脂多糖对人类风湿性关节炎滑膜细胞基质金属蛋白酶-9 表达的影响

刘柏合[1] , 李怡棠[1] , 沈 放[1] , 赵丹阳[2] , 程桂芳[1*]

(1 . 中国医学科学院 、中国协和医科大学 药物研究所 , 北京 100050 ; 2 . 北京市中西医结合医院 , 北京 100039)

摘要 : 目的 研究脂多糖(LPS) 对人类风湿性关节炎(RA) 成纤维状滑膜细胞(FLS) 基质金属蛋白酶-9(MMP-9) 表达的影响。方法 明胶酶谱法测定 MMP-9 酶活性 ; Western blot 法测定 MMP-9 蛋白的表达 ; RT-PCR 法测定 MMP-9 mRNA 的表达。结果 LPS 处理对 FLS 中 MMP-9 表达无显著影响 ;LPS 刺激的 U937 细胞培养上清液可明显增强 FLS 中 MMP-9 酶活性 、蛋白分泌及 mRNA 表达 ;地塞米松可显著抑制上述变化 ,且其抑制作用随浓度的增加而增强。结论 LPS 对 FLS 中 MMP-9 表达无直接影响 ,LPS 刺激的 U937 细胞上清液使 FLS 中 MMP-9 表达增加 ,而地塞米松能抑制 MMP-9 的变化。

关键词 : 成纤维状滑膜细胞 ; U937 细胞 ; 基质金属蛋白酶-9 ; 脂多糖 ; 地塞米松

中图分类号 : R967 文献标识码 : A 文章编号 : 0513 - 4870(2003) 04 - 0245 - 05

Effect of lipopolysaccharide on expression of matrix metalloproteinase-9 in human synoviocyte from patients with rheumatoid arthritis

LIU Bai-he[1] , LI Yi-tang[1] , SHEN Fang[1] , ZHAO Dan-yang[2] , CHENG Gui-fang[1*]

(*1 . Institute of Materia Medica , Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College , Beijing 100050 , China ; 2 . Department of Kidney Diseases , Beijing Integrated Traditional and Western Hospital , Beijing 100039 , China*)

Abstract: **Aim** To study the effects of lipopolysaccharide (LPS) , the supernatant of U937 cells stimulated with LPS and dexamethasone on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in the synoviocyte from patients with rheumatoid arthritis(RA) . **Methods** Fibroblast-like cells (FLS) from the joint tissue of patients with rheumatoid arthritis were cultured and incubated for 24 h with LPS (1 mg·L^{-1}) or the supernatant of U937 cells stimulated with LPS (1 mg·L^{-1}) for 24 h . Dexamethasone was added to the supernatant of U937 cells and FLS was incubated for 24 h . The activity of MMP-9 was analyzed by gelatin zymography . Protein expression of MMP-9 was detected by Western blot using special polyclonal antibodies . The mRNA expression of MMP-9 was detected by RT-PCR . **Results** The expression of MMP-9 was not markedly changed in FLS treated with LPS . The MMP-9 activity , MMP-9 secretion and MMP-9 mRNA expression were significantly increased in FLS cultured with the supernatant from U937 cell treated with LPS . Dexamethasone markedly inhibited the activity , protein secretion and mRNA expression of MMP-9 in FLS cultured with the supernatant from U937 cell stimulated with LPS , and the inhibitory effects were increased as the concentration of dexamethasone increased . **Conclusion** LPS did not directly affect the expression of MMP-9 in FLS , but it was found to indirectly cause the increase of MMP-9 expression in FLS by stimulating U937 cell . Dexamethasone was found to inhibit this increase of MMP-9 expression .

Key words: fibroblast-like synoviocyte ; U937 cell ; lipopolysaccharide ; matrix metalloproteinase-9 ; dexamethasone

收稿日期 : 2002-04-29 .

