

M inocycline对 rhHGF刺激 ECV304细胞株表达 MMP-9的抑制作用

刘^陽 ,郑敏 (浙江大学医学院附属第二医院风湿病学教研室,浙江 杭州 310009)

摘要:目的 探讨重组人类肝细胞增殖因子 (recombinant human hepatocyte growth factor, rhHGF)刺激 ECV304细胞株表达基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的作用及米诺环素 (minocycline)的影响作用。方法 绘制正常 ECV304细胞株生长曲线,明确最适生长浓度及对数生长期;明确 rhHGF及 minocycline的作用浓度;流式细胞仪 (flow cytometer, FCM)检测 ECV304细胞株的 MMP-9水平。结果 ① ECV304细胞株的最适生长浓度为 1.0×10^4 /mL,对数生长期为 3 ~ 5 d; rhHGF的作用浓度为 8 ng/mL, minocycline的作用浓度为 1.0×10^{-5} mol/L。② 对照组 MMP-9的表达量为 39.74%;培养基中加入 rhHGF 8 ng/mL后,细胞存活率为 1.388169 ± 0.102033 ($P < 0.01$), MMP-9的表达量为 40.32%;培养基中加入 minocycline 1.0×10^{-5} mol/L后,细胞存活率为 0.294526 ± 0.076829 ($P < 0.01$), MMP-9的表达量为 19.92%。③ 培养基中加入 minocycline 1.0×10^{-5} mol/L 15 min后加入 rhHGF 8 ng/mL,细胞存活率为 0.397291 ± 0.099504 ($P < 0.01$), MMP-9的表达量为 22.28%。结论 rhHGF可刺激 ECV304细胞株增殖,使 MMP-9的表达量增加; minocycline可抑制 ECV304细胞株增殖,使 MMP-9的表达量降低; minocycline可拮抗 rhHGF所引起的 ECV304细胞株增殖,从而使 MMP-9的表达量降低。

关键词:重组人类肝细胞增殖因子;基质金属蛋白酶-9; ECV304细胞株;米诺环素;流式细胞仪
中图分类号: R978.1; R364.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)02-0095-05

The suppression function of Minocycline to the function that rhHGF stimulates ECV304 cell line to express MMP-9

LIU Yang, ZHENG Min(Department of Rheumatology of the Second Affiliated Hospital, College of Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the function that rhHGF stimulated ECV304 cell line to express MMP-9 and the suppression function of minocycline. **METHOD** To draw normal growth curve of ECV304 cell line in order to make sure its optimal growth concentration and logarithm growth time; To make sure the valid concentration of rhHGF and minocycline; To test MMP-9 expression level by Flow cytometer. **RESULTS** ① The optimal growth concentration of ECV304 cell line was 1.0×10^4 /mL and logarithm growth time was 3~5 days. The valid concentration of rhHGF was 8 ng/mL and the valid concentration of minocycline was 1.0×10^{-5} mol/L. ② The expression level of MMP-9 was 39.74% in controls. Cell livability was 1.388169 ± 0.102033 ($P < 0.01$) when acceded to culture medium with rhHGF 8 ng/mL, and the expression level of MMP-9 was 40.32%. Cell livability was 0.294526 ± 0.076829 ($P < 0.01$) when acceded to culture medium with minocycline 1.0×10^{-5} mol/L, and the expression level of MMP-9 was 19.92%. ③ Cell livability was 0.397291 ± 0.099504 ($P < 0.01$) when acceded to culture medium with rhHGF 8 ng/mL after 15 minutes acceding minocycline 1.0×10^{-5} mol/L to culture medium, and the expression level of MMP-9 was 22.28%. **CONCLUSION** rhHGF could stimulate the proliferation of ECV304 cell line and increase the protein expression level of MMP-9. Minocycline could suppress the proliferation of ECV304 cell line and decrease the protein expression level of MMP-9. Minocycline could interrupt the proliferation of ECV304 cell line caused by rhHGF and decrease MMP-9 protein level.

