

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-03-0254-05

同型半胱氨酸对巨噬细胞 CD147 表达的影响及瑞舒伐他汀的干预作用

殷永军¹, 杜大勇², 李运田^{1,2}, 柳 杨², 宗家欣¹, 李 巍², 张雁斌¹

(1. 南方医科大学, 广东省广州市 510515; 2. 南方医科大学附属解放军第 305 医院心脏中心, 北京市 100017)

[关键词] 同型半胱氨酸; 巨噬细胞; CD147; 瑞舒伐他汀

[摘要] 目的 探讨同型半胱氨酸对 U-937 巨噬细胞 CD147 表达的影响及瑞舒伐他汀的干预作用。方法 在佛波酯诱导分化的人 U-937 巨噬细胞中加入 0、50、100 及 500 $\mu\text{mol/L}$ 的同型半胱氨酸孵育 48 h; 半定量 RT-PCR 检测 CD147 mRNA 的表达, Western blot 检测巨噬细胞 CD147 蛋白的表达。不同浓度的瑞舒伐他汀和 500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸共同干预 U-937 巨噬细胞, 48 h 后半定量 RT-PCR 及 Western blot 检测 CD147 受抑制情况, 细胞免疫荧光试验检测 CD147 表达。结果 半定量 RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 随同型半胱氨酸浓度增加, U-937 巨噬细胞 CD147 mRNA 及蛋白的表达逐渐升高, 具有剂量依赖性。不同浓度瑞舒伐他汀和 500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸共同处理 U-937 巨噬细胞, 随瑞舒伐他汀浓度增加, U-937 巨噬细胞 CD147 mRNA 及蛋白的表达逐渐受抑制, 呈一定剂量依赖性。细胞免疫荧光证实同型半胱氨酸促进 CD147 表达增加, 而瑞舒伐他汀能抑制其表达。结论 同型半胱氨酸能上调 U-937 巨噬细胞 CD147 的表达, 瑞舒伐他汀呈浓度依赖性抑制同型半胱氨酸诱导 CD147 表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of homocysteine on CD147 expression in macrophages and the intervention effect of rosuvastatin

YIN Yong-Jun¹, DU Da-Yong², LI Yun-Tian^{1,2}, LIU Yang², ZONG Jia-Xing¹, LI Wei², ZHANG Yan-Bin¹

(1. Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Heart Center, the 305th Hospital of People's Liberation Army, Southern Medical University, Beijing 100017, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Macrophages; CD147; Rosuvastatin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of homocysteine (Hcy) on CD147 expression in human U-937 macrophages and intervention effect of rosuvastatin. **Methods** Human U-937 macrophages induced by PMA were treated with 0, 50, 100 and 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy for 48 hours respectively, CD147 expression was then analyzed using Western blot and RT-PCR. Different concentrations of rosuvastatin ($10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$) were added when U-937 macrophages were treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy. CD147 expression was then examined after incubating for 48 h. Cellular immunofluorescence method was used to detect the expression of CD147. **Results** Hcy significantly increased the expression of CD147 in a dose-dependent manner. Rosuvastatin ($10^{-7} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$) significantly reversed the expression of Hcy-induced CD147 in U-937 macrophages in a dose-dependent manner. Cellular immunofluorescence demonstrated that the CD147 expression of U-937 macrophages was significantly increased by Hcy compared with control group, rosuvastatin (10^{-5} mol/L) could reverse the effect. **Conclusion** Hcy (100~500 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the production of CD147 in PMA-induced U-937 macrophages in a dose-dependent manner. Additional extracellular rosuvastatin can decrease the expression of CD147 in PMA-induced U-937 macrophages induced by Hcy.