* 通讯作者 Tel : 86 - 10 - 63165192 , Fax : 86 - 10 - 63017757 , E-mail : chenggf@imm.ac.cn

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis , RA) 是一种常见的以关节组织慢性炎症性病变为主要表现的全身性疾病。研究发现 RA 关节软骨和骨的损伤主要是由于滑膜细胞的活化和增生引起[1~3]。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9 , MMP-9) 是一种主要降解 IV 型胶原的基质蛋白水解酶,而 IV 型胶原是组成血管基底膜和细胞外基质的主要结构蛋白[4]。在 RA 病人滑膜液和血浆中 MMP-9 水平较正常人显著升高,表明 MMP-9 与 RA 软骨及骨的损伤关系密切[5]。正常滑膜细胞表达少量的 MMP-9 ,但在 RA 情况下,许多细胞因子可刺激其表达增加[6]。脂多糖(lipopolysaccharide , LPS) 是一种炎症因子,在 RA 的发生和发展中起重要作用。但关于 LPS 刺激对 RA 滑膜细胞 MMP-9 表达影响的研究尚未见报道,本文对此进行了研究,同时观察了传统的甾体抗炎药——地塞米松对此过程的影响。

材料和方法

药品和试剂 LPS 购自 Promega 公司;地塞米松(dexamethasone) 、明胶(Gelatin) 、十二烷基磺酸钠(SDS) 、四氮唑蓝(MTT) 均购自 Sigma 公司;胎牛血清(FCS) 为 Hyclon 产品;TRizol , RPMI 1640 培养基、F12 培养基和预染蛋白标记为 Gibco 产品; Phast Gel Blue R 为 Pharmacia Biotech 产品;羊抗人 MMP-9 IgG 为 R&D System 公司产品;碱性磷酸酶标记的兔抗山羊 IgG 为 Santa Cruz 公司产品;NBT/ BCIP 染色试剂盒为华美公司产品; hMMP-9 及 hGAPDH 引物由上海生工公司合成; pUC19 DNA/ MspI DNA 梯度标准品为 MBI 产品。

U937 细胞株的培养 U937 细胞株由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。细胞在含 10 % FCS , 青霉素(100 u · L^{-1}) 和链霉素(100 mg· L^{-1}) 的 RPMI 1640 培养液中常规培养。

成纤维状滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte , FLS) 的培养[7] 取类风湿性关节炎病人在关节置换手术中切除的滑膜组织,用无钙、镁的 Dulbecco 缓冲液洗涤滑膜组织,剪成 1 ~ 2 mm^3 小块,加入胶原酶消化,用含 10 % FCS 的 F12 培养液常规培养 24 h,洗去未粘附细胞,用 0.25 %胰酶-0.02 % EDTA 消化,传代培养,选用 3 ~ 10 代滑膜细胞进行实验。

MTT 法检测 LPS 及地塞米松处理对 FLS 生长的影响 U937 以细胞数 5×10^5 · mL^{-1} 接种于培养瓶中,加入终质量浓度为 1 mg· L^{-1} 的 LPS,培养 24 h 后,取上清液备用。将 FLS 以 5×10^4 · mL^{-1} 接种于 96 孔培养板中,培养 24 h,弃上清液,分别加入 F12 培养液、含 1 mg· L^{-1} LPS 的 F12 培养液或上述 U937 上清液各 200 μL,培养 24 h。再加入不同浓度的地塞米松继续培养 24 h,加入 5 g· L^{-1} MTT 0.02 mL,培养 4 h,弃去培养液,用 DMSO 0.2 mL 裂解细胞,570 nm 波长下测定其吸光度(*A*) 值,并计算细胞增长率。

$$\text{增长率 \%} = \left(\frac{\text{试验组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}} - 1\right) \times 100$$

