

## 普罗布考对巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶 9 的抑制作用

严鹏科, 廖端芳, 杨永宗<sup>1</sup>

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001; 1. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 普罗布考稳定斑块的分子机制; 逆转录聚合酶链反应; 动脉粥样硬化; 基质金属蛋白酶; 巨噬细胞; 脂蛋白, 低密度

[摘要] 通过观察普罗布考对 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 表达的影响, 初步探讨普罗布考稳定斑块的分子机制。运用逆转录聚合酶链反应、免疫印迹、明胶酶图等方法, 检测氧化型低密度脂蛋白诱导后的人单核细胞/巨噬细胞系 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达、蛋白分泌和酶活性。实验发现, 在氧化型低密度脂蛋白 (80 mg/L) 刺激下, THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 的表达和酶活性明显增强; 予普罗布考 20、40、60  $\mu\text{mol/L}$  处理, 均能在对细胞活性无影响的前提下, 显著抑制基质金属蛋白酶 9 的蛋白分泌量及明胶降解活性, 且这种作用呈浓度依赖性增强, 其中 60  $\mu\text{mol/L}$  的普罗布考抑制基质金属蛋白酶 9 的蛋白分泌和明胶降解活性分别达  $74.0\% \pm 2.4\%$  和  $48.0\% \pm 5.1\%$  ( $P < 0.05$ )。实验结果说明, 普罗布考能有效抑制巨噬细胞的基质金属蛋白酶 9 的蛋白分泌及其活性, 这一作用可能是其抗动脉粥样硬化和稳定斑块的重要机制之一。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

## Probucol Reduces Matrix Metalloproteinase-9 Secretion of THP-1 Monocyte-Derived Macrophages Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

YAN Peng-Ke, LIAO Duang-Fang, and YANG Yong-Zong

(Department of Pharmacology, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Matrix Metalloproteinases; Macrophage; Lipoprotein, Low Density; Probucol; Western Blot

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the underlying molecular mechanism of probucol stabilizing plaque and preventing acute coronary syndromes. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and gelatin zymography were performed to detect matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expres-

sion, secretion and activity in THP-1 monocyte-derived macrophages induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL).

**Results** The expression and enzyme activity of MMP-9 significantly increased in THP-1 monocyte-derived macrophages exposed to ox-LDL (80 mg/L) for 12 h. Probucol at a concentration of 20, 40 and 60  $\mu\text{mol/L}$  inhibited MMP-9 protein secretion by  $27.0\% \pm 2.6\%$ ,  $45.0\% \pm 5.5\%$  and  $74.0\% \pm 2.4\%$  respectively ( $P < 0.05$ ), and decreased enzyme activities by  $29.0\% \pm 3.2\%$ ,  $34.0\% \pm 1.9\%$  and  $48.0\% \pm 5.1\%$  respectively ( $P < 0.05$ ), but had no influence on MMP-9 mRNA expression.

**Conclusion** Probucol can effectively inhibit MMP-9 secretion in macrophages, which may play an important role in stabilizing plaque and anti atherosclerosis.

研究显示, 斑块内聚集的大量巨噬细胞在氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 的刺激下, 过度分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs), 降解纤维帽内的胶原, 导致纤维帽变薄、破损, 是斑块破裂的重要机制<sup>[1]</sup>。

Brasen JH<sup>[2,3]</sup> 的研究发现, 脂溶性抗氧化剂普罗布考, 能显著提高动脉粥样硬化斑块中的胶原纤维含量, 增厚纤维帽, 减少斑块内的巨噬细胞和脂质含量, 提示普罗布考具有潜在的稳定斑块作用。本文用 ox-LDL 诱导后的人单核细胞/巨噬细胞系 THP-1 为模型, 通过观察普罗布考对 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达的影响, 旨在初步探讨普罗布考稳定斑块的分子机制。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

人单核细胞系 THP-1 细胞购自中国科学院上海细胞中心; RPMI 1640 培养基、无脂蛋白血清、Trizol

[收稿日期] 2002-08-02

[修回日期] 2003-02-25

[基金项目] 国家 973 项目 (G2000056905)、国家自然科学基金项目 (30171084) 资助

[作者简介] 严鹏科, 男, 1967 年出生, 湖南省长沙市人, 南华大学药物药理研究所讲师, 中南大学病理学和病理生理学博士。廖端芳, 男, 1958 年出生, 湖南省沅江市人, 博士, 南华大学药物药理研究所教授, 中南大学博士生导师, 本文通讯作者, E-mail: DFLiao@Hotmail.com。杨永宗, 男, 1937 年出生, 福建省仙游县人, 南华大学心血管病研究所教授, 中南大学病理学和病理生理学博士生导师, 本文通讯作者, E-mail: YZYang@mail.hy.hn.cn。

