

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.030.html>

◇ 药学研究 ◇

环靶明对 M1 型巨噬细胞分泌 iNOS 的影响

叶家宝 李 俊 徐晓军 黄 成 孟晓明

摘要 目的 研究环靶明在巨噬细胞极化过程中的作用。方法 用 100 ng/ml 脂多糖 (LPS) 和 20 ng/ml 干扰素 γ (IFN- γ) 处理 RAW264.7 24 h 刺激成 M1 型巨噬细胞, 用 20 ng/ml 白介素-4 (IL-4) 处理 RAW264.7 24 h 刺激成 M2 型巨噬细胞, 用荧光定量 PCR (QPCR) 法检测各分型中一氧化氮合成酶 (iNOS)、CD86、精氨酸酶-1 (Arg-1)、CD206、GLi1、ptch1 mRNA 水平的表达; 用 QPCR 法、Western blot 法、免疫荧光法检测加入环靶明后对 M1 型巨噬细胞分泌 iNOS 的影响。结果 M1 型巨噬细胞高分泌 iNOS、CD86、M2 型巨噬细

胞高分泌 Arg-1、CD206 ($P < 0.01$); 40 nmol/L 环靶明刺激后, M1 型巨噬细胞中 ptch1 mRNA 水平的表达明显增强且在 100 nmol/L 时达到最大值 ($P < 0.01$); 经环靶明 1 000 nmol/L 刺激后有效降低了 iNOS 的 mRNA 和蛋白水平, 可能提示环靶明会促进巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞分化。结论

环靶明能够明显地降低 M1 型巨噬细胞中 iNOS 的分泌。

关键词 环靶明; 巨噬细胞; RAW264.7; 一氧化氮合成酶

中图分类号 R 392.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1141-05

2016-05-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273526、81473268); 安徽省自然科学基金(编号: 1308085MH145); 安徽省科技专项基金(编号: 1301042212); 高等学校博士学科点专项科研基金(编号: 20123420120001)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 叶家宝, 男, 硕士研究生;

李 俊, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞之一, 通过免疫监视、免疫清除, 清除病原体, 维护内环境的稳态^[1]。在这个过程中, 巨噬细胞可在不同的生理病理状况下表现出不同的表型以调控炎症反应, 即定义为不同的极化状态。研究^[2]显示, 巨噬细胞极化与炎症相关疾病的发生发展有着密切关系, 例如类风湿性关节炎、细菌和寄生虫感染等。进一步的研

Inhibition of stromal interaction molecule 1 attenuates hypoxia/reoxygenation induced apoptosis in H9C2 cells

Jia Hongjing, Wu Jixiong, Wang Xiaochen, et al

(Dept of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in apoptosis of H9C2 cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation (H/R) injury. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were cultured, the model of H/R injury was established. STIM1-siRNA was transfected into H9C2 cardiomyocytes to implement RNA interference. The apoptotic rate was detected by flow cytometry. Western blot analysis was used to detect the expressions of STIM1 and the apoptosis related proteins in each group. **Results** Compared with the control group, the expression of STIM1 was markedly increased in H/R group ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2 was increased and the expression of Caspase-3 was up-regulated. Meanwhile, the apoptotic rate was increased ($P < 0.05$). However, inhibition of STIM1 through transfection of STIM1-siRNA resulted in significantly decreased expression of STIM1 ($P < 0.05$) and reduced influx of calcium, the ration of Bax/Bcl-2 was decreased and the expression of Caspase-3 was down-regulated, the apoptotic rate was also reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of STIM1 is significantly increased when cardiomyocytes suffered from the H/R injury. Inhibition of STIM1 through transfection of STIM1-siRNA can decrease the myocardial apoptosis after H/R injury.

