

p38MAPK 介导 PDGF-BB 诱导的大鼠血管平滑肌细胞 MMP-2 基因表达

孙晓东^{1,2}, 王燕², 王汉琴^{2,3}, 桑明², 田宗文¹

(1. 武汉大学医学院人体解剖学与组织胚胎学系, 湖北省武汉市 430071; 2. 湖北医药学院基础医学研究所, 3. 胚胎干细胞研究湖北省重点实验室, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 基质金属蛋白酶 2; 血小板源性生长因子 BB; p38MAPK; 血管平滑肌细胞; 细胞迁移

[摘要] **目的** 观察血小板源性生长因子 BB(PDGF-BB)是否可以诱导大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)基质金属蛋白酶 2(MMP-2)基因表达及 VSMC 的迁移,探讨 p38 信号通路在这一过程中的作用,为血管重建性疾病的研究提供实验依据。**方法** PDGF-BB 不同浓度和不同时间刺激体外培养的大鼠 VSMC,用放线菌素 D、SB202190(MAPK/p38 特异性抑制剂)处理 PDGF-BB 诱导的 VSMC。细胞划痕实验检测细胞迁移,运用 Real-time RT-PCR 检测 MMP-2 基因表达水平,Western blot 检测 p38 的活性变化。**结果** PDGF-BB 可促进 VSMC 迁移,SB202190 可抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 迁移。不同浓度 PDGF-BB(10 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$)作用 VSMC 0.5 h, MMP-2 基因表达明显增加,其中以 20 $\mu\text{g/L}$ 较显著;用 20 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 作用 VSMC 0.5 h ~ 4 h,可显著上调 MMP-2 基因表达,以 0.5 h 较显著。用放线菌素 D 和 SB202190 预处理后 MMP-2 基因表达降低。PDGF-BB 可激活 VSMC 中磷酸化 p38 水平,SB202190 可抑制 p38 的磷酸化以及相应的 MMP-2 基因表达。**结论** p38 参与了 PDGF-BB 诱导的 VSMC 迁移及 MMP-2 基因表达。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

p38MAPK Mediates PDGF-BB-induced MMP-2 Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

SUN Xiao-Dong^{1,2}, WANG Yan², WANG Han-Qin^{2,3}, SANG Ming², and TIAN Zong-Wen¹

(1. Department of Anatomy and Histo-embryology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China; 3. Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research of Hubei Province, Shiyan, Hubei 442000, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase-2; Platelet-derived Growth Factor BB; p38MAPK; Vascular Smooth Muscle Cells; Cell Migration

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) gene in vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and the dependent signaling pathway. **Methods** VSMC isolated from rats were treated with PDGF-BB at different concentration and durations. The expression of MMP-2 mRNA was detected by Real-time RT-PCR. The p38 activity was detected by Western blot. Actinomycin D, SB202190 were used to investigate underlying mechanisms. Cell migration was tested by scratch. **Results** MMP-2 mRNA expression was up-regulated by PDGF-BB for 1 h at 10 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$, and maximally induced at 20 $\mu\text{g/L}$. The time of MMP-2 mRNA expression maximally occurred 30 min after PDGF-BB exposure. Incubation of VSMC with PDGF-BB resulted in a significant activation of p38. VSMC pretreated with actinomycin D showed a significant decrease of MMP-2 mRNA expression. SB202190 resulted in inactivation of p38, meanwhile, significantly suppressed of MMP-2 mRNA expression on PDGF-BB treatment. **Conclusion** PDGF-BB can induce expression of MMP-2 gene and cell migration in VSMC, which can be regulated by p38 signaling pathway. This process may play a critical role in development of vascular remodeling.

[收稿日期] 2013-10-14

[基金项目] 湖北省十堰市科技项目(十科发 2010-0475,十科通[2006]18K33);湖北医药学院启动基金(2005QDJ08)

[作者简介] 孙晓东,硕士研究生,主要从事细胞分子生物学研究,E-mail 为 sunxiaodongsm@126.com。通讯作者田宗文,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事组织胚胎学研究,E-mail 为 tianzwen@hotmail.com。

