

## 细胞因子对血管平滑肌细胞MM P-2 基因表达的诱导及其作用机制研究\*

韩梅 温进坤\*\*

(河北医科大学基础医学研究所生化研究室, 石家庄 050017)

**摘要** 为了探讨血管平滑肌细胞(VSMC)基质金属蛋白酶-2(MMP-2)基因的表达调控机制,利用Northern印迹杂交和MMP-2活性酶图分析检查bFGF、TNF- $\alpha$ 和L-1 $\beta$ 对VSMC MMP-2基因表达的影响,应用电泳迁移率改变实验(EMSA)和CAT分析对其作用机制进行研究。结果证实,3种细胞因子均能显著诱导MMP-2基因表达,其作用强度依次为bFGF> TNF- $\alpha$ > L-1 $\beta$ 。将MMP-2基因5'侧翼-619~19 bp调控序列克隆进携带报告基因的重组质粒pSV0-CAT后,经转染VSMC及CAT分析显示,在上述3种细胞因子的作用下,该调控序列可激活cat基因表达,三者促进cat表达的活性与其诱导VSMC表达MMP-2的结果相一致;EMSA结果显示,被bFGF和TNF- $\alpha$ 刺激的VSMC中产生与该基因调控区序列特异结合的转录调控因子。提示细胞因子除可激活VSMC细胞周期调节基因表达外,还可通过诱导MMP-2表达而发挥其对细胞外基质代谢的调节作用及参与VSMC迁移的启动过程;细胞因子对VSMC MMP-2基因表达的诱导作用是通过促进转录调控因子的合成或活化而实现的。

**关键词** 基质金属蛋白酶-2, 表达调控, 血管平滑肌细胞, 细胞因子

中图分类号 Q78

## Study on Expression Mechanisms of MMP-2 Gene Induced by Cytokines in Vascular Smooth Muscle Cells

HAN Mei, WEN Jin-kun

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is a key enzyme for degradation of extracellular matrix components. To study on expression mechanisms of MMP-2 gene induced by cytokines, the 5'-flanking region (-679~19) of rat MMP-2 gene was amplified and then inserted into pSV0-CAT plasmids. The activity of MMP-2, level of MMP-2 mRNA and specific transcription factors interaction with cis-acting elements were observed by zymographic analysis, Northern blotting, gel shift assay, reporter gene assay and Southwestern blotting. The results indicated that expression and secretion of MMP-2 were significantly enhanced by bFGF, TNF- $\alpha$  and L-1 $\beta$  in vascular smooth muscle cells (VSMC). Similar stimulatory effects were observed by CAT assay in VSMC transfected with the recombinant reporter plasmids. The CAT activities induced by bFGF, TNF- $\alpha$  and L-1 $\beta$  were 2.18, 1.78 and 1.43 times as high as that of the control, respectively. Further study confirmed that the nuclear extracts from VSMC stimulated with the cytokines had binding activities to the -679~19 bp region of MMP-2 gene. The 76 kD and/or 47 kD binding factors were detected by Southwestern blot. The binding activity of these transcription factors was coinci-

\* 国家及河北省自然科学基金资助项目(39770312)

\*\* 联系人 Tel: (0311)6044121-5563, Fax: (0311)6048177, Email: WJK@hebmu.edu.cn

韩梅,女,1961年2月生,博士,教授

收稿日期:1999-04-28,修回日期:1999-06-21

dent with the level of MMP-2 expression in VSMC. These observations suggested that the transcription factor could be activated by the mitogen bFGF or the inflammatory TNF- $\alpha$  and L-1 $\beta$ . The induction and binding to cis-acting element of these factors might play an important role in regulation of MMP-2 gene expression.