Key words H9C2 cells; hypoxia/reoxygenation injury; apoptosis; stromal interaction molecule 1

究^[3]表明,巨噬细胞极化过程受到多种信号分子的调控。其中 NF- κ B 是巨噬细胞向 M1 极化过程中的关键分子。寻找内源性 NF- κ B 的调控信号分子,影响巨噬细胞极化,在疾病的防治过程中有重要的作用。研究^[4]表明多种通路可调控 NF- κ B, Hedgehog 信号通路可通过调控 NF- κ B 在胰腺癌等疾病中发挥重要作用。并且其与调节 NF- κ B 的多种通路有交叉作用。而环耙明是一种小分子化合物,并且是 Hedgehog 信号通路特异性拮抗剂,作用于该通路中的 Smo 受体。该研究旨在探讨 Hedgehog 通路对巨噬细胞极化的影响,对免疫治疗的分子机制的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系 RAW264.7 细胞由美国 ATCC 细胞库提供。细胞在常规培养基(DMEM 高糖+5%胎牛血清+100 kU/L 青霉素+100 mg/L 链霉素)在含 5% CO₂、37℃、饱和湿度恒温培养箱里培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2 药品和试剂 环耙明(美国 Selleckchem 公司); DMEM 高糖培养基(美国 HyClone 公司); PBS、RIPA 强裂解液、PMSF(上海碧云天生物技术有限公司); 4×Tris×HCl/SDS, pH 8.8、4×Tris×HCl/SDS, pH 6.8、丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(37.5:1)溶液(40%)(上海生工生物工程技术服务有限公司); 二甲基亚砷(美国 Sigma 公司); 胎牛血清、0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司); 逆转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司); TRIzol、QPCR 引物合成、BCA 法蛋白浓度定量试剂盒(美国 Invitrogen 公司); iNOS 抗体(美国 Cell Signal 公司); GLi1 抗体(美国 Abcam 公司); β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶标记抗兔和抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 生物安全柜、NanoDrop2000 超微量分光光度计(ND2000)(美国 Thermo 公司); 冷冻离心机(美国 Beckman 公司); QPCR 扩增仪(美国 ABI 公司); 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 QPCR 法检测 按 TRIzol 试剂说明书提取经处理后的 RAW264.7 总 RNA,再立即用 ND2000 测定总 RNA 浓度。取 1 μ g RNA 逆转录得到的 cDNA 后进行扩增,以 GAPDH 作为检测的内参物,QPCR 扩增的反应体系为 20 μ l,包括 cDNA 2 μ l、上下游引物各 0.4 μ l、sybrgreen 10 μ l、Rox 0.4 μ l、无酶水 6.8

μ l。上机检测。以内参的循环数作为对照,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,再进行统计学分析。

1.5 Western blot 法检测 RAW264.7 细胞用预冷的 RIPA 裂解缓冲液加 PMSF 在冰上裂解 60 min,每 10 min 振荡 1 次,收集细胞裂解物,于 4℃、13 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量为 30 μ g,进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h,再转移到活化的 PVDF 膜上,非特异性封闭 1 h,加入一抗 4℃ 过夜。次日用含辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,后用 TBST 洗膜 4 次,每次 10 min,最后用 ECL 发光剂进行显影,以 β -actin 作为内参,分别以目的蛋白与 β -actin 灰度比值作为该目的蛋白的相对表达量。

1.6 免疫荧光法检测 在传代细胞之时,将经过处理的盖玻片放入培养皿中,让细胞爬片。用 4% 多聚甲醛处理细胞室温固定 30 min。PBS 洗 3 次。0.2% Triton-X 100 室温通透 30 min, PBS 洗 3 次。3% BSA 室温封闭 2 h。滴 20 μ l 一抗在封口膜上,放在有水的饭盒中 4℃ 过夜。撬片,放到皿里, PBS 洗 3 次。滴 20 μ l 二抗在封口膜上,放到湿盒里室温 1 h。PBS 洗 3 次。稀释 DAPI,然后加 0.5 ml,室温 5 min。PBS 洗 1 次,5 min。在载玻片上滴上封片剂,不要太多且注意不要有气泡,在毛玻璃侧做好标记。正置荧光显微镜观察。

1.7 统计学处理 采用 Graphpad 6.01 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$,所有检验为双侧检验。