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是动脉粥样硬化的独立危险因素^[1-3], 但至今对其确切机制尚未完全阐明。研究表明, 细胞膜表面的基质金属蛋

白酶诱导因子 CD147 能刺激多种细胞分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), 促进动脉粥样硬化发生及发展^[4]。有研究显示 Hcy 同样可

[收稿日期] 2016-08-19

[修回日期] 2016-12-08

[作者简介] 殷永军, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 yyjtalud@163.com。通讯作者李运田, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 lyt305@126.com。

引起多种细胞分泌 MMP^[5-6], 因此本研究设想 Hcy 可能通过促 CD147 表达参与动脉粥样硬化发生发展的过程, 并对此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Hcy、二甲基亚砜、佛波酯和瑞舒伐他汀购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清、RPMI1640 培养基和 MTT 试剂盒购自中科迈晨科技有限公司, U-937 细胞系购自中国协和细胞资源中心, 引物、PCR 试剂盒购自大连宝生物工程公司, 小鼠抗人 CD147 抗体购自美国 Abcam 公司, 兔抗人 CD147 单抗、Alexa555 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自美国 CST 公司, 山羊抗兔二抗、鼠抗人 GAPDH 单抗、山羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。real-time PCR system、PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国), 荧光显微镜 (Zeiss 公司, 德国)。

1.2 细胞培养及分组

用含 10% 灭活胎牛血清、1% 青霉素和 1% 链霉素的 RPMI1640 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 环境中培养 U-937 细胞。U-937 细胞呈类圆形或椭圆形, 悬浮状态生长, 传代 3 代后的细胞用于实验。参照文献[7-8], 当细胞密度达到 5×10^5 /L 时, 培养液中加入 10 nmol/L 佛波酯, 刺激 48 h。在倒置显微镜上观察细胞由悬浮生长转为贴壁生长, 并伸出伪足, 表明 U-937 细胞已诱导分化成为巨噬细胞, 吸出上清液, 用无血清培养基洗涤 3 遍, 换无血清培养基培养 24 h 后, 加处理因素: ①分别加入浓度为 0、50、100 及 500 μmol/L 的 Hcy 孵育 48 h; ②分别加入 0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 及 10^{-5} mol/L 的瑞舒伐他汀, 再加 500 μmol/L Hcy 共培养 48 h。

1.3 RT-PCR 检测 U-937 细胞 CD147 mRNA 表达水平

PCR 引物由 TaKaRa 公司合成, CD147 引物序列上游为 5'-AGAGGACTCACTTGCCCAACA-3', 下游为 5'-GCCAGTTCCCCAGCAAAA-3', 扩增产物 118 bp; GAPDH 引物序列上游为 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游为 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3', 扩增产物 138 bp。使用 RNAiso 提取细胞总 RNA, 以半定量 RT-PCR 测定 CD147 mRNA 表达, 严格按试剂盒的程序操作: ①将各样本的 RNA 逆转录成 cDNA, 反应条件为 37 ℃ 15 min, 99 ℃ 5 min, 4 ℃ 5 min; ②分别用相应的引物扩增 CD147 及 GAPDH。PCR 反应条件为 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 58 ℃ 40 s, 40 个循环。反应结束后, RT-PCR 相对定量结果采用

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.4 Western blot 检测 U-937 细胞 CD147 蛋白表达

用 4 ℃ 的 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 RMP1 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 4 ℃、12000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 加入上样缓冲液煮 5 min, 另取少量上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 计算各样品上样量。行 SDS-PAGE 电泳, 将 PAGE 胶取下, 300 mA 转膜 1.5 h, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 置兔抗人一抗中 4 ℃ 过夜, 加入羊抗兔二抗, 室温下孵育 2 h, 加入超敏发光液后进行曝光反应。蛋白条带经扫描后, 采用 Quantity One 软件分析条带灰度值。

1.5 细胞荧光免疫试验

用 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。加入 0.5% Triton X-100 室温处理 15 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。用 10% 羊血清 37 ℃ 封闭 30 min, 加入小鼠抗 CD147 抗体 (1:100), 4 ℃ 过夜, PBS 洗 3 次后, 加入 Alexa555 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体 37 ℃ 1 h, PBS 洗 3 次后, 加入 DAPI (0.5 mg/L) 室温避光孵育 3 min, PBS 洗 3 次, 在荧光显微镜下观察、摄像。