**Key words** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), Expression regulation, Vascular smooth muscle cell, Cytokine

血管平滑肌细胞(VSMC)增殖与迁移是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等心血管病共同的发病基础.已经证实,血管受损部位多种细胞所释放的生长因子和细胞因子对VSMC增殖与迁移的诱导作用取决于一系列细胞周期调节基因的协同激活<sup>[1]</sup>.近年发现,细胞外基质降解也是VSMC中膜向内膜迁移的必要条件之一<sup>[2]</sup>.我们前文报道,降解基底膜主要结构成分的基质金属蛋白酶-2(MMP-2,亦称IV型胶原酶或明胶酶A)在VSMC增殖与迁移及胶原转换过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>.然而,刺激细胞增殖与迁移的细胞因子和生长因子是否也调节MMP-2表达以及它们调节MMP-2表达的规律、特点及作用机制如何?据此,本文在以往研究的基础上,进一步观察bFGF、TNF- $\alpha$ 和L-1 $\beta$ 对VSMC MMP-2基因表达的影响并探讨其作用机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

报告基因载体pSV0-CA T、pCMV  $\beta$ 和MMP-2 cDNA 探针为本室保存;PCR引物由上海生工生物工程公司合成;T4 DNA 连接酶为Bio labs 产品;各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司;<sup>3</sup>H-乙酰CoA 购自Amersham 公司;bFGF、TNF- $\alpha$ 和L-1 $\beta$ 系北京邦定生物工程公司产品;其它化学及生化试剂为进口或国产分析纯.

### 1.2 方法

**1.2.1 MMP-2 基因5侧翼DNA片段的制备:**按文献[4]报道的大鼠MMP-2基因调控区DNA序列合成PCR引物,正义链和反义链引物序列分别为5'-TTCTGCTTTGGACTCTCATG-3',5'-AGACCAA TCGTGCCTCCAT-3',两引物之间的DNA片段长700 bp(-619~19),以大鼠基因组DNA为模板进行PCR扩增.然后,再以扩增产物为模板用中间引物5'-AGTTCTGGA TGACAC-3'与正义链引物配对再次PCR,以鉴定扩增产物的特异性.将700 bp PCR产物末端平头化后,直接克隆入pSV0-CA T质粒的EcoR V位点,用Pst I筛选出正向插

入的阳性克隆,即重组的pMMP-CA T报告质粒.

**1.2.2 细胞转染和CA T活性检测:**采用磷酸钙-DNA共沉淀法将25  $\mu$ g pMMP-CA T质粒和10  $\mu$ g pCMV  $\beta$ (内对照)转染传代培养的大鼠VSMC(3~5代).24 h后,分别加入bFGF(8 U/ml)、TNF- $\alpha$ (3 000 U/ml)和L-1 $\beta$ (3 000 U/ml),继续培养24 h,收集细胞,制备细胞提取液,用液闪液扩散法进行CA T活性检测<sup>[5]</sup>.

**1.2.3 RNA提取和Northern印迹杂交:**VSMC经上述三种细胞因子刺激24 h后,提取总RNA,取20  $\mu$ g RNA进行电泳分离,并转移、固定至尼龙膜上,与 $\alpha$ -<sup>32</sup>P标记的MMP-2 cDNA探针进行杂交.

**1.2.4 MMP-2活性测定:**按文献[6]进行.取bFGF、TNF- $\alpha$ 和L-1 $\beta$ 处理24 h的VSMC培养液各20  $\mu$ l,用含明胶的SDS-PAGE分离后,依次进行复性、保温、染色和脱色,观察MMP-2对凝胶中所含明胶的降解活性,以明胶降解所形成的白色条带亮度表示MMP-2活性.

**1.2.5 核蛋白制备和电泳迁移率改变分析(EMSA):**按文献[7]进行.取5~10  $\mu$ g核蛋白,与3'末端标记的MMP-2基因5侧翼区DNA片段结合后,进行电泳迁移率改变实验(EMSA).

**1.2.6 Southwestern印迹分析:**取100  $\mu$ g核蛋白经SDS-PAGE分离后,用电转移法印迹到NC膜上,而后将NC膜置于封闭液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1%脱脂奶粉, 100  $\mu$ g/ml 鲑精DNA, 1  $\times$  Denharts),室温放置1 h,之后,加入3'末端标记的MMP-2基因5侧翼DNA片段,室温反应2 h;用洗膜液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 0.2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA)于室温洗膜20 min, -70  $^{\circ}$ C放射自显影.