KEY WORDS: recombinant human hepatocyte growth factor; matrix metalloproteinase-9; ECV304 cell line; minocycline; flow cytometer

肝细胞增殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种具有多种功能的细胞因子, 可促进血管内皮细胞趋化、迁移、增殖及毛细血管形成^[1], 而基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 对细胞外基质的降解为血管内皮细胞提供了迁移的空间^[2], HGF 及 MMP-9 均在血管病变中发挥重要作用, 本实验检测了 rhHGF 对 ECV304 细胞株表达 MMP-9 的影响及米诺环素的抑制作用, 从而明确 HGF 与 MMP-9 的相互作用机制及米诺环素的影响作用, 为临床用药打下坚实的理论基础。现将结果报告如下。

1 材料与仪器

1.1 材料

ECV304 细胞株 (中国南京皮肤病研究所); rhHGF (英国 Petrotech 公司); 抗人 MMP-9-FITC 单克隆抗体及同型对照兔抗鼠 IgG2b 抗体 (美国 R&D 公司); IntraPrep™ Permeabilization 试剂 (法国 Immunotech 公司); 1640 培养基 (美国 Gibco BRL 公司); HEPES (N-2-[hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid], 美国 Fluka 公司); 胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司); EDTA-Na (广州化学试剂厂, 分析纯); PBS ($10 \times$ PBS: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g 溶于 800 mL 蒸馏水中, 用 HCl 调 pH 值至 7.4, 然后加水定容至 1 000 mL, 高压灭菌备用. $1 \times$ PBS: $10 \times$ PBS 稀释 10 倍所得); 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 四唑盐 (上海生物工程技术服务有限公司); 二甲基亚砜 (浙江杭

州双林化工试剂厂, 分析纯); 米诺环素 (惠氏-百宫制药有限公司)。

1.2 仪器

CO_2 培养箱 (BB16UV, 德国); 倒置显微镜 (Olympus, 日本); 细胞计数板 (上海市求精生化试剂仪器有限公司); 流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司); 酶标仪 (OPSYSMR DYNEX, 美国)。

2 方法

2.1 绘制 ECV304 细胞株生长曲线

取出冻存细胞一支, 复苏后接种于含 10% 小牛血清的 1640 培养基的培养瓶中, 待细胞接近融合时, 胰酶消化计数, 按不同浓度 4.0×10^4 , 2.0×10^4 , 1.0×10^4 , 5.0×10^3 , 2.5×10^3 /mL 接种于 7 块 96 孔板, 每孔 200 μ L, 每个浓度设复孔 6 个, 分别于 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d 各取一块板, 每孔加入新鲜配制的 5 mg/mL 的四唑盐溶液, 继续孵育 4 h 后倒掉上清, 加入 200 μ L 二甲基亚砜溶液, 振荡 15 min, 酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值, 以时间 (d) 为横坐标, 吸光度 $A(570 \text{ nm})$ 为纵坐标绘制生长曲线。

2.2 rhHGF 刺激 ECV304 细胞株生长情况

将消化好的 ECV304 细胞株按 1.0×10^4 /mL 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 待细胞进入对数生长期后, 加入不同浓度 2, 4, 8, 16, 32 ng/mL 的 rhHGF, 每个浓度设复孔 6 个, 48 h 后取出 96 孔板, 每孔加入四唑盐溶液 50 μ L, 继续孵育 4 h 后倒

掉上清,每孔加入 200 μ L二甲亚砷溶液,振荡 15 min,检测 570nm 处的吸光度,计算细胞存活率(实验组吸光度/对照组吸光度),以浓度 (ng/mL)为横坐标,细胞存活率 (%)为纵坐标作图。

2.3 m inocycline对 ECV304细胞株的作用

将消化好的 ECV304细胞株按 1.0E + 4 /mL接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,待细胞进入对数生长期后,加入不同浓度 2.5E - 6,5.0E - 6,1.0E - 5,2.0E - 5,4.0E - 5mol/L的 m inocycline,每个浓度设复孔 6 个,48h后取出 96 孔板,每孔加入四唑盐溶液 50 μ L,继续孵育 4h后倒掉上清,每孔加入 200 μ L二甲亚砷溶液,振荡 15 min,检测 570nm 处的吸光度,计算细胞存活率(实验组吸光度/对照组吸光度),以浓度 (mol/L)为横坐标,细胞存活率 (%)为纵坐标作图。

