

sirtuin-1 在肺泡巨噬细胞金属基质蛋白酶 9 表达中作用

毕 辉,李玲玲,姚 欣*

(南京医科大学第一附属医院呼吸科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages,AM)的金属基质蛋白酶 9(matrix metalloproteinases 9,MMP9)表达在慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)及肺气肿形成中起重要作用,但该细胞对于 MMP9 表达调控机制尚不明确。本研究就 NAD 依赖性蛋白脱乙酰酶 sirtuin-1(Sirt1)在 MMP9 表达调控中的可能作用开展研究。方法:体外培养小鼠 AM,建立香烟烟雾提取物(cigarette smoking extract,CSE)刺激模型;观察加入 Sirt1 激动剂白藜芦醇后的细胞内 MMP9 表达量变化;建立 Sirt1 基因 siRNA 干扰模型,观察 Sirt1 基因被抑制后的 AM 胞内 MMP9 表达状况。结果:1% CSE 刺激后 AM 胞内 MMP9 表达明显增加($P < 0.05$),此作用可被 Sirt1 激动剂白藜芦醇所拮抗,其拮抗效应呈浓度依赖性;采用 siRNA 干扰 AM 细胞 Sirt1 基因表达后,AM 细胞内 MMP9 表达明显增加($P < 0.05$)。结论:Sirt1 参与了 AM 细胞对 MMP9 的表达调控作用,其可能在 COPD 的发生发展中起保护性作用。

[关键词] sirtuin-1;金属基质蛋白酶 9;COPD

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1015-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140803

Role of sirtuin1 in matrix metalloproteinases 9(MMP-9)expression in alveolar macrophages

Bi Hui, Li Linlin, Yao Xin*

(Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** Metalloproteinases 9(MMP-9)of alveolar macrophages(AM)has been shown to play an important role in the formation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and emphysema. However,its effect on expression and regulation mechanism is still not clear. This study is aimed to investigate the potential role of sirtuin1 (Sirt1)in the expression and regulation mechanism of matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)in alveolar macrophages (AM). **Methods:** The AMs were cultured in rats,the simulation model was established using cigarette smoking extract (CSE). To observe change of expression of MM9 in cells. The interference model was established using siRNA to observe expression of MMP-9 after the inhibition of Sirt1. **Results:** MMP-9 expression increased significantly ($P < 0.05$)due to 1% CSE stimulation. However,this effect can be antagonized by the Sirt1 agonist resveratrol in a concentration dependent manner. MMP-9 expression in AM cells increased significantly after siRNA interference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sirt1 is involved in the expression of MMP9 in AM,and may play a protective role in COPD.

[Key words] sirtuin 1;matrix metalloproteinases 9;COPD

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(08):1015-1018]

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种重要的慢性呼吸系统疾病,患病人数多,病死率高,由于其缓慢进行性发展,严重影响患者的劳动能力和生活质量,是世界第 4 位致死原因,预计至 2020 年将升至第 3 位^[1]。吸烟是 COPD 发病的主要危险因素。目前研究认为蛋白酶/

抗蛋白酶系统失衡是其重要的发病机制之一,肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages,AM)表达和分泌金属基质蛋白酶 9(matrix metalloproteinases 9,MMP9)是其中重要环节,然而 MMP9 的具体调控机制仍不清楚。

sirtuin1(Sirt1)是哺乳动物酵母染色质沉默子体 Sirt2 的同源体^[2],是一种依赖 NAD⁺的组蛋白去乙酰化酶^[3]。体外动物模型肺组织中研究发现,Sirt1 在 COPD 发生过程中可以纠正金属基质蛋白酶 9/抗金

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81070025)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:xyao1998@126.com

属基质蛋白酶 1(MMP9/TIMP1)的平衡紊乱^[4],从而阻止肺气肿的发生。本研究旨在进一步明确 Sirt1 在调控 AM 的 MMP9 表达中的作用,进一步探讨 COPD 的形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠肺泡巨噬细胞 [美国模式培养物集存库(ATCC)],RPMI1640 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司);Sirt1 一抗体(美国 Abcom 公司);GAPDH 一抗体(美国 CST 公司);siRNA(上海吉玛公司);白藜芦醇(美国 Sigma 公司);实验中采用万宝路牌香烟;羊抗兔二抗(南京巴德德公司);发光液 ECL(美国 Thermo 公司);Lipofectamine 2000 Transfection Reagent(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞置于温湿的 37℃ 5%CO₂ 环境中生长,并且在含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 中培养。细胞以 2 × 10⁵ 个/ml 接种于 6 孔板中进行相关实验。

