

Notch信号通路在血管紧张素-Ⅱ诱导炎症反应中的作用

温艺超, 陈伟燕, 谢富华 (广州医科大学附属第二医院重症医学科, 广州 510260)

摘要: 目的 探讨Notch信号通路在血管紧张素-Ⅱ(Ang Ⅱ)诱导炎症反应中的作用。方法 THP-1细胞诱导分化为巨噬细胞, 给予Ang Ⅱ处理, 用qRT-PCR和免疫印迹检测Notch1、Dll1、TLR-4、NFκB及炎症因子表达。采用siRNA沉默TLR-4或SN50阻断NFκB, 观察炎症因子变化。结果 巨噬细胞中Notch1、Dll1蛋白表达在Ang Ⅱ处理后呈时间依赖性增加($P<0.05$)。TLR-4、NFκB、IL-1β和TNF-α表达在Ang Ⅱ处理24 h后明显升高($P<0.05$), 而IL-6表达明显降低($P<0.05$); TLR4沉默或NFκB阻断后, IL-1β、IL-6和TNF-α表达无明显变化。结论 Notch信号通路在Ang Ⅱ诱导炎症反应中具有重要作用, 针对Notch信号通路的调节可能有助于改善动脉粥样硬化。

关键词: Notch信号通路; 血管紧张素Ⅱ; 炎症反应

中图分类号: R 730.23

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)04-0347-03

Role of Notch signaling pathway in angiotensin II-induced inflammatory response

WEN Yi-chao, CHEN Wei-yan, XIE Fu-hua (Intensive Care Unit, the Second Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Objective To study the role of Notch signaling pathway in angiotensin II (Ang II)-induced inflammatory response. Methods The macrophages were differentiated from THP-1 cells and then treated with Ang II. Expression of Notch1, Dll1, TLR-4, NFκB and proinflammatory cytokines was detected by qRT-PCR and Western blot. Besides, proinflammatory cytokines were determined after TLR-4 silencing with siRNA and NFκB blockade with SN50. Results Notch1 and Dll1 expression of the macrophages was time-dependently upregulated after treated with Ang II ($P<0.05$). TLR-4, NFκB, IL-1β, and TNF-α levels were increased ($P<0.05$), while IL-6 decreased ($P<0.05$) after 24-h treatment. However, expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α was unchangeable after TLR-4 silencing or NFκB blockade. Conclusion Notch pathway plays an important role in Ang II-induced inflammatory response. Targeting Notch pathway may contribute to the improvement of atherosclerosis.

Key words: Notch pathway; angiotensin II; inflammatory response

近年来, 大量基础研究发现巨噬细胞在动脉粥样硬化发生过程中具有重要作用^[1]。由于多种原因所致的动脉硬化斑块区域可诱导巨噬细胞向该区域趋化并聚集于该区域, 参与局部血管重构和斑块形成, 并导致斑块炎症反应和不稳定性^[2]。病理检查发现动脉粥样硬化部位同时存在M1、M2两型巨噬细胞, 并随动脉粥样硬化发展, 斑块区域巨噬细胞逐渐增多^[3], 在不稳定斑块组织中呈M1型极化, 而在稳定斑块组织中以M2型极化^[4]。血管紧张素Ⅱ和Notch信号通路在多种心血管疾病和机体炎症反应过程中具有重要作用, 本研究将探讨Notch信号通路在

血管紧张素-Ⅱ调节动脉粥样硬化炎症反应中的作用, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

人单核细胞系THP-1购自中国科学院上海细胞库, 10%胎牛血清(Hyclone, 美国GE公司)、RPMI 1640培养基(Hyclone, 美国GE公司)。血管紧张素Ⅱ购自Sigma公司, 全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、ECL发光液均购自北京碧云天生物科技有限公司, 兔抗人Notch1、Dll1、SRA、TLR-4/NFκB、IL-1β、IL-6及TNF-α单克隆抗体均购自ABCAM公司, TLR-4沉默siRNA由上海吉玛基因公司生产, lipo3000转染试剂、Trizol购自Life technology, SN50购自Sigma公司。cDNA反转录试剂盒、SYBR Green Premix 荧光定量试剂盒均购自宝生物(大连)科技公

基金项目: 广州市属高校科研项目(青年项目)(No. 2014A020212325)

收稿日期: 2016-11-24; **修订日期:** 2017-02-23

作者简介: 温艺超(1982-), 男, 硕士, 主治医师。

司,qPCR检测上述基因引物序列如表1所示,由北京博迈德生物技术有限公司合成。

表1 引物序列

| 基因 | 序列 |
|-----------|---------------------------|
| Notch1 | GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG |
| | CCTTATCAAGATGCGAACTCACA |
| Dll1 | CGGAGTCAACGGATTTGGTGC |
| | ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG |
| SRA | GAGCCGAATGCACATAAGGTC |
| | CCAGAGAGACTAGCAAGGGG |
| TLR-4 | CGATTCTGGAGAGCCGGATAG |
| | TGGGACGGAGTGATCTCGAT |
| NFκB | GAGGGGCTGTCAAAGCTCC |
| | ACAGTTTCCCCGTGATTCGG |
| IL-1β | CCATAGCCGAGCAGACTGG |
| | GGATACGTGGCGTAAAATGAAGT |
| IL-6 | AGTGGGCTCACATATCAGAGG |
| | CAAACACCTTAGGCTGTCTCC |
| TNF-α | CAATGCTGTGGACCTGTATGT |
| | TACGGAGGGTATAGTCCCTGG |
| β-actin F | CATGTACGTTGCTATCCAGGC |
| | CTCCTTAATGTACGCACGAT |

