

巨噬细胞集落刺激因子对 RAW264.7 细胞 基质金属蛋白酶 9 分泌的影响

王 春^{1,2}, 许灿新¹, 严鹏科¹, 陈琳玲¹, 李 凯¹, 廖端芳¹

(南华大学 1. 药物药理研究所; 2. 护理学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 炎症因子对巨噬细胞基质金属蛋白酶的影响; 酶谱法; 巨噬细胞集落刺激因子; 基质金属蛋白酶; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞

[摘要] 目的 探讨巨噬细胞集落刺激因子致动脉粥样硬化作用是否与其影响基质金属蛋白酶表达和活性有关。方法 应用酶谱法观察巨噬细胞集落刺激因子对体外培养的 RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响; 逆转录聚合酶链反应检测巨噬细胞集落刺激因子对体外培养的 RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的影响。结果 与对照组相比, 不同浓度(100、250 和 500 $\mu\text{g/L}$) 巨噬细胞集落刺激因子能增强 RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 的活性, 并呈一定的剂量依赖性; 同时, 250 $\mu\text{g/L}$ 巨噬细胞集落刺激因子可增强 RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达。结论 巨噬细胞集落刺激因子可诱导 RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 的表达, 并可能通过这一机制影响动脉粥样硬化斑块的不稳定性。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Macrophage Colony-Stimulating Factor on Protease Secretion from RAW264.7 Cell

WANG Chun^{1,2}, XU Carr Xin¹, YAN Peng-Ke¹, CHEN Lin Ling¹, LI Kai¹, and LIAO Duarr Fang¹

(1. Institute of Pharmacy and Pharmacology; 2. Nursing Department, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Macrophage Colony-Stimulating Factor; Matrix Metalloproteinase; Zymography; Atherosclerosis; RAW264.7 Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) on the expression and activity of matrix metalloproteinases (MMP) in RAW264.7 cell. **Methods** Gelatin zymography analysis was used to detect the effect of M-CSF on activity of MMP-9 in cultured RAW264.7 cell. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the effect of M-CSF on expression of MMP-9 mRNA in cultured RAW264.7 cell. **Results** The enzyme activity of MMP-9 was significantly increased after 24 h M-CSF treatment. M-CSF had no effect on the activation of MMP-9 secreted. RT-PCR showed that M-CSF upregulated MMP-9 mRNA expression after 8-hour M-CSF treatment. **Conclusion** M-CSF upregulates MMP-9 expression in RAW264.7 cell, which may play an important role in plaque destabilization.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)患者最严重的后果是斑块破裂导致急性血管事件的发生,如急性冠状动脉综合征(acute coronary artery syndrome, ACS),而细胞外基质过多的降解已被认为是这个过程的主要分子机制之一。近来研究表明基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)9 和 MMP-2 在冠状动脉粥样硬化斑块中和 ACS 患者血清中的表达显著性增高^[1,2]。过度表达巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)的 RAW264.7 细胞株更易受到氧化损伤的攻击^[3],加

速 As 形成。Mozes 等^[4]证实, M-CSF 可使单核巨噬细胞在血管壁聚集并引起平滑肌细胞增殖、迁移,促进 As 发展。临床检测发现 M-CSF 在重度不稳定型心绞痛和 ACS 患者血清中表达异常增高^[5-7], M-CSF 的浓度被认为是预测未来急性冠状动脉事件发生的一个独立危险因素,但 M-CSF 的致 As 作用是否与诱导巨噬细胞 MMP-9 的表达活性改变有关却少有报道。本文以体外培养的小鼠 RAW264.7 细胞为研究对象,观察不同浓度的 M-CSF 对 MMP-9 活性的影响,以进一步揭示 M-CSF 引发 As 的分子机制。

[收稿日期] 2005-05-03 [修回日期] 2006-01-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30171084, 39970847)

[作者简介] 王春, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为心血管药理, 联系电话为 13187203195, E-mail 为 wangchun7625@yahoo.com.cn。李凯, 博士, 教授, 研究方向为遗传药理, E-mail 为 kaili34@yahoo.com。廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理, 联系电话为 0734-8281308, E-mail 为 dfliao66@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

RAW264.7 细胞为小鼠巨噬细胞, 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。DMEM 培养基为 GIB-

CO 产品,小牛血清(NCS)为杭州四季青产品,M-CSF 为 PeproTech 产品,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养

RAW264.7 细胞贴壁生长于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,至细胞密度达 1.0×10^9 个/L,用无血清 DMEM 洗 3 遍,用含不同浓度的 M-CSF 无血清培养基(DMEM)培养。