明胶酶谱法(gelatin zymography) 测定 MMP-9 酶活性[8] U937 以细胞数 5×10^5 · mL^{-1} 接种于培养瓶中,加入终质量浓度为 1 mg· L^{-1} 的 LPS,培养 24 h 后,取上清液备用。将 FLS 以 2.5×10^4 · cm^{-2} 接种于培养瓶中,培养 24 h,弃去培养液,分别加入 F12 培养液、含 1 mg· L^{-1} LPS 的 F12 培养液或上述 U937 上清液,培养 24 h。再加入不同浓度的地塞米松继续培养 24 h,取上清液与上样缓冲液混合均匀,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将凝胶转移入 2.5 % Triton X-100 溶液 200 mL 中,低速摇动 1 h 以洗脱 SDS,取出凝胶浸入明胶酶缓冲液(50 mmol · L^{-1} Tris , 10 mmol · L^{-1} $CaCl_2$, 200 mmol · L^{-1} NaCl , 1 μmol · L^{-1} $ZnCl_2$, pH 7.5) ,37 ℃孵育 12 ~ 16 h。然后转移入染色液中(1 片 PhastGel Blue 溶于蒸馏水 80 mL 和甲醇 120 mL 中,用时取 10 mL,加入冰醋酸 20 mL,甲醇 60 mL,水 120 mL) ,染色 2 h[9],蒸馏水漂洗,照像。

Western blot 测定 MMP-9 蛋白表达 取上述 LPS 及药物处理后的 FLS 培养上清液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束,用半干式石墨电转槽将蛋白转移到 NC 膜上。加入羊抗人 MMP-9 IgG(终质量浓度 1 mg· L^{-1}) ,37 ℃孵育 2 h,洗涤,加入碱性磷酸酶标记的兔抗山羊 IgG(1∶1 000稀释) ,37 ℃孵育 2 h,用 NBT/ BCIP 染色试剂盒染色,拍照。

RT-PCR 法检测 MMP-9 mRNA 表达 取上述 LPS 及药物处理后的 FLS 加 TRIzol 试剂提取总 RNA,调整各管总 RNA 量一致后,用随机引物进行逆转录,取等量的逆转录产物进行 PCR。引物核苷酸序列为 ① hMMP-9 : sense 5′-CGG GAC GGC AAT GCT GAT-3′; antisense 5′-AGG GCG AGG ACC ATA GAG G-3′; ② hGAPDH : sense 5′-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3′ ; antisense 5′-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3′。MMP-9 的反应条件为: 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 0.45 min , 63 ℃, 0.45 min , 72 ℃, 0.45 min , 27 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。GAPDH 的反应条件为: 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 0.45 min , 55 ℃, 0.45 min ,

72 ℃, 0.45 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。准确吸取等量 PCR 产物电泳,紫外凝胶成像系统照像。

结果

1 LPS 及地塞米松处理对 FLS 生长的影响

由表 1 可见,用含 LPS(1 mg·L^{-1})的 F12 培养液培养 FLS 48 h 后与用不含 LPS 的 F12 培养液培养的 FLS 相比,细胞生长无显著差异,细胞增长百分率为 11.1 %。而用 LPS(1 mg·L^{-1})刺激的 U937 细胞的培养上清液培养 FLS 48 h 后,与用不含 LPS 的 F12 培养液培养的 FLS 相比,细胞生长有显著差异($P < 0.001$),细胞增长百分率为 54.6 %。在加入 1×10^{-5},1×10^{-6} 和 1×10^{-7} mol·L^{-1} 地塞米松 24 h 后,U937 细胞培养上清液引起的 FLS 细胞生长无明显变化,其细胞增长百分率分别为 46.0 %, 50.5 % 和 51.1 %,三者之间无明显差异。

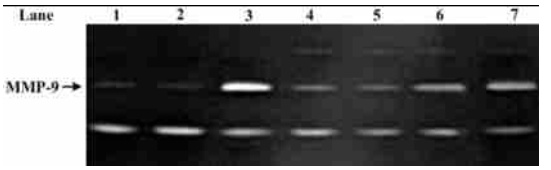
Table 1 Effect of lipopolysaccharide (LPS), the supernatant of U937 cell stimulated by LPS and dexamethasone on the growth of Fibroblast-like synoviocyte (FLS)

