论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1452-04

B型利钠肽对小鼠腹腔巨噬细胞MCP-1蛋白表达的双向调节作用

郜 攀,黄 岚,郭瑞威,钱德慧 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察B型利钠肽(B type natriuretic peptides,BNP)在小鼠腹腔巨噬细胞内介导单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)蛋白的表达,探讨BNP在小鼠腹腔巨噬细胞中调节炎症反应的作用。方法 原代培养小鼠腹腔巨噬细胞,分别予不同剂量的BNP、BNP + GC-A受体抑制剂(HS-142-1)、BNP + 肿瘤坏死因子-α(TNF-α) + HS-142-1预处理细胞,设立空白对照组。提取培养细胞蛋白,采用Western blot法检测细胞内MCP-1蛋白表达。结果 在小鼠巨噬细胞内BNP能够促进MCP-1蛋白表达,该作用可被BNP抑制剂HS-142-1所抑制;且TNF-α在巨噬细胞中促进MCP-1分泌的作用可以被BNP抑制。结论 BNP能够促进巨噬细胞释放MCP-1,促进炎症反应的发生;同时BNP能够抑制TNF-α促进MCP-1蛋白分泌的作用,提示BNP具有炎症反应的双向调节作用。

关键词:B型利钠肽;巨噬细胞;单核细胞趋化蛋白-1;肿瘤坏死因子-α;小鼠
中图法分类号:R392.12;R392.3;R972.1 文献标识码:A

Effects of B-type natriuretic peptides on expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rat peritoneal macrophages *in vitro*

GAO Pan, HUANG Lan, GUO Rui-wei, QIAN De-hui (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of B-type natriuretic peptides (BNP) on expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat peritoneal macrophages and to identify the inflammation-mediated effects of BNP in macrophages. Methods Peritoneal macrophages of primary culture were treated with BNP, BNP + HS-142-1, or BNP + TNF-α + HS-142-1. The protein expression of MCP-1 was measured by Western blot. Results BNP enhanced the MCP-1 protein expression in macrophages, and this effect could be abrogated by HS-142-1. In addition, BNP could inhibit TNF-α induced MCP-1 expression. Conclusion BNP can induce the MCP-1 protein expression in macrophages, suggesting BNP has a pro-inflammatory effect. However, BNP also can inhibit TNF-α induced MCP-1. These findings suggest that the effect of inflammation-mediated by BNP is biphasic though the mechanism is still unclear.

Key words: B-type natriuretic peptides; macrophage; monocyte chemoattractant protein-1; tumor necrosis factor-α; mouse

利钠肽家族成员在心血管系统和内分泌系统发挥着重要的调节作用,心房利钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)和B型利钠肽(B type natriuretic peptides, BNP)主要分布在心脏,在扩血管、利尿及抑制生长等各方面发挥重要作用[1,2]。BNP是由32个氨基酸残基组成的17环状多肽,最初于1988年从猪脑组织中分离出来,主要由心室细胞在容量或压力负荷过重时分泌。BNP通过与其受体结合,使第二信使环鸟苷酸(cGMP)升高,从而介导一系列生理学效应,包括利尿、利钠、扩张血管,抑制交感神经系统及肾素-血管紧张素-醛固酮系统的活性,减少心肌细胞纤维化,抑制血管内皮细胞表达组织因子(TF)和纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1),预防血栓形成,扩张心外膜冠状动脉,抑制因过度换气而造成的冠状动脉痉挛等。

目前,BNP在心力衰竭诊治中的作用已得到共识,成为国际公认的评估心力衰竭的血浆标志物。但近来的研究表明,BNP在调节炎症反应方面也发挥一定的作用,BNP能拮抗TGF-β引起的心肌成纤维细胞肥大、增殖和炎症反应等[3],同时作为BNP同一家族成员的ANP,在既往的研究中已经被证明能够抑制巨噬细胞内LPS诱导的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)产生,并进一步影响其他炎症因子的表达,但对BNP在巨噬细胞中调节炎症反应的作用国内外尚少见报道。巨噬

