地塞米松和吲哚美辛对基质金属蛋白酶-9 的抑制作用及其机制研究

李怡棠[1] , 刘柏合[1] , 张成义[2] , 沈 放[1] , 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 . 北华医学院 药理教研室 , 吉林 吉林 132001)

摘要 : 目的 研究地塞米松和吲哚美辛对 U937 细胞中基质金属蛋白酶-9(MMP-9) 活性的影响及抗炎作用机理。方法 明胶酶谱法测定 MMP-9 的活性 ; Western blot 法测定细胞培养上清液中 MMP-9 蛋白 ; RT-PCR 法测定 MMP-9 mRNA 的表达。结果 地塞米松和吲哚美辛可显著抑制 PMA 诱导的 U937 细胞培养上清液中 MMP-9 的活性 ,且抑制强度随浓度的增大而增加 ;地塞米松和吲哚美辛可显著抑制 PMA 诱导的的 U937 细胞 MMP-9 蛋白分泌及 mRNA 表达 ,且变化趋势与活性变化一致。结论 对 MMP-9 活性的抑制作用可能是地塞米松和吲哚美辛抗炎作用的机理之一。

关键词 : 基质金属蛋白酶-9 ; 地塞米松 ; 吲哚美辛 ; 抗炎作用

中图分类号 : R967 文献标识码 : A 文章编号 : 0513 - 4870(2003) 01 - 0001 - 04

Inhibition of dexamethasone and indomethacin on matrix metalloproteinase-9 and the mechanism of inhibition

LI Yi-tang[1] , LIU Bai-he[1] , ZHANG Cheng-yi[2] , SHEN Fang[1] , 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 Pharmacology , Beihua Medical College , Jilin 132001 , China*)

Abstract: **Aim** To study the inhibitory effect of dexamethasone and indomethacin on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and investigate their mechanism of MMP-9 inhibition on the level of protein and mRNA. **Methods** U937 cells were cultured in RPMI 1640 medium with 10 % fetal calf serum (FCS) . After U937 cells were exposed to 1×10^{-8} mol·L^{-1} phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 24 hours without FCS , the activity of MMP-9 in the supernatant was analyzed by gelatin zymography. The MMP-9 protein secreted from U937 in serum-free conditional media was detected by Western blot using special polyclonal antibodies. The mRNA expression of MMP-9 was investigated by RT-PCR. **Results** Gelatin zymography showed that MMP-9 activity in U937 cells supernatant increased significantly after exposed to 1×10^{-8} mol·L^{-1} PMA for 24 hours without FCS. Dexamethasone at 1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} mol·L^{-1} and indomethacin at 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol·L^{-1} can inhibit this increase. Western blot showed that MMP-9 secretion from U937 cells in serum-free conditional media was increased under the same stimulating condition , Dexamethasone and indomethacin can inhibit MMP-9 secretion in U937 cells stimulated by 1×10^{-8} mol·L^{-1} PMA and the inhibitory effect was increased as their concentration increased. RT-PCR showed that MMP-9 mRNA expression of U937 cells was also inhibited and the inhibitory effect was increased as their concentration increased. **Conclusion** Inhibition of MMP-9 activity may be one of the anti-inflammatory mechanisms of dexamethasone and indomethacin ; the inhibition of MMP-9 activity is coherent with the inhibition of MMP-9 secretion and mRNA expression.

Key words: matrix metalloproteinase-9 ; dexamethasone ; indomethacin ; Anti-inflammatory effect

收稿日期 : 2002-01-04 .

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

病理条件下白细胞向特定的聚集是炎症反应的主要特点,在某些组织如关节、肠或血管床会引起组织损伤并伴随慢性疾病,如类风湿性关节炎、肠炎和局部再灌注损伤[1]。白细胞外渗和移行要求降解血管基底膜和细胞外基质,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,基质金属蛋白酶-9(MMP-9)作为主要降解Ⅳ型胶原的一种基质蛋白水解酶,在炎性情况下发挥重要作用[2]。地塞米松和吲哚美辛分别是传统的甾体和非甾体抗炎药,对其抗炎作用的机制研究已有大量报道,但系统地研究其对白细胞 MMP-9 的影响还不多见,本文拟从蛋白及 mRNA 水平上研究地塞米松和吲哚美辛对 MMP-9 的影响,以期对其抗炎作用机制进行补充并对抗炎药物的研发提供新的思路。