2.4 m inocycline对 rhHGF刺激 ECV304细胞株增殖的抑制作用

将消化好的 ECV304细胞按 1.0E + 4 /mL接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,待细胞进入对数生长期后,加入不同浓度的 m inocycline,15min后加入 8ng/mL的 rhHGF,每个浓度设复孔 6 个,孵育 48h后取出 96 孔板,每孔加入四唑盐溶液 50 μ L,继续孵育 4h后倒掉上清,每孔加入 200 μ L二甲亚砷溶液,振荡 15 min,检测 570nm 处的吸光度,计算细胞存活率(实验组吸光度/对照组吸光度),以浓度 (mol/L)为横坐标,细胞存活率 (%)为纵坐标作图。

2.5 根据以上得出的 rhHGF 及 m inocycline 的浓度培养 ECV304细胞

2.5.1 将消化好的 ECV304细胞按 1.0E + 4 /mL接种于 4 个 50mL培养瓶中,每瓶 3mL,待细胞进入对数生长期后,倒掉上清,PBS洗涤一次后,依次加入无血清培养基, rhHGF8ng/mL, m inocycline1.0E - 5mol/L, m inocycline1.0E - 5mol/L及 rhHGF8ng/mL继续培养 2d。

2.5.2 收集上清及细胞 FCM检测 MMP-9的表达 收集上清及细胞,1800 r/min离心 5 min,倒掉上清,加 1 $\times$ PBS 4mL混匀,1800 r/min离心 5 min,2次,加 reagent A 100 μ L,振荡,避光孵育 15 min,加 1 $\times$ PBS 4mL混匀,1800 r/min离心 5 min,弃上清,加入 reagent B 100 μ L,振荡,孵育 5 min后加入 20 μ L抗人 MMP-9-FITC标记的单抗及同型兔抗鼠 IgG2b对照抗体,避光孵育 15 min,加 1 $\times$ PBS 4mL混匀,1800 r/min离心 5 min,弃上清,加 1 $\times$ PBS 500 μ L重悬,上机 Cellquest 3.1 版本软件分析。

2.6 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析作实验结果整体差异的显著性及 q 检验作样本均数的两两比较。运用 SPSS11.0统计软件进行统计处理,以 P < 0.05 为差异具有显著性意义。