作者简介:郜 攀,男,湖南省祁阳市人,博士研究生,主要从事冠心病防治方面的研究。电话:(023)68774661,E-mail:yuzhigp@yahoo.cn
通信作者:黄 岚,电话:(023)68755601,E-mail:huanglan260@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-06;修回日期:2008-01-28

细胞在炎症反应中发挥重要的作用,炎症细胞聚集、浸润是炎症反应的关键步骤,而巨噬细胞分泌的单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)对炎症细胞浸润起到重要的调节作用。在临床众多疾病中,如动脉粥样硬化,MCP-1 过量表达对炎症反应的发生、发展起到重要作用。因此研究 BNP 对巨噬细胞中 MCP-1 表达的影响可以更好的理解 BNP 对炎症反应的调节,从而对一些临床疾病治疗起到指导作用。

1　材料与方法

1.1　细胞培养

常规方法培养原代巨噬细胞,脱臼处死小鼠,腹腔注射预冷 D-Hanks 液 4 ml,轻揉 1 min,吸出腹腔液,PBS 洗细胞 2 次,4 ℃,1 200 r/min,5 min。弃上清,5% FCS-RPMI1640(本实验室自制)培养基重悬细胞。加入 1 个 35 mm 培养皿。2 h 后,预温 RPMI1640 洗细胞 3 次。继续培养 18 h,预温 RPMI1640 洗细胞 3 次,预温 PBS 洗细胞 2 次,EDTA 消化后,重新计数并调节细胞数至 $1\times10^{8}\ ml^{-1}$。然后采用 5% FCS-0.1% BSA-RPMI1640 培养细胞。

1.2　药物干预细胞

药物浓度选择参考 Kiemer 等[4] 的方法。细胞分离后,调节细胞浓度至 $1\times10^{6}\ ml^{-1}$ 培养基。细胞培养瓶中各加入 0、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L BNP(购于 Sigma 公司,美国),将细胞置于 37℃,5% CO_2 孵箱中培养 4 h,以确定 BNP 的最适合干预浓度。确定 BNP 干预的最佳浓度后,于此 BNP 浓度同时分别加入 0、10、100 μg/ml BNP 受体抑制剂 HS-142-1(购于 Sigma 公司,美国),观察 BNP 被不同程度抑制后对巨噬细胞 MCP-1 蛋白表达的影响。将 BNP 单独或与 HS-142-1 联合培养的细胞培养 30 min 后,加入 10 μg TNF-α 联合培养 4 h,观察 BNP 对 TNF-α 诱导巨噬细胞 MCP-1 蛋白表达的影响。

1.3　细胞蛋白的提取及 Western 免疫印迹法检测 MCP-1 蛋白表达

参照文献[5]的方法,细胞从培养瓶中吸出后,先将细胞悬液于 2 000 ~ 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用 PBS 溶解,于 13 000 r/min 离心 20 s,再次收集细胞沉淀。用细胞裂解液(购自升博生物公司,重庆)于 4 ℃裂解细胞,12 000 × g 离心 5 min,取上清,即为细胞蛋白。采用考马斯亮蓝法测定细胞蛋白浓度,根据蛋白浓度分装于 1.5 ml 离心管,使每管蛋白总量在 50 μg 左右,置于 -70 ℃保存。

取约 50 μg 总蛋白,置于 95 ℃变性 5 min,采用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件恒压 80 mV,时间为 3 h。然后采用‘三明治’法将蛋白转移至 PVDF 膜,转膜采用 Bio-Rad 的电转仪,转膜条件为恒流 15 mA,时间为 90 min。之后将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入封闭液稀释的一抗(山羊抗小鼠 MCP-1 多克隆抗体,购自美国 Santa Cruz,稀释浓度 1∶250)封闭过夜,加辣根过氧化物酶标的兔抗山羊 IgG(购自北京中杉金桥,稀释浓度 1∶1 000)室温反映 1 h 后染色,用相同方法检测 β-actin 蛋白表达(β-actin 一抗购自美国 Santa Cruz,稀释浓度 1∶250)为内参,用 FR-200 凝胶成像分析系统进行定量分析。