材料和方法

细胞　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。

药品和试剂　地塞米松(dexamethasone),gelatin,BSA,SDS 为 Sigma 产品;吲哚美辛(indomethacin)由北京市第三制药厂提供;Phast Gel Blue R 为 Pharmacia Biotech 产品;随机引物、佛波酯(PMA)和硝酸纤维素(NC)膜为 Promega 产品;胎牛血清(FCS)为 Hyclon 产品;TRizol,RPMI 1640 培养基和预染蛋白标记为 Gibco 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;Taq 酶为 Takara 公司产品;hMMP-9 及 hGAPDH 引物由上海生工公司合成;dNTP,MMLV 为北京鼎国公司产品;pUC19 DNA/MspI DNA 梯度标准品为 MBI 产品。

明胶酶谱法(gelatin zymography)测定 MMP-9 的活性[3]　取对数生长期的 U937 细胞,调细胞数为 $5\times10^5\cdot mL^{-1}$,以 0.5 mL/孔接种于 48 孔培养板中,无血清培养 2 h 后,加入药物、溶剂对照和刺激剂,24 h 后收集上清液,200 × *g* 离心去细胞碎片,上清液 - 20 ℃冻存备用。取等量上清液与样品缓冲液混合均匀,上样。开始以 8 $V\cdot cm^{-1}$ 电泳至溴酚蓝前沿进入分离胶,然后将电压加至 10 $V\cdot cm^{-1}$,继续电泳至溴酚蓝前沿离凝胶前端约 2 cm 时停止电泳。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,其间换液 1 次。取出凝胶浸入明胶酶缓冲液(50 $mmol\cdot L^{-1}$ Tris,10 $mmol\cdot L^{-1}$ $CaCl_2$,200 $mmol\cdot L^{-1}$ NaCl,1 $\mu mol\cdot L^{-1}$ $ZnCl_2$,pH 7.5),37 ℃孵育 12 ~ 16 h。然后转移入染色液中(1 片 Phast Gel Blue 溶于蒸馏水 80 mL,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[4],至刺激组出现明显的负染酶带,蒸馏水漂洗,照像。

Western Blot 测定 MMP-9 蛋白　将上述冻存上清液常规电泳分离后进行转膜(参照半干式石墨电转槽说明书),首先将预先浸润阴极转移液的滤纸置于转移电极负极,然后将 SDS 胶置于滤纸上,最后将浸润阳极转移液的 NC 膜和滤纸分别覆盖其上,避免阴、阳极直接接触。盖上阳极电极,0.8 $mA\cdot cm^{-2}$ 电转 3 ~ 4 h。5 % BSA 4 ℃封闭过夜,TBST(25 $mmol\cdot L^{-1}$ Tris base,0.125 $mol\cdot L^{-1}$ NaCl,0.05 % Tween-20)洗涤,加入羊抗人 MMP-9 IgG(终浓 1 $\mu g\cdot mL^{-1}$),37 ℃孵育 2 h,洗涤,加入碱磷酶标记的兔抗山羊 IgG(1∶1 000稀释),37 ℃孵育 2 h,洗涤,染色(按试剂盒说明书),拍照。

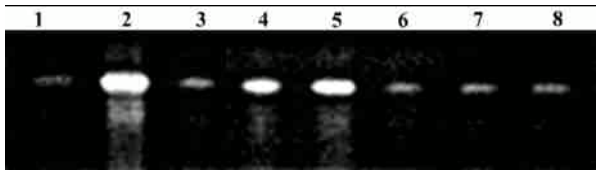
RT-PCR 法检测 MMP-9 mRNA 表达　(1)总 RNA 的提取:取 U937 细胞($1\times10^6\cdot mL^{-1}$) 6 mL 加入直径为 6 cm 的玻璃培养皿内,培养 2 h,加入药物和刺激剂,24 h 后提总 RNA,提取步骤参照 TRIzol 试剂说明书。(2)RT-PCR 法扩增 MMP-9 mRNA:调整各管总 RNA 量一致,用随机引物进行逆转录,方法参照逆转录酶 MMLV 说明书,取逆转录产物进行 PCR。引物核苷酸序列为,hMMP-9:sense 5′-CGG GAC GGC AAT GCT GAT-3′;antisense 5′ AGG GCG AGG ACC ATA GAG G-3′。hGAPDH:sense 5′-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3′;antisense 5′-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3′。MMP-9 和 GAPDH 分别逆转录和扩增,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。准确吸取上述 PCR 产物电泳,紫外凝胶成像系统照像。

