基础研究 文章编号：0253-3626(2009)03-0269-04

尿激酶对人血管内皮细胞 MMP-9 表达的影响及机制

张树堂，李光勤

（重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆医科大学基础医学研究所，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨尿激酶对人血管内皮细胞基质金属蛋白酶 9（Matrix metalloproteinase 9，MMP-9）表达的影响及机制。方法：将正常条件下培养的人脐静脉血管内皮细胞分为 5 组：第 1 组为空白对照，第 2 组加入尿激酶，第 3、4、5 组在加入尿激酶前分别加入 MEK 抑制剂 PD98059、NF-κB 抑制剂 PDTC、AP-1 抑制剂 Curcumin。分别用 RT-PCR 和激光共聚焦技术检测细胞 MMP-9 mRNA 和蛋白表达量的变化。结果：第 2 组 MMP-9 mRNA 和蛋白表达量较第 1 组显著升高，其余 3 组较第 2 组显著降低。结论：尿激酶上调人血管内皮细胞 MMP-9 表达，其机制与 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号转导途径以及 NF-κB 和 AP-1 有关。

【关键词】血管内皮细胞；尿激酶；基质金属蛋白酶 9

【中国图书分类法分类号】Q786；Q593+.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-22

The effect of urokinase on the expression of MMP-9 in human endothelial cell and its mechanism

ZHANG Shu-tang, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of urokinase on the expression of Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in human endothelial cell and its mechanism. *Methods*: The human umbilical vein endothelial cell cultured in normal condition were divided into five groups: the first group was blank control, the second group was given urokinase, the third, fourth and fifth groups were treated with MEK inhibitor PD98059, NF-κB inhibitor PDTC, and AP-1 inhibitor Curcumin, respectively before urokinase was added in. The expression of MMP-9 mRNA and protein in all the groups were detected by RT-PCR and Laser-Confocus respectively. *Results*: The mRNA and protein expression of MMP-9 in the second group were increased obviously, as compared with the first group. Compared with the second group, the mRNA and protein expression of MMP-9 in the third, fourth, and fifth groups were decreased significantly. *Conclusion*: Urokinase can upregulate the MMP-9 mRNA and protein expression of human endothelial cell. The mechanism is related to the Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 signal transduction pathway, also to NF-κB and AP-1.

【Key words】Endothelial cell; Urokinase; Matrix metalloproteinase 9

目前，国际上普遍认可的溶栓药物主要有两种—tPA 和尿激酶。其中 tPA 在国外应用较多，而我国主要的溶栓药物是尿激酶。有关 tPA 对基质金属蛋白酶 9（Matrix metalloproteinase 9，MMP-9）表达的影响及机制已比较明确，但未见尿激酶对 MMP-9 表达的影响的分子生物学机制的研究。本研究通过离体人血管内皮细胞培养，观察尿激酶对 MMP-9 表达的影响，并探讨其可能的机制。

作者介绍：张树堂（1981- ），男，硕士，研究方向：脑血管病。

通讯作者：李光勤，男，教授，E-mail：liguangqin@tom.com。

基金项目：重庆市科委课题（编号：CST 200+BB5281）。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

尿激酶（丽珠集团丽珠制药厂），PD98059（Cell Signaling Technology 公司），PDTC（Sigma 公司），Curcumin（Alexis 公司）。RNAiso Plus、RT-PCR 试剂盒（宝生物工程有限公司（TaKaRa）），人 MMP-9、GAPDH 引物亦由该公司合成。小鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体（Santa Cruz 公司）。FITC 标记山羊抗小鼠 IgG（北京中杉金桥生物技术有限公司）。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞细胞生长于含 10%胎牛血清的 RPMI1 640 培养液中，于 37℃、5%CO_2、饱和湿度条件下培养。

