

胸腺肽 $\alpha 1$ 对 THP-1 细胞 Toll 样受体 2 和 MyD88 以及 TNF- α 表达的影响

周苏明, 周 静, 程蕴琳*, 吴文溪¹

(南京医科大学第一附属医院老年医学科,¹普外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察人 THP-1 细胞与胸腺肽 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$) 孵育后, 予细菌脂蛋白(BLP) 刺激后, Toll 样受体 2(TLR₂)、髓系分化因子 88(MyD88) 蛋白的表达及细胞因子 TNF- α 的变化。方法: 实验采用人 THP-1 细胞系进行细胞培养, 分为 4 组: 对照组为 THP-1 细胞不加任何刺激; BLP 组以 1 000 ng/ml BLP 刺激 2 h; T $\alpha 1$ 组为 THP-1 细胞加 1 000 ng/ml T $\alpha 1$ 孵育 24 h, 不加 BLP 刺激; T $\alpha 1$ + BLP 组为 THP-1 细胞加 1 000 ng/ml T $\alpha 1$ 孵育 24 h 后再加 1 000 ng/ml BLP 刺激 2 h。以 Western blot 分析 TLR₂、MyD88 蛋白含量。ELISA 法测定 TNF- α 。结果: 与对照组相比, BLP 组和 T $\alpha 1$ + BLP 组的 TNF- α 均显著增加, 而 T $\alpha 1$ 组无显著改变; 在 TLR₂ 和 MyD88 的表达上, T $\alpha 1$ 组和 T $\alpha 1$ + BLP 组均高于对照组和 BLP 组。结论: 胸腺肽 $\alpha 1$ 可增加 THP-1 细胞 TLR₂、MyD88 蛋白的表达, 其对免疫细胞的影响与 BLP 诱发炎症反应的途径不完全一致。

[关键词] 胸腺肽 $\alpha 1$; 细菌脂蛋白; Toll 样受体 2; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R364.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2006)10-0921-04

Effects of Thymosin $\alpha 1$ on the expression of Toll-like receptor 2, MyD88 and TNF- α in THP-1 cell line

ZHOU Su-ming, ZHOU Jing, CHENG Yun-lin*, WU Wen-xi¹

(Department of Geriatrics, ¹Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of thymosin $\alpha 1$ on the expression of Toll-like receptor 2 (TLR₂), myeloid differentiation factor 88(MyD88) and TNF- α in human THP-1 cell line stimulated by bacterial lipoprotein(BLP) with different ways. **Methods:** Human THP-1 cells were incubated and divided into 4 groups: control group (incubated in RPMI-1 640 cell culture fluid with no stimulus), BLP group (stimulated with 1 000 ng/ml of BLP for 2 h), T $\alpha 1$ group (incubated with 1 000 ng/ml thymosin $\alpha 1$ for 24 h), and T $\alpha 1$ + BLP group (stimulated with 1 000 ng/ml of BLP for 2 h after incubated with thymosin $\alpha 1$). TLR₂, MyD88 protein concentration were detected using western blot analysis, and TNF- α was detected using available ELISA kit. **Results:** The concentration of TNF- α in T $\alpha 1$ group had no change compared to control group. It increased in BLP group and T $\alpha 1$ + BLP group, while there was no difference between both groups. TLR₂ and MyD88 protein expression in T $\alpha 1$ group and T $\alpha 1$ + BLP group were up-regulated. **Conclusion:** Thymosin $\alpha 1$ up-regulates the expression of TLR₂ and MyD88 protein in THP-1 cell line. The mechanisms for increase of TNF- α synthesis in THP-1 cells caused by T $\alpha 1$ may be partly different from that induced by BLP.

[Key words] thymosin $\alpha 1$; bacterial lipoprotein; Toll-like receptor 2; TNF- α

[Acta Univ Med Nanjing, 2006, 26(10): 921-924]

细菌脂蛋白^[1](bacterial lipoprotein, BLP)广泛存在于革兰阳性、革兰阴性细菌和支原体胞壁上,其

氨基端具有特征性氨基酯酸, N-酰基-S-二酯酰甘油半胱氨酸, 是其结构中的活性成分。细菌侵入机体后, BLP 与免疫细胞膜表面的 Toll 样受体 2(toll-like receptor 2, TLR2) 结合, 通过其下游的接头蛋白 MyD88 激活炎症反应信号转导通路, 产生炎症因子。本研究通过体外实验, 了解免疫调节剂胸腺肽

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2006250)和江苏省卫生厅135重点实验室资助项目

*通讯作者, E-mail: chenyl@163.net

$\alpha 1$ (thymosin $\alpha 1$, T $\alpha 1$) 对 TLR2、MyD88 及炎症因子 TNF- α 表达的影响,旨在探讨 T $\alpha 1$ 抗感染作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