结果

1　地塞米松和吲哚美辛对 MMP-9 活性的抑制

由 gelatin zymography 实验结果可知,静息状态下无血清培养的 U937 细胞几乎不表现 MMP-9 活性,但在 1.0×10^{-8} $mol\cdot L^{-1}$ PMA 的诱导下,U937 细胞上清液中 MMP-9 的活性显著增加,地塞米松和吲哚美辛可抑制 PMA 诱导的 MMP-9 活性增加,且抑制强度随浓度的增大而增强,其中 1×10^{-5} $mol\cdot L^{-1}$

的地塞米松抑制效果最强(图 1)。

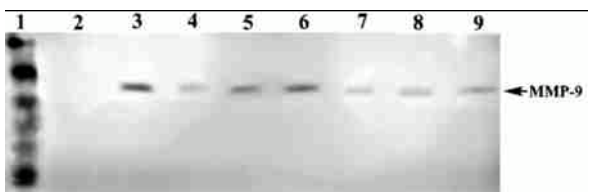


Lane 1: Control; 2: Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA); 3: PMA + 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} indomethacin; 4: PMA + 1.0×10^{-6} mol·L^{-1} indomethacin; 5: PMA + 1.0×10^{-7} mol·L^{-1} indomethacin; 6: PMA + 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} dexamethasone; 7: PMA + 1.0×10^{-7} mol·L^{-1} dexamethasone; 8: PMA + 1.0×10^{-9} mol·L^{-1} dexamethasone. Similar results were obtained in four experiments

Figure 1 The inhibitory effect of indomethacin and dexamethasone on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in cultured U937 cells stimulated with PMA (1.0×10^{-8} mol·L^{-1}) for 24 h. The amount and activity of the enzyme was reflected by the density and area of the clear band

2 地塞米松和吲哚美辛对 MMP-9 蛋白分泌的抑制

由 Western blot 实验结果可知,静息状态下无血清培养的 U937 细胞几乎不分泌 MMP-9,但在 1.0×10^{-8} mol·L^{-1} PMA 的诱导下,U937 细胞上清液中 MMP-9 的分泌显著增加,地塞米松和吲哚美辛可降低 PMA 诱导的 MMP-9 分泌增加,且抑制强度随浓度的增大而增强,并与 gelatin zymography 活性抑制结果基本一致(图 2)。

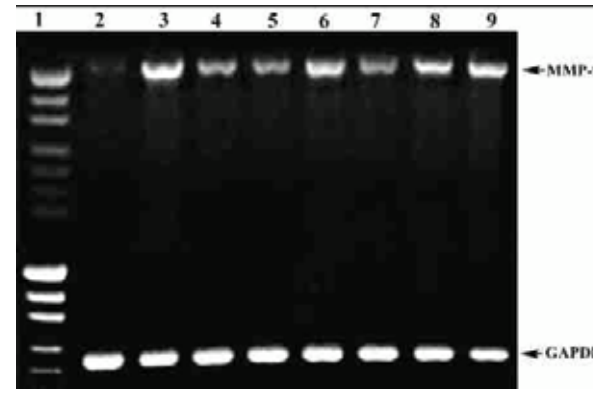


Lane 1: Prestained protein marker; 2: Control; 3: PMA; 4: PMA + 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} indomethacin; 5: PMA + 1.0×10^{-6} mol·L^{-1} indomethacin; 6: PMA + 1.0×10^{-7} mol·L^{-1} indomethacin; 7: PMA + 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} dexamethasone; 8: PMA + 1.0×10^{-7} mol·L^{-1} dexamethasone; 9: PMA + 1.0×10^{-9} mol·L^{-1} dexamethasone. Similar results were obtained in four experiments

Figure 2 The inhibitory effect of indomethacin and dexamethasone on MMP-9 protein secreted from U937 cells stimulated with PMA (1.0×10^{-8} mol·L^{-1}) for 24 h

