

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-04-0330-03

## 脂多糖对胎儿主动脉平滑肌细胞合成基质金属蛋白酶 1 和基质金属蛋白酶抑制物 1 的影响

刘相丽, 黄体钢, 周丽娟, 李飞雪

(天津医科大学第二医院心脏科, 天津市 300211)

[关键词] 分子生物学; 动脉粥样硬化; 蛋白质印迹分析; 脂多糖; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制物; 平滑肌细胞

[摘要] 为探讨脂多糖是否通过影响基质金属蛋白酶 1 和基质金属蛋白酶抑制物 1 的平衡对动脉粥样硬化的进程起作用, 应用体外培养的胎儿主动脉平滑肌细胞, 加入不同浓度的脂多糖孵育 72 h, 收集细胞上清液, 用蛋白质印迹分析方法检测细胞上清液中基质金属蛋白酶 1 和基质金属蛋白酶抑制物 1 的含量。结果发现, 脂多糖组与对照组相比, 基质金属蛋白酶 1 的含量明显减少 ( $P < 0.05$ ), 基质金属蛋白酶抑制物 1 的含量没有显著差别。以上提示, 脂多糖能抑制胎儿主动脉平滑肌细胞合成基质金属蛋白酶 1, 但对基质金属蛋白酶抑制物 1 的合成没有影响。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

### The Effect of Lipopolysaccharide on the Matrix Metalloproteinase-1 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 in Fetal Aortic Smooth Muscle Cells

LIU Xiang-Li, HUANG Ti-Gang, ZHOU Li-Juan, and LI Fei-Xue

(Department of Cardiology, the 2nd hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[KEY WORDS] Lipopolysaccharide; Matrix Metalloproteinase; Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase; Smooth Muscle Cell; Fetus; Plaque

[ABSTRACT] **Aim** To study whether lipopolysaccharide (LPS) regulates the production of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in fetal aortic smooth muscle cells. **Methods** Aortic smooth muscle cells from 4~6 month healthy abortive fetuses were incubated for 72 h with various concentration of LPS in vitro (0, 5, 10, 25 mg/L). The concentration of MMP-1 and TIMP-1 in the concentrated culture media was measured by Western Blotting. **Results** Compared with the control group, LPS could inhibit the production of MMP-1 in the smooth muscle cells, but could not change the production of TIMP-1 in the smooth muscle cells. **Conclusions** LPS could not promote the rupture of the atherosclerotic plaques by destroying the balance of the MMP-1 and TIMP-1 in the smooth muscle cells.

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 是降解冠状动脉粥样硬化斑块内的细胞外基质的重要蛋白酶, MMP-1 与其抑制物 1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1) 的平衡失调会导致细胞外基质降解加速, 引起动脉粥样硬化斑块的不稳定和破裂。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性细菌的内毒素, 本文探讨脂多糖是否影响平滑肌细胞合成 MMP-1 和 TIMP-1。

## 1 材料与方法

### 1.1 胎儿主动脉平滑肌细胞的培养

[收稿日期] 2002-08-15 [修回日期] 2003-06-06

[作者简介] 刘相丽, 女, 1970 年出生, 四川省渠县人, 博士, 主治医师, 从事动脉粥样硬化斑块破裂研究, Tel: 022-27404260, E-mail: Liu\_xiangli@hotmail.com。黄体钢, 男, 1936 年出生, 浙江省温州市人, 博士, 教授。周丽娟, 女, 1953 年出生, 上海市人, 大专, 主管技师, 研究方向均为冠心病、高血压发病机制及诊治。

选择 4~6 个月水囊引产的健康胎儿, 在引产后 8 h 内无菌条件下开胸取出主动脉, 贴块法原代培养内、中膜的平滑肌细胞, 培养基为含 20% 胎牛血清和人 AB 血清的高糖 DMEM。用免疫组织化学法鉴定平滑肌细胞 (选用小鼠抗人平滑肌肌动蛋白单克隆抗体)。胎儿主动脉平滑肌细胞培养至第 4~6 代时, 将细胞移至 24 孔板内 (细胞数为  $5 \times 10^7/L$ , 1 mL/孔)。待细胞在孔内长满汇合后换无血清培养基 (含 6 mg/L 胰岛素、5 mg/L 转铁蛋白、5 mg/L 水解乳蛋白、100 mg/L 链霉素和  $1 \times 10^5$  u/L 青霉素的 DMEM/F12 培养基), 在培养箱孵育 24 h, 使之同步化。24 h 后即用于实验。

### 1.2 细胞无血清条件培养基的收集

24 孔板每孔内加入 1 mL 不同浓度 (0、5、10 和 25 mg/L) 脂多糖, 在  $CO_2$  培养箱中  $37^\circ C$  孵育 72 h。收集细胞上清液, 超滤管浓缩 10~50 倍,  $-70^\circ C$  保存。

### 1.3 蛋白质印迹分析

将浓缩后的细胞上清液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(10% SDS-PAGE), 半干法电转移至硝酸纤维素膜上。然后用含 5% 脱脂奶粉封闭液室温孵育 60 min, 加入小鼠抗人 MMP-1 蛋白抗体(Oncogene 公司, 1: 50 稀释)或山羊抗人 TIMP-1 蛋白抗体(Santa Cruz 公司, 1: 200 稀释), 4℃冰箱内过夜。辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(Oncogene 公司, 1: 10 000 稀释)或辣根酶标记马抗山羊 IgG(Santa Cruz 公司, 1: 10 000 稀释)作为第二抗体与硝酸纤维素膜在室温下孵育 60 min。最后加入化学发光底物显色试剂(Pierce 公司), 5 min 后取出, 压 X 光片, 曝光 0.5 min 至 1 h, 常规冲片。采用 Document 1000 凝胶成像处理系统及凝胶分析软件 4.01(Bio-RAD)扫描蛋白条带及测定灰度值。每组做 3 次独立实验。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学处理。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有显著性,  $P < 0.01$  为差异有极显著性。

