

阿斯匹林对 THP-1 来源巨噬细胞 MMP9 的表达及其活性的影响

鲁立* 彭家和* 甘淋 申丽丽 江渝

(第三军医大学生物化学和分子生物学教研室 重庆 400038)

摘要 目的:探讨阿司匹林对基质金属蛋白酶 9(Matrix Metalloproteinases, MMPs)表达及其活性的影响。**方法:**应用 MTT 法观察阿司匹林对 THP-1 来源巨噬细胞增殖的影响;逆转录聚合酶链反应检测阿司匹林对体外培养的 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的影响,应用明胶酶谱法观察阿司匹林对体外培养的 THP-1 来源巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响。**结果:**与对照组相比,不同浓度的阿司匹林(150、3000、600、1200 $\mu\text{mol/l}$)对 THP-1 来源巨噬细胞增殖无影响;不同浓度的阿司匹林可以抑制 PMA 诱导的 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 的水平及其活性水平,且呈浓度依赖性。**结论:**阿司匹林可以抑制 PMA 诱导的 THP-1 巨噬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稳定性。

关键词:阿司匹林;基质金属蛋白酶;THP-1 细胞

中图分类号:R 543.1+2 **文献标志码:**A

Effects of Aspirin on the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) and Its Activity in THP-1 Macrophage Cultured in Vitro

LU Li, PENG Jia-he, GAN Lin, SHEN Li-li, JIANG Yu

(Department of Biochemistry and Molecule Biology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of aspirin on the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its activity in THP-1 macrophage cultured in vitro. **Methods:** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the effect of Aspirin on expression of MMP9 mRNA in cultured macrophage based on THP-1. Gelatin zymogram analysis was used to detect the effect of Aspirin on activity of MMP9 in cultured macrophage cells based on THP-1. **Results:** Compared to the control group, different concentration of Aspirin (150,300,600,1200 $\mu\text{mol/l}$) had no effect on the proliferation of macrophage based on THP1, RT-PCR showed that different concentration (150,300,600,1200 $\mu\text{mol/l}$) of Aspirin can inhibit the expression level of matrix metalloproteinases 9 mRNA induced by PMA and its activity; moreover,with concentration dependence. **Conclusion:** Aspirin can inhibit the expression of matrix metalloproteinases9 in THP-1 macrophage induced by PMA, and perhaps affects the stability of atherosclerosis plaques.

Key words: Aspirin; Matrix metalloproteinases; MMP9; THP-1 cell

前言

研究显示,炎症与免疫在动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)的发生发展中起重要作用^[1],炎症因子贯穿动脉粥样硬化的发生发展乃至斑块破裂的全过程^[2],在粥样斑块内巨噬细胞、T-淋巴细胞等炎症细胞表达 CD40 和 CD40L,相互作用可产生一系列免疫炎症反应,包括促进黏附分子,细胞因子如基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMP)等物质,促进 AS 的慢性炎症过程,最终导致斑块的破裂,引起一系列临床症状^[3,4]。基质金属蛋白酶是由炎症细胞分泌的一组酶,可以降解纤维帽中的胶原,使纤维帽变薄,斑块不稳定性增加,易于破裂。因此,抑制基质金属蛋白酶的分泌和活性在维持粥样斑块稳定性中十分重要。阿司匹林是一类非甾体类的抗炎药,通过抑制血小板的环氧化酶,减少前列腺素的生成,从而抑制血小板聚集和阻止血栓形成,近来发现它与斑块稳定性有一定关系^[5]。本研究通过研究阿司匹林对 THP-1 来源巨噬细胞 MMP-9 的表达及其活性的影响,探讨其与动脉粥样斑块稳定性的关系。

作者简介:鲁立,(1979-),男,在读硕士,E-mail:yqluli@163.com;

通讯作者:江渝,(1961-),男,教授,硕士生导师,

tel:023-68752261

研究方向:动脉粥样硬化的发生的分子机制

*鲁立,彭家和,同为第一作者,对本文皆有同等贡献

(收稿日期 2006-09-23 接受日期 2006-10-21)