1.2.2 白藜芦醇及香烟烟雾提取物(CSE)刺激细胞后 MMP9 变化

1.2.2.1 CSE 制备

参考文献[5]的方法,取 2 支香烟,去除过滤嘴燃烧,燃烧后的烟雾吸入 10 ml 无血清 RPMI1640 培养基中,制成悬液,调整 pH 值至 7.4,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后作为 CSE 原液备用。CSE 原液用无血清 RPMI1640 培养基稀释成 1% CSE,于 30 min 内用于实验。

1.2.2.2 白藜芦醇及 CSE 刺激细胞后 MMP9 变化

6 孔板中加入不同浓度的 Sirt1 激动剂白藜芦醇,1 h 后用 1% CSE 刺激细胞 4 h,然后更换为正常培养基,培养 24 h 提取蛋白观察 MMP9 变化。实验分为 A、B、C、D、E、F、G 组,A 组为对照组;B 组加入 DMSO;C 组加入 1% CSE;D 组加入 1% CSE+5 nmol/L 白藜芦醇;E 组加入 1% CSE+10 nmol/L 白藜芦醇;F 组加入 1% CSE+25 nmol/L 白藜芦醇;G 组加入 1% CSE+50 nmol/L 白藜芦醇。上述实验重复 5 次。

1.2.3 siRNA 转染

设计并合成 3 条 Sirt1 基因的 siRNA:siRNA-A sense:5' -GCGGAUAGGUCCAUAUACUTT-3', anti-sense:5' -AGUAUAUGGACCUAUCGGCTT-3',siRNA-B sense:5' -CCGUCUCUGUGUCACAAAUTT-3', anti-

sense:5' -AUUUGUGACACAGAGACGGTT-3',siRNA -C sense:5' -GGGAUCAAGAGGUUGUUAATT-3', anti-sense:5' -UUAACAACCUCUUGAUCCCTT-3'。Lipofectamine 2000 与 siRNA 按照 1:1 进行细胞转染,24 h 换液,48 h 提取蛋白。上述实验步骤重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测

提取各组细胞蛋白,各孔加上样蛋白 20 μg,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上。将膜分别与 Sirt1 抗体、GAPDH 抗体于 4℃ 孵育过夜;洗涤后加入稀释后的二抗,孵育。ECL 检测阳性信号。以 GAPDH 蛋白表达水平作为内参。

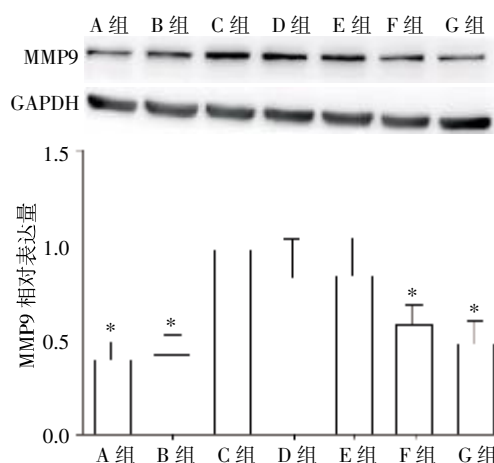
1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 方法分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 1% CSE 及白藜芦醇对 MMP9 的影响

1% CSE 刺激 AM 细胞 4 h,其表达 MMP9 明显增加($P < 0.05$)。当加入 Sirt1 激动剂白藜芦醇,再用 1% CSE 刺激,MMP9 的表达较前有所下降,且其下降程度与白藜芦醇呈浓度依赖性(图 1)。



A 组:对照组;B 组:DMSO;C 组:1% CSE;D 组:1% CSE+5 nmol/L 白藜芦醇;E 组:1% CSE+10 nmol/L 白藜芦醇;F 组:1% CSE+25 nmol/L 白藜芦醇;G 组:1% CSE+50 nmol/L 白藜芦醇。与 C 组比较, $*P < 0.05$ ($n = 5$)。

图 1 1% CSE 和 Sirt1 激动剂白藜芦醇对 AM 细胞 MMP9 表达的影响

Figure 1 Effect of 1% CSE and Sirt1 agonist-resveratrol on MMP9 expression in AM cells