2 结果

2.1 Hedgehog 信号通路中抑制蛋白 ptch1 和转运蛋白 GLi1 在巨噬细胞中的表达 QPCR 检测显示:与 M2 型巨噬细胞相比,M1 型巨噬细胞中 GLi1 mRNA 水平的表达明显增加,差异有统计学意义($t = 10.72, P < 0.01$)。与 M1 型巨噬细胞相比,M2 型巨噬细胞中 ptch1 mRNA 水平的表达明显增加($t = 475.4, P < 0.01$)。见图 1。

2.2 巨噬细胞中 iNOS、CD86、Arg-1、CD206 的表达 QPCR 检测显示,RAW264.7 细胞中,与 M2 型相比,M1 型中 iNOS、CD86 mRNA 水平的表达明显增强($t = 23.40, P < 0.01; t = 16.68, P < 0.01$)。与 M1 型相比,M2 型中 Arg-1、CD206 mRNA 水平的表达明显增强($t = 8.79, P < 0.01; t = 19.79, P < 0.01$)。见图 2。

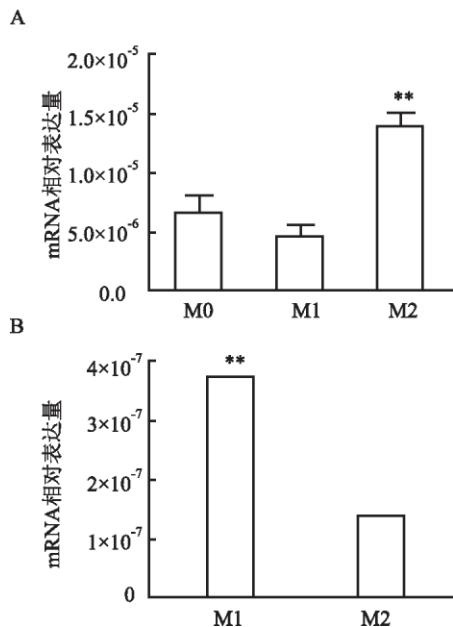


图1 Hedgehog 信号通路中转运蛋白 Gli1 和抑制蛋白 ptch1 在各类型巨噬细胞中的表达
A: ptch1; B: Gli1; 与 M1 型比较: ** $P < 0.01$

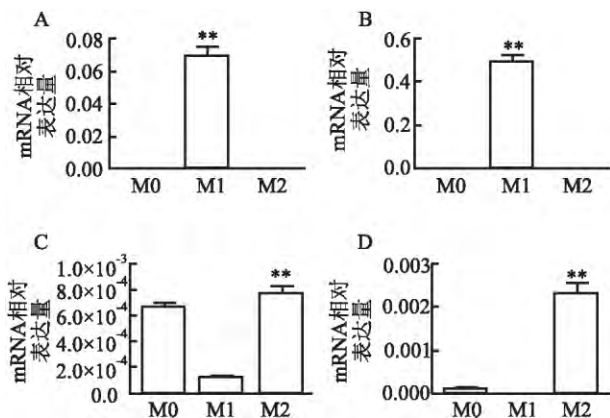


图2 各类型巨噬细胞中 iNOS、CD86、Arg-1、CD206 mRNA 的水平
A: iNOS; B: CD86; C: Arg-1; D: CD206; 与 M1 型比较: ** $P < 0.01$

2.3 环靶明对 M1 型巨噬细胞的 ptch1 表达的影响 QPCR 检测显示,与对照组比较,经环靶明 40、100、1 000、2 000 nmol/L 刺激后,M1 型巨噬细胞中 ptch1 mRNA 水平的表达明显增强,且在 100 nmol/L 时达到最大值($t = 16.68$, $P < 0.01$)。见图 3。

2.4 环靶明对 M1 型巨噬细胞 iNOS 表达的影响 用 QPCR 法检测加入环靶明后 M1 型巨噬细胞分泌 iNOS mRNA 水平明显下调($t = 194.9$, $P < 0.01$)。见图 4。Western blot 法、免疫荧光法检测的蛋白水平也明显下调($t = 264.7$, $P < 0.01$)。见图