## 2 结果

### 2.1 脂多糖对基质金属蛋白酶 1 合成的影响

与对照组比较, 不同浓度脂多糖组 MMP-1 含量均减少(图 1, Figure 1), 且随脂多糖浓度的加大而进一步减少。将对照组设为 100%, 5、10 和 25 mg/L 脂多糖组与对照组比较分别为 71.7%  $\pm$  3.1%、75.8%  $\pm$  4.0% 和 49.7%  $\pm$  6.2%, 各组之间差异有显著性( $P < 0.05$ )。

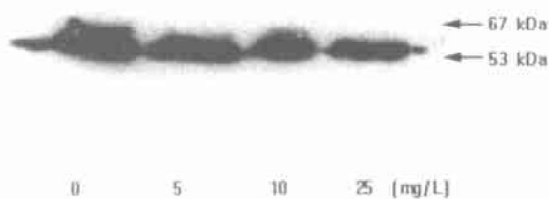


图 1. 脂多糖刺激平滑肌细胞分泌基质金属蛋白酶 1 的蛋白质印迹分析结果

Figure 1. Western blotting result of MMP-1 secretion from smooth muscle cells stimulated by lipopolysaccharide

### 2.2 脂多糖对基质金属蛋白酶抑制物 1 合成的影响

不同浓度脂多糖组 TIMP-1 含量无明显变化。将对照组设为 100%, 5、10 和 25 mg/L 脂多糖组与对照组比较分别为 109.4%  $\pm$  13.5%、102.5%  $\pm$  46.

6% 和 145.9%  $\pm$  143.7%, 各组之间的差异无显著性( $P > 0.05$ )。说明脂多糖对胎儿平滑肌细胞合成 TIMP-1 没有影响。

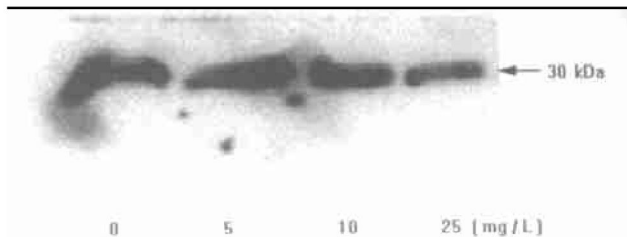


图 2. 脂多糖刺激平滑肌细胞分泌基质金属蛋白酶抑制物 1 的蛋白质印迹分析结果

Figure 2. Western blotting result of TIMP-1 secretion from smooth muscle cells stimulated by lipopolysaccharide

## 3 讨论

近十几年研究发现, 脂多糖与动脉粥样硬化的形成与发展有密切联系<sup>[1,2]</sup>。它损伤内皮细胞, 诱导单核细胞趋化蛋白 1、E-选择素、细胞间粘附因子 1 和血管细胞粘附因子 1 等的合成<sup>[3]</sup>。这些因子吸引、粘附血流中的单核细胞, 使之侵入血管内膜转化为巨噬细胞, 促进动脉粥样硬化的形成。脂多糖还可以激活内膜中的巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞, 使之合成的肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 和白细胞介素 8 等细胞因子和生长因子(如血小板衍生生长因子)明显增加, 它们都促进 MMP 的产生<sup>[4-6]</sup>。

目前有关脂多糖对 MMP 与 TIMP 平衡影响的报导尚少。文献[7~9]报导显示, 肺泡巨噬细胞在脂多糖刺激下合成 MMP-1 明显增多, 而巨噬细胞衍生的泡沫细胞受脂多糖刺激后合成的 MMP-1 则没有变化。在脂多糖和干扰素  $\gamma$  的共同刺激下, 单核细胞衍生的巨噬细胞产生的 MMP-1 明显增加。Pierce 等<sup>[10]</sup>观察到, 将单核细胞系 U937 与脂多糖共同孵育, U937 细胞内的 MMP-1 mRNA 表达增多。脂多糖对 TIMP-1 合成的影响尚未见报导。在本实验中, 脂多糖与胎儿主动脉平滑肌细胞共同孵育可抑制 MMP-1 的合成, 且呈剂量依赖性, 尤以 25 mg/L 时最为明显, 但是脂多糖对胎儿主动脉平滑肌细胞合成 TIMP-1 没有影响。

综上所述, 脂多糖对不同来源的细胞合成 MMP-1 的影响不同, 它对动脉粥样硬化斑块内 MMP 与 TIMP 平衡的调节尚需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (15): 6 911-914

- [2] Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet*, 1997, **350** (9075): 430-436
- [3] Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*, 1999, **103** (4): 571-577
- [4] Unkelbach K, Gardemann A, Kostrzewa M, Philipp M, Tillmanns H, Haberbosch W. A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (4): 932-938
- [5] Brand K, Banka CL, Mackman N, Terkeltaub RA, Fan ST, Curtiss LK. Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (5): 790-797
- [6] 周秀霞, 温进坤, 韩梅. 白细胞介素-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 对血管平滑肌细胞及基质金属蛋白酶-2骨桥蛋白基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 292-295
- [7] Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (2): 402-406
- [8] Kim H, Koh G. Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **269** (2): 401-405
- [9] Weitkamp B, Cullen P, Plenz G, Robenek H, Rauterberg J. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *Faseb J*, 1999, **13** (11): 1 445-457
- [10] Pierce RA, Sandefur S, Doyle GA, Welgus HG. Monocytic cell type-specific transcriptional induction of collagenase. *J Clin Invest*, 1996, **97** (8): 1 890-899
- (此文编辑 朱雯霞)