

血管紧张素 II-血管紧张素 II 1 型受体途径在巨噬细胞生成促炎因子中的作用

郭峰 陈旭林 王飞



【摘要】 目的 了解血管紧张素 II (Ang II)-血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)途径在介导巨噬细胞促炎因子产生中的作用和初步机制。方法 采用随机数字表法,将体外培养的小鼠单核巨噬细胞株 RAW 264.7 分为 4 组,每组 3 个培养皿,均采用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液培养。(1)空白对照组:常规培养 6 h,不加任何刺激因素。(2)ZD7155 组:预先用含 38 $\mu\text{mol/L}$ 特异性 AT1R 拮抗剂 ZD7155 的培养液作用细胞 1 h,换液后培养 6 h。(3)Ang II 组:用含 0.01 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 的培养液培养 6 h。(4)ZD7155 + Ang II 组:先用含 38 $\mu\text{mol/L}$ ZD7155 的培养液处理 1 h,再改用含 0.01 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 的培养液作用 6 h。ELISA 法检测各组细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 含量,RT-PCR 法检测细胞 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达,凝胶电泳迁移率变化分析法检测细胞 NF- κ B 和激活蛋白 1(AP-1)活性。对数据进行单因素方差分析。结果 (1)Ang II 组细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 含量分别为(119 \pm 14)、(105 \pm 17)pg/mL,均显著高于空白对照组 [(24 \pm 11)、(24 \pm 6)pg/mL, F 值分别为 1.62、8.03, P 值均小于 0.01]、ZD7155 组 [(22 \pm 11)、(25 \pm 8)pg/mL, F 值分别为 1.62、4.52, P 值均小于 0.01]以及 ZD7155 + Ang II 组 [(45 \pm 13)、(62 \pm 11)pg/mL, F 值分别为 1.16、2.29, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。(2)Ang II 组细胞 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平均显著高于空白对照组 (F 值分别为 7.59、3.38, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、ZD7155 组 (F 值分别为 10.66、2.24, P 值均小于 0.05)和 ZD7155 + Ang II 组 (F 值分别为 5.10、5.09, P 值均小于 0.01)。(3)Ang II 组细胞内转录因子 NF- κ B 和 AP-1 活性分别为 69 027 \pm 2502、36 752 \pm 2055,均显著高于空白对照组 (45 709 \pm 1203、20 325 \pm 2695, F 值分别为 4.32、1.72, P 值均小于 0.01)、ZD7155 组 (46 303 \pm 1897、21 951 \pm 2517, F 值分别为 1.74、1.50, P 值均小于 0.01)和 ZD7155 + Ang II 组 (38 271 \pm 690、22 365 \pm 3797, F 值分别为 13.13、3.41, P 值均小于 0.01)。结论 Ang II 与 AT1R 结合可以介导巨噬细胞内转录因子 NF- κ B 和 AP-1 活化,从而促进 TNF- α 和 IL-1 β 的产生及释放。

【关键词】 血管紧张素 II; 受体,血管紧张素,1 型; 巨噬细胞; 促炎因子

Role of angiotensin II-angiotensin II type 1 receptor pathway in the production of proinflammatory cytokines in macrophage GUO Feng, CHEN Xu-lin, WANG Fei. Department of Burns, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: CHEN Xu-lin, Email: okcxl@126.com, Tel: 0551-2922332

【Abstract】 Objective To investigate the role of angiotensin II (Ang II)-angiotensin II type 1 receptor (AT1R) pathway in the production of proinflammatory cytokines in macrophage, and to analyze its mechanisms. **Methods** RAW264.7 macrophages were cultured in vitro in DMEM nutrient medium containing 10% FBS, and then they were divided into control group (ordinary culture for 6 hours without any stimulation), ZD7155 group (pretreated with 38 $\mu\text{mol/L}$ AT1R-specific inhibitor ZD7155 for 1 hour, then cultured with fresh nutrient solution for 6 hours), Ang II group (cultured with 0.01 $\mu\text{mol/L}$ Ang II for 6 hours), and ZD7155 + Ang II group (pretreated with 38 $\mu\text{mol/L}$ AT1R-specific inhibitor ZD7155 for 1 hour, then cultured with 0.01 $\mu\text{mol/L}$ Ang II for 6 hours) according to the random number table. Contents of TNF- α and IL-1 β in the supernatant were measured by ELISA. Expressions of TNF- α mRNA and IL-1 β mRNA were determined by RT-PCR. Activity of NF- κ B and AP-1 were examined by electrophoretic mobility

