

C 反应蛋白对 U937 细胞表达基质金属蛋白酶 2 的影响

沈彬¹, 吴宗贵²

(1. 中国人民解放军 411 医院心内科, 上海市 200083; 2. 第二军医大学附属长征医院心血管内科, 上海市 200003)

[关键词] 分子生物学; C 反应蛋白的致炎作用; 蛋白免疫印迹分析; C 反应蛋白; U937 细胞; 基质金属蛋白酶 2; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 观察 C 反应蛋白对 U937 细胞表达基质金属蛋白酶 2 的影响, 探讨 C 反应蛋白导致动脉粥样硬化斑块不稳定甚至破裂的可能机制。**方法** 体外培养 U937 细胞, 予不同浓度 C 反应蛋白及普伐他汀干预, 分为空白对照组、C 反应蛋白 5 mg/L、20 mg/L、100 mg/L 及 C 反应蛋白 20 mg/L+ 普伐他汀 10^{-3} mol/L 组, 用蛋白免疫印迹分析及逆转录聚合酶链反应观察各组细胞表达基质金属蛋白酶 2 的差异。**结果** 蛋白免疫印迹分析显示, C 反应蛋白 5 mg/L、20 mg/L 和 100 mg/L 组基质金属蛋白酶 2 的蛋白条带灰度相对值逐渐增高, 呈浓度依赖性, 均高于空白对照组, 其中 C 反应蛋白 20 mg/L 和 100 mg/L 组与空白对照组差别显著 ($P < 0.05$); 而普伐他汀干预组的灰度相对值亦明显低于 C 反应蛋白 100 mg/L 组 ($P < 0.05$)。逆转录聚合酶链反应结果显示, 随着 C 反应蛋白浓度增加, 细胞内基质金属蛋白酶 2 mRNA 表达量也相应增加, 呈浓度依赖性, 而普伐他汀可以减轻这种作用。**结论** C 反应蛋白干预体外培养的 U937 细胞后, 可上调基质金属蛋白酶 2 的表达, 进而可能导致其它一系列炎症反应, 因此 C 反应蛋白在导致斑块不稳定方面有直接致炎症作用及炎症放大作用, 值得进一步研究。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

C-Reactive Protein Enhancing the Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in U937 Cells

SHEN Bin, and WU Zong-Gui

(Department of Cardiology, the 411th Hospital of PLA, Shanghai 200083, China)

[KEY WORDS] C-Reactive Protein; U937 Cells; Matrix Metalloproteinase-2; Atherosclerosis; Pravastatin; Inflammation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of C-reactive protein (CRP) on expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in U937 cells and the influence of CRP on matrix remodeling in atherogenesis and plaque rupture.

Methods U937 cells were cultured in vitro and intervened by different concentrations of recombination human CRP and pravastatin [a: control; b: CRP 5 mg/L; c: CRP 20 mg/L; d: CRP 100 mg/L; e: CRP 20 mg/L+ pravastatin 10^{-3} mol/L]. The MMP-2 mRNA was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and MMP-2 protein was measured by Western blotting.

Results In comparison with the control, the expression of mRNA and protein of MMP-2 significantly increased in 5 mg/L, 20 mg/L and 100 mg/L CRP groups ($P < 0.05$), and this upregulation of the expression of MMP-2 could be inhibited in CRP 20 mg/L+ Pravastatin 10^{-3} mol/L group.

Conclusions CRP can enhance the expression of MMP-2 in U937 cells and may cause advanced inflammation in atherosclerosis plaques. It may provide an explanation for the phenomenon that patients who have high concentration of CRP are prone to have atherosclerotic lesions and plaque rupture.