5、6。

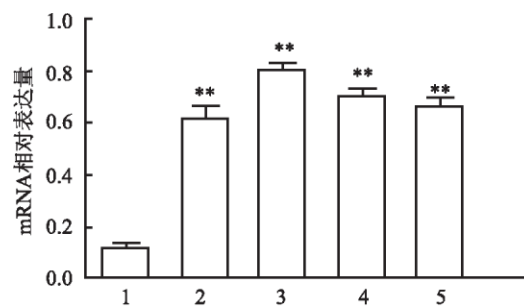


图3 环靶明对 M1 型巨噬细胞的 ptch1 在 mRNA 水平的影响

1: M1 巨噬细胞(对照组); 2: 环靶明(40 nmol/L); 3: 环靶明(100 nmol/L); 4: 环靶明(1 000 nmol/L) 组; 6: 环靶明(2 000 nmol/L); 与对照组比较: ** $P < 0.01$

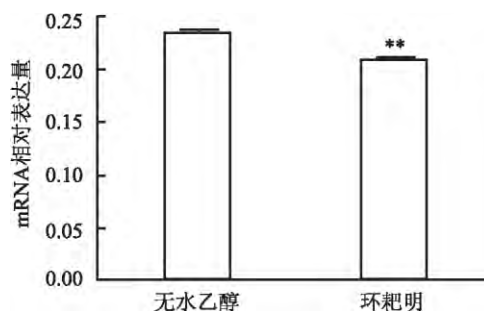


图4 QPCR 法检测环靶明对 M1 型巨噬细胞 iNOS 表达的影响

1: 无水乙醇(对照组); 2: 环靶明 1 000 nmol/L(实验组); 与对照组比较: ** $P < 0.01$

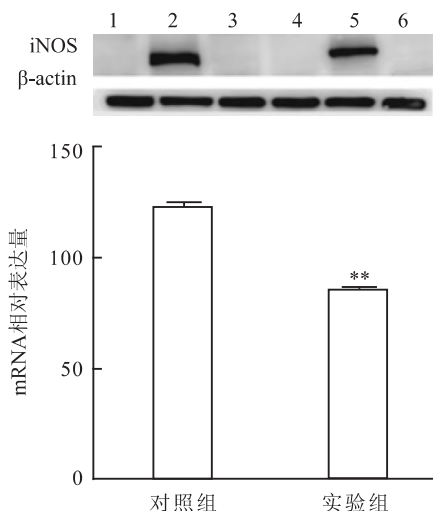


图5 Western blot 法检测环靶明对 M1 型巨噬细胞 iNOS 表达的影响

1: M0 + 等体积无水乙醇; 2: M1 + 等体积无水乙醇(对照组); 3: M2 + 等体积无水乙醇; 4: M0 + 1 000 nmol/L 环靶明; 5: M1 + 1 000 nmol/L 环靶明(实验组); 6: M2 + 1 000 nmol/L 环靶明; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

