

LPS 对金属蛋白酶的诱导表达及中药热毒清的保护机制

The Induced Expression of Metalloproteinases by LPS and the Protection Mechanism of Chinese Herb "Reduqing"

张玉心¹/马 涛¹/韩 玲²/

丁廷波²/杨渝珍²

(1. 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室,

安徽 蚌埠 233003; 2. 华中科技大学同济

医学院生物化学与分子生物学系, 湖北

武汉 430030)

ZHANG Yu-xin¹, MA Tao¹, HAN Ling²,

DING Ting-bo², YANG Yu-zhen²

(1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Bengbu

Medical College, Anhui 233003, China; 2. Department of

Biochemistry & Molecular Biology, Tongji Medical College,

HUST, Wuhan 430030, Hubei, China)

【摘要】背景与目的: 以肿瘤坏死因子(Tumour necrosis factor- α , TNF- α)前体向分泌型 TNF- α 转化过程为目标, 探讨 HL-60 细胞中金属蛋白酶(Metalloproteinases, MPs)家族的基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)和解整合素金属蛋白酶(A disintegrin and metalloproteases, ADAM)两亚类成分参与炎症因子分泌的机理以及中药热毒清(Reduqing, RDQ)抗炎保护功效的分子机制。材料与方法: 采用细胞毒性-MTT 检测法、原位杂交、PAG-底物(明胶)电泳等方法分别检测 HL-60、U937 和小鼠腹腔巨噬细胞在大肠杆菌内毒素(LPS)及 RDQ 的作用下, MMPs、ADAM17、TNF- α 基因转录水平和酶活性的变化。结果: ①LPS 刺激后, 不同类型细胞的 MMPs 的表达量及电泳酶谱随刺激时间的延长变弱, 而 HL-60 细胞培养上清的酶谱变化正好相反; ②在 HL-60 细胞中与 MMPs 相比, ADAM17 在前体 TNF- α (pro-TNF- α)向分泌型 TNF- α (s-TNF- α)转换中起着重要作用; ③RDQ 在细胞杀伤效应上、在 ADAM17 mRNA 表达水平上均能明显抑制 LPS 所诱导的 s-TNF- α 表达和分泌的增高作用($P < 0.01$)。结论: ①在 LPS 刺激的 TNF- α 分泌中, MPs 家族的 ADAM17 起主要作用, 而针对解整合素结构域(Disintegrin)的探针对排除 MMPs 的干扰, 真实反映 ADAM17 mRNA 表达水平更具特异性; ②纯中药注射液 RDQ 的抗炎、解毒作用的靶标之一是拮抗 LPS 诱导的 TACE mRNA 活性增加。ADAM17 成为炎症机制和治疗研究的新靶标。

【关键词】基质金属蛋白酶; 肿瘤坏死因子转换酶; 肿瘤坏死因子; 大肠杆菌内毒素; 热毒清

中图分类号: R392.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)04-0294-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study the function and role of two subclasses in MPs family, MMPs and ADAMs, for processing of precursor TNF- α , and explore the anti-inflammatory mechanisms of Chinese herbal preparation Reduqing (RDQ). MATERIAL AND METHODS: The *in vitro* study was carried out on HL-60、U937 cells and macrophages of murine abdominal cavity treated by LPS and RDQ. Using MTT colorimetry, *in situ* hybridization and Gelatin-PAGE to detect transcriptional levels of MMPs, ADAM17, TNF- α mRNA and the changes of enzymatic activity. RESULTS: ①After stimulation by LPS, the expression level of MMPs and electrophoresis zymogram on gelatin-PAGE decreased with increased stimulation time; ②ADAM17 (TACE) played a more important role in precursor processing of proTNF- α of HL-60 cells compared with MMPs; ③RDQ had obvious inhibitory effects on enhancing secretion of TNF- α induced by LPS stimulation ($P < 0.01$) at the transcriptional level of ADAM17 mRNA in HL-60 cells. CONCLUSION: ①ADAM17 of MPs family had a main role in TNF- α secretion induced by LPS. It is a key step to choose and design the correct probe or primers aiming specifically at the disintegrin domain for ADAM17, in order to eliminate the interference of MMPs and reflect the true expression level of ADAM17 gene; ②The mechanism of RDQ against inflammation may be its inhibitory effect on ADAM17 mRNA expression activated by LPS. ADAM17 is able to represent the novel target for studying the mechanism and the therapeutic pathway for inflammation.