1.3 基质金属蛋白酶 9 的酶图分析

按文献[8]报道的方法,收集不同条件处理的 RAW264.7 细胞培养基,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。8% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(含 0.2% 明胶) 90 V 恒压电泳 3 h,凝胶浸于 2.5% TritonX-100 100 mL 中,室温 1 h,转入含 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(pH7.6)、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L CaCl_2 和 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。Epson1650Photo 扫描仪获取图像。

1.4 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 β -actin 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'-TTT CTG CCC TAG TGA GAG ACT CTA-3',下游引物为 5'-GGC TTA GAG CCA CGA CCA TAC AGA-3'。 β 肌动蛋白上游引物为 5'-GGT GGC ACC TGT GGT CCA CCT-3',下游引物为 5'-CIT CAC TTG TGG CCC AGA TAG-3'。MMP-9 扩增产物为 550 bp, β -actin 为 420 bp,均经测序鉴定证实。聚合酶链反应首次循环先在 94℃ 变性 10 min,变性、退火、延伸分别为 94℃ 1 min \rightarrow 53℃ 1 min \rightarrow 72℃ 1 min,共 35 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 1.7% 琼脂糖凝胶电泳分析。AlphaImager2200 凝胶分析系统收集图像。

用 AlphaImager2200 图像分析系统对明胶酶图结果进行吸光度扫描,明胶酶图和逆转录聚合酶链反应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 β -actin 的相对面积灰度值表示。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 巨噬细胞集落刺激因子对 RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响

RAW264.7 细胞经不同浓度的 M-CSF 诱导 24 h 后,可在 92 kDa 的位置使明胶发生降解。从明胶被降解的程度可知,M-CSF 对 RAW264.7 细胞 MMP-9 活性的作用呈浓度依赖性增强(图 1),100、250 和 500 $\mu\text{g/L}$ M-CSF 组 MMP-9 活性分别为对照组的 1.32、2.21 和 2.82 倍($P < 0.05$)。

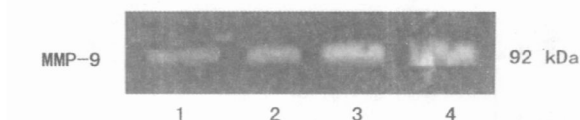


图 1. RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 活性的明胶酶图分析 1 为对照组;2 为 M-CSF 100 $\mu\text{g/L}$ 组;3 为 M-CSF 250 $\mu\text{g/L}$ 组;4 为 M-CSF 500 $\mu\text{g/L}$ 组。

2.2 巨噬细胞集落刺激因子对 RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 的影响

RAW264.7 细胞经 250 $\mu\text{g/L}$ M-CSF 诱导 8 h 后,提取细胞总 RNA,进行逆转录聚合酶链反应检测,结果发现,250 $\mu\text{g/L}$ M-CSF 处理组的 MMP-9 mRNA 量是对照组的 2.26 倍($P < 0.05$)(图 2)。

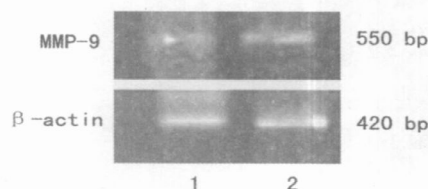


图 2. RAW264.7 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的逆转录聚合酶链反应分析 1 为对照组;2 为 M-CSF 250 $\mu\text{g/L}$ (8 h) 组。

2.3 巨噬细胞集落刺激因子对 RAW264.7 细胞上清液中基质金属蛋白酶 9 活性的影响

为确定 M-CSF 是否影响已分泌的 MMP-9 的活化过程,用无血清 DMEM 培养 RAW264.7 细胞 24 h 后,取上清液分成 4 等份,加不同浓度 M-CSF (100、250 和 500 $\mu\text{g/L}$),37℃ 培养 24 h。上清液可在 92 kDa 的位置使明胶发生降解,但与对照组相比,M-CSF 处理组活性分别为对照组的 0.98、0.96 和 1.01

倍($P > 0.10$) (图3), 表明 M-CSF 对上清液中的 MMP-9 活性无明显影响。

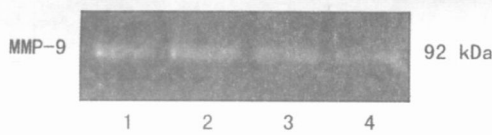


图3. RAW264.7 细胞上清液中基质金属蛋白酶 9 活性的明胶酶图分析 1 为对照组; 2 为 M-CSF 100 $\mu\text{g/L}$ 组; 3 为 M-CSF 250 $\mu\text{g/L}$ 组; 4 为 M-CSF 500 $\mu\text{g/L}$ 组。

