

• 基础研究 •

肾上腺素受体激动剂对基质金属蛋白酶基因转录的影响

赵亚力 宋国杰 李琦 韩为东 齐永 伍志强 杨洁 田丽媛

【摘要】 目的 从细胞水平了解肾上腺素受体对基质金属蛋白酶(MMP)的调控机制。方法 构建含 MMP-9 启动子区的乙酰基转移酶(CAT)报告基因质粒,转染人脐静脉内皮细胞系 ECV304 细胞,测定肾上腺素受体激动剂刺激后报告基因的 CAT 活性。结果 重组质粒转染 ECV304 细胞后,加入苯肾上腺素(PE, α 肾上腺素受体激动剂)和异丙肾上腺素(ISO, β 肾上腺素受体激动剂)后,含 MMP-9 启动子区域(-1285~+1)和截短(-523~+1)区域的转染细胞报告基因表达上调,但前者更为明显。PE 与 ISO 的反应强度和变化曲线有较大差异,ISO 峰值在 4h 反应强度为 80 倍,而 PE 为逐步上升,至 24h 达到最大值。结论 肾上腺素受体与 MMP 活性之间存在着明显的相关性,为老年心血管病的进一步临床和实验研究提供了信息。

【关键词】 基质金属蛋白酶;受体;肾上腺素

Effect of adrenergic receptor agonists on transcription of matrix metalloproteinases gene

ZHAO Yali, SONG Guojie, LI Qi, et al

Department of Molecular Biology, Institute of Basic Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the mechanisms of regulating matrix metalloproteinases (MMP)9 activity by adrenoceptor in ECV304 cells. Methods The reporter gene plasmids containing the promoter of MMP-9 and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) was constructed, then the promoter activity of MMP-9 CAT expression following exposure to adrenoceptor stimulator(phenylephrine and isoprenaline) was investigated. Results After the plasmid was transfected to ECV304 cells, both isoprenaline and phenylephrine increased MMP-9 promoter activity. Cells exposed to isoprenaline had rapid response and the greatest increase (80.6 ± 14.8 folds) appeared after exposure for 4h. Phenylephrine also caused an increase in MMP-9 promoter activity, the greatest increase (23 ± 3.7 fold) occurred at 24h. Conclusion Adrenoceptor and MMP-9 gene activity have notable correlation, which provides useful information for the future clinical and experimental investigation of cardiovascular diseases in the elderly.

【Key words】 matrix metalloproteinases; receptor, adrenergic

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类对细胞外基质成分有特异降解作用的锌依赖性蛋白水解酶家族,通过降解细胞外基质在心肌重构中起重要作用,已证实在充血性心力衰竭存在 MMP 表达的增加^[1,2]。心肌细胞在应用异丙肾上腺素后 MMPs(-2, -9, -14)的表达明显增加^[3,4]。心脏特异性 MMP-1 的过度表达导致幼鼠左室肥厚和收缩力增强,年长鼠心室扩张和衰竭,而 MMP-9 缺失可减轻左室扩张,降低梗死范围^[5,6]。

提示 β 肾上腺素受体拮抗剂具抗重构作用,能预防和部分减弱与实验性心衰有关的心脏重构适应障碍,但其机制并不十分清楚^[7,8]。研究证实,心衰成功的治疗方法包括针对细胞外基质的重构^[9]。在一短期心室功能失调模型中应用 β_1 受体阻断剂阿替洛尔能预防持续性的 MMP 激活^[10,11]。心衰患者使用卡维地洛(α/β 肾上腺素受体拮抗剂)能稳定血浆 MMP-9 的活性,并改变 MMP/金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteninase,

收稿日期:2007-01-31

作者单位:100853 北京市,解放军总医院基础医学所分子生物学研究室(赵亚力、李琦、韩为东、齐永、伍志强、杨洁、田丽媛);225009 扬州市,扬州大学医学院心血管内科(宋国杰)

作者简介:赵亚力,男,1954 年 3 月生,河北省安平县人,博士,研究员。Tel: 010-66937516, E-mail: ZhaoYL301@yahoo.com.cn

