

白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 对血管平滑肌细胞及基质金属蛋白酶-2骨桥蛋白基因表达的影响

周秀霞 温进坤 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 石家庄 050017)

主题词 肌, 平滑, 血管; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 基质金属蛋白酶-2; 骨桥蛋白; 基因表达; 大鼠

摘要 促炎细胞因子白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 是血管平滑肌细胞的强效促分裂原, 为了探讨其促血管平滑肌细胞增殖是否与细胞外基质降解及粘附蛋白合成有关, 本文以体外培养的血管平滑肌细胞为研究对象, 应用 Northern 印迹及基质金属蛋白酶-2 活性酶图分析方法动态观察白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 对血管平滑肌细胞表达基质金属蛋白酶-2 及骨桥蛋白的影响。结果发现, 白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 均可显著诱导基质金属蛋白酶-2 及骨桥蛋白的基因表达, 血管平滑肌细胞受两种细胞因子刺激 12 h 后, 基质金属蛋白酶-2 及骨桥蛋白 mRNA 表达活性最高, 分别达到对照细胞的 3 倍左右和 10 倍以上。对细胞培养基基质金属蛋白酶活性进行酶图分析的结果发现, 肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-1 β 作用于血管平滑肌细胞 12 及 24 h 时, 基质金属蛋白酶降解明胶的活性约为对照细胞培养基的 2 倍和 1.5 倍。提示这类细胞因子可同时在多位点上对血管平滑肌细胞的迁移与增殖发挥促进作用。

Effects of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α on Matrix Metalloproteinase-2 and Osteopontin Gene Expression of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

ZHOU Xiu-Xia, WEN Jin-Kun and HAN Mei

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

MeSH Muscle, Smooth, Vascular; Interleukin-1 β ; Tumor Necrosis Factor- α ; Matrix Metalloproteinase-2; Osteopontin; Gene Expression; Rats

ABSTRACT **Aim** To explore whether or not the function of proinflammatory cytokines, interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in promoting vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation was concerned with the degradation of extracellular matrix (ECM) and the synthesis of adhesion protein. **Methods** Cultured VSMCs were used as experimental objects, Northern blotting and zymography analysis were used to observe the effects of IL-1 β and TNF- α on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and osteopontin gene expression. **Results** Both IL-1 β and TNF- α could obviously induce the gene expression of MMP-2 and osteopontin, which reached a peak at 12 h after treatment, and was about 3 times and over 10 times respectively, comparing with the control. The results of cell media MMP-2 zymography analysis showed that the activity of MMP-2 was about 2 times and 1.5 times, comparing with those from the control cell media. **Conclusion** IL-1 β and TNF- α could simultaneously promote the migration and proliferation of VSMC by stimulating the gene expression of MMP-2 and osteopontin.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 异常增殖是高血压、动脉粥样硬化和血管再狭窄等心血管病的共同病理特征。近年研究发现, VSMC 增殖除了与细胞周期调节基因激活有关外, 还与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解及细胞本身合成粘附蛋白等多种因素有关^[1,2]。已经证明, 血管内皮受损部位的内皮细胞、VSMC 和巨噬细胞等所释放的碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β), IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等是 VSMC 的强效促分裂原^[3], 但对这些细胞因子是否也同时影响 ECM 代谢及细胞粘附蛋白合成目前研究尚少。本文观察促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 对 VSMC 表达催化 ECM 分解的基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 及细胞粘附蛋白-骨桥蛋白的影响, 以进一步探讨细胞因子促 VSMC 迁移与增殖的作用机制。

ukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等是 VSMC 的强效促分裂原^[3], 但对这些细胞因子是否也同时影响 ECM 代谢及细胞粘附蛋白合成目前研究尚少。本文观察促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 对 VSMC 表达催化 ECM 分解的基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 及细胞粘附蛋白-骨桥蛋白的影响, 以进一步探讨细胞因子促 VSMC 迁移与增殖的作用机制。