Group	Dose / mol·L^{-1}	A	Proliferation / %
F(control)		0.28 ± 0.06	
F + L		0.32 ± 0.04	11.1
F + U		0.440 ± 0.029*** △△△	54.6
F + U + D	1×10^{-5}	0.415 ± 0.013*** △△△	46.0
	1×10^{-6}	0.43 ± 0.03*** △△△	50.5
	1×10^{-7}	0.43 ± 0.04*** △△△	51.1

F: FLS was incubated with F12 medium for 48 h; F + L: FLS was incubated with F12 medium containing LPS(1 mg·L^{-1}) for 48 h; F + U: FLS was incubated for 48 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS(1 mg·L^{-1}) for 24 h; F + U + D: After FLS was incubated for 24 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS (1 mg·L^{-1}) for 24 h, dexamethasone was added and FLS was incubated for additional 24 h. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ *vs* F group; △△△ $P < 0.001$ *vs* F + L group

2 LPS 及地塞米松对 MMP-9 酶活性的影响

Gelatin zymography 的结果(图 1)显示,F12 培养液培养 FLS 48 h 后,上清液中存在少量有活性的 MMP-9 (Lane 1)。用 LPS 刺激 FLS 48 h 后,FLS 上清液中 MMP-9 酶活性无显著变化(Lane 2)。但用 LPS 刺激的 U937 细胞培养上清液培养 FLS 48 h 后,FLS 上清液中 MMP-9 酶活性(Lane 3)较 LPS 刺激的 U937 细胞的培养上清液中 MMP-9 酶活性(Lane 4)明显增加;在加入不同浓度地塞米松 24 h 后,由 U937 细胞上清液引起的 FLS 中 MMP-9 酶活性的增加被抑制(Lane 5 ~ 7),且抑制效果随地塞米松浓度的增加而增强。



Lane 1: FLS was incubated with F12 medium for 48 h; Lane 2: FLS was incubated with F12 medium containing LPS for 48 h; Lane 3: FLS was incubated for 48 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS for 24 h; Lane 4: the supernatant of U937 cell stimulated with LPS for 24 h; Lane 5 - 7: After FLS was incubated for 24 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS for 24 h, 1×10^{-5}, 1×10^{-6} and 1×10^{-7} mol·L^{-1} dexamethasone were added and then FLS was incubated for additional 24 h

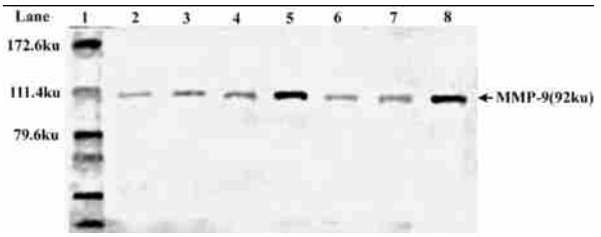
Figure 1 Effects of lipopolysaccharide (LPS), supernatant of U937 cell stimulated with LPS and dexamethasone on MMP-9 activity in cultured fibroblast-like synoviocyte (FLS). The activity of MMP-9 was assessed by the density of the clear band. Similar results were obtained in four experiments

3 LPS 及地塞米松对 MMP-9 蛋白表达的影响

由 Western blot 实验结果(图 2)显示,用 F12 培养液培养 FLS 48 h 后,FLS 分泌少量的 MMP-9 蛋白,而用 LPS 刺激 FLS 48 h 后,FLS 中 MMP-9 蛋白的表达无显著变化。用 LPS 刺激的 U937 细胞的培养上清液培养 FLS 48 h 后,与 LPS 刺激的 U937 细胞的培养上清液中 MMP-9 蛋白相比,FLS 上清液中 MMP-9 蛋白的表达显著增加;加入不同浓度地塞米松 24 h 后,由 U937 细胞上清液引起的 FLS 中 MMP-9 蛋白表达的增加被抑制,且抑制效果随地塞米松浓度的增大而增强,并与 Gelatin zymography 的结果基本一致。

