

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.030.html>

替米沙坦对小鼠巨噬细胞 M1/M2 亚型极化的影响

邢亦明¹, 胡泽平¹, 王邦宁¹, 周青², 汪渊²

摘要 目的 探讨替米沙坦对小鼠巨噬细胞 M1/M2 亚型极化的影响。方法 分别用脂多糖(LPS)联合干扰素- γ (IFN- γ)和白介素-4(IL-4)诱导小鼠巨噬细胞 M1/M2 型极化,用免疫荧光法检测极化结果。在 M1 型巨噬细胞中分别加入 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 替米沙坦,同时设立空白对照组及溶剂对照组,Western blot 法检测各组巨噬细胞亚型标志物诱导性一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶 I(Arg I)的表达情况,ELISA 法检测各组培养液上清中 IL-6、IL-10 表达情况。结果 在 LPS + IFN- γ 诱导的小鼠巨噬细胞中 M1 型巨噬细胞

标志物 iNOS、IL-6 的表达水平明显升高,替米沙坦干预后,各干预组 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS、IL-6 的表达水平下降($P < 0.05$)。随着替米沙坦浓度的增加而降低,而代表 M2 型巨噬细胞标志物的 Arg I 和 IL-10 表达水平上升($P < 0.05$)。结论 替米沙坦可以抑制 LPS + IFN- γ 诱导的小鼠巨噬细胞 M1 型极化,促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞转化。

关键词 替米沙坦;巨噬细胞 M1/M2 型极化;炎症

中图分类号 R 392

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)07-0989-05

2016-04-21 接收

基金项目 高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20123420120005);安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2012A147)

作者单位 ¹安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

²安徽医科大学分子生物学实验室,合肥 230032

作者简介 邢亦明,女,硕士研究生;

王邦宁,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wangbangning@medmail.com.cn;

胡泽平,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 1431318679@qq.com

替米沙坦是一种新型血管紧张素 II 受体拮抗剂,广泛应用于临床冠心病、高血压等心血管疾病的治 疗,其不仅有拮抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统、改善心肌重构、改善血管内皮功能等心血管保护作用,更有抗炎、抗动脉粥样硬化作用^[1]。动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,巨噬细胞在其中扮演了重要角色^[2]。近年来,通过调节巨噬细胞功能影响动脉粥样硬化发生发展的研究受到广泛关注。

tion factor RAP30[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91(21): 9808-12.

[10] Sawadogo M, Sentenac A. RNA polymerase B (II) and general

transcription factors[J]. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 711-54.

[11] Sentenac A. Eukaryotic RNA polymerases[J]. *CRC Crit Rev Biochem*, 1985, 18(1): 31-90.

The effect of general transcription factor GTF II F2 expression on the proliferation and migration of esophageal cancer cells

Chen Dandan, Geng Huiwu, Pan Linxin, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of general transcription factor GTF II F2 expression on the proliferation and migration of esophageal cancer cells. **Methods** Synthesized siRNA targeted to GTF II F2 gene or negative control siRNA and plasmid pcDNA3.1-GTF II F2-FLAG were transfected to esophageal cancer cells respectively by using LipofectamineTM 2000. Colony formation assay and wound-healing assay were performed to study the effect of knockdown and overexpression of GTF II F2 expression on the proliferation and migration of esophageal cancer cells respectively. **Results** Knockdown of GTF II F2 inhibited the proliferation and migration in TE-1, ECA-109 cells, but overexpression of GTF II F2 had no significant effect on cell proliferation and migration. **Conclusion** GTF II F2 gene plays an important role in the proliferation and migration of TE-1, ECA-109 cells. It is useful for further understanding of the mechanism that GTF II F2 inhibits the proliferation and migration of TE-1, ECA-109 cells.

