

· 论 著 ·

CD40 配体通过诱导型环氧合酶途径诱导单核巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶

樊 民¹, 李 岚², 吴宗贵^{1*}, 黄 佐¹, 任雨笙¹, 潘晓明¹

(1. 第二军医大学长征医院心内科, 上海 200003; 2. 中国人民解放军第 411 医院内 4 科, 上海 200081)

[摘要] **目的:**观察重组人 CD40 配体(rhCD40L)对 U937 细胞分泌基质金属蛋白酶(MMPs)的影响,探讨其可能的作用机制。**方法:**不同浓度(0.1、0.2、0.4 μg/ml)的 rhCD40L 和不同浓度(10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L)的 NS-398(COX-2 特异性抑制剂)分别刺激体外培养的 U937 细胞 24 h 后收集上清液;在加入终浓度为 0.4 μg/ml rhCD40L 的基础上,分别加入终浓度为 10^{-4} mol/L 的阿司匹林(COX-1 抑制剂)或 NS-398,共同刺激 U937 细胞 24 h 后收集上清液。酶谱法测定上述 U937 细胞培养上清中 MMPs 活性。**结果:**rhCD40L 可使 MMP-2 和 MMP-9 活性增加($P<0.01$),且随浓度的增加而逐渐增强,0.4 μg/ml rhCD40L 作用最强;NS-398 可抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性,且抑制作用随剂量的增加而增强($P<0.05$)。NS-398、阿司匹林均可抑制 rhCD40L 诱导 U937 细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9($P<0.01$),NS-398 的抑制作用强于阿司匹林($P<0.05$)。**结论:**rhCD40L 以浓度依赖的方式诱导单核巨噬细胞分泌 MMPs,这种诱导作用可能与诱导型环氧合酶(COX)有关,而且与 COX-2 的相关性可能较 COX-1 更密切。

[关键词] CD40 配体;诱导型环氧合酶;基质金属蛋白酶;巨噬细胞

[中图分类号] R 543.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0845-03

rhCD40L induces mononuclear macrophages secreting matrix metalloproteinases through cyclooxygenase-2 pathway

FAN Min¹, LI Lan², WU Zong-gui^{1*}, HUANG Zuo¹, REN Yu-sheng¹, PAN Xiao-ming¹(1. Department of Cardiovasology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. The Fourth Medical Department, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the influence of rhCD40L on mononuclear macrophage, U937 cells, secreting matrix metalloproteinases (MMPs) and its possible mechanism. **Methods:** U937 cells were treated with different concentrations of rhCD40L and NS-398 (specific antagonist of COX-2) for 24 h and the supernatants were harvested. Cells treated with 0.4 μg/ml rhCD40L were further treated with 10^{-4} mol/L NS-398 or aspirin separately for 24 h and the supernatants were harvested. Zymography was used to determine the activities of MMPs in the above supernatants. **Results:** rhCD40L increase the activity of MMP-2 and MMP-9 in a dose-dependent manner ($P<0.01$); the increased peaked when rhCD40L was at 0.4 μg/ml. NS-398 inhibited the activity of MMP-2 and MMP-9 in a dose-dependent manner ($P<0.05$). NS-398 and aspirin both significantly inhibited the activity of MMP-2 and MMP-9 induced by rhCD40L ($P<0.05$). **Conclusion:** rhCD40L can induce U937 cells to secrete MMPs in a dose dependent manner, which might be related to COX, more possibly through COX-2 than COX-1 pathway.