目前认为, Ross 的“炎症假说”^[1]是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的主要发病机制, 而 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是由肝脏产生的急性期反应蛋白, 正常情况下以微量形式存在于正常人血清中, 特异和非特异性炎症刺激(如风湿病、败血症等)可使之显著升高, 是一种炎症反映标志。近年来分子生物学研究认为, CRP 不仅仅是一种临床血清

标志物, 其本身还有炎症因子的作用, 直接参与致 As 的形成。本研究通过体外培养 U937 细胞并用人重组的 CRP 干预, 观察 CRP 对 U937 细胞表达基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的影响, 探讨 CRP 导致 As 斑块不稳定甚至破裂的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

人重组 C 反应蛋白(rhCRP)(Calbiochem 公司), 兔抗人 MMP-2 多抗(武汉博士德公司), 辣根

[收稿日期] 2004-04-19 [修回日期] 2004-12-21

[作者简介] 沈彬, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病诊治, E-mail 为 shenbin0094@163.com。吴宗贵, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病诊治。

过氧化酶结合的抗兔 IgG(武汉博士德公司), 琼脂糖(上海博亚公司), DNA 分子量标准、蛋白分子量标准、总 RNA 抽提 Trizol 试剂(上海生工生物公司), 一步法逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(大连 TaKaRa 公司), MMP-2、 β -actin 引物合成(北京赛百胜公司), RPMI1640 培养基(Gibco 公司), 胎牛血清(杭州四季青公司), Super Singal 化学发光试剂盒(PIERCE 公司)。

1.2 细胞培养与干预

人原单核细胞系 U937 细胞购自上海中科院细胞所 U937 细胞株, 在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中悬浮生长, 调节细胞数在 1×10^5 , 接种于 25 cm^2 培养瓶, 37°C 、5% CO_2 孵箱内培养, 2~3 天换液一次, 细胞生长密集后传代, 将培养基与细胞混匀, 全部吸入 50 mL 离心管, 1 500 rpm 离心 2 min, 将上清液轻轻吸去, 加入新鲜培养基, 吹打混匀, 按 1:2 的比例分瓶移入培养瓶继续培养。细胞分为空白对照组、rhCRP 5 mg/L、20 mg/L、100 mg/L 及 rhCRP 20 mg/L+ 普伐他汀 10^{-3} mol/L 组, 继续培养 24 h 后用于 Western blotting 及 RT-PCR。每个实验重复 3 次。

1.3 Western blotting 检测^[2]

将各组干预后用于蛋白质提取的 U937 细胞于 0°C 充分洗涤细胞, 于 4°C 、1 500 rpm 离心 5 min, 估算离心管底部沉淀物的体积。彻底吸出上清液, 以 5 倍体积用冰预冷的悬浮缓冲液[含 0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L TrisCl(pH 7.6), 0.001 mol/L EDTA (pH 8.0), 1 mg/L 抑肽酶, 100 mg/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)]分散细胞, 然后尽快加入等体积的 $2 \times \text{SDS}$ 凝胶加样缓冲液将细胞裂解。沸水浴中加热 10 min, 用超声处理仪对 DNA 进行剪切, 室温 10 000 g 离心 10 min, 将上清液移于另一管中, 弃去沉淀物。取 20 μL 总蛋白样品用于 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后转印至硝酸纤维素膜上, 转印后以丽春红染色检验转印效果, 将转印后的硝酸纤维素膜放入含 10% 脱脂奶粉及 0.1% Tween-20 的 TBS 液中封闭 2 h, 用含 0.1% Tween-20 的 TBS (TTBS) 洗膜 3 次。将兔抗人 MMP-2 一抗以 1:300 于 TBS 中稀释, 与硝酸纤维素膜 37°C 反应 2 h。弃去一抗, TTBS 洗 3 次后加入 1:500 稀释于 TBS 的羊抗兔 IgG 二抗, 反应 1 h。弃去二抗后 TTBS 洗 2 次, PBS 缓冲液洗 1 次。按照化学发光试剂盒的使用说明进行显色, 在自显影胶片上曝光 1 min, 可看到蛋白条带。蛋白条带经计算机图像分析仪扫描, 进行灰度测定及分析。以对照组的灰度值为 1, 实验组数据与对照组相比取值。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测