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

THP-1 人单核细胞由第三军医大学生物化学和分子生物学教研室提供;逆转录反应试剂为美国 Promega 公司产品,多聚酶链反应试剂为 Takara 公司产品;新生小牛血清购自成都哈里生物制品厂、阿司匹林(Aspirin)、佛波酯(Phorbol myristate acetate, PMA)为 Sigma 公司产品;总 RNA 提取试剂 Tripure, MMP-9 和 actin (作为内参)引物均由上海生物工程公司提供, MMP-9 检测试剂盒购自北京普利莱公司,其他试剂均为进口或者国产分析纯。

1.2 细胞培养

人单核细胞系 THP-1 由第三军医大学生物化学和分子生物学教研室提供, THP-1 细胞株用 RPMI1640 培养液培养,其中含 10% 的新生小牛血清。2~3 天换液一次,在每次实验前用 200nmol/L 佛波酯孵育 48 小时左右,使其诱导分化成巨噬细胞,然后将贴壁细胞用 PBS 冲洗后,接种于 6 孔板,每孔细胞 107 左右,培养液为 3mL 左右,逐孔加入浓度 150、300、600、1200 $\mu\text{mol/L}$ 的阿司匹林,每种浓度三孔,培养 24 小时检测 MMP-9 的表达水平;培养贴壁细胞接种于 24 孔板,每孔细胞 106 左右,逐孔加入浓度为 150、300、600、1200 $\mu\text{mol/L}$ 的阿司匹林,每种浓度三孔,收集上清液, -20℃ 冻存。

1.3 细胞增殖功能实验(MTT)

将诱导分化的 THP-1 巨噬细胞加入 96 孔板, 每孔接种 1.0×10^4 个细胞左右, 体积为 $100 \mu\text{L}$, 然后分别加入不同剂量的阿司匹林, 每个剂量重复三个复孔, 每孔最后均用培养基补充为 $200 \mu\text{L}$, 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度条件下培养, 36h 后, 每孔加入 5g/L 的 MTT $20 \mu\text{L}$ 继续培养 4h, 将培养板离心, 1000rpm , 弃上清, 每个孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, 振荡使紫色结晶溶解, 10min 后与酶链检测仪检测各孔 A490 值。

1.4 逆转录-聚合酶链反应

1.4.1 总 RNA 提取

采用 Tripure 一步提取法(按 Roche 公司说明书)

1.4.2 逆转录合成 cDNA

$5 \times$ 逆转录缓冲液(含 50mM MgCl_2) $5 \mu\text{L}$, 10mM dNTP $1 \mu\text{L}$, 30U/L RNA 酶抑制剂 $1 \mu\text{L}$, Random Primer $1 \mu\text{L}$, $1\text{ug}/\mu\text{L RNA}$ $2 \mu\text{L}$, 上述反应物混匀, 室温 25°C 放置 10 min 后, 加入 $10\text{U}/\mu\text{L AMV}$ $1 \mu\text{L}$, 补充去离子水至 $25 \mu\text{L}$, 42°C 孵育 1 h, 95°C 5min 灭活 AMV, 中止反应, 所得 cDNA 置于 -20°C 用于后续反应。

1.4.3 聚合酶链反应扩增

β -actin, MMP-9 反应总体系为 $50 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$, Ex-Taq 酶 ($5\text{U}/\mu\text{L}$) $0.5 \mu\text{L}$, $10 \times$ 缓冲液 $5 \mu\text{L}$, MgCl_2 (25mM) $3 \mu\text{L}$, dNTP (10mM) $1 \mu\text{L}$, 上下游引物(25uM)各 $1 \mu\text{L}$, 补充无菌离子水至 $50 \mu\text{L}$ 体积作为对照, β -actin 反应条件为: 预变性 94°C 10min, 94°C 45s, 55°C 45s, 72°C 45s, 30 个循环, 72°C 5min, 4°C 保存。MMP-9 的反应条件为预变性 94°C 10min, 94°C 45s, 58°C 45s, 72°C 45s, 35 个循环, 72°C 5min, 4°C 保存。MMP-9 的引物正义: $5'$ -CTACCACCTCGAAGCTTTGACAGC- $3'$, 反义: $5'$ -CTTCCCATCCTTGAA CAAATA CAG- $3'$, PCR 扩增片断为 494bp, 引物由北京赛百盛 SBC genetech 公司合成。 β -actin 引物正义: $5'$ -CATCTCTTGCTCGAAGTCCA- $3'$, 反义: $5'$ -ATCATGTTT GAGACCTTCAA CA- $3'$, PCR 扩增片断长为 308 bp, 引物为上海英骏生物技术公司合成, 选 β -actin 为半定量内对照, 扩增片断分别为 308bp。PCR 产物点样于 1.0% 琼脂糖凝胶上, EB 染色, 应用 Bio-Rad 凝胶成像仪, 将电泳结果进行灰度扫描, 将表达量化。