[KEY WORDS] CD40 ligand; cyclooxygenase-2; matrix metalloproteinases; macrophages

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 845-847]

动脉粥样硬化(AS)后期,斑块不稳定性增加,影响粥样斑块稳定性的因素有很多。单核巨噬细胞分泌的 MMPs 能够降解纤维帽中的胶原成分,使纤维帽变薄,是斑块不稳定性增加的一个重要环节。目前研究^[1]发现,CD40-CD40L 可以诱导 MMPs 的表达并与斑块易损性直接相关,但其具体机制尚不明确。因此,本研究通过观察 rhCD40L 对 U937 细胞分泌 MMPs 功能的调节探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 U937 细胞购自上海中科院细胞所,垂直式凝胶电泳仪为 Bio-Rad 公司产品,明胶(gelatin)为美国 Sigma 公司产品。rhCD40L 购于 R&D

公司,阿司匹林购自上海九福制药有限公司,NS-398 为美国 Sigma 公司产品。

1.2 U937 细胞培养、处理及培养上清样本的制备 培养 U937 细胞,3~10 代细胞接种于 24 孔板中,每孔细胞数约为 10^6 ,培养液为含 10% 小牛血清(NBS)的 RPMI 1640 液,逐孔加药,分别加入终浓度为 0.1、0.2、0.4 μg/ml 的 rhCD40L,和终浓度为 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L 的 NS-398,以及终浓度为 10^{-4} mol/L 的阿司匹林,每种浓度 3 孔,培养 24 h 后收集上清液,−20℃ 冻存;未加药孔设为空白对

[作者简介] 樊 民,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: zgwu@medmail.com.cn

照。此外,在加入终浓度为 0.4 μg/ml rhCD40L 的基础上,分别加入终浓度为 10⁻⁴ mol/L 的阿司匹林和 NS-398,培养 24 h 后收集标本检测,每种标本均设 3 孔。

1.3 酶谱法测定上述上清中 MMPs 活性 取 10 μl 上清液样本与等体积的上样缓冲液混合,上样,在电泳槽中加入预冷的电泳缓冲液,接通电源,电泳 180 min 后溴酚蓝到达底线,停止电泳。小心将胶剥离,浸泡于 2.5% Triton 液中 30 min,然后将胶浸泡于底物缓冲液中,37℃ 过夜。次日将底物缓冲液弃去,0.5% 考马斯亮蓝染色 20 min,脱色液脱色至凝胶蓝色背景上可见白色透明条带。

1.4 统计学处理 以 SxImag25 图像分析系统计算条带的灰度值。实验重复 3 次,以空白对照的灰度值为 1,实验组数据与对照组相比取值,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;以 SPSS 10.1 软件进行 *t* 检验和方差分析,*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 rhCD40L 对 U937 细胞分泌 MMPs 的影响 以不同浓度 rhCD40L(0.1、0.2、0.4 μg/ml) 与 U937 细胞作用 24 h 后,在蓝色的凝胶背景上可见两条清晰的透明条带,分别位于 68 000 和 92 000 处,相应分子量分别为 MMP-2 和 MMP-9。经 SxImag25 图像分析比较不同条件下的灰度值,结果显示,rhCD40L 可使 MMP-2 和 MMP-9 活性增加,且随浓度的增加而逐渐增强,0.4 μg/ml rhCD40L 作用最强(图 1)。

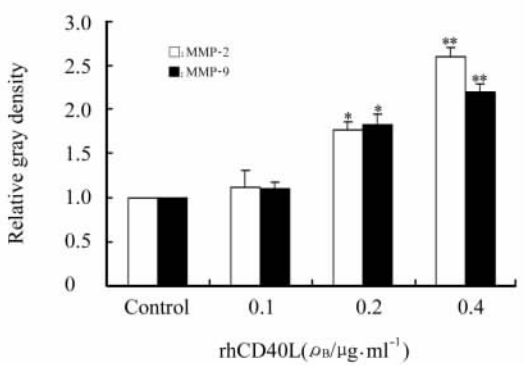


图 1 不同浓度 rhCD40L 作用 24 h 对 U937 细胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 的影响

Fig 1 Effect of rhCD40L at different concentrations on MMP-2 and MMP-9 secretion by U937 cells

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control; *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

2.2 不同浓度 NS-398 对 U937 细胞分泌 MMPs 的影响 不同浓度 NS-398 (10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³ mol/

L) 作用 24 h 的上清液 MMPs 活性测定结果显示 NS-398 可抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性,且抑制作用随剂量的增加而增强(图 2)。