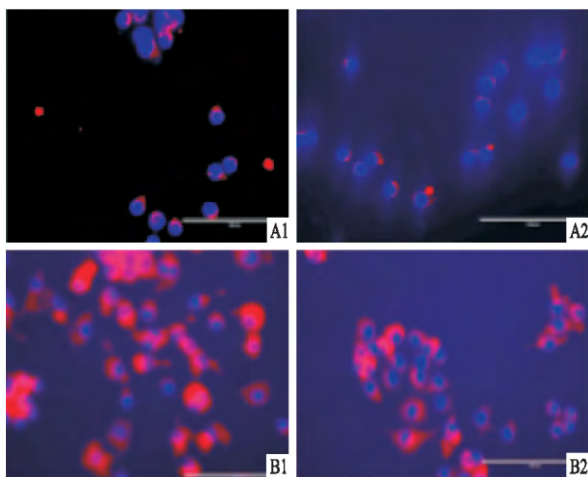


图6 免疫荧光法检测环靶明对
M1型巨噬细胞iNOS表达的影响 ×100
A: Gli1; B: iNOS; 1: M1 + 无水乙醇; 2: M1 + 环靶明

3 讨论

巨噬细胞是从单核细胞分化而来,是一类重要的固有免疫效应细胞。在固有免疫应激过程中,组织外的巨噬细胞对于外来抗原起到防御作用,并且能够通过吞噬或者降解从而维持抗原在一定的耐受范围内,其还可以与其他的免疫细胞发生相互作用,比如T细胞和B细胞,相互作用的过程中会释放大量的细胞因子和酶类等。巨噬细胞还可参与机体内许多抗炎或抑炎反应,对于组织细胞的损伤和修复都起到一定的作用。研究^[5]表明,巨噬细胞按照TH细胞的分类原理一样,根据其表型和分泌的细胞因子定义为两种极化类型,即经典活化的M1型和选择性活化的M2型。M1型高表达ROS、IL-1、IL-12、IL-23等其他趋化因子,发挥宿主免疫功能,但也会导致机体正常组织的炎症损伤。M2型高表达CD209、CD206、IL-10、CD301等其他趋化因子,发挥降低炎症反应、组织修复功能,但在炎症后期可发挥抗炎作用、促进创伤修复。此外,持久性M1型巨噬细胞及其活性的产品可以诱导组织损伤,M2型巨噬细胞抑制炎症、清除残骸、血管生成和组织愈合。巨噬细胞极化在许多人类炎症性疾病治疗中,包括动脉粥样硬化、肥胖和胰岛素抵抗、癌症、类风湿性关节炎、细菌和寄生虫感染发挥了至关重要的作用。其中,信号通路在影响巨噬细胞极化的过程中起到巨大作用。如TLR、MyD88、MAPK、NF- κ B^[6]、mTOR、STAT6^[7]。因为许多信号通路与Hedgehog信号通路存在交叉作用。所以,也许Hedgehog信号通路参与了巨噬细胞的极化过程。

Hedgehog信号通路开始发现其功能,是在胚胎发育、组织分化过程中起到重要的调控作用。然而近年来,研究^[8]显示Hedgehog信号通路在肿瘤发生的过程中也发挥着重要作用。Hedgehog信号通路主要由正调控的Shh配体和跨膜蛋白Smo、负调控跨膜蛋白受体Ptch以及下游转录因子Gli蛋白(Gli1、Gli2、Gli3)组成。Smo蛋白是Hedgehog信号通路中重要的传递信使,能够将细胞外的Shh信号转换成细胞内的Gli1信号,从而启动细胞核内基因的转录,对Hedgehog信号通路具有激活作用。其中Ptch蛋白的异常激活也能阻止该过程的发生。为了探究当该通路没有激活时,其对病理生理的影响,运用其抑制剂是个很好的研究方法,其中环靶明是Hedgehog信号通路特异性抑制剂^[9],作用于该通路中Smo受体。

目前,许多对于Hedgehog信号通路的研究^[9]集中于其在癌症发生发展中的作用。对于其在免疫方面的作用尚未有所研究。本研究从其与NF- κ B等重要的炎症信号通路有交叉作用,探讨其对巨噬细胞极化的影响。本研究显示,Hedgehog信号通路在M1型巨噬细胞中是激活的,抑制基因ptch1低表达,其抑制剂环靶明可降低M1型巨噬细胞iNOS的表达,可能促进巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化,本研究的意义在于,Hedgehog信号通路的异常激活可促进癌症的发生,通过使用其抑制剂可能会导致其向M2型巨噬细胞极化,而M2型巨噬细胞在炎症后期对癌症细胞起到保护作用,这就提示,小分子化合物对于癌症^[10]治疗的副作用可能就是因为其促进巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化,尚需进一步深入研究,本研究是第一次探讨该抑制剂对巨噬细胞极化后分泌物的影响,为后来的研究提供基础,也为临床治疗提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Almatroodi S A, McDonald C F, Darby I A, et al. Characterization of M1/M2 tumor-associated macrophages (TAMs) and Th1/Th2 cytokine profiles in patients with NSCLC [J]. Cancer Microenviron 2016 9(1): 1-11.
- [2] Chen J J, Lin Y C, Yao P L, et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression [J]. J Clin Oncol 2005 23(5): 953-64.
- [3] Ahmad A. Pathways to breast cancer recurrence [J]. ISRN Oncol, 2013 2013: 290568.
- [4] Du W, Liu X, Chen L, et al. Targeting the SMO oncogene by miR-326 inhibits glioma biological behaviors and stemness [J]. Neuro Oncol 2015 17(2): 243-53.