1.5 明胶-聚丙烯酰胺凝胶酶谱法测 MMP-9 活性

按 MMP-9 检测试剂盒说明方法, 以 Bio-Rad 电泳仪进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 按常规方法灌制 8% 分离胶和 5% 浓缩胶, 但分离胶中含有 明胶作为底物。取 $10 \mu\text{L}$ 培养基上清液样本与等体积的 $2 \times$ 上样缓冲液 (0.5mol/L Tris-HCL PH 6.8, 20% 甘油, 0.1% 溴酚蓝) 混合, 室温放置 30min, 上样, 将电泳仪器接通电源, 电流 20mA 电泳约 90min, 溴酚蓝到达底线, 停止电泳, 小心将胶剥离, 浸泡于 Buffer A 中 15min, 更换液体一次, 然后将胶浸泡于底物缓冲液 Buffer B (50mmol/L Tris-HCL , PH 8.0, 2mol/L NaCl , 5mmol/L CaCl_2) 中, 37°C 过夜。次日将底物缓冲液弃去, 以 0.5% 考马斯亮蓝染色 20min, 经脱色液 (40% 蒸馏水, 10% 冰乙酸, 50% 甲醇) 振荡脱色 30min, 中间更换脱色液一次至到凝胶蓝色背景上出现白色条带, 以 Quantity 软件对条带的灰度进行分析。

1.6 统计学处理

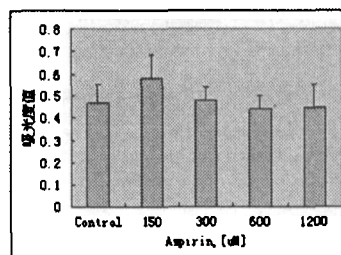
以空白对照条带的灰度值为 1, 试验组数据与对照组数据相比取值。所有数据以表示。以 SPSS10.0 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结论

2.1 阿司匹林对培养 THP-1 来源巨噬细胞的增殖影响

THP-1 来源巨噬细胞培养 24 小时后, 与对照组比较, 经不同浓度的阿司匹林刺激后的实验组, 其 A490 值变化不明显。将所测 A490 值分别进行统计学分析, 结果表明不同浓度的阿司匹林对 THP-1 来源巨噬细胞的增殖能力之间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 同时结果显示: 在设定浓度为 600uM 时, 阿司匹林刺激巨噬细胞不同时间对其增殖能力也没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

A



B

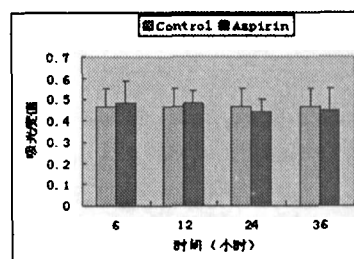


图 1 A 图 不同浓度阿司匹林对 THP-1 来源巨噬细胞增殖作用
B 图 在阿司匹林浓度为 $600 \mu\text{M}$ 时, 作用 6, 12, 24, 36 小时后对其增殖能力的影响

Fig.1 A: The proliferation effects of different concentration aspirin on macrophage based on THP-1; B: The proliferation effects of $600 \mu\text{M}$ aspirin after 6, 12, 24, 36 hours.

