

洛伐他汀对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 3 表达的影响

栾朝霞¹, 高沁怡², 裴著果³

(中国医科大学 1. 第三临床学院, 2. 第一临床学院, 3. 第二临床学院, 辽宁省沈阳市 110022)

[关键词] 内科学; 洛伐他汀抑制基质金属蛋白酶 3 的表达; Western blot 检测法; 血管平滑肌细胞; 白细胞介素 1 α ; 血小板源生长因子 BB; 动脉粥样硬化[摘要] 观察洛伐他汀对兔血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 3 表达的影响及其作用机制。用 Western blot 检测基质金属蛋白酶 3 蛋白水平, 采用电泳迁移率变动分析法测定 AP-1 结合活性, 用逆转录聚合酶链反应检测基质金属蛋白酶 3 mRNA 水平。结果发现, 白细胞介素 1 α 和血小板源生长因子 BB 联合作用于兔血管平滑肌细胞, 可明显增加基质金属蛋白酶 3 的表达, 洛伐他汀抑制这种刺激作用, 使基质金属蛋白酶 3 的表达减低, 且呈浓度依赖性; 该抑制作用可被甲羟戊酸和双香叶酯基焦磷酸盐所逆转, 而不被角鲨烯所逆转。白细胞介素 1 α 和血小板源生长因子 BB 联合作用后使兔血管平滑肌细胞 AP-1 结合活性和基质金属蛋白酶 3 mRNA 水平明显增高, 洛伐他汀抑制白细胞介素 1 α 和血小板源生长因子 BB 上调 AP-1 结合活性的作用, 但对基质金属蛋白酶 3 mRNA 水平无明显影响。结果提示, 洛伐他汀不依赖其调脂作用抑制血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 3 的生成, 从而在理论上具有抗动脉粥样硬化和增加斑块稳定性的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Lovastatin on Secretion of Matrix Metalloproteinase-3 in Vascular Smooth Muscle Cells

LUAN Zhao Xia¹, GAO Qin Yi², and PEI Zhuo Guo³

(1. The Third Affiliated Hospital, 2. The First Affiliated Hospital, 3. The Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110022, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Interleukin 1 α ; Platelet Derived Growth Factor BB; Atherosclerosis; Lovastatin; Matrix Metalloproteinase-3[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of lovastatin on secretion of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) of rabbits. **Methods** Expression of MMP-3 was detected by Western blot, AP-1 binding activity was detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), mRNA level of MMP-3 was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Interleukin 1 α (IL-1 α) combined with platelet derived growth factor BB (PDGF-BB) strongly increased the expression of MMP-3 at VSMC. Lovastatin inhibited the upregulated expression of MMP-3 by IL-1 α and PDGF-BB in a concentration dependent manner. This inhibitory effect was reversed by mevalonate and GGPP, but not by squalene. Lovastatin decreased AP-1 binding activity enhanced by IL-1 α and PDGF-BB, but had no significant effect on MMP-3 mRNA level. **Conclusion** Lovastatin inhibited MMP-3 secretion at VSMC, which could contribute to its plaque stabilizing effects.

研究发现, 他汀类药物可减少内皮细胞和单核巨噬细胞基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的生成^[1,2], 但有关他汀类药物对血管平滑肌细胞 MMP 影响的研究较少。本研究观察洛伐他汀对兔血管平滑肌细胞 MMP-3 分泌的影响以及探讨其作用机制。

1 材料与方法

[收稿日期] 2002-10-08 [修回日期] 2003-05-25

[作者简介] 栾朝霞, 女, 1968 年出生, 辽宁省庄河市人, 博士, 讲师, 主治医师, 研究方向为冠心病。E-mail: lz681004@yahoo.com.cn。高沁怡, 女, 1958 年出生, 北京市人, 博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向为冠心病及其放射治疗。裴著果, 男, 1934 年出生, 辽宁省黑山县人, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病。

1.1 兔血管平滑肌细胞的培养

将兔主动脉段切成碎片, 用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (Gibco 公司) 培养。两周后当细胞长满培养瓶底面时, 用胰蛋白酶/EDTA 悬浮细胞进行传代培养。将第 1~3 代的传代细胞以 2×10^5 /孔的密度置于 6 孔培养板中, 用以 Western blot 实验, 或以 1×10^6 /培养瓶的密度置于 75 cm² 的培养瓶中, 用以逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 或电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 实验。当细胞长至 60%~70% 满时, 换用无血清培养基培养 3 天, 更换无血清培养基, 并加入适当浓度的白细胞介素 1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、血小板源生长因子

BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB) 和洛伐他汀, 孵育 48 h。

1.2 Western blot 分析

应用羊抗兔 MMP-3 多克隆抗体, 效价为 1: 10 000。MMP-3 分泌至培养基中, 将培养基浓缩 10 倍, 经 8% 聚丙烯酰胺变性凝胶分离蛋白(上样量为 15 μL 浓缩培养基), 电转膜法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 封闭, 加 iv 抗, 辣根过氧化物酶标记 ①抗, 化学发光试剂增强反应, X 线片压片曝光, 经光密度仪扫描分析, 以背景光密度值进行标准校正, 计算 MMP-3 蛋白表达相对量。