细胞摇晃混匀后移入离心管离心, 加入 1 mL 总 RNA 抽提的 Trizol, 按 Trizol 法提取细胞总 RNA。RNA 经定量后行 RT-PCR, 设计引物序列^[3], MMP-2 上游 5-ACCTGGATGCGTCGTGGAC-3, 下游 5-TGTG-GCAGCACCAGGGCAGC-3 (447bp); 内参照 β -actin 上游 5-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3, 下游 5-AGGGG CCGGACTCGTCATACT-3 (621 bp)。按照一步法 RT-PCR 试剂盒的使用说明加入各种所需试剂, 混合物总量 50 μL , 使用 PCR 热循环仪, 50°C 30 min 及 94°C 2 min 后, 以 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 60 s 扩增 30 个循环, 随后 72°C 延伸 7 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶进行凝胶电泳, 所得电泳条带经摄片后, 经计算机图像分析仪扫描, 进行灰度测定及分析。以同一样品的 β -actin 信号值作校正, 对照组的灰度值为 1, 实验组数据与对照组相比取值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS10.0 进行统计分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数差别的比较采用方差分析, SNK 法两两比较。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 人重组 C 反应蛋白对 U937 表达基质金属蛋白酶 2 蛋白的影响

在白色的背景上位于 72 kDa 处可见一条深色条带, 对应为 MMP-2。经灰度扫描, 可见随着 rhCRP 浓度的增加, 空白对照组、rhCRP 5 mg/L、20 mg/L 及 100 mg/L 组蛋白表达的灰度相对值亦逐渐增加, 而普伐他汀干预组细胞的灰度相对值亦明显小于 rhCRP 20 mg/L 组(图 1 和表 1, Figure 1 and Table 1)。

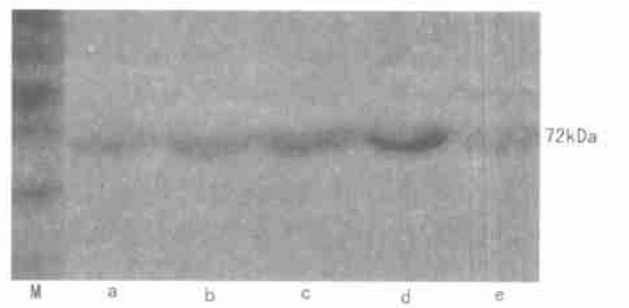


图 1. U937 细胞基质金属蛋白酶 2 蛋白水平 M 为 marker, a 为空白对照组, b 为人重组 C 反应蛋白 5 mg/L 组, c 为人重组 C 反应蛋白 20 mg/L 组, d 为人重组 C 反应蛋白 100 mg/L 组, e 为普伐他汀干预组。

Figure 1. MMP-2 expression in U937 cells

2.2 人重组 C 反应蛋白对 U937 细胞基质金属蛋白酶 2 mRNA 表达的影响

RNA 样品的 A₂₆₀/A₂₈₀值均大于 1.8, 提示样品的纯度较高, RNA 无降解, 并且无明显蛋白质的污染。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果显示, 随着 rhCRP 浓度的增加, U937 细胞表达 MMP-2 mRNA 水平逐渐增高, 其灰度相对值均明显高于空白对照组。而普伐他汀干预组与 rhCRP 20 mg/L 组相比明显降低(图 2 和表 2, Figure 2 and Table 2)。

表 1. 人重组 C 反应蛋白及普伐他汀干预后基质金属蛋白酶 2 蛋白表达的相对灰度值 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 1. Protein levels of MMP-2 in different groups of U937 cells

细胞分组	相对灰度值
空白对照组	1
rhCRP 5 mg/L	1.3 ± 0.1
rhCRP 20 mg/L	1.9 ± 0.2 ^a
rhCRP 100 mg/L	3.9 ± 0.4 ^b
rhCRP 20 mg/L + 普伐他汀 10 ⁻³ mol/L	1.4 ± 0.2 ^c