1.6 MTT 试验

取对数生长期 U-937 细胞, 调整细胞的浓度为 1×10^8 /L, 每孔 200 μL, 用 RPMI1640 培养基接种于 96 孔培养板中, 每孔 2×10^4 个细胞, 利用 10 nmol/L 佛波酯刺激 48 h, 换无血清培养基培养 24 h, 按空白对照组、不同浓度 Hcy 组 (分别为 0、50、100 及 500 μmol/L Hcy 组)、不同浓度瑞舒伐他汀组 (分别为 0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 及 10^{-5} mol/L 瑞舒伐他汀组) 分组, 继续孵育 48 h。按照 MTT 试剂盒说明书, 每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 g/L), 37 ℃ 温箱内孵育 4 h, 小心吸弃孔内培养上清液, 加入 100 μL DMSO, 震荡 10 min, 充分溶解, 全自动酶标仪上于 490 nm 处测定吸光度。

1.7 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 21.0 统计学软件进行单因素方差分析, 多组样本均数比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 对巨噬细胞 CD147 表达的影响

不同浓度的 Hcy 刺激 U-937 巨噬细胞 48 h 后, 随着 Hcy 浓度的升高, CD147 mRNA 和蛋白的表达量逐渐增加, 其中 100、500 μmol/L Hcy 组 CD147 mRNA 和蛋白的表达量较对照组明显增加 ($P <$

0.05;图1)。0、500 μmol/L Hcy 刺激 U-937 巨噬细胞 48 h 后,细胞免疫荧光试验检测 CD147 表达,可见对照组细胞膜上荧光浅淡,Hcy 处理后细胞膜上荧光较对照组明显增强(图2)。

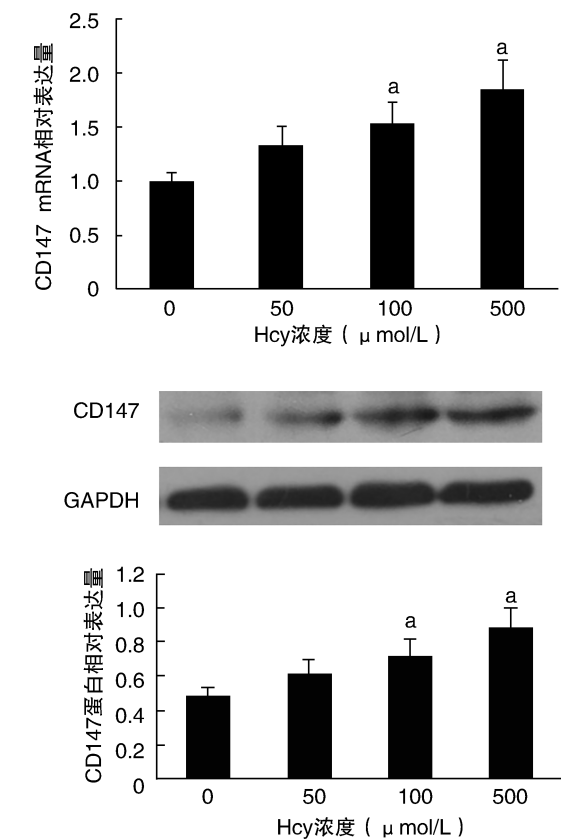


图1. Hcy 对 CD147 mRNA 和蛋白表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$,与对照组比较。
Figure 1. Effect of homocysteine on CD147 mRNA and protein expression in U-937 macrophages($n=3$)

2.2 瑞舒伐他汀对 Hcy 诱导的巨噬细胞 CD147 表达的影响

不同浓度瑞舒伐他汀与 500 μmol/L Hcy 共同处理 U-937 细胞 48 h 后,随着瑞舒伐他汀浓度的逐渐增加,CD147 mRNA 和蛋白的表达量逐渐减少,其中 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 瑞舒伐他汀组较对照组明显减少($P<0.05$;图3)。0、 10^{-5} mol/L 瑞舒伐他汀与 500 μmol/L Hcy 共同处理 U-937 巨噬细胞 48 h 后,细胞荧光试验检测显示 Hcy 组免疫荧光信号较强,而瑞舒伐他汀组荧光强度较 Hcy 组明显减弱(图2)。

2.3 Hcy、瑞舒伐他汀对巨噬细胞活性的影响

与对照组比较,不同浓度 Hcy 组、Hcy+不同浓度瑞舒伐他汀组 OD 值无明显差异($P>0.05$),提示瑞舒伐他汀抑制 Hcy 上调 CD147 表达并非抑制细胞活力所致(表1)。

