

## 阻断清道夫受体 A iv对巨噬细胞源泡沫细胞基质金属蛋白酶及其组织抑制剂表达的影响

危当恒, 万腊香, 刘录山, 万载阳, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学; 清道夫受体 A iv对动脉粥样斑块的作用; 逆转录聚合酶链反应; 基质金属蛋白酶; 组织型基质金属蛋白酶抑制剂; 巨噬细胞源泡沫细胞; THP-1 细胞

[摘要] 为探讨巨噬细胞源泡沫细胞基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的表达及活性与清道夫受体 A iv的关系, 应用油红 O 染色、高效液相色谱法检测巨噬细胞的泡沫化, 逆转录聚合酶链反应检测细胞清道夫受体 A iv的表达, Western blot、明胶酶谱法观测巨噬细胞泡沫化后阻断清道夫受体 A iv对 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 及组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达的影响。结果发现, THP-1 细胞在佛波酯处理 24 h 后有清道夫受体 A iv 的表达, 清道夫受体 A iv 反义寡核苷酸及其抗体能显著降低基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的蛋白表达和活性, 并增加组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 的表达。结果提示, 阻断清道夫受体 A iv 有助于基质金属蛋白酶与组织型基质金属蛋白酶抑制剂的平衡维持, 从而抑制细胞外基质的降解。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

### Effects of Blocking Scavenger Receptor A iv on Expression of Matrix Metalloproteinase and its Tissue Inhibitor of Metalloproteinase in Macrophage-Driven Foam Cells

WEI Dang-Heng, WAN La-Xiang, LIU Lu-Shan, WAN Zai-Yang, and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase; Tissue Inhibitor of Metalloproteinase; Macrophage-Driven Foam Cells; THP-1; Cell Scavenger Receptor A iv; Plaques

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of the scavenger receptor A iv (SR-A iv) on expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and its tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in macrophage-driven foam cells. **Methods** THP-1 cells were incubated with PMA, then added oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to induce macrophage cell foaming. Foamed macrophage cells were verified by oil red staining and high performance liquid chromatography (HPLC). Scavenger receptor A iv mRNA was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Antisense and antibody were used to block SR-A iv in foamed cell. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 were detected by Western blot. MMP-2 and MMP-9 activities in media were estimated using zymography. **Results** Blocking SR-A iv inhibits activities and expression of MMP-2 and MMP-9, increases the expression of TIMP-1 and TIMP-2. **Conclusions** Blocking the activities of SR-A iv may contribute to maintain the balance between MMP and TIMP and inhibit macrophage-mediated matrix breakdown in the atherosclerotic plaques.

冠状动脉粥样硬化斑块由稳定转为不稳定, 继而破裂导致血栓形成是急性冠状动脉综合症最主要的发病机制, 但参与斑块破裂的细胞学机制复杂。研究证实, 易破性斑块具有大的富含脂质核心, 纤维帽薄, 含有大量的炎性细胞(主要为单核细胞源巨噬

细胞、肥大细胞和 T 淋巴细胞)。斑块的破裂与单核细胞源巨噬细胞产生的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 失衡关系密切。虽然已知清道夫受体 A iv(scavenger receptor A iv, SR-A iv) 在动脉粥样硬化的发生、发展中起着重要作用, 但它对 MMP 及 TIMP 表达的作用不明确。本研究利用反义技术和抗体阻断 SR-A iv, 探讨 SR-A iv 与 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 表达之间的关系。

### 1 材料与方法

[收稿日期] 2002-09-16 [修回日期] 2003-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金(39900061)资助

[作者简介] 危当恒, 男, 1974 年出生, 湖南省双峰县人, 硕士研究生。万腊香, 女, 1964 年出生, 湖南省慈利县人, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 本文通讯作者, E-mail: LXWan@hotmail.com。杨永宗, 男, 1937 年出生, 福建省仙游县人, 教授, 博士研究生导师。

### 1.1 引物

SR-A iv引物序列: 上游: 5'-TGGAACATTCTCA-GACCTTGAG-3' 下游: 5'-ACAAGGCAGCTCACT TTG-GACAA-3'。GAPDH 引物序列: 上游 5'-TCAC-CATCTTCCAGGAGCGAG-3', 下游: 5'-TGTCGCTGTTG AAGTCAGAG-3'。SR-A iv正义寡核苷酸序列为: 5'-ATGGAGCAGTGGGATCACTTT-3', 反义寡核苷酸序列为: 5'-TACCTCGTCACCCTAGTGAAA-3'。MMP-9 引物序列: 上游: 5'-CGGGACGGCAATGCTGATG-3', 下游: 5'-CGCCACGAGGAACAACTGT-3'。MMP-2 引物序列: 上游 5'-TTCATTTGGCGGACTGTG-3', 下游 5'-AGCCAGTCGGATTGATGCT-3'。抗人 SR-A iv单克隆抗体由日本 Kodama 教授制备并赠送。

### 1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

用健康人新鲜血浆制备低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。Lowry 法测 LDL 的蛋白量(文中所列脂蛋白浓度均以蛋白含量为标准)。将 LDL 置含 10 μmol/L  $\text{Cu}^{2+}$  的 PBS 中, 37℃透析 12 h, 再置于 0.01% EDTA 的 PBS 中, 4℃透析 24 h, 除菌保存。

