

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0669-04

• 实验研究 •

抗血小板制剂对家兔血管成形术后基质金属蛋白酶及其抑制剂表达的影响

王绽菲, 张子新, 曾定尹, 宋丽新

(中国医科大学第一临床学院循环内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 抗血小板制剂对基质金属蛋白酶及其抑制剂表达的影响; 血管成形术; 基质金属蛋白酶; 组织型金属蛋白酶抑制剂; 西洛他唑; 内膜增生

[摘要] 观察抗血小板制剂西洛他唑对血管成形术后基质金属蛋白酶及组织型金属蛋白酶抑制剂表达的影响。建立家兔二次损伤的血管成形术模型, 随机分为对照组、高脂组及西洛他唑组。观察血管成形术后 4 周腹主动脉内膜增生情况, 用免疫组织化学及逆转录聚合酶链反应检测基质金属蛋白酶 2 和 9 及组织型金属蛋白酶抑制剂 1 和 2 的蛋白及 mRNA 表达。结果发现, 血管成形术 4 周后, 西洛他唑组新生内膜面积减少, 管腔面积增大, 与高脂组相比差异显著; 基质金属蛋白酶 2 和 9 及组织型金属蛋白酶抑制剂 1 和 2 的蛋白及 mRNA 表达水平与高脂组相比明显减低。结果提示, 抗血小板制剂西洛他唑可以抑制血管成形术后内膜基质金属蛋白酶及组织型金属蛋白酶抑制剂的表达, 干预基质代谢, 抑制内膜增生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect on the Expression of Matrix Metalloproteinase and Its Inhibitor of Antiplatelet Medicine in Rabbits after Angioplasty

WANG Zhan-Fei, ZHANG Zi-Xin, ZENG Ding-Yin, and SONG Li-Xin

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase; Tissue Metalloproteinase Inhibitor; Cilostazol; Intimal Hyperplasia; Angioplasty

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the inhibitory effect of Cilostazol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 and tissue metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1) and TIMP-2 protein and mRNA expression, to study its role and mechanism on proliferation after angioplasty. **Methods** 40 Japanese male white rabbits were injured two times to make PTA models and divided into three groups: control group, high cholesterol group and Cilostazol group. PTA was proceeded under X-Ray, 4 weeks after the angioplasty, the damaged segments of abdominal arteries were harvested for morphometry (assessing NIA, MA, CA) and for immunohistochemical analysis as well as RT-PCR to evaluate MMP-2, MMP-9 and TIMP-1, TIMP-2 protein and mRNA expression level. **Results** Cilostazol can reduce the NIA and increase the CA. MMP-2, MMP-9 and TIMP-1, TIMP-2 protein and mRNA expression levels in high cholesterol control group increases at 4th week after angioplasty. However, Cilostazol can reduce their levels. **Conclusions** Cilostazol can inhibit the vascular intimal hyperplasia, through its effect on the expression of MMP and TIMP to regulate the extracellular matrix turnover.

血管成形术后内膜增生与细胞外基质代谢失衡有关, 血小板参与了此过程并具有重要作用。新型抗血小板制剂西洛他唑是环磷酸腺苷磷酸二酯酶(④)抑制剂, 它具有抑制血小板聚集、血管扩张和抑制离体平滑肌细胞增殖等作用^[1]。本文观察西洛他唑是否能通过影响基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及组织型金属蛋白酶抑制剂(tissue metalloproteinase inhibitor, TIMP)的表达, 影响细胞外基质代谢, 从而抑制家兔血管成形术后的内膜增生。

1 材料和方法

1.1 血管成形术模型的制作

日本雄性大耳白兔 40 只, 由中国医科大学动物部提供, 体重 2.3 ± 0.5 kg, 4~5 月龄, 单笼、固定温度、湿度、饮食及饮水量饲养。随机分为对照组($n=13$)、高脂组($n=13$)和西洛他唑组($n=14$)。最初 4 周对照组喂普通饲料, 另两组喂普通饲料加胆固醇粉[1.5 g/(kg·d)]。经一侧股动脉行股动脉内皮剥脱术, 之后继续喂养 4 周, 于第 8 周末在 X 光下经另一侧股动脉行腹主动脉造影, 对造影显示狭窄超过 50% 的部位行血管成形术, 球囊直径 3.5~4.0 mm, 压力 6~8 个大气压, 扩张 3 次, 每次 30 s, 间隔

