

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-01-0010-04

氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞 基质金属蛋白酶-2和9表达的影响

刘虹彬, 温进坤, 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 肌, 平滑, 血管; 脂蛋白, 低密度; 金属蛋白酶; 基因表达; 大鼠

[摘要] 为探讨氧化型低密度脂蛋白致动脉粥样硬化的作用是否与基质金属蛋白酶表达活性改变有关, 应用 Northern blot、Dot blot、Western blot 和明胶酶图分析方法观察氧化型低密度脂蛋白对体外培养的大鼠血管平滑肌细胞表达基质金属蛋白酶-2和9的影响。结果显示, 10 mg/L 氧化型低密度脂蛋白作用于血管平滑肌细胞 24 h, 可明显增强基质金属蛋白酶-2和9 mRNA 表达、蛋白分泌和酶的活性, 高浓度的氧化型低密度脂蛋白对基质金属蛋白酶-2和9表达的影响不同, 氧化型低密度脂蛋白浓度为 50 mg/L 时, 基质金属蛋白酶-9 表达活性仍然高于对照细胞, 但与 10 mg/L 氧化型低密度脂蛋白的作用强度无显著差别; 相同条件下, 基质金属蛋白酶-2 的基因表达和蛋白分泌明显降低。以上结果提示, 氧化型低密度脂蛋白可诱导血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2和9的表达, 并可促进细胞外基质降解。

[中图分类号] Q513.5

[文献标识码] A

Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein on Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and 9 in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Hong-Bin, WEN Jin-Kun, and HAN Mei

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

MeSH Muscle, Smooth, Vascular; Lipoprotein, LDL; Metalloproteinase; Gene Expression; Rat

ABSTRACT **Aim** To examine the effects of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMCs), and explore the relation between the migration and proliferation of VSMCs and the expression activity of these two genes. **Methods** Northern blot, Dot blot, Western blot and SDS-PAGE containing gelatin were used to detect MMP-2 and MMP-9 mRNA expression, protein synthesis and enzyme activities. **Results** The mRNA expressions, protein levels and enzyme activities of MMP-2 and MMP-9 significantly increased after VSMCs were stimulated by 10 mg/L ox-LDL for 24 h. When the concentration of ox-LDL were enhanced to 50 mg/L, different effects were exerted on MMP-2 and MMP-9. The levels of MMP-9 were still higher than control group and as the same as the group of 10 mg/L ox-LDL. However, the expression of MMP-2 decreased markedly at the same condition. **Conclusion** Ox-LDL could increase the expression activities of MMP-2 and MMP-9 and the degradation of ECM.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 迁移和增殖是导致血管内膜增厚和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块形成的重要原因。近年发现, VSMC 迁移和增殖在造成 VSMC 数量和分布发生变化的同时, 还大量分泌与合成细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和基质金属蛋白酶 (matrix

metalloproteinase, MMP), 后者通过降解 ECM 又可进一步促进 VSMC 迁移和增殖^[1]。业已证明, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是刺激 VSMC 迁移和增殖的重要因素之一, 在 As 发生发展过程中占有重要地位^[2,3], 但 ox-LDL 的致动脉粥样硬化作用是否与诱导 VSMC MMP 表达活性改变有关却少有报道。本文观察 ox-LDL 对降解血管组织 ECM 主要成分——Ⅲ型胶原的 MMP-2 (明胶酶 A) 和 MMP-9 (明胶酶 B) 表达的影响, 以进一步揭示 ox-LDL 引发 As 的分子机制。

[基金项目] 国家自然科学基金 (39770312) 及河北省自然科学基金 (398284)

[作者简介] 刘虹彬, 女, 1970 年出生, 在读博士生。温进坤, 男, 1954 年出生, 教授, 博士生导师。韩梅, 女, 1961 年出生, 教授, 博士生导师。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供, M199 培养基为 GIBCO 公司产品, 小牛血清(NCS)为本室自制, MMP- 2 和 MMP- 9 cDNA 为本室保存, α - 32 P- dCTP 系北京亚辉生物医学公司产品, 核酸随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品, 抗 MMP- 2 和 MMP- 9 抗体、兔抗羊免疫球蛋白及 ECL 试剂盒均购自北京中山生物技术公司, 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

按文献[4]报道的一次性密度梯度超速离心法分离人血清 LDL。提取液经透析后浓缩至蛋白含量为 1 g/L, 以 10 μ mol/L CuSO₄ 于 37 °C 氧化 24 h, 氧化后的 LDL(ox- LDL) 经透析除去 Cu²⁺, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳及苏丹黑染色进行鉴定, 微孔滤膜过滤除菌, 4 °C 保存备用。