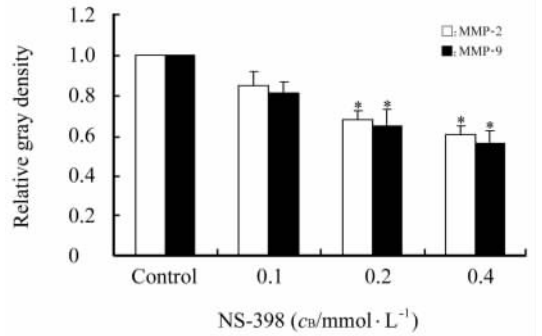


图 2 不同浓度 NS-398 作用 24 h 后对 U937 细胞分泌 MMP-2 及 MMP-9 的影响

Fig 2 Effect of NS-398 at different concentrations on MMP-2 and MMP-9 secretion by U937 cells

* *P* < 0.05 vs control; *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

2.3 NS-398 和阿司匹林对 rhCD40L 诱导 U937 细胞分泌 MMPs 的影响 rhCD40L(0.4 μg/ml) 分别与 NS-398、阿司匹林共同作用 24 h 后,经 SxImag25 图像分析测定条带的灰度值,结果显示,NS-398、阿司匹林均可抑制 rhCD40L 诱导 U937 细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 (*P* < 0.01),NS-398 的抑制作用强于阿司匹林 (*P* < 0.05)。

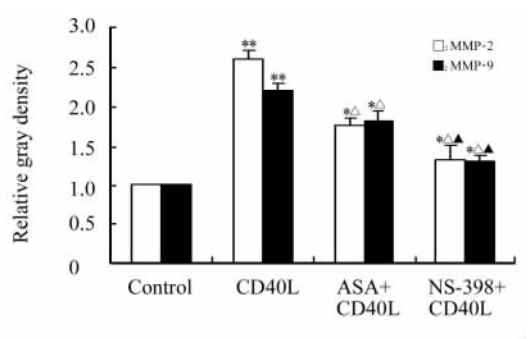


图 3 NS-398 和阿司匹林对 rhCD40L 诱导 MMPs 表达的影响

Fig 3 Effects of NS-398 and aspirin on expression of MMPs induced by rhCD40L

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control; △ *P* < 0.05 vs CD40L; ▲ *P* < 0.05 vs ASA+CD40L; *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

急性冠脉综合征(ACS)是一系列危及患者生命的临床急症,包括不稳定型心绞痛、急性心肌梗死和猝死。研究证实粥样硬化斑块由稳定转为不稳定,

继而破裂导致血栓形成是 ACS 最主要的发病机制。MMPs 是一族 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 依赖性酶, pH 值呈中性时, 它可以降解所有细胞外基质成分。MMPs 家族可降解各型胶原、明胶、纤维结合素、层连蛋白, 其中 MMP-1 特异性降解 I、II 型和 III 型胶原, MMP-2 和 MMP-9 降解变性的胶原(明胶)和弹性蛋白。研究发现人冠状动脉不稳定斑块中间质胶原酶、明胶酶及基质溶解素 I 的表达均有所增加; 对不稳定型和稳定型心绞痛患者旋切的斑块组织中明胶酶的检测表明, 前者明胶酶的量明显多于后者。炎性细胞分泌的多种细胞因子可以促进巨噬细胞分泌 MMPs, 但 MMPs 是以酶原形式分泌的, 只有在受到激活活化才能发挥作用。MMPs 酶原一经激活, 即成为具有活性的 MMPs, 降解纤维帽中细胞外基质成分, 使纤维帽变薄, 斑块不稳定而易于破裂。

近年来 CD40 和 CD40L 在 AS 发生和斑块稳定性中的作用日益引起人们的重视。无论早期还是晚期复杂 AS 病变中都有 CD40 和 CD40L 的表达, 尤其在斑块易破裂的肩部及破裂的斑块中更为显著。多个研究发现, CD40L 诱导而 CD40L 抗体抑制基质金属蛋白酶表达^[2,3]。CD40L 可促进 AS 相关细胞(如巨噬细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞)分泌表达趋化因子、黏附分子、细胞因子、MMPs 及促凝因子, 通过 CD40 能够诱导斑块相关细胞表达 MMPs 与 TF 表达, 从而诱发急性冠脉事件。