2.2 阿司匹林对 THP-1 来源巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 的影响

THP-1 诱导分化成巨噬细胞后, 分别加入不同浓度的阿司匹林 ($150, 300, 600, 1200 \text{uM}$), 37°C 培养 24 小时, 提取总 RNA, 进行逆转录聚合酶链反应后检测, 结果发现, MMP9 表达水平呈浓度依赖型的下降。

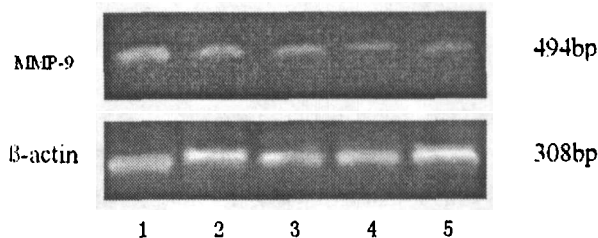


图 2 THP-1 巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的逆转录聚合酶链反应分析

1 为对照组; 2 为 Aspirin 150uM /l 组; 3 为 Aspirin 300uM /l 组; 4 为 Aspirin 600uM /l 组; 5 为 Aspirin 1200uM /l 组

Fig.2 The MMP-9 mRNA analysis of macrophage based on THP-1: 1, control group; 2, 150uM aspirin group; 3, 300uM aspirin group; 4, 600uM aspirin group; 5, 1200uM aspirin group.

2.3 不同时间 THP-1 来源巨噬细胞培养上清液中基质金属蛋白酶 9 活性测定

以未加 Aspirin 组 THP-1 来源巨噬细胞培养 24, 48 以及

72h 的上清液为样本,经染色及脱色后,在蓝色的凝胶背景上可见在 92kDa 的位置明胶发生降解,经 BIO-RAD 图像分析系统测定,以 24h 条带的灰度值为 1,48h 和 72h 条带的相对灰度值为 0.78,0.58。结果显示,培养 24h 收集的 THP-1 巨噬细胞上清液中 MMP9 活性高于 48h 和 72h。

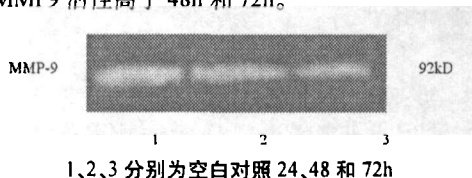


图 3 不同时间巨噬细胞培养上清液中 MMP9 的活性测定

Fig.3 The determination of MMP9 activity in culture supernatant fluid:

1,2,3 presents control group at 24,48,72 respectively.

2.4 阿司匹林对培养 THP-1 来源巨噬细胞培养上清液中基质金属蛋白酶活性的影响

为确定不同浓度的 Aspirin 对 MMP-9 活性的影响,用无血清 1640 培养液培养 THP-1 来源的巨噬细胞,分别加入不同浓度的阿司匹林 (150、300、600、1200 $\mu\text{mol/l}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 小时。上清液可在 92kDa 的位置使明胶发生降解,但与对照组相比,阿司匹林处理组活性分别为对照组的 0.89、0.79、0.67、0.59 倍,表明阿司匹林对上清液当中的基质金属蛋白酶 9 的活性有抑制作用。

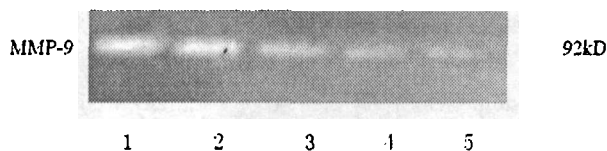


图 4 THP-1 来源巨噬细胞上清液中基质金属蛋白酶 9 的明胶酶图分析

1 为对照组;2 为 Aspirin 150 $\mu\text{mol/l}$ 组;3 为 Aspirin 300 $\mu\text{mol/l}$ 组;
4 为 Aspirin 600 $\mu\text{mol/l}$ 组;5 为 Aspirin 1200 $\mu\text{mol/l}$ 组

Fig.4 Gelatin zymography analysis of matrix metalloproteinase9 in culture supernatant fluid of macrophage based on THP-1: 1, control group; 2.150 μm aspirin group; 3.300 μm aspirin group; 4. 600 μm aspirin group; 5. 1200 μm aspirin group.