TIMP)比例,从而抑制心衰和延缓疾病的发展^[12]。但 β 肾上腺素受体刺激调节 MMP 的细胞内途径至今尚未阐明^[13,14]。针对这一问题,笔者根据已有的肾上腺素受体激动剂影响 MMP 活性的证据,由肾上腺素受体对 MMP 基因转录活性的影响入手,以 ECV304 细胞系为模型,探讨并阐明二者之间可能存在的分子水平转录调控机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 ECV304 细胞为本室保存;大肠杆菌 DH5 α 为本室常规保存;质粒 pCAT-BASIC,购自 Promega 公司;Hind III、Xho I、T4 DNA 连接酶、LA Taq 酶购自 TaKaRa(大连宝生物有限公司);PCR 扩增引物由上海华诺公司合成;PCR 产物回收试剂盒为 Promega 公司产品;DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;胰酶为 Gibco 公司产品;DMSO 为 Sigma 公司产品;青霉素、链霉素、卡那霉素购自 Amresco 公司。

1.2 氯霉素乙酰基转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)报告基因重组质粒的构建

利用来自正常人的基因组 DNA,使用 MMP-9 基因+1 位置相对应的下游引物加 5'端 Hind III 酶切位点(5'-TGGTGAGGGCAGAGGTGTCT-3'),以 MMP-9 基因-533、-1285 位置开始为上游引物,引物 5'加入 Xho I 的酶切位点。引物分别为:-523(5'-AAGGCTGTCAGGGAGGGAAGA-3'),和-1285(5'-GGGAGGGAGGCTTGGCATAA-3'),以 PCR 方法来产生 MMP-9 两种启动序列,MMP-9 的-1285~+1 和-523~+1。对各扩增片段进行回收,再以 Xho I/Hind III 双酶切后回收片段,与同样酶切的线性 pCAT-Basic 进行连接反应(pCAT-Basic 为一氯霉素乙酰基转移酶 CAT 报告基因而不含 MMP-9 启动子的基本质粒)。连接产物转染至感受态大肠杆菌 DH5 α ,扩增后酶切鉴定,并经序列分析(申能博彩生物技术公司)确证序列正确。两种重组质粒分别命名为 p1285CAT、p523CAT,分别大量扩增和纯化 3 种质粒(p1285CAT、p523CAT、pCAT-Basic),定量后冻存备用。

1.3 细胞培养及质粒转染 传代培养的 ECV304 细胞,培养于 DMEM 培养基中。与转染前 1 天接种于 6 孔培养板,每孔接种细胞 2×10^6 。采用 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)进行质粒转染。准备重组质粒(p1285CAT, p523CAT)和基本质粒

pCAT-Basic,每孔细胞质粒用量为 4 μ g 质粒和 8 μ l Lipofectamine 2000。将转染质粒和 Lipofectamine 2000 分别加入至 250 μ l opti-MEM 中,轻柔混合两者,将合并后溶液置于室温 20min 形成 DNA-Lipofectamine 复合体。培养细胞以 PBS 洗涤 3 次,分别加入 DNA-Lipofectamine 复合物 500 μ l,补加 DMEM 培养基(含血清,无抗生素),37 $^{\circ}$ C 孵育 24h,每组实验平行 4 孔。

1.4 MMP-9 启动子的调控分析实验 ECV304 细胞经瞬时转染后,先以含 5% 乳清蛋白水解产物(lactalbumin hydrolysate, Gibco Life Technologies)和 10g/L 转铁蛋白(transcriptional, Sigma)的无血清 DMEM 培养基饥饿处理,37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 16h。然后将 α 受体激动剂苯肾上腺素(PE) 0.2 μ mol/L、 β 受体激动剂异丙肾上腺素(ISO) 0.2 μ mol/L 及阴性对照(PBS)分别作用于细胞,反应时间点分别为 2、4、8、24 h,在每个时间点收集细胞,测定 CAT 的表达。以吡啶醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA, 50nmol/L)和肿瘤坏死因子 α (TNF α , 25 μ g/L)为阳性对照。

1.5 CAT 活性检测 按照说明书(Roch)操作,细胞经预冷的 PBS 洗 3 次,蛋白裂解缓冲液裂解,通过 ELISA 法测定细胞提取物中 CAT 酶的表达来量化,实验结果做出标准曲线。重复一次实验,选取细胞状态好的一次进行数据分析。

1.6 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒构建的检测 构建了含有 MMP-9 启动子区转录起始位点+1~-1285 和+1~-524 片段的重组 CAT 报告基因质粒(p1285CAT, p523CAT)。见图 1。

2.2 转染后不同时间点的 CAT 值测定 转染 ECV304 细胞后,加入 PE 和 ISO 后,与基本 CAT 质粒比较,二者转录活性均在不同的时间位点,显示明显的上调。其中 ISO 的反应迅速和强烈,4h 达到峰值,增加近 80 倍,PE 表现渐进升高过程,至 24h 达到峰值,约 25 倍(图 2)。

