论著

文章编号:1000-5404(2012)17-1758-04

# 去甲肾上腺素诱导人巨噬细胞MMP-9的表达及机制

李 明[1],孙守兵[1],周 越[1],庞晓明[2],席 娟[3],金泰宇[4],姚文平[5] (222000 江苏 连云港,连云港市中医院:药学部[1],针灸科[5];710061 西安,西安交通大学药理学系[2];272029 山东 济宁,济宁医学院附属医院手术室[3];222000 江苏 连云港,连云港市第二人民医院药学部[4])

[摘要] **目的** 观察去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)预处理人巨噬细胞基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达及其致动脉粥样硬化机制。**方法** 体外培养的U937巨噬细胞,以$10^{-10}$、$10^{-9}$、$10^{-8}$、$10^{-7}$ mol/L NE分别刺激细胞0、1、3、6、12、24 h。RT-PCR法测细胞MMP-9 mRNA水平,Western blot法检测细胞MMP-9蛋白表达,ELISA法测细胞培养液上清中MMP-9蛋白水平的表达。预先加入抗氧化剂NAC(10 mmol/L)和NAD(P)H氧化酶抑制剂DPI($10^{-5}$ mol/L)孵育1 h后再用不同浓度的NE分别刺激细胞24 h,用荧光探针法检测细胞内ROS的生成;用RT-PCR及ELISA法检测细胞MMP-9 mRNA和蛋白的表达。**结果** NE浓度时间依赖性地增加巨噬细胞MMP-9 mRNA($10^{-7}$ mol/L NE为对照组的4.65倍,$P<0.01$)及蛋白($10^{-7}$ mol/L NE为对照组的4.14倍,$P<0.01$)表达;随着NE浓度的升高,ROS的生成分别为对照组的2.18、3.22、3.64、4.50倍($P<0.01$)。NAC和DPI都一定程度地抑制了MMP-9 mRNA[DPI组为NE组的0.752倍($P<0.05$),NAC组为NE组的0.500倍($P<0.01$)]和蛋白(DPI组为NE组的0.698倍,NAC组为NE组的0.671倍,均$P<0.05$)的表达。**结论** NE浓度和时间依赖性地诱导人巨噬细胞U937 MMP-9的表达,通过NAD(P)H氧化酶介导的ROS通路而促进炎症反应,促进AS的发生、发展。

[关键词] 去甲肾上腺素;巨噬细胞;基质金属蛋白酶-9;动脉粥样硬化

[中图法分类号] R963.21;R394.2;R543.5 [文献标志码] A

# Norepinephrine induces expression of matrix metalloproteinase-9 in human macrophages and its mechanisms

Li Ming[1], Sun Shoubing[1], Zhou Yue[1], Pang Xiaoming[2], Xi Juan[3], Jin Taiyu[4], Yao Wenping[5] ([1]Department of Pharmacy, [5]Department of Acupuncture and Moxibustion, Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang, Jiangsu Province, 222000; [2]Faculty of Pharmacology, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an, Shaanxi Province, 710061; [3]Department of Operating Room, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong Province, 272029; [4]Department of Pharmacy, Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang, Jiangsu Province, 222000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of norepinephrine (NE) on the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human macrophages, and to explore its pro-inflammatory and pro-atherosclerotic mechanisms. **Methods** Murine U937 macrophages were cultured and pretreated with antioxidant NAC (10 mmol/L) and NAD(P)H oxidase inhibitor DPI ($10^{-5}$ mol/L) for 1 h. Then the cells were treated with different concentrations ($10^{-10}$, $10^{-9}$, $10^{-8}$ and $10^{-7}$ mol/L) of NE at different time points (0, 1, 3, 6, 12 and 24 h). MMP-9 mRNA level was analyzed by RT-PCR. MMP-9 protein expression was measured by Western blotting. MMP-9 protein level in cell supernatant was detected by ELISA. Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation was observed with fluorescence probes, and intracellular MMP-9 mRNA and protein expressions were detected by RT-PCR and ELISA. **Results** The mRNA expression level (4.65 times that of the control group in the $10^{-7}$ mol/L NE group, $P<0.01$) and protein expression level (4.14 times that of the control group in the $10^{-7}$ mol/L NE group, $P<0.01$) of MMP-9 in macrophages were increased by NE in a dose- and time-dependent manner. The levels of ROS were 2.18, 3.22, 3.64 and 4.50 times that of the control group in the $10^{-10}$, $10^{-9}$, $10^{-8}$ and $10^{-7}$ mol/L NE groups, respectively ($P<0.01$). NAC and DPI significantly antagonized the effect of NE on MMP-9 mRNA (DPI group was 75.2% that of the control group, $P<0.05$; NAC group was 50% that of the control group, $P<0.01$) and protein expressions (DPI group was 69.8% that of the control group, $P<0.05$; NAC group was 67.1% that of the control group, $P<0.05$).