3 讨论

急性冠状动脉综合征是一系列危及患者生命的临床急症,它最主要的发病机制是粥样硬化斑块由稳定转为不稳定,继而破裂导致血栓形成。粥样斑块有一个纤维帽所覆盖,纤维帽是由大量的平滑肌细胞及其所产生的胶原纤维、弹性纤维及蛋白聚糖构成,深部为粥样物质,其中不稳定斑块多为偏心性斑块,纤维帽很薄,尤其在偏心性纤维帽的边缘(也称肩部),可见大量炎性细胞(包括巨噬细胞、淋巴细胞及肥大细胞)浸润,斑块内细胞外基质降解增加及合成不足是纤维帽变薄,是斑块稳定性降低的主要原因。

MMPs 是一类对细胞外基质具有降解活性蛋白酶超家族,其中 MMP-9 与 AS 斑块的不稳定型尤为相关,MMP-9 又称 92 kDa 明胶酶或者明胶酶 B,是巨噬细胞分泌的主要 MMP-9,并被认为是巨噬细胞激活的主要标志之一。研究发现^[6-8],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的单核/巨噬细胞^[9]。

本研究发现,当不同浓度的阿司匹林作用于 THP-1 来源的巨噬细胞的后,没有引起细胞增殖,且不同浓度之间没有显

著性差异($P>0.05$),与此同时,观察 600 μM 阿司匹林作用不同的时间后,发现其对细胞的增殖作用与时间无关,结果表明,阿司匹林不是通过直接引起动脉粥样硬化斑块处巨噬细胞的死亡或增殖来发挥调节作用,可能是通过调节巨噬细胞分泌的细胞因子来发挥作用的。

文献报道^[10]人动脉粥样硬化斑块的去稳定与 MMP-9 的持续表达有一定关系,巨噬细胞移动抑制因子诱导 MMP9 的表达,从而使斑块变得不稳定。本实验发现,阿司匹林通过抑制 MMP9 mRNA 的表达,且呈剂量依赖型,同时用明胶酶谱观察了分泌到上清液中 MMP9 的活性水平,发现其活性也相对下降,且呈剂量依赖型,当达到一定剂量后,趋于稳定,与文献报道一致。阿司匹林作为一种非甾体类的抗炎药,可能通过抑制 COX-2 的活性,从而降低 PGE2 的水平,使其与受体蛋白结合量降低,间接抑制胞内 NF-KB 与 MMP-9 上游 NF-KB 结合位点的结合,从而抑制其表达水平^[11]。

总之,阿司匹林作不仅抑制是抑制各种炎症分子的表达,在动脉粥样硬化斑块的稳定方面也发挥着一定的作用,进一步研究可观察动脉粥样硬化的动物模型,直接观察其在体内斑块的稳定性方面的作用,这将其预防动脉粥样硬化的机理提供理论基础。

参考文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease [J]. N Eng J Med, 1999, 340(2): 115-126
- [2] Anna Abou-Raya and Suzan Abou-Raya. Inflammation: A pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis [J]. Autoimmunity Reviews, 2006, 5(5): 331-337
- [3] Mach F, Schonbeck U, Sukhova G, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cell, and macrophage: Implication for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94(5): 1931-936
- [4] Jessica A. Manuel and Barbara Gawronska-Kozak. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. Matrix Biology[J]. In Press, Accepted Manuscript
- [5] Tillmann Cyrus, Yuemang Yao, Liun X, et al. Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin[J]. Athero-Sclerosis, 2006 184(1): 8-14
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 于澄,杨向红. 粒细胞 2 巨噬细胞集落刺激因子对入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
- [9] 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
- [10] Yao Zhong, Xiyong Yu, Jia Ju Tang, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implication for destabilization of human atherosclerotic plaques [J]. Atherosclerosis, 2005,178:207-215
- [11] over-expression of COX-2, Prostaglandin E, Synthase-1 and Prostaglandin E Receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: Regulation by nuclear factor-Kb[J]. Atherosclerosis, 2006, 187: 139-149