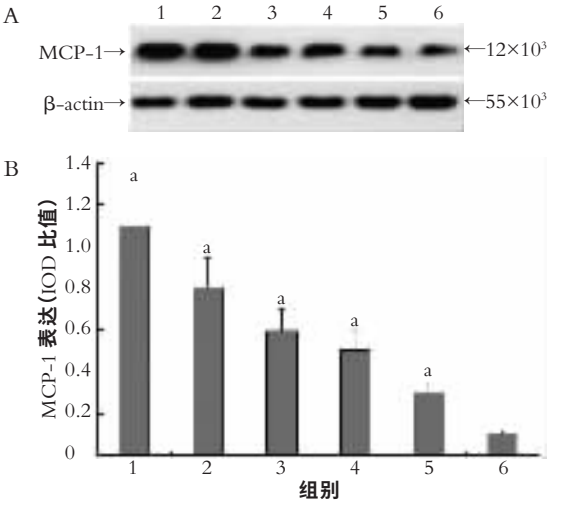
1.4　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 不同表示,浓度 BNP 对巨噬细胞 MCP-1 蛋白表达的影响采用单因素方差分析,其余结果的统计分析采用两因素析因设计方差分析,全部统计分析用 SPSS 10.0 统计软件完成。

2　结果

2.1　BNP 对巨噬细胞释放 MCP-1 的影响

不同浓度 BNP 能够促进腹腔巨噬细胞释放 MCP-1,且成浓度依赖性。与对照组比较,10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} mol/L BNP 都能显著增加腹腔巨噬细胞释放 MCP-1($P<0.05$),且 10^{-4} mol/L BNP 作用最显著;与对照组比较,10^{-8} mol/L BNP 作用于细胞,细胞释放 MCP-1 增加不显著($P>0.05$)。BNP 促进细胞释放 MCP-1 呈浓度依赖性。见图 1。



1 - 5:BNP 浓度分别为 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L;6:对照组(BNP 0 mol/L)　A:Western 免疫印迹结果;B:MCP-1 蛋白表达柱状图,结果以 MCP-1/β-actin (IOD 比值)表示　a:$P<0.05$,与对照组比较

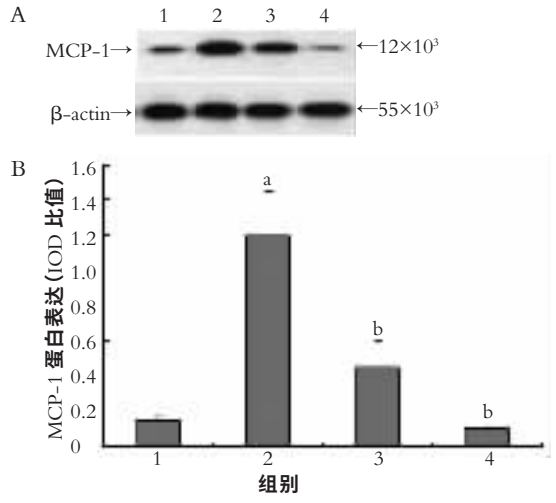
图 1　不同浓度的 BNP 对巨噬细胞内 MCP-1 表达的影响

2.2　HS-142-1 对 BNP 促进巨噬细胞释放 MCP-1 的影响

予细胞分别以 10^{-4} mol/L BNP 和 0、10、100 μg/ml HS-142-1 预处理 4 h 后,观察巨噬细胞内 MCP-1 蛋白表达。与对照组比较,100 μg/ml HS-142-1 处理后,细胞内 MCP-1 蛋白表达无显著差别($P>0.05$);相对于对照组,0、10 μg/ml HS-142-1 处理后,细胞内 MCP-1 蛋白表达显著增高($P<0.05$),分别为对照组 MCP-1 蛋白表达的 6.67、2.22 倍。见图 2。

