

## IV 型胶原酶与动脉粥样硬化

孙红霞

温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 石家庄 050017)

**摘要** IV 型胶原酶作为基质金属蛋白酶家族成员之一, 可降解基底膜的主要结构成分—IV 型胶原, 在血管平滑肌细胞穿过细胞外基质从中膜向内膜迁移过程中起重要作用。本文介绍 IV 型胶原酶的结构、生理功能、基因表达和活性调节, 通过分析生长因子和细胞因子对该酶基因转录的影响, 探讨血管内膜损伤引发细胞外基质结构重建的分子机制, 并讨论该酶在动脉粥样硬化和血管再狭窄发生中的意义。

**关键词** IV 型胶原酶; 动脉粥样硬化; 血管再狭窄

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是分解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的蛋白酶类的总称, 其活性依赖于  $Zn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  离子。对基质金属蛋白酶的研究始于 80 年代初期, 近年来随着对该酶参与血管新生内膜形成及肿瘤细胞浸润过程的发现, 该酶家族也日益受到人们的关注。目前已发现的基质金属蛋白酶有十二种<sup>[1,2]</sup>, 根据其降解底物的不同可归为四类: 间质胶原酶、IV 型胶原酶 (明胶酶)、基质分解素类 (溶基质素类) 和新命名的膜型基质金属蛋白酶。在四类基质金属蛋白酶中, IV 型胶原酶与心血管疾病的关系最为密切。本文就 IV 型胶原酶的结构、生理功能、基因表达调节及其与动脉粥样硬化和血管再狭窄的关系作一综述。

### 1 IV 型胶原酶的结构及生理功能

#### 1.1 IV 型胶原酶的结构特点

IV 型胶原酶包括两个成员: 72 kDa IV 型胶原酶 (MMP<sub>2</sub>, 又称明胶酶 A) 和 92 kDa IV 型胶原酶 (MMP<sub>9</sub>, 又称明胶酶 B)。两者均已被纯化, 其基因结构也已清楚<sup>[3,4]</sup>。MMP<sub>2</sub> 的 DNA 总长为 32 kb, 包括 27 kb 结构基因, 0.4 kb 5' 端和 4.5 kb 3' 端非编码区。MMP<sub>9</sub> 的 DNA 总长约 26 kb, 包括 7.7 kb 结构基因, 15 kb 5' 端和 3.5 kb 3' 端非编码区。两者结构基因部分均含 13 个外显子及 12 个内含子, 其中, 外显子 5~7 所编码的序

列与纤连蛋白分子中的胶原结合区一致。MMP<sub>2</sub> 和 MMP<sub>9</sub> 5' 端转录调控区内不含 TATA 盒及 CAAT 盒, 但在 MMP<sub>2</sub> 的 -89 和 -69 位及 MMP<sub>9</sub> 的 -29~-25 位有 GC 盒存在, 后者为转录因子 SP<sub>1</sub> 结合位点。另外, MMP<sub>9</sub> 的 -533~-527 位和 -79~-73 位含有两个 TPA 反应元件 (TRE), 这是转录因子激活蛋白-1 (AP-1) 结合位点, MMP<sub>2</sub> 启动子区域中缺乏此序列, 而在 +157 位第 1 外显子中含转录因子激活蛋白-2 (AP-2) 结合位点。MMP<sub>9</sub> 的 -474~-465 位含 GGT TTGGGGA 序列, 这与转化生长因子- $\beta_1$  抑制元件 (TIE) 序列 GN-NTTGGNGN 相一致。由此可见, MMP<sub>2</sub> 和 MMP<sub>9</sub> 是由不同基因编码的, 其主要差别在转录调控区, 因此决定了两种基因的转录调控方式存在差异。

