

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0568-03

粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对人内皮细胞 基质金属蛋白酶分泌及活性的影响

于 滢, 杨向红

(中国医科大学实验病理学教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学; 炎症因子对内皮细胞基质金属蛋白酶的影响; 蛋白印迹法; 基质金属蛋白酶; 内皮细胞; 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对人内皮细胞基质金属蛋白酶分泌及活性的影响, 体外培养人脐静脉内皮细胞, 分别应用蛋白印迹法和酶谱法检测基质金属蛋白酶 2 的含量和活性。结果发现, 与对照组相比, 不同浓度(5、25 和 50 $\mu\text{g/L}$) 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子可使人内皮细胞基质金属蛋白酶 2 的蛋白表达和活性增强, 且随粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子剂量增加而增强。提示粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子可通过刺激人内皮细胞基质金属蛋白酶 2 蛋白的表达, 并增强其活性, 促进内皮细胞对细胞外基质的降解, 从而易于动脉粥样硬化斑块内炎性细胞的渗入, 内皮细胞的迁移及新血管的形成, 从而对斑块的稳定性产生影响。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Granular Macrophage Colony Stimulating Factor on the Expression and Activity of Matrix Metalloproteinases in Human Endothelial Cells

YU Ying, and YANG Xiang-Hong

(Department of Pathology, College of Basic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase; Endothelial Cell; Granular Macrophage Colony Stimulating Factor; Atherosclerosis; Vulnerable Plaque; Western Blot; Zymography

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of granular-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on the expression and activity of matrix metalloproteinases (MMP). **Methods** Human endothelial cells were cultured in vitro and the protein expressions of MMP-2 were detected by Western blot. MMP-2' activity was detected by Zymography. **Results** The results revealed that the protein expression and activity of MMP-2 were significantly increased after endothelial cells were stimulated by GM-CSF. And the protein expression and activity of MMP-2 were in a dose-dependent and time-dependent manner. **Conclusions** The results indicate that GM-CSF can obviously increase the protein expression and activity of MMP-2 in human endothelial cells. So GM-CSF could enhance the breakdown of matrix in lesions of atherosclerosis which could probably induce vulnerable plaque.

急性心肌梗死等急性冠状动脉综合征多是由于动脉粥样硬化斑块的不稳定性破裂引起, 而动脉粥样硬化斑块内基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)合成增多和/或基质金属蛋白酶抑制物的减少, 是造成动脉粥样硬化斑块稳定性下降的主要机制之一^[1]。随着动脉粥样硬化炎症学说的提出, 炎症因子在斑块中的作用逐渐引起人们的关注。研究表明, 多种炎症因子可以促进斑块内基质金属蛋白酶的分泌, 如白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 等^[2-4], 而关于粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子(granular macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)

对 MMP 表达和活性影响的研究较少。因此, 本实验通过观察 GM-CSF 对体外培养的人血管内皮细胞 MMP-2 表达和活性的影响, 探讨炎症因子 GM-CSF 与动脉粥样硬化斑块形成和稳定性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

健康新生儿脐带; DMEM 培养基(Gibco 公司); 胰蛋白酶(华美生物工程公司); 胎牛血清(天津生物化学制品厂); GM-CSF(北京宝赛生物技术有限公司); 羊抗人 MMP-2 一抗(Santa Cruz 公司); 碱性磷酸酶标记鼠抗羊二抗(Santa Cruz 公司); 显色剂 O-dianisidine, tetrazotized 与 β -naphthyl acid phosphate(Sigma 公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

[收稿日期] 2003-12-22 [修回日期] 2004-04-21

[作者简介] 于滢, 硕士研究生。杨向红, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化和高血压等心血管疾病发病机制和防治的研究。

采用本实验室改进的 Jaffe 氏培养法。取新鲜的健康新生儿脐带, PBS 冲洗干净, 0.25% 胰蛋白酶消化 (37℃, 4 min), 收集消化液, 离心后弃上清, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液, 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞数种植于培养板内, 隔日换液。经免疫荧光检测第 (II) 因子相关抗原阳性, 鉴定为血管内皮细胞。待细胞生长达亚汇合状态后, 加入不同浓度 (0、5、25 和 50 $\mu\text{g/L}$) 的 GM-CSF, 培养 24 h; 用相同浓度 GM-CSF (50 $\mu\text{g/L}$) 分别作用不同时间 (0、6、12 和 24 h), 收集培养细胞上清液, 离心去除细胞碎屑待用。