1.3 电泳迁移率变动分析

在 T₄ 多聚核苷酸激酶作用下, 将 [γ-³²P]ATP 标记至 AP-1 寡聚核苷酸(5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3') 5' 端, 用 Nuc-trap 柱将标记的寡聚核苷酸与未标记的分开, 测定标记寡聚核苷酸放射强度。提取兔血管平滑肌细胞核蛋白并定量。标记的寡聚核苷酸与核蛋白进行结合反应, 反应条件: 5 μg 核蛋白, 20 000 cpm 标记寡聚核苷酸, 1 μL poly L-lysine, 1 μL poly [d(F-C)], 4 μL 5 × 结合缓冲液, 加去离子水至 20 μL, 将混合物置于冰上反应 30 min。20% 聚丙烯酰胺变性凝胶分离反应液, 将凝胶取出干燥, X 线片压片曝光(48 h, - 80 °C), 光密度仪扫描分析。

1.4 总 RNA 提取及逆转录聚合酶链反应

按照 RNeasy Mini 药盒(Qiagen) 的使用说明, 从兔血管平滑肌细胞中提取总 RNA。RT-PCR 方法按照《分子克隆实验指南》。MMP-3 和 GAPDH 引物序列参照文献[3] 设计。引物序列: MMP-3 上游 5'-GCATCAAGACAGCATAGAGCT-3', 下游 5'-GACAG-GTTCATAGGCAC TTC-3'; GAPDH 上游 5'-GTGAAG-GTCGGAGTCAACG-3', 下游 5'-GGTGAAGACGC-CAGTGG ACTC-3'。

1.5 洛伐他汀的细胞毒性检测

用 MTT 分析药盒(Sigma 公司) 检测细胞毒性。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 洛伐他汀对基质金属蛋白酶 3 表达的影响及其细胞毒性

白细胞介素 1α(IL-1α) 和 PDGF-BB (均为 20 μg/L) 联合使用明显增加血管平滑肌细胞 MMP-3 的蛋白和 mRNA 表达, 洛伐他汀减少 MMP-3 蛋白的生

成, 且呈浓度依赖性, 但洛伐他汀对 MMP-3 mRNA 的表达无明显影响(表 1, Table 1)。MTT 实验结果表明洛伐他汀对血管平滑肌细胞无明显毒性作用(表 2, Table 2)。

表 1. 洛伐他汀对基质金属蛋白酶 3 的蛋白和 mRNA 表达的影响

Table 1. Effect of lovastatin on the protein and mRNA of MMP-3 in VSMC ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

分 组	蛋白	mRNA
对照组	69.1 ± 13.2	46.5% ± 8.6%
IL-1α+ PDGF-BB 组	100 ± 0 ^a	100% ± 0% ^a
洛伐他汀组		
1 μmol/L	76.5 ± 18.9	
5 μmol/L	39.0 ± 1.7 ^b	103.2% ± 4.5%
10 μmol/L	29.5 ± 10.2 ^b	
20 μmol/L	1.3 ± 0.1 ^b	

a: *P* < 0.05, 与对照组比较; b: *P* < 0.01, 与 IL-1α+ PDGF-BB 组比较。

表 2. 兔平滑肌细胞 MTT 实验结果

Table 2. MTT results at vascular smooth muscle cells

分 组	$\bar{x} \pm s$
对照组	2.05 ± 0.56
IL-1α+ PDGF-BB 组	2.47 ± 0.23
洛伐他汀各组	
1 μmol/L	2.36 ± 0.25
5 μmol/L	2.15 ± 0.26
10 μmol/L	2.06 ± 0.12
20 μmol/L	2.03 ± 0.45

2.2 异戊二烯类物质对洛伐他汀作用的影响

在 IL-1α、PDGF-BB(均为 20 μg/L) 和洛伐他汀(5 μmol/L) 的培养基中分别加入甲羟戊酸(100 μmol/L)、双香叶酯基焦磷酸盐(10 μmol/L) 和角鲨烯(10 μmol/L), 孵育 48 h, 结果发现甲羟戊酸和双香叶酯基焦磷酸盐明显逆转洛伐他汀的作用, 使 MMP-3 分泌增加, 而角鲨烯无明显逆转作用(表 3, Table 3)。

2.3 洛伐他汀对 AP-1 结合活性的影响

白细胞介素 1α(IL-1α) 和 PDGF-BB 明显上调血管平滑肌细胞 AP-1 结合活性, 而洛伐他汀明显抑制这种刺激作用, 使 AP-1 结合活性降低(表 4, Table 4)。

表 3. 异戊二烯类物质对洛伐他汀作用的影响

Table 3. MMP-3 secretion was rescued by mevalonate and GG-PP

分 组	$\bar{x} \pm s$
IL-1 α + PDGF-BB 组	100% \pm 0%
洛伐他汀组	42.1% \pm 15.0% ^a
角鲨烯组	54.9% \pm 21.6% ^a
甲羟戊酸组	92.3% \pm 14.3%
双香叶酯基焦磷酸盐	102.4% \pm 9.9%

a: $P < 0.01$, 与 IL-1 α + PDGF-BB 组比较。

表 4. 洛伐他汀对 AP-1 结合活性的影响

Table 4. Effect of lovastatin on AP-1 binding activity ($\bar{x} \pm s$)