2.3 p1285CAT 与 p532CAT 间的比较 将 p1285CAT 与 p532CAT 的最大反应值进行比较,同时以 PMA 和 TNF α 为阳性对照,统计结果显示,ISO 组和 PE 组的 p1285CAT 与 p532CAT 最大反应值差异明显(图 3)。

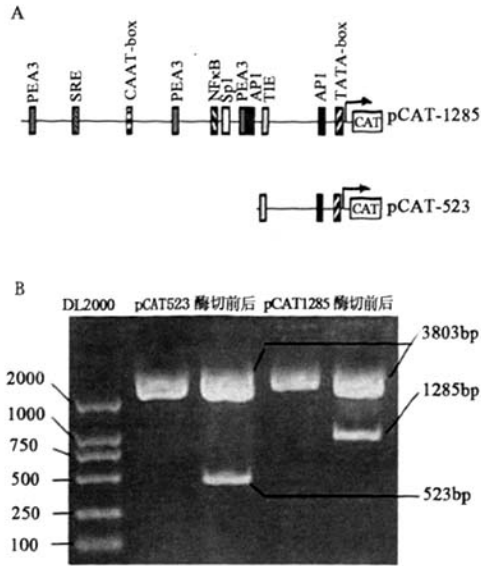
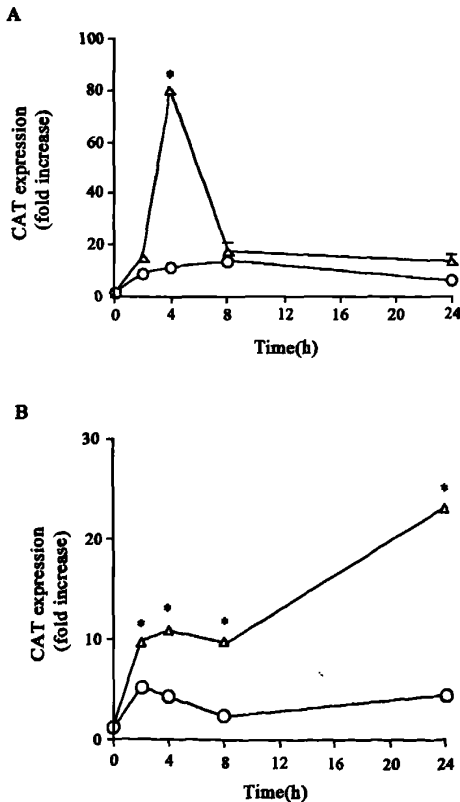
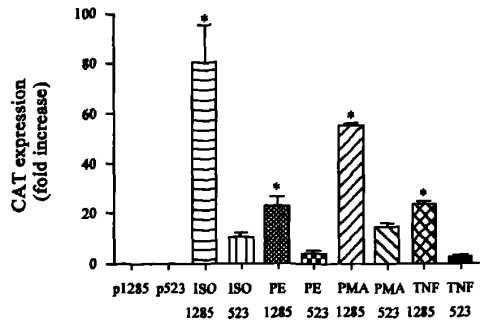


图 1 CAT 重组质粒结构图(A)和重组质粒酶切后的电泳结果(B)



p1285CAT(△), p523CAT(○)。与 p532CAT 相比, * $P < 0.05$

图 2 异丙肾上腺素(A)和苯肾上腺素(B)对 MMP-9 启动子活性的影响



与相应 p523CAT 值比, * $P < 0.05$

图 3 p1285CAT 和 p523CAT 在异丙肾上腺素(ISO)、苯肾上腺素(PE)、吡啶醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)、肿瘤坏死因子(TNF α)存在时对 MMP-9 启动子活性的影响

3 讨论

本研究利用全长和截短的 MMP-9 启动子片段构建 CAT 报告基因重组质粒,转染细胞系 ECV304 后,利用 CAT 报告基因中氯霉素乙酰基转移酶的活性对底物作用后,ELASA 方法检测其活性。实验过程中加入 PE(α 肾上腺素受体激活剂)和 ISO(β 肾上腺素受体激活剂)后,与基本 CAT 质粒比较,ISO 和 PE 均可以明显增加 MMP-9 启动子的转录活性,但二者存在显著差异,其转录活性作用曲线在不同时间点显示不同。ISO 的反应更加迅速和强烈,4h 达到峰值,增加近 80 倍。而 PE 则表现出渐进和逐步升高的过程,至 24h 达到峰值,约 25 倍。这种在反应时间和强度上的差异,反映了 α 和 β 肾上腺素受体在反应机制、受体分离动力学、反应敏感性和受体再循环方面的差异。研究结果初步证实了肾上腺素受体与 MMP 活性之间存在着明显的相关性,说明它们之间存在某种调控关系,为进一步的研究提供了可行性的研究基础。

