

姜黄素对脂多糖诱导人支气管上皮细胞 基质金属蛋白酶的影响

张蓉蓉 韦丽玲 王灵聪

【摘要】 目的 探讨姜黄素对脂多糖(LPS)诱导人支气管上皮细胞基质金属蛋白酶(MMP-7、MMP-9、MMP-12)表达的影响。方法 人支气管上皮细胞培养24 h后,随机分为空白组(CK组)、LPS组(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、LPS + 细胞外信号调节激酶(ERK)抑制剂PD98059组(PD组)、LPS + 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)抑制剂LY294002组(LY组)、LPS + 核转录因子- κB (NF- κB)抑制剂PDT组(PDTC组)、LPS + 姜黄素组(cur组)6组。各组给予相应阻断剂30 min后给予LPS作用4 h,用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测MMP-7、MMP-9、MMP-12的mRNA表达。结果 LPS组MMP-7 mRNA、MMP-12 mRNA表达明显高于CK组($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 0.22 ± 0.11 比 0.08 ± 0.04 , 0.76 ± 0.21 比 0.25 ± 0.01 , 均 $P < 0.05$)。cur组MMP-7 mRNA表达较LPS组显著下降($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 0.08 ± 0.03 比 0.22 ± 0.11 , $P < 0.05$)。各组MMP-9 mRNA表达差异均无统计学意义($F = 0.327$, $P = 0.887$)。LY组MMP-12 mRNA表达较LPS组显著下降($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 0.24 ± 0.10 比 0.76 ± 0.21 , $P < 0.05$), cur组则显著高于LPS组(1.36 ± 0.39 比 0.76 ± 0.21 , $P < 0.05$)。结论 PI3K/Akt抑制剂能抑制LPS诱导人支气管上皮细胞MMP-12表达;姜黄素可抑制LPS诱导的MMP-7表达。

【关键词】 姜黄素; 支气管上皮细胞; 信号通路; 基质金属蛋白酶

基质金属蛋白酶(MMPs)如MMP-9在急性肺栓塞(APE)等病理性重构过程中发挥重要作用^[1]。本课题组既往研究发现,APE模型大鼠存在炎症反应,其核转录因子- κB (NF- κB)、细胞外信号调节激酶(ERK)、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)均明显升高;而姜黄素可通过抑制NF- κB 、ERK和PI3K/Akt的表达起到对APE的保护作用^[2-4]。但APE继发炎症反应后的NF- κB 、ERK、PI3K/Akt是否与MMPs存在因果关系,目前国内外还未见相关研究报道,故本研究拟进行相关探讨。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料:人支气管上皮细胞BEAS-2B由中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞库提供。姜黄素为美国Sigma公司产品(货号08511-10 mg,批号#BCBL0424V),处理剂量为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,二甲基亚砜(DMSO)溶解,母液浓度100 mmol/L;脂多糖(LPS)为美国Sigma公司产品(货号L2630-10MG,批号122M40010),处理剂量10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H_2O 溶解,母液浓度1 mg/mL;PI3K/Akt抑制剂LY294002为美国Sigma公司产品(货号L9908-1MG,批号29968),处理剂量20 $\mu\text{mol}/\text{L}$, H_2O 溶解,母液浓度10 mmol/L;NF- κB 抑制剂PDT组为江苏南通碧云天公司产品(产品编号S1808),处理剂量100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, DMSO溶解,母液浓度25 mmol/L;ERK抑制剂PD98059为美国Sigma公司产品(货号1001602366,批号#SLBG072N),处理剂量25 $\mu\text{mol}/\text{L}$, H_2O 溶解,母液浓度

25 mmol/L。反转录(RT)试剂盒为赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品;实时定量聚合酶链反应(qPCR)扩增试剂为天根生化科技(北京)有限公司产品;定量PCR仪及其配套分析软件为美国伯乐公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:使用LHC-8无血清培养基复苏BEAS-2B细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育;采用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,0.125%胰岛素+0.01%乙二胺四乙酸(EDTA)消化细胞,并进行传代培养以及调整细胞状态。采用对数生长期的细胞,经0.125%胰岛素+0.01%EDTA消化并离心、计数,以 2×10^5 /皿铺六孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育。

1.2.2 细胞分组及处理:细胞培养24 h后,采用SPSS 19.0统计软件产生随机数字分配表,将细胞分为6组:空白组(CK组);LPS组(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$);LPS + ERK抑制剂PD98059组(PD组);LPS + PI3K/Akt抑制剂LY294002组(LY组);LPS + NF- κB 抑制剂PDT组(PDTC组);LPS + 姜黄素10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组(cur组)。各组提前给予相应阻断剂30 min后给予LPS,加药后作用4 h。