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.02.003

基金项目:国家自然科学基金(30872687);安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2008A159)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院烧伤科

通信作者:陈旭林,Email:okcxl@126.com,电话:0551-2922332

shift assay. Data were processed with one-way analysis of variance. **Results** Compared with those in Ang II group [(119 ± 14), (105 ± 17) pg/mL, respectively], the levels of TNF-α and IL-1β in the supernatant in control group [(24 ± 11), (24 ± 6) pg/mL, with *F* value respectively 1.62, 8.03, *P* values all below 0.01], ZD7155 group [(22 ± 11), (25 ± 8) pg/mL, with *F* value respectively 1.62, 4.52, *P* values all below 0.01], and ZD7155 + Ang II group [(45 ± 13), (62 ± 11) pg/mL, with *F* value respectively 1.16, 2.29, *P* < 0.05 or *P* < 0.01] were all obviously decreased. The expressions of TNF-α mRNA and IL-1β mRNA, and activity of NF-κB and AP-1 showed the similar changes as above: (1) The levels of TNF-α mRNA and IL-1β mRNA in Ang II group were all higher than those in control group (with *F* value respectively 7.59, 3.38, *P* < 0.05 or *P* < 0.01), ZD7155 group (with *F* value respectively 10.66, 2.24, *P* values all below 0.05), and ZD7155 + Ang II group (with *F* value respectively 5.10, 5.09, *P* values all below 0.01). (2) Activity of NF-κB and AP-1 was respectively 69 027 ± 2502, 36 752 ± 2055 in Ang II group, all higher than those in control group (45 709 ± 1203, 20 325 ± 2695, with *F* value respectively 4.32, 1.72, *P* values all below 0.01), ZD7155 group (46 303 ± 1897, 21 951 ± 2517, with *F* value respectively 1.74, 1.50, *P* values all below 0.01), and ZD7155 + Ang II group (38 271 ± 690, 22 365 ± 3797, with *F* value respectively 13.13, 3.41, *P* values all below 0.01). **Conclusions** Ang II can mediate activation of transcription factor NF-κB and AP-1 via combination of AT1R, thereby contributing to the production and release of proinflammatory cytokines TNF-α and IL-1β in macrophage.

[Key words] Angiotensin II; Receptor, angiotensin, type 1; Macrophages; Proinflammatory cytokine

血管紧张素 II (Ang II) 是肾素-血管紧张素系统 (RAS) 主要生物活性成分, 在血管张力和细胞生长、迁移、凋亡以及炎症反应中发挥重要作用^[1]。在许多急性病理状态下, 循环系统和局部组织的 Ang II 水平明显增高, RAS 在介导肾脏、心脏和肺脏等组织器官炎症反应中起着关键性作用^[2-3]。近年来研究显示, Ang II 与细胞表面的血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 结合后, 调节细胞因子、化学趋化因子和黏附分子等炎症介质的表达, 参与一些炎症相关疾病的发生和发展^[4]。本研究中, 笔者观察 Ang II-AT1R 途径在介导巨噬细胞促炎因子产生和释放中的作用及初步机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞株由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供。将细胞接种于直径 9 cm 培养皿中, 采用 DMEM 培养液 (法国 Biowest 公司, 此处及后续所用 DMEM 培养液均含体积分数 10% FBS, 以下简称培养液), 置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞生长达 80% 融合时用于实验。

1.2 实验分组

按照随机数字表法, 将 RAW 264.7 细胞分为 4 个实验组, 每组 3 皿。(1) 空白对照组: 用培养液培养 6 h; (2) ZD7155 组: 预先用含 38 μmol/L 特

性 AT1R 拮抗剂 ZD7155 (美国 Tocris 公司) 的培养液作用细胞 1 h, 再更换为新鲜培养液培养 6 h; (3) Ang II 组: 用含 0.01 μmol/L Ang II (美国 Sigma 公司) 的培养液培养细胞 6 h; (4) ZD7155 + Ang II 组: 预先用含 38 μmol/L ZD7155 的培养液培养细胞 1 h, 再改用含 0.01 μmol/L Ang II 的培养液作用 6 h。处理结束后, 分别收集各组细胞及其培养上清液待检。