Key words GTF II F2; gene expression; RNA interference; cell proliferation; cell migration

研究^[3]显示,巨噬细胞在不同的微环境下可以分化为 M1 和 M2 两种亚型,称为巨噬细胞极化。M1 型巨噬细胞高表达诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthases, iNOS)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等,有促炎、促动脉粥样硬化作用; M2 型巨噬细胞高表达精氨酸酶 I(arginase I, Arg I)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)等,有抗炎、抗动脉粥样硬化作用。然而,替米沙坦是否能够调节巨噬细胞 M1/M2 型极化,目前尚不清楚。该研究探讨替米沙坦对小鼠巨噬细胞 M1/M2 型极化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由中国科学技术大学生命科学院馈赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 替米沙坦购于上海勃林格殷格翰药业有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM 高糖培养基购于美国 Gibco 公司;脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)购于美国 Sigma 公司;IL-4 和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)均购于美国 Peprotech 公司;兔 Arg I 多抗和 β -actin 单抗购于美国 Santa Cruz 公司;兔 iNOS 多抗购于美国 Abcam 公司;其余相应二抗及免疫荧光试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;BCA 定量试剂盒、ECL 显色试剂盒均购于美国 Pierce 公司;IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒均购于北京四正柏科技有限公司;免疫荧光照片均使用 Leica DM4000B 拍摄。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和传代 用含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 链霉素、100 μ g/ml 青霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺的高糖 DMEM 培养基培养细胞,细胞培养瓶置入 5% CO₂、37 °C 培养箱中,当细胞密度为 90%~95% 并处于对数生长期时,用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 免疫荧光法检测巨噬细胞 M1/M2 亚型极化 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板,设立 M1 组和 M2 组,分别在 M1 组和 M2 组加入 LPS 200 ng/ml + IFN- γ 20 ng/ml 和 IL-4 15 ng/ml 共培养 12 h,同时设立空白对照组(M ϕ 组),取出盖玻片,用预冷的 PBS 溶液清洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 溶液清洗 3 遍;后用 0.3% 聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)透化细胞膜 10 min, PBS 冲洗 3 遍;用含 1% BSA 的 PBS 封闭 30 min,弃封闭

液,加入 iNOS 一抗和 Arg I 一抗(1:200,用封闭液配制),4 °C 过夜, PBS 洗 3 遍;再加入 FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 二抗(1:100, PBS 配制),室温孵育 1 h,弃二抗, PBS 冲洗 3 遍,再加入 0.5 μ g/ml DAPI 染核 10 min,弃 DAPI, PBS 冲洗 3 遍,最后用荧光淬灭剂封片,荧光显微镜观察结果并拍照。

1.2.3 Western blot 法检测 iNOS、Arg I 的表达 复苏 RAW264.7 细胞,按照上述方法进行培养及传代,待细胞稳定传代后,加入 LPS 200 ng/ml + IFN- γ 20 ng/ml 培养 12 h,后加入替米沙坦 0.1、1、10 μ mol/L(替米沙坦用 DMSO 溶解),并设立空白对照组和溶剂对照组。共培养 24 h 后, PBS 洗涤 3 次,每瓶加入 200 μ l RIPA 蛋白提取液,冰上放置 30 min,刮取细胞,移入 1.5 ml 预冷 EP 管中,反复冻融 3 次,14 000 r/min 离心 30 min,将上清液移入另一个 1.5 ml EP 管中。BCA 法测定总蛋白浓度并将所有样本调整至相同浓度,加入 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液,混匀后煮沸变性,-80 °C 保存备用。配制 12.5% SDS-PAGE,加入等量样本后电泳,电泳结束将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗(iNOS、Arg I、 β -actin)4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤,二抗室温孵育 2 h,洗涤后在暗室内加 ECL,覆盖上 X 线片、显影、定影。底片扫描后用 Quantity One 分析灰度值。

1.2.4 ELISA 法检测细胞上清液 IL-6、IL-10 水平

收集各培养瓶细胞培养上清液,根据说明书步骤使用 ELISA 法检测上清液 IL-6、IL-10 水平,酶标仪检测吸光度值,标准曲线计算活性。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均值比较采用 t 检验,多组间均值比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外诱导小鼠巨噬细胞 M1/M2 亚型极化结果 M1 组 iNOS 的表达水平相对于 M ϕ 组和 M2 组均明显升高($P < 0.05$) (图 1),而 M2 组 Arg I 表达水平明显高于 M ϕ 组及 M1 组($P < 0.05$) (图 2),结果提示体外巨噬细胞极化造模成功。