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的异常增殖和迁移在血管重建性疾病(vascular remodeling diseases, VRD)的病理过程中起重要作用。多种生长因子和细胞因子可通过与细胞膜受体的相互作用进而激活胞内相关信号通路,启动增殖相关基因的表达,引起位于中膜 VSMC 增殖和迁移而导致受损血管狭窄。其中,血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)是刺激 VSMC 迁移和增殖的强效细胞因子^[1]。因此,研究 VSMC 迁移相关基因以及可能的信号转导机制,对探讨 VRD 血管重建的发生过程有重要意义。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)与细胞外基质降解有关,是一组依赖 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子作为辅助因子的蛋白水解酶家族,由巨噬细胞、VSMC 及其他一些细胞产生,可广泛降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。MMP-2 可以特异性地降解动脉壁基膜中的重要成分 IV 型胶原,可以促进斑块纤维帽中的基质成分降解,从而使粥样斑块不稳定,导致动脉粥样硬化和心肌梗死的发生^[2,3]。研究证实,PDGF-BB 能够通过上调 MMP-2 基因表达调节 VSMC 迁移^[4,5],但具体信号机制不明。本研究拟探讨 PDGF-BB 对体外培养的大鼠主动脉 VSMC MMP-2 基因表达的影响,以及可能参与信号转导的 p38 的活性变化,为 VRD 的研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

重组人 PDGF-BB 购自 Prospec 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;逆转录试剂盒购自 Promega 公司;Trizol、SYBR-Green 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司;放线菌素 D(Actinomycin D)、SB202190、PD98059、Wortmannin 购自 Sigma 公司;兔抗 p-p38 和 p38 的多克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;碱性磷酸酶标记的山羊抗兔和马抗小鼠的二抗购自上海碧云天生物技术有限公司;二氧化碳培养箱为 Thermo 产品;倒置相差显微镜和显微成像系统为 Olympus 产品;垂直凝胶电泳槽为 Bio-Rad 产品;高速冷冻离心机为 Heraeus Beckman 产品;Stepone plus Real-Time PCR System 为 ABI 产品。

1.2 大鼠 VSMC 的培养

参照文献[6],选 6~8 周龄雄性 SD 大鼠,3% 戊巴比妥钠麻醉后,无菌条件下取胸主动脉,眼科

镊剥离外膜,纵行切开血管,消毒棉签擦去内膜层后,将中膜剪成 $1\sim 2\text{ mm}^2$ 大小的组织块,均匀贴在培养皿底面上,加入适量含 20% FBS、青霉素、链霉素各 10^5 IU/L 的 DMEM 培养基,在 37°C 、含 5% CO_2 的恒温孵育箱中培养。3~4 天可见细胞从组织周边爬出,1 周后用 0.125% 胰蛋白酶消化传代,倒置显微镜下见传代细胞呈典型的“峰-谷”样生长,免疫细胞化学染色见细胞内 α -肌动蛋白呈阳性,确定为平滑肌细胞。实验用 4~8 代细胞。

1.3 Actinomycin D、SB202190、PD98059、Wortmannin 的干预

用 DMSO 溶解基因转录阻断剂 Actinomycin D、p38 抑制剂 SB202190、ERK 抑制剂 PD98059 和 PI3K 抑制剂 Wortmannin。接种于 6 孔板的 VSMC 同步 24 h 后,加入 Actinomycin D(终浓度 1 mg/L)、SB202190(终浓度 100 mmol/L)和 Wortmannin(终浓度 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$),加入同体积的 DMSO 为对照,孵育 20 min,再加入 PDGF-BB($20\text{ }\mu\text{g/L}$)作用 30 min。

1.4 细胞划痕实验

先用 Marker 笔在 6 孔板背后用直尺比着,在孔正中直径处划横线。孔中加入约 5×10^5 个细胞,过夜后无血清 DMEM 同步 24 h。用直尺比着在显微镜下用细胞刮沿横线将一侧细胞刮去。用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。设 DMSO 对照组、PDGF-BB 组、SB202190 + PDGF-BB 组、PD98059 + PDGF-BB 组和 Wortmannin + PDGF-BB 组,抑制剂预处理 20 min 后与 PDGF-BB 组同时加入 PDGF-BB 作用 4 h,然后更换为含 1% FBS 的 DMEM 继续培养 16 h。洗涤、固定、HE 染色后用显微成像系统拍照,计算相对迁移距离,观察 4 个视野,取均值。