[收稿日期] 2003-12-31 [修回日期] 2004-05-31

[作者简介] 张子新, 博士, 讲师。宋丽新, 技师。曾定尹, 教授, 博士研究生导师。

1 min。术后各组均改喂普通饲料,西洛他唑组于术前3天加喂西洛他唑 50 mg/(kg·d)。最后各组家兔气栓处死。

1.2 病理标本采集

4℃、4%多聚甲醛原位生理压灌流固定后,立即截取部分成形术血管多聚甲醛中固定,逐级脱水、透明、石蜡包埋,连续切片(片厚4 μm)。

1.3 病理形态学观察

HE染色计算机图像分析,测定新生内膜面积、中膜面积及最小管腔面积,每张切片测3次,取平均值。另外计算内膜面积的改变及管腔面积的改变。

1.4 免疫组织化学分析

采用SABC法观察MMP-2、MMP-9、TIMP-1、

TIMP-2蛋白表达情况(一抗购自北京中山生物技术有限公司)。

1.5 逆转录聚合酶链反应

引物及扩增条件见表1(Table 1),以GAPDH为内对照,用图像自动分析仪测定条带强度并计算产物相对值。

1.6 生物化学指标检测

经耳缘静脉采血3 mL,测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。

表1. 引物序列及反应条件

Table 1. The premier sequence and reaction condition of mRNA

目的基因	引物序列	反应条件	PCR产物(bp)
MMP-2	5'引物 5'-AGCCTTCTACCCCCACCTG-3' 3'引物 5'-GCCCTATCCCACTGCCCG-3'	94℃预变性4 min, 94℃变性40 s, 52.5℃复性1 min, 72℃复性1 min, 72℃延伸5 min, 32个循环	313
MMP-9	5'引物 5'-GCCTCCAGCCACCACCACAG-3' 3'引物 5'-CGCCGAACAGCAGCACCTTG-3'	94℃预变性4 min, 94℃变性40 s, 52.5℃复性1 min, 72℃复性1 min, 72℃延伸5 min, 32个循环	536
TIMP-1	5'引物 5'-CCACCAAGATGTTCAAAG-3' 3'引物 5'-GTCTGTCCACAAGCAATG-3'	94℃预变性4 min, 94℃变性40 s, 52.5℃复性1 min, 72℃复性1 min, 72℃延伸5 min, 32个循环	323
TIMP-2	5'引物 5'-GCCAGAAGGAGGTGGACT-3' 3'引物 5'-AGGAGATGTAGCACGGGAT-3'	94℃预变性4 min, 94℃变性40 s, 52.5℃复性1 min, 72℃复性1 min, 72℃延伸5 min, 32个循环	351
GAPDH	5'引物 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' 3'引物 5'-GGTGAAGACGCCAGTGGACTG-3'	94℃预变性4 min, 94℃变性40 s, 60℃复性1 min, 72℃复性1 min, 72℃延伸5 min, 32个循环	299

1.7 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平的变化

家兔血中TG、TC、HDLC和LDLC在胆固醇喂养后均逐渐升高,停止喂养后均下降;西洛他唑治疗4周后血脂水平与高脂组无明显差异(表2, Table 2)。

2.2 血管结构的变化

HE染色显示对照组内膜轻度增生,而高脂组可见明显新生内膜形成,西洛他唑组与高脂组比较管腔面积大,内膜增生程度轻($P < 0.05$)。西洛他唑

组新生内膜增加占管腔面积减少百分比较高脂组明显减少($P < 0.05$;表3, Table 3)。

2.3 基质金属蛋白酶及其抑制剂蛋白的表达

对照组仅于局部损伤内皮见微弱阳性表达(胞浆棕黄色颗粒),高脂组表达强度及范围均增高,西洛他唑组表达比高脂组低,且范围仅见于内膜。这些蛋白的表达最强部位位于内弹力板附近(图1和表4, Figure 1 and Table 4)。

2.4 逆转录聚合酶链反应结果

西洛他唑组MMP和TIMP的表达低于高脂组,且西洛他唑组MMP和TIMP更接近数值1,说明西洛他唑不仅抑制MMP活性,且能调节MMP和TIMP平衡(表5和图2, Table 5 and Figure 2)。

表 2. 三组血脂水平的变化

Table 2. Changes of serum lipids in the three groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n=10$)