2.2 Sirt1 基因 siRNA 细胞干扰模型的建立

siRNA 转染 AM 细胞 24 h 后,显微镜下观察细

胞状态良好, 提取蛋白测定 Sirt1 干扰效率。3 条 siRNA 中, 以 siRNA-B、siRNA-C 干扰效果显著 ($P < 0.05$), 其中 siRNA-B 干扰效果最明显, 干扰效率为 64% ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 siRNA-B 干扰 AM 细胞 Sirt1 基因表达后胞内 MMP9 含量变化

siRNA-B 干扰 AM 24 h 后提取细胞蛋白, 结果显示 MMP9 含量明显升高, 且具有统计学差异 ($P < 0.05$, 图 3)。

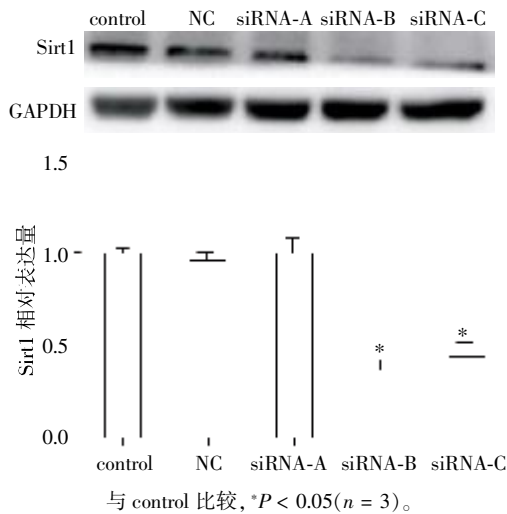


图 2 AM 细胞中 Sirt1 基因 siRNA 干扰模型的建立

Figure 2 Establishment of Sirt1-siRNA interference model in AM cells

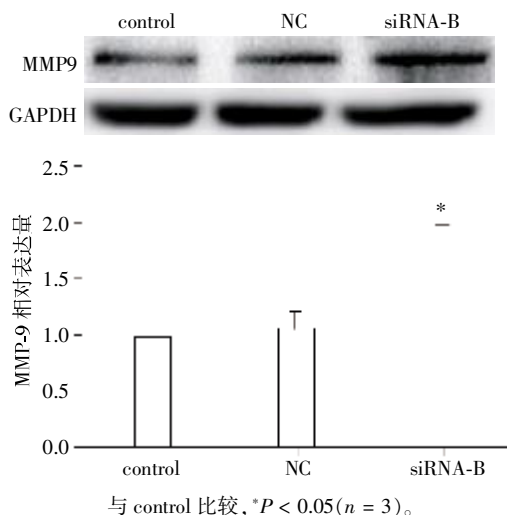


图 3 siRNA-B 干扰 AM 细胞 Sirt1 表达后胞内 MMP9 含量变化

Figure 3 MMP9 expression after interference of siRNA-B in AM cells

3 讨论

COPD 是一种以不完全可逆性气流受限为特征

的疾病, 主要病理特征表现为气道炎症和气道重构, 影像学典型表现为肺气肿, 与肺部对有害气体或颗粒的异常反应有关, 目前认为吸烟是 COPD 重要的发病原因之一。研究显示香烟烟雾中含有高浓度的自由基和氧化剂, 可导致肺部的氧化应激损伤, 造成对生物大分子物质如 DNA、RNA、蛋白质和脂肪等的损伤^[6], 对细胞产生毒性作用, 甚至细胞死亡。吸烟导致 COPD 形成的重要机制是引起患者体内蛋白酶/抗蛋白酶失衡。研究显示吸烟者肺组织中 AM 细胞激活, 表达和分泌一种重要的金属基质蛋白酶——MMP9, 其在 COPD 的形成过程中占有重要地位。MMP9 通过破坏肺组织中弹性基质成分、气道上皮和内皮结构, 介导炎性细胞聚集, 从而加速 COPD 肺气肿的发生发展^[7], 但香烟致 AM 细胞分泌 MMP9 的表达调控机制仍然不明确。

Sirt1 是一种依赖 NAD⁺的组蛋白去乙酰化酶, 编码基因位于常染色体 10q21.3, 具有高度的保守性^[8]。研究表明 Sirt1 参与体内多项生理功能的调节, 与细胞增殖、分化、衰老、凋亡和代谢密切相关^[9-10], 其与 COPD 的发生发展具有密切联系。研究显示 Sirt1 在 COPD 患者以及香烟诱导的鼠模型中表达降低, 其可拮抗香烟诱导的肺部炎症和氧化应激所致的损伤^[11], 参与 COPD 急性发作时炎症表达调控^[12]。研究还显示 Sirt1 参与蛋白酶/抗蛋白酶平衡调节。Yao 等^[4]在 Sirt1 基因敲除小鼠动物肺组织中发现 MMP9 水平上升而 TIMP1 下降, 而 Sirt1 基因过表达后呈现相反的趋势, 人肺组织中也观察到 Sirt1 与 MMP9/TIMP1 的平衡密切相关, 提示 Sirt1 可通过纠正 MMP9/TIMP1 的平衡紊乱而在 COPD 肺气肿的发生发展中起保护性作用。但上述研究基于组织水平说明 Sirt1 具有抑制 MMP9 表达的作用, 本研究进一步从细胞水平证实 Sirt1 可能是通过作用于靶细胞——AM 细胞, 从而调控 MMP9 的表达, 拮抗 CSE 所致的损伤。