IV 型胶原酶与其它基质金属蛋白酶家族成员一样, 由三个结构域组成, 即氨基端结构域、金属离子结合结构域和羧基端结构域。MMP<sub>2</sub> 和 MMP<sub>9</sub> 在氨基酸序列上密切相关: ①它们都存在一个由约 80 个氨基酸残基组成的前肽, 其中含有与其激活有关的高度保守序列 PRCGVPDV; ②都含有高度保守的锌结合位点; ③羧基端序列与血凝酶相似; ④都含有由 58 个氨基酸组成的明胶结合区, 其序列与纤连蛋白的胶原结合区相似。另外, 两者不同的是 MMP<sub>9</sub> 分子中还有一段富含脯氨酸的区域, 该区域由 54 个氨基酸组成, 位于锌结合区和血凝酶相似区之间。

#### 1.2 IV 型胶原酶的生理功能

IV 型胶原酶的作用特点如下: ①在中性 pH 值条件下, 需要有内源性  $Zn^{2+}$  和外源性  $Ca^{2+}$  存在才能发挥活性; ②其活性可被螯合剂或基质金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 所抑制; ③两者均以无活性的前体形式分泌, 经蛋白酶水解或在有机汞如 4-醋酸氨基苯汞 (4-aminophenylmercuric acetate, APMA) 作用下而激活。

MMP<sub>2</sub> 可由皮肤成纤维细胞、体外培养的人黑素瘤细胞 A<sub>2058</sub>、人纤维肉瘤细胞 HT-1080 等合成与分泌, 氨基端裂解掉 80 个氨基酸后被激活, 活化后分子

量为 66 kDa 或 62 kDa, 可降解明胶、I、V、VII、X 型胶原和纤维连接蛋白, 但不能降解间质胶原(I、II、III 型)、蛋白多糖或层粘连蛋白。MMP<sub>2</sub> 降解 IV 型胶原分子中对胃蛋白酶抵抗的片段, 其作用位点为甘氨酸-亮氨酸和甘氨酸-异亮氨酸组成的肽键<sup>[5]</sup>。MMP<sub>9</sub> 主要由中性粒细胞和巨噬细胞合成与分泌。近来研究表明, SV<sub>40</sub> 转化的成纤维细胞<sup>[6]</sup>、纤维母细胞瘤细胞株及上皮胶质细胞也可分泌 MMP<sub>9</sub>, 它以前酶原(78 kDa~82 kDa)的形式被合成, 含有一个由 19 个氨基酸组成的信号肽, 裂解掉信号肽, 多肽糖基化而变成 95 kDa 的酶原形式, 该酶原裂解掉氨基端 73 个氨基酸后产生其活化形式(84 kDa)。MMP<sub>9</sub> 的底物特异性与 MMP<sub>2</sub> 几乎完全相同, 但前者对完整的基底膜具有降解作用。

## 2 IV 型胶原酶基因表达及活性调节

### 2.1 转录调节

多种生长因子和细胞因子可通过单独作用或协同作用调节 IV 型胶原酶基因转录。这些因子对 MMP<sub>2</sub> 和 MMP<sub>9</sub> 的调节并不一致, 且其作用具有种属特异性。Fabunmi 等<sup>[7]</sup>证明佛波酯、胎牛血清和凝血酶单独作用可使兔主动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)中 MMP<sub>9</sub> 表达增加, 但这些因素对 MMP<sub>2</sub> 基因表达无影响。PDGF 或 IL-1 $\alpha$  单独作用对 IV 型胶原酶基因表达无影响, 但两者协同作用可使 MMP<sub>9</sub> 分泌增加。转化生长因子- $\beta$  可诱导一些细胞表达 MMP<sub>9</sub>, 但在兔平滑肌细胞其单独作用对 MMP<sub>9</sub> mRNA 无影响, 加入 PDGF 可轻度诱导其表达。另外, TGF $\beta$  还可增加人成纤维细胞和大鼠骨细胞原代培养基中 MMP<sub>2</sub> 的水平<sup>[8]</sup>。Hane-maaijer 等<sup>[9]</sup>的研究表明, 肿瘤生长因子- $\alpha$  和 IL-1 $\alpha$  可促进人平滑肌细胞分泌 MMP<sub>9</sub>, 但不改变 MMP<sub>2</sub> 的 mRNA 水平。肝素可抑制猩猩主动脉平滑肌细胞 MMP<sub>9</sub> 的分泌<sup>[10]</sup>。

