·实验研究·

[文章编号] 1007-3949(2012)20-08-0714-05

丹红、C 反应蛋白与基质金属蛋白酶 1 表达的关系

陈 东[1], 严 激[2], 潘文博[1], 钟万生[1]

(1. 安徽省合肥市第三人民医院心内科, 安徽省合肥市 230022; 2. 安徽省立医院心内科, 安徽省心血管病研究所, 安徽省合肥市 200310)

[关键词] THP-1 细胞; 巨噬细胞; C 反应蛋白; 基质金属蛋白酶 1; 丹红注射液

[摘 要] **目的** 探讨中药丹红、C 反应蛋白与 THP-1 源性巨噬细胞基质金属蛋白酶 1 表达的关系。**方法** 采用佛波醇将 THP-1 细胞诱导分化成巨噬细胞后,用酶联免疫吸附法测定细胞基质金属蛋白酶 1 蛋白表达峰值时间。再将其分为对照组、C 反应蛋白干预组、丹红注射液干预组。酶联免疫吸附法测定不同组别细胞培养上清液中基质金属蛋白酶 1 蛋白浓度,再用逆转录聚合酶链反应测定细胞不同时间和 C 反应蛋白干预组基质金属蛋白酶 1 的 mRNA 表达。并将基质金属蛋白酶 1 蛋白浓度和 mRNA 表达进行比较分析。**结果** 显微镜下观察到细胞株 THP-1 在佛波醇诱导下转变为巨噬细胞,在 24 h 细胞的上清液基质金属蛋白酶 1 蛋白和 mRNA 表达到峰值。与对照组相比,C 反应蛋白干预组中基质金属蛋白酶 1 蛋白和 mRNA 表达升高,5、10、25、50 mg/L C 反应蛋白干预时基质金属蛋白酶 1 表达逐渐增高($P<0.05$),呈剂量依赖性。与对照组相比,丹红注射液干预组中基质金属蛋白酶 1 的表达降低,0、200、400、800、1 600、3 200 mL/L 丹红干预时基质金属蛋白酶 1 的表达减低($P<0.05$),呈节段性依赖性递减,且 0 mg/L 和 50 mg/L C 反应蛋白干预下两组干预基质金属蛋白酶 1 表达无差异($P>0.05$)。**结论** THP-1 细胞分化成巨噬细胞后,在 24 h 基质金属蛋白酶 1 蛋白和 mRNA 表达最高,C 反应蛋白能促进 THP-1 源性巨噬细胞表达基质金属蛋白酶 1,丹红能抑制基质金属蛋白酶 1 分泌,在有 C 反应蛋白干预基质金属蛋白酶 1 表达无显著差别。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Relationship Among Dan Hong, C-reactive Protein and Expression of Matrix Metalloproteinase-1

CHEN Dong[1], YAN Ji[2], PAN Wen-Bo[1], and ZHONG Wan-Sheng[1]

(1. *Department of Cardiology, the Third People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui* 230032, *China*; 2. *Department of Cardiology, Anhui Provincial Hospital & Auhui Institute of Cardiovascular Disease, Hefei, Anhui* 200310, *China*)

[**KEY WORDS**] THP-1 Cell; Macrophage; C-reactive Protein; Matrix Metalloproteinase-1; Dan Hong Injection

[**ABSTRACT**] **Aim** The aim of this study was to investigate the relation of traditional Chinese drug Dan Hong, C-reactive protein (CRP) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). **Methods** Human THP-1 cells were induced to differentiated into macrophages with phorbol-12 myristate 13-acetate (PMA). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the macrophages secretes MMP-1 in peak time. Thereafter, cells were divided into three groups: control group, CRP group, Dan Hong injection group, ELISA was applied to test the MMP-1 concentration in the cell supernatant of three groups, and then MMP-1 mRNA expression at different time was tested by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in CRP group. At last, the protein concentration and mRNA expression of MMP-1 were analyzed. **Results** THP-1 cell induction into macrophages was observed under the microscope, the peak of MMP-1 secretion was in 24-hour. Compared with the control group, protein and mRNA expression of MMP-1 in CRP group was up-regulated gradually with 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L CRP. The result exposed that MMP-1 level was markedly elevated in a concentration dependent fashion ($P<0.05$). Compared with the control group, MMP-1 ex-

