

苯并芘通过 NF- κ B 诱导 RAW264.7 细胞 MMPs 的表达

王国强 郭辉辉 吴少泽 陶路渊 薛杨静 唐疾飞 季亢挺

摘要 **目的** 探讨烟雾主要成分苯并芘(BaP)对 RAW264.7 单核-吞噬细胞中基质金属蛋白酶(MMPs)的影响,为研究吸烟与腹主动脉瘤的关联提供相关依据。**方法** 应用免疫印迹法观察 BaP 对体外培养的 RAW264.7 单核-吞噬细胞基质金属蛋白酶-2/9/12(MMP-2/9/12)的影响,并验证其是否通过 NF- κ B 信号通路。**结果** BaP 暴露使培养巨噬细胞 NF- κ B 活化,同时伴随 MMP-9、MMP-12 表达升高,而 PDTC,核转录因子 NF- κ B 的抑制剂,可抑制 NF- κ B 活化,同时伴随 MMP-9、MMP-12 表达下降。**结论** BaP 可通过 NF- κ B 通路诱导 RAW264.7 单核-吞噬细胞 MMP-9、MMP-12 表达升高。

关键词 单核-吞噬细胞 苯并芘 核转录因子 κ B 基质金属蛋白酶

中图分类号 R543.1+6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.015

Benzo[a]pyrene (BaP) Induced the Expression of MMPs in the RAW264.7 Cell through the NF- κ B. Wang Guoqiang, Guo Huihui, Wu Shaoze, et al. The Second Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the effect of benzo[a]pyrene (BaP), the main components of smoke, on matrix metalloproteinase (MMPs) of RAW264.7 mononuclear macrophage. **Methods** We observed the influence of BaP on matrix metalloproteinase-2/9/12 (MMP-2/9/12) of RAW264.7 mononuclear macrophage in vitro by western blotting and verified if it happened through the NF- κ B signaling pathway. **Results** BaP caused NF- κ B activation and expression of MMP-12, MMP-9 increased in cultured macrophages. While PDTC, an inhibitor of nuclear transcription factor NF- κ B, caused the inhibition of NF- κ B activation and expression of MMP-12 and MMP-9 decreased. **Conclusion** BaP can induce the expression of MMP-9 and MMP-12 in RAW264.7 cell by NF- κ B pathway.

Key words Monocyte macrophages; Benzo[a]pyrene; Nuclear transcription factor kappa B; Matrix metalloproteinases

腹主动脉瘤(AAA)的发生、发展是多种因素相互作用的结果,其中吸烟是腹主动脉瘤的高危因素,而苯并芘(BaP)是香烟烟雾的主要成分之一^[1,3]。Yong 等^[4]的研究中,在 C57/B6J 小鼠体内利用 BaP 和血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)诱导 AAA 模型。结果显示, BaP 可使动脉血管壁巨噬细胞浸润、弹性纤维素紊乱,促进 AAA 的发生。本课题组前期在体研究表明,香烟成分 BaP 可能通过诱导血管壁巨噬细胞浸润、MMPs 表达升高同时伴随 NF- κ B 活力的增强,进一步导致血管壁的弹性纤维和胶原纤维降解,血管壁结构丧失,从而引起 AAA 的发生^[5]。目

前对于腹主动脉瘤的机制研究集中在炎症反应和细胞外基质的降解,但对于 BaP 是否诱导巨噬细胞基质金属蛋白酶的变化及相关机制鲜有报道。本研究以体外培养 RAW264.7 单核-吞噬细胞为研究对象,观察 BaP 对 MMP-2、MMP-9、MMP-12 的影响,并探讨该影响是否通过 NF- κ B 通路。

材料与方法

1. 研究对象:RAW264.7 细胞为小鼠白血病单核细胞,购自上海中科院细胞库。

2. 试剂:DMEM 培养液胎牛血清(FBS)、MMPs 一抗、P65 一抗均为 Gibco 产品。苯并[a]芘-B1760 购自美国 Sigma 公司。

3. 方法:(1)细胞培养:冻存的 RAW264.7 细胞经复苏后培养于 10% DMEM 培养液中并在倒置显微镜下观察细胞生长情况,每隔 2 天换液。当细胞生长达培养瓶底面积的 80% 时,使用吸管吹下。在倒置显微镜下观察下,待 90% 以上细胞脱落时,将细胞悬液转移至 15ml 离心管中,1000r/min 离心 5min,弃去

