

PF4 通过 NF- κ B 上调巨噬细胞 MMP-9 表达

赵战芝¹, 何 钒^{1,2*}, 唐雅玲¹, 孙 慧¹

(1. 南华大学心血管病研究所暨动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

2. 宜昌市中心人民医院病理科)

摘要: **目的** 观察血小板因子 4(PF4)是否通过核因子 κ B (NF- κ B)上调 THP-1 单核源性巨噬细胞基质金属蛋白酶 9(MMP-9)表达。**方法** 佛玻酯诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细胞。巨噬细胞分别在 NF- κ B 抑制剂(PDTC)缺乏或存在情况下与溶媒或 PF4(100 μ g/L)孵育一定时间,RT-PCR 检测 MMP-9 mRNA 水平;同时,巨噬细胞与 PF4(25~200 μ g/L)单独或结合 Toll 样受体 4(TLR4)阻断剂(抗体 HTA125, anti-TLR4)孵育,ELISA 法检测 NF- κ B 含量。**结果** PF4 较对照组上调巨噬细胞 MMP-9 mRNA 水平。而 NF- κ B 抑制剂抑制 PF4 诱导的巨噬细胞 MMP-9 表达上调。PF4 呈浓度依赖性增加巨噬细胞的 NF- κ B 含量,最大效应浓度为 100 μ g/L。TLR4 阻断剂逆转 PF4 诱导的巨噬细胞 NF- κ B 含量增加。**结论** PF4 可能通过 NF- κ B 上调巨噬细胞 MMP-9 的表达。TLR4 可能是 PF4-NF- κ B 通路中 NF- κ B 的上游信号分子。

关键词: 血小板因子 4; 基质金属蛋白酶 9; 巨噬细胞; 核因子 κ B; 动脉粥样硬化

中图分类号:R363

文献标识码:A

Platelet Factor 4 Up-regulates the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Macrophages via NF- κ B

ZHAO Zhanzhi, HE Fan, TANG Yalin, et al

(Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether PF4 modulates the MMP-9 expression of macrophages via Nuclear factor kappa B (NF- κ B). **Methods** THP-1 monocytes were differentiated into monocyte-derived macrophages by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Macrophages were incubated with PF4 (100 μ g/L) in the absence or presence of NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), the MMP-9 expression of macrophages was determined by Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Macrophages were incubated with PF4 (25-200 μ g/L) or vehicle (PBS), NF- κ B content in cultured supernatant of macrophages was measured by ELISA assay. To evaluate the intracellular signal transduction pathways, macrophages were pretreated for 30min with the TLR4 blocker(monoclonal antibody HTA125, anti-TLR4) before the addition of PF4, NF- κ B content was measured. **Results** Macrophages that were untreated showed a relatively low MMP-9 mRNA level; treatment with PF4 increased MMP-9 expression. However, the high levels of MMP-9 expression induced by PF4 were significantly attenuated in the presence of NF- κ B inhibitor. PF4 increased concentration of NF- κ B in a dose dependent manner, with the strongest increase at 100ng/mL. The increased the concentration of NF- κ B induced by PF4 was significantly reduced when treated with TLR4 blocker. **Conclusion** PF4 may up-regulate MMP-9 expression in macrophages via NF- κ B. TLR4 may be upstream signaling molecules of NF- κ B in PF4- NF- κ B signaling pathway.

Key words: platelet factor 4; matrix metalloproteinase-9; macrophages; nuclear factor kappa B; atherosclerosis

临床事件的发生。炎症在 As 中起重要作用^[1]。业已证明,血小板是炎症和 As 的重要纽带。活化的血小板通过释放多种活性因子影响 As 发展^[2]。其中,血小板因子 4 (platelet factor 4, PF4) 的含量最丰富,且已证实可促进 As 形成^[3],但机制尚未阐明。基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 做为炎症细胞因子在血管重构、斑块的不稳定性及其破裂中起着重要作用^[4]。核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 是 'Rel' 家族中的转录因子,活化后介导的信号转导通路参与 As 的发生发展,包括斑块形成、斑块不稳定及斑块破裂等过程^[5]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在天然免疫中可介导细胞跨膜信号传导。文献[6]报道,TLR4/NF- κ B 信号参与炎症反应。在高脂饲养的动脉粥样硬化兔模型,TLR4/NF- κ B 信号通路被激活,血清炎症因子分泌增加。在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的单核细胞,TLR4/NF- κ B 的活化诱导白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 分泌^[7]。在 PF4 处理的内皮细胞,E-选择素的表达有赖于 NF- κ B 的活化^[8]。课题组前期研究发现 PF4 可上调巨噬细胞 MMP-9 表达,但机制尚未阐明^[9]。因此,本研究探索 TLR4 和 NF- κ B 是否参与 PF4 上调巨噬细胞 MMP-9 表达的信号转导,旨在探讨 PF4 对 As 斑块稳定性的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