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供, M199 培养基为 GIBCO 公司产品, 基质金属蛋白酶- 2 cDNA 质粒由 Mamer BL 教授惠赠, 骨桥蛋白 cDNA 质粒为本室保存, α -³²P- dCTP 为北京亚辉公司产品, 小牛血清为本室自制, 随机引物标记试剂盒由 Promega 公司提供, 重组人 IL- 1 β 及 TNF- α 为北京邦定生物医学公司产品。

1.2 大鼠血管平滑肌细胞的培养

取 5~ 8 周龄 SD 大鼠胸主动脉, 按本室报道的贴块法进行原代培养^[4]。培养基为含 10% 及 15% 小牛血清的 M199, 待 VSMC 长满培养瓶后, 用 0. 25% 胰蛋白酶消化传代, 实验选用 4~ 10 代细胞。

1.3 细胞分组及 RNA 的提取

当传代细胞生长至 80% 汇合时, 换成含 10% 小牛血清的 M199 培养基, 同时分别加入 IL- 1 β 或 TNF- α 至终浓度为 3 Mu/L, 继续培养 6、12、24 和 48 h 后, 收集各时间点的培养基分析基质金属蛋白酶- 2 活性, 收集细胞按异硫氰酸胍- 酚- 氯仿一步法^[5]提取细胞总 RNA, 以培养基内不加 IL- 1 β 及 TNF- α 的细胞作对照。

1.4 Northernblot 分析

取 RNA 30 μ g, 经 1% 琼脂糖- 甲醛变性凝胶电泳后, 转移至尼龙膜上, 80 $^{\circ}$ C 干燥 2 h, 按 Sambrook 等^[6]方法于 42 $^{\circ}$ C 条件下, 在含 50% 甲酰胺、6 \times SSC、5 \times Denhards、0. 5% SDS 和 100 mg/L 变性鲑精 DNA 中与用 α -³²P- dCTP 标记的基质金属蛋白酶- 2 及骨桥蛋白 cDNA 探针进行杂交, 杂交膜先后用 1 \times SSC、0. 1% SDS 及 0. 2 \times SSC、0. 1% SDS 漂洗, 然后在 - 70 $^{\circ}$ C 放射自显影。

1.5 基质金属蛋白酶- 2 活性的酶图分析

取被 IL- 1 β 或 TNF- α 刺激 6、12、24 和 48 h 的细胞培养基, 按文献^[7]方法, 用含明胶的 SDS- PAGE 检测基质金属蛋白酶- 2 活性。分离胶浓度为 8% (含 0. 2% 明胶), 浓缩胶为 5%, 120 V 恒压电泳 2 h。电泳结束后, 凝胶经 2. 5% Triton X- 100 漂洗 2 次, 15 min/次, 使基质金属蛋白酶- 2 复性, 随后加入反应缓冲液(50 mmol/L Tris- HCl, pH 8. 0, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 1% Triton X- 100) 37 $^{\circ}$ C 孵育 9 h, 0. 5% 考马斯亮兰染色 2 h, 脱色液脱色至蓝色背景下白色条带清晰。以不加刺激因子的相应时间点的细胞培养基作对照。

1.6 密度扫描分析

采用美国 Kodak 公司 1D 数码成像分析系统软件对 Northern 杂交信号及基质金属蛋白酶- 2 酶图进行定量分析。

2 结果

2.1 肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素- 1 β 对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶- 2 基因表达的影响

如图 1 (Figure 1) 所示, VSMC 被 TNF- α (3 Mu/L) 或 IL- 1 β (3 Mu/L) 处理 6 h 后, 基质金属蛋白酶- 2 表达活性开始增加, 12 h 达到峰值, 杂交带位于 28 S 和 18 S rRNA 之间, 与文献^[8]报道的基质金属蛋白酶- 2 mRNA 长度一致。经光密度扫描对杂交信号进行定量分析的结果表明, TNF- α 和 IL- 1 β 作用于 VSMC 12 h, 基质金属蛋白酶- 2 表达活性分别达对照细胞的 2. 7 倍和 3. 6 倍。