1.5 Real-time RT-PCR 检测 MMP-2 基因表达

将细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔培养板中,待细胞长满孔底约 70%,换无血清 DMEM 饥饿同步 24 h 后分组进行实验。用 $500\text{ }\mu\text{L}$ Trizol 裂解各组 VSMC,提取总 RNA 并用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 Real-time RT-PCR 检测,以 GAPDH 为内参来调整模板浓度。MMP-2(NM_031054)上游引物 5'-CAC TTT CTA TGG CTG CCC CA-3',下游引物 5'-GGT CAA GGT CAC CTG TCT GG-3';GAPDH(NM_017008)上游引物 5'-GGC AGC CCA GAA CAT CATC C-3',下游引物 5'-GCC AGC CCC AGC ATC AAA G-3'。每个样品反应总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95°C 5 min, 95°C 20 s, 58°C 20 s, 72°C 20 s,35 个循环。然后进行数据分析,各目的基因表达水平的

变异用变化倍率 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示。

1.6 Western blot 检测 p38 活性

收集各组 VSMC, 用冰 PBS 洗 3 次, 加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液冰上处理 20 min, 离心后吸取上清。用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 蛋白上样量 30 μg 。转膜后用 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h, 分别加兔抗 p-p38 和 p38 的多克隆抗体 (1:1000); 鼠抗 Tublin 多克隆抗体 (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗膜后加碱性磷酸酶标记的山羊抗兔和鼠抗小鼠的二抗 (1:1000), 室温摇床上孵育 2 h, 洗膜后用 BCIP/NBT 显色液膜上显色, 扫描后进行图像灰度分析。

1.7 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数的比较采用 t 检验, 多样本组间均数比较采用单因素方差分

析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDGF-BB 促进 VSMC 迁移

DMSO 对照组、PDGF-BB 组、SB202190 + PDGF-BB 组、PD98059 + PDGF-BB 组和 Wortmannin + PDGF-BB 组细胞相对迁移距离分别为 0.773 ± 0.100 mm、 1.230 ± 0.091 mm、 0.390 ± 0.078 mm、 1.203 ± 0.149 mm 及 2.243 ± 0.219 mm。与 DMSO 对照组相比, PDGF-BB 组和 Wortmannin + PDGF-BB 组细胞迁移明显被促进 ($P < 0.05$); 与 PDGF-BB 组相比, SB202190 + PDGF-BB 组细胞迁移明显被抑制 ($P < 0.01$), 而 PD98059 + PDGF-BB 组细胞迁移没有明显改变 (图 1)。

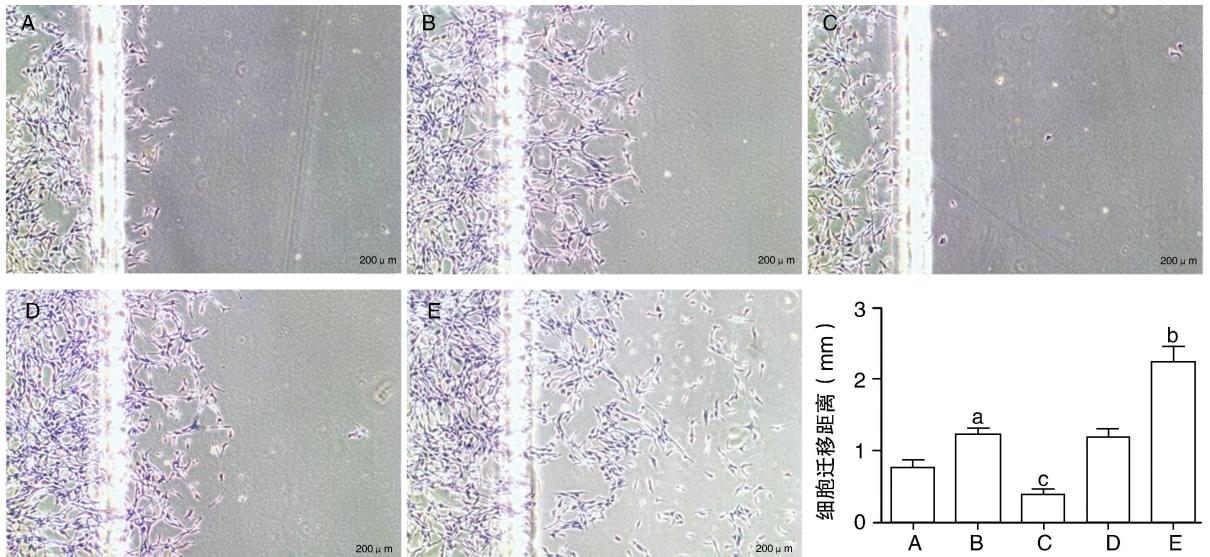


图 1. PDGF-BB、SB202190、PD98059 和 Wortmannin 对 VSMC 细胞迁移的影响 A 为 DMSO 对照组, B 为 PDGF-BB 组, C 为 SB202190 + PDGF-BB 组, D 为 PD98059 + PDGF-BB 组, E 为 Wortmannin + PDGF-BB 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 DMSO 对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 PDGF-BB 组比较。