1.3 大鼠血管平滑肌细胞的培养

取 6 周龄 SD 大鼠胸腹主动脉, 按贴块法分离、培养 VSMC, 0.25% 胰酶消化传代, 实验选用第 4~ 8 代细胞。

1.4 Northern blot 分析

待细胞生长至 80% 融合时无血清饥饿培养 24 h, 加入 ox- LDL 至终浓度分别为 10 mg/L 和 50 mg/L, 继续培养 24 h, 以相同浓度的天然低密度脂蛋白(n- LDL) 为对照。采用 AGPC 一步法从各组细胞提取总 RNA, 各取 30 μ g, 经 1% 琼脂糖- 甲醛变性凝胶电泳分离后, 转移至尼龙膜上, 80 °C 固定 2 h, 在甲酰胺杂交体系中与 α - 32 P- dCTP 标记的 MMP- 2 cDNA 探针进行杂交, 按常规方法洗膜后, 于 - 70 °C 放射自显影 72 h。

1.5 Dot blot 分析

将 RNA 用变性样品液进行梯度稀释后, 分别点加 5、10 和 20 μ g RNA 于硝酸纤维素膜上, 80 °C 固定 2 h, 与 α - 32 P- dCTP 标记的 MMP- 9 cDNA 探针进行杂交。

1.6 Western blot 分析

血管平滑肌细胞被不同浓度 ox- LDL 或 n- LDL 刺激 24 h, 各取其培养液 20 μ L, 经 8% SDS- PAGE 后, 转移到硝酸纤维素膜上, 4 °C 封闭过夜。与抗 MMP- 2 或 MMP- 9 抗体及兔抗羊二抗室温反应 1~ 2 h, 利用 ECL 试剂盒对反应产物进行检测。

1.7 基质金属蛋白酶- 2 和 9 的酶图分析

按文献[5]所报道的方法用含明胶的 SDS-

PAGE 检测 MMP- 2 和 MMP- 9 活性。分离胶浓度为 8% (含 0.2% 明胶), 浓缩胶浓度为 5%。取不同条件刺激的细胞培养液 20 μ L, 120 V 恒压电泳 2~ 2.5 h, 凝胶经 2.5% Triton X- 100 漂洗两次后, 加入反应缓冲液(50 mmol/L Tris- HCl, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 1% Triton X- 100), 37 °C 孵育 9 h, 0.5% 考马斯亮兰染色 1.5~ 2 h, 脱色液(10% 乙酸- 40% 甲醇)脱色至蓝色背景下白色条带清晰可见。

用 Kodak 1D 图像分析系统对 Northern blot、Dot blot、Western blot 及明胶酶图实验结果进行扫描分析。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白的鉴定

如图 1(Figure 1) 所示, n- LDL 经氧化修饰后, 因所带负电荷增多, 其电泳迁移率明显大于 n- LDL, 表明本实验所制备的 ox- LDL 符合要求。

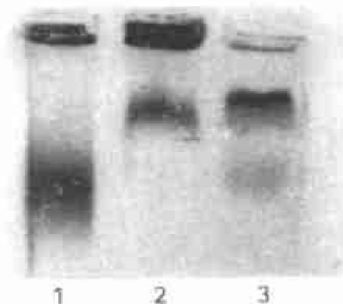


图 1 低密度脂蛋白的琼脂糖凝胶电泳图谱

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of lipoprotein samples.

1: ox- LDL, 2: n- LDL, 3: normal serum

2.2 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶- 2 和 9 mRNA 表达的影响

Northern 和 Dot blot 分析结果显示, VSMC 被 10 mg/L ox- LDL 处理 24 h 后, 其 RNA 与 MMP- 2 和 MMP- 9 cDNA 探针杂交信号比对照及 n- LDL 处理的细胞明显增强; 当浓度升高到 50 mg/L 时, MMP- 9 杂交信号依然较强, 而 MMP- 2 的反而减弱(图 2, Figure 2)。经光密度扫描对杂交信号进行定量分析的结果表明, 被 10 mg/L ox- LDL 处理的细胞, 其 MMP- 2 和 MMP- 9 mRNA 表达比对照细胞增加近 1 倍。MMP- 2 杂交区带位于 28S 和 18S rRNA 之间, 与文献[6]报道的 MMP- 2 mRNA 长度一致。n- LDL 对 MMP- 2 和 MMP- 9 基因表达无显著影响。