1.3 培养上清液中 TNF-α 和 IL-1β 含量测定

采用 ELISA 法检测, 试剂盒购自上海天齐生物科技有限公司, 按照说明书操作。

1.4 细胞中 TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达的检测

按表 1 合成 TNF-α、IL-1β 和 GAPD 特异性片段扩增的寡核苷酸引物。采用美国 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA, 按美国 Promega 公司 RT-PCR 试剂盒说明书操作, 扩增反应条件见表 1。测定结果用灰度值表示。

表 1 引物和反应条件

| 基因名称 | 引物序列 | 引物长度 | 反应条件 |
|-------|-------------------------------------|--------|--------------|
| TNF-α | 上游: 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3' | 300 bp | 60 ℃, 28 个循环 |
| | 下游: 5'-GGCAGGCTACTTTGGAGTCTTGC-3' | | |
| IL-1β | 上游: 5'-CTCGGAGCCTGTACTGCAG-3' | 382 bp | 61 ℃, 30 个循环 |
| | 下游: 5'-GCAACTGTTCTGAACTCA-3' | | |
| GAPD | 上游: 5'-AGCGAGACCCCACTAACA-3' | 263 bp | 58 ℃, 28 个循环 |
| | 下游: 5'-GGGGCTAAGCAGTTGCTG-3' | | |

1.5 细胞内 NF-κB 和激活蛋白 1 (AP-1) 活性检测

采用凝胶电泳迁移率变化分析 (EMSA) 法测定。Gel Shift Assay 试剂盒购自美国 Promega 公司, 按照说明书进行操作, 最后用计算机对自显影条带进行灰度扫描, 结果用灰度值表示。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 培养上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 含量

Ang II 组细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 含量均显著高于空白对照组 (F 值分别为 1.62、8.03, P 值均小于 0.01)、ZD7155 组 (F 值分别为 1.62、4.52, P 值均小于 0.01) 和 ZD7155 + Ang II 组 (F 值分别为 1.16、2.29, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。ZD7155 + Ang II 组 TNF- α 和 IL-1 β 含量高于空白对照组 (F 值各为 1.40、3.36, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

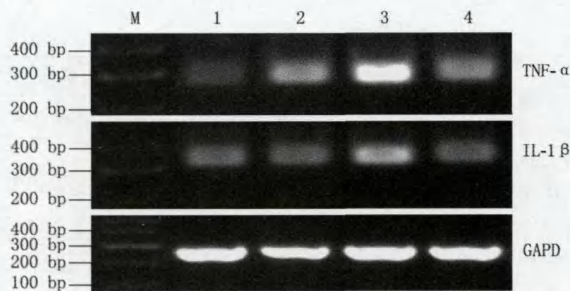
表 2 各组 RAW 264.7 细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | TNF- α | IL-1 β |
|-------------------|-----|---------------------------|---------------------------|
| 空白对照组 | 3 | 24 \pm 11 ^d | 24 \pm 6 ^d |
| ZD7155 组 | 3 | 22 \pm 11 ^d | 25 \pm 8 ^d |
| Ang II 组 | 3 | 119 \pm 14 | 105 \pm 17 |
| ZD7155 + Ang II 组 | 3 | 45 \pm 13 ^{ad} | 62 \pm 11 ^{bc} |

注:ZD7155 为血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂;Ang II 为血管紧张素 II;与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 Ang II 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

2.2 细胞内 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平

Ang II 组细胞内 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平均显著高于空白对照组 (F 值分别为 7.59、3.38, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、ZD7155 组 (F 值分别为 10.66、2.24, P 值均小于 0.05) 以及 ZD7155 + Ang II 组 (F 值分别为 5.10、5.09, P 值均小于 0.01)。ZD7155 + Ang II 组细胞 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平与空白对照组比较,差异无统计学意义 (F 值分别为 1.49、1.51, P 值均大于 0.05)。见图 1,表 3。



注:M. marker; 1. 空白对照组; 2. ZD7155 组; 3. Ang II 组; 4. ZD7155 + Ang II 组; ZD7155 为血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂; Ang II 为血管紧张素 II

图 1 RT-PCR 测定各组 RAW 264.7 细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达