收稿日期: 2005-06-21; 修订日期: 2005-12-12

基金项目: 安徽省教育厅资助课题 (No. 2005kj285), 蚌埠医学院科研项目 (No BY0408)

作者简介: 张玉心 (1976-), 女, 安徽省蚌埠人, 讲师, 硕士, 研究方向: 分子免疫和分子肿瘤。Tel: 86-552-3175242 E-mail: zyx5460@yahoo.com.cn

【KEY WORDS】 matrix metalloproteinases; TNF- α ; Lipopolysaccharides; Reducing

目前已知对肿瘤坏死因子(Tumour necrosis factor- α , TNF- α)前体加工的金属蛋白酶有两个主要的亚类:基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)和解整合素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteases, ADAM)^[1]。多数MMPs由细胞分泌至基质,其中的MMP2、7、9等除了以粘连蛋白、纤维结合蛋白等基质成分为水解底物外,还参与TNF- α 的前体加工^[2];而定位于膜表面的ADAM17,又称肿瘤坏死因子- α 前体转换酶(Tumour necrosis factor- α converting enzyme, TACE),以分子含有解整合素结构域(Disintegrin domain)为基本特征^[3]而归属于ADAM家族。本文用体外培养的HL-60细胞为模型,分别用大肠杆菌内毒素(Lipopolysaccharides, LPS)(促炎)^[4]、中药热毒清(Reducing, RDQ)(抗炎)^[5]分时相直接刺激细胞后,观察ADAM17和MMPs在TNF- α 前体转换中的反应性差异,以深入了解ADAM17在炎症起始、发展中的表现,有助于抗炎药物的筛选和开发,并为炎症治疗提供一种新思路和新靶标。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂 人急性早幼粒白血病细胞株HL-60,成单核白血病细胞株U937和鼠成纤维细胞L929,均由本室保存,小鼠腹腔巨噬细胞按常规方法用可溶性淀粉诱导富集后从腹腔采取。地高辛标记-原位杂交试剂盒(武汉博士德公司),LPS(Sigma公司);100%复方中药热毒清(RDQ)注射液主要成分为大青叶、金银花、鱼腥草、蒲公英等组成,由华中科技大学同济医院中西医结合研究所研制^[6]。明胶(上海华美生物试剂公司),聚丙烯酰胺凝胶电泳、细胞培养、MTT法细胞增殖实验等均按常规试剂添置。含金属蛋白酶区和解整合素区的pGEX-ADAM17重组质粒由本室构建。

1.2 方法

1.2.1 LPS、RDQ对HL-60细胞的作用

HL-60细胞悬浮于24孔培养板和培养瓶中培养,待细胞生长良好并达到($10^4 \sim 10^5$)/ml时,分为LPS组和LPS+RDQ 2个实验组。LPS组加LPS 200 ng/ml,于0~12 h不同刺激时间收集细胞,离心后收集培养上清液于-20℃冻存,细胞用等渗PBS清洗后收集。LPS+RDQ组则为LPS刺激细胞6 h后加入RDQ(以1:30、60、120、240比例稀释原液,原液2 ml/瓶)作用6 h。

1.2.2 培养上清液中sTNF- α 活性检测

清液sTNF- α 的胞毒活性采用细胞杀伤实验检测,

以L929为靶细胞,效靶比为10:1,MTT法检测残留细胞活性并计算细胞杀伤率,方法见文献^[7]。

1.2.3 PAG-底物胶电泳测定MMPs活性

分别收集LPS分时相刺激的HL-60、U937、小鼠腹腔巨噬细胞,用PBS清洗后超声破碎获得细胞裂解液,采用改良的底物胶电泳法,测定胞浆内及分泌至细胞外的MMPs活性。具体操作见文献^[8]。

1.2.4 探针标记和原位杂交检测

ADAM17-ME、ADAM17-DIS cDNA片段经PCR扩增模板为pGEX-ADAM17重组质粒,PCR引物序列见文献^[9];用作探针的对应扩增片段分别命名为ME和DIS。按试剂盒的操作步骤要求,随机引物法进行地高辛标记。制作不同作用条件下的HL-60细胞涂片,4%多聚甲醛固定,干燥后进行杂交显色,详见说明书。

2 结果

2.1 LPS对不同类型细胞系MMPs水解活性的影响

将收集的3种细胞裂解液分别进行蛋白电泳,结果发现LPS刺激后不同的细胞有不同的酶谱:HL60细胞的酶谱的数量和活性随刺激时间的延长而变弱(图1A中左侧图是PAG-底物胶电泳结果,由于MMP具有水解明胶底物的酶活性,经考马斯亮蓝染色后在深蓝的凝胶背景上出现透明的条带;右侧图为经过相同处理的细胞裂解液同时采用普通PAGE电泳结果,以做对照。);U937也有随时间而变的酶谱变化,但不如HL60细胞明显(图1B);大鼠腹腔巨噬细胞酶谱的相对分布和强度也有变化(图1C)。