Figure 1. Effects of PDGF-BB, SB202190, PD98059 and Wortmannin on VSMC cell migration

2.2 PDGF-BB 对 MMP-2 基因表达的影响

与对照组相比, 除 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 组外, 其它 PDGF-BB 浓度组均能明显增强 MMP-2 基因的表达 ($P < 0.05$), 以 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度组增强效果最显著。以 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ PDGF-BB 作用 VSMC 不同时间, 在 0.5 h 作用组 MMP-2 基因表达最强, 说明 PDGF-BB 对 VSMC 中 MMP-2 基因的调节是瞬时性的 (图 2)。

2.3 阻断剂对 PDGF-BB 诱导的 MMP-2 基因表达的影响

与 DMSO 对照组相比, PDGF-BB 组 MMP-2 基

因的表达明显上升 ($P < 0.05$)。与 PDGF-BB 组相比, Actinomycin D、SB202190 预处理后 MMP-2 基因的表达显著降低 ($P < 0.05$); PD98059 对这一作用的抑制效果不明显, 而 Wortmannin 预处理后 MMP-2 基因的表达有明显上升 ($P < 0.01$; 图 3)。

2.4 PDGF-BB 激活 p-p38

与 0 min 相比, PDGF-BB 作用 5 min 即可显著激活 p-p38 的表达 ($P < 0.05$), 随着时间的延长 p-p38 的表达逐渐减弱。与 PDGF-BB 组相比, SB202190 预处理后 p-p38 的表达被明显抑制 ($P < 0.05$; 图 4)。

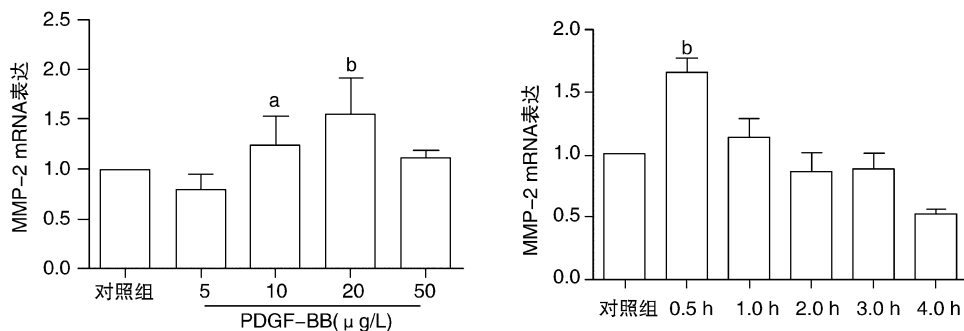


图 2. PDGF-BB 对 MMP-2 基因表达的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Effect of PDGF-BB on the expression of MMP-2 gene

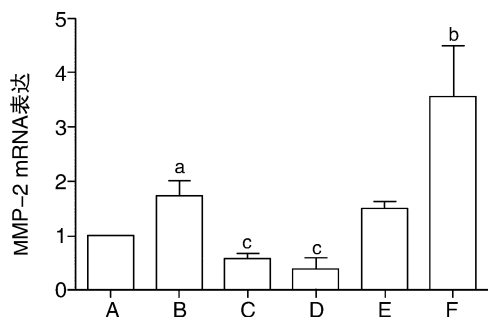


图 3. Actinomycin D、SB202190、PD98059、Wortmannin 对 PDGF-BB 诱导 VSMC 中 MMP-2 基因表达的影响 A 为 DMSO 对照组, B 为 PDGF-BB 组, C 为 Actinomycin D + PDGF-BB 组, D 为 SB202190 + PDGF-BB 组, E 为 PD98059 + PDGF-BB 组, F 为 Wortmannin + PDGF-BB 组。

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 DMSO 对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 PDGF-BB 组比较。

Figure 3. Effects of Actinomycin D, SB202190, PD98059, Wortmannin on the expression of VSMC MMP-2 gene induced by PDGF-BB