1.3　细胞分组及处理

将正常条件下培养的人脐静脉血管内皮细胞分为 5 组，第 1 组为空白对照，第 2 组加入尿激酶。第 3、4 组在加入尿激酶前 1 h 分别加入 MEK 抑制剂 PD98059、NF-κB 抑制剂 PDTC，第 5 组在加入尿激酶前 0.5 h 加入 AP-1 抑制剂 Curcumin。

1.4　MMP-9　mRNA 检测

采用半定量 RT-PCR 方法进行检测。具体步骤：在加入尿激酶后 6 h，严格按 RNAiso Plus 试剂说明书分别提取 5 组细胞总 RNA。取 5 组细胞总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳并用紫外分光光度法定量，然后分别取 400 ng 总 RNA 进行逆转录反应合成 cDNA。以 GAPDH 为内参照，分别取 10 μl 模板进行 PCR 反应。人 MMP-9 基因扩增引物碱基序列：5'-GGCTTAGATCATTCCTCAGTGC-3'and5'-CACAGTAGTG-GCCGTAGAAGG-3'（amplified length，300 base pairs），GAPDH 引物碱基序列：5'-GC-CAAGGTCATCCATGACAAC-3' and 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'（amplified length，498 base pairs）。MMP-9 的反应条件为预变性 95℃ 5min；94℃ 30 s，56℃ 30s，72℃ 1 min，30 个循环后 72℃延伸 10 min。GAPDH 的退火温度为 58℃，其余反应条件与 MMP-9 完全一致。结果检测：2%琼脂糖凝胶电泳，85 V 电压，GoldView 染色。

1.5　MMP-9 蛋白检测

采用激光共聚焦成像方法。在加入尿激酶后 48 h，将 5 组细胞按如下步骤进行处理：（1）固定：① 弃去板内液体，0.01 mol/LPBS 轻轻洗 3 次，每次 3 min。② 冷的 4%多聚甲醛固定 15 min。③ PBS 洗 3 次，3 min/ 次，吸水纸吸干液体。（2）用 0.5% TritonX-100 透化处理 15 min；PBS 洗 3 次，3 min/ 次，吸水纸吸干。（3）封闭：加入山羊血清 20 μl，37℃，20 min；PBS 洗 3 次，3 min/ 次。（4）将盖玻片移到载玻片上，在湿盒内操作。（5）每张盖玻片加 20 μl 用 PBS 以 1∶50 比例稀释的小鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体，37℃过夜；PBS 洗 3 次，3 min/ 次。（6）加 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 20 μl 于盖玻片，37℃，1.5 h（避光操作）；PBS 洗 3 次，3 min/ 次。（7）去离子水洗 2 次，1min/ 次，消除非特异性荧光。（8）10 μl 甘油加 10 μlPBS，兑成 50%甘油封片。（9）立即进行激光共聚焦镜检。

