

# 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 1 活性的影响

王金凤, 任立群, 李广生

(吉林大学再生医学科学研究所病理室, 吉林省长春市 130021)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶的表达; 逆转录聚合酶链反应; 同型半胱氨酸; 血管平滑肌细胞; 基质金属蛋白酶 1; 动脉粥样硬化

[摘要] 观察同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 1 活性的影响, 并探讨其作用机制。采用体外培养的大鼠血管平滑肌细胞, 加入不同浓度的同型半胱氨酸作用 48 h, 通过酶谱分析和半定量逆转录聚合酶链反应的方法观察同型半胱氨酸对基质金属蛋白酶 1 活性及其 mRNA 表达的影响。结果发现, 同型半胱氨酸抑制基质金属蛋白酶 1 活性, 下调其 mRNA 表达, 并有剂量依赖效应。提示同型半胱氨酸通过减少基质金属蛋白酶 1 的合成, 抑制其活性, 从而减少胶原降解而使胶原蓄积。表明同型半胱氨酸减少胶原降解可能是致动脉粥样硬化的发病机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Homocysteine on the Activity of Matrix Metalloproteinase-1 in Culture Vascular Smooth Muscle Cells

WANG Jinfeng, REN Liqun, and LI Guangsheng

(Department of Pathology, The Institute of Frontier Medical Science, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Vascular Smooth Muscle Cells; Matrix Metalloproteinase-1; Atherosclerosis; Collagen; Zymography

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of homocysteine (Hcy) on the activity of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and its regulatory mechanism in cultured vascular smooth muscle cells. **Methods** Cultured rat vascular smooth muscle cells were treated with different concentration of Hcy in vitro for 48 h. The activity of MMP-1 was determined using the method of zymography. The expression of MMP-1 mRNA in vascular smooth muscle cells was observed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** Hcy significantly inhibited the activity of MMP-1 and down-regulated the MMP-1 mRNA expression in vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** These data suggested that Hcy can induce collagen accumulation by decreasing the secretion of MMP-1 and inhibiting the activity of MMP-1. It may be the key factor in the pathogenesis of atherosclerosis induced by Hcy.

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的一个独立、重要的危险因素<sup>[1-3]</sup>, 在Hcy所致动脉粥样斑块中胶原成份增加是个突出特点, 已有研究表明, Hcy能够促进胶原合成<sup>[4]</sup>, 然而, Hcy对胶原降解有何影响, 至今国内外均未见报道。本研究旨在探讨Hcy对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)活性的影响, 并对其可能的机制进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

雄性Wistar大鼠, 体重150g左右, 由吉林大学白求恩医学部实验动物室提供。TRIZOL试剂购自GIBCOBRL公司; 逆转录酶为Promega公司产品。

### 1.2 血管平滑肌细胞培养和同型半胱氨酸处理

大鼠胸主动脉VSMC原代培养及鉴定依照我们实验室以前报告的方法进行<sup>[5]</sup>。取第5~7代细胞进行实验, 接种于100 mL培养瓶中, 每瓶 $1 \times 10^5$ 个。加含15%胎牛血清的PRMI 1640培养液培养48 h, 瓶内细胞长满至80%左右, 换含0.4%胎牛血清的培养液再培养24 h。使细胞同步增长后, 分成5组, 加入不同浓度的Hcy, 其终浓度分别为0、0.1、0.25、0.5和1.0 mmol/L, 各组细胞培养液中均含0.4%胎牛血清和0.15 mol/L的维生素C。培养48 h后, 收

[收稿日期] 2003-07-23 [修回日期] 2003-12-18

[基金项目] 教育部留学归国人员启动资金(1999年363号)资助

[作者简介] 王金凤, 医学博士, 主治医师, 主要从事心血管疾病的 研究。电话: 0431-5619287, E-mail: wangjinfengcl@sohu.com。任立群, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病的 研究。李广生, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心肌疾病及代谢性骨病的 研究。

集培养液, -70℃保存备用。细胞用于提取总RNA及酶谱分析。

### 1.3 酶谱分析

样品制备: 细胞培养液的样品制备: 收集不同浓度Hcy作用48h的VSMC培养液, 2 000 r/min, 4℃离心5 min, 去除细胞碎片, 每瓶取3 mL培养液冷冻干燥后, -70℃保存备用。用时加200 μL双蒸水溶解成15倍浓缩的培养液。④VSMC的样品制备: 把已移去培养液的细胞用磷酸盐缓冲液清洗2次, 用0.25%的胰蛋白酶消化各组细胞, 加入含10%血清的RPMI 1640培养液终止消化。用吸管将细胞移入10 mL尖底离心管中, 以2 000 r/min离心10 min, 弃上清液。加入4℃预冷的磷酸盐缓冲液悬浮细胞后, 移入1.5 mL离心管中, 4℃2 000 r/min离心5 min, 共2次。弃上清, 加入50 μL裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.1%十二烷基硫酸钠, 1%曲拉通X-100, pH 8.0), 旋涡振荡15 s, 4℃10 000 r/min离心5 min, 吸出上清, -70℃保存备用。