3 讨论

正常情况下, VSMC 处于分化状态, 不会向内膜

迁移。当局部血管损伤时, 可激活多种细胞因子, 这些细胞因子刺激 VSMC 由收缩表型转化为合成表型, 并向内膜迁移、增殖, 促进血管疾病的发生, 如高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等, 特别是在 VRD 病理过程中起重要作用。研究发现, 在大鼠未损伤动脉, 只有无活性 MMP-2 表达, 损伤后 24 h, MMP-2 mRNA 水平和活性增加 2 倍^[7]。作为一种降解 ECM 的蛋白酶, 能促进粥样硬化斑块的形成发展及破裂。

通过细胞迁移实验, 我们发现 PDGF-BB 可以诱导 VSMC 迁移, 这与文献[4]报道是一致的, 同时发现这一迁移可以被 p38MAPK 的信号通路抑制剂 SB202190 阻断。本研究发现, 低浓度 PDGF-BB (5 μg/L) 不能促进 MMP-2 基因表达, 当 PDGF-BB 浓度在 10 ~ 50 μg/L 时则可显著提高 MMP-2 基因表达。从时间梯度作用结果来看, 20 μg/L PDGF-BB 刺激细胞 30 min, 即可显著提高 MMP-2 基因表达, 1 h 后 MMP-2 基因表达随之降低, 并基本维持在稳定水平, 说明 PDGF-BB 可以瞬时调节 MMP-2 基因表达, 这一结果也与已有的报道一致^[2]。另外, 由

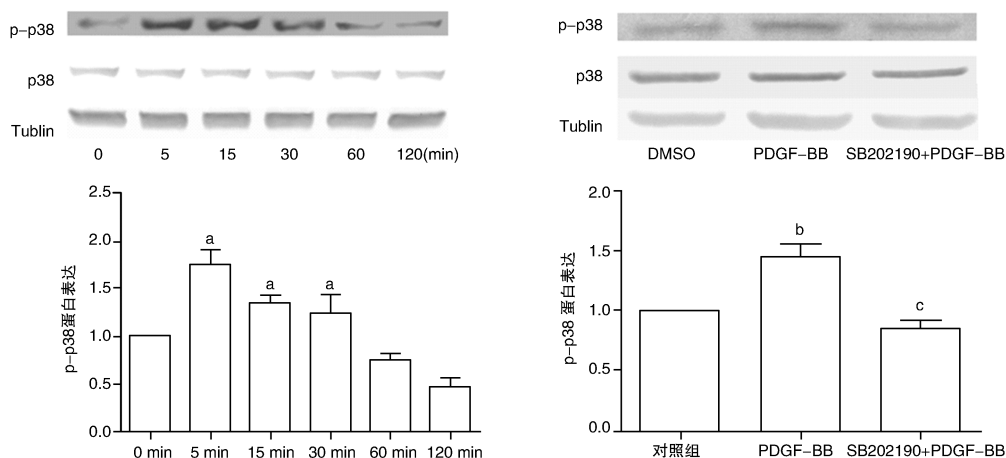


图 4. PDGF-BB 对 p38 蛋白磷酸化的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 0 min 比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 PDGF-BB 组比较。