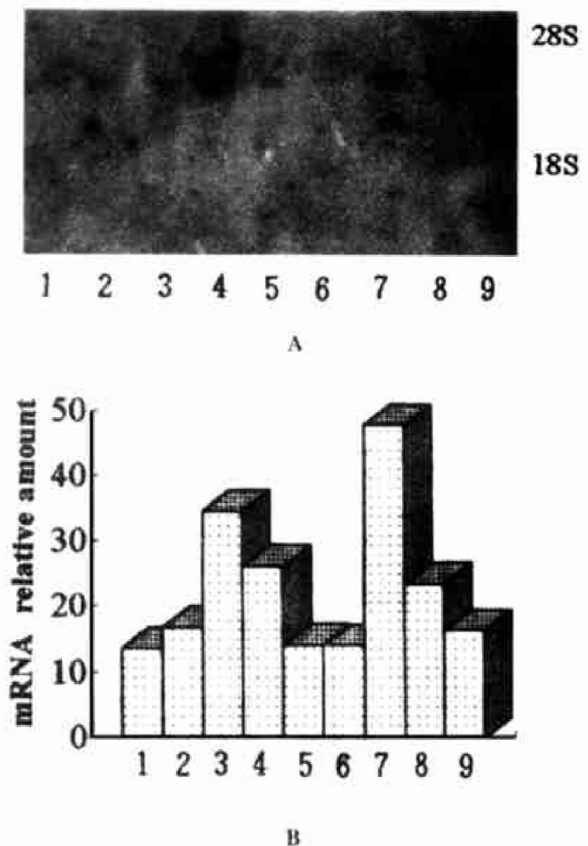


图 1. 血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶- 2 mRNA 的 Northern 印迹分析

Figure 1. Northern blot analysis for MMP- 2 mRNA in VSMC treated by IL- 1 β , TNF- α at different times. A.

Autoradiogram for Northern blotting. B. MMP- 2 RNA signals were quantitated by densitometric scanning. 1: control; 2~ 5: VSMC treated by TNF- α for 6, 12, 24, and 48 h; 6~ 9: VSMC treated by IL- 1 β for 6, 12, 24, and 48 h

2.2 肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素- 1 β 对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶- 2 活性的影响

用含明胶 SDS- PAGE 对 VSMC 培养基中基质金属蛋白酶- 2 活性进行酶图分析时发现, 对照及被 TNF- α 、IL- 1 β 处理不同时间的 VSMC 培养基均可在 72 kDa、68 kDa 和 62 kDa 的位置使明胶发生降

解。根据基质金属蛋白酶-2的分子质量,可知72 kDa和68 kDa及62 kDa处的明胶降解区带分别是基质金属蛋白酶-2酶原及活性形式所造成(图2, Figure 2)。对酶图进行定量分析的结果表明, TNF- α 和IL-1 β 刺激VSMC 12 h,细胞培养基中的基质金属蛋白酶-2活性增加幅度均达到最大或接近最大,直到24 h,仍维持在较高水平,在这两个时间点的活性增加幅度约为对照细胞培养基的2倍和1.5倍左右。至48 h,在被两种因子刺激的细胞培养基中,基质金属蛋白酶-2活性增加幅度明显下降,但基质金属蛋白酶-2活性仍高于相应时间点的对照细胞培养基。