[通信作者] 姚文平,E-mail: liminglm1985@163.com

**Conclusion** NE upregulates MMP-9 expression in U937 cells in a dose- and time-dependent manner, and induces ROS secretion *via* NAD(P)H oxidase, which mediates the pro-inflammatory effect of NE to promote the formation and development of atherosclerosis.

[**Key words**] norepinephrine; macrophages; matrix metalloproteinase-9; atherosclerosis

Corresponding author: Yao Wenping, E-mail: liminglm1985@163.com

全身炎症或血管壁的局部炎症与动脉粥样硬化(atherosclerosis,As)有着密切的关系。在单核/巨噬细胞中,各种炎症特征因子被激活,如白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)和C反应蛋白等[1-2],其中MMP-9的异常表达与患心血管疾病风险的增加有着强大的关联。MMP-9又称明胶酶B,是MMPs家族之一。MMP-9不仅是一个炎症标志物,而且直接参与了动脉粥样硬化的发展和形成。MMP-9与IL-8之间可以形成正反馈调节,加剧炎症反应的发生。去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)为节后交感神经释放的主要神经递质,能够激动α和β受体,从而参与心肌肥大、心肌凋亡等病理过程,是高血压、心肌梗死、动脉粥样硬化患者心室重构、心力衰竭发生、发展的重要因素。据报道,NE能够诱导巨噬细胞肿瘤坏死因子、单核细胞趋化蛋白-1及Toll样受体4(toll-like receptor,TLR4)的表达[3-4]。研究证实,在巨噬细胞中,髓过氧化物酶的分泌是通过了TLR4的介导,并且此过程能够被罗格列酮和非诺贝特抑制[5-7]。本研究旨在探讨NE对U937巨噬细胞产生MMP-9的影响及分子机制,特别是活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)信号通路方面。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人单核/巨噬细胞株(U937)购自美国Cascade Biologics公司,RPMI1640培养基及胎牛血清购自美国HyClone公司,NE、活性氧抑制剂(NAC)、NAD(P)H氧化酶抑制剂(DPI)购自Sigma公司,Trizol总RNA提取试剂盒购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒、DNA标准和蛋白标准购自德国Fermentas公司,兔抗人MMP-9多克隆抗体购自Abcam公司,HRP标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥公司。

### 1.2 实验分组及处理

以$10^{-10}$、$10^{-9}$、$10^{-8}$、$10^{-7}$ mol/L NE分别诱导细胞24 h后收集细胞及上清液,分别用RT-PCR法和Western blot法检测提取的RNA和总蛋白。以$10^{-10}$、$10^{-9}$、$10^{-8}$、$10^{-7}$ mol/L NE分别诱导细胞0、1、3、6、12、24 h后离心收集细胞上清液,用ELISA法检测提取的蛋白质。以$10^{-10}$、$10^{-9}$、$10^{-8}$、$10^{-7}$ mol/L NE诱导细胞24 h后离心收集细胞,用荧光探针法检测细胞ROS的生成。预先加入抗氧化剂NAC(10 mmol/L)和NAD(P)H氧化酶抑制剂DPI($10^{-5}$ mol/L)孵育1 h,然后与$10^{-9}$ mol/L NE共同孵育24 h,收集细胞及上清液,分别用RT-PCR法和ELISA法检测提取的RNA和总蛋白。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基培养细胞,置于37 ℃含5% $CO_2$的培养箱中孵育,24~48 h后,换培养液继续培养,每2~3天传代1次,取对数生长期细胞用于实验。用无血清培养基继续培养24 h后开始实验。