试剂为 Gibco 公司产品;胎牛血清、Western blot 荧光检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Hyclone-Pierce 公司;逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒为 Promega 公司产品;聚合酶链反应引物由上海申工生物公司合成;羊抗人 MMP-9 抗体、兔抗羊 IgG 为 Santa Cruz 公司产品;普罗布考购自 Sigma 公司;硫代巴比妥反应物检测试剂盒购自南京建成公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰及鉴定

人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)采用超速离心法分离,经琼脂糖凝胶电泳、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,均显示为单一蛋白带。将 LDL 置于 PBS 溶液中,4℃透析 36 h,充分去除乙二胺四乙酸(ethylene dinitrotetraacetic acid, EDTA)后,用含 10 μmol/L CuSO<sub>4</sub> 的 PBS 溶液(pH 7.2),37℃透析 20 h,进行氧化修饰。氧化修饰后的 LDL 置含 100 μmol/L EDTA 的 PBS 中,4℃透析 24 h,终止氧化。经硫代巴比妥反应物含量检测和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定后,超滤除菌,BCA 试剂定量蛋白,调蛋白浓度至 1 g/L 用于实验。

### 1.3 细胞培养

THP-1 细胞悬浮生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,至细胞密度达  $1.0 \times 10^9$  个/L,换液后铺入 100 mm 平皿,加入佛波酯 100 nmol/L,诱导分化 5 d。细胞呈典型的巨噬细胞状。换入含 5% 无脂蛋白血清的 RPMI 1640 培养液中,同时加入 ox-LDL 至终浓度 80 mg/L 诱导 12 h, RPMI 1640 洗两遍,分别加入不同浓度的普罗布考,37℃温育 6 h。

### 1.4 明胶酶图分析检测基质金属蛋白酶 9 活性

按 Xu 等的方法<sup>[4]</sup>,收集不同条件处理的 THP-1 细胞培养液,5 000 r/min、4℃离心 5 min,去除沉淀。上清经 BCA 试剂测定其蛋白含量,调蛋白浓度至 0.25 g/L。8% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(含 0.2% 的明胶),90 V 恒压电泳 3 h,凝胶浸于 2.5% Triton X-100 100 mL 中,室温 1 h,转入含 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(pH 7.6)、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1% Triton X-100 的酶反应缓冲液 100 mL 中,37℃16 h,使酶复性并与底物明胶作用。2.5% 考马斯亮蓝染色 2 h,脱色液中脱色 45 min,可见清晰的明胶降解条带。Epson 1650 Photo 扫描仪获取图像。

### 1.5 免疫印迹法检测基质金属蛋白酶 9 蛋白分泌

参考文献[5]方法,收集不同条件处理的 THP-1

细胞培养液,BCA 试剂测定其蛋白含量,调蛋白浓度至 1 g/L,经 8% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,90 V 恒压电泳 3 h,转移至 PDVF 膜上,丽春红染色观察转移效果,并标记蛋白分子量标准的位置。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h,按 1:200 加入羊抗人 MMP-9 一抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,按 1:1 000 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗,室温 1 h, TBST 洗 3 次后,用 Western blot 荧光检测试剂盒显示结果于 X 光片。Epson 1650 Photo 扫描仪获取图像。

### 1.6 逆转录聚合酶链反应检测基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达

应用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,用逆转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶为内对照,进行半定量逆转录聚合酶链反应。MMP-9 上游引物为 5' CCCATTTTCGACGATGAC 3',下游引物为 5' GGCACGAGGAATGATCTAAG 3'。3-磷酸甘油醛脱氢酶上游引物为 5' CGGAGTCAACG-GATTTCGTCGTAT 3',下游引物为 5' AGCCITCTC-CATGGTTCGTCGAAGAC 3'。MMP-9 扩增产物为 640 bp,3-磷酸甘油醛脱氢酶为 380 bp,均经测序鉴定证实。聚合酶链反应首次循环先在 94℃变性 5 min,变性、退火、延伸分别为 95℃1 min → 60℃1 min → 72℃1.5 min,共 30 个循环,最后一次循环在 72℃延伸 10 min;聚合酶链反应产物用含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。Labworks 凝胶分析系统收集图像。