重组人血小板因子 4 购自 Peprotech 公司,脂多糖购自上海捷瑞公司,胎牛血清购自杭州四季青生物研究所,RPMI1640 培养基购自美国 GIBCO 公司,佛波脂 (PMA) 和 NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基酸盐 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 购自 Sigma 公司,TLR4 抗体型阻断剂 (单克隆抗体 HTA125, anti-TLR4) 购自 Biolegend 公司,Trizol Reagent 和引物分别从上海生物工程技术公司购买和合成,cDNA 第一链合成试剂盒购自 Fermentas 公司,Taq PCR MasterMix 以及 DNA marker 购自北京天根公司,NF- κ B ELISA 试剂盒购自广州齐特科生物公司。THP-1 单核细胞系购自上海细胞库。

1.2 细胞培养

THP-1 单核细胞在含 10% 胎牛血清的 RP-

MI1640 培养基中,静置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。实验前,细胞用 160 nmol/L PMA 孵育 24 h,使其诱导成为巨噬细胞。换无血清的 RPMI1640 培养基培养 12 h,同步化后进行实验。为分析 MMP-9 表达,巨噬细胞在有或无 NF- κ B 抑制剂 PDTC (25 μ g/mL) 预处理 30 min 后,与溶媒 (PBS)、PF4 (100 μ g/L) 或 LPS (阳性对照) 孵育 4 h;为检测 NF- κ B 含量,巨噬细胞与 PF4 (0 ~ 200 μ g/L) 孵育 12 h,或 TLR4 阻断剂 HTA125 (25 μ g/mL) 预处理 30 min 后,再加入 PF4 继续孵育 12 h。

1.3 RT-PCR 反应

收集细胞,采用 Trizol Reagent 提取总 RNA。每个样本取 0.2 μ g 总 RNA 按 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行逆转录。用 Taq PCR MasterMix 试剂进行 PCR 循环:95 °C 温育 5 min,95 °C 变性 45 s,54 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 32 个循环,72 °C,继续延伸 10 min,4 °C 冷却。反应结束后,取反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,UVP 型凝胶图像分析系统摄图。MMP-9 和 GAPDH 产物大小依次为 476 bp 和 240 bp。以各组目的基因与 GAPDH 基因灰度值比值代表目的基因 mRNA 的相对量。每组实验重复 3 次。

1.4 ELISA 分析

按 NF- κ B ELISA 试剂盒说明书进行。细胞处理好后,收集细胞培养上清液于 4 °C 1 000 r/min 离心 8 min,吸取上清液。酶标板微孔中依次加入 100 μ L 的标准品和样品。再于标准品和样品孔中加入 50 μ L 的酶标记溶液;37 °C 孵育 60 min;清洗后每孔加入底物 A、B 液,37 °C 避光反应 15 min;加入终止液终止反应;于酶标仪 450 nm 波长下读取各孔的 OD 值,根据标准曲线计算 NF- κ B 的含量,结果以 μ g/L 表示。每组实验重复 3 次。

1.5 统计学分析

用 SPSS15 统计分析软件进行统计处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多重比较用 ANOVA 分析后进行 LSD-*t* test 检验,两组间比较用 Student's *t* test。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 PF4 上调 THP-1 源性巨噬细胞 MMP-9 mRNA 水平

如图 1 所示,静止的 THP-1 源性巨噬细胞有低

丰度的 MMP-9 mRNA 表达,经 PF4(100 $\mu\text{g/L}$) 处理 4 h 后,巨噬细胞 MMP-9 mRNA 水平较对照组升高约 1 倍($P < 0.001$)。

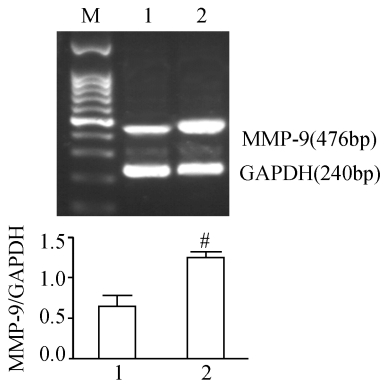


图 1 PF4 对巨噬细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响($n = 3$)
M:marker;1:对照组;2:PF4 组. 与对照组比较, #: $P < 0.001$

