



# 机械压力对人脐静脉内皮细胞 P38 MAPK 及基质金属蛋白酶 9 的表达及意义

姚豫桐<sup>1</sup> 骆乐<sup>1</sup> 李可洲<sup>2</sup> 黄孝伦<sup>1, Δ</sup>

1. 电子科技大学附属医院 & 四川省人民医院 肝胆胰脾外科中心 & 细胞移植中心 成都 610072;

2. 四川大学华西医院肝胆胰外科 成都 610041

**【摘要】目的** 探讨不同机械压力下人脐静脉内皮细胞丝裂素活化蛋白激酶 (p38 MAPK)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 的表达与肝脏再生的关系。**方法** 对静态培养及不同压力、不同时间条件下体外培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 用倒置显微镜进行形态观察, 并采用 RT-PCR 方法相对定量检测细胞 P38、MMP9 mRNA 的表达变化, 用免疫印迹法测定 MMP9 蛋白表达量。**结果** 随着压力的增加和加压时间的延长, 正常血管内皮细胞形态逐渐发生变化, 表现为细胞形状梭形化或变为不规则形, 以 30 mm Hg 24 h 组最为明显; P38、MMP9 mRNA 表达和 MMP9 蛋白表达量均随压力增高而明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 体外加压 HUVEC 后, P38、MMP9 mRNA 及 MMP9 蛋白表达上调证实 P38MAPK 信号通道可在转录水平调节 MMP9 基因, 最终促进肝脏的再生, 提示 P38 MAPK-MMP9 级联反应是门静脉压力促进肝再生的重要信号通道。

**【关键词】** 机械压力; 血管内皮细胞; 细胞培养; 基质金属蛋白酶 9

**【中图分类号】** R608 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-9561 (2016) 04-001-03

## The regulation and significance of P38 MAPK and matrix metalloproteinase-9 in cultured human umbilical vein endothelial cells by mechanical pressure

**【Abstract】Objective** To study the relationship of expression of p38 MAPK and MMP9 and liver regeneration by HUVECs under the mechanical stress. **Methods** The HUVECs in vitro cultured were observed under different pressures and different times conditions by inverted microscope. To detected the cell MMP9 mRNA expression using relative quantitative RT-PCR method and MMP9 protein expression using relative quantitative RT-PCR. **Results** With the increase of pressure and time, the normal vascular endothelial cell morphology gradually changed, showing the cell shape into a spindle-based or irregular shape, 30mmHg 24 h group is the most obvious. The expression of P38, MMP9 mRNA and MMP9 protein were significantly increase ( $P < 0.05$ ) with the elevated of pressure. **Conclusion** The increase of P38, MMP9 mRNA and MMP9 protein of HUVEC in vitro after mechanical stress indicate the P38MAPK signal channel MMP9 gene regulation at the transcriptional level and ultimately to promote liver regeneration, suggesting that P38 MAPK-MMP9 is an important signal of liver regeneration by portal vein pressure.

**【Key words】** mechanical pressure; vascular endothelial cell; cell culture; MMP9

大量研究发现肝脏部分切除术及部分门静脉结扎术后的残余肝脏再生与门静脉压力增高密切相关, 我们的前期实验也证实大鼠 90% 极限门静脉分支结扎后残余肝脏再生的启动与门静脉压力变化有关<sup>[1, 2]</sup>。细胞外基质 (ECM) 的重新构型是肝再生过程中的重要步骤, 而基质金属蛋白酶-9 (MMP9) 可以降解许多胶原包括基底膜 (IV 型胶原)、变形纤维性 I 型胶原及 V 型胶原, 在 ECM 的重构过程中发挥着重要的作用<sup>[3, 4]</sup>。p38MAPK (P38 Mitogen-activated protein kinase) 通路是一种应激活化的蛋白激酶, 能将细胞外的压力刺激信号转导至细胞及核内, 并引起一系列细胞生物学反应 (如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)<sup>[5, 6]</sup>。本研究拟通过体外人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 加压培养模拟体内门静脉压力升高对血管内皮细胞的机械压力, 试图探讨内皮细胞中 p38MAPK、MMP9 表达调控信号途径, 为门静脉压力增高与肝脏再生间的信号传导机制提供理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 人脐静脉内皮细胞