[收稿日期] 2011-08-22

[作者简介] 陈东,硕士研究生,主治医师,研究方向为心脏电生理,E-mail 为 chendong@0038sina.com。严激,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为心脏电生理,E-mail 为 yanji111111@126.com。潘文博,副主任医师,研究方向为冠心病诊治,E-mail 为 hfssypwb@sina.com。

pression in Dan Hong injection group was lower than the control group. MMP-1 expression in Dan Hong injection group was down-regulated segmentally and dependently with 200 mL/L, 400 mL/L, 800 mL/L, 1 600 mL/L, 3 200 mL/L Dan Hong injection, but MMP-1 expression by Dan Hong injection intervention has no significance whether with CRP (50 mg/L) or not ($P>0.05$). **Conclusions** CRP promotes the expression of MMP-1 in THP-1 derived macrophages. Dan Hong can attenuate the MMP-1 secretion in interval, and there was no difference with or without CRP.

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是心血管病急症之一,研究表明其斑块糜烂或破裂等与众多因素有关,其中与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)[1]、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等具有重要相关性[2]。临床中药丹红注射液为丹参、红花等提取物的中药注射剂。其性微寒,若辅以红花,则可以其温性以助消散瘀血,温运血行,具有增加冠状动脉血流量、降低心肌耗氧量、抗心肌缺血和降低血液黏稠度等作用[3]。丹红、CRP、MMP 之间是否存在某些联系?本文主要通过探讨 CRP 对 THP-1 源性巨噬细胞 MMP-1 的蛋白和 mRNA 表达的影响,同时观察中药丹红对 MMP-1 及 CRP 干预下 MMP-1 的表达影响,进一步了解 ACS 的发生、发展和发病机制,以及中药丹红对 ACS 患者的保护作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养、基质金属蛋白酶 1 峰值时间确定和实验分组

THP-1 细胞(购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞中心)用含 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 双抗(青霉素和链霉素配制)的 RPMI 1640 培养基,在 37℃、5% CO_2、湿度恒定在 60% ~70% 的培养箱内静置培养,维持细胞密度在(2 ~9) ×10^8 个/L,每 4 ~5 天换液 1 次,传至 2 ~3 代用于实验[4]。将传代培养的 THP-1 细胞以 5 ×10^6 个/孔接种 12 孔板,于含 60 μg/L 佛波醇(phorbol myristate acetate, PMA)(购自 Sigma 公司)的 1640 培养基中培养 48 h,细胞分化为巨噬细胞。MMP-1 峰值时间确定:用 PPS 洗涤分化巨噬细胞 2 次,换培养基分别孵育 6、12、24、48、72 h。

实验分为对照组、CRP(购于 Calbiochem 公司)干预组、丹红注射液(步长制药公司提供)干预组。每组设 3 个复孔。对照组:空白培养基孵育 24 h。CRP 干预组:细胞在含有不同浓度(0、5、10、25、50 mg/L)CRP 的培养基孵育 24 h。丹红注射液干预组:在培养基加入 0 mg/L CRP 和 50 mg/L CRP 下与不同浓度丹红注射液(0、200、400、800、1 600、3 200 mL/L)共同孵育 24 h,以上细胞经无血清 1640 饥饿 12 h 处理[4]。

1.2 酶联免疫吸附法测定基质金属蛋白酶 1

收集不同时间细胞培养基和在加入 CRP、丹红注射液后各组细胞培养基。离心后 -80℃保存,采用酶联免疫吸附实验试剂盒(试剂盒购自美国 R&D 公司)检测 MMP-1 含量。