### 1.7 实验结果的分析 and 统计学处理

用 Labworks 图像分析系统对 Western blot、明胶酶图和逆转录聚合酶链反应结果进行吸光度扫描,其中 Western blot、明胶酶图结果以面积灰度值进行计算,逆转录聚合酶链反应结果以目的基因/3-磷酸甘油醛脱氢酶的相对面积灰度值表示。重复实验的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异性比较采用单因素方差分析,由 SPSS 统计软件完成。

## 2 结果

### 2.1 低密度脂蛋白的氧化修饰及鉴定

取氧化前后的 LDL,经 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,2.5% 考马斯亮蓝常规染色,脱色后可见清晰的 LDL 条带(图 1, Figure 1)。经 CuSO<sub>4</sub> 处理的 LDL,由于阴离子含量增多,电泳迁移率明显增快。LDL 和 ox-LDL 的硫代巴比妥反应物检测,结果氧化前 LDL 的硫代巴比妥反应物含量为  $4.26 \pm 0.52$  nmol/

mg 蛋白, ox-LDL 的硫代巴比妥反应物含量为  $19.84 \pm 0.22$  nmol/mg 蛋白 ( $n = 8$ ), 说明 LDL 已被氧化。

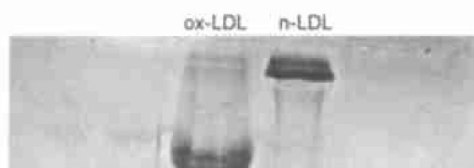


图 1. 低密度脂蛋白的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱 ox-LDL: 氧化型低密度脂蛋白; n-LDL: 自然未修饰的低密度脂蛋白。

Figure 1. SDS-PAGE electrophoresis of low density lipoprotein samples

## 2.2 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 细胞基质金属蛋白酶活性的影响

THP-1 细胞经 ox-LDL 诱导后, MMP-9 活性上升  $36.0\% \pm 7.3\%$ , 细胞培养液在 92 kDa 的位置使明胶发生降解(图 2, Figure 2)。不同浓度的普罗布考均可抑制 THP-1 细胞培养液中的 MMP-9 活性, 且这种作用是呈浓度依赖性增强, 20、40、60  $\mu\text{mol/L}$  的普罗布考组 MMP-9 活性较 ox-LDL 组分别下降  $29.0\% \pm 3.2\%$ 、 $34.0\% \pm 1.9\%$ 、 $48.0\% \pm 5.1\%$  ( $P$  均  $< 0.05$ ,  $n = 5$ )。同时, 运用台盼蓝染色和乳酸脱氢酶检测法观察实验处理因素对细胞活性的影响, 发现 ox-LDL 80 mg/L 和普罗布考 20、40、60  $\mu\text{mol/L}$  处理 THP-1 细胞后, 细胞台盼蓝拒染率均  $> 90\%$ , 各组乳酸脱氢酶活性无显著差异 ( $P > 0.10$ )。提示实验所采用的 ox-LDL 和普罗布考浓度对细胞活性无明显影响。

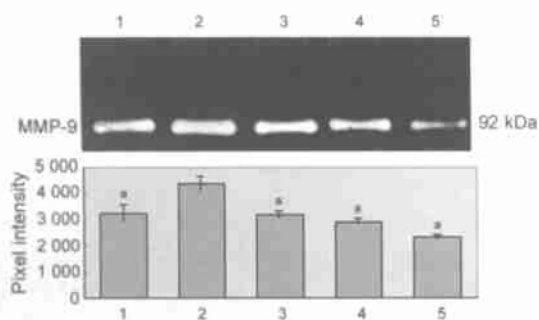


图 2. THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 酶活性的明胶酶图分析 1: 正常组; 2: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 组; 3: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 20  $\mu\text{mol/L}$  组; 4: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 40  $\mu\text{mol/L}$  组; 5: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 60  $\mu\text{mol/L}$  组。a:  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ , 与氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 组比较。

Figure 2. Gelatin zymographic analysis of MMP-9 activity in THP-1 monocyte derived macrophages

## 2.3 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 蛋白表达的影响

免疫印迹分析细胞培养液中 MMP-9 的蛋白含量, 结果表明, THP-1 细胞在 ox-LDL 刺激 12 h 后, 细胞培养液中 MMP-9 升高 1.1 倍; 予普罗布考处理 6 h, MMP-9 蛋白分泌明显减少, 20、40、60  $\mu\text{mol/L}$  的普罗布考对 MMP-9 蛋白的抑制量与 ox-LDL 组相比较, 分别达  $27.0\% \pm 2.6\%$ 、 $45.0\% \pm 5.5\%$ 、 $74.0\% \pm 2.4\%$  ( $P$  均  $< 0.05$ ,  $n = 5$ ) (图 3, Figure 3)。