对照组	IL-1 α + PDGF-BB 组	洛伐他汀组
70.1% \pm 10.5%	100% \pm 0% ^a	27.0% \pm 13.9% ^b

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与 IL-1 α + PDGF-BB 组比较。

3 讨论

基质金属蛋白酶(MMP)能够分解细胞外基质,从而引起血管平滑肌细胞移行和增殖,在动脉粥样硬化发生和发展过程中起着十分重要的作用^[4,6]。此外,MMP能够分解动脉粥样硬化斑块部位的细胞外基质,使斑块结构稳定性和对血流冲击的抵抗力下降,导致斑块破裂,引起不稳定型心绞痛、急性心肌梗死等急性综合症^[7,8]。MMP中的MMP-3有着广泛的分解底物,包括iv型和 α 型胶原蛋白、弹性蛋白和粘蛋白等,并且MMP-3能够剪切其它种类的MMP,比如MMP-1和MMP-9,使之由非活性的酶原转化为有活性的酶^[8]。在动物模型和人的动脉粥样硬化斑块中均发现过多分泌的MMP-3,而在正常的动脉组织中MMP-3的表达非常低^[9,10]。因此在冠心病治疗中,减少MMP-3的生成有着十分重要的意义,可以使斑块保持稳定,避免急性致死性心脏病的发生。

在无外来刺激作用下,血管平滑肌细胞MMP-3的分泌量极低。IL-1 α 和PDGF-BB是存在于炎症和动脉粥样硬化病变处的生物因子,在它们的联合刺激作用下,平滑肌细胞MMP-3的分泌明显增加,而洛伐他汀则明显抑制IL-1 α 和PDGF-BB的刺激作用,使MMP-3的分泌减少,且呈浓度一效应依赖性。

他汀类药物被细胞摄取后能抑制HMG-CoA转化为甲羟戊酸,造成细胞内甲羟戊酸缺乏。甲羟戊酸是合成双香叶酯基焦磷酸盐和角鲨烯的共同前体

物质,双香叶酯基对细胞内许多重要蛋白有修饰作用,如Rho蛋白,而角鲨烯则是合成胆固醇的前体物质。在本研究中,甲羟戊酸和双香叶酯基焦磷酸盐可逆转洛伐他汀的作用,使MMP-3的分泌增多,而角鲨烯无此作用,说明洛伐他汀通过抑制细胞内蛋白双香叶酯化使MMP-3的合成减少,而与该药物降低血浆胆固醇作用无关。

基质金属蛋白酶3(MMP-3)的表达受转录因子AP-1的调控^[5,8]。洛伐他汀明显抑制AP-1的结合活性,表明洛伐他汀可能抑制MMP-3的转录,但RT-PCR结果证实洛伐他汀组MMP-3 mRNA水平并无显著变化,提示相对于其对转录的抑制作用,洛伐他汀更强的抑制MMP-3的翻译过程,因此导致细胞内MMP-3蛋白缺乏,通过负反馈作用使MMP-3 mRNA水平提高,因此最终mRNA水平可保持不变或增高。事实上,Bellocsta等^[2]研究发现氟洛伐他汀(另一种他汀类药物)在抑制人巨噬细胞MMP-9蛋白表达的同时可使MMP-9 mRNA水平增加1倍。

本研究结果表明洛伐他汀通过抑制血管平滑肌细胞内重要蛋白的双香叶酯化而减少MMP-3的表达,从而在分子水平上阐明洛伐他汀抗动脉粥样硬化和增加斑块稳定性的机制。

[参考文献]

- [1] Ikeda U, Shimpo M, Ohki R. Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Hypertension*, 2000, **36** (3): 325-329
- [2] Bellocsta S, Via D, Canavesi M. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (11): 1671-678
- [3] Chase AJ, Bond M, Crook MF, Newby AC. Role of nuclear factor- κ B activation in metalloproteinase 1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 765-771
- [4] Newby AC, Zaltsman AB J. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *Pathol*, 2000, **190** (3): 300-309
- [5] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 1995, **77** (5): 863-868
- [6] 谢良地, 吴可贵, 陈达光. 血小板源生长因子诱导血管平滑肌细胞迁移及机制. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (1): 10-14
- [7] Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction: the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovascular Research*, 1999, **41** (2): 345-360
- [8] Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 1995, **91** (11): 2844-850
- [9] James TW, Wagner R, White LA. Induction of collagenase and stromelysin gene expression by mechanical injury in vascular smooth muscle-derived cell line. *J Cell Physiol*, 1993, **157** (2): 426-437
- [10] Galis Z, Sukhova G, Libby P. Evidence for presence of activated matrix metalloproteinases in human atherosclerotic plaques. *FASEB J*, 1995, **9** (10): 974-980

(此文编辑 文玉珊)