1.3 逆转录聚合酶链反应测定基质金属蛋白酶 1 的 mRNA 表达

收集各组细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA,置于 -80℃冰箱备用,紫外测总 RNA 的纯度及含量。根据 Genebank 提供的基因序列使用 Primerdesign 软件进行引物设计。MMP-1 的上游引物为 5′-CCTGAAGAATGATGGGAGGCAAG-3′,下游引物为 5′-GCTCTTGGCAAATCTGGCGTG-3′,扩增产物长度为 255 bp;内参 GAPDH 上游引物为 5′-CCTGAAGAATGATGGGAGGCAAG-3′,下游引物为 5′-ATGAGCCCAGCCTTCTCCAT-3′,扩增产物长度为 350 bp。逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)按说明书进行操作,反应条件为:94℃ 3 min、94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 45 s,扩增 33 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶 80 ~90 V 恒压电泳 25 min,在紫外灯照射下利用凝胶成像系统进行拍照。运用捷达 V3.3.2 软件对 PCR 电泳的结果进行灰质度值测定,每一例样本 MMP-1 基因 PCR 产物的灰质度值分别除以相对应内参 GAPDH 基因 PCR 产物的灰质度值,从而得到 MMP-1 的 mRNA 表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行结果分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示,组内比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA),组内两两比较用 SNK 方法,两独立样本间采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 THP-1 细胞分化为巨噬细胞

显微镜下人单核细胞株 THP-1 细胞呈圆形,在

培养液悬浮生长。经 PMA 诱导细胞胞体增大,包浆出现空泡,胞质伸出伪足,形态逐渐变不规则,48 h 后完全贴壁生长成巨噬细胞。

2.2 基质金属蛋白酶 1 表达水平比较

2.2.1 不同时间 THP-1 源性巨噬细胞上清液基质金属蛋白酶 1 蛋白和 mRNA 水平比较 不同时间巨噬细胞细胞上清液 MMP-1 蛋白的表达(图 1A)、不同时间巨噬细胞 mRNA 灰度值(图 1B)及不同时间巨噬细胞 mRNA 的表达(图 1C),比较后证实 24 h MMP-1 表达到峰值($P<0.05$)。

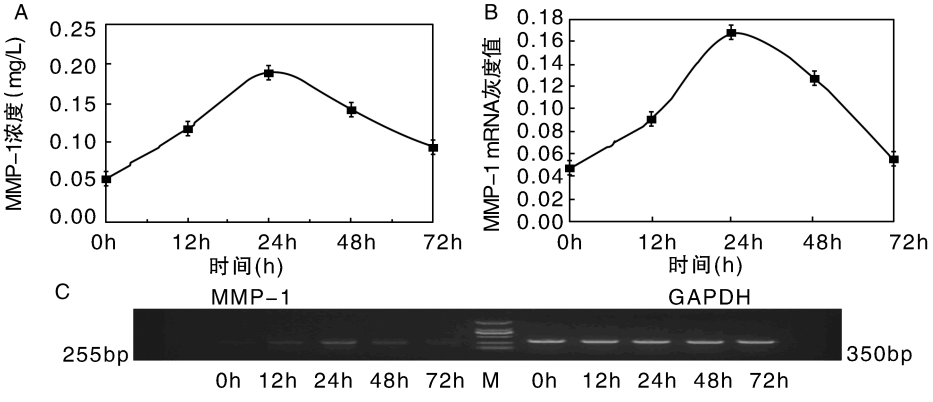

图 1. 不同时间 THP-1 源性巨噬细胞 MMP-1 蛋白和 mRNA 的表达比较 A 为不同时间巨噬细胞 MMP-1 的蛋白表达,B 为不同时间巨噬细胞 MMP-1 的 mRNA 灰度值比较,C 为不同时间巨噬细胞 mRNA 的表达。

Figure 1. Expression of different time MMP-1 protein and mRNA of THP-1 source macrophages

2.2.2 不同浓度 C 反应蛋白干预后基质金属蛋白酶 1 蛋白和 mRNA 表达水平比较 24 h 巨噬细胞在加入 0、5、10、25、50 mg/L CRP 时 MMP-1 蛋白的表达比较(图 2A),24 h 巨噬细胞在加入 0、5、10、25、50 mg/L CRP 时 MMP-1 的 mRNA 灰度值比较(图 2B),24 h 巨噬细胞在加入 0、5、10、25、50 mg/L CRP 时 MMP-1 的 mRNA 表达(图 2C),经上述比较后证实 MMP-1 表达随 CRP 干预浓度增高而逐渐增高($P<0.05$)。