由于以HL60细胞作为模型,多数MMPs是分泌型的,故还对不同时相的细胞培养上清进行底物胶电泳,与胞浆裂解物的电泳结果恰巧相反(图2),随着LPS刺激时间的延长,分泌的MMPs量随之增加,而RDQ的抑制作用却十分明显(泳道4)。

2.2 LPS、RDQ对HL-60细胞sTNF- α 分泌的影响

LPS按200 ng/ml的浓度预先刺激HL-60细胞6 h,然后加入RDQ于细胞中作用不同时间,观察LPS、RDQ对sTNF- α 分泌的影响。表1所示加RDQ组sTNF- α 分泌明显下降,共作用6 h的杀伤率与LPS组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)表明:RDQ对LPS刺激增高的sTNF- α 具有明显的抑制效果。

2.3 LPS对ADAM17 mRNA表达的影响及RDQ的保护效应



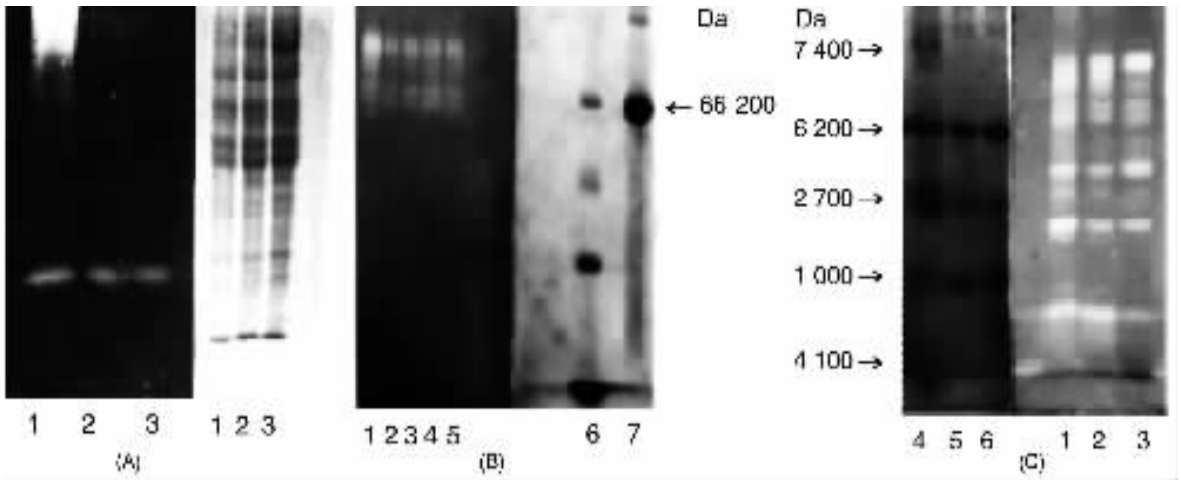


图 1 HL-60、U937 和腹腔巨噬细胞的 MMPs 对 LPS 刺激的反应

Figure 1 Influence of MMPs in HL-60, U937 and peritoneal macrophage cells of mice stimulated LPS. (A) HL-60 cells. 1: LPS 0 h; 2: LPS 6 h; 3: LPS 12 h; (B) U937 cells. 1: LPS 0 h; 2: LPS 3 h; 3: LPS 6 h; 4: LPS 12 h; 5: LPS 24 h; 6, 7: protein marker; (C) peritoneal macrophage cells of mice. 1: LPS 0 h; 2: LPS 6 h; 3: LPS 12 h; 4, 5, 6: protein marker

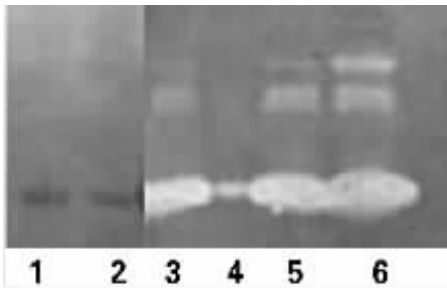


图 2 LPS、RDQ 作用的 HL-60 细胞培养上清 MMPs 的活性变化

Figure 2 Effect of LPS and RDQ on MMPs in suspended of HL-60 cells. 1、2: control (BSA); 3: LPS 3 h; 4: LPS + RDQ; 5: LPS 6 h; 6: LPS 12 h