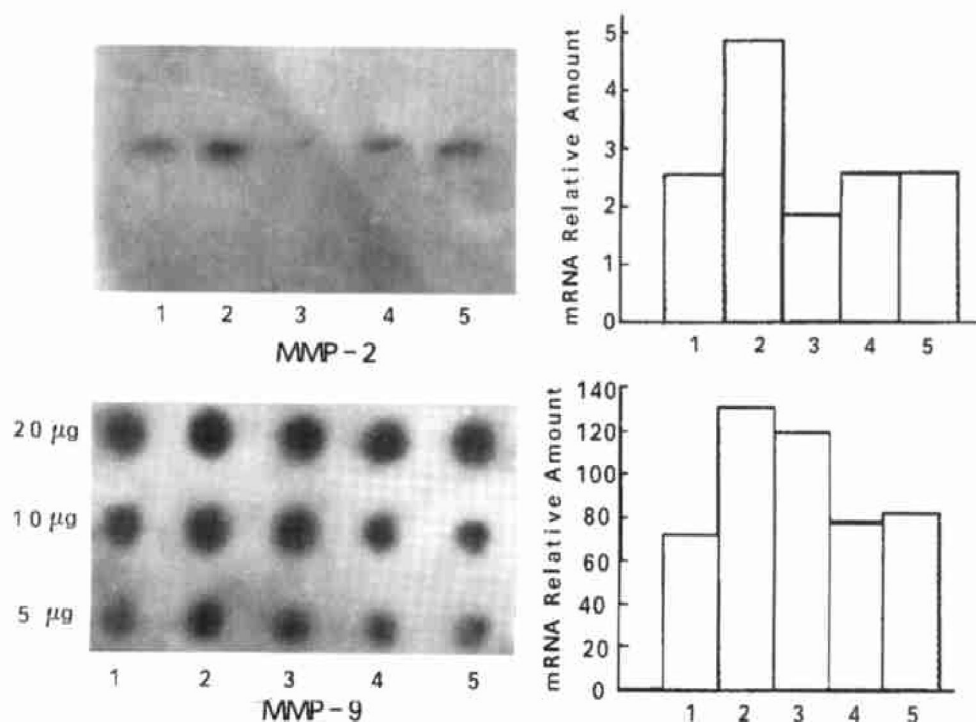


图2 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2和9 mRNA表达的放射自显影(左)和密度扫描分析(右)

Figure 2 Effects of ox-LDL on MMP-2 and MMP-9 mRNA. Left: autoradiogram; Right: densitometric scanning (10 μ g/Dot). 1: control; 2: 10 mg/L ox-LDL; 3: 50 mg/L ox-LDL; 4: 10 mg/L n-LDL; 5: 50 mg/L n-LDL

2.3 氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2和9含量的影响

Western blot 分析结果(图3, Figure 3)表明, VSMC 经 10 mg/L ox-LDL 处理 24 h 后, 细胞培养液中 MMP-2 和 MMP-9 含量比对照及 n-LDL 处理

的细胞明显升高; 当浓度为 50 mg/L 时, MMP-9 含量仍处于较高的水平, 而 MMP-2 水平显著降低。根据 MMP 的分子量, 本实验检测到的 MMP-2 和 MMP-9 主要是其酶原形式。n-LDL 对 MMP-2 和 MMP-9 含量无明显影响。

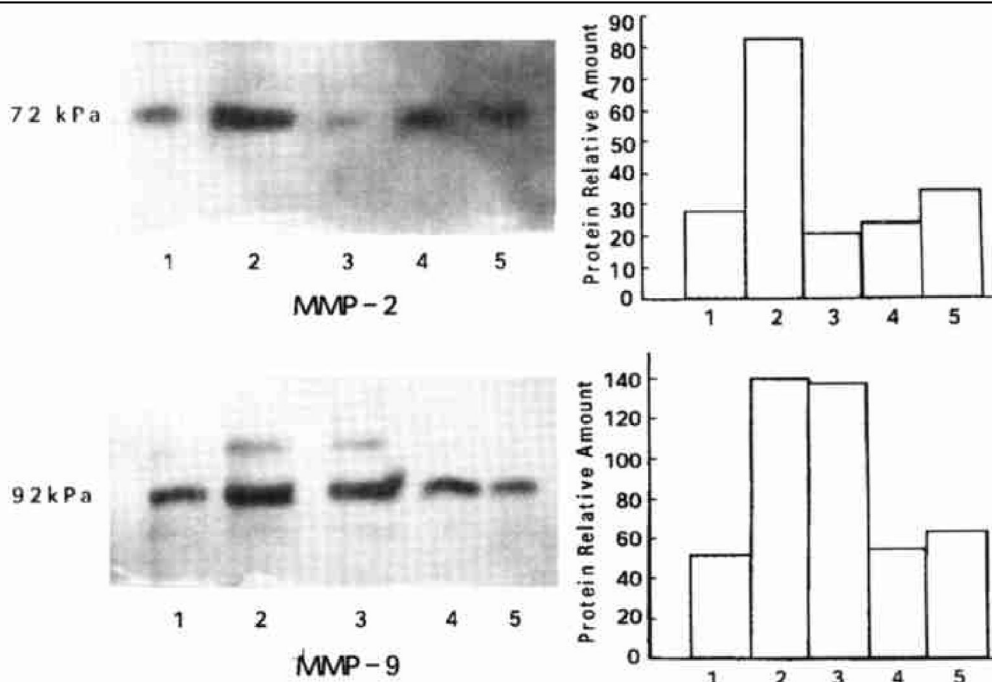


图3 基质金属蛋白酶-2和9的 Western blot 分析

Figure 3 Western blot analysis for MMP-2 and MMP-9. 1: control; 2: 10 mg/L ox-LDL; 3: 50 mg/L ox-LDL; 4: 10 mg/L n-LDL; 5: 50 mg/L n-LDL