研究显示,在 U937 细胞中,ISO 和 PE 均可通过其对应的 α 和 β 肾上腺素受体增加 MMP-9 的蛋白丰度和 mRNA 表达量,作用位点位于 MMP-9 启动子序列-1285~-523 的 762bp 长度区间中,该区间主要包含 NF- κ B(-600)和 AP1(-533)的结合位点,并且已证实了 U937 细胞中 cFOS/cJUN 能特异结合顺式反应元件 AP1 序列^[16]。因此,本研究结果显示了与其相似的反应性,即在 ECV304 细胞中使用两种肾上腺素刺激后,MMP-9 启动子-1285~-523 的 762bp 长度区间明显的上调其启动子的转录活性,说明同样的元件在上调启动子活性中作用机制相同,均与 NF- κ B(-600)和 AP1(-533)的顺式反

应元件结合而起作用。此外,在 MMP-9 启动子的-79 位点还包含另外一个 AP1 位点,但目前研究资料显示,其在肾上腺素介导的 MMP-9 启动子转录活性中的作用较弱,但仍有一定的作用,这可以较好的解释 p523CAT 质粒转染后也显示出弱的启动子转录活性。

目前,在心衰的老年患者中, α/β 肾上腺素受体拮抗剂卡维地洛的短期治疗,消弱了 MMP 的活性,使降解平衡倾向于较少降解的表现型,这一机制可能影响了细胞外基质降解的稳定性。因此,肾上腺素可直接激活 MMP-9 启动子,而非选择性肾上腺素受体阻断剂则可以消弱 MMP-9 启动子的转录活性,进而降低了心衰中心脏重塑的几率,达到治疗的效果。

参考文献

- [1] Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, et al. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res*, 1998,82: 482-495.
- [2] Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, et al. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem*, 1996, 155: 13-21.
- [3] Coker ML, Jolly JR, Joffs C, et al. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281: H543-H551.
- [4] Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, et al. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *Am J Physiol*, 1999, 277(2 Pt 2): H777-H787.
- [5] Kim MH, Albertsson P, Xue Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors by rat NK cells: inhibition of their expression by genistein. *In Vivo*, 2000, 14:557-564.
- [6] Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*, 2000, 106:55-62.
- [7] Martin EL, Moyer BZ, Pape MC. Negative impact of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 null mutation on lung structure and function in response to sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285: L1222-L1232.
- [8] Pacca SR, De-Azevedo AP, De-Oliveira CF, et al. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39: 201-207.
- [9] Patiyl SN, Katoch SS. Beta-adrenoceptor agonist clenbuterol down-regulates matrix metalloproteinase (MMP-9) and results in an impairment of collagen turnover in mice left ventricle. *Jpn J Physiol*, 2005, 55:165-172.
- [10] Senzaki H, Paolocci N, Gluzband YA, et al. Beta-blockade prevents sustained metalloproteinase activation and diastolic stiffening induced by angiotensin II combined with evolving cardiac dysfunction. *Circ Res*, 2000, 86:807-815.
- [11] Senzaki H, Kobayashi T, Nagasaka H, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 in patients with Kawasaki disease: diagnostic value for the prediction of coronary artery lesion and implication for a new mode of therapy. *Pediatr Res*, 2003, 53:983-988.
- [12] Spiers JP, Kelso EJ, Siah WF, et al. Alterations in vascular matrix metalloproteinase due to ageing and chronic hypertension: effects of endothelin receptor blockade. *J Hypertens*, 2005, 23:1717-1724.
- [13] Hao L, Nishimura T, Wo H, et al. Vascular responses to α 1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 819-825.
- [14] Briest W, Homagk L, Rassler B, et al. Norepinephrine-induced changes in cardiac transforming growth factor-beta isoform expression pattern of female and male rats. *Hypertension*, 2004, 44: 410-418.
- [15] Heymans S, Lupu F, Terclavers S, et al. Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice. *Am J Pathol*, 2005, 166:15-25.
- [16] Speidl WS, Toller WG, Kaun C, et al. Catecholamines potentiate LPS-induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. *FASEB*, 2004:603-605.