

HIV-1 Tat 对人脑内皮细胞 MMP-9 蛋白的影响及作用机制*

徐瑞芬, 白 宁, 王 晖 (陕西省人民医院麻醉科, 西安 710068)

摘要:目的 探讨 HIV-1 Tat 对人脑内皮细胞基质金属蛋白-9(MMP-9)的影响及作用机制。方法 按照 Weksler's 方法分离和处理人脑血管内皮细胞。小分子干扰 RNA(siRNA)沉默 MMP-9, 根据报告的序列设计 MMP-9 的特异性 siRNA 和 Scramble II 对照, MMP-9 的活性采用明胶酶谱法检测, 进行内皮细胞渗透性检测。结果 实验结果显示, Tat 增强 MMP-9 的表达和活性, siRNA 靶向作用于 MMP-9 以减少可溶性闭锁蛋白的浓度, Tat 可以使 HBMECs 渗透性显著增强。MMP-9 干扰可以恢复 Tat 处理后细胞的完整性。结论 Tat 可以抑制闭锁蛋白的表达, 并通过增强 MMP 的表达和激活而间接破坏闭锁蛋白, 使血脑屏障(BBB)渗透性增强。

关键词:血脑屏障; Tat 蛋白; MMP-9

中图分类号: R373; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-080-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.021

Effect of HIV-1 Tat on MMP-9 Protein in Brain Endothelial Cells and Its Mechanism

XU Rui-fen, BAI Ning, WANG Hui

(Department of Anesthesia, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of HIV-1 Tat on MMP-9 protein in brain endothelial cells and its mechanism.

Methods Human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) were isolated according to Weksler's method. Silencing of MMP-9 with small interference RNA (siRNA) A siRNA specific for the MMP-9 and a Scramble II control were designed according to the reported. Activities of MMP-9 were tested by gelatin zymography. Occludin expressions were detected by western blot according to Reyes's method. Immunofluorescence staining were detected images were collected with a fluorescence microscope. Meanwhile, transendothelial permeability assays were detected. **Results** The results showed that Tat enhanced the expression and activity of MMP-9, and SiRNA targeting effected on MMP-9 in order to reduce the concentration of soluble blocking proteins. Tat could significantly enhance the permeability of HBMECs. MMP-9 interference could restore the integrity of the cells after Tat treatment. **Conclusion** Tat could inhibit the expression of the blocking protein, and through indirectly enhancing the expression and activation of MMP to destroy the blocking protein, so that the permeability of BBB is enhanced.

Keywords: blood-brain barrier; tat protein; MMP-9

人类免疫缺陷病毒(HIV-1)可以引起神经艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS), 涉及到多重且复杂的过程^[1,2]。HIV-1 感染外周和中枢神经系统(central nervous system, CNS)的细胞, 产生病毒蛋白, 包括 gp120, Tat 和 Nef, 聚集免疫细胞, 如细胞因子、趋化因子。在被 HIV-1 感染的病人体内可以观察到紧密连接被破坏^[3,4]。HIV-1 病毒和蛋白可以单独地或是与细胞因子、趋化因子一起影响血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的完整性。HIV-1 感染后, 可以观察到闭锁蛋白和 ZO-1 分裂与免疫反应性。当缺血性中风和细菌感染时, BBB 的分裂和调节是通过基质金属蛋白(MMPs)和其他机制实现的^[5,6]。本研究拟探讨 HIV-1 Tat 对人脑内皮细胞 MMP-9 的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 按照 Weksler's 方法分离和处理人脑血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMECs)。经医院伦理委员会批准并按照研究所的准则, 从癫痫患者需要行颞叶切除术者中分离 HBMECs。然后在加入 EGM-2 Single Quots 和 2 g/dl 胎牛血清的血管内皮生长培养液-2(EGM-2)中培养。细胞接种到覆盖了 1 mg/ml 的 I 型胶原蛋白的盖玻片上。在整个实验中, 细胞预先在含 1g/dl FCS 的 EGM-2 基础培养液中进行饥饿培养 2 h。

1.2 试剂与仪器 ELISA 试剂盒购自美国 Uscn Life Science 公司; 闭锁蛋白单克隆抗体试剂(E-5)购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 重组 HIV-1 分支 B 蛋白购自以色列 Prospec 公司; 硝

* 作者简介: 徐瑞芬(1975—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 脑保护, Tel: 13991131730, E-mail: 858215318@qq.com。

