

泽泻汤对巨噬细胞源性泡沫细胞 MMP-9 表达的影响及其与 ERK 通路的相关性

陈彤¹, 魏伟², 邹愉龙², 周晓茂¹, 邓阳阳¹, 卓丽萍¹, 薛偕华²

(1. 福建中医药大学康复医学院, 福建省福州市 350003; 2. 福建中医药大学附属康复医院脑病科, 福建省福州市 350003)

[关键词] 泽泻汤; 泡沫细胞; 基质金属蛋白酶9; ERK

[摘要] **目的** 以大鼠腹腔巨噬细胞为研究对象,经 ox-LDL(50 mg/L)诱导后建立巨噬细胞源性泡沫细胞模型,观察泽泻汤对泡沫细胞 MMP-9 表达的影响及其与 ERK 通路的相关性。**方法** 用 ox-LDL(50 mg/L)处理大鼠腹腔巨噬细胞 24 h,经 20% 泽泻汤含药血清干预 24 h,油红 O 染色检测泡沫细胞形成情况,RT-PCR 检测泡沫细胞 MMP-9 mRNA 的表达,蛋白免疫印迹检测泡沫细胞 MMP-9 和 ERK 信号分子的表达情况。**结果** ox-LDL(50 mg/L)处理巨噬细胞成功建立巨噬细胞源性泡沫细胞模型;与空白组比较,模型组 MMP-9mRNA 和蛋白表达明显增加,经 20% 泽泻汤含药血清、U0126 干预后,MMP-9 mRNA 和蛋白、p-ERK 蛋白表达水平较模型组显著降低。**结论** ox-LDL(50 mg/L)处理巨噬细胞可以成功建立巨噬细胞源性泡沫细胞模型;ERK 通路受抑制能减少泡沫细胞中 MMP-9 的表达,泽泻汤能抑制巨噬细胞源性泡沫细胞 MMP-9 表达,其作用机制可能与 ERK 的磷酸化密切相关。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

The Effect of Alisma Soup on the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 and the Correlation with ERK Pathway on Foam Cell Derived from Rat Peritoneal Macrophages

CHEN Tong, WEI Wei, ZOU Yu-Long, ZHOU Xiao-Mao, DENG Yang-Yang, ZHUO Li-Ping, and XUE Xie-Hua
(Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China)

[KEY WORDS] Alisma Soup; Foam Cell; Matrix Metalloproteinase-9; ERK

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of Alisma soup on the expression of matrix metalloproteinase-9 and the correlation with ERK pathway on foam cell derived from rat peritoneal macrophages. **Methods** Foam cell model derived from rat peritoneal macrophages was established after induction with oxidized low density liprotein (ox-LDL) (50 mg/L) for 24h. The foam cells were intervened with 20% Alisma-containing serum for 24 h. They were stained by oil red O to observe foam cell formation. RT-PCR and Western blot was utilized to detect the expression of MMP-9. p-ERK and ERK protein was detected by Western blot. **Results** The foam cell model was established successfully after the stimulation with ox-LDL(50mg/L). As compared with the control group, the expression of MMP-9 protein and mRNA in ox-LDL group were elevated. However, after the intervention with 20% Alisma soup-containing serum and U0126, the specific inhibitor of the ERK signaling pathway, the expression of MMP-9 protein and mRNA and P-ERK protein decreased significantly comparing with ox-LDL group. There was no change of ERK expression among groups. **Conclusion** Pretreating macrophage with ox-LDL can establish foam cell model derived from macrophages. Alisma soup can inhibit the expression of MMP-9 in foam cell, and the mechanism maybe has correlation with ERK signaling pathway.