1.2 细胞培养及相关处理

THP-1细胞由含有10%FBS的RPMI1640培养基培养,培养条件37℃、5%CO₂,经刺激分化为巨噬细胞后给予血管紧张素Ⅱ刺激,作用浓度10⁻⁶mol/L,持续时间分别为12、24、36、48h,对照组给予同等浓度二甲基亚砜(DMSO)培养相应时间。根据lipo 3 000转染试剂说明书转染siRNA沉默TLR-4,转染后继续培养48h。SN50培养浓度为2×10⁻⁶mol/L,持续时间24h。

1.3 Western blot检测相关蛋白表达

相关细胞经有效处理或培养后,弃去培养基,PBS洗净后以全蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,BCA蛋白定量,配制聚丙烯酰胺凝胶,常规电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭,一抗4℃孵育过夜,次日二抗孵育2h,ECL发光系统检测相关蛋白表达程度。

1.4 qPCR检测相关基因mRNA表达

相关细胞经有效处理或培养后,弃去培养基,采用Trizol提取全细胞RNA,测定浓度后经cDNA反转试剂盒构建cDNA文库,采用罗氏480qPCR检测仪检测相关基因的mRNA的表达程度,内参基因选择

β-actin。

1.5 统计学处理

采用SPSS22.0软件,所得实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管紧张素Ⅱ对Notch信号通路的影响

巨噬细胞给予血管紧张素Ⅱ分别处置12、24、36、48h后,Notch1和Dll1的表达水平均明显高于对照组,且随着培养时间的延长,其表达的水平持续升高($P < 0.05$),见图1、2。

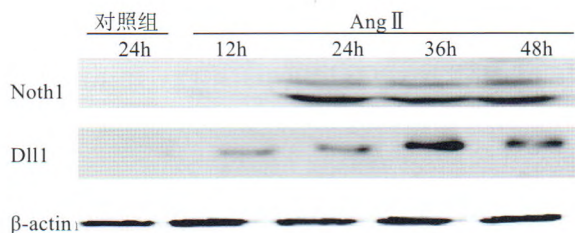
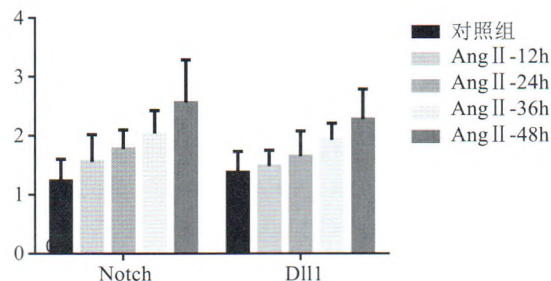


图1 血管紧张素Ⅱ对Notch信号通路的影响电泳结果



血管紧张素Ⅱ对Notch信号通路的影响

图2 血管紧张素Ⅱ对Notch信号通路的柱状图 (n=3)

2.2 血管紧张素Ⅱ对TLR-4/NFκB的影响

血管紧张素Ⅱ处置过量Dll1与Notch1结合的泡沫细胞后,TLR-4/NFκB的蛋白表达水平均明显高于对照组($P < 0.05$),见图3、4。

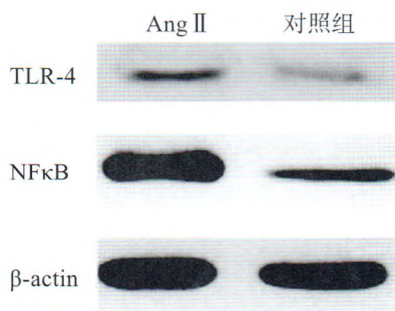


图3 血管紧张素Ⅱ对TLR-4/NFκB的影响电泳结果

2.3 血管紧张素Ⅱ对炎症因子的影响

血管紧张素Ⅱ 处置巨噬细胞 24 h 后, IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平均明显高于对照组($P<0.05$), 而 IL-6 表达水平均明显低于对照组($P<0.05$)。巨噬细胞分别经 siRNA 沉默 TLR4 或 SN50 阻断 NF κ B, 同时给予血管紧张素Ⅱ 处置 24 h 后, IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平与对照组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)(见图 5、6)。