a: P < 0.05, b: P < 0.01, 与空白对照组比较; c: P < 0.05, 与人重组 C 反应蛋白 20 mg/L 组比较。

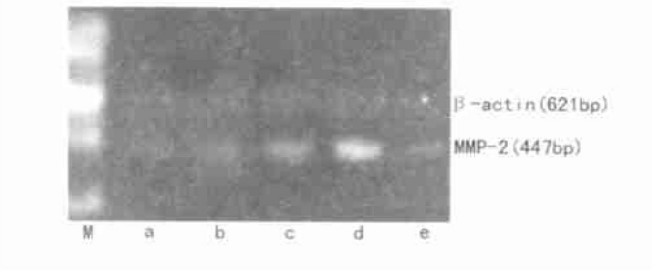


图 2. U937 细胞基质金属蛋白酶 2 mRNA 水平 M 为 marker, a 为空白对照组, b 为人重组 C 反应蛋白 5 mg/L 组, c 为人重组 C 反应蛋白 20 mg/L 组, d 为人重组 C 反应蛋白 100 mg/L 组, e 为普伐他汀干预组。

Figure 2. MMP-2 mRNA expression in U937 cells

表 2. 人重组 C 反应蛋白及普伐他汀干预后基质金属蛋白酶 2 mRNA 表达的相对灰度值 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 2. mRNA levels of MMP-2 in different groups of U937 cells

细胞分组	相对灰度值
空白对照组	1
rhCRP 5 mg/L	1.4 ± 0.2 ^a
rhCRP 20 mg/L	2.1 ± 0.3 ^b
rhCRP 100 mg/L	4.2 ± 0.4 ^b
rhCRP 20 mg/L + 普伐他汀 10 ⁻³ mol/L	1.3 ± 0.2 ^c

a: P < 0.05, b: P < 0.01, 与空白对照组比较; c: P < 0.05, 与人重组 C 反应蛋白 20 mg/L 组比较。

3 讨论

近年来分子生物学研究认为, CRP 不仅仅是一种临床血清标志物, 其本身还有炎症因子的作用, 直接参与致 As 的形成。在人的 As 斑块特别是复杂斑块中, 发现有大量的 CRP 沉积。1985 年 Vlaicu 等^[4]从人主动脉粥样硬化内膜中提取出 CRP 分子, 首次证明 CRP 在 As 病变中存在。有大量研究表明, CRP 在人类正常冠状动脉中无沉积, 但在增厚的动脉内膜及早期冠状动脉粥样斑块中就有出现, 而且随着斑块大小的增加, CRP 沉积增多, 沉积的强度直接与脂质沉积数量相关。在炎性细胞浸润的区域特别是坏死斑块的边缘, CRP 免疫反应较强, 而富含脂质的斑块核心 CRP 免疫反应最强(免疫荧光法)。有研究证实患者的血清 CRP 水平与其冠状动脉内薄纤维帽数量之间存在相关性, 提示 CRP 可刺激斑块不稳定^[5-7]。表明 CRP 在 As 中不仅仅单纯作为炎症标志物存在, 在致 As 方面可能有直接致炎作用。

Pasceri 等^[8]将 CRP 与人脐静脉内皮细胞或人冠状动脉内皮细胞一起在人血浆中孵育, 发现细胞间粘附分子表达增加 10 倍, 血管细胞粘附分子及 E 选择素表达也明显增加, 而其中细胞间粘附分子是内皮细胞上淋巴细胞功能相关抗原的主要受体, 在白细胞与内皮粘附并向血管壁移动的过程中起关键作用。另外, 有研究表明, CRP 还可促进单核细胞趋化因子 1 的分泌, 从而使单核细胞对内皮细胞的粘附性明显增加^[9]; 可降低内皮型一氧化氮合酶的表达及其生物活性; 可刺激巨噬细胞表达细胞因子及组织因子, 增加对低密度脂蛋白的摄入, 同时对其它炎症介质的致 As 作用有放大作用^[10-12]。