指 标	分 组	0 周	4 周	8 周	12 周
TG	正常组	0.83 ± 0.29	0.98 ± 0.54	0.62 ± 0.13	0.50 ± 0.16
	高脂组	0.95 ± 0.25	1.28 ± 0.62	1.1 ± 1.21	0.72 ± 0.31
	西洛他唑组	0.91 ± 0.24	1.08 ± 0.44	1.04 ± 0.75	0.70 ± 0.37
TC	正常组	1.48 ± 0.54	1.24 ± 0.68	0.91 ± 0.34	0.76 ± 0.29
	高脂组	1.61 ± 0.43	11.01 ± 5.68	11.77 ± 7.08	1.17 ± 0.56
	西洛他唑组	1.60 ± 0.36	9.60 ± 9.29	14.09 ± 11.51	1.94 ± 2.61
HDLc	正常组	0.51 ± 0.13	0.40 ± 0.15	0.39 ± 0.13	0.4 ± 0.15
	高脂组	0.56 ± 0.11	1.47 ± 0.89	1.03 ± 0.42	0.41 ± 0.11
	西洛他唑组	0.60 ± 0.14	1.10 ± 0.63	1.34 ± 1.01	0.47 ± 0.08
LDLc	正常组	0.63 ± 0.36	0.54 ± 0.39	0.29 ± 0.20	0.28 ± 0.10
	高脂组	0.74 ± 0.39	4.80 ± 2.87	6.60 ± 3.93	0.54 ± 0.47
	西洛他唑组	0.67 ± 0.26	6.02 ± 6.27	7.36 ± 5.56	1.07 ± 1.97
HDLc/TC	正常组	0.36 ± 0.08	0.36 ± 0.10	0.45 ± 0.10	0.54 ± 0.09
	高脂组	0.36 ± 0.10	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.40 ± 0.15
	西洛他唑组	0.38 ± 0.07	0.20 ± 0.11	0.11 ± 0.04	0.43 ± 0.18

表 3. 血管结构的变化

Table 3. Changes of vascular structure in the three groups ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分 组	新生内膜面积 (mm ²)	管腔面积 (mm ²)	中膜面积 (mm ²)	△新生内膜面积/ △管腔面积
对照组	0.35 ± 0.14	2.6 ± 0.67	0.87 ± 0.13	
高脂组	0.81 ± 0.24 ^b	1.69 ± 0.78 ^b	0.88 ± 0.34	0.46 ± 0.12/0.91 ± 0.04 (50.5%)
西洛他唑组	0.56 ± 0.24 ^{ac}	2.04 ± 0.44 ^{ac}	0.96 ± 0.26	0.21 ± 0.09/0.56 ± 0.03 (37.4%) ^c

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与高脂组比较。

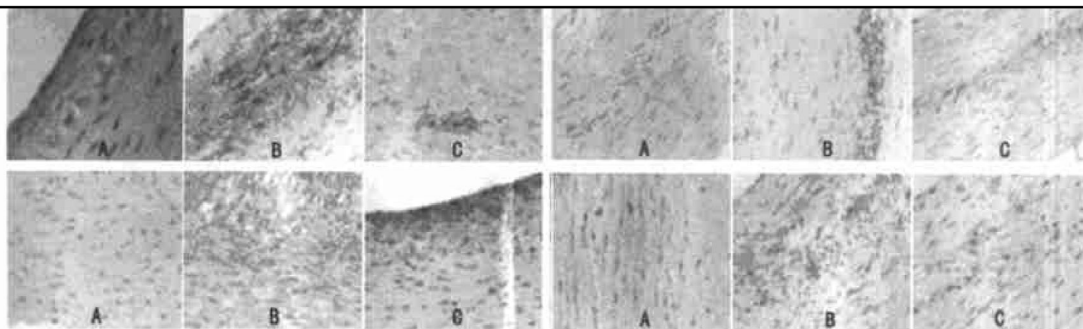


图 1. 免疫组织化学分析 (40×) 左上为基质金属蛋白酶 2, 左下为基质金属蛋白酶 9, 右上为组织型金属蛋白酶抑制剂 1, 右下为组织型金属蛋白酶抑制剂 2; A 为对照组, B 为高脂组, C 为西洛他唑组。

Figure 1. Immunohistochemical analysis

3 讨论

血管损伤后, 血小板释放血小板源生长因子增加, 而后者是 MMP 分泌的刺激因子, 可使 MMP 及 TIMP mRNA 水平升高。因而血小板在血管成形术后内膜增生的发生中具有重要作用^[2]。

目前认为血管成形术后再狭窄的发生是新生内膜形成及血管重塑的总和。其中细胞外基质不仅是新生内膜的主要成分, 且在血管重塑过程中亦起重要作用。许多证据表明, MMP 在粥样斑块中表达增加, 且容许血管平滑肌细胞从血管中膜迁移至内