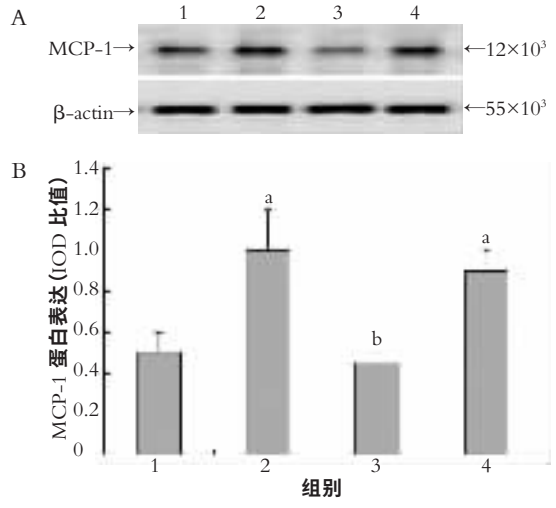
2.3　BNP 对 TNF-α 释放 MCP-1 的影响

与对照组比较,TNF-α 组能够明显促进 MCP-1 蛋白的表达($P<0.05$);与对照组比较,BNP + TNF-α 组 MCP-1 蛋白表达无显著增加($P>0.05$),与 TNF-α 组比较,MCP-1 蛋白表达显著降低($P<0.05$);加入 HS-142-1 后,MCP-1 蛋白表达与对照组比较明显增高($P<0.05$),与 TNF-α 组比较,无明显差别($P>0.05$)。见图 3。



1:对照组;2:BNP 组;3:BNP + 10 μg/ml HS-142-1;4:BNP + 100 μg/ml HS-142-1 A:Western 免疫印迹结果;B:MCP-1 蛋白表达柱状图,结果以 MCP-1/β-actin (IOD 比值)表示 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 BNP 组比较

图2 HS-142-1 对 BNP 促进巨噬细胞释放 MCP-1 蛋白的影响



1:对照组;2:TNF-α 组;3:BNP + TNF-α 组;4:BNP + TNF-α + HS-142-1组 A:Western 免疫印迹结果;B:MCP-1 蛋白表达柱状图,结果以 MCP-1/β-actin (IOD 比值)表示 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 TNF-α 组比较

图3 BNP 对 TNF-α 释放 MCP-1 的影响

3 讨论

脑利钠肽或称为 B 型利钠肽(brain natriuretic peptide/B-type natriuretic peptide, BNP)是属于被人们称为'心脏激素'的利钠肽家族的成员,是由 32 个氨基酸组成的多肽,主要由心室肌细胞分泌,但心房亦有少量分泌。既往的研究表明 BNP 能够防治心室重构,调节心肌的纤维增生过程,此外 BNP 还有类似心房利钠肽(ANP)的作用,包括血管扩张、利钠利尿、阻断肾素-血管紧张素-醛固酮系统和交感神经系统等。近来的研究表明,转 BNP 基因(BNP-Tg)小鼠能够促使中性粒细胞激活,同时增加 MMP-9 的表达[6]。此外,BNP 在心肌成纤维细胞中能够对抗 TGF-β 所引起的促增殖和炎症等作用[7]。提示我们 BNP 可能与体内炎症过程存在联系。