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573185);浙江省科技厅基金资助项目(2014C33163);温州科技局计划项目(Y20140678)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院心血管内科(王国强、吴少泽、陶路渊、薛杨静、唐疾飞、季亢挺);312400 绍兴,嵊州市人民医院(郭辉辉)

通讯作者:季亢挺,硕士生导师,电子信箱:jikt@wzmc.edu.cn

上清液。吸取 9ml 10% DMEM 完全培养液至上述含有细胞沉淀的离心管中,吹打至细胞悬液。分别吸取 3ml 细胞悬液至预先装好 1ml 10% DMEM 完全培养液的 25cm³ 的培养瓶中,轻轻摇晃混匀。将培养瓶重新置于饱和湿度培养箱中孵育。(2) 分组:正常对照组:不做任何处理;溶剂对照组(即 DMSO 组);DMSO 终浓度为 0.1ml/L;BaP 组:BaP 终浓度为 20μmol/L;PDTC 组:PDTC 为核转录因子 NF-κB 的抑制因子二硫代氨基甲酸吡咯烷。先 50μmol/L 的 PDTC 作用细胞 2h 后,再用 20μmol/L 的 BaP 作用细胞 24h。(3) 取材:将各组 RAW264.7 单核-吞噬细胞培养 24h 后提取总蛋白,各组实验重复 3 次。

4. 目的蛋白测定:利用 Western blot 法检测各组

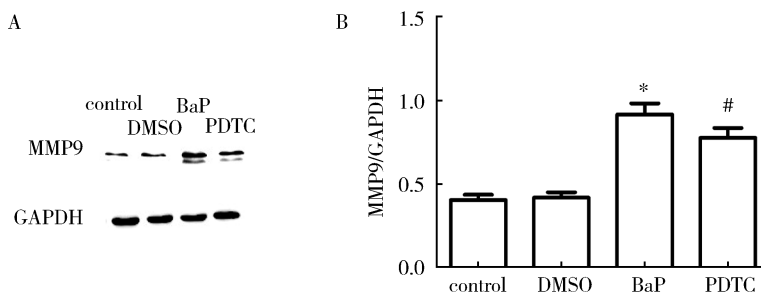


图1 各组细胞总蛋白中 MMP9 的表达水平

A. 不同药物干预细胞培养 24h, Western blot 法检测结果显示 MMP9 条带; B. 各组 MMP9/GAPDH 比值的柱状图。

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与 BaP 组比较, # $P < 0.05$

2. BaP 对 RAW264.7 单核-吞噬细胞 MMP12 表达的影响:从图 2 可见,各组 MMP12 的表达量:正常组 0.68 ± 0.09 ;溶剂组 0.63 ± 0.71 ;PDTC 组 0.85 ± 0.42 ;BaP 组 0.81 ± 0.46 。与正常组相比,DMSO 组

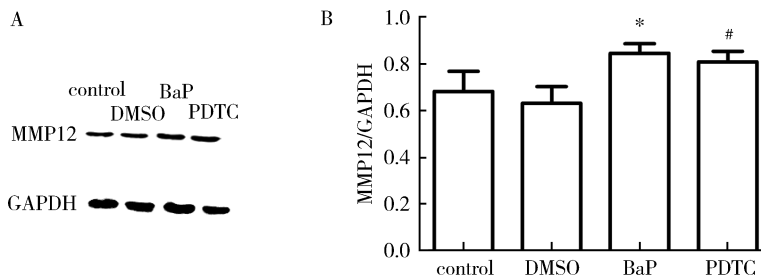


图2 各组细胞总蛋白中 MMP12 的表达水平

A. 不同药物干预细胞培养 24h, Western blot 法检测结果显示 MMP12 条带; B. 各组 MMP12/GAPDH 比值的柱状图

与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$; 与 BaP 组比较, # $P > 0.05$

3. BaP 对 RAW264.7 单核-吞噬细胞 MMP2 表达的影响:图 3 所示,各组 MMP2 的表达量:正常组 0.25 ± 0.03 ;溶剂组 0.30 ± 0.16 ;BaP 组 0.26 ± 0.12 ;PDTC 组 0.28 ± 0.13 。MMP2 在正常组、BaP 组、PDTC 组的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