以动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)为病理基础的心脑血管疾病严重威胁着人们的健康。在 As 进程中巨噬细胞通过清道夫受体摄取氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density liprotein, ox-LDL),

[收稿日期] 2013-06-17
[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81001543/H2717),福建省卫生厅中医处重点项目(Wzzk0905)
[作者简介] 陈彤,硕士研究生,研究方向为脑血管病的基础和康复研究,E-mail 为 1250622438@qq.com。魏伟,硕士,医师,研究方向为脑血管病的基础和临床,E-mail 为 455719687@qq.com。通讯作者薛偕华,博士,副主任医师,研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床研究,E-mail 为 465356738@qq.com。

转变为泡沫细胞,分泌大量基质酶和细胞因子等,在 As 的发生、发展中起重要的作用。研究表明在人颈动脉粥样硬化斑块中存在基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的高表达^[1],在体外培养中 ox-LDL 能诱导巨噬细胞分泌 MMP-9^[2]。MMP-9 是基质金属蛋白酶家族重要一员,在巨噬细胞溢出迁移、血管壁重构、斑块破裂、血栓形成等一系列病理生理过程扮演着重要的作用^[3]。泽泻汤出自东汉张仲景《金匱要略》篇,研究表明本方具有扩张血管、降脂、抗 As 等药理作用^[4,5]。目前泽泻汤抗 As 的机制研究较少见,尚未见泽泻汤对 MMP-9 的表达影响及其与 ERK 信号通路的相关性研究。本研究立足于 As 进程中重要细胞—巨噬细胞源性泡沫细胞,观察泽泻汤对 MMP-9 表达的影响,并探讨其作用机制与 ERK 通路相关性。

1 材料与方法

1.1 主要材料

RPMI1640 培养基购自 Hyclone 有限公司;胎牛血清购自 FAA 有限公司;氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL 1.26 mg/L) 购自北京协生生物科技有限公司;油红 O 购自武汉博士德有限公司;苏木素购自武汉博士德有限公司;MMP-9、p-ERK 和 ERK 抗体购自 CST 有限公司;ECL 试剂购自北京碧云天有限公司;细胞裂解液裂解细胞购自北京碧云天有限公司,清洁级 SD 雄性大鼠 40 只,购自福建医科大学实验动物中心(许可证号:SCXK(闽)2012-0001),Western blot 电泳设备购自 Bio-RAD 公司;细胞培养箱 (Therom 公司,美国),Leica DM IL LED 倒置显微镜。

1.2 泽泻汤的制备

泽泻汤由泽泻、白术组成,购自福建中医药大学附属康复医院药剂科,泽泻、白术剂量严格按《金匱要略》原方剂量比例制剂并提供,以上药物均经过鉴定,符合《中华人民共和国药典·一部》2005 年版有关规定。参考中药药理实验方法学(李仪奎著作,上海科学技术出版社)制备相当于生药材 2.64 g/mL 的药液:头煎加水量为药量的 6 倍,浸泡 1 h,煎 20 分钟;二煎加水量为药量的 4 倍,煎 0.5 h,两次药液混合后,再浓煎压缩,4℃ 冰箱储存备用。

1.3 大鼠腹腔巨噬细胞提取及细胞培养

SD 大鼠腹腔内注射 10 mL RPMI1640 培养液,72 h 后以颈椎脱臼法处死,腹腔内注射无血清无酚红 RPMI1640 培养液 10 mL,75% 乙醇浸泡 5 min,无菌操作收集腹腔内液,1500 r/min 离心 5 min 后收

集细胞,用含 10% 胎牛血清的无酚红 RPMI1640 培养液调整细胞数至 5×10^6 mL/L,将细胞接种到覆有盖玻片的 6 孔板和 25 cm² 培养瓶中,置 5% CO₂、37℃ 孵箱培养 6 h 细胞贴壁后弃上清液,PBS 洗去未贴壁细胞。

1.4 泽泻汤含药血清的制备

清洁级 SD 雄性大鼠 40 只,体重 200 ~ 220 g,适应性饲养 3 天后再行实验。SD 大鼠随机分为泽泻汤含药血清组和空白血清组(注射相同量的生理盐水),每组各 20 只。按 1 mL/100 g 灌胃给药,每天 2 次,连续 7 天,第 8 天给药后 2 h 腹主动脉采血,于 4℃ 3 kr/min 离心 10 min 分离血清。合并血清,56℃ 灭活 30 min,微孔滤膜过滤除菌,于 -20℃ 保存待用。血清均在制备后 1 个月内使用。