2.2 PF4 升高 THP-1 源性巨噬细胞 NF- κ B 的含量

为了探索 PF4 上调巨噬细胞 MMP-9 表达是否通过 NF- κ B 信号环节,实验采用 ELISA 法检测 PF4 对 THP-1 源性巨噬细胞上清液中 NF- κ B 含量的影响。结果显示,与 PBS 对照组比,不同浓度 PF4 (25 ~ 200 $\mu\text{g/L}$)处理巨噬细胞 12 h 后,NF- κ B 含量均升高,尤其以 PF4 100 $\mu\text{g/L}$ 时最为显著,较对照组升高约 78% ($P < 0.001$,图 2)。TLR4 激活因子 LPS 也升高巨噬细胞 NF- κ B 含量,但其程度略低于 100 $\mu\text{g/L}$ PF4 组。

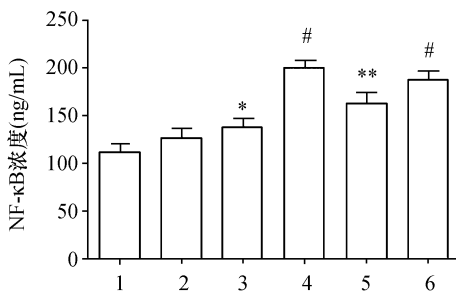


图 2 不同浓度 PF4 对巨噬细胞 NF- κ B 含量的影响($n = 3$)
1:对照组;2:25 $\mu\text{g/L}$ PF4 组;3:50 $\mu\text{g/L}$ PF4 组;4:100 $\mu\text{g/L}$ PF4 组;5:200 $\mu\text{g/L}$ PF4 组;6:100 $\mu\text{g/L}$ LPS 组. 与对照组比较, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, #: $P < 0.001$

2.3 NF- κ B 阻断剂逆转 PF4 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 MMP-9 mRNA 水平升高

为了证实 NF- κ B 是 PF4 上调 MMP-9 mRNA 表

达的信号环节,实验采用 NF- κ B 抑制剂预处理细胞后,观察 PF4 对巨噬细胞 MMP-9 mRNA 水平的影响。结果显示,NF- κ B 抑制剂 PDKC 和 PF4 处理细胞后,其 MMP-9 mRNA 水平较 PF4 单独孵育组降低约 19% ($P < 0.05$,图 3)。与上述结果一致的是,LPS/NF- κ B 抑制剂处理组也较 LPS 单独处理组明显下调 MMP-9 的 mRNA 表达($P < 0.05$)。但 NF- κ B 抑制剂单独孵育组对巨噬细胞 MMP-9 mRNA 表达无显著影响($P > 0.05$)。上述结果提示 NF- κ B 可能是 PF4 上调 MMP-9 mRNA 表达的重要信号分子。

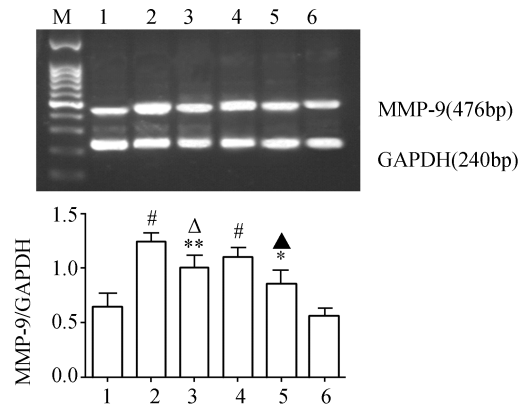


图 3 25 $\mu\text{g/mL}$ NF- κ B 抑制剂对 100 $\mu\text{g/L}$ PF4 上调巨噬细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响($n = 3$) M:marker;1:对照组;2:PF4 组;3:PF4 + NF- κ B 组;4:100 $\mu\text{g/L}$ LPS 组;5: NF- κ B + LPS 组;6:NF- κ B 组. 与对照组比较, #: $P < 0.001$, *: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$;与 PF4 组比较, Δ : $P < 0.05$;与 LPS 组比较, $\blacktriangle$: $P < 0.05$