## 2 结果

### 2.1 MMP-2基因5侧翼区DNA片段的合成及重组表达载体的构建与鉴定

如Fig. 1所示,第一次PCR扩增产物的长度为700 bp,该产物经BamH I切割后产生560 bp和

140 bp 两种片段, 与文献报道的长度一致<sup>[4]</sup>. 以该产物为模板, 用正义链引物与中间引物配对再次 PCR, 可扩出一 480 bp 的 DNA 片段, 其大小与预期的结果相同. 揭示该实验所得到的 DNA 片段是

MMP-2 基因 5' 侧翼区的 DNA 序列. 将 700 bp 片段平端插入 pSV0-CAT 报告基因载体, 含正向插入片段的重组质粒用 *Pst*I 可切出一 400 bp 片段 (Fig 1).

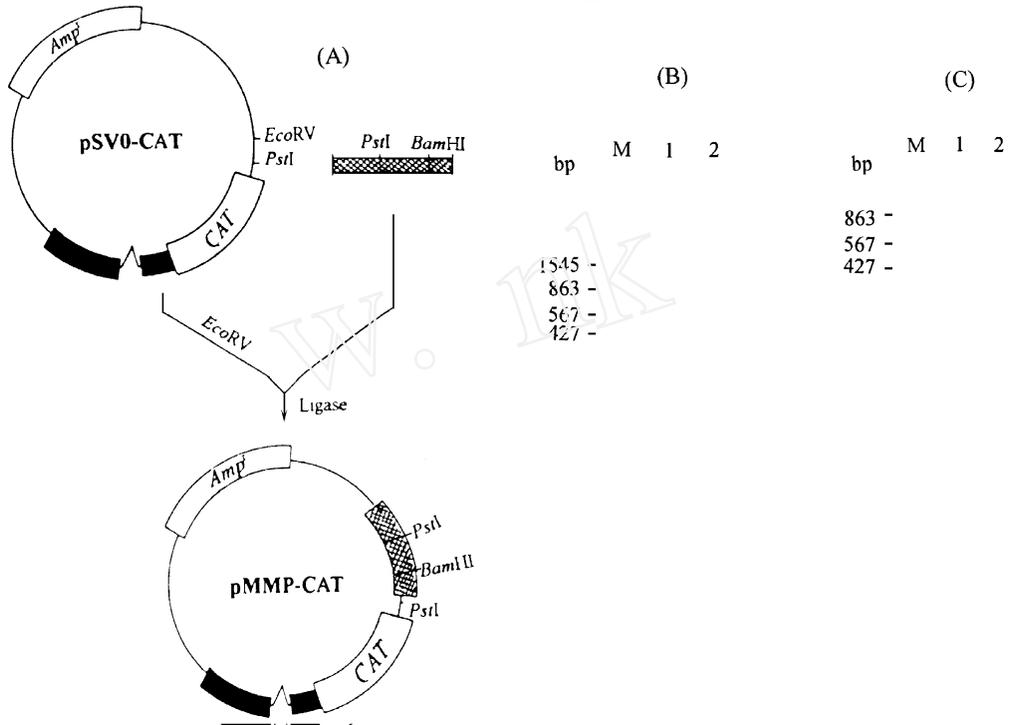


Fig 1 Construction and identification of pMMP-CAT (A) Construction of pMMP-CAT; (B) M: Marker, 1. pMMP-CAT/*Pst*I; 2. The first PCR products; (C) M: Marker, 1. The second PCR products; 2. The first PCR products/*Bam*HI

### 2.2 细胞因子对MMP-2 基因表达的影响

Northern 印迹杂交显示, VSMC 受 bFGF、TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 刺激 24 h 后, 其MMP-2 基因表达活性均有不同程度的升高. 杂交信号经光密度扫描定量, 在所观察的 3 种因素中, 以 bFGF 对MMP-2 表达的诱导作用最强, 其信号强度是对照组的 5.16 倍, 同时加入地塞米松可解除 bFGF 的诱导作用; L-1 $\beta$ 的作用较弱, 仅是对照的 1.53 倍, TNF- $\alpha$  介于二者之间 (Fig. 2).