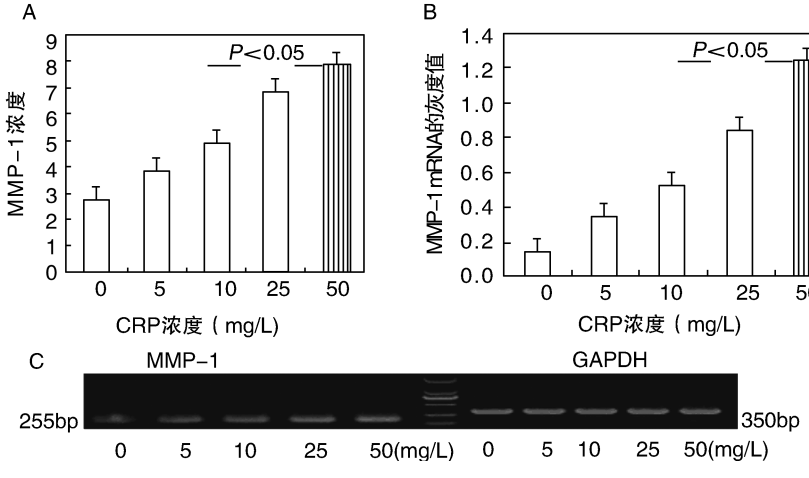

图 2. 不同浓度 CRP 干预 THP-1 源性巨噬细胞 MMP-1 蛋白和 mRNA 的表达比较 A 为不同浓度 CRP 干预巨噬细胞 MMP-1 的蛋白表达,B 为不同浓度 CRP 干预巨噬细胞 MMP-1 的 mRNA 灰度值比较,C 为不同浓度 CRP 干预巨噬细胞 MMP-1 的 mRNA 表达。

Figure 2. The comparison of expression of MMP-1 protein and mRNA by different concentration CRP intervention THP-1 source macrophages

2.2.3 不同浓度的丹红注射液 0 mg/L 或 50 mg/L C 反应蛋白干预下巨噬细胞基质金属蛋白酶 1 的表达比较 不同浓度的丹红注射液和 0 mg/L 或 50 mg/L CRP 干预下巨噬细胞 MMP-1 的表达降低,呈节段性依赖性递减,($P<0.05$);但在两组之间比较并无差别(表 1)。

表 1. 不同浓度丹红注射液和 0 mg/L 或 50 mg/L CRP 干预下巨噬细胞 MMP-1 蛋白的表达比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1. Different concentration Dan Hong injection effect expression of MMP-1 protein of macrophages by CRP inducing with 0 mg/L and 50 mg/L($\bar{x} \pm s, n=3$)

丹红浓度 (mL/L)	0 mg/L CRP 干预下 MMP-1	50 mg/L CRP 干预下 MMP-1
0	0.647 ± 0.0554	0.657 ± 0.0119
200	0.395 ± 0.037	0.314 ± 0.0573
400	0.191 ± 0.005	0.182 ± 0.047
800	0.167 ± 0.0007	0.166 ± 0.004
1 600	0.1593 ± 0.0021	0.167 ± 0.0002
3 200	0.1572 ± 0.1846	0.168 ± 0.0004

3 讨 论

ACS 主要病理机制是在冠状动脉粥样硬化基础上易损斑块形成和破裂,其中斑块破裂主要与炎症细胞浸润和释放,MMP 对斑块基质的降解和斑块内新生血管增多等有关[5,6]。最具有代表性的 MMP 和炎症因子 CRP 与易损斑块的形成和破裂有着密切关系[7-9]。MMP-1 是 MMP 中的一种,其主要功能参与斑块纤维帽胶原纤维[10-12]、纤连蛋白、弹性蛋白的降解[13,14],削弱斑块稳定性使之纤维帽易于破裂[15,16],从而导致 ACS 的发生发展。CRP 是一种重要的炎症因子,直接参与动脉粥样硬化(atherosclerosis,As)的形成,在人的 As 斑块特别是复杂斑块中,发现有大量的 CRP 沉积,随着斑块大小的增加,CRP 沉积逐渐增多,在炎性细胞浸润的区域特别是坏死斑块的边缘,CRP 大幅度增多且免疫反应较强,同时还可引起炎性细胞释放 MMP、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素 1β(interleukin-1β,IL-1β)、IL-6 等促进斑块病变。Wu 等[17]在颈动脉易损斑块研究中证实了 MMP-1 对斑块的稳定性和破裂有着至关重要的作用,还进一步证实 CRP 能促进 MMP 的表达,明确了斑块的破裂并不仅仅是全身的炎症反应,也有局部反应的参与。Mahajan 等[4]研究也证实 CRP 可以通过 ERK、P53、JNK 机制作用促进 MMP 的表达。总之 CRP 和 MMP-1 通过不同方式促进 As 斑块病变和不稳定形成,是致 As 斑块破裂的关键点[18],本实验在此研究的基础上进一步证实和结合我国中药丹红治疗冠心病的可行性而展开观察。