用紫外分光光度法检测样品蛋白浓度后, 按照文献[6]的方法进行酶谱分析。VSMCs样品总蛋白的上样量为16.2 μg, 浓缩的细胞培养液上样量是42.6 μg。不经煮沸直接上样。经含0.1%明胶的10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将凝胶置于洗涤缓冲液中充分洗涤, 孵育缓冲液内37℃过夜, 考马斯亮蓝R-250染色, 脱色液中脱色。显示出MMP-1为位于蓝色背景上无色透明条带。对酶谱分析结果进行灰度扫描, 计算酶解量, 从而对各组细胞酶活性进行定量比较。每组3个样本, 并经多次重复实验。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应

用TRIZOL RNA抽提液提取细胞总RNA。RNA浓度以UV755B分光光度计重复测定3次, 其A260 nm与A280 nm比值在1.8以上方可使用。取1.0 μg总RNA为模板, 以Oligo(dT)16为引物进行逆转录。反应条件为: 65℃变性5 min → 42℃反应50 min → 70℃终止反应15 min。扩增MMP-1的引物为: 有意义序列引物: 5'-GGA GCC CTG ATG TTT CCC-3', 反意义序列引物: 5'-ATG CGA TTA CTA CAG ATA CTG T-3', 预计扩增产物全长646 bp。以3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)做内参对照, 扩增其引物为: 有意义序列引物: 5'-TGT CTC CTG TGA CTT CAA CAG C-3', 反意义序列引物: 5'-TGA TGG TAT TCG AGA GAA GGG-3', 预计扩增长度为346 bp。均由大连宝生物

公司合成。各取逆转录产物2 μL分别进行聚合酶链反应。反应条件为: 94℃变性30 s → 退火45 s → 72℃延伸50 s。退火温度MMP-1为50℃, GAPDH为53℃。经30个循环后, 72℃延伸10 min。取5 μL聚合酶链反应产物做琼脂糖凝胶电泳。并通过数码凝胶成像系统测算电泳条带吸光度值。

### 1.5 统计学处理

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验数据应用SPSS 10.0统计软件进行统计分析,  $P < 0.05$ 为统计学有显著差异。并且每项指标都与Hcy剂量之间进行相关分析。

## 2 结果

### 2.1 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶1活性的影响

应用明胶底物酶谱法检测VSMCs及其浓缩培养液中MMP-1的活性, 结果表现为蓝色背景上的无色透明条带。在蛋白上样量为16.2 μg的VSMCs样品的酶谱分析凝胶中, 只有活性形式(42 kDa)的一条带; 而上样量为42.6 μg的浓缩培养液, 除有42 kDa活性形式的MMP-1外, 还有少量52 kDa酶原形式的MMP-1, 表明VSMCs合成的MMP-1主要以活性形式存在。用酶解量表示酶活性, 不论是存在于VSMCs还是其浓缩培养液中的MMP-1, 其活性都随着Hcy浓度的增加而减少, 0.5和1.0 mmol/L浓度的Hcy组与对照组比较差异显著(表1, 图1, 图2; Table 1, Figure 1, Figure 2)。在浓缩培养液的酶谱分析中有少量酶原形式的MMP-1, 其含量也随着Hcy浓度的增加而减少, 在0.25、0.5和1.0 mmol/L浓度Hcy组酶原形式的MMP-1与对照组比较差异显著。

表1. 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶1酶原及活性形式的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1. Effect of Hcy on the pro-MMP-1 and activity of MMP-1 in VSMCs

浓度 分组 (mmol/L)	浓缩细胞培养液		细胞 MMP-1 (42 kDa)
	MMP-1 酶原 (52 kDa)	MMP-1 (42 kDa)	
对照组	2.15 ± 0.43	14.39 ± 0.47	8.55 ± 0.68
Hcy 0.1	1.95 ± 0.10	12.54 ± 1.12	8.06 ± 0.49
Hcy 0.25	1.67 ± 0.18 <sup>a</sup>	11.22 ± 1.32	7.80 ± 0.45
Hcy 0.5	1.35 ± 0.08 <sup>b</sup>	10.28 ± 3.36 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.61 <sup>b</sup>
Hcy 1.0	1.13 ± 0.04 <sup>b</sup>	7.69 ± 1.64 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.15 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组相比。