2.4 TLR4 阻断剂逆转 PF4 诱导的巨噬细胞 NF- κ B 含量增加

为了进一步探索 NF- κ B 与 PF4、TLR4 之间的内在关系,本实验观察了 TLR4 阻断剂对 PF4 上调巨噬细胞 NF- κ B 含量的影响。如图 4 所示,经 PF4 与 TLR4 阻断剂处理后,巨噬细胞释放的 NF- κ B 含量显著降低,较 PF4 单独孵育组降低约 11% ($P < 0.05$)。与此同时,LPS 诱导的 NF- κ B 含量增加也被 TLR4 阻断剂显著抑制($P < 0.05$)。以上结果提示,TLR4 可能是 PF4-NF- κ B 通路中 NF- κ B 的上游信号分子。

3 讨 论

长期以来,血小板被认为在动脉粥样硬化的发生发展中发挥了至关重要的作用^[2]。作为血小板活化的标记物及活化后释放的含量最丰富的活性因

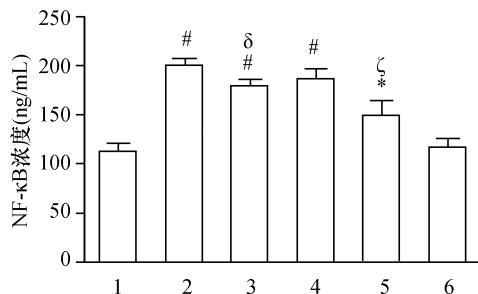


图4 TLR4 阻断剂对 PF4 增加巨噬细胞 NF-κB 含量的影响 ($n=3$) 1: 对照组; 2: PF4 组; 3: PF4 + TLR4 阻断剂组; 4: 100 $\mu\text{g/L}$ LPS 组; 5: TLR4 阻断剂 + LPS 组; 6: TLR4 阻断剂组。与对照组比较, #: $P < 0.001$, *: $P < 0.05$; 与 PF4 组比较, δ : $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ζ : $P < 0.05$

子之一, PF4 已被证实不但存在于动脉粥样硬化早、晚期病变, 而且促进动脉粥样硬化形成^[10]。在 PF4^{-/-} ApoE^{-/-} 小鼠, 其主动脉根部和主动脉内膜面的动脉粥样硬化病变面积均较 ApoE^{-/-} 小鼠显著减小^[3]。在单核细胞, PF4 可诱导细胞存活、表达细胞因子、产生氧自由基和粘附于受损的内皮^[11]; 诱导外周血单核细胞募集到病变并分化为巨噬细胞^[10]; 在巨噬细胞, PF4 抑制 CD163 表达, 诱导炎性巨噬细胞的形成^[12]; 抑制 LDL-R 降解、促进巨噬摄取和酯化 ox-LDL^[13]。本实验表明, PF4 上调巨噬细胞 MMP-9 mRNA 表达, 其机制可能与 NF-κB 有关。结果显示: ①PF4 增加巨噬细胞的 MMP-9 mRNA 水平; ②NF-κB 抑制剂削弱 PF4 诱导的 MMP-9 mRNA 表达上调; ③PF4 增加巨噬细胞上清液 NF-κB 的含量; ④TLR4 阻断剂能显著逆转 PF4 诱导的巨噬细胞 NF-κB 含量增加。以上结果提示 NF-κB 是 PF4 上调巨噬细胞 MMP-9 表达的重要信号环节。

细胞、细胞外基质和脂质在动脉内膜的积聚导致动脉粥样硬化斑块的发生发展。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一类可以降解和重组细胞外基质的酶类, 参与动脉粥样硬化的病理生理过程。文献报道, 动脉粥样硬化斑块破裂和随后的血栓栓塞与局部 MMP-9 的高表达和高活性相关; 急性冠脉综合征患者的冠状动脉病变组织 MMP-9 表达和循环 MMP-9 水平均显著高于稳定心绞痛患者, 且循环 MMP-9 水平与心血管风险显著相关; 与此一致的还有, 颈动脉疾病患者的循环 MMP-9 水平增高, 他们的临床事件率也增高^[14-15]。在血管重构期间, 炎性细胞如巨噬细胞、肥大细胞和中性粒细胞是血管组织 MMP-9 的重要资源。多种炎性因子如 TNF-α 和 IL-17 等可诱

导 MMP-9 表达和活化^[16]。课题组前期研究发现, 25 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 的 PF4 均可诱导巨噬细胞 MMP-9 mRNA 和蛋白表达上调, 最大效应浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 且未出现细胞毒性作用^[9]。本实验采用 100 $\mu\text{g/L}$ PF4 处理巨噬细胞, 可显著上调巨噬细胞 MMP-9 mRNA 水平, 与前期结果一致。表明 PF4 可能通过促进 MMP-9 的表达, 使斑块不稳定。但尚需进一步的在体实验以证实 PF4 是否上调动脉粥样硬化斑块 MMP-9 的表达。