Fig 3 是用含明胶 SDS-PA GE 对MMP-2 活性进行分析的结果. 从图可见, MMP-2 有 65 kD (活性形式) 和 72 kD (酶原) 两种形式, 其中 65 kD 处的明胶分解条带在各组之间无明显差异, 但是, 3 种细胞因子明显提高 72 kD 的活性, 活化强度与 mRNA 含量变化相一致.

### 2.3 细胞因子对 pMMP-CAT 表达的影响

用含有 MMP-2 基因 5' 侧翼区 DNA 片段的 pMMP-CAT 质粒转染 VSMC, 检测在细胞因子作

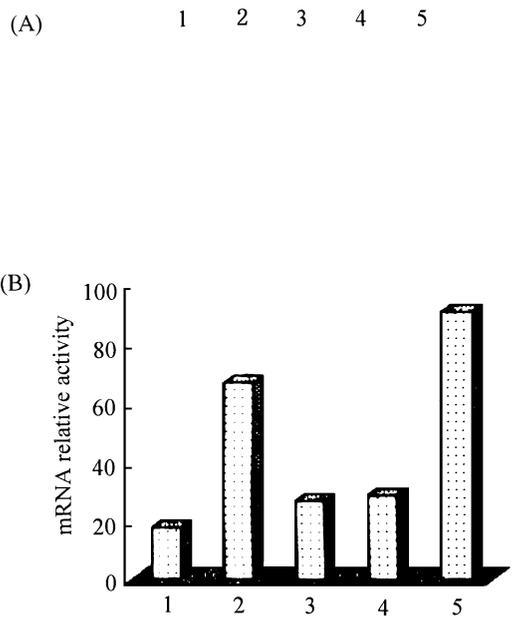
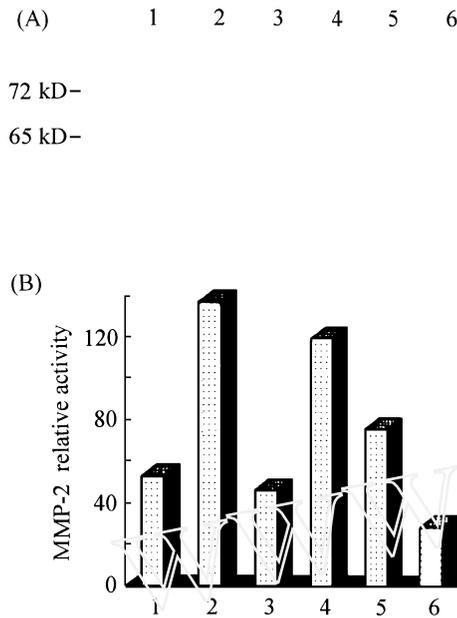


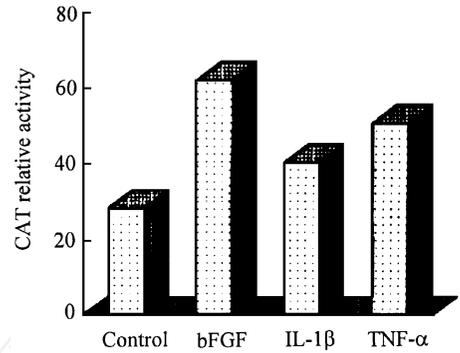
Fig 2 Effect of cytokines on VSMC MMP-2 expression (A) Northern blot; (B) Densitometric scanning 1. Control; 2. TNF- $\alpha$  3. L-1 $\beta$  4. bFGF+ Dex; 5. bFGF



**Fig 3** Gelatin zymogram analysis of MMP-2 in the conditioned media from VSMC  
 (A) SDS-PAGE; (B) Densitometric scanning  
 1. Control; 2. bFGF; 3. bFGF + Dex; 4. TNF-α; 5. IL-1β; 6. Dex