1.2.3 实时荧光RT-qPCR检测MMPs mRNA表达:TRIzol法提取总RNA,测定RNA纯度和RNA定量,以相应溶剂为对照。取2 μL RNA溶液于SMA4000光度计检测,观察波长260 nm与280 nm、230 nm处的吸光度比值(A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230})及连续波长吸收峰,并计算RNA溶液浓度,判断RNA提取质量,如果 $A_{260}/A_{280} > 2.0$ 且 < 2.3 ,则可以满足后续进行RT-qPCR所需的反转录实验。RT-qPCR扩增实验引物序列见表1,操作按试剂盒说明书步骤进行,实验结果用PCR分析软件分析,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算结果。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.015

基金项目:浙江省自然科学基金(LY12H29005);浙江省卫生高层次人才创新人才培养工程项目资助(2014-108)

作者单位:310006 浙江杭州,浙江中医药大学附属第一医院ICU

通讯作者:王灵聪,Email:wlc501@139.com

表 1 实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 引物序列

基因	引物序列
actin	上游 5'-GACTTAGTTCGCTTACACCCCTTC-3' 下游 5'-GACTGCTGTCACCTTCACCGT-3'
MMP-7	上游 5'-GGAGCTCATGGGACTCCTA-3' 下游 5'-TCCAGCGTTCATCCTCATCG-3'
MMP-9	上游 5'-TTTGAGTCCGGTGGACGATG-3' 下游 5'-GCTCCTCAAAGACCGAGTCC-3'
MMP-12	上游 5'-ACTACACATTCAGGAGGCACA-3' 下游 5'-CAGGGACTGAATGCCACGTA-3'

注: actin 为肌动蛋白, MMP 为基质金属蛋白酶

1.3 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 统计软件, 实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

RT-qPCR 检测结果显示 (表 2): LPS 组 MMP-7 mRNA 表达较 CK 组显著升高 ($P < 0.05$); cur 组 MMP-7 mRNA 表达较 LPS 组显著下降 ($P < 0.05$)。各组 MMP-9 mRNA 表达差异均无统计学意义。LPS 组、cur 组 MMP-12 mRNA 表达较 CK 组显著升高 (均 $P < 0.05$); LY 组较 LPS 组显著下降, 而 cur 组则较 LPS 组进一步升高 (均 $P < 0.05$)。

表 2 LPS 诱导人支气管上皮细胞 MMP mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	MMP-7 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	MMP-9 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	MMP-12 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
CK 组	3	0.08 ± 0.04	0.25 ± 0.16	0.25 ± 0.01
LPS 组	3	0.22 ± 0.11 ^a	0.49 ± 0.67	0.76 ± 0.21 ^a
LY 组	3	0.15 ± 0.08	0.54 ± 0.23	0.24 ± 0.10 ^b
PD 组	3	0.10 ± 0.06	0.37 ± 0.49	0.58 ± 0.07
PDTC 组	3	0.17 ± 0.10	0.70 ± 0.78	0.50 ± 0.26
cur 组	3	0.08 ± 0.03 ^b	0.32 ± 0.31	1.36 ± 0.39 ^{ab}
F 值		1.669	0.327	10.907
P 值		0.216	0.887	0.000

注: LPS 为脂多糖, MMP 为基质金属蛋白酶; CK 组为空白组, LPS 组为脂多糖组, LY 组为 LPS + 磷酸酯肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 抑制剂 LY294002 组, PD 组为 LPS + 细胞外信号调节激酶 (ERK) 抑制剂 PD98059 组, PDTC 组为 LPS + 核转录因子-κB 抑制剂 PDTC 组, cur 组为 LPS + 姜黄素组; 与 CK 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

有研究表明, LPS 可诱导单核细胞 MMP-7^[5] 及小神经胶质细胞 MMP-9 表达^[6], 也可诱导巨噬细胞 MMP-12 表达^[7], 但未见 LPS 诱导支气管上皮细胞 MMP-7、MMP-9、MMP-12 表达的研究。MMPs 是一类能降解细胞外基质 (ECM) 及基底膜中多种成分的内肽酶家族, 来源于多种组织及细胞^[8], 在炎症等过程中发挥重要作用。MMP-7 是基质溶解素, 为 MMPs 家族中相对分子质量最小、蛋白水解酶活性最强的一员, 由巨噬细胞分泌, 可广泛降解 ECM^[9]。MMP-9 为明胶酶, 能促进炎症反应, APE 后 MMP-9 可显著升高^[1,10]。MMP-12 为人巨噬细胞弹性蛋白酶, 1993 年在