NF-κB、MMP2、MMP9、MMP12 蛋白的表达情况。

5. 统计学方法:统计学分析采用 SPSS 17.0 完成,作图利用 GraphPad Prism5。实验数据均以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. BaP 对 RAW264.7 单核-吞噬细胞 MMP9 表达的影响:在图 1 中可知,各组 MMP9 的表达量:正常组 0.40 ± 0.03 ;溶剂组 0.41 ± 0.03 ;BaP 组 0.91 ± 0.07 ;PDTC 组 0.78 ± 0.06 。与正常组相比,DMSO 组差异无统计学意义($P > 0.05$),BaP 组 MMP-9 表达升高($P < 0.01$);而在 PDTC 处理组,MMP-9 表达较 BaP 组 MMP-9 表达下降($P < 0.05$)。

差异无统计学意义($P > 0.05$),BaP 组 MMP12 的表达上调($P < 0.05$);与 BaP 组相比,PDTC 组 MMP12 表达较 BaP 无明显下调($P > 0.05$)。

4. BaP 对 RAW264.7 单核-吞噬细胞 NF-κB 活性的影响:图 4 可见各组总蛋白中 P65 及 P65 表达水平:总 P65 各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。核蛋白,与正常组(0.30 ± 0.06)相比,溶剂组(0.30 ± 0.06)核 P65 表达差异无统计学意义($P >$

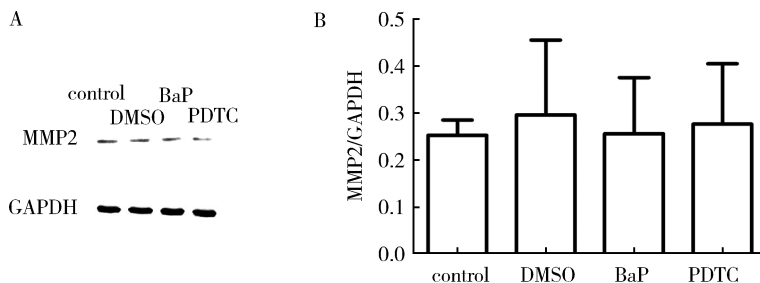


图 3 各组细胞总蛋白中 MMP2 的表达水平

A. 不同药物干预细胞培养 24h, Western blot 法检测结果显示 MMP2 条带; B. 各组 MMP2/GAPDH 比值的柱状图

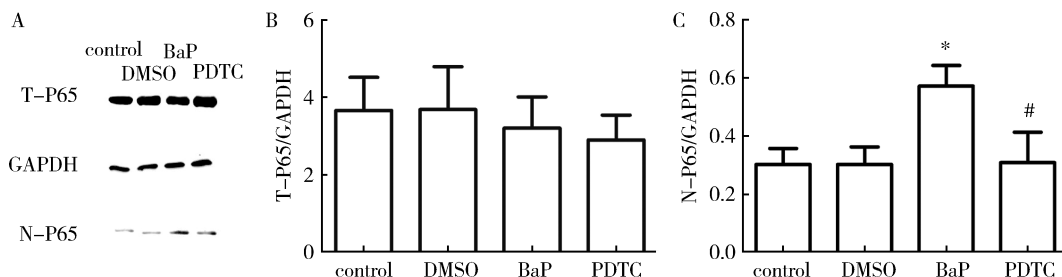


图 4 各组总蛋白中 P65 及核 P65 的表达水平

A. 不同药物干预细胞培养 24h, Western blot 法检测结果显示总蛋白及核蛋白中 P65 条带; B. 各组总蛋白中 P65 与 GAPDH 比值的柱状图;

C. 各组核 P65 与 GAPDH 比值的柱状图, 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与 BaP 组比较, # $P < 0.05$

0.05); BaP 组 (0.57 ± 0.07) 核 P65 表达显著升高 ($P < 0.05$)。与 BaP 组相比, PDTC 组 (0.31 ± 0.10) 核 P65 表达显著下降 ($P < 0.05$)。由此可推断与正常组相比, DMSO 组 NF- κ B 的活力差异无统计学意义 ($P > 0.05$), BaP 组 NF- κ B 的活力显著上调 ($P < 0.05$); 与 BaP 组相比, PDTC 组 NF- κ B 活力较 BaP 组显著下降 ($P < 0.05$)。