表 1. MTT 法检测细胞活力($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 1. Cell viability detected by MTT assay($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分组	OD 值
对照组	0.59±0.020
50 μmol/L Hcy 组	0.60±0.036
100 μmol/L Hcy 组	0.57±0.032
500 μmol/L Hcy 组	0.59±0.023
500 μmol/L Hcy+10 ⁻⁸ mol/L 瑞舒伐他汀组	0.60±0.036
500 μmol/L Hcy+10 ⁻⁷ mol/L 瑞舒伐他汀组	0.62±0.048
500 μmol/L Hcy+10 ⁻⁶ mol/L 瑞舒伐他汀组	0.61±0.025
500 μmol/L Hcy+10 ⁻⁵ mol/L 瑞舒伐他汀组	0.58±0.035

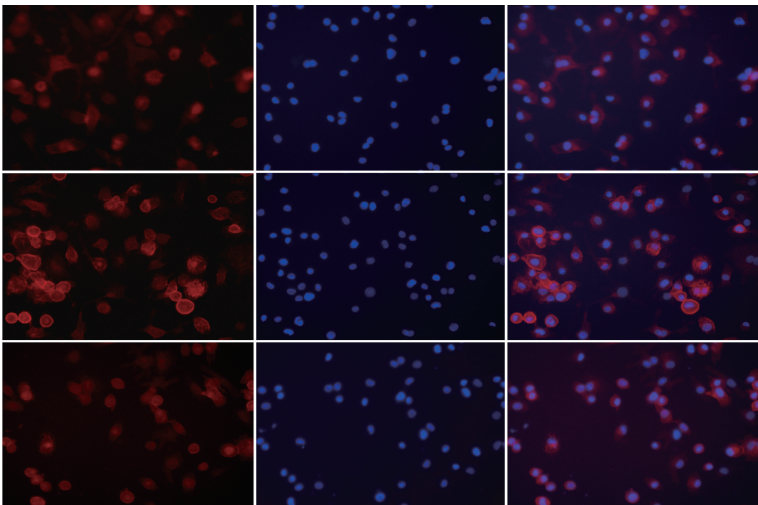


图2. 细胞免疫荧光检测 CD147 的表达(×200) 从左至右依次为 CD147、细胞核、CD147+细胞核,从上至下依次为对照组、500 μmol/L Hcy 组、 10^{-5} mol/L 瑞舒伐他汀组。
Figure 2. Cell immunofluorescence detection of CD147(×200)

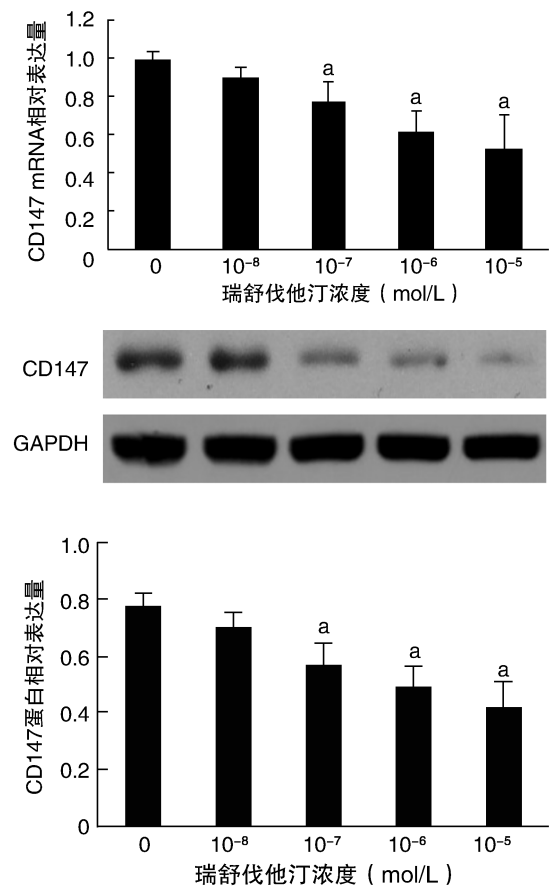


图 3. 瑞舒伐他汀对 CD147 mRNA 和蛋白表达的影响 ($n = 3$) 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 与不同浓度瑞舒伐他汀共同处理细胞 48 h。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 3. Effect of rosuvastatin on CD147 mRNA and protein expression induced by homocysteine in U-937 macrophages ($n = 3$)