酸纤维素膜购自美国 Millipore 公司; Qiagen RNeasy 美国 Sigma-Aldrich 公司; Transwell 滤膜 Nunc, Roskilde, Denmark; Perkin Elmer Fusion Universal Microplate 分析仪。

1.3 实验方法

1.3.1 小分子干扰 RNA(siRNA)沉默 MMP-9: 根据报告的序列设计 MMP-9 的特异性 siRNA 和 Scramble II 对照。MMP-9 的 siRNA 为 19 个核苷酸的 5'-UACCUGUACCGCUAUGGUU-3' (19-nt), Scramble II control 为 21 个核苷酸的 5'-UUGGUAUCGCCAUGUCCA-3' (21-nt)。HBMECs 用 2 μ g/ml MMP-9-siRNA 或 Scramble II siRNA GeneSilencer siRNA 转染试剂(GeneTherapy System)转染, 根据说明书操作。转染 6 h 后, 细胞受胰蛋白酶作用, 计数并进行其他分析。

1.3.2 明胶酶谱法: MMP-9 的活性采用明胶酶谱法检测。每个样本在含 1 mg/ml 明胶的 10 g/dl 十二烷基硫酸钠明胶(SDS-PAGE)上进行非还原电泳。人纤维肉瘤细胞系(HT-1080)作为阳性对照进行凝胶电泳。分离完毕后, 十二烷基硫酸钠明胶置于 2.5 g/dl Triton X-100(3 \times 15 min)震荡洗脱, 然后将凝胶置于孵育液中(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L CaCl₂, and 0.05% (v/v) Br-j-35, pH 7.4) 37 $^{\circ}$ C, 孵育 24 h。凝胶固定, 用染色液(含 0.1 g/dl 考马斯亮蓝, 50 ml/dl 甲醇, 30 ml/dl 乙酸和两倍蒸馏水)染色 3 h。MMP-9 显示为蓝色背景上的透亮带。每条带的分子量参照已知的分子量标准(Takara, Dalian, China)。用凝胶图像分析系统 ImageQuant 软件(Amersham)分析条带的相对密度。

1.3.3 ELISA: 可溶性闭锁蛋白包被于 ELISA 板

4 $^{\circ}$ C 过夜。以 PBS/0.2 ml/dl Tween 洗涤孔 4 次, 然后以含 1 g/dl BSA 的 PBS 封闭 30 min。将可溶性闭锁蛋白按照 1:10 数量级稀释后加入 ELISA 板中, 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1 h, 以 PBS/0.2 ml/dl Tween 洗涤孔 4 次, 加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgM, 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1 h。PBS/0.2 ml/dl Tween 洗涤孔 4 次, 加入 ABTS 显色 10~15 min, 最后在 ELISA 读数仪中 450 nm 波长读数测定吸光度。

1.3.4 内皮细胞渗透性检测: 将 Transwell 小室放入培养板中, 小室内称上室, 培养板内称下室, 上室内盛装上层培养液, 下室内盛装下层培养液, 上下层培养液以聚碳酸酯膜相隔。将细胞种在上室内, 由于聚碳酸酯膜有通透性, 下层培养液中的成分可以影响到上室内的细胞, 从而可以研究下层培养液中的成分对细胞生长、运动等的影响(模型示意图见图 1)。特别注意的是, 下层培养液和小室间常会有气泡产生, 一旦产生气泡, 下层培养液的趋化作用就减弱甚至消失了, 在种板的时候要特别留心, 一旦出现气泡, 要将小室提起, 去除气泡, 再将小室放进培养板。

HBMECs 在 0.4 μ m 孔径 Transwell 滤膜(Nunc, Roskilde, Denmark)上生长, 直至完全融合后, 饥饿培养 2 h。在上端培养小室中加入 0.1 μ g/ml FITC-葡聚糖 30 min 后, 收集下层小室的样本, 并测量基础渗透率。将样品(单层细胞)分成两组: 无处理组和 HIV-1 Tat 处理组(重复三次)。下层小室的样本用于荧光检测, 并与对照组相比较。以 Perkin Elmer Fusion Universal Microplate 分析仪检测荧光, 激发波长为 492 nm, 并检测 520 nm 波长信号。