THP-1 细胞为人单核细胞株,购于上海生物研究所;胸腺肽 $\alpha 1$ 注射剂为美国 Sciclone 公司产品;细菌脂蛋白 (BLP, Pam3CSK4.3HCl, 美国 Alexis 公司), RPMI-1 640 培养基 (美国 Gibco 公司), 小牛血清 (美国 Hyclone 公司), 抗 TLR₂、MyD88 兔抗人抗体 (美国 eBioscience 公司), Marker (美国 Fermentas 公司), ELISA 试剂盒 (武汉晶美生物工程有限公司), 硝化纤维素膜 (美国 Millipore 公司), CO₂ 培养箱 (美国 ThermoForma 公司), 全自动酶标仪 (美国 Bio-TEK 公司), 电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

THP-1 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 37℃, 5% CO₂ 下生长。THP-1 细胞为悬浮型生长, 2~3 天换液, 细胞生长至 4~6 × 10⁶/ml 时及时传代。

1.2.2 BLP 及 T $\alpha 1$ 处理

本实验分为 4 组: 对照组为 THP-1 细胞不加任何刺激, 用培养液调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml, 置 6 孔细胞培养板中, CO₂ 孵箱中孵育 24 h; BLP 组为 THP-1 细胞在培养液中孵育 24 h 后以 1 000 ng/ml BLP 刺激 2 h; T $\alpha 1$ 组为 THP-1 细胞加 1 000 ng/ml T $\alpha 1$ 孵育 24 h, 不加 BLP 刺激; T $\alpha 1$ + BLP 组为 THP-1 细胞加 1 000 ng/ml T $\alpha 1$ 孵育 24 h 后再加 1 000 ng/ml BLP 刺激 2 h。

1.2.3 细胞因子 TNF- α 浓度测定

THP-1 细胞经上述处理后, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, -7℃ 保存。根据 ELISA 试剂盒说明操作, 反应终止后立即用酶标仪测定 A₄₅₀, 同时绘制标准曲线, 得出 TNF- α 浓度。

1.2.4 Western Blot 分析

THP-1 细胞经上述处理后, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, -7℃ 保存。加入细胞裂解液 [20 mmol/L Tris (pH7.4), 4 mmol/L EDTA (pH8.0), 2% SDS], 冰上超声破碎 5 s × 15 次, 12 000 r/min 离心 8 min, 取上清液, BCA 蛋白测定试剂盒 (美国 Pierce 公司) 测定蛋白浓度, 将样本调整至相同浓度。沸水煮沸 5 min。电泳时取等量蛋白上样, 以 8%

的分离胶分离, 硝化纤维素膜恒压 100 V 冰上转膜 1 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, TBST 洗涤后加入抗 TLR₂、MyD88 兔抗人抗体 (1:1 000), 4℃ 过夜。洗膜后与辣根过氧化物酶联的抗兔二抗 (1:20 000) 室温振荡 1 h, super-signal (美国 Pierce 公司) 显色, 最后曝光、显影, 定影, 晾干。

1.3 统计学方法

各组数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。细胞因子 TNF- α 浓度对原始数据编秩, 对秩次进行随机区组设计的方差分析, 方差分析后的 4 个处理组的两两比较采用 Bonferroni 法校正 P 值。TLR₂、MyD88 蛋白表达取其相对 A 值, 对原始数据进行随机区组设计的方差分析。采用 Stata8.0 统计软件进行分析, P < 0.05 时具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同处理后细胞分泌 TNF- α 浓度的变化

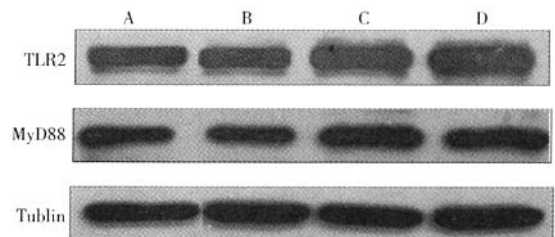
用大剂量 (1 000 ng/ml) BLP 刺激 THP-1 细胞 2 h 后, 不管之前有没有用 T $\alpha 1$ 刺激, TNF- α 水平均明显升高, 与对照组比较均有统计学差异。用 T $\alpha 1$ 刺激细胞 24 h 后, 再用 1 000 ng/ml BLP 刺激, 与未用 T $\alpha 1$ 刺激, 直接予大剂量 BLP 刺激的细胞相比, TNF- α 升高的水平, 两者之间无统计学差异。用 T $\alpha 1$ 刺激细胞, TNF- α 水平无明显升高, 与对照组之间无统计学差异 (表 1)。