3 讨论

动脉粥样硬化斑块破裂的 3 个主要决定因素是动脉粥样硬化区脂质核心的密度和大小、纤维帽的厚度和脂质核中炎症的程度^[9]。斑块中的胶原含量严重影响纤维帽的厚度, 胶原含量少的薄纤维帽会增加斑块破裂的风险, 而血管平滑肌细胞的数量减少和胶原酶、基质金属蛋白酶的分泌增多会导致纤维帽变薄。MMPs 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 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 为辅助因子而激活, 可以降解所有细胞外基质成分。MMPs 包括 12 个成分, 其中 MMP-9 与 As 斑块的不稳定型尤为相关, MMP-9 又称 92 kDa 明胶酶或明胶酶 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^[2, 10, 11], 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^[12]。

巨噬细胞集落刺激因子在 As 中的作用机制十分复杂, 包括正反两个方面, 有些观点还存在分歧, 何者更为主要一些, 有待于进一步研究证实。不管 M-CSF 致 As 作用还是抑制 As 作用, 但共同的认识是冠心病患者血浆 M-CSF 水平升高且与临床危险度、病变活动程度存在一定的关系^[5-7]。本实验结果发现, M-CSF 可增强 RAW264.7 细胞 MMP-9 的活性, 且这种作用呈剂量依赖性增强, 说明 M-CSF 可能通过增强斑块内单核/巨噬细胞 MMP-9 的活性, 促进斑块内胶原的降解, 使斑块易于破裂, 从而导致 ACS 的发生。

巨噬细胞 MMP-9 的分泌和活性存在着基因转

录、蛋白翻译和酶原的活化 3 种水平的调控^[13]。为说明 M-CSF 增强 RAW264.7 细胞 MMP-9 的活性作用是通过 MMP-9 的基因转录还是与 MMP-9 基因转录后的蛋白翻译或促进酶原的激活有关, 我们提取 M-CSF 处理细胞的总 RNA, 进行逆转录聚合酶链反应检测, 发现 M-CSF 能明显地促进 MMP-9 的 mRNA 表达, 而对细胞上清液中已分泌出来的 MMP-9 的活性无明显作用。说明 M-CSF 可能主要通过促进 MMP-9 的基因转录来影响蛋白水平, 从而促使酶分泌增加。彻底弄清楚 M-CSF 的作用机制, 将有助于阐明 As 的发病机理, 提高 As 的预防和诊治水平, 这也有待于我们进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarelli CM, Ceci F, Franco M Di, et al. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation[J]. *J Invest Med*, 2003, **51** (5): 295-300
- [2] Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **59** (4): 812-823
- [3] Pang ZL. Effect of macrophage colony stimulating factor overexpression on oxidative injury/resistance of RAW264.7 cells[J]. *Clin Exp Med*, 2003, **3** (1): 20-26
- [4] Mozes G, Mohacs F, Glovizio P, Menawat S, Kullo I, Spector D, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of macrophage colony stimulating factor to the arterial wall in vivo[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1157-1163
- [5] Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Shimada K. Increased levels of monocyte-related cytokines in patients with unstable angina[J]. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (2): 403-408
- [6] Rallidis LS, Zolindaki MG, Manioudaki HS, Laoutaris NP, Velissariou AH, Papasteriadis EG. Prognostic value of C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6, and macrophage colony stimulating factor in severe unstable angina[J]. *Clin Cardiol*, 2002, **25** (11): 505-510
- [7] Rallidis LS, Zolindaki MG, Pentzeridis PC, Pouloupoulos KP, Velissariou AH, Apostolou TS. Raised concentrations of macrophage colony stimulating factor in severe unstable angina beyond the acute phase are strongly predictive of long term outcome[J]. *Heart*, 2004, **90** (1): 25-29
- [8] Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72 kDa progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β [J]. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 1860-1869
- [9] Zhou J, Chew M, Ravn HB, Falk E. Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes[J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1999, **230**: 3-11
- [10] 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 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 10-13
- [11] 于滢, 杨向红. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对人对内皮细胞基质金属蛋白酶分泌及活性的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 568-570
- [12] Loftus IM, Naylor AR, Goodall S. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption[J]. *Stroke*, 2000, **31** (1): 40-47
- [13] Xu XP, Meisel SR, Ong JM. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages[J]. *Circulation*, 1999, **99**: 993-998

(此文编辑 朱雯霞)