1.3 基质金属蛋白酶活性的测定

采用酶谱法。按文献[5]所报道的方法用含明胶的 SDS-PAGE 检测 MMP-2 活性。分离胶浓度为 8% (含 0.2% 明胶), 浓缩胶浓度为 5%。取不同条件刺激的细胞培养基与上样缓冲液以 1:1 的比例混合后, 取 25 μL 不经煮沸直接上样, 4℃、120 V 恒压电泳 2~2.5 h, 凝胶经 2.5% TritonX-100 漂洗两次后, 加入反应缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl_2 , 1% TritonX-100), 37℃ 孵育 18 h, 0.5% Coomassie Blue R-250 染色, 脱色液 (10% 乙酸-40% 甲醇) 中脱色至蓝色背景下白色条带清晰可见。

1.4 基质金属蛋白酶蛋白表达检测

采用 Western blot 方法。首先用 SDS-PAGE 电泳分离样品蛋白质, 转移缓冲液在 70 mA、40 V 条件下电泳 2 h 后转移到硝酸纤维素膜上, 4℃ 封闭过夜, 与羊抗人 MMP-2 抗体及碱性磷酸酶标记的鼠抗羊二抗室温反应 1~2 h, 利用 Gdianisidine 、tetrazotized 与 β -naphthyl acid phosphate 对反应产物进行检测。

用 Metamorph 显微图像分析系统对 Western blot 及明胶酶谱实验结果进行扫描分析。

2 结果

2.1 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对人内皮细胞基质金属蛋白酶 2 活性的影响

用含明胶 SDS-PAGE 对 MMP-2 活性进行检测的结果发现, 不同浓度的 GM-CSF (5、25 和 50 $\mu\text{g/L}$) 作用 24 h 后, 细胞培养基中 MMP-2 活性要高于对照组, 且呈剂量依赖效应 (图 1A, Figure 1A), 和对照组相比, 其活性分别为对照组的 3.32、5.14 和 8.13 倍 ($P < 0.05$)。而相同浓度的 GM-CSF 以不同的时间 (6、12 和 24 h) 作用于人脐静脉内皮细胞后, 随着时间的延长 MMP-2 的活性亦增强, 呈时间依赖效应

(图 1B, Figure 1B), 和对照组相比, 其活性分别为对照组的 3.05、4.44 和 7.42 倍 ($P < 0.05$)。

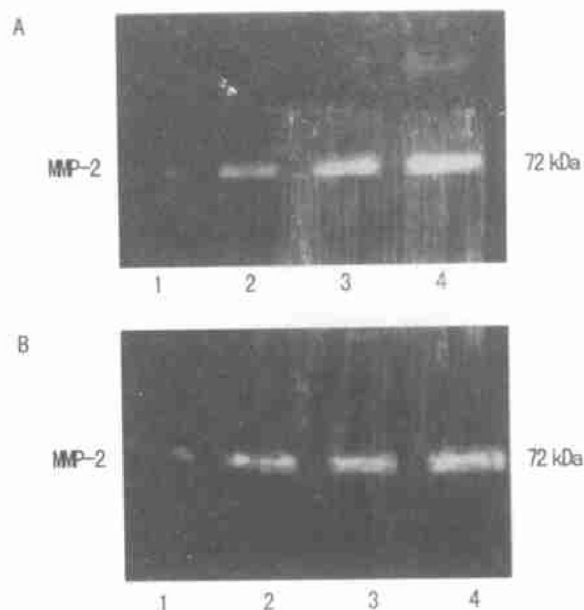


图 1. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对人血管内皮细胞基质金属蛋白酶 2 活性的影响 A 图: 1 为对照组, 2 为 5 $\mu\text{g/L}$ GM-CSF 组, 3 为 25 $\mu\text{g/L}$ GM-CSF 组, 4 为 50 $\mu\text{g/L}$ GM-CSF 组; B 图: 1 为对照组, 2 为 GM-CSF 作用 6 h 组, 3 为 GM-CSF 作用 12 h 组, 4 为 GM-CSF 作用 24 h 组。

Figure 1. Effect of GM-CSF on the activity of matrix metalloproteinase-2 in human umbilical vein endothelial cells

2.2 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对人内皮细胞基质金属蛋白酶 2 蛋白表达的影响

Western blot 分析发现, 人脐静脉内皮细胞经不同浓度的 GM-CSF (5、25 和 50 $\mu\text{g/L}$) 作用 24 h 后, 细胞培养基中 MMP-2 含量高于对照组, 并且呈剂量依赖效应。和对照组相比, 其含量分别为对照组的 1.95、3.66 和 5.34 倍 ($P < 0.05$) (图 2A, Figure 2A)。相同浓度的 GM-CSF (50 $\mu\text{g/L}$) 以不同时间作用于人脐静脉内皮细胞后, 随着作用时间的延长, MMP-2 蛋白分泌量随之增加, 呈时间依赖效应 (图 2B, Figure 2B), 和对照组相比, 其含量分别为对照组的 2.75、4.21 和 5.38 倍 ($P < 0.05$)。根据 MMP-2 分子量, 本实验检测到的 MMP-2 是其酶原形式。