1.5 细胞干预分组

空白组:大鼠腹腔巨噬细胞 + 20% 正常大鼠血清,48 h;模型组:大鼠腹腔巨噬细胞 + ox-LDL (50 mg/L),48 h;泽泻汤血清干预组:在大鼠腹腔巨噬细胞 + Ox-LDL (50mg/L) 孵育 24 h 后,加入含有 20% 泽泻汤含药血清的 RPMI1640 培养基孵育细胞,继续培养 24 h。单纯泽泻汤血清组:大鼠腹腔巨噬细胞 + 20% 正常大鼠血清培养 24 h 后,更换为含有 20% 泽泻汤含药血清的 RPMI1640 培养基孵育细胞,继续培养 24 h。U0126 组:在大鼠腹腔巨噬细胞 + ox-LDL (50 mg/L) 孵育 24 h 后,加入含 U0126 (10 μmol/L) 的 20% 正常大鼠血清 RPMI1640 培养基,继续培养 24 h。每组实验重复 3 次。

1.6 油红 O 及苏木素染色

取出干预后细胞(6 孔板),细胞标本用 PBS 洗涤 1 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,油红 O 染色 10 min,苏木素染色 5 min,10 mL/L HCl 分化及返蓝,水性封片剂封片。普通显微镜下观察,细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色。

1.7 RT-PCR 检测 MMP-9 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂 (Gibco 公司) 提取总 RNA,取 2 μg 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA,再各取 2 μL 逆转录产物分别进行 PCR。MMP-9 的引物序列为:上游 5'-GATCCCCAGAGCGTTACTCG-3',下游 5'-GTTGTGGAACTCACACGCC-3',扩增片段长度为 132 bp。内参照采用 β-actin 引物序列为上游 5'-GCATTGCTGACAGGATGCAG-3',下游 5'-GTAA-CAGTCCGCCTAGAAGCA-3',扩增片段长度为 218 bp。取 RT-PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳中电泳,MMP-9 加样量为 5 μL,内参的加样量为 5 μL,溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分

析系统做积分吸光度测定和分析。

1.8 蛋白免疫印迹检测 MMP-9、p-ERK 和 ERK 蛋白的表达

在收获好的细胞中加入三去污细胞裂解液裂解细胞,0℃放置 30 min,4℃、12 kr/min 离心 2 min,弃除沉淀,BCA 法蛋白定量。取 30 μg 蛋白加入 2 × SDS 凝胶加样缓冲液中,100℃水浴 10 min,立刻置于冰上备用。6% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转 PDVF 膜,丽春红染色观察转移效果。5%脱脂奶粉封闭液封闭 2 h;按 1: 200 加入一抗,4℃孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min;1: 2000 加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次。用 Western blot 印迹荧光检测试剂盒显示,并于凝胶

成像系统检测分析。

2 结果

2.1 大鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立

50 mg/L ox-LDL 与大鼠腹腔巨噬细胞共同培养 24 h 后,用 PBS 洗涤 2 次,采用油红 O 与苏木素染色,显微镜下观察提示模型组泡沫细胞的胞浆内存在大量红色的脂滴,苏木素染色后细胞核呈蓝色,成功建立巨噬细胞源性泡沫细胞。与模型组泡沫细胞比较,泽泻汤血清干预组和 U0126 干预组的泡沫细胞内脂滴染色较淡,提示二者脂质沉积较模型组减少(图 1)。