1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Excel 进行均值、标准差分析、t' 检验。

2　结　果

2.1　各组细胞 MMP-9 mRNA 表达的琼脂糖凝胶电泳结果（图 1）

2.2　各组细胞 MMP-9 蛋白表达的激光共聚焦成像结果（图 2~6）

2.3　各组细胞 MMP-9　mRNA 表达的变化

第 2 组 MMP-9 mRNA 表达量较第 1 组显著升高（$P<0.01$），其余 3 组较第 2 组显著降低（$P<0.01$）。见表 1。

2.4　各组细胞 MMP-9 蛋白表达的变化

第 2 组 MMP-9 蛋白表达量较第 1 组显著升高（$P<0.01$），其余 3 组较第 2 组显著降低（$P<0.01$）。见表 2。



M.DNA Marker；1. 空白对照；2.uPA；3.uPA+PD98059；4. uPA+PDTC；5. uPA+Curcumin；

图 1　各组细胞 MMP-9 mRNA 表达

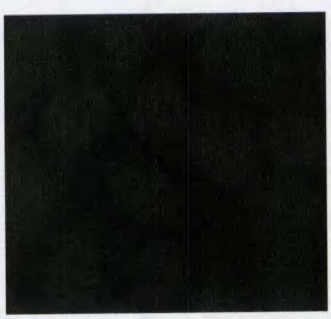


图 2　空白对照组 MMP-9 蛋白表达

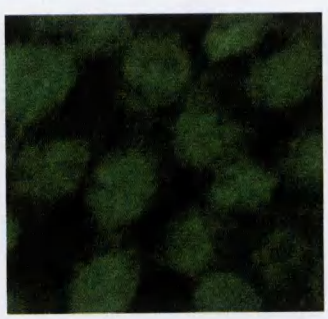


图 3　uPA 组 MMP-9 蛋白表达



图 4　uPA+PD98059 组 MMP-9 蛋白表达

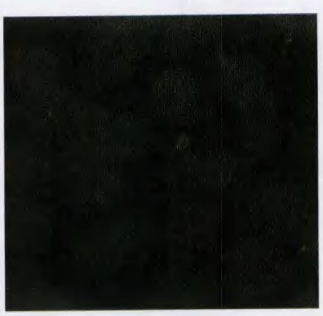


图 5　uPA+PDTC 组 MMP-9 蛋白表达

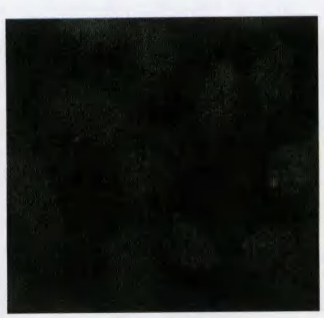


图 6　uPA+Curcumin 组 MMP-9 蛋白表达

表 1 各组细胞 MMP-9 mRNA 表达的比较

	均值	标准差	P
第 1 组（空白对照）	0.328 776	0.031 580	<0.01[a]
第 2 组（uPA）	2.399 393	0.490 489	
第 3 组（uPA+PD98059）	0.531 105	0.081 647	<0.01[b]
第 4 组（uPA+PDTC）	0.452 957	0.052 950	<0.01[c]
第 5 组（uPA+Curcumin）	0.382 598	0.087 342	<0.01[d]

a：空白对照组与 uPA 组比较；b：uPA+PD980 59 组与 uPA 组比较；c：uPA+PDTC 组与 uPA 组比较；d：uPA+Curcumin 组与 uPA 组比较（以下标识符所代表的含义相同）

表 2 各组细胞 MMP-9 蛋白表达的比较

	均值	标准差	P
第 1 组（空白对照）	27.889 500	3.199 486	<0.01[a]
第 2 组（uPA）	107.377 750	14.680 797	
第 3 组（uPA+PD98059）	29.339 750	4.635 681	<0.01[b]
第 4 组（uPA+PDTC）	29.196 250	2.840 000	<0.01[c]
第 5 组（uPA+Curcumin）	28.672 000	3.571 277	<0.01[d]

a：空白对照组与 uPA 组比较；b：uPA+PD980 59 组与 uPA 组比较；c：uPA+PDTC 组与 uPA 组比较；d：uPA+Curcumin 组与 uPA 组比较（以下标识符所代表的含义相同）

3 讨 论

基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases,MMPs)是一组锌离子依赖性内肽酶，包括多个结构相似、能够消化降解基质和基底膜的酶，目前已确定的 MMPs 达 20 种以上。细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)是细胞之间的物质，由多种蛋白质和非蛋白成分组成，构成细胞生活的微环境，具有支持、连结、营养和防御的作用。他们处在不断代谢、更新、降解、重塑的动态平衡中，这种平衡的失调与体内多种病理过程密切相关[1]。MMPs 是细胞外基质降解过程中必不可少的酶，几乎能降解细胞外基质的所有成分。在正常稳定状态组织 中 MMPs 表达量极少，而在炎性细胞因子、激素、生长因子刺激下和细胞转化过程其表达明显上调。此过程涉及人体多种生理及病理过 程，如炎症、胚胎发生、血管形成、肿瘤侵袭转移等。MMP-2 和 MMP-9 与脑血管疾病的病理生理机制密切相关，它们主要降解Ⅳ和Ⅴ型胶原、弹性蛋白、明胶及层粘连蛋白等。