用下, 该调控区启动 *cat* 基因表达的活性。结果表明, 在 bFGF、TNF-α、IL-1β 刺激后, VSMC 所表达的 CAT 活性分别比未受刺激的对照组升高 2.18 (SE ± 0.23)、1.79 (SE ± 0.20) 和 1.43 (SE ± 0.16) 倍, 说明这 3 种细胞因子对 VSMC MMP-2 表

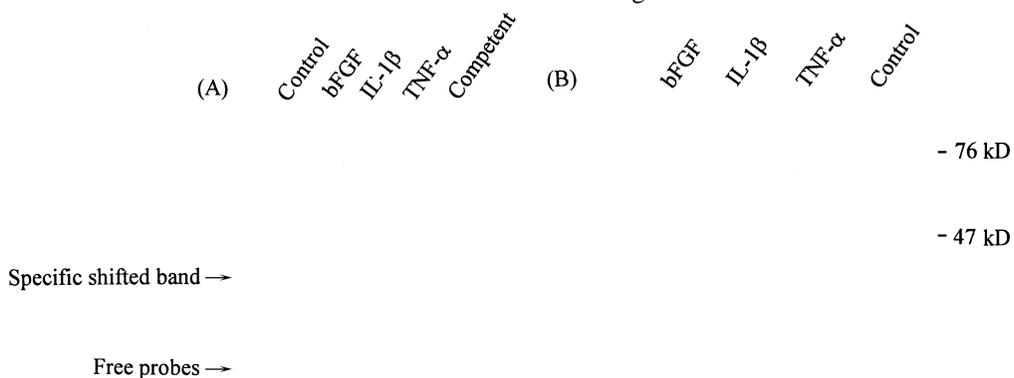
达的诱导作用是通过增强转录因子与该基因顺式元件的相互作用而实现的 (Fig 4)。



**Fig 4** MM P-2 gene promoter activity induced by cytokines

**2.4 细胞因子对 MMP-2 基因转录因子的影响**

以 MMP-2 基因 5' 侧翼区 -619~19 bp DNA 片段为探针, 与被 bFGF、TNF-α、IL-1β 处理 3 h 的 VSMC 核抽提物结合后进行 EMSA。放射自显影结果显示, 来自 bFGF 和 TNF-α 诱导的 VSMC 核提取物可与探针结合形成一条明显的电泳滞后带, 前者的信号强度高于后者, IL-1β 组的结合带不明显 (Fig 5A)。竞争结合实验证实, 加入 100 倍过量的非标记探针后, 滞后带消失, 表明探针与核蛋白的结合具有特异性。根据 Southwestern 印迹分析结果, 与探针特异结合的转录因子分子量约为 47 kD。此外, bFGF 还可诱导产生一分子量为 76 kD 的蛋白因子 (Fig 5B)。



**Fig 5** Analysis of trans-acting factors binding to MMP-2 gene cis-acting element  
 (A) EMSA; (B) Southwestern blot

**3 讨 论**

血管壁细胞外基质降解是 VSMC 迁移与增殖初期的重要步骤之一, MMP-2 是降解血管壁细胞外基质中主要结构成分 IV 型胶原的主要酶类。已有

研究表明, 大鼠主动脉内皮剥脱后 3 d, 损伤部位的 VSMC 中 MMP-2 基因表达活性明显升高, 损伤 7 d 后, 才出现 VSMC 从中膜向内膜迁移及其在新生内膜中的增殖<sup>[3]</sup>。血管损伤局部存在的内皮细胞、VSMC、巨噬细胞和 T 淋巴细胞等所释放的各种细

胞因子不仅刺激VSMC增殖,而且调节细胞外基质的降解过程。本文发现,体外培养的VSMC被bFGF和TNF- $\alpha$ 刺激24h后,MM P-2基因表达水平明显升高,且其表达产物可向细胞外分泌。由此表明,细胞因子通过诱导MM P-2基因表达而行使其对血管细胞外基质代谢的调节过程。所观察的3种细胞因子诱导MM P-2表达的强度依次为bFGF>TNF- $\alpha$ >L-1 $\beta$ 。地塞米松可解除bFGF对MM P-2的诱导作用,这可能是其抑制VSMC迁移与增殖的作用机制之一。