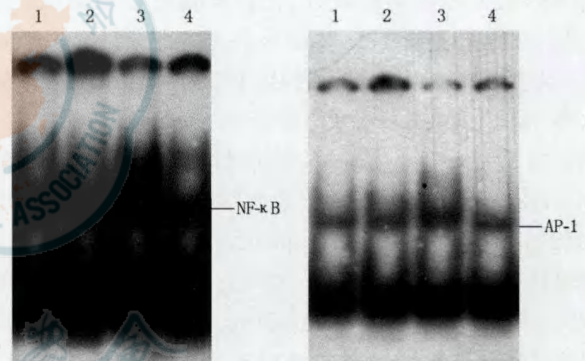
表 3 各组 RAW 264.7 细胞 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | TNF- α mRNA | IL-1 β mRNA |
|-------------------|-----|---------------------------------|---------------------------------|
| 空白对照组 | 3 | 21 788 \pm 1 874 ^a | 20 498 \pm 1 166 ^b |
| ZD7155 组 | 3 | 25 447 \pm 1 581 ^a | 21 145 \pm 1 433 ^a |
| Ang II 组 | 3 | 37 481 \pm 5 162 | 31 151 \pm 2 143 |
| ZD7155 + Ang II 组 | 3 | 24 774 \pm 2 286 ^b | 20 098 \pm 950 ^b |

注:表中数据为灰度值;ZD7155 为血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂; Ang II 为血管紧张素 II;与 Ang II 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2.3 NF- κ B 和 AP-1 活性

Ang II 组细胞内转录因子 NF- κ B 和 AP-1 活性均显著高于空白对照组 (F 值分别为 4.32、1.72, P 值均小于 0.01)、ZD7155 组 (F 值分别为 1.74、1.50, P 值均小于 0.01) 和 ZD7155 + Ang II 组 (F 值分别为 13.13、3.41, P 值均小于 0.01)。ZD7155 + Ang II 组细胞内 NF- κ B 和 AP-1 活性与空白对照组比较,差异无统计学意义 (F 值分别为 3.04、1.98, P 值均大于 0.05)。见图 2,表 4。



注:1. 空白对照组; 2. ZD7155 组; 3. Ang II 组; 4. ZD7155 + Ang II 组; AP-1 为激活蛋白 1; ZD7155 为血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂; Ang II 为血管紧张素 II

图 2 凝胶电泳迁移率变化分析法测定 RAW 264.7 细胞中 NF- κ B 和 AP-1 转录活性

表 4 各组 RAW 264.7 细胞 NF- κ B 和激活蛋白 1 转录活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | NF- κ B | 激活蛋白 1 |
|-------------------|-----|---------------------------------|---------------------------------|
| 空白对照组 | 3 | 45 709 \pm 1 203 ^a | 20 325 \pm 2 695 ^a |
| ZD7155 组 | 3 | 46 303 \pm 1 897 ^a | 21 951 \pm 2 517 ^a |
| Ang II 组 | 3 | 69 027 \pm 2 502 | 36 752 \pm 2 055 |
| ZD7155 + Ang II 组 | 3 | 38 271 \pm 690 ^a | 22 365 \pm 3 797 ^a |

注:表中数据为灰度值;ZD7155 为血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂; Ang II 为血管紧张素 II;与 Ang II 组比较,^a $P < 0.01$

3 讨论

研究表明,Ang II 除了在调节血管张力、血流及促进细胞生长增殖等方面起重要作用外,还可通过直接激活炎症细胞,促进该类细胞聚集,增加炎症因

子的产生,参与炎症反应的发生和发展。炎症介质过度表达是炎症失控的主要原因。因此,Ang II 在炎症性损伤中的作用近年来备受关注。

促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 在细胞因子网络中起着重要作用,是激活细胞级联反应的主要介质。在脓毒症、急性胰腺炎和缺血再灌注损伤等动物模型中,血清 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高,且与病情严重程度和预后有关^[5]。在本实验中笔者观察到,RAW 264.7 细胞经 Ang II 单独刺激后,培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 含量及细胞内 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达水平均明显增加,表明 Ang II 可诱导巨噬细胞促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的产生和释放。