2.2 替米沙坦对 M1 型巨噬细胞 iNOS 和 Arg I 表达的影响 在 M1 型巨噬细胞中加入不同浓度(0.1、1、10 μ mol/L)替米沙坦干预 24 h 后,与空白对照组比较,替米沙坦干预各组 iNOS 表达水平明

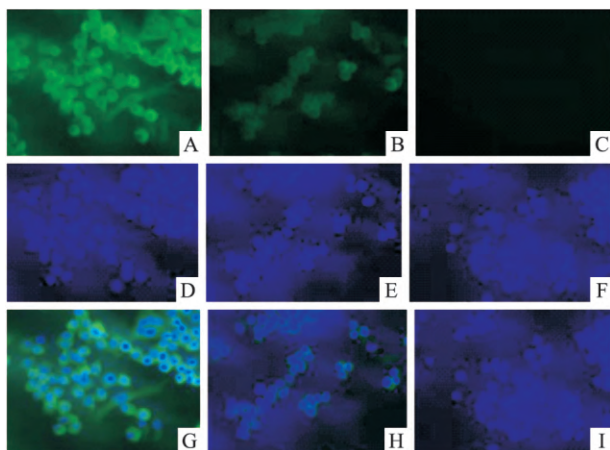


图1 M1组、Mφ组、M2组 iNOS 表达情况 免疫荧光 ×400

A: iNOS 在 M1 组细胞中的表达情况; B: iNOS 在 Mφ 组中的表达情况; C: iNOS 在 M2 组中的表达情况; D: M1 组中细胞核染色; E: Mφ 组中细胞核染色; F: M2 组中细胞核染色; G: A、D 合成图; H: B、E 合成图; I: C、F 合成图

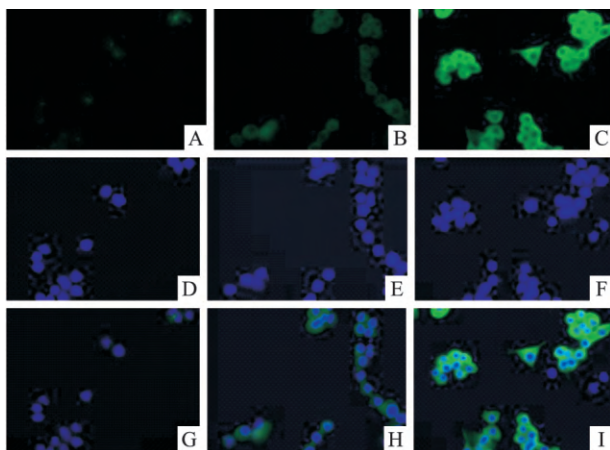


图2 M1组、Mφ组、M2组 Arg I 表达情况 免疫荧光 ×400

A: Arg I 在 M1 组细胞中的表达情况; B: Arg I 在 Mφ 组中的表达情况; C: Arg I 在 M2 组中的表达情况; D: M1 组中细胞核染色; E: Mφ 组中细胞核染色; F: M2 组中细胞核染色; G: A、D 合成图; H: B、E 合成图; I: C、F 合成图

显下降,随着替米沙坦浓度的增加,iNOS 表达水平明显降低($F=51.893$, $P<0.05$)。同时,与空白对照组相比,替米沙坦干预各组 Arg I 表达水平明显上升,随着替米沙坦浓度的增加,Arg I 表达水平明显上升($F=10.090$, $P<0.05$)。见图3。

2.3 替米沙坦对巨噬细胞培养上清液 IL-6 水平的影响 与 Mφ 比较, M1 组上清液中 IL-6 水平明显增加($P<0.01$); M1 组与 M1 + DMSO 组比较,差异无统计学意义;与 M1 组比较,替米沙坦干预组 IL-6 水平明显下降,随着替米沙坦的浓度增加,IL-6 水平进一步降低($F=49.871$, $P<0.05$)。见图4。