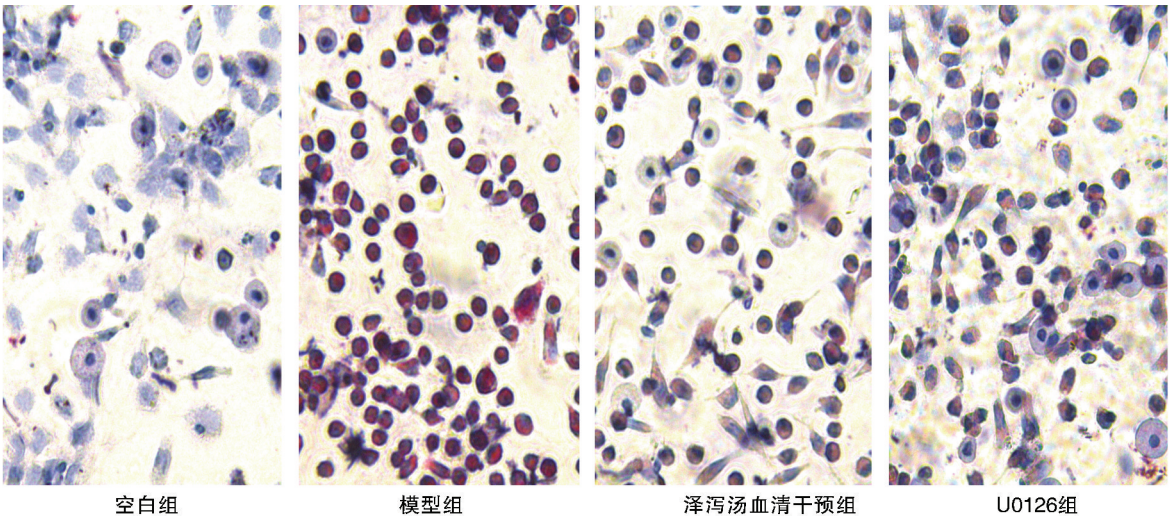


图 1. 巨噬细胞向泡沫细胞的转化 大鼠腹腔巨噬细胞油红 O 与苏木素染色后发现模型组泡沫细胞的胞浆内存在大量红色的脂滴,经泽泻汤血清干预组和 U0126 干预后泡沫细胞内脂滴染色较模型组减轻。

Figure 1. Transformation of macrophages to foam cells

2.2 泽泻汤含药血清对巨噬细胞源性泡沫细胞的 MMP-9 mRNA 表达的影响

Ox-LDL(50 mg/L)与大鼠腹腔巨噬细胞共同培养 24 h 后,20%泽泻汤含药血清继续干预 24 h 后,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,分别采用 TRIzol 提取细胞总 RNA。RNA 定量后,采用 RT-PCR 检测 MMP-9 mRNA 的表达水平。结果发现空白组细胞亦有 MMP-9 mRNA 的表达,模型组中泡沫细胞 MMP-9 mRNA 表达明显增加,泽泻汤血清干预组、单纯泽泻汤血清干预组和 U0126 干预组的细胞 MMP-9 mRNA 表达显著降低(图 2)。

2.3 泽泻汤含药血清对巨噬细胞源性泡沫细胞的 MMP-9、p-ERK 和 ERK 蛋白表达的影响

Ox-LDL(50 mg/L)与大鼠腹腔巨噬细胞共同培

养 24 h 后,20%泽泻汤含药血清继续干预 24 h 后,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,采用细胞裂解液提取细胞总蛋白,蛋白定量后,采用蛋白免疫印迹检测 MMP-9、p-ERK 和 ERK 蛋白的表达水平。结果发现大鼠腹腔巨噬细胞(空白组)在体外培养过程中 MMP-9 和 p-ERK 有不少的表达,模型组的泡沫细胞 MMP-9 和 p-ERK 蛋白表达量较空白组略有增加,泽泻汤血清干预组、单纯泽泻汤血清干预组和 U0126 干预组的细胞 MMP-9 和 p-ERK 蛋白表达量显著降低(图 3)。

3 讨论

As 是许多心脑血管疾病的起点,严重危害人类的生命健康。单核/巨噬细胞是参与动脉粥样硬化

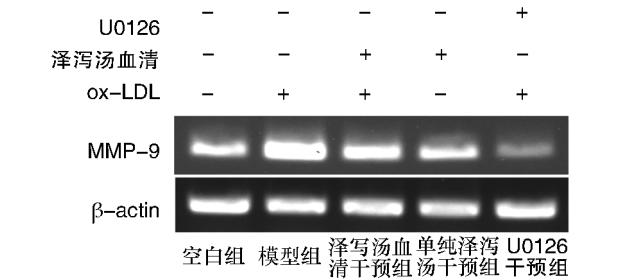


图 2. 不同干预方法对巨噬细胞源性泡沫细胞的 MMP-9 mRNA 表达水平的影响 与模型组比较,泽泻汤含药血清清干预组和 U0126 干预组的泡沫细胞 MMP-9 mRNA 表达显著降低。