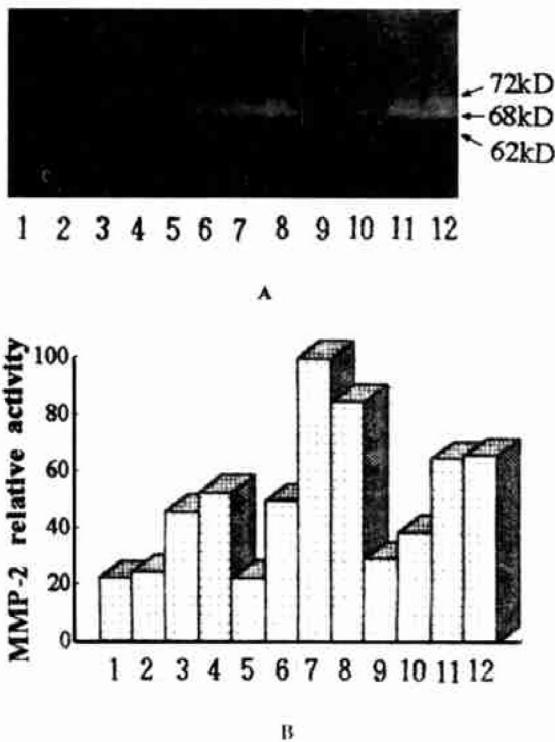


图2. 血管平滑肌细胞培养基中基质金属蛋白酶-2活性的酶图分析

Figure 2. Zymography analysis of MMP-2 activity in conditioned media. A. Enzymatic activity of MMP-2 was analyzed using SDS-PAGE gelatin zymography. B. MMP-2 activity was quantitated by densitometric scanning. 1~4: controls at different times; 5~8: VSMC treated by TNF- α for 6, 12, 24, and 48 h; 9~12: VSMC treated by IL-1 β for 6, 12, 24, and 48 h

2.3 白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 对血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响

如图3 (Figure 3)所示,被IL-1 β (3 Mu/L)或TNF- α (3 Mu/L)处理的VSMC,骨桥蛋白基因表达活性明显增强。对杂交信号进行定量分析的结果表明, TNF- α 和IL-1 β 作用于VSMC 12 h时,骨桥蛋白mRNA表达量均达最大,在该时间点,两者分别达

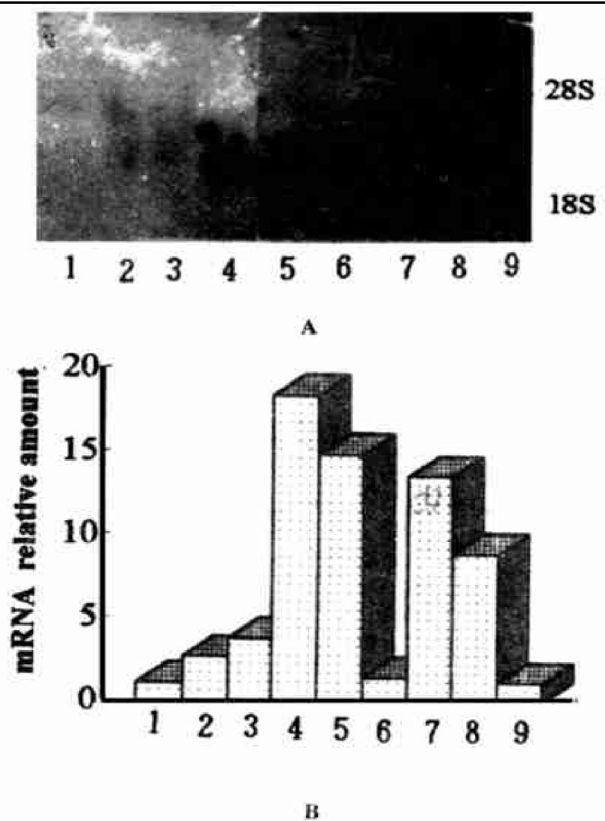


图3. 血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 的 Northern 印迹分析

Figure 3. Northern blot analysis of osteopontin mRNA. A. Autoradiogram for Northern blotting. B. Osteopontin mRNA signals were quantitated by densitometric scanning. 1: control; 2~5: VSMC treated by IL-1 β for 48, 24, 12, and 6 h; 6~9: VSMC treated by TNF- α for 6, 12, 24, and 48 h