Mehta 等^[4]发现阿司匹林可以抑制人冠状动脉内皮细胞中 MMP-1 的活性, 同时另外一些研究^[5,6]发现阿司匹林能够抑制 MMP-2 和 MMP-9 活性。Rupp 等^[7]发现肺炎衣原体感染经由 p38 和 p44/42 MAPK 信号途径可诱导 COX-2 mRNA 和蛋白快速持续表达, 而肺炎衣原体感染诱导的 PGE_2 和 MMP-1 表达增加可以完全被 NS-398 所抑制; 其他研究者^[8,9]发现 MMP-2 和 MMP-9 表达增加是一个 PGE_2 依赖的过程; 然而也有人得出相反的结果, Pillinger 等^[10]发现 COX-2 介导的 PGE_2 通过抑制 ERK 活性而抑制 MMP-1 的表达。

本实验以明胶为底物, 采用 SDS-PAGE 电泳酶谱分析方法分析巨噬细胞培养上清液中 MMPs 的活性以及不同浓度的 rhCD40L 和 COX-2 抑制剂及阿司匹林对其活性的影响。结果显示, U937 细胞培养上清液中有 MMP-2 及 MMP-9 活性表达, 而用 NS-398 和阿司匹林作用后, 条带的亮度明显减弱, 表明 MMP-2 及 MMP-9 活性明显减低, 且随着浓度的增加, 对 MMP 活性的抑制作用越强。而

rhCD40L 可使 MMP-2 及 MMP-9 活性增加, 亦呈剂量依赖性, 以 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量时作用最强。阿司匹林及 NS-398 均可以抑制 rhCD40L 诱导的 MMP-2 及 MMP-9 活性增加, 而 NS-398 的作用强于阿司匹林。由此我们推测 rhCD40L 对 MMPs 的诱导作用可能与 COX 有关, 而与 COX-2 的相关性可能较 COX-1 更密切。

[参考文献]

- [1] Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability [J]. *Circ Res*, 2001, 89:1092-1103.
- [2] Nagashima H, Aoka Y, Sakomura Y, et al. Matrix metalloproteinase 2 is suppressed by trapidil, a CD40-CD40 ligand pathway inhibitor, in human abdominal aortic aneurysm wall [J]. *J Vasc Surg*, 2004, 39:447-453.
- [3] Smola-Hess S, Schnitzler R, Hadaschik D, et al. CD40L induces matrix-metalloproteinase-9 but not tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cervical carcinoma cells: imbalance between NF-kappaB and STAT3 activation [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 267:205-215.
- [4] Mehta JL, Chen J, Yu F, et al. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64:243-249.
- [5] Jiang MC, Liao CF, Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits *in vitro* invasion of tumor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282:671-677.
- [6] Muroso S, Yoshizaki T, Sato H, et al. Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression [J]. *Cancer Res*, 2000, 60:2555-2561.
- [7] Rupp J, Berger M, Reiling N, et al. COX-2 inhibition abrogates Chlamydia pneumoniae-induced PGE_2 and MMP-1 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320:738-744.
- [8] Choi YA, Lee DJ, Lim HK, et al. Interleukin-1beta stimulates matrix metalloproteinase-2 expression *via* a prostaglandin E_2 -dependent mechanism in human chondrocytes [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36:226-232.
- [9] Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, et al. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E_2 -dependent matrix metalloproteinase activity [J]. *Circulation*, 2004, 109:1482-1488.
- [10] Pillinger MH, Rosenthal PB, Tolani SN, et al. Cyclooxygenase-2-derived E prostaglandins down-regulate matrix metalloproteinase-1 expression in fibroblast-like synoviocytes *via* inhibition of extracellular signal-regulated kinase activation [J]. *J Immunol*, 2003, 171:6080-6089.

[收稿日期] 2005-12-13

[修回日期] 2006-05-10

[本文编辑] 贾泽军