MMP-9 在缺血后引起基膜下细胞外基质成分蛋白水解伴随血管通透性增加及血管完整性丧失，最终血脑屏障破坏导致出血及水肿，国内外的研究均证实缺血性卒中溶栓后脑出血的发生与 MMP-9 增高有关。2003 年，Wang 等[2]通过体外实验发现 tPA 可促进血管内皮细胞表达 MMP-9。2005 年，国外学者发现尿激酶可增加动脉 MMP-2 及 MMP-9 的含量和活性[3]。本实验采用半定量 RT-PCR 和激光共聚焦分别检测 MMP-9 mRNA 和蛋白含量的变化，结果显示其含量在加入尿激酶后明显升高，说明尿激酶在体外可促进人血管内皮细胞表达 MMP-9。但尿激酶促进人血管内皮细胞 MMP-9 表达的机制尚不清楚。

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-actived protein rinase,MAPK)途径是介导细胞反应的重要信号系统，普遍存在于包括酵母和哺乳动物在内的多种生物细胞中，参与了细胞生长、发育、分化、凋亡等多种生理过程。哺乳动物细胞中了解得最清楚的 MAPK 是细胞外信号调节蛋白激酶(Extracellular regulated protein kinases,ERK1/2)，它的信号传递途径为典型的三级酶促级联反应，是调节细胞生长、发育及分化的信号网络的核心。在 ERK1/2 的传递途径中 Ras 作为上游激活蛋白，Raf 作为 MAPK 激酶的激酶，ERK 激酶(MEK1/2)作为 MAPK 激酶，ERK1/2 为 MAPK，即 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 途径。MEK1/2 不仅仅是 ERK 的激活物，还可能是 ERK 在胞浆中的锚定器。当信号通路无活性时，它就将 ERK 固定在胞浆中，而细胞受到刺激后，活化的 ERK 与 MEK 解离并二聚体化，转移到胞核或其它活化位点，再进一步磷酸化下游底物。

ERK1/2 是将信号从细胞表面受体传导至细胞核的关键。磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而介导 Elk-1、活化转录因子(Activated transfer factor,ATF)、核因子 NF-κB、激活蛋白-1(Activator protein-1,AP-1)、c-fos 和 c-Jun 等转录调节因子的活化,促进某些基因的转录与表达。参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应。前期研究表明,在 MMP-9 启动子区存在 AP-1、NF-κB、Ets-1、GC 和 RCE 等多种转录因子结合位点[4]。在这些转录因子结合位点之中,其中某些位点可能受 ERK调控,但 ERK 到底通过哪些转录因子发挥调控作用仍未明了。1998 年,Hua Tang[5]等在牛主动脉内皮细胞培养中发现:尿激酶可与其细胞表面受体(uPAR)结合并激活局部粘着斑激酶和 ERK1/2, 从而在细胞信号转导中发挥作用。本研究结果显示, 加入 MEK 抑制剂 PD98059 阻断 MEK 对 ERK1/2 的激活后, 细胞 MMP-9 mRNA 和蛋白含量较单纯加入尿激酶时明显降低。说明尿激酶促进人血管内皮细胞表达 MMP-9 与其细胞表面受体(uPAR)、局部粘着斑激酶以及 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号转导途径有关。