3 讨论

Hcy 是蛋氨酸代谢过程中产生的一种含硫氨基酸,国内外多项研究表明,Hcy 是心血管疾病的一种危险因素^[2-3]。部分学者认为 Hcy 可能通过引起内皮细胞损伤、诱导平滑肌细胞增殖、增加血小板聚集、破坏凝血系统、促脂质过氧化等途径促进动脉粥样硬化病变的发生、发展^[9-10]。然而,目前关于 Hcy 致动脉粥样硬化的确切机制未完全明确。

众所周知,不稳定斑块破裂和血栓形成是急性冠状动脉综合征发生的主要病理生理学机制,其中,MMP 不仅在动脉粥样硬化的发生与发展中起重要作用,而且可通过降解纤维帽上的胶原而加速斑块破裂,进而促进急性冠状动脉综合征的发生^[11]。有研究报道心肌梗死患者血 Hcy 水平明显增高^[12-13],提示 Hcy 与心肌梗死有关。此外,国外多项细胞实验证实 Hcy 可引起血管平滑肌细胞、内皮细胞、小鼠 J774A 腹膜巨噬细胞表达 MMP 增

多^[4,14-15]。上述研究表明,Hcy 可能通过促进 MMP 分泌导致斑块不稳定,从而参与动脉粥样硬化斑块的发展过程。

CD147 分子是一种广泛表达于人体多种组织的跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,可以诱导多种细胞表达 MMP,包括 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 等^[16-17]。而 MMP 又可降解构成粥样斑块纤维帽的主要成分细胞外基质,从而加速斑块不稳定^[18]。近年我中心以高脂饮食饲养新西兰兔建立易损斑块模型并发现易损斑块中 CD147 表达丰富,是易损斑块的危险因素,其表达与易损斑块的存在呈正相关^[19]。另有研究表明急性心肌梗死患者外周血单核细胞上 CD147、MMP-9 表达较稳定型心绞痛患者明显增加,CD147 的表达上调,可相应增加单核细胞 MMP-9 活性,用 siRNA 将 CD147 基因沉默能阻止脂多糖诱导的单核细胞 MMP-9 的分泌^[20]。以上研究均表明 CD147 也通过诱导 MMP 的表达在动脉粥样硬化易损斑块的发生发展过程中发挥重要作用。

Hcy 是否通过上调 CD147 表达而参与动脉粥样硬化机制,目前相关报道甚少,本研究发现不同浓度 Hcy (0、50、100 及 500 $\mu\text{mol/L}$) 刺激人 U-937 巨噬细胞 48 h 后,Hcy 诱导 U-937 巨噬细胞 CD147 的表达增加,且呈剂量依赖关系。Winchester 等^[21]使用 Hcy 刺激小鼠 J774A.1 和 Raw264.7 巨噬细胞,Hcy 能诱导 CD147 表达增多,与本研究得出的结论一致。因此,Hcy 通过上调巨噬细胞 CD147 表达,可能促进细胞分泌 MMP 而导致纤维帽等细胞基质成分变薄,进而参与动脉粥样硬化的发生发展过程。

瑞舒伐他汀由于具有强大的降脂作用,作为一种新型降脂药物在临床上广泛应用,此外其在抑制炎症反应、改善血管内皮功能、稳定斑块等方面也发挥重要作用^[22-23],而关于瑞舒伐他汀抑制 Hcy 诱导的 CD147 表达,目前未见相关报道。本研究发现瑞舒伐他汀能抑制 Hcy 诱导的 CD147 mRNA 及蛋白表达,呈剂量依赖关系。因此,瑞舒伐他汀通过抑制 Hcy 诱导的 CD147 表达,从而可能进一步抑制 CD147 诱导的 MMP 分泌,延缓斑块纤维帽的降解,进而稳定斑块,减少急性心血管事件的发生。

综上所述,本研究发现 Hcy 诱导 U-937 来源的巨噬细胞 CD147 表达增多,进而可能引起 CD147 诱导的 MMP 分泌增多,加剧斑块内基质降解,可能是 Hcy 参与动脉粥样硬化发生发展的一种新的机制。瑞舒伐他汀能抑制 Hcy 诱导的 CD147 表达,从而能改善 Hcy 对斑块的损害,可能具有稳定斑块作用。