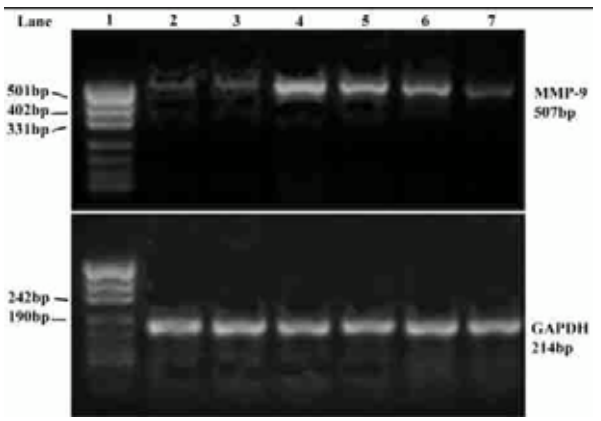
4 LPS 及地塞米松处理对 MMP-9 mRNA 表达的影响

由 RT-PCR 实验结果(图 3)显示,用 F12 培养液培养 FLS 48 h 后,FLS 表达少量 MMP-9 mRNA(Lane 2),用 LPS 刺激 FLS 48 h 后,FLS 中 MMP-9 mRNA 表达无显著变化(Lane 3)。用 LPS 刺激的 U937 细胞的培养上清液培养 FLS 48 h 后,FLS 中 MMP-9 mRNA 表达显著增加(Lane 4);在加入不同浓度地塞米松 24 h 后,由 U937 细胞上清液引起的 FLS 中 MMP-9 mRNA 表达的增加被抑制(Lane 5 ~ 7),且抑制效果随地塞米松浓度的增加而增强,并与蛋白表达及活性变化基本一致。



Lane 1 : Protein marker ; Lane 2 : FLS was incubated with F12 medium for 48 h ; Lane 3 : FLS was incubated with F12 medium containing LPS for 48 h ; Lane 4 : Supernatant of U937 cell stimulated with LPS for 24 h ; Lane 5 : FLS was incubated for 48 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS for 24 h ; Lane 6 - 8 : After FLS was incubated for 24 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS for 24 h , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} and 1×10^{-7} mol·L^{-1} dexamethasone were added and FLS was incubated for additional 24 h

Figure 2 Effects of lipopolysaccharide (LPS) , the supernatant of U937 cell stimulated with LPS and dexamethasone on protein expression of MMP-9 in cultured fibroblast-like synoviocyte (FLS) . Similar results were obtained in four experiments



Lane 1 : pUC19 DNA/MspI DNA ladder ; Lane 2 : FLS was incubated with F12 medium for 48 h ; Lane 3 : FLS was incubated with F12 medium containing LPS for 48 h ; Lane 4 : FLS was incubated for 48 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS for 24 h ; Lane 5 - 7 : After FLS was incubated for 24 h with the supernatant of U937 cell stimulated with LPS , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} and 1×10^{-5} mol·L^{-1} dexamethasone were added and FLS was incubated for additional 24 h

Figure 3 Effects of lipopolysaccharide (LPS) , the supernatant of U937 cell stimulated with LPS and dexamethasone on the mRNA expression of MMP-9 in cultured fibroblast-like synoviocyte (FLS) . Similar results were obtained in four experiments

讨论

在 RA 疾病情况下,滑膜细胞活化和增生, MMP-9 表达过量,从而引起关节软骨和骨损伤。LPS 是一种在 RA 的发生和发展中起重要作用的炎症刺激因子,本文利用体外培养的 FLS 研究了 LPS 对滑膜细胞中 MMP-9 表达的影响。实验结果显示, LPS 刺激对 FLS 生长无显著影响,对 FLS 中 MMP-9 表达无影响。