1.3.2 RT-PCR检测细胞MMP-9 mRNA水平 按Trizol试剂盒说明书提取总RNA,用紫外分光光度计进行浓度及纯度测定,取总RNA 2 μg逆转录合成cDNA,,逆转录产物2 μl进行PCR循环。目的基因MMP-9引物序列:上游5′-GATGCGTGGAGAGTCGAAATC-3′,下游5′-CACCAAACTGGATGACGATG-3′,扩增片段为337 bp。内参人GAPDH引物序列:上游5′-GGATTTGGTCGTATTGGG-3′,下游5′-GGAAGATGGTGATGGGATT-3′,扩增产物长度为205 bp。取PCR产物80 V电泳30 min,凝胶图像分析系统扫描摄图,并分析MMP-9及GAPDH基因灰度值。

1.3.3 Western blot检测细胞MMP-9蛋白表达 弃去培养液,轻漂洗后,加入冷细胞裂解液裂解细胞。静置冰上20 min沉淀蛋白,12 000 r/min、4 ℃离心15 min,取上清液加入1/4体积的5×上样缓冲液,随后煮沸7 min,按蛋白定量按照试剂盒说明进行。蛋白上样量为20 μg,SDS-PAGE电泳分离蛋白,采用半干式电转移法,转膜后封闭1 h后,按1∶1 000加入兔抗人MMP-9多克隆抗体一抗,4 ℃孵育过夜,TBST冲洗3×15 min,按1∶7 000加入HRP标记山羊抗兔二抗,室温孵育1 h,TBST冲洗,用ECL显色并曝光于X线片,并用凝胶图像分析系统对胶片进行扫描分析和拍照。

1.3.4 ELISA测定细胞上清液MMP-9蛋白表达 收集细胞,离心吸取上清液。按ELISA试剂盒说明测定MMP-9水平,在450 nm波长下酶标仪读取各孔光密度值[$D(450)$],计算机绘制标准曲线并给出相应的值,以μg/ml表示。

1.3.5 荧光探针检测细胞ROS的生成 离心收集细胞,用稀释好的$10^{-5}$ mol/L的$H_2$DCF-DA 1 ml吹散细胞,移入6孔培养板中继续培养20 min,无血清培养基1 000 r/min离心洗涤3次、每次5 min,以洗去未进入细胞内的$H_2$DCF-DA,488 nm激发波长、525 nm发射波长条件下,荧光显微镜观察并拍照。每组选择5个不同视野,每个视野包含20~35个细胞。用Image-Pro Plus软件分析细胞荧光强度。

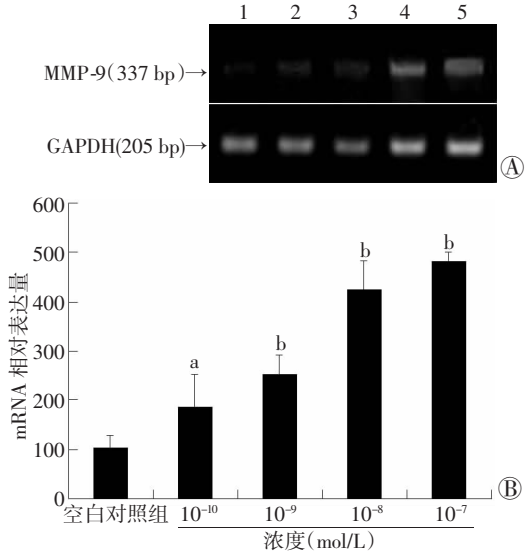
### 1.4 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,进行多组间两两比较的单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 NE对U937巨噬细胞MMP-9 mRNA水平的影响

不同浓度的NE刺激U937巨噬细胞24 h后,MMP-9 mRNA水平随着NE浓度的增加而升高,并呈浓度依赖性(图1)。

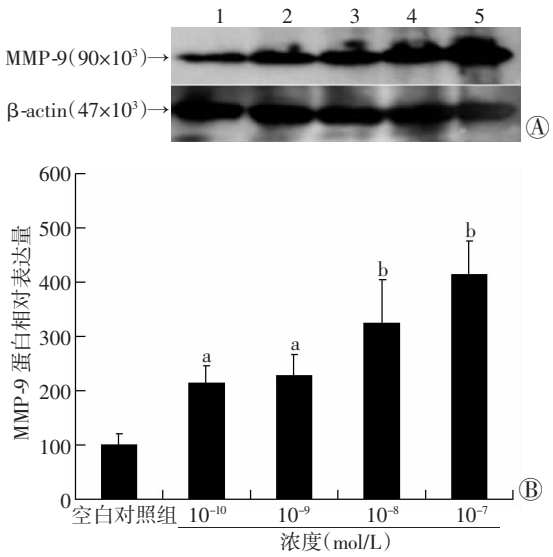



A:RT-PCR 检测 1:空白对照组,2:$10^{-10}$ mol/L NE,3:$10^{-9}$ mol/L NE,4:$10^{-8}$ mol/L NE,5:$10^{-7}$ mol/L NE;B:半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较