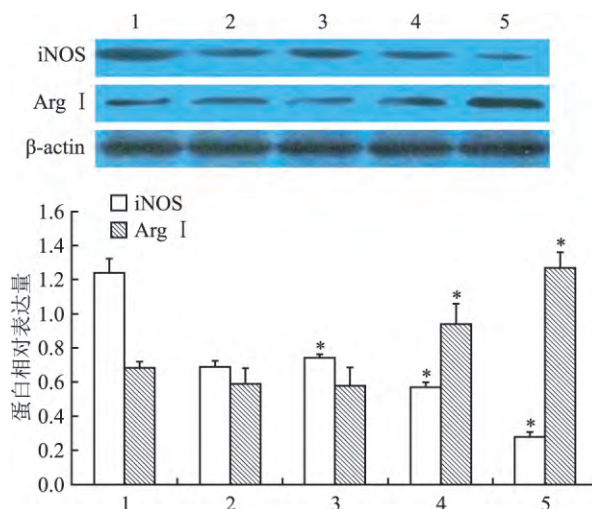


图3 Western blot 法检测 iNOS、Arg I 蛋白表达

1: 空白对照组 (M1); 2: 溶剂对照组 (M1 + DMSO); 3: M1 + 0.1 μmol/L 替米沙坦组; 4: M1 + 1 μmol/L 替米沙坦组; 5: M1 + 10 μmol/L 替米沙坦组; 与空白对照组比较: * $P<0.05$

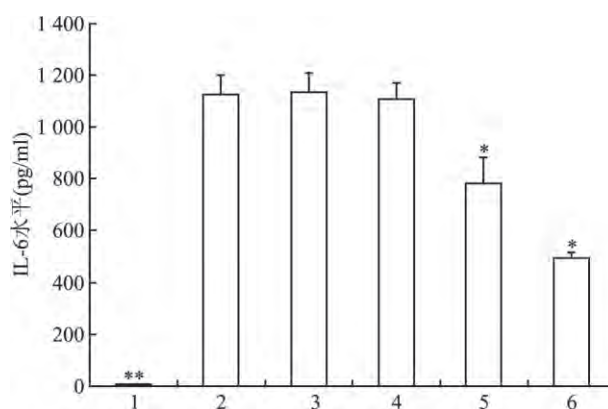


图4 细胞培养上清液中 IL-6 水平

1: Mφ 组; 2: M1 组; 3: M1 + DMSO 组; 4: M1 + 0.1 μmol/L 替米沙坦组; 5: M1 + 1 μmol/L 替米沙坦组; 6: M1 + 10 μmol/L 替米沙坦组; 与 M1 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.4 替米沙坦对巨噬细胞培养上清液 IL-10 水平的影响 Mφ 组、M1 + DMSO 组和 M1 组细胞培养上清液中 IL-10 水平差异无统计学意义;与 M1 组比较,替米沙坦干预组细胞培养上清液中 IL-10 水平均升高,随着替米沙坦的浓度增加,IL-10 水平进一步升高($F=6652.236$, $P<0.01$)。见图5。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种全身性的疾病,是多种心脑血管疾病的病理基础,亦是急性心脑血管事件的罪魁祸首,严重危害人类健康。随着人民生活水平的提高,动脉粥样硬化发病率呈逐年递增趋势且呈现年轻化。在动脉粥样硬化的形成机制中,炎症反

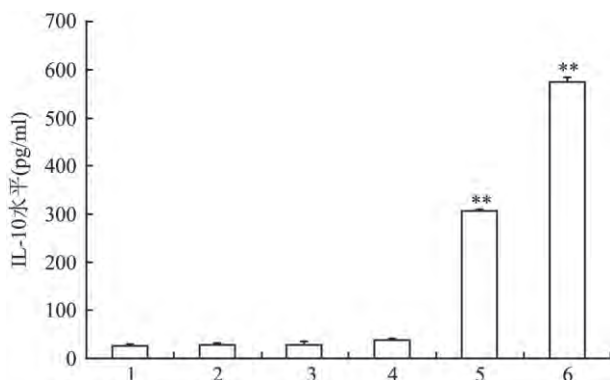


图5 细胞培养上清液中 IL-10 水平

1: Mφ 组; 2: M1 组; 3: M1 + DMSO 组; 4: M1 + 0.1 μmol/L 替米沙坦组; 5: M1 + 1 μmol/L 替米沙坦组; 6: M1 + 10 μmol/L 替米沙坦组; 与 M1 组比较: ** $P < 0.01$