本实验选择斑块中迁移聚集斑块较多的炎症细胞—巨噬细胞为实验细胞[19,20],在体外通过 PMA 诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细胞后,用酶联免疫吸附法和 RT-PCR 检测不同时间巨噬细胞表达 MMP-1 蛋白和 mRNA,经比较结果显示:MMP-1 峰值时间是 24 h,并具有显著的统计学意义。在 24 h 下,CRP 促进 MMP-1 表达,且呈依赖剂量效应关系。上述实验表明:巨噬细胞在 24 h MMP-1 表达最高,一旦巨噬细胞聚集或迁移在 24 h 可能是易损斑块的不稳定期的开始。另我们获知 CRP 不仅直接参与致炎症作用,CRP 还具有促进 MMP-1 表达,是 As 易损斑块形成和破裂重要机制之一,CRP 通过巨噬细胞促进 MMP-1 释放而作用斑块,随 CRP 浓度逐渐增高 MMP-1 表达呈现线性升高,在 50 mg/L CRP 下 MMP-1 升高达到高峰,同时在 24 h 巨噬细胞本身表达 MMP-1 是高峰期,两者的叠加进一步增加斑块易破裂性,证明冠状动脉粥样硬化斑块的破裂是在 CRP 和 MMP-1 增多情况下发生的,也验证了 ACS 患者在急性期炎症因子 CRP 和 MMP 升高所在。但是,ACS 时期 CRP 前后有什么变化,当 CRP 促进 MMP-1 表达时,是否有其它因子和蛋白的辅助作用,MMP-1 对 CRP 促进 MMP-1 有正反馈还是负反馈作用? 这一系列问题尚不甚明白。

丹红注射液在治疗冠心病中有着一定临床基础,本实验运用丹红注射液作用巨噬细胞 MMP-1 表达,了解丹红注射液治疗 ACS 作用机理。本实验采用丹红注射液干预巨噬细胞分泌 MMP-1,在 0 mg/L 和 50 mg/LCRP 干预下,不同浓度的丹红注射液作用 THP-1 源巨噬细胞,200 mL/L 丹红注射液干预巨噬细胞分泌 MMP-1 有效,400 ~ 800 mL/L 开始最有效但进入平台期,至丹红浓度达 3 200 mL/L,效果和 400 ~ 800 mL/L 差别不显著。从上述实验可知,丹红在 0 mg/L 或 50 mg/L CRP 干预下巨噬细胞对分泌 MMP-1 均有抑制作用,在 200 mL/L 时有效,400 ~ 800 mL/L 最有效,800 mL/L 后 MMP-1 分泌不随丹红注射液浓度呈依赖性效应关系;0 mg/L 和 50 mg/L CRP 干预下,丹红注射液作用对 MMP-1 的分泌无差别;实验证实丹红抑制 MMP-1 的分泌,当丹红注射液临床治疗浓度超出一定范围时,没有出现随浓度的增加而效果更为显著,同时丹红抑制 MMP-1 时也表明其作用机制没有通过抑制 CRP 而降低 MMP-1 分泌,是否通过促进巨噬细胞的凋亡或其它途径而导致 MMP-1 分泌的减少不甚清楚。

综上所述,通过上述实验,我们认为,冠状动脉粥样硬化易损斑块不稳定和破裂是多方面因素作用的,CRP 和 MMP-1 对斑块的稳定性和破裂起至关重要的作用,中药丹红对 MMP-1 有抑制作用,但对 CRP 干预下的 MMP-1 无明显差别,显然丹红对 CRP

无明显抑制作用,故此进一步了解了丹红的作用机制。总之,丹红对冠心病患者有一定保护作用。

[参考文献]

[1] Hartung D, Schafers M, Fujimoto S, et al. Targeting of matrix metalloproteinase activation for noninvasive detection of vulnerable atherosclerotic lesions[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007, 34(1): S1-S8.