本研究表明,经过 BNP 预处理后,腹腔巨噬细胞 MCP-1 蛋白表达明显增加,且呈浓度依耐关系:用 10^{-4} mol/L BNP 预处理腹腔巨噬细胞后,MCP-1 蛋白表达增加最显著($P<0.05$),降低 BNP 浓度后,MCP-1 蛋白表达增加也降低,而用 10^{-8} mol/L BNP 处理腹腔巨噬细胞后,MCP-1 蛋白表达与对照组无显著差别($P>0.05$)。BNP 在巨噬细胞中发挥作用,需要通过其受体 GC-A 发挥生理功能[8],因而在本实验中,我们通过抑制 GC-A 受体,观察 BNP 对巨噬细胞 MCP-1 蛋白表达的影响。予细胞分别以 10^{-4} mol/L BNP 和 0、10、100 μg/ml HS-142-1 预处理 4 h 后,观察巨噬细胞内 MCP-1 蛋白表达。与对照组比较,100 μg/ml HS-142-1 处理后,细胞内 MCP-1 蛋白表达无显著差别;相较于对照组,0、10 μg/ml HS-142-1 处理后,细胞内 MCP-1 蛋白表达显著增高($P<0.05$)。在巨噬细胞中,TNF-α 能够显著增加 MCP-1 释放,同时也是动脉粥样硬化等疾病中重要的步骤[9],因而在本实验中检测了 BNP 对 TNF-α 促进释放 MCP-1 的影响。与 Kapoun 等[7]实验结果类似,BNP 在 TNF-α 存在的情况下,并不能进一步增加 MCP-1 的释放,反而显著抑制了 TNF-α 对 MCP-1 释放的促进作用。对此,Kapoun 等[7]认为,可能是细胞内 BNP 对炎症反应和促炎反应的一种平衡调节,因为在 Kapoun 等的研究中发现,巨噬细胞中 BNP 能够抑制 TGF-β 释放 COX-2、IL-6、TNFAIP6 和 TNFSF4 等炎症因子,同时 BNP 也能够 IL-1、GRO1、GRO3 和 MCP-4 等炎症因子的释放。而本实验中,未将细胞预先用 TGF-β 处理,BNP 仍然能在腹腔巨噬细胞中显著促进 MCP-1 的释放,但是预先用 TNF-α 处理后,细胞中 MCP-1 蛋白表达反而降低,进一步证实了 MCP-1 可能存在对炎症反应的双向调节作用,但其机制尚未明了。

近来的临床实验显示,BNP 在心血管疾病的预测和诊断中发挥着重要的作用,并认为 BNP 可作为最佳的心血管疾病预后诊断因子[10]。除此之外,研究还表明:在肾衰、肝硬化、慢性阻塞性肺疾病、急性脑血管病等疾病时亦可使 BNP 升高;死亡、心衰、再梗死患者入院所测 BNP 浓度显著高于对照组,动脉硬化患者中 BNP 水平明显增高,同时在 AMI 的患者血清中,BNP 水平也是明显高于稳定性心绞痛患者的,在其他心脑血管病如心力衰竭中,BNP 水平也是明显增高的。以往的研究对 BNP 主要集中在心衰方面,但是越来越多的证据提示 BNP 在动脉粥样硬化中也起到重要作用。

而且 Logistic 回归分析亦显示 BNP 是急性心肌梗死不良预后(死亡、心衰、非致死性再梗死)的独立预测因素[11]。在我们的研究中发现小鼠腹腔巨噬细胞经 BNP 预处理后,能够增加巨噬细胞内 MCP-1 蛋白表达,且这种作用能够被 BNP 在巨噬细胞上的受体 GC-A抑制剂所抑制,说明 BNP 主要通过 GC-A 受体发挥作用。TNF-α 是已知的促进巨噬细胞分泌 MCP-1 的因子,但是 BNP 可以在巨噬细胞内抑制 TNF-α 的这种作用,同时也证实了 BNP 在炎症反应中存在双向调节作用。因此本实验从理论上说明了 BNP 在巨噬细胞中的炎症调节作用,从而为临床疾病的治疗起到了指导作用。

参考文献:

[1] Daniels L B, Maisel A S. Natriuretic peptides[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(25): 2357 - 2368.

[2] Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(2): 318 - 328.

[3] Kapoun A M, Liang F, O'Young G, *et al*. B-Type Natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation[J]. Circ Res, 2004, 94(4): 453 - 461.

[4] Kiemer A K, Hartung T, Vollmar A M. cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages[J]. J Immunol, 2000, 165(1): 175 - 181.