表 1 LPS、RDQ 对 HL-60 细胞 sTNF- α 分泌的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibition of RDQ and LPS on sTNF- α secretion in HL-60 cells ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Groups	Dilution	sTNF- α activity (cell death rate $\times 10^{-2}$)			
		2 h	4 h	6 h	8 h
LPS		13.21 \pm 4.78	18.24 \pm 1.54	30.80 \pm 3.30	26.10 \pm 3.46
LPS + RDQ	1:240	8.80 \pm 1.95*	19.18 \pm 1.42	22.96 \pm 2.20	20.13 \pm 1.54
	1:120	7.54 \pm 4.30*	20.13 \pm 1.54	18.55 \pm 3.25	22.01 \pm 1.54
	1:60	7.55 \pm 1.54*	13.84 \pm 1.54	12.55 \pm 3.25	14.45 \pm 2.58
	1:30	4.40 \pm 1.54*	3.46 \pm 4.03*	3.45 \pm 0.47*	8.18 \pm 3.51*

Compared with various LPS stimulation groups, * $P < 0.01$.

分别用 ME 探针和 DIS 探针观察 LPS 和 RDQ 对 MPs 中不同亚类的 mRNA 表达状况的调节。

原位杂交实验成功地在 HL-60 细胞内检测出棕褐色阳性杂交信号, 位于胞浆、胞核及核周(图 3), 对细胞杂交信号强度(平均光度值)进行图象分析的结果(表 2)显示: ①在 LPS 刺激 6 h, 12 h 时, DIS 探针杂交的信号强度与对照组(LPS 0 h)比依次增加 38.4%, 76.8% ($P < 0.01$); 而 ME 探针杂交信号增长率仅分别为 4%, 16.1% ($P < 0.01$), 明显低于 DIS 的信号强度; 而在无 LPS 刺激对照组(LPS 0 h 组)中也反映出两种探针的检测信号强度相差也很大, 说明针对不同结构域的探针检测的靶分子特异性有所不同。ME 针对所有 MPs (MMPs + ADAM) 家族成员, DIS 仅特异性地针对 ADAM17 分子。②以 DIS 探针进行细胞原位杂交, 观察 LPS 对 HL60 细胞的激活效应及 RDQ 的抑制作用, RDQ + LPS 组的阳性杂交信号明显受到 RDQ 的抑制, 也说明 RDQ 的作用位点在 ADAM17 表达的 mRNA 的水平上。

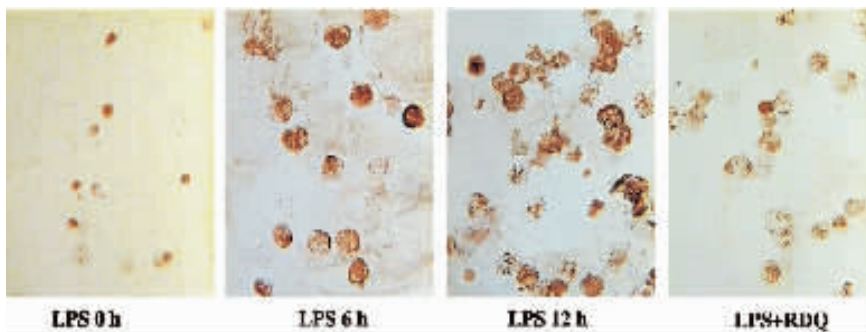


图 3 LPS 和 RDQ 对 HL-60 细胞 ADAM17 mRNA (DIS 探针) 表达调节的原位杂交结果 ($\times 400$)

Figure 3 The effect of LPS and RDQ on expression of ADAM17 (DIS probe) ($\times 400$)

表 2 不同结构域探针杂交结果的影响

Table 2 Influence of different probes on the result of ISH

Groups	Cell absorbance ($\times 10^{-2}$, $\bar{x} \pm s$)	
	DIS	ME
LPS 0 h	15.53 \pm 2.80	17.72 \pm 5.21
LPS 6 h	21.50 \pm 8.34	18.50 \pm 7.82
LPS 12 h	27.45 \pm 6.52	20.57 \pm 9.25
LPS + RDQ	18.79 \pm 4.95	15.91 \pm 5.17