[2] 李桂花, 马玉英. 急性心肌梗死早期 C-反应蛋白水平对经皮冠状动脉介入治疗预后的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(5): 406-408.

[3] 梁显亮, 张衍仕. 丹红注射液治疗冠心病心绞痛 48 例的疗效分析[J]. 广东医学, 2010, 31(12): 50-52.

[4] Mahajan N, Dhawan V. Inhibition of C-reactive protein induced expression of matrixmetalloproteinases by atorvastatin in THP-1 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 338(1-2): 77-86.

[5] Kemik O, Kemik AS, Sümer A, et al. Levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(16): 2 109-112.

[6] Lee TH, Lee SM, Lee DY, et al. A glycosidic spinasterol from Koreana stewartia promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in UVB-irradiated human dermal fibroblasts[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(5): 768-773.

[7] Schneeweis C, Gräfe M, Bungenstock A, et al. Chronic CRP-exposure inhibits VEGF-induced endothelial cell migration[J]. Atheroscler Thromb, 2010, 17(2): 203-212.

[8] Jguirim-Souissi I, Jelassi A, Slimani A, et al. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the outcome of coronary artery disease[J]. Coron Artery Dis, 2011, 22(6): 388-393.

[9] 罗玉梅, 姜德谦, 万新红, 等. 急性冠状动脉综合征患者巨噬细胞表达过氧化体增殖物激活型受体 γ 及炎症相关因子的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(3): 220-224.

[10] Salgame P. MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers[J]. Clin Invest, 2011, 121(5): 1 686-688.

[11] Kuo MY, Ou HC, Lee WJ, et al. Ellagic acid inhibits oxidized low-density lipoprotein(ox-LDL)-induced metalloproteinase (MMP) expression by modulating the protein kinase C-α/extracellular signal-regulated kinase/peroxisome proliferator-activated receptor γ/nuclear factor-κB (PKC-α/ERK/PPAR-γ/NF-κB) signaling pathway in endothelial cells[J]. Agric Food Chem, 2011, 59(9): 5 100-108.

[12] Kouvelos GN, Milionis HJ, Arnaoutoglou EM, et al. Postoperative levels of cardiac troponin versus CK-MB and high-sensitivity C-reactive protein for the prediction of 1-year cardiovascular outcome in patients undergoing vascular surgery[J]. Coron Artery Dis, 2011, 22(6): 428-434.

[13] Nabata A, Kuroki M, Ueba H, et al. C-reactive protein induces endothelial cell apoptosis and matrixmetalloproteinase-9 production in human mononuclear cells: Implications for the destabilization of atherosclerotic plaque[J]. Atherosclerosis, 2008, 196(1): 129-135.

[14] Hwang JJ, Yang WS, Chiang FT, et al. Association of circulating matrix metalloproteinase-1, but not adiponectin, with advanced coronary artery disease[J]. Atherosclerosis, 2009, 204(1): 293-297.

[15] Bostrom P, Soderstrom M, Vahlberg T, et al. MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 348.

[16] Tanindi A, Sahinarslan A, Elbeg S, et al. Relationship between MMP-1, MMP-9, TIMP-1, IL-6 and Risk Factors, clinical presentation, extent and severity of atherosclerotic coronary artery disease[J]. Open Cardiovasc Med J, 2011, 5(5): 110-116.

[17] Wu YW, Yang WS, Chen MF, et al. High serum level of matrix metalloproteinase-1 and its rapid surge after intervention in patients with significant carotid atherosclerosis[J]. Formos Med Assoc, 2008, 107(1): 93-98.

[18] Mitsakakis K, Gizeli E. Detection of multiple cardiac markers with an integrated acoustic platform for cardiovascular risk assessment[J]. Anal Chim Acta, 2011, 699(1): 1-5.

[19] Alekperov EZ, Nadzhafov RN. Contemporary concepts of the role of inflammation in atherosclerosis[J]. Kardiologiia, 2010, 50(6): 88-91.

[20] Monter O, Orbe J, Varo N, et al. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells implications for clinical and subclinical atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(7): 1 369-378.

(此文编辑 曾学清)