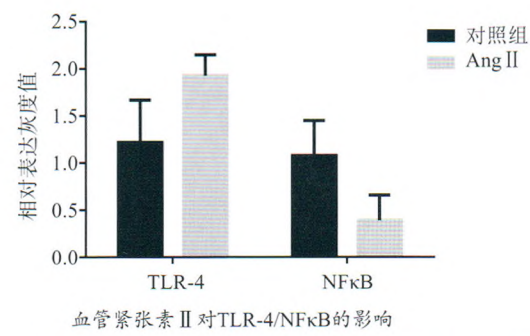


图 4 血管紧张素Ⅱ 对 TLR-4/NF κ B 的影响柱状图比较 ($n=3$)

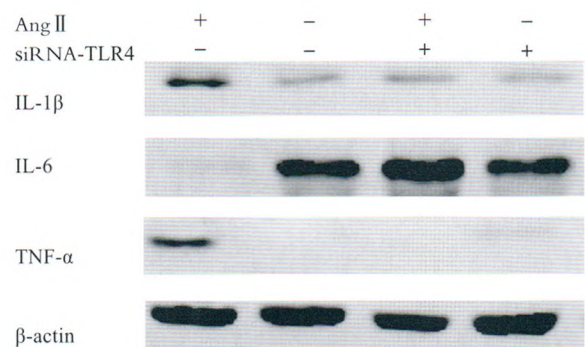


图 5 血管紧张素Ⅱ 对炎症因子的影响电泳结果

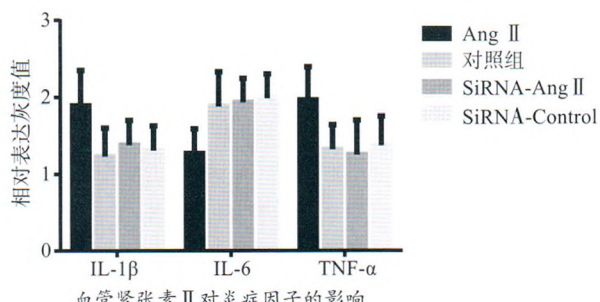


图 6 血管紧张素Ⅱ 对炎症因子的影响柱状图比较 ($n=3$)

3 讨论

动脉粥样硬化不稳定斑块形成是威胁患者生命安全最危险的进程, 尤以 M1 型巨噬细胞的促炎和组织损伤作用最为突出^[5]。早期动脉粥样硬化形成过程中, 患者血中 Th1 型炎性细胞因子大量合成并激活

M1 型巨噬细胞, 可促进多种炎症因子的表达, 加速动脉粥样硬化炎症反应和病变斑块的不稳定性^[6]。

高水平的血管紧张素Ⅱ 是动脉粥样硬化患者典型的特征之一, 大量研究已证实血管紧张素Ⅱ 可在多种细胞中有效激活 Notch1 信号通路, 本研究亦证实 Notch1 信号通路得到有效激活^[7], Notch1 受体和配体的过度表达可刺激积聚的巨噬细胞呈 M1 型转变, 释放大促炎症反应介质如 IL-1 β 、TNF- α 等, 诱导并加强机体炎症反应, 同时下调抑制炎症反应的 Th2 型炎性细胞因子, 如 IL-6, 进一步促进炎症反应^[8]。

本研究进一步采用 siRNA 沉默 TLR-4 或 SN50 阻断 NF κ B, 观察结果发现 Notch1 信号通路诱导的机体炎症反应明显减弱, 符合预期结果, 证实 Notch 信号通路在血管紧张素-Ⅱ 调节动脉粥样硬化炎症反应中具有重要作用, 针对 Notch 信号通路的调节有助于控制和改善动脉粥样硬化。

参考文献:

[1] 李毅. 血清 SAA、IL-1 β 水平在诊断动脉狭窄及动脉粥样硬化中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(2): 283-285.

[2] 陈卓. 从 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路探讨丹参酮Ⅱ A 干预动脉粥样硬化易损斑块的抗炎及免疫调节机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[3] 唐凯玲, 龙鼎新. Notch 信号通路在相关疾病中的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(2): 219-223.

[4] 李红蓉, 孙颖, 常成成, 等. Notch 信号通路调节巨噬细胞极化研究进展[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(12): 1316-1321.

[5] 陈洁霞. 单核细胞、VEGF-C、IL-6、hs-CRP、FIB 和 D-D 与外周动脉粥样硬化狭窄程度的相关性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.

[6] 高峰, 张涛, 王晓梅, 等. 血管紧张素Ⅱ 对足细胞 Notch 通路及 Nephron 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 247-250.

[7] Wu J R, Yeh J L, Liou S F, et al. Gamma-secretase inhibitor prevents proliferation and migration of ductus arteriosus smooth muscle cells through the Notch3-HES1/2/5 pathway[J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(9): 1063-1072.

[8] Maalouf S W, Smith C L, Pate J L. Changes in microRNA expression during maturation of the bovine corpus luteum: regulation of luteal cell proliferation and function by microRNA-34a1[J]. Biol Reprod, 2016, 43(5): 156-169.