### 1.3 THP-1 细胞培养

THP-1 细胞购自中科院上海细胞生物所细胞中心, 在 37℃、5%  $\text{CO}_2$  条件下, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 细胞长至 60%~70% 满时换无血清培养基, 并加佛波酯(PMA, 终浓度为 100 nmol/L) 孵育 24 h。换培养基, 加终浓度为 80 mg/L 氧化型 LDL(oxidized LDL, ox-LDL) 培养 48 h, 使巨噬细胞泡沫化。

### 1.4 实验分组

将泡沫化后的 THP-1 细胞分成四组: 对照组; ④SR-A iv正义寡核苷酸组; ④SR-A iv反义寡核苷酸组; SR-A iv抗体组。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测清道夫受体 A iv

Trizol 法抽提佛波酯处理后的 THP-1 细胞 RNA, 逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法参照《分子克隆实验指南》<sup>[1]</sup>。

### 1.6 细胞爬片油红 O 染色

参照杨永宗等<sup>[2]</sup>的方法, 采用油红 O 染色观测细胞内脂质。

### 1.7 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇和胆固醇酯含量

按王佐等<sup>[3]</sup>的改良方法进行。采用 Gen-Pak 柱, 以异丙醇: 正己烷: 乙腈(10: 30: 60, 体积比) 为流动相, 流速为 1 mL/min 进行非梯度洗脱, 226 nm 紫外检测, 检测时间为 10 min。

### 1.8 Western blot 检测基质金属蛋白酶和组织型基质金属蛋白酶抑制剂的表达

各取 40 μL 培养基, 经 8% SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜上, 4℃封闭过夜, 依次用一抗, IgG-HRP 室温反应 2 h, 用 ECL 试剂盒对反应产物进行检测。

### 1.9 明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 2 和 9 的活性<sup>[4]</sup>

酶原电泳在含 0.1% 明胶、10% SDS 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶中进行。电泳完毕后, 将凝胶浸入 2.5% Triton-100 中复性 30 min, 共 2 次, 洗去 SDS, 恢复 MMP-2 和 MMP-9 活性。再将凝胶浸入酶解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、0.2 mol/L NaCl、5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、0.02% Brij35, pH 7.6), 37℃温浴 18 h。用 0.5% 考马斯亮兰染色 90 min 后, 10% 醋酸、40% 甲醇脱色至透明条带与蓝色背景对比清晰即可。凝胶扫描, 半定量测定培养基中 MMP-2 和 MMP-9 活性。

### 1.10 统计学方法

所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 清道夫受体 A ivmRNA 的表达

THP-1 细胞经佛波酯处理后, 由单核细胞转变为巨噬细胞, 表现为由悬浮细胞转变为贴附细胞, 并且有 SR-A iv 的表达(图 1, Figure 1)。

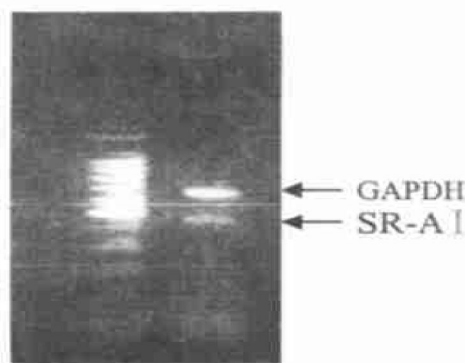


图 1. 逆转录聚合酶链反应检测清道夫受体 A iv 的表达

Figure 1. Expression of SR-A iv assayed by RT-PCR

### 2.2 细胞内胆固醇和胆固醇酯含量

THP-1 细胞与 80 mg/L ox-LDL 孵育 48 h 后, 细胞内总胆固醇和胆固醇酯均明显增加, 与对照组比较均有显著性差异( $P < 0.01$ )。油红 O 染色可见, 实验组细胞胞质内有大量的脂滴存在, 符合泡沫细胞形态特征, 对照组细胞内仅有少量脂滴。

表 1. 细胞内胆固醇与胆固醇酯含量

Table 1. Content of cholesterol and cholesterol ester in THP-1 cell ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ , mg/g protein)

分 组	游离胆固醇	总胆固醇	胆固醇酯
对照组	229.3 $\pm$ 9.6	363.9 $\pm$ 17.2	134.6 $\pm$ 8.3
ox-LDL 组	251.2 $\pm$ 11.3 <sup>a</sup>	659.3 $\pm$ 18.5 <sup>a</sup>	408.1 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。 ox-LDL: 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein)。

### 2.3 基质金属蛋白酶和组织型基质金属蛋白酶抑制剂的表达

Western blot 分析结果发现, 在巨噬细胞源泡沫细胞中 MMP-2 和 MMP-9 表达量较多, 而 TIMP-1、TIMP-2 表达量相对较少。用 SR-A iv 反义寡核苷酸和 SR-A iv 抗体阻断 SR-A iv 后, MMP-2 和 MMP-9 的表达量明显降低, TIMP-1、TIMP-2 的表达量明显增加 (表 2, Table 2)。