3 结果

3.1 rhHGF8ng/mL可明显刺激 ECV304细胞株增殖,如图 1。

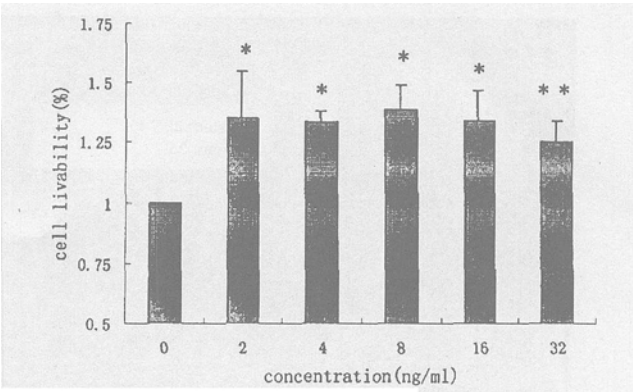


图 1 rhHGF对 ECV304细胞株的作用

Fig 1 The function of rhHGF to ECV 304 cell line

* P < 0.01, ** P < 0.05, vs cell livability in control group by q-test

3.2 m inocycline 1.0E-5mol/L可明显抑制 ECV304细胞株增殖,如图 2。

3.3 m inocycline可抑制 rhHGF所刺激的 ECV304细胞株增殖,如图 3。

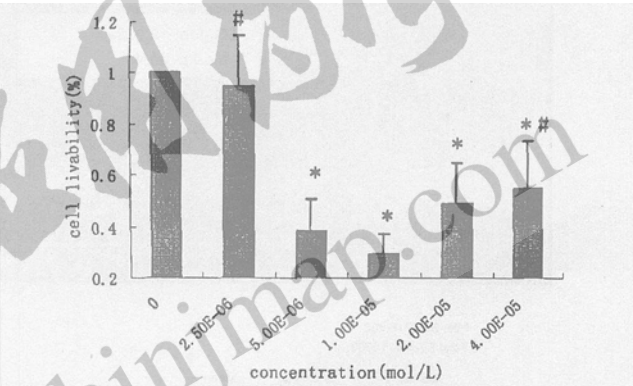


图 2 m inocycline对 ECV304细胞株的作用

Fig 2 The function of m inocycline to ECV304 cell line

* P < 0.01, vs control group. # P < 0.05 vs m inocycline 1.00E - 05mol/L group

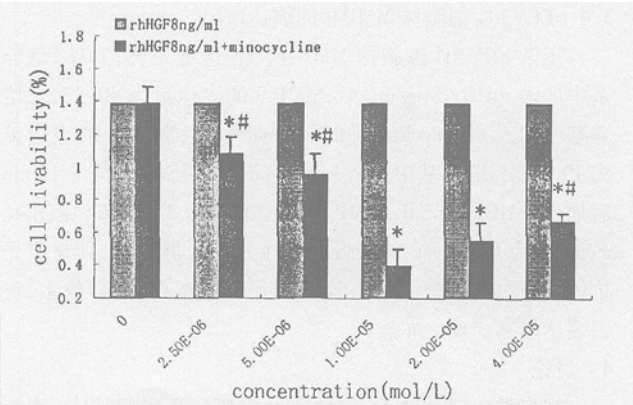


图 3 m inocycline对 rhHGF刺激 ECV304细胞株增殖的抑制作用

Fig 3 The suppression function of m inocycline to rhHGF stimulating ECV304 cell line proliferation

* P < 0.01, vs rhHGF8ng/mL group. # P < 0.01, vs rhHGF8ng/mL + m inocycline 1.00E-05mol/L group