本实验结果发现, CRP 可在蛋白水平及 mRNA 水平刺激上调 U937 细胞表达 MMP-2, 表明 CRP 的直接致炎症作用可能是 As 形成初期的作用机制之一, 而且, 在斑块形成后、急性感染等各种原因导致的 CRP 骤然增高可通过促进内皮细胞及单核/巨噬细胞的 MMP-2 表达而使斑块不稳定, 进而导致斑块破裂, 形成急性冠状动脉综合征。临床研究表明, 不稳定型心绞痛患者血清 CRP 水平在 5~10 mg/L^[13, 14], 在这一水平下, CRP 也许不足以刺激内皮细胞或单核/巨噬细胞表达 MMP 增高。但是, 以往研究表明, 轻度炎症或微生物病原体感染可使 CRP 升高至大约 10~40 mg/L, 甚至可高达 200 mg/L。并且, 由于 CRP 长期在斑块局部的沉积及斑块内细胞同时表达分泌 CRP, 因而 As 斑块内的

CRP 浓度可能远高于血浆中的测定水平^[15]。因此,我们在此次实验中采用了 5 mg/L、20 mg/L 和 100 mg/L 三种浓度,大致与冠心病患者体内的血清 CRP 水平相符,提示在这三个浓度水平上,U937 细胞表达 MMP-2 逐渐递增,呈浓度依赖性,而普伐他汀干预后,MMP-2 表达的蛋白水平及 mRNA 水平均减低,表明普伐他汀可以抑制 rhCRP 引起的细胞表达 MMP-2 增加,进一步证实了他汀类药物的抗炎作用^[16]。

我们目前的实验只是在蛋白及 mRNA 水平初步证实了 CRP 对 U937 细胞表达 MMP-2 有促进作用,可能会因此而进一步导致斑块不稳定,甚至破裂。但是,其相应的作用机制及信号通路等方面仍需作进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆. 第二版. 北京: 科学出版社, 1995
- [3] 颜春洪,田方,肖凤君,等. 粘附诱导卵巢癌细胞基质金属蛋白酶-9 基因的表达. *中华肿瘤杂志*, 2002, **24** (1): 101-103
- [4] Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A. Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima. *Atherosclerosis*, 1985, **55** (1): 35-50
- [5] Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (9): 1

386-392

- [6] Zhang YX, Cliff WJ, Schoeffl GI, Higgins G. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **145** (2): 375-379
- [7] Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, Malcom GT, Zieske A, Kutys R, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation*, 2002, **105** (17): 2 019-023
- [8] Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, 2000, **102** (18): 2 165-168
- [9] Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET, Chang J. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, 2001, **103** (21): 2 531-534
- [10] Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*, 2002, **105** (16): 1 890-896
- [11] Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 2002, **106** (12): 1 439-441
- [12] Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*, 2001, **103** (9): 1 194-197
- [13] 沈彬,吴宗贵. 不稳定型心绞痛患者超敏 C 反应蛋白的测定及临床意义. *上海医学*, 2004, **27** (4): 234-236
- [14] 纪求尚,张运,杨晓静,张梅,王荣,李贵双,等. 炎症因子在急性冠状动脉综合征预后中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 635-638
- [15] Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 2001, **158** (3): 1 039-051
- [16] 邓平,赵水平. 环氧合酶 2 在动脉粥样硬化炎症中的意义和他汀类药物的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 241

(此文编辑 文玉珊)

读者·作者·编者

[文章编号] 1007-3949(2005)13-01-0028-01

关于汉字文稿中名词术语使用英文缩写词的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,我刊亦不例外。然而在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题:

同一个英文名词术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生;④缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein),缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;⑤用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,我刊对汉字文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请遵照执行。

1 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内,一律使用汉文;多于 3 个汉字的,才可使用英文缩写词;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用汉字;但冠心病、肺心病

等例外。

2 文题、摘要、关键词、正文中的各层次标题、插图和表格标题中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。

3 段首的名词术语需用缩写词时,为了阅读方便,可在缩写词左右加圆括号,左半圆括号之前写出汉字名词术语全称。

4 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写:汉文全称(英文全称,缩写词)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等。

5 英文缩写词在汉字文稿中不用复数。

6 书写时缩写词字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。

7 名词术语的英文缩写词不移行。

8 汉字文稿中不宜过多使用英文缩写词,我刊规定文献综述可用 4~6 个,其它文稿限 4 个内。

以上规定请共同遵照执行。

(胡必利起草、修订)