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购自四川大学华西医院卫生部移植免疫重点实验室。经鉴定其生长状态良好且活性稳定。

#### 1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Hyclone)、RPMI 1640 培养基 (Gibco)、胰蛋白酶 (Sigma)、RT-

PCR 试剂盒 (TaKaRa)、引物与探针 (上海生物工程有限公司)、dNTP (Promega)、FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪 (加拿大枫岭公司)、GeneAmp PCR System 9600 PCR 扩增仪 (PE)、Gel Doc 1000 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司)、倒置显微镜及照相系统 (Olympus)、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Forma)、Flexcell 细胞压力加载系统、6 孔弹性基底膜培养板 (Flexcell)。

#### 1.3 HUVEC 的静态及压力下培养

将 HUVEC 在含 10% 胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml 的 RPMI 1640 培养液中, 并置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。观察细胞铺满瓶底约 80%~90% 时, 以 0.125% 胰蛋白酶消化并按 1:2 传代, 取第 5 代细胞按  $2 \times 10^4$ /孔的细胞密度接种于 6 孔弹性基底膜培养板中。加入含 10%FBS 的培养液 3ml 培养 24h, 待细胞贴壁后吸去培养液, 再加入含有 1%FBS 的培养液 3ml。随机分为 5 组, 每组含有 1 个 6 孔弹性基底膜培养板。分别为: A. 静态培养组 (对照组); B. 15mmHg 压力 (模拟生理状态下门静脉压力状态) 12h 培养组; C. 15mmHg 压力 24h 培养组; D. 30mmHg 压力 (模拟门静脉高压状态) 12h 培养组; E. 30mmHg 压力 24h 培养组。以上 15mmHg 及 30mmHg 压力实验组 6 孔弹性基底膜培养板均置于 Flexcell 细胞压力加载系统中, 并使加载系统持续与 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱相通以调节压力稳定在预定的水平。所有培养细胞达到预定时间后进行苔盼蓝实验证实存活率大于 90%。

1.4 荧光实时定量 PCR (real-time PCR) 检测细胞 P38、MMP9 mRNA 表达

各组细胞达到预定培养时间后, 取出培养板在无菌条件

作者简介: 姚豫桐, 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肝胆胰外科方面的研究。

Δ通信作者: E-mail: garrymd@163.com



下将其中1孔以0.125%胰蛋白酶消化后,以预冷的磷酸盐缓冲液漂洗3次,并溶于4℃ TRIzol,按照试剂盒说明书提取总RNA。两步法进行real-time PCR。逆转录应用Taqman逆转录试剂盒克隆cDNA,并储藏于-20℃。引物设计见表1。总反应体系为50μL,包括:10×定量PCR缓冲液5μL、1μL cDNA模板(100ng)、1μL 10mmol/L deoxy-NTPs、7μL 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>、引物各0.8μL(20pmol/L)及0.1μL定量Taq聚合酶(5U/L),SYBR Green I (Biotium, INC. USA)(1:1 000稀释)1μL,0.2μL ROX内参染料(Invitrogen),用去离子水补足至50μL。PCR循环参数为:94℃预变性3min,然后变性94℃ 30s,退火53℃ 30s,延伸72℃ 30s,50个循环扩增,每个反应做3个复孔。最后采用相对定量法,以β-actin作为内参照,同时以正常对照组的细胞为基准。

表1 Real-time PCR的引物序列

Tab.1 Primer sequence for quantitative real-time PCR

| 基 因     | 引 物                        | 片段大小 (bp) |
|---------|----------------------------|-----------|
| β-actin | 正义链 GCCAACACAGTGCTGTCT     | 114       |
|         | 反义链 AGGAGCAATGATCTTGATCTT  |           |
| P38     | 正义链 GTTTCTGTGACAGACCATATT  | 170       |
|         | 反义链 GATTGGCACCAATAAATACATT |           |
| MMP9    | 正义链 ATCCAAGGCCAATCCTACT    | 128       |
|         | 反义链 CGTCGAGTCAGCTCGGGT     |           |