图 1 显示 T $\alpha 1$ 组和 T $\alpha 1$ + BLP 组, TLR₂、MyD88 蛋白的条带较对照组明显增强。

表 1 不同处理后 TNF- α 浓度测定 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α 浓度
对照组	6	91.75 ± 76.72*
BLP 组	6	1 666.30 ± 1 056.52 [△]
T $\alpha 1$ 组	6	93.68 ± 81.72*
T $\alpha 1$ + BLP 组	6	2 711.60 ± 548.79 ^{*△}

与对照组比较, *P < 0.05; 与 BLP 组比较, [△]P < 0.05; 与 T $\alpha 1$ 组比较, [△]P < 0.05。



A: 对照组; B: BLP 组; C: T $\alpha 1$ 组; D: T $\alpha 1$ + BLP。

图 1 不同处理后 TLR₂、MyD88 蛋白含量的变化

3 讨论

机体的固有免疫系统能够识别侵入的微生物并产生快速有效的免疫应答,其识别系统由免疫细胞表面的一系列受体构成,它们能识别特定的病原相关性分子模式 (pathogens associated molecular pattern, PAMP)。当这些被称作 Toll 样受体 (TLRs) 的识别蛋白发现入侵微生物后,他们刺激胞内的信号转导途径,最终产生多种免疫应答 [2-5]。研究显示,TLR₂ 介导了机体对 BLP 的反应,是 BLP 细胞跨膜信号传导的关键受体。TLR₂ 在哺乳动物体内广泛分布于单核巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性细胞、树突状细胞等多种细胞表面。当 BLP 被细菌释放后,直接与细胞表面的 TLR2 胞外区结合 [6],继而通过胞内结构发生构象变化 [1],促使一系列下游衔接蛋白募集至胞内的 Toll/IL-1 (TIR) 结构域。

多数情况下,刺激 TLR 引起炎症因子生成依赖于配体蛋白 MyD88 共同的途径,后者为 35 kD 的胞浆内蛋白质,是 TLR/IL-1R 超家族信号途径中普遍存在的接头蛋白,也是 TLR/IL-1R 超家族的重要成员之一。这种蛋白能通过胞浆内 C 末端 TIR 区与 TLR 胞内尾端 TIR 区直接相连,并使其与促进信号进一步转导至胞内的分子相结合,最终将信号转至核内,促使 IRAK 发生磷酸化,然后从受体复合物中分离,继而与 TNF 受体激活因子 6 (TNF receptor-activated factor 6, TRAF6) 结合,这个过程可触发两个不同信号通路的激活,即 c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 途径和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族及 NF- κ B 途径,引起一系列细胞因子的分泌,如 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-12、IL-18 等,产生炎症反应 [1,7-8]。

本研究显示,与对照组相比,BLP 组和 T α 1 + BLP 组的 TNF- α 均显著增加,证实细菌细胞壁成分 BLP 可刺激机体的免疫细胞产生炎症因子,导致炎症反应。而 Western blot 蛋白测定显示,BLP 组的 TLR₂ 和 MyD88 蛋白表达均无显著增加,MyD88 的表达似有减少,其原因可能为实验误差或 BLP 通过非 MyD88 依赖途径激活免疫细胞,产生炎症因子。近年的研究显示,LPS 可不依赖 MyD88 途径 [3,9],通过 TIRAP/Mal 与 IRAK 结合,最终导致 NF- κ B 活化产生炎症因子 [10-14]。本实验结果提示,BLP 刺激 THP-1 细胞产生炎症因子可能与 MyD88 途径无关,BLP 是否有类似于 LPS 的非 MyD88 依赖途径还有待于进一步研究证实。

T α 1 [15] 是一种由 28 个氨基酸合成的多肽,是临

床常用的免疫调节剂,具有促进 NK 细胞的活性、促进病毒的清除、抗氧化、抑制肿瘤细胞生长等作用,被临床广泛应用于治疗免疫缺陷、恶性肿瘤以及某些病毒感染性疾病。但其抗细菌感染的作用机制仍不清楚。意大利学者 Luigina R [16] 的研究发现,T α 1 可以显著增加哺乳动物树突状细胞 TLR₂、TLR₅ 和 TLR₉ 的表达,并且必须是通过 MyD88 依赖途径增强树突状细胞分泌 IL-12p70 的产生。国内学者赵媛 [17] 等研究发现,T α 1 可以增加 THP-1 细胞 TLR4 mRNA 的表达,促进 TNF- α 的分泌,且与 T α 1 的浓度及作用时间正相关。