Figure 4. Effect of PDGF-BB on p38 phosphorylation

于 mRNA 水平的多少主要取决于该基因转录活化的程度与生成 mRNA 的稳定性,我们用基因转录抑制剂 Actinomycin D 预处理 VSMC,发现 Actinomycin D 完全抑制了 PDGF-BB 诱导的 MMP-2 基因表达,说明 PDGF-BB 可以在转录水平上调 MMP-2 基因的表达。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族可以在一系列细胞外刺激下调细胞行为。p38 信号通路可以在紫外照射、热击、高渗透压、炎症因子、生长因子等细胞外刺激时被激活,调控细胞分化、细胞周期、炎症反应等多种生理过程。并且 p38MAPK 通路激活可上调 MMP^[8-10]。新近的研究发现^[11-13],炎症因子、细胞因子和生长因子等直接或间接地激活 p38MAPK 的上游激活物 MKK3/4/6,通过高度保守三级级联途径激活 p38MAPK,将促 VSMC 增殖信号传入细胞核中,改变 VSMC 基因表达,最终使 VSMC 从中膜进入内膜,并发生增殖促进动脉粥样硬化的发生和发展。为了验证 PDGF-BB 是否通过 p38MAPK 信号通路来调节 MMP-2 基因表达,我们首先使用 p38MAPK 特异性阻断剂 SB202190 预处理 VSMC,实时定量 PCR 检测发现 SB202190 明显抑制了 PDGF-BB 诱导的 MMP-2 基因表达,而 ERK 抑制剂 PD98059 对 PDGF-BB 诱导的 MMP-2 mRNA 表达没有显著的抑制作用;再通过 Western blot 方法证实 PDGF-BB 可以促进 VSMC 中 p-p38 蛋白的活化,SB202190 可以阻断 VSMC 中 PDGF-BB 诱导的 p-p38 的活化。结果还发现,在 PDGF-BB 刺激 VSMC 5 min 时即可激活 p38 蛋白发生活化,p-p38 维持到 60 min 后逐渐减弱,而 PDGF-BB 诱导 VSMC 30 min 时 MMP-2 基因表达最高,这说明 PDGF-BB 诱导 MMP-2 基因表达发生在 PDGF-BB 活化 p38 之后,这提示 p38 可能参与调节了 PDGF-BB 诱导的 MMP-2 基因表达。而 MAPK 家族中的另一重要成员 ERK 没有发挥类似作用。在这个实验中,我们还使用了 PI3K 抑制剂 Wortmannin,结果发现 MMP-2 基因表达没有被抑制,反而是被显著上调的,同时 Wortmannin 还促进了 PDGF-BB 诱导的 VSMC 迁移,提示 PI3K/Akt 信号通路可能与 p38 信号通路之间存在交互作用,对 MMP-2 的调节呈现负性调控,这一点也有待进一步探讨。

前期研究发现 PDGF-BB 诱导 VSMC 中 Pim-1 基因的表达,进而促进 VSMC 增殖^[14]。本研究观察到 PDGF-BB 促进细胞迁移,对 VSMC 中 MMP-2 表达有促进作用,并呈现瞬时性,而且受到 p38MAPK

信号通路的调节。这些结果提示,PDGF-BB 可能通过 p38MAPK 信号通路调节 MMP-2,以改变 VSMC 的迁移、增殖等功能从而调节血管重建。

[参考文献]

- [1] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84 (3): 767-801.
- [2] Lemaitre V, Soloway PD, D' Armiento J. Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1 [J]. *Circulation*, 2003, 107: 333-338.
- [3] 李光伟, 李爽. 基质金属蛋白酶组织抑制因子-3 基因转染血管平滑肌细胞移植对大鼠心肌梗死的治疗作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22 (6): 1-6.
- [4] 于悦卿, 郭文潮, 郝玉宾. 血小板源生长因子对大鼠血管平滑肌细胞表达基质金属蛋白酶 2 的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (11): 911-918.
- [5] 郭文潮, 于悦卿, 郝玉宾. 血小板源性生长因子提高血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2 活性的机制 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21 (27): 3 346-375.
- [6] 王刚, 边云飞, 白瑞, 等. 肾素通过非血管紧张素 II 途径促进大鼠血管平滑肌细胞钙化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (4): 294-298.
- [7] Webb KE, Henney AM, Anglin S, et al. Expression of matrix metalloproteinase and their inhibitor TIMP-1 on the rat carotid artery after balloon injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 1 837-844.
- [8] Li H, Mittal A, Paul PK, et al. Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis augments matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) production in skeletal muscle through the activation of nuclear factor-kappaB-inducing kinase and p38 mitogen-activated protein kinase: a potential role of MMP-9 in myopathy [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (7): 4 439-450.
- [9] Duarte S, Shen XD, Fondevila C, et al. Fibronectin- α 4 β 1 interactions in hepatic cold ischemia and reperfusion injury: regulation of MMP-9 and MT1-MMP via the p38MAPK pathway. *Am J Transplant*, 2012, 12 (10): 2 689-699.
- [10] Pan T, Xiao Z. Expression of P38 MAPK and MMP-2 mRNA in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury [J]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2013, 15 (5): 383-386.
- [11] 刘丹, 杨慧, 李汇华. 胞内 NOD1 激活加重心肌梗死及其机制研究 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33 (2): 124-131.
- [12] Subramanian V, Golledge J, Heywood EB, et al. Regulation of PPAR γ by angiotensin II via TGF- β 1 activated p38 MAP kinase in aortic smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32 (2): 397-405.
- [13] 刘蜜, 刘秀华. 内质网应激与心血管疾病 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2011, 31 (4): 305-309.
- [14] 孙晓东, 王燕, 王汉琴, 等. STAT3 介导了血小板源性生长因子 BB 诱导的大鼠血管平滑肌细胞 Pim-1 表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29 (5): 804-809.