表2 不同时间及压力下培养细胞的P38基因表达相对值比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别          | Ct <sub>P38</sub> | Ct <sub>β-actin</sub> | ΔCt       | ΔΔCt       | 2 <sup>-ΔΔCt</sup>     |
|-------------|-------------------|-----------------------|-----------|------------|------------------------|
| 对照组         | 21.26±0.25        | 16.72±0.22            | 4.53±0.32 | 0±0.28     | 1.01±0.21              |
| 15mmHg 12h组 | 20.74±0.19        | 18.26±0.18            | 2.48±0.28 | -2.05±0.19 | 4.14±0.28 <sup>a</sup> |
| 15mmHg 24h组 | 21.36±0.28        | 17.36±0.25            | 3.99±0.26 | -0.54±0.27 | 1.45±0.26              |
| 30mmHg 12h组 | 21.74±0.22        | 18.72±0.17            | 3.02±0.31 | -1.51±0.32 | 2.84±0.22 <sup>a</sup> |
| 30mmHg 24h组 | 19.62±0.30        | 17.18±0.28            | 2.44±0.19 | -2.08±0.26 | 4.23±0.35 <sup>a</sup> |

注:与对照组比较:<sup>a</sup> P<0.05

表3 不同时间及压力下培养细胞的MMP9基因表达相对值比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别          | Ct <sub>MMP9</sub> | Ct <sub>β-actin</sub> | ΔCt       | ΔΔCt       | 2 <sup>-ΔΔCt</sup>     |
|-------------|--------------------|-----------------------|-----------|------------|------------------------|
| 对照组         | 24.68±0.36         | 17.15±0.25            | 7.52±0.29 | 0±0.39     | 1.03±0.25              |
| 15mmHg 12h组 | 23.46±0.31         | 17.04±0.22            | 6.42±0.33 | -1.10±0.28 | 2.14±0.33 <sup>a</sup> |
| 15mmHg 24h组 | 23.44±0.30         | 16.68±0.20            | 6.76±0.34 | -0.76±0.30 | 1.68±0.31 <sup>a</sup> |
| 30mmHg 12h组 | 22.18±0.26         | 22.18±0.26            | 5.19±0.22 | -2.33±0.25 | 5.05±0.47 <sup>a</sup> |
| 30mmHg 24h组 | 24.47±0.29         | 17.27±0.17            | 7.19±0.28 | -0.33±0.23 | 1.23±0.28              |

注:与对照组比较:<sup>a</sup> P<0.05

## 2.2 Western blotting检测MMP9表达

对照组可见MMP9基因表达(IOD为0.382)。细胞经15mmHg 12h及30mmHg 12h加压后MMP9基因表达明显升高(IOD分别为0.672, 0.763);经15mmHg 24h及30mmHg 24h加压后可见MMP9基因表达轻度(IOD分别为0.501, 0.496)。(图1)

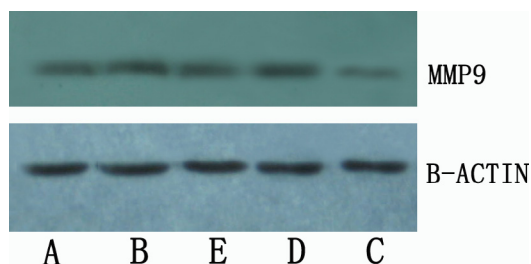


图1 Western blotting检测MMP9表达

(A: 对照组; B: 15mmHg 12h组; E: 15mmHg 24h组; D: 30mmHg 12h组; C: 30mmHg 24h组)