表 2. 基质金属蛋白酶 2 和 9 及组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 和 2 的表达

Table 2. The experssion of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

指 标	对照组	SR-A iv 正义组	SR-A iv 反义组	SR-A iv 抗体组
MMP-2	221.3 $\pm$ 26.1	240.6 $\pm$ 36.3	140.7 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>	135.6 $\pm$ 17.6 <sup>a</sup>
MMP-9	381.6 $\pm$ 46.4	326.4 $\pm$ 42.5	70.3 $\pm$ 10.6 <sup>b</sup>	88.9 $\pm$ 7.2 <sup>b</sup>
TIMP-1	210.4 $\pm$ 24.1	200.8 $\pm$ 19.6	380.2 $\pm$ 42.1 <sup>a</sup>	370.1 $\pm$ 37.5 <sup>a</sup>
TIMP-2	24.3 $\pm$ 3.8	30.2 $\pm$ 4.5	170.8 $\pm$ 16.3 <sup>b</sup>	190.4 $\pm$ 21.6 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。 MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase); TIMP: 组织型基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase)。

### 2.4 基质金属蛋白酶 2 和 9 的活性

氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 能诱导 MMP-2 和 MMP-9 活性增加, MMP-9 的活性比 MMP-2 强, 提示 MMP-9 可能比 MMP-2 起着更主要的作用。但阻断 SR-A iv 后, MMP-2 和 MMP-9 活性明显降低。

表 3. 基质金属蛋白酶 2 和 9 的活性

Table 3. The activities of MMP-2 and 9 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

指 标	对照组	SR-A iv 正义组	SR-A iv 反义组	SR-A iv 抗体组
MMP-2	131.6 $\pm$ 15.3	147.2 $\pm$ 12.6	72.3 $\pm$ 10.5 <sup>a</sup>	65.2 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>
MMP-9	391.3 $\pm$ 28.4	405.2 $\pm$ 26.2	263.5 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>	142.6 $\pm$ 14.8 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

## 3 讨论

动脉粥样硬化的特征之一是粥样斑块中存在含脂类的泡沫细胞, 而巨噬细胞源泡沫细胞又是斑块中泡沫细胞的主要成分。巨噬细胞源泡沫细胞分泌的 MMP-2 和 MMP-9 在降解细胞外基质中起着主要作用。SR-A iv 为一种受体, 结合和内化多种聚阴离子化合物, 如修饰脂蛋白、马来酰牛血清白蛋白、多聚次黄苷酸、多糖及某些磷脂等生物大分子, 在机体的防御、细胞粘附、信号转导及动脉粥样硬化等多种生理及病理过程中起着重要作用。万腊香等<sup>[5]</sup>证实转 SR-A iv 的转基因小鼠对动脉硬化具有易感性。但 SR-A iv 是否与 MMP 的表达及促进细胞外基质降解有关是一个值得探讨的问题。本研究结果发现, SR-A iv 反义寡核苷酸和抗体能明显降低巨噬细胞源泡沫细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的分泌和活性, 增加 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达。有研究表明, SR-A iv 与其配体结合后, 能够促进蛋白质酪氨酸磷酸化和蛋白激酶 C 活化, 并诱导尿激酶类纤溶酶原激活物表达。Hsu 等<sup>[6]</sup>证实由脂蛋白和非脂蛋白引发的 uPA 的分泌依赖于 SR-A iv 介导的信号途径。由此推测, 巨噬细胞泡沫化后, 通过 SR-A iv 反义寡核苷酸和抗体的作用, 阻断 SR-A iv 与配体的相互作用, 阻断蛋白质酪氨酸磷酸化和蛋白激酶 C 活化, 从而直接抑制 MMP 表达, 增加 TIMP 表达, 这对抑制细胞外基质降解具有重要意义。因此, 阻断 SR-A iv 不仅能降低细胞对氧化脂质的摄入, 减少细胞内脂质含量, 并能抑制细胞外基质降解, 这两者都将对斑块稳定的维持起到重要的作用。

### [参考文献]

- [1] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992; 343-388, 683-684
- [2] 杨永宗, 谭健苗, 杨小毅. 动脉粥样硬化敏感小鼠 C57BL/6J 腹膜巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3 (4): 279-282
- [3] 王 佐, 李全忠, 杨向东, 杨永宗. 高效液相色谱法分析氧化低密度脂蛋白处理 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6 (4): 356-359
- [4] Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type ⑤ collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. Circ Res, 1994, 75 (1): 41-54
- [5] 万腊香, 陈 修, Sookja Kim Chung, 吴孟津, 万载阳, 危当恒, 等. 清道夫受体 A iv 转基因小鼠对动脉粥样硬化具有易感. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (3): 185-189
- [6] Hsu HY, Hajjar DP, Khan KM, Falcone DJ. Ligand binding to macrophage scavenger receptor-A induce urokinase-type plasminogen activator expression by a protein kinase dependent signaling pathway. J Biol Chem, 1998, 273 (2): 1240-246

(此文编辑 文玉珊)