由于本研究采用 U-937 细胞系作为研究对象,与人体中分离的巨噬细胞相比,结果可能存在一定差距;此外,Hcy 调节巨噬细胞 CD147 表达的途径及瑞舒伐他汀抑制 CD147 信号通路等问题目前仍不清楚,尚需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Wu Y, Huang Y, Hu Y, et al. Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor in young patients with coronary artery disease in southern China[J]. Herz, 2013, 38(7): 779-784.
- [2] Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta analysis [J]. BMJ, 2002, 325(7374): 1 202-209.
- [3] Zylberstein DE, Bengtsson C, Bjorkelund C, et al. Serum homocysteine in relation to mortality and morbidity from coronary heart disease [J]. Circulation, 2004, 109(5): 601-606.
- [4] Joghetaei N, Stein A, Byrne RA, et al. The extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN, CD147)-a potential novel target in atherothrombosis prevention [J]. Thromb Res, 2013, 131(6): 474-480.
- [5] Lee SJ, Lee YS, Seo KW, et al. Homocysteine enhances MMP-9 production in murine macrophages via ERK and Akt signaling pathways [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 260(1): 89-94.
- [6] Munjal C, Tyagi N, Lominadze D, et al. Matrix metalloproteinase-9 in homocysteine-induced intestinal microvascular endothelial paracellular and transcellular permeability[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(4): 1 159-169.
- [7] Perretti M, Wheller SK, Harris JG, et al. Modulation of ICAM-1 levels on U-937 cells and mouse macrophages by interleukin-1 beta and dexamethasone [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 223(1): 112-117.
- [8] Solito E, Raugei G, Melli M, et al. Dexamethasone induces the expression of the mRNA of lipocortin 1 and 2 and the release of lipocortin 1 and 5 in differentiated, but not undifferentiated U-937 cells [J]. FEBS Lett, 1991, 291(2): 238-244.
- [9] Welch GN, Loscalzon J. Homocysteine and atherothrombosis [J]. New Eng J Med, 1998, 338(15): 1 042-050.
- [10] McCully KS. Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2015, 8(2): 211-219.
- [11] Kampoli AM, Tousoulis D, Papageorgiou N, et al. Matrix metalloproteinases in acute coronary syndromes: current perspectives[J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12(10): 1 192-205.
- [12] Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians[J]. JAMA, 1992, 268(7): 881-887.
- [13] Akyurek O, Akbal E, Gunes, et al. Increase in the risk of ST elevation myocardial infarction is associated with homocysteine level[J]. Arch Me Res, 2014, 45(6): 501-506.
- [14] Doronzo G, Russo I, Mattiello L, et al. Homocysteine rapidly increases matrix metalloproteinase-2 expression and activity in cultured human vascular smooth muscle cell[J]. Thromb Haemost, 2005, 94(6): 1 285-293.
- [15] Moshal KS, Sen U, Tyagi N, et al. Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 290(3): C883-C891.
- [16] Orbe J, Fernandez L, Rodriguez JA, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions relation to plaque features and vascular bed[J]. Atherosclerosis, 2003, 170(2): 269-276.
- [17] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques[J]. J Clin Invest, 1994, 94(6): 2 493-503.
- [18] Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2001, 104(3): 365-372.
- [19] 张雁斌, 杜大勇, 李运田, 等. CyPA 与 CD147 在兔动脉粥样硬化易损斑块中的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(5): 495-499.
- [20] Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells implications in acute myocardial infarction [J]. Circulation, 2006, 113(6): 834-841.
- [21] Winchester LJ, Veeranki S, Givvimani S, et al. Homocysteine elicits an M1 phenotype in murine macrophages through an EMMPRIN-mediated pathway [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(7): 577-584.
- [22] Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial [J]. JAMA, 2006, 295(13): 1 556-565.
- [23] Preusch MR, Vannkaris A, Picard MH, et al. Rosuvastatin reduces neointima formation in a rat model of ballom injury [J]. Eur J Med Res, 2010, 15(6): 461-467.

(此文编辑 文玉珊)