**图1 不同浓度 NE 诱导 24 h MMP-9 mRNA 表达变化**

## 2.2 NE 对 U937 巨噬细胞 MMP-9 蛋白的影响

不同浓度的 NE 刺激 U937 巨噬细胞 24 h 后,MMP-9 蛋白表达随着 NE 浓度的增高而增加,呈浓度依赖性(图2)。




A:Western blot 检测 1:空白对照组,2:$10^{-10}$ mol/L NE,3:$10^{-9}$ mol/L NE,4:$10^{-8}$ mol/L NE;5:$10^{-7}$ mol/L NE;B:半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较

**图2 不同浓度 NE 诱导 24 h MMP-9 蛋白表达变化**

## 2.3 NE 对 U937 巨噬细胞 MMP-9 表达的时间依赖性

在 $10^{-9}$ mol/L NE 刺激 U937 巨噬细胞 3 h 时,MMP-9 水平即明显增加,与空白对照组比较具有显著性差异($P<0.01$);刺激 24 h 时,MMP-9 的含量达到最大,为空白对照组的 1.40 倍(表1)。表明,NE 能显著增加 U937 巨噬细胞 MMP-9 的产生,并呈时间依赖性。

**表1 NE 时间和浓度依赖性地刺激 U937 巨噬细胞产生 MMP-9**

($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 0 h | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 空白对照组 | 3.23±0.22 | 3.54±1.31 | 3.37±0.60 | 3.68±0.71 | 3.86±0.56 | 4.12±0.93 |
| $10^{-10}$ mol/L NE | 3.47±0.34 | 4.11±1.02[a] | 5.00±0.82[b] | 5.35±0.64[b] | 6.13±0.92[b] | 6.47±1.20[b] |
| $10^{-9}$ mol/L NE | 3.57±0.11 | 4.41±0.24 | 5.72±0.37[b] | 5.76±0.84[b] | 6.81±1.19[b] | 7.16±0.35[b] |
| $10^{-8}$ mol/L NE | 3.77±0.10 | 5.24±0.29[b] | 6.54±0.31[b] | 6.98±0.43[b] | 7.75±0.36[b] | 7.85±0.38[b] |
| $10^{-7}$ mol/L NE | 3.90±0.15 | 5.54±0.38[b] | 7.65±0.41[b] | 7.82±0.22[b] | 9.65±0.35[b] | 9.99±0.20[b] |

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较

## 2.4 NE 对 U937 巨噬细胞产生 ROS 的影响

荧光显微镜观察显示,荧光探针 $H_2$DCF-DA 标记的 U937 巨噬细胞在无刺激时仅有少量 ROS 生成。与对照组(96.03±17.96)相比,NE($10^{-9}$ mol/L,309.99±43.36)显著增加 U937 巨噬细胞中 ROS 的生成并呈现浓度依赖性($10^{-10}$、$10^{-8}$、$10^{-7}$ mol/L NE 分别为 210.14±14.08、349.90±39.72、435.42±23.22,$P<0.01$,图3)。

## 2.5 ROS 与 NE 诱导 U937 巨噬细胞表达 MMP-9 mRNA 的关系

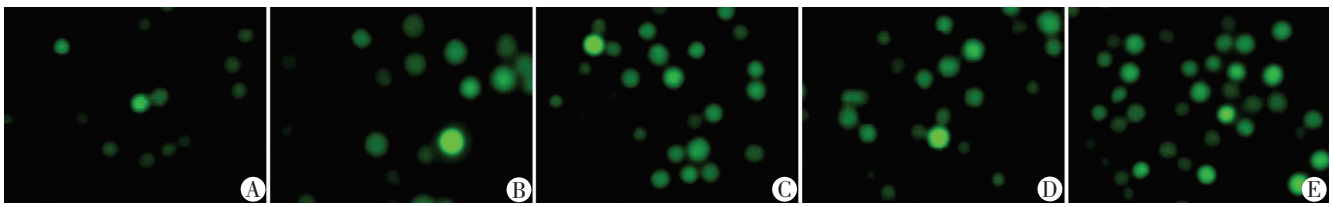
RT-PCR 检测显示,抗氧化剂 NAC(10 mmol/L)几乎完全抵消了 NE 诱导 U937 巨噬细胞 MMP-9 mRNA 的表达($P<0.01$),而且 NAD(P)H 氧化酶抑制剂 DPI($10^{-5}$ mol/L)也一定程度地抑制了 MMP-9 mRNA 的表达(图4)。说明,ROS 信号通路介导了 NE 诱导的 U937 巨噬细胞 MMP-9 mRNA 的表达。