Figure 2. Effect of different intervention on MMP-9 mRNA in foam cell derived from rat peritoneal macrophages

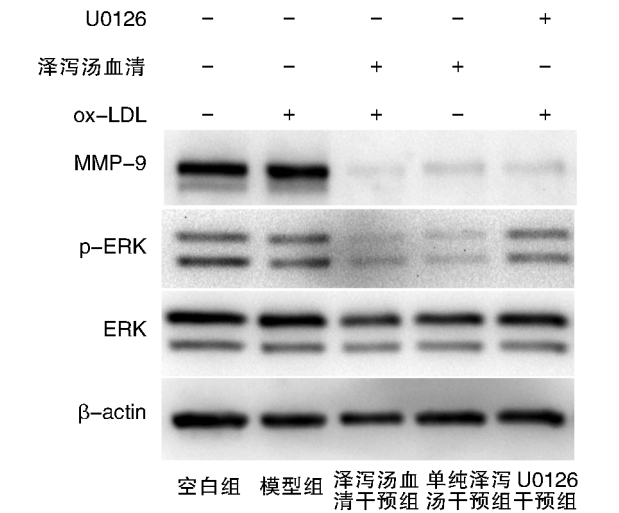


图 3. 不同干预方法对巨噬细胞源性泡沫细胞 MMP-9、ERK 和磷酸化后 ERK (p-ERK) 蛋白表达的影响 巨噬细胞源性泡沫细胞经泽泻汤血清、U0126 干预后 MMP-9、p-ERK 表达显著降低,单纯泽泻汤血清亦有类似的作用。

Figure 3. Effect of different intervention on MMP-9, ERK and p-ERK protein in foam cell derived from rat peritoneal macrophages

形成的重要炎症细胞,也是泡沫细胞的主要来源细胞^[6]。单核/巨噬细胞与 ox-LDL 接触,并通过膜表面清道夫受体等无限制摄取 ox-LDL,最终形成泡沫细胞,并分泌大量基质蛋白酶和细胞因子等,促进 As 的发生发展。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK) 是哺乳动物细胞内广泛存在的一类丝/苏氨酸蛋白激酶,包括细胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 MAPK 等,与多种细胞反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)密切相关,其中 ERK、JNK 以及 p38 在动脉粥样硬化中具有重要作用。ERK 的磷酸化促进细胞增殖分化,诱导相应促炎分子分泌,与

As 进程密切相关。

泽泻汤出自东汉张仲景《金匱要略》篇,其调节血脂代谢和抗动脉粥样硬化的作用在防治心脑血管病方面逐渐成为研究热点。刘金元等^[7]研究发现泽泻汤对大鼠血脂及血液流变学指标明显改善,认为该方对动脉粥样硬化大鼠血脂和血液流变学指标具有调节作用,对受损血管具有修复作用。泽泻中主要含有的三萜类成分为泽泻醇 A,24-乙酰泽泻醇 A,泽泻醇 B 及其 23-乙酰化物等。近来有研究提示泽泻主要成分泽泻醇 B 能作用人血管平滑肌细胞和淋巴细胞而发挥抗 As 的作用^[8],Law 等研究提示泽泻醇 B 能通过抑制内质网 Ca 离子 ATP 酶而诱导自噬、抗细胞增殖的作用^[9]。本研究初步发现泽泻汤具有改善泡沫细胞脂质累积的效应,提示泽泻汤具有改善脂质代谢而发挥抗 As 的作用。临床和实验研究提示泽泻汤抗 As 的明确疗效,是否与 MMP-9 和 ERK 信号途径相关亦未见报道。