3 讨论

已知水解 pro-TNF- α 的蛋白酶为 II 型膜蛋白, 属于金属蛋白酶超家族 (MPs), 该家族的 MMPs 和 ADAMs 两个家族以是否含有解整合素结构域 (disintegrin domain) 为主要区别。目前已发现 ADAM 家族包括 35 类膜型和 8 类可溶性分子, ADAMs 中的 ADAM-17 又名 TACE, 1997 年首次报道其氨基酸序列时^[10], 曾被认为是特异性很强的 pro-TNF- α 的加工酶。由于能与 Zn^{2+} 结合的金属蛋白酶结构域 (ME-domain) 是 MPs 家族的同源序列。MMPs 中的 MMPs-2、3、7、9 等也参与 TNF- α 的加工; MMPs 的功能主要是参与肿瘤转移、血管再生、受精卵着床等一系列与细胞基质成分的水解有关的重要生命活动; 而 ADAM17 与膜表面分子的脱落和加工有关, 因此, 在研究炎症病理机制时, 有必要将两者区分开来^[11]。

LPS 是 G⁻菌细胞壁的成分, 它在对细胞或组织损伤过程中是使效应细胞激活的信号, 诱导效应细胞分泌过量的炎性细胞因子。本试验将 LPS 与细胞共孵育, 在体外模拟炎症发生的实际情况。从实验结果看出, LPS 使 HL-60、U937 及腹腔巨噬细胞裂解物中 MMPs 酶谱都有不同程度的减弱, 提示炎症发生与 s-TNF- α 的分泌过量相关。本实验是以 HL-60 细胞为重点细胞模型进行分析, 明显看出随着 LPS 刺激时间的延长, 胞内具有明胶水解特异性的 MMPs 的活性 (电泳条带数和亮度) 持续减弱, 而多数被分泌到培养上清中激活发挥作用。

在上述研究基础上, 我们选用了针对 ADAM17 的探针, 以排除 MMPs 的影响, 观察 LPS 和 RDQ 对 ADAM17 基因表达的诱导和拮抗作用, 以往的临床观察和实验研究表明, RDQ 具有抗炎症、抗感染、抗病毒及抗内毒素等多种功效, 是通过抑制细胞因子的激活, 降低 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎性细胞因子的毒性作用而实现的^[12]。我们对 HL-60 细胞 s-TNF- α 分泌的检测和细胞原位杂交检测的结果, 进一步从分子水平证明 RDQ 抑制 s-TNF- α 分泌的作用机制, 在于其对抗 LPS 所诱导的 ADAM17 mRNA 的高

表达, 对了解炎症机制和逆转炎症过程有理论和实践意义, 为进一步开发与筛选抗炎类药物提供了好的药靶。

参考文献:

- [1] Renata M, Monica B, Joanna B. Structure and function of TNF- α converting enzyme[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2003, 50(3): 625 - 645.
- [2] Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(5): 602 - 608.
- [3] Reddy P, Slack JL, Davis R, et al. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(19): 14 608 - 14 614.
- [4] Li lingbo, Yang Yuzhen, Wang Zhen, et al. Study of the influence of LPS on the TACE gene expression and its function [J]. *J HUST(Med.Sci)*, 2002, 22(1): 5 - 8.
- [5] 王开富, 李鸣真, 杨渝珍, 等. 热毒清 (RDQ) 对 TNF α 和 TACE mRNA 表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(4): 283 - 285.
- [6] 李鸣真, 叶望云. 中药热毒清注射液的研究 [J]. *中药药理与临床*, 1985, 1(2): 76 - 77.
- [7] Ding Tingbo, Li lingbo, Zhu Kongli, et al. Relationship between the Increase of Secretion of sTNF α Induced by Lipopolysacchrides and the Enhanced Expression of TACE mRNA in HL-60 Cells and Adhesive Cells from Human Spleen [J]. *J Tongji Med Univ*, 2001, 21(4): 265 - 268.
- [8] 丁廷波, 杨渝珍, 韩玲, 等. 基质金属蛋白酶活性测定的改良底物胶电泳法 [J]. *同济医科大学学报*, 2000, 29(1): 43 - 44.
- [9] 王开富, 韩玲, 杨渝珍, 等. 人脾贴壁细胞中 TNF α 转换酶 cDNA 的克隆以及 LPS 对其表达的影响 [J]. *同济医科大学学报*, 2000, 29(6): 564 - 566.
- [10] Moss ML, Jin SL, Milla ME, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor necrosis factor-alpha [J]. *Nature*, 1997, 385(6618): 733 - 736.
- [11] Black RA, Durie FH, Otten-Evans C, et al. Relaxed specificity of matrix metalloproteinases (MMPs) and timp insensitivity of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production suggest the TNF-alpha converting enzyme is not an MMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225(2): 400 - 405.
- [12] 吴朝栋, 李鸣真, 张艳萍, 等. 中药热毒清对内毒素 DIC 家兔血浆肿瘤坏死因子- α 血细胞介素-6 水平影响的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1995, 15(6): 356 - 358.