吸烟者的肺泡巨噬细胞中克隆出 MMP-12 的 cDNA 序列, 在炎症中起一定作用^[11]。丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 级联为细胞中很重要的通路, 而 ERK 与细胞的增殖反应很紧密^[12]。PI3K/Akt 在细胞中广泛存在, 为细胞生长、增殖以及分化的信号转导通路之一, 其受体蛋白为 Akt^[13], PI3K/Akt 的信号途径可促进炎症细胞激活。

本研究结果显示, LPS 可诱导人支气管上皮细胞 MMP-7、MMP-12 表达, 而 MMP-9 表达未见升高; PI3K/Akt 抑制剂能抑制 MMP-12 表达。有研究表明, ERK1/2 抑制剂能抑制 MMP-9 的表达^[14]。表皮生长因子 (EGF) 诱导人类 A431 细胞后, MMP-12 表达与 ERK、PI3K/Akt、NF-κB 信号通路有关^[15], 这与本研究结果相符。

姜黄为姜黄属植物, 药用根茎, 能散风活血、行气、通经止痛。《本草纲目拾遗》有“姜黄味辛, 温, 无毒, 色黄, 主破血下气, 温不寒”的记载。姜黄素是从姜黄中提取的一种酚类物质, 其分子式为 C₂₁H₂₀O₆, 相对分子质量为 368.39, 有抗炎、抗凝、抗氧化等作用^[16-17]。根据预实验发现, 10 μmol/L 姜黄素对 LPS 诱导支气管上皮细胞表达的抑制作用最显著, 故选用该浓度进行实验。有研究发现, 姜黄素能显著降低肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 刺激后的人脐静脉内皮细胞分泌 MMP-9^[18]; 姜黄素还可抑制 TNF-α 诱导人动脉平滑肌细胞 NF-κB 的表达, 从而降低 MMP-9 的表达^[19-20]。而本研究发现, 姜黄素可抑制 LPS 诱导人支气管上皮细胞后的 MMP-7 表达。

本实验的缺点是 LPS 不能真正模仿 APE 后的炎症反应, 可在本研究基础上, 进一步用 TNF-α 刺激肺微血管内皮细胞后, 观察 MMPs 的变化。

综上, PI3K/Akt 抑制剂能抑制 LPS 诱导人支气管上皮细胞 MMP-12 表达; 姜黄素可抑制 MMP-7 表达。

参考文献

- [1] Mühl D, Ghosh S, Uzuelli JA, et al. Increases in circulating matrix metalloproteinase-9 levels following fibrinolysis for acute pulmonary embolism [J]. Thromb Res, 2010, 125 (6): 549-553.
- [2] 王灵聪, 张微, 夏国莲, 等. 姜黄素对急性肺栓塞大鼠炎症因子的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54 (6): 506-508.
- [3] 王灵聪, 张微, 吴建浓, 等. 姜黄素对急性肺栓塞大鼠 ERK、PI3K、Akt 的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54 (18): 1592-1595.
- [4] 张微, 赖志珍, 王灵聪. 姜黄素对急性肺栓塞大鼠核转录因子 kappaB 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32 (9): 2216-2218.
- [5] Reel B, Sala-Newby GB, Huang WC, et al. Diverse patterns of cyclooxygenase-independent metalloproteinase gene regulation in human monocytes [J]. Br J Pharmacol, 2011, 163 (8): 1679-1690.
- [6] Pul R, Kopadze T, Skripuletz T, et al. Polyclonal immunoglobulins (IVIg) induce expression of MMP-9 in microglia [J]. J Neuroimmunol, 2009, 217 (1-2): 46-50.
- [7] Dean RA, Cox JH, Bellac CL, et al. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR + CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx [J]. Blood, 2008, 112 (8): 3455-3464.
- [8] Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases [J]. Biol Chem, 2003, 384 (6):

863-872.

[9] Williams H, Johnson JL, Jackson CL, et al. MMP-7 mediates cleavage of N-cadherin and promotes smooth muscle cell apoptosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87 (1): 137-146.

[10] Cau SB, Barato RC, Celes MR, et al. Doxycycline prevents acute pulmonary embolism-induced mortality and right ventricular deformation in rats [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2013, 27 (4): 259-267.

[11] Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (32): 23824-23829.

[12] Yu PJ, Ferrari G, Pirelli L, et al. Vascular injury and modulation of MAPKs: a targeted approach to therapy of restenosis [J]. *Cell Signal*, 2007, 19 (7): 1359-1371.

[13] Lin CH, Yeh SH, Lin CH, et al. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala [J]. *Neuron*, 2001, 31 (5): 841-851.