本组资料显示,与对照组相比,THP-1 细胞与 T α 1 共同孵育后 TNF- α 浓度并未增加,而在 BLP 刺激后 TNF- α 的表达显著增加,说明 T α 1 本身并不刺激免疫细胞产生 TNF- α ,必须在细菌或其组成成分作用下机体才能产生免疫应答;而与 BLP 组相比,T α 1 + BLP 组的 TNF- α 的表达量较高,但无统计学差异;从 TLR₂ 和 MyD88 蛋白表达来看,T α 1 组和 T α 1 + BLP 组都较对照组和 BLP 组增加。本研究提示:① T α 1 对免疫细胞炎症反应通路中的 TLR₂-MyD88 途径有正性影响,其抗细菌感染的作用可能与此有关;② T α 1 对免疫细胞的影响与 BLP 产生炎症反应的途径不完全一致;③ 尚无充分证据表明,T α 1 可增强免疫细胞产生炎症因子的能力以及 TNF- α 的产生与 TLR2 和 MyD88 蛋白表达增加有关。

【参考文献】

- [1] Shizuo A, Kiyoshi T, Tsuneyasu K. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nature Immunology*, 2001, 2(8): 675-680
- [2] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses [J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(10): 987-995
- [3] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nature Immunology*, 2001, 2(8): 675-680
- [4] Zarembka KA, Godowski PJ. Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines [J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 554-561
- [5] Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells [J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 5998-6004

- [6] Vasselon T, Detmers PA, Charron D, et al. TLR2 recognizes a lipopeptide through direct binding [J]. *J Immunol*, 2004, 173(12): 7401-7405
- [7] Steven MO, Christian EH. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock [J]. *Crit Care*, 2002, 6(2): 125-136
- [8] Meng GX, Mark R, Matthias S, et al. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2 - driven lethal shock-like syndromes [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(10): 1473-1481
- [9] Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 167(10): 5887-5894
- [10] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like receptor signaling pathway [J]. *Science*, 2003, 301(5633): 640-643
- [11] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(11): 1144-1150
- [12] Kaisho TS, Akira. Toll like receptors as adjuvant receptors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1589: 1213
- [13] Medzhitov R. Toll receptors and innate immunity [J]. *Nature Rev Immunol*, 2001, 1: 1352145
- [14] Fitzgerald KA, Plasson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88- adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction [J]. *Nature*, 2001, 413: 78283
- [15] Zavaglia C, Airoidi A, Pinzello G. Antiviral therapy of HBV- and HCV-induced liver cirrhosis [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2000, 30(3): 234-241
- [16] Luigina R, Francesco B, Roberta G, et al. Thymosin 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through Toll-like receptor signaling [J]. *Blood*, 2004, 103(11): 4232-4239
- [17] 赵媛, 张顺财, 曹中伟, 等. 胸腺肽 $\alpha 1$ 对 THP-1 细胞 Toll 样受体 4 表达的影响 [J]. *中国临床医学*, 2004, 11(增刊): 26-28

[收稿日期] 2006-04-05

Effects of genistein on angiotensin-converting enzyme in rats

Yin-Yan Xu, Cui Yang, Sheng-Nan Li.

Department of Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract

Genistein (4,5,7-trihydroxyisoflavone), a phytoestrogen with selective estrogen receptor modulator properties, has received a great deal of attention over the last few years because of its potentially preventive roles against cardiovascular diseases. However, the precise molecular mechanisms for this modulation are not fully elucidated. In this study, we investigated (both in vivo and in vitro) the relationship between genistein and the changes of angiotensin-converting enzyme (ACE) in rat aortic endothelial cells (RAECs), serum and tissue (aorta). ACE expression was assessed by the immunofluorescence and the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Serum and tissue ACE activity was detected with a commercial kit. Genistein exhibited a concentration-dependent inhibitory effect on the expression of ACE, particularly at higher concentrations (24.70 ± 1.20 at $100 \mu\text{M}$, $P < 0.01$, and 18.22 ± 0.92 at $200 \mu\text{M}$, $P < 0.01$ compared with the control group 50.49 ± 5.19). The estrogen receptor blocker tamoxifen at $100 \mu\text{M}$ attenuated this effect of genistein. The extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) blocker PD98059 also markedly inhibited this effect. The observations in vivo were highly consistent with the data in RAECs. These results indicate that genistein inhibits the expression of ACE via estrogen receptor and subsequently ERK1/2 signaling pathway in RAECs. Our results suggest that the down-regulation of ACE with a consequent change in the circulating levels of angiotensin II (Ang II), vasorelaxant angiotensin-(1-7) and bradykinin plays an important role in cardiovascular effects of genistein through the ERK1/2 pathway.

Key words: Genistein; Angiotensin-converting enzyme; Estrogen; Tamoxifen; Extracellular signal-regulated kinase 1/2; Aorta; Endothelial cell

Life Sciences 79 (2006) 828-837

*Corresponding author. Tel.: +86 25 86863364; fax: +86 25 86863050.

E-mail address: snli@njmu.edu.cn (S.-N. Li).