讨 论

近年来, 吸烟与 AAA 的研究受到广泛关注。BaP 为香烟烟雾的重要组成成分, 属于多环芳香烃物质, 为有机染料的不完全燃烧产物, 研究证实 BaP 参与了动脉瘤的发生^[6]。AAA 的发病机制现在还不甚清楚, 目前主流观点认为炎性细胞浸润和细胞外基质的降解在其中起关键作用。本课题组前期在体研究表明, 香烟成分 BaP 可能通过诱导血管壁巨噬细胞浸润、MMPs 表达升高同时伴随 NF- κ B 活力的增强, 进一步导致血管壁的弹性纤维和胶原纤维降解, 血管壁结构丧失, 从而引起 AAA 的发生^[5]。目前对于腹主动脉瘤的机制研究集中在炎症反应和细胞外基质的降解, 但对于 BaP 是否诱导巨噬细胞基质金属蛋白酶的变化及相关机制鲜有报道。本研究以体外培养 RAW264.7 单核-吞噬细胞为研究对象, 观察 BaP 对 MMP-2、MMP-9、MMP-12 的影响, 并探讨该影响

是否通过 NF- κ B 号通路。

基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一类依赖于锌、钙离子的内肽酶^[7]。可以降解细胞外基质成分, 如胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白、蛋白多糖、弹性蛋白等^[8]。AAA 的病理学改变是炎症细胞的浸润和细胞外基质成分的降解, 而细胞外基质蛋白发生降解的始动因素为 MMPs 的表达。一项荟萃分析证实, 与没有患 AAA 的患者相比, 患 AAA 的患者具有较高水平的血清 MMP9^[9]。此外, Huusko 等^[10]研究发现 AAA 患者的全身血管组织 MMP2 表达升高。本课题组前期试验证实, MMP2、MMP9 及 MMP12 在 AAA 组织中表达较正常组织升高^[5]。在 AAA 组织中, 利用免疫沉淀法证实几乎所有的 MMP9 表达于炎性细胞而不是平滑肌细胞或者成纤维细胞^[11]。在大鼠动脉瘤组织中, 抑制炎性细胞可以降低 MMP2、MMP9 以及 MMP12 的表达。综上所述, 在 AAA 组织中, 炎性细胞表达 MMP2、MMP9 和 MMP12 增多, 进而降解 ECM, 导致动脉瘤扩张形成动脉瘤。在本实验中, 与正常组相比, BaP 刺激 RAW264.7 单核-吞噬细胞后, 可以引起 MMP9、MMP12 表达显著升高, 而 MMP2 未见明显升高, 这与 Piechota-Polanczyk 等^[12]在 AAA 的研究一致。MMP9 由巨噬细胞分泌, 而 MMP2 由间充质细胞分泌, 间充质细胞持续表达 MMP2, 但

是其他细胞如巨噬细胞和成纤维细胞也可分泌少量 MMP2, 这与本实验结果一致。内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞可以分泌少量 MMP12, 它主要由巨噬细胞产生。MMP9 属于明胶酶, 又称为明胶酶 B, 作用底物为明胶和 IV 型胶原, 还可以降解层粘连蛋白和 VII、IX、X 型胶原。MMP2 也属于明胶酶, 称为明胶酶 B, 降解的底物除 MMP9 的底物外, 还可以降解 I、II、III 型胶原。MMP12 被称为人巨噬细胞弹性蛋白酶, 主要作用底物为弹性蛋白酶。可见, 巨噬细胞分泌的 MMP9、MMP12 降解动脉壁组织中的弹性蛋白酶和胶原蛋白以及其他的结缔组织中起着重要作用。这与课题组前期在体实验, 一起证实了巨噬细胞以及分泌的 MMPs 在 BaP 建立的 AAA 模型中发挥着重要作用。