## 2.6 ROS 与 NE 诱导 U937 巨噬细胞表达 MMP-9 蛋白的关系

ELISA 法检测细胞外 MMP-9 蛋白的表达,与空白对照组(3.68±0.45)相比 $10^{-9}$ mol/L NE 组(7.13±0.83)明显升高($P<0.01$);NE+DPI 组(4.98±0.55)及 NE+NAC 组(4.78±0.18)与 NE 组比较均显著降低($P<0.01$);抗氧化剂 NAC 和 DPI 都一定程度地阻断了 MMP-9 蛋白的表达。说明,NE 诱导的 U937 巨噬细胞 MMP-9 的表达是通过了 ROS 信号通路的介导。

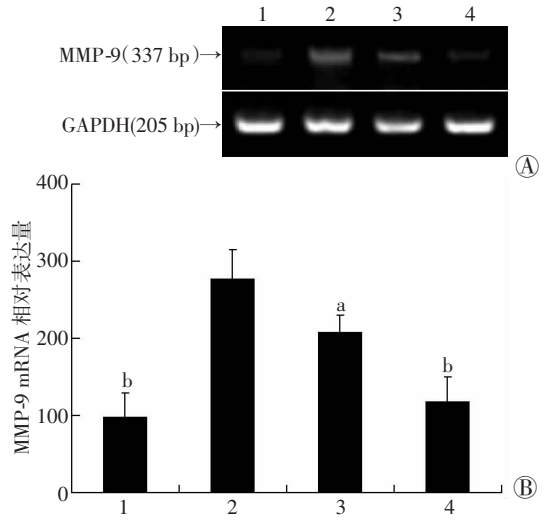
# 3 讨论

MMP-9 主要源自单核/巨噬细胞,其可降解动脉粥样硬化斑块纤维帽而参与不稳定斑块形成。有报道称MMP-9水平与动脉粥样硬化及脑梗死的关系非常




A:空白对照组;B:$10^{-10}$ mol/L NE;C:$10^{-9}$ mol/L NE;D:$10^{-8}$ mol/L NE;E:$10^{-7}$ mol/L NE

**图3 NE 诱导 U937 巨噬细胞产生 ROS 的相对荧光强度**




1:空白对照组;2:$10^{-9}$ mol/L NE;3:NE($10^{-9}$ mol/L) + DPI ($10^{-5}$ mol/L);4:NE($10^{-9}$ mol/L) + NAC(10 mmol/L)
A:RT-PCR 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 $10^{-9}$ mol/L NE 组比较

**图 4　NE 诱导 U937 巨噬细胞表达 MMP-9 mRNA 与 ROS 的关系**

复杂,可能互为因果,MMP-9 水平升高加速了动脉硬化的发生发展,易导致斑块破裂发生脑梗死,而急性脑梗死进一步促进 MMP-9 的上调[8]。本研究发现,NE 可激活巨噬细胞,上调 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达,且呈时间和浓度依赖性,说明,NE 通过刺激 MMP-9 的产生而诱导 U937 巨噬细胞的炎症反应,这个结果丰富了 NE 致 As 的炎症机制。