[14] Cheng YC, Chen LM, Chang MH, et al. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 325 (1-2): 15-23.

[15] Yang XS, Liu SA, Liu JW, et al. Fucosyltransferase IV enhances expression of MMP-12 stimulated by EGF via the ERK1/2, p38 and NF-κB pathways in A431 cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13 (4): 1657-1662.

[16] 王灵聪, 蒋慧芳, 朱佃香, 等. 姜黄素对 TNF-α 诱导人脐静脉内皮细胞 FKN 表达的干预作用[J]. *中国中医药科技*, 2010, 17 (6): 517-524.

[17] Araújo CC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96 (5): 723-728.

[18] 张筠, 王宗仁, 刘钺利. 姜黄素对人脐静脉内皮细胞损伤模型 MMP-9 表达的抑制作用[J]. *中国中医急症*, 2008, 17 (4): 510-512.

[19] Yu YM, Lin HC. Curcumin prevents human aortic smooth muscle cells migration by inhibiting of MMP-9 expression [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010, 20 (2): 125-132.

[20] 林梅琴, 陈碧新, 赵志光, 等. 姜黄素对动脉粥样硬化家兔核转录因子-κB 的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14 (2): 95-98.

(收稿日期: 2015-05-30)
(本文编辑: 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊常用的不需要标注中文的缩略语

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)
 急性呼吸窘迫综合征
 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)
 呼吸机相关性肺炎 (ventilator-associated pneumonia, VAP)
 医院获得性肺炎 (hospital acquired pneumonia, HAP)
 社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia, CAP)
 高氧性急性肺损伤
 (hyperoxia-induced acute lung injury, HALI)
 慢性阻塞性肺疾病
 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)
 急性肺动脉栓塞 (acute pulmonary embolism, APE)
 全身炎症反应综合征
 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)
 多器官功能障碍综合征
 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)
 多器官功能衰竭 (multiple organ failure, MOF)
 重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP)
 弥散性血管内凝血
 (disseminated intravascular coagulation, DIC)
 心力衰竭 (heart failure, HF)
 机械通气 (mechanical ventilation, MV)
 无创通气 (noninvasive ventilation, NIV)
 持续气道正压 (continuous positive airway pressure, CPAP)
 同步间歇指令通气
 (synchronized intermittent mandatory ventilation, SIMV)
 高频振荡通气 (high frequency oscillatory ventilation, HFOV)
 体外膜肺氧合 (extra corporeal membrane oxygenation, ECMO)
 自主呼吸试验 (spontaneous breathing trial, SBT)
 控制性肺膨胀 (sustained inflation, SI)
 气管内插管 (endotracheal intubation, ETI)
 吸入氧浓度 (fraction of inspired oxygen, FiO₂)
 呼气末正压 (positive end-expiratory pressure, PEEP)
 压力支持通气 (pressure support ventilation, PSV)
 气道峰压 (peak inspiratory pressure, PIP)

气道平台压 (platform of the airway pressure, Pplat)
 脉搏指示连续心排量监测
 (pulse index continuous cardiac output, PiCCO)
 外周循环阻力指数
 (systemic vascular resistance index, SVRI)
 血管外肺水 (extravascular lung water, EVLW)
 血管外肺水指数 (extravascular lung water index, EVLWI)
 全心舒张期末容积指数
 (global end-diastolic volume index, GEDVI)
 每搏量指数 (stroke volume index, SVI)
 心排量指数 (cardiac index, CI)
 呼吸浅快指数 (rapid shallow breathing index, RSBI)
 脉搏血氧饱和度 (percutaneous oxygen saturation, SpO₂)
 平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP)
 中心静脉压 (central venous pressure, CVP)
 肺动脉楔压 (pulmonary artery wedge pressure, PAWP)
 重症加强治疗病房 (intensive care unit, ICU)
 呼吸危重症医学科 (respiratory intensive care unit, RICU)
 急性生理学与慢性健康状况评分系统
 (acute physiology and chronic health evaluation, APACHE)
 急诊脓毒症死亡风险评分
 (the mortality in emergency department sepsis, MEDS 评分)
 肺损伤预测评分 (lung injury prediction score, LIPS)
 肺部超声评分 (lung ultrasound score, LUS)
 序贯器官衰竭评分
 (sequential organ failure assessment, SOFA)
 临床肺部感染评分 (clinical pulmonary infection score, CPIS)
 格拉斯哥昏迷评分 (Glasgow coma score, GCS)
 盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP)
 反转录-聚合酶链反应
 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)
 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot)
 酶联免疫吸附试验
 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)