生长因子和细胞因子的作用机制较复杂, 近年来的研究发现, 一些生长因子的作用是通过诱导原癌基因 *c-fos* 和 *c-jun* 的表达来实现的。后者作为反式作用因子通过与顺式元件 TRE 或 AP-1 结合位点相结合, 促进基因转录<sup>[2]</sup>。已经证明, 白细胞介素-1 $\beta$ 、肿瘤生长因子- $\alpha$  和转化生长因子- $\beta$  等对基质分解素和间质胶原酶基因表达的调控均与诱导 *c-fos* 和/或 *c-jun* 表达有关<sup>[2,11]</sup>。生长因子和细胞因子对 IV 型胶原酶的基因调控机制是否与此有关尚待进一步研究。

### 2.2 转录后调节

机体对 IV 型胶原酶基因的转录后调节表现为酶原活化和酶活性调节两方面。

2.2.1 酶原活化 基质金属蛋白酶的活化过程与半胱氨酸转换有关<sup>[12]</sup>。在基质金属蛋白酶家族成员的氨基端结构域所含有的高度保守序列 PRCGVPDV 内有一半胱氨酸残基, 它通过与位于催化部位的锌原子相互作用而使酶处于非活化状态。有机汞或蛋白酶水解作用通过影响基质金属蛋白酶前体中的锌原子与半胱氨酸残基的相互作用而激活此酶。

2.2.2 酶活性调节 分泌基质金属蛋白酶的细胞同时也分泌 TIMP。目前已发现的 TIMP 有 TIMP-1、TIMP-2 和 TIMP-3 三种, 前两种的性质及 mRNA 序列已被阐明<sup>[13,14]</sup>。TIMPs 与 IV 型胶原酶原以酶原/抑制剂复合物的形式分泌<sup>[15~18]</sup>, 此复合物为非共价结合, 在 SDS 存在的情况下很不稳定。已经证明, TIMP-2 可与活化型和酶原型两种 MMP<sub>2</sub> 结合而发挥双重抑制作用, 即一方面与 MMP<sub>2</sub> 原结合防止酶原的激活, 另一方面与被活化的 MMP<sub>2</sub> 结合使其失去活性。TIMP-1 可与 MMP<sub>9</sub> 形成复合物, 目前认为其仅与活化型 MMP<sub>9</sub> 结合。值得注意的是, 许多调节 MMPs 基因表达的生长因子和细胞因子同样可调节 TIMPs 的基因表达。机体通过调节 MMPs 及其抑制剂的相对含量来控制细胞外基质的组成。

## 3 IV 型胶原酶与动脉粥样硬化及血管再狭窄

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和血管成形术所造成的血管内膜损伤可引起平滑肌细胞由中膜向内膜迁移及增殖。血管内膜受损后, 循环细胞和损伤部位的血管壁释放一些生长因子和细胞因子, 它们不仅作为平滑肌细胞的分裂原和化学趋化剂调控细胞迁移与增殖, 而且还可引起细胞外基质重构。目前认为 MMPs 是细胞外基质转化所需的主要物质, 其中 MMP<sub>2</sub> 是血管壁细胞表达和分泌的最主要的基质金属蛋白酶, 它可高效降解基底膜的主要成分—IV 型胶原, 对平滑肌细胞穿过细胞外基质第一道屏障尤其重要。已证明, 牛、大鼠、猩猩、猪和人平滑肌细胞均可释放 IV 型胶原酶和其他 MMPs。