对照细胞的13.5和18.3倍。之后, mRNA表达量逐渐下降,至48 h,已接近对照水平。

3 讨论

业已证明,血管内皮受损时,损伤部位的内皮细胞和巨噬细胞等合成与分泌白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 及碱性成纤维细胞生长因子等生长因子或细胞因子。近年研究表明,这些因子是刺激血管平滑肌细胞增殖与迁移的重要因素。我们^[9]及Giachelli等^[10]都报道,大鼠主动脉内皮剥脱后在受损部位的血管平滑肌细胞中基质金属蛋白酶-2和骨桥蛋白表达被显著诱导。为了检查基质金属蛋白酶-2和骨桥蛋白的表达是否可直接由白细胞介素-1 β 或肿瘤坏死因子- α 所诱导,本研究以白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 作为刺激因素,动态观察了二者对体外培养的血管平滑肌细胞表达基质金属蛋白酶-2及骨桥蛋白的影响。结果发现,白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 均可显著诱导血管平滑肌细胞对基质金属蛋白酶-2及骨桥蛋白基

因的表达。血管平滑肌细胞受白细胞介素-1 β 或肿瘤坏死因子- α 刺激 12 h 后, 基质金属蛋白酶-2 及骨桥蛋白表达活性最高, 分别达对照细胞的 3 倍左右和 10 倍以上。此后两者表达呈逐渐下降趋势, 48 h 时基本恢复到对照水平。用含明胶的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳对细胞培养基中基质金属蛋白酶-2 活性进行分析的结果显示, 肿瘤坏死因子- α 刺激血管平滑肌细胞 12 h 时基质金属蛋白酶-2 活性增加幅度已接近最大, 至 24 h, 仍维持在较高水平。白细胞介素-1 刺激血管平滑肌细胞后培养基中基质金属蛋白酶-2 活性变化的谱型与肿瘤坏死因子- α 刺激后的变化相一致。细胞外基质 (ECM) 降解是血管平滑肌细胞从血管中膜向内膜下迁移及增殖的必要条件, 骨桥蛋白是一种细胞粘附蛋白。近年发现, 基质金属蛋白酶-2 在 ECM 降解过程中发挥重要调节作用^[11], 骨桥蛋白表达与细胞迁移密切相关^[12]。本文结果进一步表明, 白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 等促炎细胞因子除了能促进血管平滑肌细胞增殖相关基因表达外, 还可同时诱导基质金属蛋白酶-2 和骨桥蛋白基因表达, 说明这类细胞因子能同时多位点、多层次上启动和/或促进血管平滑肌细胞的迁移与增殖, 从而构成血管内皮损伤后内膜增厚的主要原因。

参考文献

- 1 Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovas Res*, 1995, **30**: 544- 556
- 2 Liaw L, Almeida M, Hart CE, et al. Osteopontin promotes vascular

cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth vascular cell in vitro. *Circ Res*, 1994, **74**: 214- 224

- 3 Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Cytokine- stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res*, 1994, **75**: 181- 189
- 4 胡静, 温进坤, 魏素珍, 等. 甲基硝基亚硝胍对血管平滑肌细胞增殖的影响. *中华物理医学杂志*, 1994, **16**: 211- 213
- 5 Chomczynski P, Sacchi N. Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156- 159
- 6 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual* 2nd ed, New York, Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- 7 孙红霞, 温进坤, 韩梅. 大鼠不同年龄和组织中明胶酶活性的比较研究. *河北医科大学学报*, 1998, **19**: 350- 351
- 8 Haas TL, Davis SJ, Madri JA. Three- dimensional Type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1- MMP and MMP- 2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 3 604- 610
- 9 周秀霞, 温进坤, 韩梅. 血管再狭窄发生过程中 MMP- 2 基因表达与胶原转换的动态变化. *中国生物化学与分子生物学杂志*, 1999, 15(6)
- 10 Giachelli CM, Bae N, Almeida M, et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 1 686- 696
- 11 Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 1995, **77**: 863- 868
- 12 石纓, 温进坤. 新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素对大鼠血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7**: 1- 3

(此文 1999- 06- 28 收到, 1999- 11- 15 修回)

(此文编辑 胡必利)