本课题组前期研究中发现 NF- κ B 在动脉瘤组织中被活化^[5]。同样, Parodi 等^[13]发现 PDTC 通过抑制 NF- κ B 减少了 AAA 的发生率。在体外培养人单核细胞, 证实抑制 NF- κ B 可以引起 MMP9 的表达量下降^[14]。PDTC 是一种特异性 NF- κ B 的抑制剂, 可以在 NF- κ B 活化通路的不同水平发挥抑制作用, 如可以抑制 NF- κ B P65 亚单位, 减少 NF- κ B 的核移位, 抑制 I- κ B 的降解。综上所述, NF- κ B 在单核-吞噬细胞中可以激活基质金属蛋白酶, 并且通过抑制 NF- κ B 的表达可以降低基质金属蛋白酶的表达。NF- κ B 转录因子家族包含着 5 个亚基, 其中二聚体形式具有活性。其家族成员包括 P50、P52、P65、RelB 和 c-REL, 在 P65、c-Rel 和 RelB 结构中存在转录激活区域, 可以正向调控基因表达。在胞质中, 具有活性的二聚体在与 NF- κ B 的抑制剂(I- κ Bs)结合抑制 NF- κ B 的活性。当 I- κ Bs 激酶(IKKs)将 I- κ Bs 磷酸化, 二聚体形式可活化进入核内, 改变特定基因的转录, 影响众多细胞学功能如增殖及代谢等。MMP9 的启动子序列中含有 NF- κ B 的共有序列。当 NF- κ B 活化后促进 MMP9 的转录及翻译, 引起 MMP9 蛋白水平表达升高。本课题组前期在体实验, 在 AAA 组织学水平证实了血管壁的炎性细胞浸润、NF- κ B 活、MMP2、MMP9 和 MMP12 表达升高。此次实验在细胞学水平证实, BaP 诱导 RAW264.7 单核巨噬细胞 MMP9 和 MMP12 表达升高。并进一步发现, MMP9 和 MMP12 的升高是 NF- κ B 信号通路介导完成的。在实验中, BaP 组核转录因子 P65 表达较正常组显著升高, 且 PDTC 组核转录因子 P65 的表达较 BaP 组表达显著下降。这说明

BaP 在单核-吞噬细胞通过激活 NF- κ B 通路影响 MMP 的表达。

本研究发现, BaP 通过 NF- κ B 信号通路诱导 RAW264.7 单核-吞噬细胞 MMP9 和 MMP12 表达升高。

参考文献

- Guo X, Luo L, Ma Y, *et al.* Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on particulate organic matters [J]. *J Hazard Mater*, 2010, 173(1-3): 130-136
- Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, *et al.* Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(2): 92-102
- Toghill BJ, Saratzis A, Harrison SC, *et al.* The potential role of DNA methylation in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(1): 121-129
- Zhang Y, Ramos KS. The development of abdominal aortic aneurysms in mice is enhanced by benzo(a)pyrene [J]. *Vasc Health Risk manage*, 2008, 4(5): 1095-1102
- Ji K, Zhang Y, Jiang F, *et al.* Exploration of the mechanisms by which 3,4-benzopyrene promotes angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice [J]. *J Vasc Surg*, 2014, 59(2): 492-499
- Prins PA, Perati PR, Kon V, *et al.* Benzo[a]pyrene potentiates the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 29(1-2): 121-30
- Qin Y, Cao X, Yang Y, *et al.* Cysteine protease cathepsins and matrix metalloproteinases in the development of abdominal aortic aneurysms [J]. *Future Cardiol*, 2013, 9(1): 89-103
- Nissinen L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in inflammation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840(8): 2571-2580
- Takagi H, Manabe H, Kawai N, *et al.* Circulating matrix metalloproteinase-9 concentrations and abdominal aortic aneurysm presence: a meta-analysis [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009, 9(3): 437-440
- Huusko T, Salonurmi T, Taskinen P, *et al.* Elevated messenger RNA expression and plasma protein levels of osteopontin and matrix metalloproteinase types 2 and 9 in patients with ascending aortic aneurysms [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 145(4): 1117-1123
- Zhang F, Kent KC, Yamanouchi D, *et al.* Anti-receptor for advanced glycation end products therapies as novel treatment for abdominal aortic aneurysm [J]. *Ann Surg*, 2009, 250(3): 416-223
- Piechota-Polanczyk A, Demyanets S, Mittlboeck M, *et al.* The influence of simvastatin on NGAL, matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human intraluminal thrombus and abdominal aortic aneurysm tissue [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2015, 49(5): 549-555
- Parodi FE, Mao D, Ennis TL, *et al.* Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in mice by treatment with pyrrolidine dithiocarbamate, an antioxidant inhibitor of nuclear factor-kappaB [J]. *J Vasc Surg*, 2005, 41(3): 479-489
- Chase AJ, Bond M, Crook MF, *et al.* Role of nuclear factor-kappaB activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo [J]. *Arterioscl, Throm, Vasc Biol*, 2002, 22(5): 765-771

(收稿日期: 2015-10-23)

(修回日期: 2015-11-05)