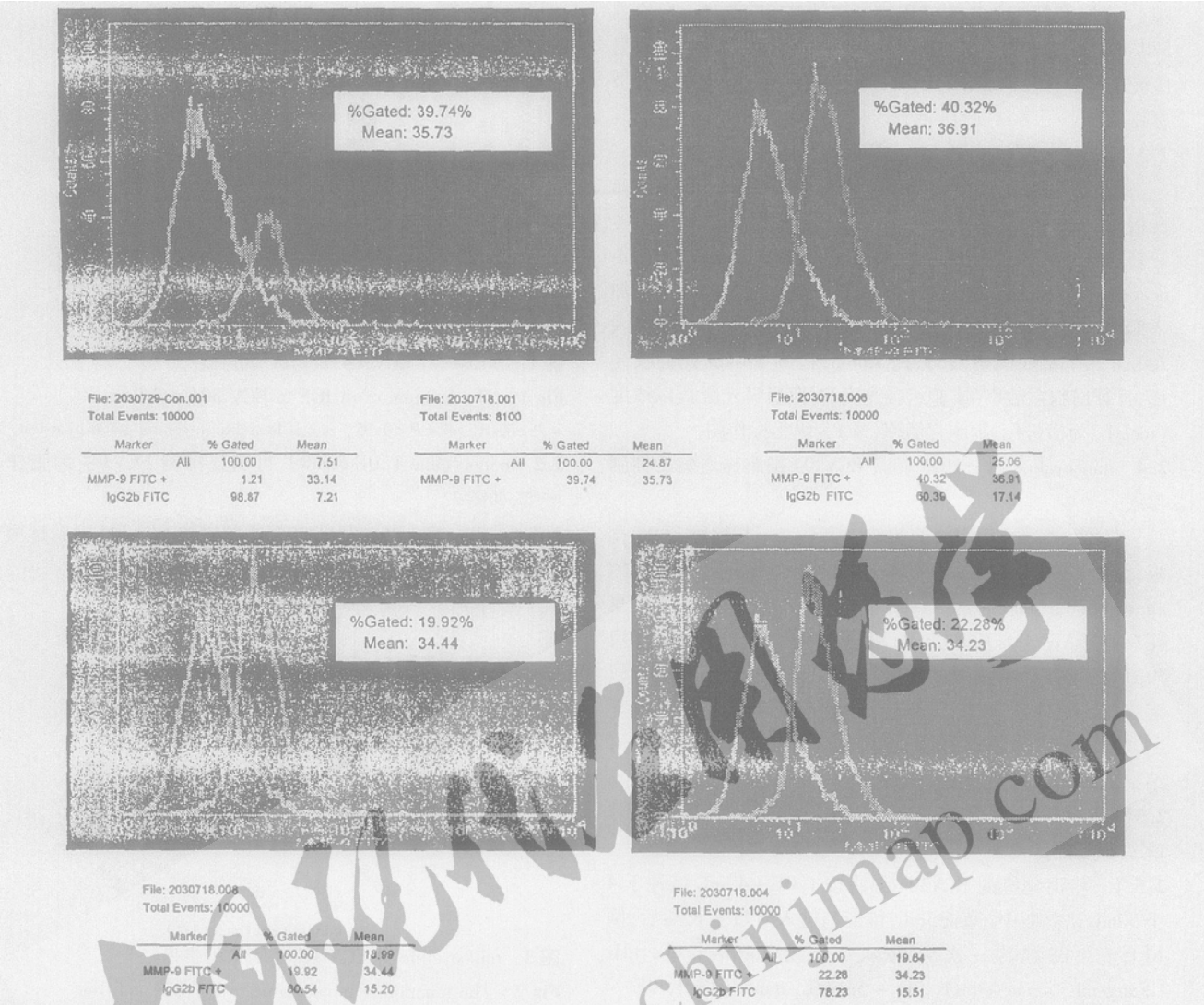


图 4 不同处理后 MMP-9 的表达

Fig 4 The expression of MMP-9 after different treatments

3.4 ECV304 细胞株 MMP-9 的表达情况

正常 ECV304 细胞株 MMP-9 的表达量为 39.74%，培养基中加入 rhHGF 8 ng/mL 后，MMP-9 的表达量为 40.32%，培养基中加入 minocycline 1.0×10^{-5} mol/L 后，MMP-9 的表达量为 19.92%，培养基中加入 minocycline 1.0×10^{-5} mol/L 15 min 后加入 rhHGF 8 ng/mL，MMP-9 的表达量为 22.28%，见图 4。mean 值为 Cellquest 3.1 版本软件分析所得数据，其与荧光抗体与蛋白的结合强度一致，即 mean 值越高，结合越多，蛋白表达越高。反之亦然。

4 讨论

在多种病理条件下，如增殖性糖尿病视网膜病^[3]、系统性红斑狼疮^[4]、类风湿性关节炎以及骨关节炎^[5]中 HGF 是一个重要的血管病变因子。它通过直接活化增殖活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase MAPK) 和磷脂酰肌醇激酶 3 (phosphatidylinositol-3-kinase PI3K) 诱导血管形成^[6]。MMP 是细胞生长、迁移和细胞外基质重建的调节剂，而且可释放被细胞外基质隔绝的关键的生长因子，如碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮细胞生长因子以及胰岛素样生长因

子^[7]。

HGF 发挥作用需与其高亲和力的受体 c-met 结合。HGF 与受体结合后，受体 c 末端的酪氨酸残基磷酸化导致受体活化。MDS (multifunctional docking site) 区域与各种信号传递分子结合，激活多种信号传导途径，如 MAPK 级联系统，使生物活性信息传入细胞内，从而发挥 HGF 的多种生物学功能。