### 3.1 IV 型胶原酶与动脉粥样硬化

目前认为, 平滑肌细胞迁移和增殖是导致内膜增厚及动脉粥样硬化斑块形成的关键。动脉粥样硬化斑块形成的最早事件之一是循环中的单核细胞和血小板粘附于损伤部位的内膜下或内膜下组织, 并释放大

的细胞因子和生长因子如 IL-1、肿瘤生长因子- $\alpha$ 、PDGF 等。这些细胞因子一方面刺激平滑肌细胞增殖并分泌大量的细胞外基质,另一方面又刺激平滑肌细胞和内皮细胞合成 MMPs 以促进细胞迁移。由于细胞增殖和细胞外基质的沉积与由 MMPs 所引起的基质降解之间失去平衡,最终导致斑块的形成。因此动脉粥样硬化斑块的形成过程实际上就是基质的重建过程。Pauly 等<sup>[19]</sup>用离体实验证明 MMP<sub>2</sub> 是平滑肌细胞通过基底膜屏障所必须的,另外还发现细胞必须处于活跃的增殖状态下才能穿过基底膜。对人正常动脉组织和动脉粥样硬化斑块组织中 MMPs 的表达检测表明,正常平滑肌细胞有 N 型胶原酶、TIMP-1、TIMP-2 的表达但无活性,动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞和巨噬细胞中的基质蛋白酶、间质胶原酶和 N 型胶原酶表达增多,且具有降解基质的活性。另外,覆于斑块上的内皮细胞与其它部位的内皮细胞不同,它们也具有表达 N 型胶原酶的活性<sup>[20]</sup>。临床研究证实,不稳定心绞痛病人斑块组织中的 MMP<sub>9</sub> 含量较稳定型心绞痛病人明显增高<sup>[21]</sup>,说明斑块局部 MMPs 表达增多可能是斑块不稳定的生化基础。

### 3.2 N 型胶原酶与血管再狭窄

血管成形术后再狭窄是血管内膜损伤后中层平滑肌细胞向内膜迁移及在损伤部位过度增殖并大量分泌细胞外基质所造成的,是血管壁机械损伤后伤口愈合修复过度的结果。胶原是细胞外基质的主要成分,占其干重的 20%~50%。以往研究表明,基质金属蛋白酶在调节胶原转化和聚集中起重要作用<sup>[22]</sup>。动物实验显示,血管内膜机械损伤后平滑肌细胞中 MMPs 表达增加。Bendeck 等<sup>[23]</sup>证明,用球囊对大鼠颈动脉内膜进行剥脱后第一天 MMP<sub>9</sub> 表达活性增高,第 4~5 天 MMP<sub>2</sub> 表达增加,其表达时程与平滑肌细胞迁移相一致,表明 MMP<sub>2</sub> 和 MMP<sub>9</sub> 参与动脉损伤后的组织重塑和新生内膜的形成过程。另外,Southgate 等<sup>[24]</sup>发现,猪冠脉球囊损伤后第 3 天 MMP<sub>9</sub> 活性增加,第 7 天 MMP<sub>2</sub> 增多,并且两酶的活性升高持续至第 21 天。应用 MMPs 抑制剂可使平滑肌细胞向内膜迁移减少 97%。用家兔进行实验也显示,血管内膜损伤后即刻胶原合成和降解速度即明显增加,其高峰发生于损伤后第 7 天,MMPs 抑制剂可减少胶原的合成和降解<sup>[22]</sup>。MMPs 抑制剂具有抑制胶原转化之功效的发现,为防止血管成形术后再狭窄展现出新的前景。

综上所述,N 型胶原酶参与平滑肌细胞迁移和基质重构过程,在心血管疾病发生发展过程中发挥重要

作用。应用 MMPs 抑制剂可能有助于防治动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄及心脏和血管移植后的血管闭塞问题。但目前对 MMPs 及其抑制剂的认识以及两者在临床应用方面的许多问题尚待进一步研究。