应被证实参与了动脉粥样硬化的发生、发展及转归^[2]。多种免疫细胞参与了动脉粥样硬化的炎症反应,其中单核细胞募集是动脉粥样硬化炎症反应中的早期事件,进入内皮下的单核细胞转化为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫细胞,成为粥样斑块形成的基础^[4]。然而,巨噬细胞有异质性的特点,即根据局部微环境的不同起到促炎或抗炎的作用,称之为巨噬细胞极化。最经典的分型为通过经典途径激活的 M1 型和通过选择性途径激活的 M2 型, M1 型巨噬细胞高表达 iNOS、IL-6、IL-1 β 、IL-23、肿瘤细胞因子- α 等,有促炎及促动脉粥样硬化形成的作用; M2 型巨噬细胞高表达 Arg I、IL-10、转化生长因子- β 等,有抗炎和抗动脉粥样硬化的作用^[3];两者均存在于粥样斑块中,呈现动态平衡,可以相互转化^[5]。研究^[6]显示,巨噬细胞亚型与斑块的稳定性相关,在不稳定性斑块中, M1 型巨噬细胞占主导地位;而在稳定斑块中,更多表现为 M2 型巨噬细胞;在易损的斑块肩部, M1 型巨噬细胞个数远多于 M2 型巨噬细胞,而在相对稳定的纤维帽中, M1 型巨噬细胞与 M2 型巨噬细胞数目相似,相对于巨噬细胞的绝对个数而言,亚型所占的比例对斑块的稳定性影响更大^[7]。

本研究就经典的巨噬细胞极化分型为理论基础,采用小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 进行细胞培养,分别给予 LPS + IFN- γ 、IL-4 进行极化造模,在诱导极化的同时加入不同浓度替米沙坦进行干预,研究结果可见替米沙坦对 M1 型巨噬细胞表面标志物 iNOS、IL-6 的表达有抑制作用,随着替米沙坦浓度的增加, iNOS、IL-6 的表达水平进一步下降,差异有

统计学意义。同时检测 Arg I、IL-10,与 M1 组比较,替米沙坦干预组 Arg I、IL-10 的表达水平明显增加,随着替米沙坦浓度的增加, Arg I、IL-10 的表达水平进一步增加,差异有统计学意义。提示,替米沙坦有抑制巨噬细胞向 M1 型分化的作用,随着浓度的增加,其抑制作用进一步增强,有诱导 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞转化的趋势。

巨噬细胞极化受多种信号通路及转录因子调控^[8]。其中,过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) 是一种在巨噬细胞中高表达的核受体,参与脂质代谢和阻止动脉粥样硬化的进程。PPAR- γ 在 IL-4 诱导的巨噬细胞中通过 STAT-6 途径高表达,可通过抑制 NF- κ B 途径和 AP-1 途径表达抗炎物质,是一种影响 M2 型巨噬细胞极化的重要转录因子^[9]。M2 型巨噬细胞表面标记物的表达与 PPAR- γ 呈正相关, PPAR- γ 的活化可以促使单核细胞向 M2 巨噬细胞的分化^[10]。替米沙坦有选择性激活 PPAR- γ 作用。本课题组前期研究^[11]表明替米沙坦通过促进 PPAR- γ 的表达保护血管内皮,抑制动脉粥样硬化进展。推测替米沙坦可能通过促进 PPAR- γ 表达,促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型转化。

综上所述,替米沙坦对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 M1 型极化有着抑制作用,促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型转化,为替米沙坦的抗动脉粥样硬化作用提供了可能的新机制。