MAPK 系统包括 ERKs (extracellular signal-regulated kinases)，JNK/SAPKs (the c-Jun N-terminal kinases/stress activated protein kinases) 及 p38^[8]。MAPK 下游存在着 ELK-1、c-fos 等转录因子，ERK 活化后由胞浆易位到胞核，磷酸化其底物 ELK-1^[9]，ELK-1 与结合于 c-fos 的顺式反应元件的血清反应因子协同导致 c-fos 基因转录，然后 c-fos 与转录因子 Jun 家族成员组成异二聚体，从而形成 AP-1 (activator protein-1)。JNK/SAPKs、p38 以及 ERKs 的活化导致转录因子 AP-1 的活化。AP-1 可与某些基因的 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 反应元件结合，并活化这些基因的转录^[10]，而这种反应元件对细胞增殖是很关键的。

MMP-9的启动子区域含有 AP-1 结合位点,可介导 MMP-9对生长因子的反应^[11]。12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate可结合 Jun D/c-fos异二聚体^[12]从而上调 MMP-9的表达。

Caveolin-1 作为一种天然的内源性 ERK抑制剂,可抑制 ERK1(p42-KDa) /ERK2(p44-KDa) MAPK级联系统,还可抑制 ELK的磷酸化^[13]。HGF与受体结合后使内皮细胞增殖, caveolin-1 表达明显下调^[14],抑制作用减弱。Minocycline为四环素类光谱抗生素,具有高效与长效性,可抑制内皮细胞增殖,从而阻止 caveolin-1 表达下调; minocycline是胶原酶及明胶酶的强抑制剂,可抑制 p38MAPK途径^[15]及 IV型胶原降解^[16],这些均可使 MMP-9表达下调。

我们的试验表明 HGF与 MMP-9均在 ECV304细胞的生理病理作用中发挥重要作用,因此抑制 HGF与受体结合、抑制 ERK活化及 ELK磷酸化、增加 caveolin-1 的表达、特异的 MMP抑制剂均可抑制 MMP-9的表达及分泌,从而达到治疗炎性血管性疾病的目的,其中 minocycline不失为一种有效的药物。

参考文献

- [1] Dong G, Chen Z, Li ZY, *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic chemokines IL-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5911.
- [2] Egeblad M, Werb Z. New roles for the matrix metalloproteinase in the progression of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (3): 161.
- [3] Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2000, 19 (6): 779.
- [4] Robak E, Wozniacka A, Sysa-Jędrzejowska A, *et al.* Serum level of angiogenic cytokines in systemic lupus erythematosus and their correlation with disease activity[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2001, 12(3): 445.
- [5] Nagashima M, Hasegawa J, Kato K, *et al.* Hepatocyte growth factor(HGF), HGF activator and c-Met in synovial tissues in rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. *J Rheumatol*, 2001, 28 (8): 1772.
- [6] Sengupta S, Gherardi E, Sellers LA, *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor[J]. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 2003, 23(1): 69.
- [7] Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, *et al.* Matrix metalloproteinase biologic activity and clinical implications[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(5): 135.
- [8] McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, *et al.* Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(7): 4347.
- [9] Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter[J]. *Nature*, 1992, 358(6385): 414.
- [10] Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinase[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(28): 16483.
- [11] Gum R, Lengyel E, Juárez J, *et al.* Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3 /ets and AP-1 sequences[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(18): 10672.
- [12] Gum R, Wang H, Lengyel E, *et al.* Regulation of 92kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades[J]. *Oncogene*, 1997, 14(12): 1481.
- [13] Liu J, Razani B, Tang S, *et al.* Angiogenesis activator and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (12): 15781.
- [14] Liu J, Wang XB, Park DS, *et al.* Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 10661.
- [15] Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, *et al.* Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice[J]. *Nature*, 2002, 417(6884): 74.
- [16] Masumori N, Tsukamoto T, Miyao N, *et al.* Inhibiting effect of minocycline on *in vitro* invasion and experimental metastasis of mouse renal adenocarcinoma[J]. *J Urol*, 1994, 151(5): 1400.

收稿日期: 2003-08-27