### 参考文献

- 1 Baramova E, Foidart JM. Matrix metalloproteinase family. *Cell Biol Int*, 1995, **19**(3): 239~242.
- 2 Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genetics*, 1990, **6**(4): 121~125.
- 3 Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type N collagenase gene. *J Biol Chem*, 1991, **266**(19): 11 077~082.
- 4 Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, et al. Complete structure of the human gene for 92 kDa type N collagenase. *J Biol Chem*, 1991, **266**(25): 16 485~490.
- 5 Fessler LT, Duncan KG, Fessler JH. Characterization of the procollagen N cleavage products produced by a special tumor collagenase. *J Biol Chem*, 1984, **259**(15): 9 783~789.
- 6 Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, et al. SV<sub>40</sub>-transformed human lung fibroblasts secrete a 92 kDa type N collagenase which is identical to that secreted by normal macrophages. *J Biol Chem*, 1989, **264**(29): 17 213~221.
- 7 Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, et al. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J*, 1996, **315**(1): 335~342.
- 8 Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72 kDa gelatinase/type N collagenase by transforming growth factor- $\beta$ 1 in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 1991, **266**(21): 14 064~071.
- 9 Hanemaaijer R, Koolwijk P, Clercq LL, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells: effects of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J*, 1993, **296**(3): 803~809.
- 10 Kenagy RD, Nikkari ST, Welgus HG, et al. Heparin inhibits the induction of three matrix metalloproteinases (stromelysin, 92 kDa gelatinase, and collagenase) in primate arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1994, **93**(5): 1 987~993.
- 11 Brenner DA, O'Hara M, Angel P, et al. Prolonged activation of Jun and collagenase genes by tumor necrosis

factor-alpha. *Nature*, 1989, **337**(6208): 661 ~ 663.

12 Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, et al. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinase and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry*, 1990, **29**(24): 5 783~789.

13 Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). *J Biol Chem*, 1989, **264**(29): 17 374~378.

14 Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenase inhibitors. *J Biol Chem*, 1983, **258**(20): 12 252 ~264.

15 Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem*, 1991, **266**(20): 13 064~069.

16 Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, et al. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(21): 8 207~211.

17 Howard EW, Banda MJ. Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinases. *J Biol Chem*, 1991, **266**(27): 17 972~977.

18 Fridman R, Fuerst TR, Bird RE, et al. Domain structure of human 72 kDa gelatinase/type IV collagenase. *J Biol Chem*, 1992, **267**(22): 15 398~405.

19 Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Cir Res*, 1994, **75**(1): 41~54.

20 Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1994, **94**(6): 2 493~503.

21 Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, et al. Identification of 92 kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions; association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*, 1995, **91**(8): 2 125~131.

22 Strauss BH, Robinson R, Batchelor WB, et al. In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases. *Cir Res*, 1996, **79**(3): 541~549.

23 Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, et al. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Cir Res*, 1994, **75**(3): 539~545.

24 Southgate KM, Fisher M, Banning AP, et al. Upregulation of basement membrane degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries. *Cir Res*, 1996, **79**(6): 1 177~187.

(1998-03-23 收稿, 1998-07-20 修回. 编辑: 朱雯霞)

构成单位因数的词头

所表示的因素	词头名称	词头符号	所表示的因素	词头名称	词头符号
10 <sup>18</sup>	艾[可萨]	E	10 <sup>-3</sup>	毫	m
10 <sup>15</sup>	拍[它]	P	10 <sup>-6</sup>	微	μ
10 <sup>12</sup>	太[拉]	T	10 <sup>-9</sup>	纳[诺]	n
10 <sup>9</sup>	吉[咖]	G	10 <sup>-12</sup>	皮[可]	p
10 <sup>6</sup>	兆	M	10 <sup>-15</sup>	飞[母托]	f
10 <sup>3</sup>	千	k	10 <sup>-18</sup>	阿[托]	a