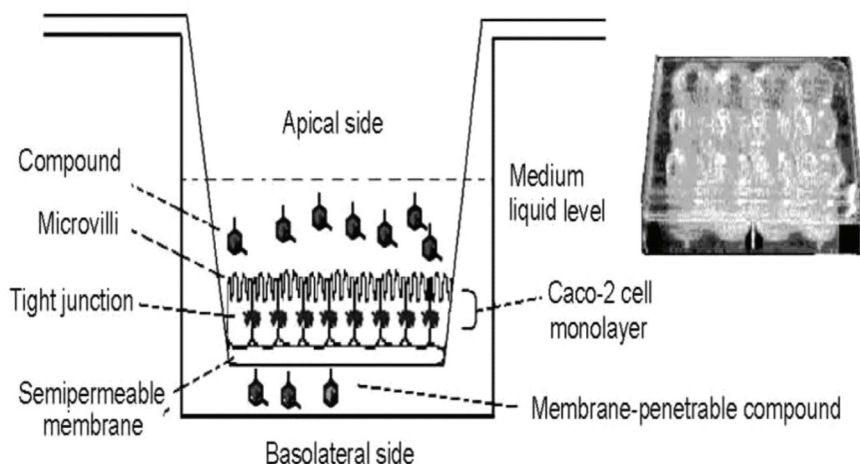


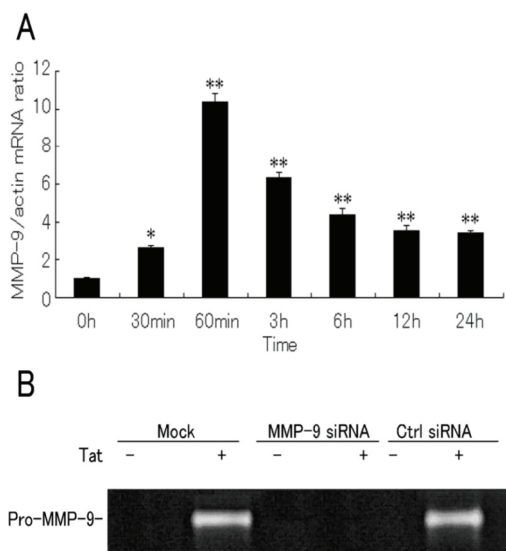
图1 Transwell 小室模型示意图

1.4 统计学分析 实验结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, n 表示实验的次数。反复测量数据采用

单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

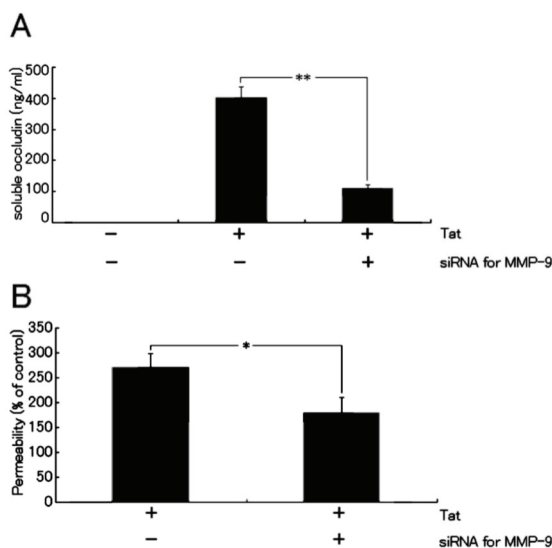
2.1 Tat 增强 MMP-9 的表达和活性 在几种细胞模型,包括单核细胞、乳腺癌细胞和星形胶质细胞,Tat 可以增强 MMP-9 的表达和活性^[2,3]。因为 HBMECs 是 BBB 的基本组成部分,那么 Tat 对基质金属肽酶的调节和接下来的血流动力学就应该讨论了。我们发现,与未处理组相比较,Tat 处理后 MMP-9 的 mRNA 水平明显增强(10 times, $P < 0.01$)(图 2 A)。进一步的实验研究发现,半定量明胶酶谱法显示,在没有刺激时几乎未发现 MMP-9 的表达,而 Tat 处理则诱发其表达(图 2 B)。



注:(A)采用实时逆转录聚合酶链反应 RT-PCR 法检测 MMP-9 mRNA,以 MMP-9 和 β -actin mRNA 之比表示;(B)明胶酶谱法检测 MMP-9 的活性。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 Tat 处理后 MMP-9 的表达和活性