NF-κB 是哺乳动物 Rel 蛋白家族成员,属 DNA 结合蛋白,具有结合某些基因启动子 κB 序列并启动靶基因转录的功能。它是一种调控多种细胞基因的快反应转录因子,主要存在于胞浆,细胞静息时极少有核表达,多数细胞中以 p50 和 p65 亚基的二聚体存在,由与其紧密结合的抑制蛋白 IκB 抑制其活性。当活化因子磷酸化 IκB 后,释放出 NF-κB 并使其活化转位到核中增强靶基因的表达。NF-κB 是细胞分裂和生存的关键调节因子,参与调控细胞周期、细胞增殖和细胞分化。已有研究发现 NF-κB 参与 MMP-9 表达的正调控过程[6];在 MMP-9 基因启动子的-561~-550 区域存在 NF-κB 的结合位点,当 NF-κB 活化后,促进 MMP-9 转录,进而引起 MMP-9 表达增加[7]。本研究结果显示,加入 NF-κB 抑制剂 PDTC 后,细胞 MMP-9 mRNA 和蛋白含量较单纯加入尿激酶时明显降低。说明尿激酶促进人血管内皮细胞表达 MMP-9 与核转录因子 NF-κB 有关。

AP-1 是指一类能与许多基因上的 AP-1 位点佛波酯应答元件结合,而在细胞中发挥多种重要作用的蛋白质家族因子[8]。它是一类二聚体的转录调控因子,主要由 Jun 和 Fos 两大类蛋白质因子家族组成。Jun 和 Fos 是通过多种亮氨酸残基之间的疏水作用即一种"亮氨酸拉链"(lucine zipper)结构结合在一起的,其作用范围十分广泛。作为反式作用因子,它们能直接或间接地识别或结合在同一顺式作用元件 8~12 bp 核心序列上,参与调控靶基因转录效率,从而在基因转录调控中有重要作用[9]。同大多数转录因子一样,AP-1 的 DNA 结合结构域和转录激活结构域在物理构象上是分离的,而转录激活结构域会受到不同信号传导通路的调控。许多不同基因的调节区域都存在 AP-1 的结合位点,MMP-9 基因就是其中之一。本研究结果显示,加入 AP-1 抑制剂 Curcumin 后, 细胞 MMP-9 mRNA 和蛋白含量较单纯加入尿激酶时明显降低。说明尿激酶促进人血管内皮细胞表达 MMP-9 与 AP-1 有关。

综上所述,尿激酶在体外可促进人血管内皮细胞表达 MMP-9。其发生机制可能为:尿激酶与其细胞表面受体(uPAR)结合并激活局部粘着斑激酶,继而激活 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号转导途径,激活的 ERK1/2 进一步活化 NF-κB 和 AP-1,最终导致 MMP-9 mRNA 转录增强和蛋白表达增高。

参 考 文 献

[1] Romanic A M, White R F, Arleth A J, et al. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size[J]. Stroke, 1998, 29(5): 1020-1030.

[2] Wang X Y, Lee S R, Arai K, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator[J]. Nat Med, 2003, 9:1313-1317.

[3] Solomatina M A, Plekhanova O S, Men'shikova M Y, et al. Urokinase increases the content and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 during in vivo constrictive arterial remodeling[J]. Bull Exp Biol Med, 2005, 139:283-286.

[4] Bischof P, Meisser A, Campana A. Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 943:157-162.

[5] Tang H, Kerins D M, Hao Q, et al. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells[J]. Biol Chem, 1998, 273(29):18268-18272.

[6] 冷启新, 刘执玉, 李瑞祥. NF-κB 抑制剂对 THP-1 粘附及 MMP-9 表达影响的实验研究[J]. 解剖科学进展, 2000, 6:363-365.

[7] Eberhardt W, Schulze M, Engels C. Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors[J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(8):1752-1766.

[8] Adcock I M. Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B[J]. Monaldi Arch Chest Dis, 1997, 52(2):178-186.

[9] Hiroi N, Nestler E J. Nuclear memory: gene transcription and behavior[J]. Adv Pharmacol, 1998, 42:1037-1041.

(责任编辑:冉明会)