2.4 基质金属蛋白酶- 2 和 9 活性的变化

用含明胶 SDS-PAGE 对 MMP-2 和 MMP-9 活性进行检测的结果表明,不同浓度的 ox-LDL 或 r-LDL 刺激 VSMC 24 h 后,细胞培养液均可在 92 kDa、88 kDa 和 72 kDa 的位置使明胶发生降解。根据已知 MMP 的分子质量,可知 92 kDa 和 88 kDa 处的明胶降解区带分别为 MMP-9 酶原及其活性形式降解明胶所致;72 kDa 的区带是 MMP-2 酶原降解活性造成的。从明胶被降解的程度可知,10 mg/L ox-LDL 可使 MMP-2 和 MMP-9 活性明显升高,50 mg/L ox-LDL 与 r-LDL 的作用相比无显著差异。

3 讨论

细胞外基质的降解不仅与血管平滑肌细胞从血管中膜向内膜迁移及增殖密切相关,而且其含量与组成的变化也是高血压、As 和血管成形术后再狭窄时血管再塑的重要原因^[7]。在血管组织中,血管平滑肌细胞既合成血管基质的主要成分——Ⅴ型胶原,又合成和分泌对Ⅴ型胶原进行降解的基质金属蛋白酶- 2 和基质金属蛋白酶- 9。近年证实,基质金属蛋白酶- 2 和基质金属蛋白酶- 9 在血管平滑肌细胞迁移和增殖及血管再狭窄发生过程中起重要作用。ox-LDL 作为一种强效致 As 因子,其致 As 作用是否与诱导基质金属蛋白酶表达及促进细胞外基质降解有关是个值得探讨的问题。本工作以体外培养的血管平滑肌细胞为研究对象,观察不同浓度 ox-LDL 对基质金属蛋白酶- 2 和基质金属蛋白酶- 9 表达的影响。结果发现,10 mg/L ox-LDL 作用于血管平滑肌细胞 24 h 可明显增强基质金属蛋白酶- 2 和基质金属蛋白酶- 9 mRNA 表达、蛋白分泌及酶的活性。我们曾报道,基质金属蛋白酶- 2 活性变化与胶原降解速度及血管平滑肌细胞增殖活性呈正相关^[1],由此推测,ox-LDL 对血管平滑肌细胞的致分裂效应与其诱导基质金属蛋白酶- 2 和基质金属蛋白酶- 9 表达及促进 ECM 降解有关。高浓

度的 ox-LDL 对基质金属蛋白酶- 2 和基质金属蛋白酶- 9 表达的影响不同, Dot blot 和 Western blot 分析结果显示,当 ox-LDL 浓度升高到 50 mg/L 时,基质金属蛋白酶- 9 表达活性仍然高于对照细胞,且与 10 mg/L ox-LDL 的作用强度无显著差别;在相同条件下,基质金属蛋白酶- 2 的基因表达和蛋白分泌明显降低,我们推测,这可能与较高浓度的 ox-LDL 对血管平滑肌细胞产生毒效应有关^[8],也可能是两种基因表达调控序列不同^[9]所导致,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周秀霞,温进坤,韩梅. 血管再狭窄发生过程中 MMP- 2 基因表达与胶原转换的动态变化 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15 (6): 997- 1 001
 - [2] Paul H. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1998, 137(Suppl): S33- 38
 - [3] Daniel S. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 20 963- 966
 - [4] 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血浆脂蛋白 [J]. 生物化学和生物物理学报, 1989, 21(3): 257- 259
 - [5] Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72kDa progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 1 860- 869
 - [6] Haas TL, Davis SJ, Madri JA. Three- dimensional Type I collagen lattices induce coordinate express of matrix metalloproteinases MT1- MMP and MMP- 2 in microvascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 3 604- 610
 - [7] Dollery CM, MeEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 1995, 77: 863- 868
 - [8] Bachem MG, Wendelin D, Schneiderhan W, et al. Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells [J]. *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37(3): 319- 326
 - [9] 孙红霞,温进坤. Ⅴ型胶原酶与动脉粥样硬化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(3): 271- 274
- (此文 2000- 08- 01 收到, 2000- 12- 28 修回)
(此文编辑 朱雯霞)