MMP-9 是降解细胞外基质最主要的 MMP,是参与 As 进程中最主要的分子。正常动脉壁内只有少量无活性的 MMP-9 表达,而在 As 斑块中可检出多种 MMP,其中 MMP-9 含量较多,活性最强。MMP-9 是平滑肌细胞和单核/吞噬细胞迁移的一种必要的媒介,在对内膜损伤的反应及 As 病变形成的过程中起关键作用。在动脉粥样硬化斑块血管平滑肌细胞及聚集的巨噬细胞内可诱导 MMP-9 表达,MMP-9 表达与斑块不稳定性及颈动脉粥样硬化的密切相关^[10-12]。因此抑制 MMP-9 的表达具有抗 As 作用和稳定斑块的可能。ox-LDL 能够激活巨噬细胞 NF- κ b 通路,从而导致 MMP-9 大量表达^[2,13],Zhang 等^[14]研究表明 TGF- β 1 通过 ERK-NF- κ B 通路诱导 MMP-9 的表达,提示 MMP-9 的表达与 ERK 通路调控有关。本研究发现大鼠腹腔巨噬细胞体外培养过程中亦有部分 MMP-9 和 p-ERK 的表达,单纯加入泽泻汤血清后亦能抑制 MMP-9 和 p-ERK 的表达;加入 ox-LDL 后 p-ERK 和 MMP-9 表达水平略有增加,经泽泻汤血清和 ERK 特异性抑制剂 U0126 干预后 p-ERK 和 MMP-9 表达量明显降低,证实了 MMP-9 的表达与 ERK 通路调控有关,同时也提示泽泻汤具有类似 U0126 的抑制 ERK 磷酸化的作用,可能通过该途径调节 MMP-9 的表达。

总之,我们实验结果表明泽泻汤能抑制大鼠腹腔巨噬细胞和泡沫细胞 MMP-9 的表达,并通过抑制 ERK 的磷酸化起作用,该研究结果的发现为阐明泽泻汤抗动脉粥样硬化研究提供新的思路和实验方法。

[参考文献]

[1] 何远宏,刘恒方,张 敏,等. 颈动脉粥样硬化斑块组织中 ABCA1 和 MMP-9 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2011, 46(2): 213-215.

[2] Huang Z, Meng S, Wang L et al. Suppression of oxLDL-induced MMP-9 and EMMPRIN expression by berberine via inhibition of NF-κB activation in human THP-1 macrophages[J]. Anat Rec (Hoboken), 2012, 295: 78-86.

[3] 梅 宇,王桂照,黄永麟. 基质金属蛋白酶与血管成形术后再狭窄[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 376-379.

[4] 吕少锋,曹克强,王培杨. 泽泻汤加味治疗高脂血症 120 例临床观察[J]. 中医药临床杂志, 2005, 17(5): 454.

[5] 唐雪梅,翟玉祥,刘 涛. 加味泽泻饮对实验性高脂血症大鼠血液流变学及血清一氧化氮的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(5): 26-28.

[6] Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages; an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis[J]. Med Res Rev, 2008, 28(4): 483-544.

[7] 刘金元,杨冬娣,张慧婕. 加味泽泻汤对动脉粥样硬化模型大鼠的治疗作用[J]. 江苏中医药, 2008, 40(6): 87-88.

[8] Chen HW, Hsu MJ, Chien CT, et al. Effect of alisol B acetate, a plant triterpene, on apoptosis in vascular smooth muscle cells and lymphocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 419(2-3): 127-138.

[9] Law BY, Wang M, Ma DL, et al. Alisol B, a novel inhibitor of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump, induces autophagy, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(3): 718-730.

[10] 白文武,刘运芳,鹿晓婷,等. 大黄素稳定小鼠动脉粥样硬化斑块的机制[J]. 中国老年医学杂志, 2011, 31(7): 1 167-169.

[11] 周志斌,郭 毅,王思鸿,等. 基质金属蛋白酶 9 及转化生长因子 β 1 在人动脉粥样硬化斑块的表达及其与斑块稳定性的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(3): 217-220.

[12] 林梅瑟,陈碧新,赵志光,等. 姜黄素对动脉粥样硬化兔基质金属蛋白酶 9 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(3): 189-192.

[13] Schmidt R, Bultmann A, Fischel S, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes[J]. Circ Res, 2008, 102(3): 302-309.

[14] Zhang H, Wang ZW, Wu HB, et al. Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat vascular smooth muscle cells via ROS-dependent ERK-NF-κB pathways[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 375(1-2): 11-21.

(此文编辑 李小玲)