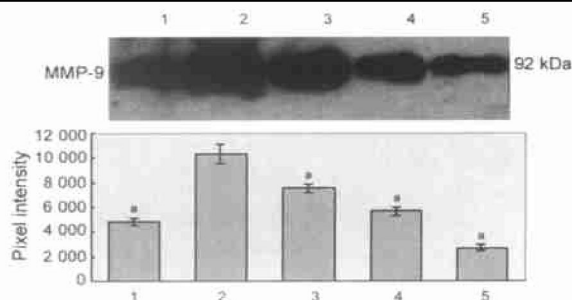


图 3. THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 分泌的免疫印迹分析

1: 正常组; 2: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 组; 3: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 20  $\mu\text{mol/L}$  组; 4: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 40  $\mu\text{mol/L}$  组; 5: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 60  $\mu\text{mol/L}$  组。a:  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ , 与氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 组比较。

Figure 3. Western blot analysis for MMP-9 secretion by THP-1 monocyte derived macrophages

## 2.4 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的影响

提取不同浓度普罗布考处理细胞的总 RNA, 进行逆转录聚合酶链反应检测 ( $n = 4$ ), 结果显示, ox-LDL 显著促进 MMP-9 mRNA 的表达, 但普罗布考对 ox-LDL 诱导后的 THP-1 巨噬细胞 MMP-9 mRNA 表达无明显抑制作用 ( $P > 0.10$ ) (图 4, Figure 4)。

## 3 讨论

研究表明, 易于破裂的斑块往往具有以下特征: 脂质池大, 纤维帽薄, 胶原纤维含量少, 含有大量巨噬细胞和 T 淋巴细胞, 而平滑肌细胞极少。斑块中胶原含量, 特别是覆盖斑块脂质坏死核心的纤维帽中胶原含量, 对斑块稳定起重要作用。斑块内细胞外基质的过度降解可能是斑块中胶原含量减少、纤维帽变薄的主要原因<sup>[6]</sup>, 基质金属蛋白酶是一类对细胞外基质具有降解活性的蛋白酶超家族, 它们在中性 pH 条件下, 依赖  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  为辅助因子而激活, 可以降解所有细胞外基质成分。目前已知,

MMPs 包括 12 个成分。其中 MMP-9 与动脉粥样硬化斑块的不稳定性尤为相关, MMP-9 又称 92 kDa 明

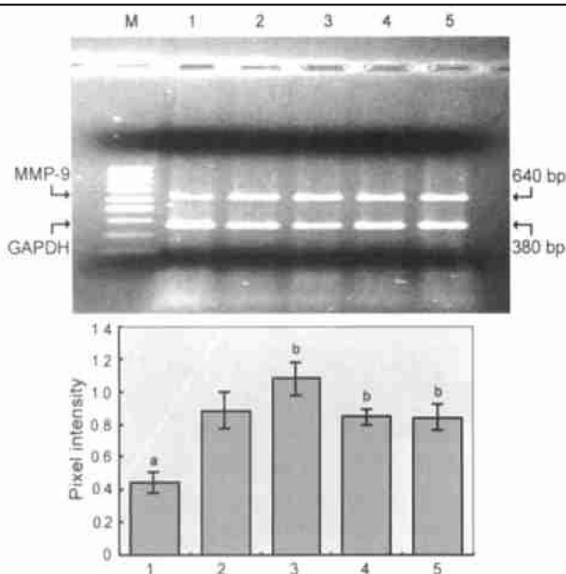


图 4. THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的逆转录聚合酶链反应分析 M: DNA 分子量标准; GAPDH: 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 1: 正常组; 2: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 组; 3: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 20  $\mu$ mol/L 组; 4: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 40  $\mu$ mol/L 组; 5: 氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 加普罗布考 60  $\mu$ mol/L 组。a:  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ , 与氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 组比较; b:  $P > 0.10$ ,  $n = 5$ , 与氧化型低密度脂蛋白 80 mg/L 组比较。

Figure 4. RT-PCR analysis for MMP-9 expression in THP-1 monocyte-derived macrophages