2.2 siRNA 靶向作用于 MMP-9 减少可溶性闭锁蛋白的浓度 为了证实 MMP-9 是否可以持续裂解闭锁蛋白,我们检测了 MMP-9 的表达和可溶性闭锁蛋白浓度间的关系。在未处理组,用 ELISA 试剂盒检测可溶性闭锁蛋白的浓度十分敏感。在 Tat 处理 48 h 后,可溶性闭锁蛋白的浓度大约为 400 pg/ml。为了判断 MMP-9 对可溶性闭锁蛋白的浓度的影响,我们转染了 50 nmol/L MMP-9 siRNA 进入 HBMECs,可溶性闭锁蛋白的浓度减少到了 73%(图 3 A)。同时,HBMECs 和 Tat 一同培养 48 h,与基础值相比,渗透性显著的增强。MMP-9 干扰可以恢复 Tat 处理后细胞的完整性(图 3B)。



注:(A)ELISA 法测量可溶性闭锁蛋白的含量;(B)单层 HBMECs 的渗透率。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。与对照组相比,* $P < 0.01$ 。

图 3 MMP-9 对闭锁蛋白的影响

3 讨论 以往的研究证实,HIV-1 蛋白处理后,通过调节紧密连接组成成分的表达和分布,可以增加内皮细胞的通透性^[7,8]。

关于 Tat 对闭锁蛋白的调节还存在几种争议。Nagel 等^[9]应用 Tat 的外显子(Tat1~72),证实其对闭锁蛋白的总量水平没有调节作用。然而,在他的其他研究中又发现,Tat1~72 可以降低闭锁蛋白的表达。Nagel 和他的同事发现 Tat 可以与 G-蛋白耦合受体如 VEGFR-2 相互作用。这些细胞表面受体的激活可以刺激小的 GTPases 包括 Ras 及其下游激酶的激活,最终闭锁蛋白的表达明显降低。一项体外视网膜上皮细胞试验证实,Tat 可以通过 ERK1/2 和 NF- κ B 通路改变紧密连接蛋白的表达^[10]。此外,还发现 Tat 可以明显提高 GTP-RhoA 的表达水平^[11]。几种刺激物,包括内皮单核激活多肽(endothelial-monocyte-activating polypeptide EMAP II)、脂多糖(LPS)、缓激肽(BK)、阿米巴和 TNF- α 等,均通过 RhoA/ROCK 信号转导途径影响闭锁蛋白的表达和组装^[12,13]。我们也首次证实了 Tat 通过 RhoA/ROCK 途径降低闭锁蛋白的表达。

MMPs 是由锌肽链内切酶家族组成的,其广泛分布于几乎所有哺乳动物的中枢神经系统(CNS)。神经认知障碍(HAND)的过程中,几种 MMPs 如 MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 均表达升高并激活^[14,15]。这些成员中,MMP-9 是神经 AIDS 发病机制的重要因素。已经证实,Tat 在其他细胞模型而不是 HBMECs 可以诱导 MMP-9 的表达。本实验证明,Tat 在 HBMECs 可以诱导 MMP-9 的表达和激活。

(下转 86 页)

所占比例,发现联合突变组高于其他组,ADV组高于LAM组和ETV组,这与几类药物耐药屏障的高低有关,也与临床用药进程一致。耐药屏障最高的ETV耐药患者发生的病毒反跳弱于其他组。ADV作为LAM耐药患者的挽救治疗药物,当它发生耐药后,病毒的复制将更难抑制,这也提示我们,经验性加用或未经突变检测便滥用药物会引起治疗失败甚至无药可用^[7]。

我们的研究对慢性乙肝患者服药NA药物后体内病毒的碱基突变状态作了统计,并将它们与临床生化指标的相关关系进行探究,了解到HBV RT基因突变与患者临床状态存在关联。这意味着乙肝病毒逆转录酶基因突变的检测对临床用药和患者临床状态的预测具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Nebbia G, Peppia D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges[J]. Quarterly Journal of Medicine, 2012, 105(2): 109-113.
- [2] Tong MJ, Pan CQ, Hann HW, et al. The management of chronic hepatitis B in Asian Americans[J]. Diges-

tive Diseases and Sciences, 2011, 56(11): 3143-3162.