在许多炎症病理状态(如脓毒症)下,循环系统和局部组织中 Ang II 水平均明显增高^[6],而 Ang II 可反过来介导炎症因子的产生和释放,促进炎症反应发生和发展。因此,炎症反应与 Ang II 可相互促进,形成恶性循环,导致炎症反应失控。提示 Ang II 可能是炎症反应复杂网络中的一个重要组成部分。然而,Ang II 必须与其相应受体结合后才能发挥生物学效应。研究表明,Ang II 与其 1 型和 2 型受体结合后的信号转导机制不同,介导的生物学效应迥异。为进一步探讨 Ang II 激活炎症的受体信号转导机制,笔者采用特异性 AT1R 拮抗剂 ZD7155 进行干预。结果显示,预先加入 ZD7155 作用后再用 Ang II 刺激,巨噬细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 含量较单独用 Ang II 刺激后明显下降,细胞内 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达被明显抑制,表明 AT1R 参与了 Ang II 诱导巨噬细胞产生和释放 TNF- α 及 IL-1 β 的效应。这为采用 AT1R 拮抗剂治疗炎症相关性疾病提供了实验依据。

NF- κ B 是由 Rel/NF- κ B 家族的多肽成员组成的真核细胞核转录因子。当细胞受到 NF- κ B 的诱导剂刺激,细胞质中的 κ B 抑制蛋白(I κ B)激酶被激活,I κ B α 被泛素化和降解,胞质内游离的 NF- κ B 移位至胞核,与细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 靶基因中启动子区域的 NF- κ B 结合位点“GGGRNYYCC”相结

合,启动靶基因转录^[7],从而生成 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA。AP-1 属碱性亮氨酸拉链转录因子,是调控 TNF- α 和 IL-1 β 产生的另一重要转录因子,在 TNF- α 和 IL-1 β 基因的启动子区存在 AP-1 结合位点^[8]。

本研究中,Ang II 刺激导致巨噬细胞 NF- κ B 和 AP-1 活性明显增加,AT1R 拮抗剂 ZD7155 对此有显著抑制作用。这一结果表明,Ang II 通过活化巨噬细胞内转录因子 NF- κ B 和 AP-1,促进 TNF- α 和 IL-1 β 的产生和释放,这一促炎作用主要是通过 AT1R 介导的。但是,参与该活化效应的胞质蛋白尚不清楚,Ang II 和其他炎症介质的细胞内信号转导通路之间是否存在交叉效应,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*, 2007,13(8 Suppl B):S9-20.
- [2] Santiago OI, Rivera E, Ferder L, et al. An angiotensin II receptor antagonist reduces inflammatory parameters in two models of colitis. *Regul Pept*, 2008,146(1/2/3):250-259.
- [3] Nyby MD, Abedi K, Smutko V, et al. Vascular angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res*, 2007,30(5):451-457.
- [4] Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 2006,98(1):121-128.
- [5] Dong X, Liu Y, Du M, et al. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates pulmonary inflammatory response in a rat cardiopulmonary bypass model. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006,30(1):77-84.
- [6] Salgado DR, Rocco JR, Silva E, et al. Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in sepsis: a new therapeutic approach? *Expert Opin Ther Targets*, 2010,14(1):11-20.
- [7] Konia MR, Schaefer S, Liu H. Nuclear factor-[kappa]B inhibition provides additional protection against ischaemia/reperfusion injury in delayed sevoflurane preconditioning. *Eur J Anaesthesiol*, 2009,26(6):496-503.
- [8] Streicher KL, Willmarth NE, Garcia J, et al. Activation of a nuclear factor kappaB/interleukin-1 positive feedback loop by amphiregulin in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res*, 2007,5(8):847-861.

(收稿日期:2010-10-20)

(本文编辑:罗勤)

· 烧伤感染与免疫进展链接 ·

应用可释放一氧化氮的纳米微粒治疗创面鲍氏不动杆菌感染

临床分离的鲍氏不动杆菌菌株常对多种抗菌药物耐药,给治疗带来极大困难。作者应用可释放一氧化氮的纳米微粒(NO-np)治疗小鼠创面鲍氏不动杆菌感染,结果观察到 NO-np 能够减轻化脓性炎症,减少微生物与胶原蛋白降解,显著加快鲍氏不动杆菌感染创面的愈合。此外,NO-np 还改变了局部的细胞因子环境。实验证明 NO-np 能够治疗创面鲍氏不动杆菌感染,是一种方便、疗效确切的创面外用药。

唐佳俊,编译自《Virulence》,2010,1(2):62-67;郇京宁,审校