表 4. 基质金属蛋白酶及其抑制剂免疫组织化学分析

Table 4. MMP and TIMP of immunohistochemical analysis ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分 组	MMP-9		TIMP-1		MMP-2		TIMP-2	
	阳性面积	光密度	阳性面积	光密度	阳性面积	光密度	阳性面积	光密度
对照组	29.38% \pm 2.66%	0.26 \pm 0.07	16.46% \pm 1.45%	0.26 \pm 0.05	28.39% \pm 1.46%	0.27 \pm 0.05	17.28% \pm 2.05%	0.28 \pm 0.07
高脂组	46.75% \pm 1.67% ^b	0.39 \pm 0.09 ^b	30.18% \pm 1.33% ^b	0.49 \pm 0.08 ^b	47.66% \pm 1.54% ^b	0.37 \pm 0.11 ^b	32.19% \pm 1.73% ^b	0.48 \pm 0.04 ^b
西洛他唑组	37.45% \pm 2.42% ^{ac}	0.32 \pm 0.03 ^{ac}	22.09% \pm 1.91% ^{ac}	0.36 \pm 0.06 ^{ac}	38.39% \pm 3.62% ^{ac}	0.31 \pm 0.06 ^{ac}	24.38% \pm 1.05% ^{ac}	0.32 \pm 0.04 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与高脂组比较。

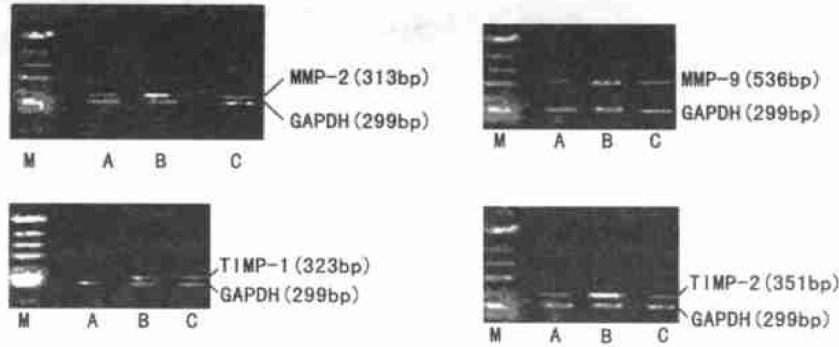


图 2. 逆转录聚合酶链反应产物电泳结果 A 为对照组, B 为高脂组, C 为西洛他唑组。

Figure 2. Electrophoresis analysis of RT-PCR products

表 5. 逆转录聚合酶链反应结果

Table 5. Result of RT-PCR ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分 组	对照组	高脂组	西洛他唑组
MMP-2	0.917 \pm 0.127	1.024 \pm 0.129 ^b	0.976 \pm 0.134 ^{ac}
MMP-9	0.942 \pm 0.129	1.002 \pm 0.130 ^b	0.962 \pm 0.134 ^{ac}
TIMP-1	0.948 \pm 0.122	1.053 \pm 0.126 ^b	0.976 \pm 0.118 ^{ac}
TIMP-2	0.959 \pm 0.136	1.019 \pm 0.137 ^b	0.967 \pm 0.131 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与高脂组比较。

膜, 其中 MMP-2、MMP-9 的活化是动脉损伤后平滑肌细胞向内膜迁移、增生所必需^[3]。MMP 的活化和它们的蛋白水解能力被 TIMP 严格控制, TIMP 是一种内源性低分子量蛋白质, 它有两个功能区, 可与 MMP 形成复合体, 从而阻断 MMP 与底物结合所启动的生物学效应^[4]。

本实验结果发现, 新型抗血小板制剂西洛他唑可以抑制血管内膜增厚及管腔狭窄, 对血管中膜无明显影响, 这与前人结果相似^[5], 且与高脂组比较, 应用西洛他唑 4 周时内膜增生程度轻、管腔面积丢失少, 内膜增生减少 12.6%。高脂组血管损伤部位

的 MMP-1、MMP-2 和 TIMP-1、TIMP-2 mRNA 和蛋白表达均比西洛他唑组高, 提示 MMP 的高表达, 使 TIMP 反应性的表达增高, 以期与 MMP 在高水平上重新达到平衡。西洛他唑治疗 4 周后 MMP 及 TIMP 水平下降, 而且 MMP/TIMP 比值接近 1。说明西洛他唑可以使二者表达下降且能调节二者之间的平衡, 使基质合成与降解基本平衡, 从而抑制了内膜增生的发生, 并能影响血管重塑过程。

[参考文献]

- [1] Nobukazu Ishizaka, Junichi Taguchi, Yukiokimura, et al. Effects of a single local administration of Cilostazol on neointimal formation in balloon injured rat carotid artery. *Atherosclerosis*, 1999, **142**: 41-46
- [2] Lefkovits J, Topol EJ. Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Progress in Cardio Disease*, 1997, **40** (2): 141-158
- [3] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 1995, **77**: 863-868
- [4] Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Increased secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 from the aortas of cholesterol fed rabbits partially counterbalances increased metalloproteinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 1700-1707
- [5] Take S, Matsutani M, Ueda H, et al. Effect of Cilostazol in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardio*, 1997, **79**: 1097

(此文编辑 文玉珊)