研究发现,ROS 是生物体内产生的活性含氧化合物的总称,包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基、一氧化氮等。过量的 ROS 可引起细胞大分子的氧化损伤,微量 ROS 是调节血管结构和功能状态的重要信号分子,在血管生物学中发挥重要作用。本研究发现,NE 能够刺激 U937 巨噬细胞产生 ROS,并且 ROS 的表达随着 NE 浓度的增加而升高,呈现浓度依赖性。此外,NAD(P)H 氧化酶抑制剂 DPI 也一定程度地抑制了 MMP-9 mRNA 和蛋白水平的表达。说明这个过程可能涉及了 NAD(P)H 氧化酶途径,与文献[9]报道一致。本研究还发现,抗氧化剂 NAC 几乎完全阻断 NE 诱导的 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达,也就是说 ROS 介导了巨噬细胞中 MMP-9 的产生,即 NE 刺激巨噬细胞产生 MMP-9 是通过 ROS 信号通路的介导。此结果与先前研究所示的血管紧张素Ⅱ诱导内皮细胞表达 CRP 是通过了 ROS 的介导作用这一机制一致,但不同的是 CRP 的表达并未涉及到 NAD(P)H 氧化酶途径[10]。此结果的差异不仅是因为表达的炎症因子不同,也暗示了 MMP-9 及 ROS 的表达的细胞特异性和通路特异性。巨噬细胞膜表面分布着较高密度的肾上腺素受体即 α 和 β 受体,他们能特异性地与相应的配体结合从而发挥药理作用。肾上腺素受体的激活被认为是 NE 和其在 As 中致炎作用之间的一个关键的"桥梁",α 和 β 受体的激活也被认为是 ROS 激活的上游事件。有研究发现,NE 能够激活巨噬细胞表达 TLR4 也是通过了肾上腺素受体的介导[11]。

综上所述,本实验证明,NE 通过 α 和(或)β 受体——ROS 信号通路,刺激巨噬细胞产生 MMP-9,从而参与其致 As 的炎症反应。本研究为更深入地认识 NE 在致炎及致 As 中的作用提供了重要依据。至于 MMP-9 的表达是否与炎症通路 MAPK 有关,以及通路特异性和在体研究还需要进一步的探索。

**参考文献:**

[1] Yen J H, Yang D J, Chen M C, *et al*. Glycine tomentella Hayata inhibits IL-1beta and IL-6 production, inhibits MMP-9 activity, and enhances RAW264.7 macrophage clearance of apoptotic cells[J]. J Biomed Sci, 2010, 17: 83.

[2] Li M, Liu J, Han C, *et al*. Angiotensin II induces the expression of c-reactive protein *via* MAPK-dependent signal pathway in U937 macrophages[J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(1): 63 - 70.

[3] 黄俊龙. 去甲肾上腺素通过 toll 样受体 4 促进巨噬细胞炎症因子的分泌[D]. 上海: 第二军医大学, 2008.

[4] 周建云, 周琳琳, 严军, 等. 去甲肾上腺素对脂多糖诱导的巨噬细胞活化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(13): 1278 - 1280.

[5] 姬媛媛, 王志东, 刘俊田, 等. 血管紧张素Ⅱ诱导 RAW264.7 细胞 Toll 样受体 4 表达及髓过氧化物酶活性的机制研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(11): 1037 - 1039, 1043.

[6] 姬媛媛, 王志东, 刘俊田, 等. 非诺贝特对血管紧张素Ⅱ诱导 RAW264.7 细胞 Toll 样受体 4 表达、髓过氧化物酶活性及表达的抑制作用[J]. 药学学报, 2009, 44(5): 462 - 467.

[7] 姬媛媛, 王志东, 刘俊田, 等. 罗格列酮对血管紧张素Ⅱ诱导 RAW264.7 细胞 Toll 样受体 4 表达及髓过氧化物酶活性的抑制作用[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(9): 1779 - 1782.

[8] Wagsater D, Zhu C, Bjorkegren J, *et al*. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse[J]. Int J Mol Med, 2011, 28(2): 247 - 253.

[9] Carluccio M A, Scoditti E, Massaro M, *et al*. The Antioxidant Hydroxytyrosol Suppresses MMP-9 Activity and Expression in Human Monocytes Through PKC alpha/beta 1 and NADPH Oxidase Inhibition-A Mechanism for Plaque Stabilization by an Olive Oil Component of Mediterranean Diets[J]. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 2010, 3(2/3): 85 - 86.

[10] Han C, Liu J, Liu X, *et al*. Angiotensin II induces C-reactive protein expression through ERK1/2 and JNK signaling in human aortic endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2010, 212(1): 206 - 212.

[11] 陈吉, 黄岚, 吴强. 去甲肾上腺素刺激乳鼠心肌细胞内活性氧产生受体途径的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(8): 694 - 696.

(**收稿**:2012-02-16;**修回**:2012-03-14)

(编辑　张　维)