参考文献

- [1] Hu Z P, Wang B N, Qian H Y, et al. Fixed-dose telmisartan/hydrochlorothiazide in comparison with losartan/hydrochlorothiazide in decreasing serum hepatocyte growth factor and improving endothelial dysfunction in hypertensive patients [J]. Int Heart J, 2010, 51(4): 252-8.
- [2] Sloop G D. Atherosclerosis - an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(24): 1928.
- [3] Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis [J]. Immunol Rev, 2014, 262(1): 153-66.
- [4] Libby P, Ridker P M, Hansson G K. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(23): 2129-38.
- [5] van Tits L J, Stienstra R, van Lent P L, et al. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2 [J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2): 345-9.
- [6] Lee C W, Hwang I, Park C S, et al. Macrophage heterogeneity of culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction [J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2): 345-52.

(下转第 997 页)

inal results were divided into 7 groups. The effects of different degree of analytic variation in sCr measurement on eGFR and classification of CKD using eGFR were evaluated. **Results** When sCr was in the range of $URL \pm 12\% \times URL$, creatinine increased with age, on the contrary, eGFR decreased with age ($P < 0.05$). The mean bias of the results of eGFR compared with the original results of eGFR was increased with the analytic variation of sCr. When the results of sCr had a reverse analytic bias of 12%, the results of eGFR had a forward bias of 16.73%. When sCr results had a forward analytic bias of 12%, the male patients in stage G3 (eGFR in $30 \sim 59 \text{ ml/min/1.73 m}^2$), according to the classification of CKD using eGFR, increased about 20%; while women in this stage could increase by nearly 30%. When sCr results had a reverse analytic bias of 12%, the percentage of female patients in stage G3 could decrease from 38.65% to 10.42%; while male patients could decrease by 7%. **Conclusion** The analytic variation of creatinine change in laboratory testing tolerance range can cause large shift in the distribution of eGFR, which can cause change in the classification of patients. The correct eGFR report relies on the accurate detection of sCr. Routine reporting of eGFR alongside creatinine should pay attention to the detection accuracy of sCr.

Key words eGFR; creatinine; analytic variation; CKD

(上接第 992 页)

- tion or stable angina[J]. *Am J Clin Pathol*, 2013, 139(3): 317–22.
- [7] Stöger J L, Gijbels M J, van der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis* 2012 225(2): 461–8.
- [8] Federica D P, Bart S, Giulia C G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis[J]. *Circ J*, 2014, 78(8): 1775–81.
- [9] Babaev V R, Yancey P G, Ryzhov S V, et al. Conditional knockout of macrophage PPARγ increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 25: 1647–53.
- [10] El Hadri K, Mahmood D F, Couchie D, et al. Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012, 32(6): 1445–52.
- [11] Hu Z P, Fang X L, Qian H Y, et al. Telmisartan prevents angiotensin II-induced endothelial dysfunction in rabbit aorta via activating HGF/Met system and PPARγ pathway[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2014, 28(5): 501–11.

Effect of Telmisartan on mice macrophage M1/M2 polarization

Xing Yiming, Hu Zeping, Wang Bangning, et al

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To investigate the effect of Telmisartan on the M1/M2 polarization of mice macrophage. **Methods** Mice macrophage was induced to M1/M2 polarization by LPS + IFN-γ and IL-4 respectively, and tested by immunofluorescence. Meanwhile cells were treated with 0.1 μmol/L, 10 μmol/L Telmisartan, blank control group and vehicle control group were established at the same time. The biomarkers iNOS and Arg-1 were tested by Western blot, and the cytokines IL-6 and IL-10 were tested by ELISA assay. **Results** The biomarker iNOS and IL-6 secreted by M1 macrophage, were apparently increased in the macrophages induced by LPS + IFN-γ. However, after being treated with Telmisartan, the expressions of iNOS and IL-6 were obviously decreased ($P < 0.05$), as the concentration higher the expression lower. While, the expression of Arg-1 and IL-10, which represented the M2 macrophage, increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Telmisartan can inhibit the M1 polarization of mice macrophage RAW264.7 induced by LPS and IFN-γ and transform M1 macrophage polarization to M2 macrophage polarization. **Key words** Telmisartan; macrophage M1/M2 polarization; inflammation