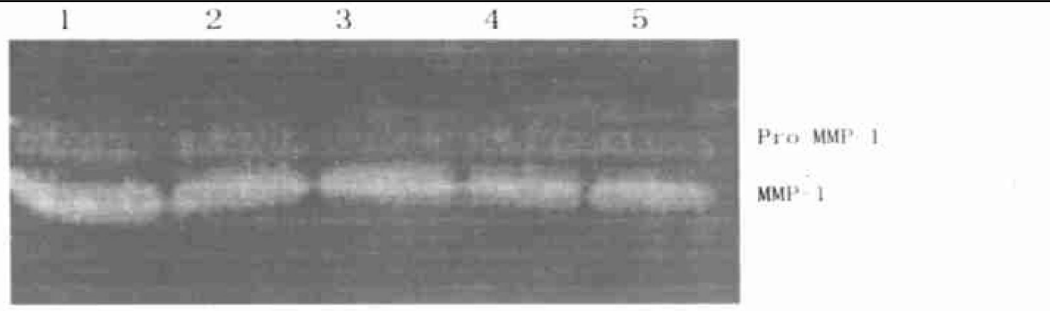


图 1. 血管平滑肌细胞浓缩培养液的酶谱分析图 1 为对照组; 2 为 0.1 mmol/L Hcy 组; 3 为 0.25 mmol/L Hcy 组; 4 为 0.5 mmol/L Hcy 组; 5 为 1.0 mmol/L Hcy 组。

Figure 1. Zymographic detection of MMP-1 in the culture medium of VSMC

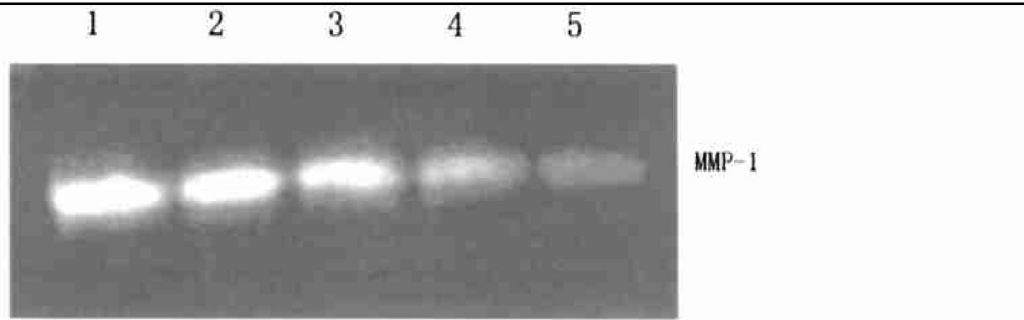


图 2. 血管平滑肌细胞的酶谱分析图 1 为对照组; 2 为 0.1 mmol/L Hcy 组; 3 为 0.25 mmol/L Hcy 组; 4 为 0.5 mmol/L Hcy 组; 5 为 1.0 mmol/L Hcy 组。

Figure 2. Zymographic detection of MMP-1 in VSMC

表 2. 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 1 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 2. Effect of Hcy on the expression of MMP-1 mRNA in VSMCs

浓度分组	MMP-1/GAPDH
对照组	0.623 ± 0.044
Hcy 0.1 (mmol/L)	0.513 ± 0.035 <sup>a</sup>
Hcy 0.25 (mmol/L)	0.493 ± 0.041 <sup>a</sup>
Hcy 0.5 (mmol/L)	0.420 ± 0.075 <sup>a</sup>
Hcy 1.0 (mmol/L)	0.340 ± 0.042 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组相比。

## 2.2 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 1 mRNA 表达的影响

通过半定量逆转录聚合酶链反应方法观察 Hcy 对 MMP-1 mRNA 表达的影响, 记录 MMP-1 和内参照 GAPDH 电泳条带吸光度值的比值, 结果显示, Hcy 下调 VSMC 的 MMP-1 mRNA 的表达, 并随着 Hcy 浓度的增加而抑制作用加强(表 2, 图 3; Table 2, Figure 3)。本实验所设各浓度 Hcy 组的 MMP-1 mRNA 的表达与对照组相比均有显著差异, 并有剂量依赖效应。