3 地塞米松和吲哚美辛对 MMP-9 mRNA 表达的抑制

由 RT-PCR 实验结果可知,静息状态下无血清培养的 U937 细胞中 MMP-9 mRNA 表达量很小,但在 1.0×10^{-8} mol·L^{-1} PMA 的诱导下,U937 细胞中 MMP-9 mRNA 的表达量显著增加。地塞米松和吲哚美辛可降低 PMA 诱导的 MMP-9 mRNA 的表达,且抑制强度随浓度的增大而增强,并与蛋白表达及活性变化基本一致(图 3)。



Lane 1: pUC19 DNA/MspI DNA ladder; 2: Control; 3: PMA; 4: PMA + 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} indomethacin; 5: PMA + 1.0×10^{-6} mol·L^{-1} indomethacin; 6: PMA + 1.0×10^{-7} mol·L^{-1} indomethacin; 7: PMA + 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} dexamethasone; 8: PMA + 1.0×10^{-7} mol·L^{-1} dexamethasone; 9: PMA + 1.0×10^{-9} mol·L^{-1} dexamethasone. Similar results were obtained in four experiments

Figure 3 The inhibitory effect of indomethacin and dexamethasone on MMP-9 mRNA expression in cultured U937 cells stimulated with PMA (1.0×10^{-8} mol·L^{-1}) for 24 h

讨论

U937 是人前单核细胞株,静息状态下主要分泌弹性蛋白酶和组织蛋白酶 G,在炎性因子的刺激下,MMP-9 的表达显著增加,可一定程度上反映炎症时体内白细胞的状态[5]。由实验结果可见,静息状态下 U937 细胞表达极少量的 MMP-9,在 PMA 诱导下,U937 细胞 MMP-9 活性显著增加,地塞米松和吲哚美辛可抑制 PMA 诱导的 MMP-9 活性增加,且抑制强度随浓度的增大而增大。因为明胶酶谱法结果只反映 MMP-9 降解底物的变化,不能反映此种变化是由于酶量的改变还是酶活性的改变造成的,因此本实验设计了蛋白印迹法以检测酶量是否变化。由结果可见,给药组的 U937 细胞上清液中 MMP-9 的分泌量显著减小,且变化趋势与活性变化趋势一致,由此可初步断定地塞米松和吲哚美辛对 MMP-9 活性的抑制是由于酶量减少导致的。为进一步阐明细胞培养上清液中 MMP-9 酶量减少的机理,本文又设计了 RT-PCR 试验以检测 MMP-9 mRNA 表达的变化。结果表明,给药组 MMP-9 mRNA 表达显著降低,且变化趋势与蛋白量及活性变化趋势基本一致,由此可断定细胞培养上清液中酶量减少是 MMP-9 生成减少所致。至于地塞米松和吲哚美辛是通过何种途径

抑制 MMP-9 mRNA 表达,我们在后续的试验中继续探讨了地塞米松和吲哚美辛对 U937 细胞核转录因子 κB 和 AP-1 的影响(结果待发表)。

综上所述,可以得出以下结论:1. 对 MMP-9 活性的抑制可能是地塞米松和吲哚美辛抗炎作用的机制之一;2. 对于 MMP-9 活性的抑制可能是由于抑制了 MMP-9 mRNA 表达进而抑制了 MMP-9 蛋白分泌所致,即地塞米松和吲哚美辛是 MMP-9 的生成抑制剂,而不是活性抑制剂;3. 基于 MMP-9 在基质降解、细胞移行中的重要作用,以此为靶点,建立高通量的筛选模型,筛选有效的抗炎、抗肿瘤药物将有广泛的应用前景。

References:

[1] Nagaoka I, Hirota S. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs [J]. *Inflamm Res*, 2000, **49**(2) :55 - 62.

[2] Christian R, Helmut K, Petro EP. Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: Tumor necrosis factor-α as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion [J]. *Blood*, 1994, **83**(12) :3638 - 3646.

[3] Han R. *Research and development of anticancer drugs and experimental techniques* (抗癌药物研究与实验技术) [M]. Beijing: Pebing Union Medical College and Beijing Medical University Press, 1997. 356 - 359.

[4] 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.

[5] Ulpu KSK, Howard GW, William CP. 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.