U937 是人单核细胞株,在炎性因子的刺激下,可分泌多种炎症介质和细胞因子,一定程度上反映了炎症时体内白细胞的状态[10]。为模拟 RA 疾病情况下关节腔的环境,本文用 LPS 刺激 U937 细胞后,取细胞培养上清液代替 FLS 原培养液,继续培养 FLS,并对 FLS 生长及 FLS 中 MMP-9 表达进行了检测。实验结果显示,与未加 LPS 刺激或加 LPS 直接刺激的 FLS 相比,LPS 刺激的 U937 细胞培养上清液可明显促进 FLS 生长($P < 0.001$) 。同时,用 LPS 刺激的 U937 细胞培养上清液培养 FLS 后, FLS 中 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达明显增加,并且 FLS 中 MMP-9 酶活性也明显增强。

本文进一步研究了传统的甾体抗炎药地塞米松对上述 FLS 的生长及 MMP-9 表达的影响,结果表明,地塞米松不影响 LPS 刺激的 U937 细胞培养上清液引起的 FLS 的生长,但可减少 LPS 刺激的 U937 细胞培养上清液引起的 FLS 中 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达及 MMP-9 的酶活性。地塞米松抑制 FLS 中 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达及酶活性的趋势基本一致,即随其浓度增加其抑制作用增强。

从上述结果可:在 RA 疾病情况下, LPS 可能不直接对 FLS 产生影响,而是通过刺激体内的免疫细胞,使其分泌多种炎症介质和细胞因子,从而间接刺激 FLS,使 FLS 生长加快,并使其 MMP-9 表达和酶活性增加,引起关节软骨的损伤。地塞米松可在不影响 FLS 生长的情况下,通过抑制各种炎症介质和细胞因子对 FLS 中 MMP-9 mRNA,蛋白以及酶活性的影响,发挥其抗炎作用。由于 RA 疾病情况下,除 MMP-9 表达改变外, FLS 中还存在多种异常表达的炎症介质和细胞因子, LPS 刺激对 FLS 中一些相关的炎症介质和细胞因子的影响有待进一步深入研究。

References:

[1] Tebib JG. Apoptosis : relevance to rheumatology [J]. *Rev Rheum Engl Ed*, 1995 ,**62**(10) :618 - 626.

[2] Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in immune system [J]. *Curr Opin Immunol*, 1996 ,**8**(2) :245 - 254.

[3] Hui A, Kulkarni GV, Hunter WL, *et al*. Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 1997 ,**40**(6) :1073 - 1084.

[4] Ries C, Kolb H, Petrides PE. Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia ster-induced secretion [J]. *Blood*, 1994 ,**83**(12) :3638 - 3646.

[5] Ahrens D, Koch AE, Pope RM, *et al*. Expression of matrix

metalloproteinase 9 (96-kd gelatinae B) in human rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, **39**(9): 1576 - 1587.

[6] Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE. Using inhibitor of metalloproteinase to treat arthritis, easier said than dong [J]. *Arthritis Rheum*, 1994, **37**(8): 1115 - 1126.

[7] Li LC, Hou Q, Cheng GF, *et al*. Establishment of a model for adhesion of polymorphonuclear leukocyte to synovial cell [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2000, **35**(2): 99 - 102.

[8] Li YT, Liu BH, Zhang CY, *et al*. Inhibition of dexamethasone and indomethacin on matrix metalloproteinase-9 and the mechanism of inhibition [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, **38**(1): 1 - 4.

[9] Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels [J]. *Anal Biochem*, 1997, **249**(1): 24 - 28.

[10] Saarialho-Kere UK, Welgus HG, Parks WC. Distinct mechanisms regulate interstitial collagenase and 92-kDa gelatinase expression in human monocytic-like cells exposed to bacterial endotoxin [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**(23): 17354 - 17361.