胶酶或明胶酶 B, 是巨噬细胞分泌的主要 MMP, 并被认为是巨噬细胞激活的主要标志之一。研究发现<sup>[7]</sup>, 不稳定斑块, 尤其是易发生破裂的斑块肩部区域 MMP-9 的蛋白及酶活性明显增加, 较稳定斑块高 3~5 倍, 且这种 MMP-9 的增加主要来源于斑块内的单核/巨噬细胞<sup>[8]</sup>。Xu<sup>[4]</sup> 和刘虹彬等<sup>[9]</sup> 的体外研究结果显示, 氧化型低密度脂蛋白可显著促进人单核/巨噬细胞、血管平滑肌细胞表达和分泌 MMP-9, 下调其内源性抑制物 TIMP-1 的表达。我们的研究结果发现, ox-LDL 能显著刺激 THP-1 人单核/巨噬细胞系 MMP-9 的 mRNA 表达、蛋白分泌量和明胶降解活性, 与上述文献报道相符。

普罗布考被认为是目前已知具有稳定斑块作用的少数几个药品之一<sup>[10]</sup>。Brasen 等的系列研究显示<sup>[4,5]</sup>, 高脂血症动物 WHHL 兔经普罗布考治疗后, 动脉粥样硬化斑块中的细胞外基质含量显著提高, 纤维帽增厚, 斑块内平滑肌细胞增多而巨噬细胞和脂质坏死核心面积减少, 动物的生存时间延长, 并把斑块在普罗布考治疗后的这种改变称为“普罗布考

斑块”(probuco plaque), 提示改变动脉粥样硬化斑块的组成成分, 使之更倾向于稳定, 是普罗布考抗动脉粥样硬化机制的重要因素。

我们研究结果显示, 20、40、60  $\mu$ mol/L 的普罗布考能在对细胞活性无影响的前提下, 显著抑制氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 细胞的 MMP-9 的蛋白分泌量及其明胶降解活性 ( $P < 0.01$ ), 且这种作用随浓度增高而效果增强, 说明普罗布考可能通过抑制斑块内单核/巨噬细胞 MMP-9 的分泌及活性, 减少斑块内胶原的降解, 稳定斑块, 从而防止急性冠状动脉综合征的发生。

巨噬细胞 MMP-9 分泌和活性存在着基因转录和翻译后修饰两种水平的调控<sup>[4]</sup>。如上所示, 普罗布考可抑制 THP-1 泡沫细胞培养液中 MMP-9 酶活性, 但这种抑制作用是通过作用 MMP-9 的基因转录还是与 MMP-9 基因转录后的蛋白修饰等有关, 尚不清楚。因此, 我们提取不同浓度普罗布考处理细胞的总 RNA, 进行逆转录聚合酶链反应检测, 发现普罗布考对 MMP-9 的 mRNA 表达作用影响不明显, 而主要抑制 MMP-9 的分泌和活性, 说明普罗布考可能主要影响 MMP-9 翻译后的蛋白修饰, 尤其是与蛋白分泌有关的修饰环节。对普罗布考作用环节的进一步研究, 将可能为防治动脉粥样硬化寻找新的靶点。

#### [参考文献]

- [1] Ambrose JA, Martinez EE. A new paradigm for plaque stabilization. *Circulation*, 2002, **105** (16): 2 000-004
- [2] Brasen JH, Harsch M, Niendorf A. Survival and cardiovascular pathology of heterozygous watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits treated with pravastatin and probucol on a low-cholesterol (0.03%)-enriched diet. *Virchows Arch*, 1998, **432** (6): 557-562
- [3] Brasen JH, Harsch M, Niendorf A. Probucol inhibits not only the progression of atherosclerotic disease, but causes a different composition of atherosclerotic lesions in WHHL-rabbits. *Virchows Arch*, 1995, **426** (2): 179-188
- [4] Xu XP, Meisel SR, Ong JM. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 1999, **99**: 993-998
- [5] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin-1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 379-383
- [6] Crisby M, Nordström-Fredriksson G, Shah PK. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*, 2001, **103**: 926-933
- [7] Libby P. What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am J Cardiol*, 2001, **88**: 3F-6J
- [8] Loftus IM, Naylor AR, Goodall S. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke*, 2000, **31** (1): 40-47
- [9] 刘虹彬, 温进坤, 韩梅. 氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 和 9 蛋白的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 10-13
- [10] Kanaki T, Saito Y. Anti-atherogenic drugs. *Nippon Rinsho*, 1998, **56** (10): 2 635-639

(此文编辑 曾学清)