1.5 蛋白印迹法(Western blotting)检测分泌到培养液中的MMP9蛋白表达

各组细胞达到预定培养时间后,取出培养板在无菌条件下,收集其中1孔的培养液的上清,在1000×g条件下离心5min,浓缩上清中的蛋白,用5×SDS上样缓冲液稀释到相同的浓度,并煮沸5min。取50mg总蛋白以10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,半干法电转移蛋白至硝酸纤维素膜上,丽春红染色证实转移成功。在室温下用5%脱脂奶粉封闭,然后与MMP9大鼠单克隆抗体4℃孵育杂交过夜,进一步用结合辣根过氧化物酶的二抗孵育,化学发光法显色,洗片。扫描仪收集胶片图像后用图像分析系统检测光密度值进行比较和相对定量分析。一抗:MMP9抗体1:500稀释,二抗:羊抗兔IgG、羊抗鼠IgG均以1:5000稀释。

## 1.6 统计学分析

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS15.0统计软件处理相关数据,组间进行t检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同压力及时间对血管内皮细胞分泌P38、MMP9 mRNA表达的影响

分别扩增各组细胞的P38、MMP9,并记录扩增曲线。mRNA的定量采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算<sup>[7]</sup>。其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样品}} - \Delta Ct_{\text{基准}} = (Ct_{\text{样品}} - Ct_{\text{样品}} \beta\text{-actin}) - (Ct_{\text{基准}} - Ct_{\text{基准}} \beta\text{-actin})$ 。(表2、3)。

30mmHg 12h组; C: 30mmHg 24h组)

## 3 讨论

已有大量基础研究发现门静脉压力变化与肝脏部分切除及门静脉部分结扎术后的肝再生启动密切相关<sup>[8,9]</sup>。而临床上“门静脉栓塞”(Portal vein embolization, PVE)和ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy, ALPPS)的手术方式也是通过门静脉压力的升高促进残余肝脏的再生,从而达到提高“肝癌的可切除率”和“降低术后肝衰竭发生率”<sup>[10,11]</sup>。这些研究及临床应用均表明门静脉压力升高是肝部分切除及门静脉分支结扎后肝脏最早、最直接的微环境改变,门静脉压力升高与肝再生有着紧密关系。本课题组前期通过建立大鼠90%极限门静脉分支结扎模型证实门静脉压力变化与肝脏再生的进程密切相关<sup>[1,2]</sup>,但肝窦内血管内皮细胞如何通过感受血管内压力变化从而启动肝再生的信号转导机制仍不清楚。

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein



kinase, MAPK) 级联是细胞内重要的信号转导系统之一<sup>[12]</sup>。现已发现至少 4 条 MAPK 通路: 细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal regulated protein kinase, ERK) 通路、c-jun 氨基末端激酶 (c-junN-terminal kinase, JNK) 通路、p38/MAPK 通路以及 ERK5/BMK1 通路。其中 p38MAPK 通路是近年来引起注意的蛋白激酶级联通路, 该通路参与细胞生长、发育、分裂及细胞间的功能同步等多种细胞生物学过程, 在外界刺激如炎症因子或环境压力等作用下 p38MAPK 被磷酸化活化, 并通过磷酸化活化转录因子调控特定基因的表达, 将信号从细胞外传导到细胞核, 激活下游的激酶或多种转录因子从而介导细胞产生各种反应<sup>[13]</sup>。而细胞外基质 (ECM) 不仅是细胞赖以生存的场所, 而且是细胞与细胞之间自分泌和旁分泌调节的必经之路和缓冲地带, 其变化受基质金属蛋白酶 (MMPs) 和组织金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 的调节。正常情况下, MMPs 主要降解 ECM, TIMPs 主要抑制 MMPs 的活性, 从而抑制 ECM 降解。基质金属蛋白酶 (MMPs) 与基质金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 表达的平衡统一是维持正常肝组织中 ECM 合成与降解动态平衡的关键。肝再生过程中尿激酶被激活, 尿激酶裂解血浆纤溶蛋白酶原生成血浆纤溶蛋白酶, 后者溶解纤溶蛋白, 激活一系列基质相关金属蛋白酶, 其中 MMP9 的激活在肝再生过程中具有重要作用<sup>[14]</sup>。Olle 等发现敲除 MMP9 基因的小鼠肝再生不能正常进行<sup>[15]</sup>。