NF-κB 是一种具有多向转录功能的核转录因子, 与许多免疫炎症相关基因表达密切相关。在 As 病变内, NF-κB 主要存在于单核细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞。活化前, 细胞质中的 NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 以二聚体形式结合呈无活性状态。当细胞受到细胞因子、缺氧、病毒等一些因子的刺激时, IκB 可磷酸化, 后经泛素化-蛋白酶小体途径降解, 使得 NF-κB 从 IκB 复合物中释放出来, 并由细胞质转入到细胞核, 在此与 NF-κB 特异性结合位点结合, 调控其靶基因转录^[17]。业已证明, NF-κB 对多种炎症细胞因子、粘附分子、趋化因子和生长因子等的表达起着至关重要的调控作用, 参与 As 炎症过程中的多种信号转导通路^[5]。本实验结果显示不仅 PF4 可升高巨噬细胞上清液中 NF-κB 的含量, 而且 NF-κB 抑制剂可逆转 PF4 对 MMP-9 的诱导表达。表明 NF-κB 参与了 PF4 诱导巨噬细胞 MMP-9 表达的信号转导。有研究报道, 细胞膜上的 TLR4 被 LPS 激活后, 使 NF-κB 从细胞质转位至细胞核, 从而诱导炎症反应^[17]。本实验发现 TLR4 阻断剂能显著降低 PF4 诱升的巨噬细胞 NF-κB 含量, 前期研究还发现 TLR4 阻断剂可逆转 PF4 上调巨噬细胞 MMP-9 表达^[9]。结合上述实验结果表明, NF-κB 是 PF4-TLR4-通路的下游信号分子。

总之, 现在的结果表明 PF4 通过增加巨噬细胞 NF-κB 的含量, 从而促进 MMP-9 基因的转录。

参考文献:

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. Nature, 2002, 420(6917): 868-874.
- [2] Gleissner CA. Platelet-derived chemokines in atherogenesis: what's new [J]? Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(5): 563-569.
- [3] Sachais BS, Turrentine T, Dawicki McKenna JM, et al. Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice [J].

- Thromb Haemost,2007,98(5):1108-1113.
- [4] Chen Q, Jin M, Yang F, et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013:928315.
- [5] Pamukcu B, Lip GY, Shantsila E. The nuclear factor- κ B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease [J]. Thromb Res, 2011, 128(2):117-123.
- [6] Hu ZP, Fang XL, Fang N, et al. Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF- κ B system in high-fat-fed rabbits [J]. J Pineal Res, 2013, 55(4):388-398.
- [7] Yang S, Li R, Qu X, et al. Fosinoprilat alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling in monocytes [J]. Cell Immunol, 2013, 284(1-2):182-186.
- [8] Yu G, Rux AH, Ma P, et al. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF- κ B-dependent manner [J]. Blood, 2005, 105(9):3545-3551.
- [9] 赵战芝, 何钒, 唐雅玲, 等. 血小板因子 4 经 Toll 样受体 4 上调巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(8):769-773.
- [10] Aidoudi s, Bikfalvi A. Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis [J]. Thromb Haemost, 2010, 104(5):941-948.
- [11] Kasper B, Winoto-Morbach S, Mittelst ddt J, et al. CXCL4-induced monocyte survival, cytokine expression, and oxygen radical formation is regulated by sphingosine kinase 1 [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(4):1162-1173.
- [12] Gleissner CA, Shaked I, Erbel C, et al. CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages [J]. Circ Res, 2010, 106(1):203-211.
- [13] Gleissner CA, Ley K. CXCL4 in atherosclerosis: possible roles in monocyte arrest and macrophage foam cell formation [J]. Thromb Haemost, 2007, 98(5):917-918.
- [14] Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, et al. Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris versus stable angina pectoris [J]. Am J Cardiol, 2006, 97(2):175-180.
- [15] Lim HS, Lip GY. Circulating matrix metalloproteinase-9 levels in atherosclerotic vascular disease: a possible measurement of systemic or specific disease pathophysiology [J]? J Intern Med, 2008, 263(6):620-622.
- [16] Siasos G, Tousoulis D, Kioufis S, et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases [J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12(10):1132-1148.
- [17] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. Mol Cancer, 2013, 12:86.

(此文编辑:朱雯霞)