将MM P-2基因5侧翼区DNA片段(-679~19,长700bp)重组进pSV0-CAT质粒后转染VSMC,3种细胞因子诱导cat基因表达的作用虽然与其诱导MM P-2表达的作用相一致,但是,与对照相比,前者所升高的幅度远不及后者,提示细胞因子除在转录水平上促进MM P-2表达外,还有可能在转录后及翻译水平调节MM P-2表达活性。为在转录水平上探讨细胞因子诱导MM P-2表达的分子机制,本文以MM P-2基因5侧翼区DNA片段为探针,经EMSA显示,在bFGF和TNF- $\alpha$ 作用下,VSMC核内出现与探针相互作用的转录因子,且bFGF的作用强于TNF- $\alpha$ ,与二者诱导VSMC表达MM P-2的结果相吻合。Southern分析证实,被bFGF和TNF- $\alpha$ 诱导产生或激活的转录因子分子量为47kD,除此之外,前者还诱导产生一种分子量为76kD的核蛋白因子,这可能是其对MM P-2表达的诱导活性高于TNF- $\alpha$ 的原因之一。根据本实验所使用的MM P-2基因5侧翼区DNA序列中含有SP-1、AP-1、AP-2和 $\gamma$ RE顺式作用元件及细胞因子诱导产生的转录因子的分子量,我们推测,47kD的转录因子可能是原癌基因c-jun表达产物。我们用体外转录实验证实,在VSMC受bFGF刺激后60min,c-jun基因表现出较高的转录活性(结果将另文发表)。c-jun基因表达产物作为转录调控因子之一,

通过与MM P-2基因调控区中的AP-1位点结合而激活其表达。关于76kD的蛋白因子,我们正在进一步研究。总之,细胞因子对VSMC的作用具有一箭多靶的效应,可同时影响细胞外基质代谢、VSMC迁移和增殖等多个环节。

### 参考文献(References)

- 1 Fabunmi R P, Baker A H, Murray E J, Booth R F G. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kD and 72 kD gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J*, 1996, **315**: 335~ 242
- 2 Clowes A W, Reidy M A, Clowes M M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest*, 1983, **49**: 327~ 333
- 3 周秀霞,温进坤,韩梅.血管再狭窄发生过程中MM P-2表达活性与胶原转换速率的动态变化.中国生物化学与分子生物学报(Zhou Xiu-xia, Wen Jin-kun, Han Mei. The change of MM P-2 activity and collagen turnover rate during vascular restenosis development. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1999, **15**(6): 997~ 1001
- 4 Harendza S, Pollock A S, Mertens P R, Lovett D H. Tissue-specific enhancer-promoter interactions regulate high level constitutive expression of matrix metalloproteinase 2 by glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 18786~ 18796
- 5 韩梅,温进坤.大鼠NOS基因上游调控区在转录激活中的作用.中国生物化学与分子生物学报(Han Mei, Wen Jin-kun. Role of 5'-flanking region of rat NOS gene in transcriptional activation. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1998, **14**(5): 498~ 501
- 6 孙红霞,温进坤,韩梅.大鼠不同年龄和组织中明胶酶活性的比较研究.河北医科大学学报(Sun Hong-xia, Wen Jin-kun, Han Mei. The comparison of gelatinase activity in different tissue of rats of different age. *J Hebei Med Univ*), 1998, **19**: 350~ 351
- 7 韩梅,温进坤. L-1对正常和自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞NOS基因转录调控因子的影响.生物化学杂志(Han Mei, Wen Jin-kun. Effect of L-1 on the transcript control factors of NOS gene in VSMC of SHR and WKY rat. *Chin Biochem J*), 1997, **13**(6): 644~ 648