本实验中采用实时荧光定量 PCR 的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, 并引入看家基因  $\beta$ -actin 作参照, 从而发现 15mmHg 12h 组、30mmHg 12h 组、30mmHg 24h 组细胞 P38 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), 15mmHg 24h 组细胞 MMP9 mRNA 表达则无明显变化; 而 MMP9 mRNA 的表达在 15mmHg 12h 组、15mmHg 24h 组、30mmHg 12h 组中明显升高 ( $P < 0.05$ ), 在 30mmHg 24h 组中无明显变化, 这可能与较高压力长时间下所导致的细胞凋亡有关。而两种基因相对不同的结果则可能与之对于不同的压力而有不同的敏感性有关。为了进一步确定 MMP9 基因表达的上调是否能导致相应蛋白的增加, 实验通过 Western blotting 检测分泌到培养液中的 MMP9 蛋白, 证实随着不同压力和时间下 MMP9 蛋白的增加与 MMP9 mRNA 的表达有相同的趋势。

总之本研究结果发现体外加压 HUVEC 后, P38、MMP9 mRNA 及 MMP9 蛋白表达上调证实 P38MAPK 信号通道可在转录水平调节 MMP9 基因, 最终促进肝脏的再生, 提示 P38 MAPK-MMP9 级联反应是门静脉压力促进肝再生的重要信号通道。

#### 参考文献:

- [1] 李可洲, 姚豫桐, 张晓等. 门静脉分支结扎后门静脉压力变化与肝再生的关系 [J]. 中华消化外科杂志, 2010, 9(1):48-51.
- [2] 姚豫桐, 李可洲, 张晓等. NF-kappaB p65 和 TNF- $\alpha$  在门静脉压力促进极限门静脉分支结扎致肝再生中的作用 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2010, 41(4):713-716.
- [3] Xie Z, Singh M, Singh K. ERK1/2 and JNKs, but not p38

kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts [J]. J Cell Physiol, 2004, 198 (3):399 - 407.

[4] Preaux AM, Mallat A, Nhieu J T, et al. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell2matrix interactions [J]. Hepatology, 1999, 30(4):944 ~ 950.

[5] Lv J, Sun X, Ma J, et al. Netrin-1 induces the migration of Schwann cells via p38 MAPK and PI3K-Akt signaling pathway mediated by the UNC5B receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, S0006-291X(15)30194-30197.

[6] Oh JE, Bae GU, Yang YJ, et al. Cdo promotes neuronal differentiation via activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. FASEB J, 2009, 23 (7): 2088 - 2099.

[7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.

[8] Shupe TD, Petersen BE. Liver regeneration: A consequence of complex, well-orchestrated signals [J]. Hepatology, 2015, 62(2):644-645.

[9] Zhang J, Ma C, Liu Y, et al. Interleukin 18 accelerates the hepatic cell proliferation in rat liver regeneration after partial hepatectomy [J]. Gene, 2014, 537(2):230-237.

[10] Robles R, Parrilla P, López-Conesa A, et al. Tourniquet modification of the associating liver partition and portal ligation for staged hepatectomy procedure [J]. Br J Surg, 2014, 101(9):1129-1134.

[11] Truant S, Scatton O, Dokmak S, et al. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): impact of the inter-stages course on morbi-mortality and implications for management [J]. Eur J Surg Oncol, 2015, 41(5):674-682.

[12] Wong ES, Le Guezennec X, Demidov ON, et al. p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age [J]. Dev Cell, 2009, 17 (1):142 ~ 149.

[13] 姚豫桐, 李可洲. 肝部分切除术后肝脏再生调控的研究进展 [J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18 (2):181-184.

[14] Kim TH, Mars WM, Stolz DB, et al. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration [J]. Hepatology, 2000, 31 (1):75 ~ 82.

[15] Olle EW, Ren X, McClintock SD, et al. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice [J]. Hepatology, 2006, 44(3):540-549.