3 讨论

基质金属蛋白酶是一族锌离子依赖性内肽酶家族, 能广谱降解多种胶原。该家族主要包括间质胶原酶、间质溶素、明胶酶和膜型金属蛋白酶等, 它们以酶原的形式由多种细胞合成和分泌, 如单核细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞及成纤维细胞

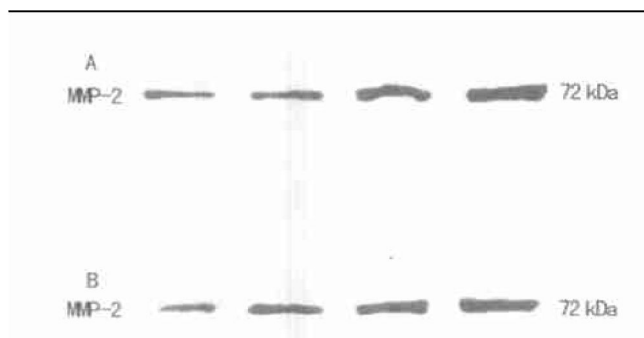


图2. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对人血管内皮细胞基质金属蛋白酶2蛋白表达的影响 A: 1为对照组, 2为5 µg/L GM-CSF组, 3为25 µg/L GM-CSF组, 4为50 µg/L GM-CSF组; B: 1为对照组, 2为GM-CSF作用6 h组, 3为GM-CSF作用12 h, 4为GM-CSF作用24 h。

Figure 2. Effect of GM-CSF on the expression of matrix metalloproteinase-2 in human umbilical vein endothelial cells

等^[6,7]。明胶酶A即MMP-2,是血管壁细胞表达和分泌的最主要的基质金属蛋白酶,主要降解明胶、多种胶原和基底膜成分,一旦被激活,即可降解细胞外基质成分。研究表明,人动脉粥样硬化斑块中尤其是斑块肩区、脂质核心边缘和微血管形成区,以及血管平滑肌细胞内MMP,包括MMP-1、MMP-2、MMP-9和MMP-3活性均有增高^[8-11],而组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)TIMP-1和TIMP-2等表达减少。因而推测上述区域MMP可能参与纤维帽的降解并促进新生血管的形成。

冠状动脉粥样硬化的斑块破裂及血栓形成是绝大多数急性冠脉综合症的病变基础。动脉粥样硬化斑块与正常内膜交界处(即肩部)是最易发生破裂处,而此处具有纤维帽最薄,炎细胞浸润增加,并且新生小血管增加等特征。近来的研究认为,斑块中新生小血管通过上调细胞粘附分子表达,促使更多的炎细胞聚集于病变的内膜,通过分泌炎症因子,激活巨噬细胞和平滑肌细胞等并使其生成基质金属蛋白酶增加,从而降解基质,削弱纤维帽,导致斑块不稳定,从而引发一系列严重的临床后果^[12,13]。

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子作为一种炎症因子,可由斑块处的巨噬细胞和内皮细胞所分泌,本

实验体外培养人血管内皮细胞,观察GM-CSF对内皮细胞基质金属蛋白酶-2的分泌及活性的影响。结果发现,随着GM-CSF浓度的逐渐增高和作用时间的延长,基质金属蛋白酶-2的分泌及酶活性随之增强。提示GM-CSF可通过增强MMP活性,促进动脉粥样硬化斑块局部细胞外基质成分的降解。MMP通过降解基质,一方面可促进血液中单核细胞和中膜平滑肌细胞向内膜迁移,促进动脉粥样硬化病变的进展,更重要的是,可促进斑块纤维帽的降解和大量新生小血管的形成,使斑块处于不稳定状态,增加急性冠脉综合征发生的可能性。

[参考文献]

- [1] Zaman AG, Helft G, Worthy SG, et al. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2000, **149** (2): 251-266
- [2] Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Cytokine stimulate human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extra cellular matrix digestion. *Circ Res*, 1994, **75** (1): 181-189
- [3] Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-KDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*, 1996, **157** (9): 4159-165
- [4] Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin and tissue factor. *Circulation*, 1997, **96** (2): 396-399
- [5] Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72kDa progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Biol Chem*, 1989, **264**: 1860-1869
- [6] 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 Clin Invest*, 1994, **94** (6): 2493-503
- [7] Galis ZS, Sukhova GK, Libby P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J*, 1995, **9** (10): 974-980
- [8] Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, et al. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (8): 1070-1073
- [9] 周秀霞, 温进坤, 韩梅. 白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 对血管平滑肌细胞及基质金属蛋白酶2骨桥蛋白基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 292-295
- [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. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 10-13
- [11] 李飞雪, 黄体钢, 周丽娟. 活性淋巴细胞诱导人血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 300-303
- [12] de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, et al. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (2): 443-449
- [13] Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126

(此文编辑 朱雯霞)