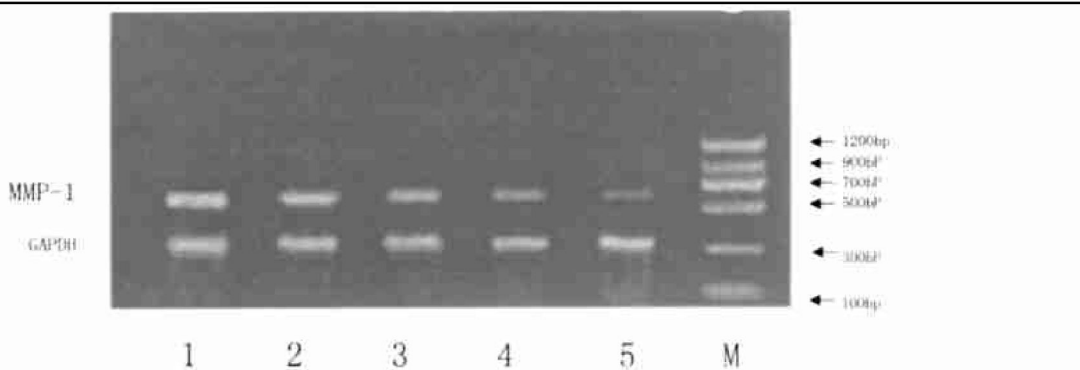


图 3. 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 1 mRNA 表达的影响 1 为对照组; 2 为 0.1 mmol/L Hcy; 3 为 0.25 mmol/L Hcy; 4 为 0.5 mmol/L Hcy; 5 为 1.0 mmol/L Hcy; M 为分子质量标准物。

Figure 3. Effect of Hcy on the expression of MMP-1 mRNA in VSMC

### 3 讨论

基质金属蛋白酶 1 为间质胶原酶( interstitial collagenase), 以酶原的形式合成, 分子量为 52 kDa。在氨基端分解掉一个多肽后转化为 42 kDa 的活性形式, 即 MMP-1。MMP-1 主要降解 iv、 $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 型胶原, 也可降解明胶。VSMCs 可以分泌 MMP-1, 对细胞外基质中胶原的降解起着重要作用。本实验通过酶谱分析法, 以不同浓度的 Hcy 作用于体外培养的 VSMCs 48 h, 检测 VSMCs 及其浓缩培养液中 MMP-1 活性的变化。结果发现, 培养 VSMCs 的 MMP-1 主要以活性形式存在, 酶原形式的 MMP-1 量较少。不论是 VSMCs 还是浓缩培养液, 都显示出 Hcy 抑制 MMP-1 的活性, 分子量为 42 kDa 的活性 MMP-1 随着 Hcy 浓度的增加而减少。Hcy 为 0.5 和 1.0 mmol/L 的浓度组与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。在浓缩的细胞培养液中, 有少量 52 kDa 的酶原形式的 MMP-1, 其含量也随着 Hcy 浓度的增加而减少, 在 0.25、0.5 和 1.0 mmol/L 浓度的 Hcy 组与对照组比较差异显著。表明 Hcy 可以减少 MMP-1 合成, 并抑制其活性, 从而减少胶原的降解。

采用半定量逆转录聚合酶链反应分析 Hcy 对

VSMCs MMP-1 mRNA 表达的影响, 从酶基因转录水平上观察 Hcy 对 VSMCs 胶原代谢的影响。结果显示 Hcy 对 MMP-1 mRNA 表达有明显的下调作用, 本实验所设的 0.1、0.25、0.5 和 1.0 mmol/L 各浓度 Hcy 组与对照组相比均有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 并有剂量依赖效应。表明 Hcy 从转录水平抑制 MMP-1 的蛋白质表达, 减少 VSMCs MMP-1 的分泌。可见, Hcy 抑制 MMP-1 活性, 减少胶原降解, 从而导致胶原蓄积, 是其致 As 的重要机制之一。

#### [参考文献]

- [1] 王玉芳, 王树人. 同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6: 259-263
- [2] 李全忠, 朱雯霞, 赵水平. 同型半胱氨酸对血管内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达及氧化型低密度脂蛋白摄取的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10: 324-326
- [3] 石彦荣, 牛大地, 王述姮, 高霖, 齐永芬, 庞永正, 等. 同型半胱氨酸抑制培养的大鼠血管平滑肌细胞牛磺酸转运. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10: 203-205
- [4] Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease: Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 2 074-081
- [5] 任立群, 张秀云, 孙波, 王金凤. 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的组织贴块法培养及鉴定. 吉林大学学报·医学版, 2002, 28: 135-136
- [6] 卜文, 黄晓武, 汤钊猷. 基质金属蛋白酶 2 与肝细胞侵袭转移性的关系. 中华医学杂志, 1997, 77: 661-664

(此文编辑 曾学清, 胡必利)