[5] Liang F, O'Rear J, Schellenberger U, *et al*. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(10): 1071 - 1078.

[6] Kawakami R, Saito Y, Kishimoto I, *et al*. Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2004, 110(21): 3306 - 3312.

[7] Kapoun A M, Liang F, O'Young G, *et al*. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation[J]. Circ Res, 2004, 94(4): 453 - 461.

[8] LaPointe M C. Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene[J]. Peptides, 2005, 26(6): 944 - 956.

[9] Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(2): 266 - 274.

[10] Wang T J, Gona P, Larson M G, *et al*. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death[J]. N Engl J Med, 2006, 355(25): 2631 - 2639.

[11] Jarai R, Wojta J, Huber K. Circulating B-type natriuretic peptides in patients with acute coronary syndromes. Pathophysiological, prognostical and therapeutical considerations[J]. Thromb Haemost, 2005, 94(5): 926 - 932.

(编辑　栾　嘉)

(上接 1451 页)

2　结果

2.1　临床特征表现

25 例 PS 患者中,女性的发病率高于男性;发作持续时间为 25 ~ 805 (133.6 ± 31.9) s;PS 发作时的特点为起病缓慢,发作持续时间长,且均在觉醒状态下发作且无痫样放电;双眼闭合,双眼睑快速震颤,无凝视固定现象,无瞳孔散大、光反射存在;无口吐白沫、面色及口唇发紫现象,无大小便失禁;有目的或半目的的活动,这些活动能被外界的言语或动作打断。发作时可出现强直运动和强直体位,可呈四肢挺直或角弓反张状;有时表现为重复动作甚至暴力样动作。发作时多伴有哭叫,但意识存在,常能回忆发作时周围的情况,而发作后无疲劳及嗜睡感。

2.2　VEEG 监测结果

25 例 PS 患者均无发作期痫样放电,符合 PS 诊断标准。其中 18 例无同步痫性放电,诊断为单纯 PS;5 例为单纯 PS 合并亚临床发作,既往无癫痫病史,VEEG 监测到有与现在临床发作不同步的痫样放电;2 例诊断为 PS 合并癫痫。

2.3　随访结果

给予 25 例 PS 患者社会、心理及药物辅助对症治疗。随访 3 ~ 6 个月,并对其进行 VEEG 监测并暗示诱发试验监测复诊。11 例患者复诊 3 次,3 例患者复诊 4 次,4 例患者复诊 5 次,7 例患者复诊 7 次;25 例 PS 患者中 18 例未再发作,7 例发作次数明显减少。

3　讨论

PS 又称心因性发作(psychogenic seizures),为一种非痫性发作性疾病,是由一定心理机制引起而非脑电紊乱所致的运动、情绪、感觉或体验变化的发作[2],在临床上很容易与癫痫相混淆而造成误诊。VEEG 的出现给 PS 的诊断带来了突破性进展,VEEG 能较长时间记录患者的临床特点与脑电图改变,可精确观察分析其临床发作和脑电之间的关系,是目前鉴别发作性质及类型的最有效的检查方法。

我们将 VEEG 监测的长处与暗示诱发试验的优点相结合,用于 PS 的诊断,对确认为 PS 的患者给予社会、心理及药物辅助对症治疗,并随访 3 ~ 6 个月,复诊 3 ~ 7 次,其中 18 例未再发作,7 例发作次数明显减少。因此我们认为,暗示诱发试验下 VEEG 监测能较准确地诊断 PS,并给予正确的治疗,使患者早日康复。

关键词:视频脑电图;暗示诱发试验;假性癫痫;诊断
中图法分类号:R742.1　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 杨　敏,张晓琴,朱　能. 儿童假性癫痫发作的临床特征与视频脑电图监测的意义[J]. 医学新知杂志, 2006, 16(1): 22 - 24.

[2] 王学峰,肖　波,孙红斌. 难治性癫痫[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2002: 254 - 257.

(编辑　张　维)