- [3] Devi U, Locarnini S. Hepatitis B antivirals and resistance[J]. Current Opinion in Virology, 2013, 3(5): 495-500.
- [4] Chen LP, Zhao J, Du Y, et al. Antiviral treatment to prevent chronic hepatitis B or C-related hepatocellular carcinoma[J]. World Journal Virology, 2012, 1(6): 174-183.
- [5] Fan J, Zhang Y, Xiong H, et al. Nucleotide analogue-resistant mutations in hepatitis B viral genomes found in hepatitis B patients[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(pt3): 663-670.
- [6] Michailidis E, Kirby KA, Havhiya a, et al. Antiviral therapies: Focus on hepatitis B reverse transcriptase[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2012, 44(7): 1060-1071.
- [7] 古丽娣, 张丹, 曾惠玲. 核苷(酸)类似物治疗引起乙肝病毒耐药相关基因位点突变的总结分析[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(1): 122-123, 126.

Gu LD, Zhang D, Zeng HL. Summative analysis of drug resistance genetic mutation on nucleotide (acid) analog anti-HBV[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(1): 122-123, 126.

收稿日期: 2016-01-18

修回日期: 2016-03-13

(上接 82 页)当 MMP-9 的表达特异性抑制时, Tat 处理可引起渗透性增强, 可溶性闭锁蛋白浓度降低。

因此, 本实验得出的结论是 Tat 通过增强 MMP 的表达和激活而间接破坏闭锁蛋白, 从而破坏 BBB 的完整性, 使 BBB 渗透性增强。

参考文献:

- [1] Lin CJ, Chang YA, Lin YL, et al. Preclinical effects of honokiol on treating glioblastoma multiforme via G1 phase arrest and cell apoptosis[J]. Phytomedicine, 2016, 23(5): 517-527.
- [2] Wen J, Doerner J, Chalmers S, et al. B cell and/or autoantibody deficiency do not prevent neuropsychiatric disease in murine systemic lupus erythematosus[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 73.
- [3] Castro V, Bertrand L, Luethen M, et al. Occludin controls HIV transcription in brain pericytes via regulation of SIRT-1 activation[J]. FASEB J, 2016, 30(3): 1234-1246.
- [4] Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier[J]. FEBS J, 2015, 282(21): 4067-4079.
- [5] Wang Y, Jin S, Sonobe Y, et al. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110024.
- [6] Hall CN, Reynell C, Gesslein B, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease[J]. Nature, 2014, 508(7494): 55-60.
- [7] Sardo L, Vakili PR, Elbezanti W, et al. The inhibition of microRNAs by HIV-1 Tat suppresses beta catenin activity in astrocytes[J]. Retrovirology, 2016, 13(1): 25.
- [8] Atluri Venkatas SR. Editorial: HIV and Illicit Drugs

of Abuse[J]. Front Microbiol, 2016(7): 221.

- [9] Nagel S, Heinemann PV, Heiland S, et al. Selective MMP-inhibition with Ro 28-2653 in acute experimental stroke—a magnetic resonance imaging efficacy study[J]. Brain Res, 2011, 1368(1): 264-270.
- [10] Huang W, Yang F, Li Y, et al. Anti-tumor effects in mice induced by Bcl-2 targeted siRNA delivered by TAT-g-CS vector[J]. J Control Release, 2015(213): e109-110.
- [11] Kaneai N, Sumitani K, Fukui K, et al. Tocotrienol improves learning and memory deficit of aged rats[J]. J Clin Biochem Nutr, 2016, 58(2): 114-121.
- [12] Alqahtani MF, Smith CM, Weiss SL, et al. Evaluation of new diagnostic biomarkers in pediatric sepsis: matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, mid-regional pro-atrial natriuretic peptide, and adipocyte fatty-acid binding protein[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153645.
- [13] Mieszalo K, fawicki S, Szmikowski M. The utility of metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in diagnostics of gynecological malignancies[J]. Pol Merkur Lekarski, 2016, 40(237): 193-197.
- [14] Bae MJ, Karadeniz F, Lee SG, et al. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 activities by limonium tetragonum extract[J]. Prev Nutr Food Sci, 2016, 21(1): 38-43.
- [15] 李红霞, 国汉邦, 周伟燕, 等. 血清高、低密度脂蛋白胆固醇标准物质的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 10-13.

Li HX, Guo HB, Zhou WY, et al. Preparation of serum reference materials for high- and low- density lipoprotein cholesterol[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(4): 10-13.

收稿日期: 2016-05-01

修回日期: 2016-06-13