研究发现 CSE 可诱导 AM 细胞分泌 MMP9 增多, 而 Sirt1 激动剂白藜芦醇具有拮抗 CSE 诱导 MMP9 的作用, 且此拮抗效应具有明显的浓度依赖性, 白藜芦醇浓度在 50 nmol/L 时抑制作用最明显。此结果表明高表达 Sirt1 具有对抗香烟诱导 AM 细胞分泌 MMP9 的作用, 一定程度上具有对抗香烟所诱导的肺部损伤作用。

细胞干扰实验中, 我们设计 3 条 siRNA, 其中 siRNA-B 蛋白水平干扰效率最高, 可达 64%。AM 细胞内干扰 Sirt1 后, MMP9 水平显著性升高, 说明低

表达 Sirt1 促进 MMP9 分泌。

Sirt1 是一种核蛋白,其主要通过对组蛋白、转录因子及其他蛋白修饰的赖氨酸残基进行去乙酰化从而调控基因的表达。研究显示 Sirt1 可结合细胞凋亡蛋白 1 抑制子基因启动子,致该区域组蛋白去乙酰化,使其不再被核因子(NF)- κ B 激活,最终引起肿瘤坏死因子诱导的凋亡敏感性增加^[13]。在细胞核中,Sirt1 可与 P53 相互作用,抑制 P53 的活性,从而减少应激条件下细胞凋亡或衰老^[14]。Gao 等^[15]发现 Sirt1 还可与 c-JUN 相互作用,进而抑制转录激活蛋白因子 1 的活性,抑制 MMP9 的产生。上述研究表明 Sirt1 参与多信号通路的调控,据此推测其对 MMP9 的调控可能是多通路调控的终结果。本课题组后续将在 AM 细胞中围绕 Sirt1 所参与的 MMP9 调控通路做进一步探讨。

综上所述,本研究在细胞水平,同时从 Sirt1 高、低表达两方面证实了 Sirt1 可通过作用于 AM 细胞,发挥调控 MMP9 表达的作用,拮抗 CSE 所致细胞损伤,提示 Sirt1 激动剂白藜芦醇可能通过作用于靶细胞——AM 细胞而发挥纠正蛋白酶/抗蛋白酶平衡紊乱的作用,但其中具体机制仍需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(4):347-365
- [2] Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, et al. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19):10794-10799
- [3] McBurney MW, Yang X, Jardine K, et al. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1):38-54
- [4] Yao H, Hwang JW, Sundar IK, et al. SIRT1 redresses the imbalance of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 in the development of mouse emphysema and human COPD [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(9):L615-624
- [5] Su Y, Han W, Giraldo C, et al. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(5):819-825
- [6] Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion [J]. *Eur J Cancer Prev*, 1998, 7(1):9-16
- [7] Lee KS, Jin SM, Lee H, et al. Imbalance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in toluene diisocyanate-induced asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(2):276-284
- [8] Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73:417-435
- [9] Chua KF, Mostoslavsky R, Lombard DB, et al. Mammalian SIRT1 limits replicative life span in response to chronic genotoxic stress [J]. *Cell Metabolism*, 2005, 2(1):67-76
- [10] Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase [J]. *Science*, 2004, 305(5682):390-392
- [11] Yao H, Sundar IK, Ahmad T, et al. SIRT1 protects against cigarette smoke-induced lung oxidative stress via FOXO3-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(9):L816-L828
- [12] Knobloch J, Wahl C, Feldmann M, et al. Resveratrol attenuates the release of inflammatory cytokines from human bronchial smooth muscle cells exposed to lipoteichoic acid in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 114(2):202-209
- [13] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase [J]. *EMBO*, 2004, 23(12):2369-2380
- [14] Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress [J]. *Cell*, 2001, 107(2):137-148
- [15] Gao Z, Ye J. Inhibition of transcriptional activity of c-JUN by SIRT1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(4):793-796

[收稿日期] 2014-04-08