(下转第1150页)

multi-step sequence of oxidation, etherification, chlorination and N-alkylation. **Methods** The target compounds were confirmed by ^1H NMR, IR, MS spectra as well as elemental analyses. **Results** All these synthesized nitrogen mustards were evaluated for *in vitro* antimicrobial and fungi activities by two fold serial dilution technique. The antimicrobial activities indicated that most of the title compounds inhibited effectively all the tested stains *in vitro* and showed strongly selective inhibitory efficacy against *Staphylococcus aureus* with comparable or superior activity to the clinic drug. Among these compounds, pyridine-derived bis-alkyl nitrogen mustard 7 and its hydrochloride 8a and nitrateand 8b showed equivalent anti-*S. aureus* activities to chloramphenicol. **Conclusion** Pyridine-derived bis-amide nitrogen mustard 11 exhibited better antibacterial activities against *S. aureus* than chloramphenicol, which were worthy of further investigation. A single crystal of the key intermediate 6 with suitable dimension and no crack was obtained and measured by X-ray diffraction. The structure belongs to orthorhombic system with space group $P2_12_12$.

Key words nitrogen mustard; pyridine; antibacterial; antifungal

(上接第 1144 页)

- [5] 李美玲, 李应配, 冷银芝, 等. 双酚 A 对小鼠腹腔巨噬细胞极化影响的体外研究[J]. 安徽医科大学学报 2015, 50(6): 82-5.
- [6] Zou J, Shankar N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine expression in response to *E. faecalis* infection [J]. PLoS One 2015, 10(8): e0136947.
- [7] Tian F, Yu B L, Hu J R, et al. mTOR mediates the cross-talk of macrophage polarization and autophagy in atherosclerosis [J]. Int J Cardiol 2014, 177(1): 144-5.
- [8] Genin M, Clement F, Fattaccioli A, et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide [J]. BMC Cancer 2015, 15:577.
- [9] Xu Y, An Y, Wang X, et al. Inhibition of the Hedgehog pathway induces autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. Oncol Rep 2014, 31(2): 707-12.
- [10] You J, Zhao J, Wen X, et al. Chemoradiation therapy using cyclopamine-loaded liquid-lipid nanoparticles and lutetium-177-labeled core-crosslinked polymeric micelles [J]. J Control Release, 2015, 202: 40-8.

Effect of cyclopamine on the secretion of iNOS in M1-type

Ye Jiabao, Li Jun, Xu Xiaojun, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the role of cyclopamine in macrophage polarization. **Methods** M1-type macrophage was treated with LPS (100 ng/ml) and IFN- γ (20 ng/ml) for 24 h, and M2-type macrophage was stimulated with IL-4 (20 ng/ml) for 24 h. The expressions of iNOS, CD86, Arg-1, CD206, GLi1, pth1 were detected by QPCR in various types; the mRNA level of iNOS was determined by QPCR after joining cyclopamine in the M1-type, the protein expression of iNOS was assessed by western blot and immunofluorescence after joining cyclopamine in the M1-type. **Results** The relative expression of iNOS, CD86 was significantly higher in M1-type than that in M2-type at mRNA level ($P < 0.01$). The relative expression of Arg-1, CD206 was significantly higher in M2-type than that in M1-type at mRNA level ($P < 0.01$). After 40 nmol/L cyclopamine stimulation, the mRNA level of pth1 was significantly enhanced in M1 macrophages and reached the maximum at 100 nmol/L treatment of M1-type with cyclopamine at 1 000 nmol/L, which effectively reduced the expression of iNOS at mRNA and protein levels, suggesting that it could promote the macrophages polarization to M2-type. **Conclusion** Cyclopamine can obviously reduce the secretion of iNOS in M1 macrophages.

Key words cyclopamine; macrophages; RAW264.7; iNOS