

基质金属蛋白酶及其抑制因子与心肌纤维化

王丽萍 综述, 杨方 审校

(华北煤炭医学院病理学教研室, 河北省唐山市 063000)

[关键词] 病理学与病理生理学; 细胞外基质; 综述; 基质金属蛋白酶; 心肌纤维化

[摘要] 细胞外基质是构成心脏间质的主要成份。在各种致病因素作用下, 细胞外基质沉积的异常增加导致了心肌纤维化的发生。基质金属蛋白酶及其抑制因子的相互作用在这一过程中起着关键作用。本文就基质金属蛋白酶及其抑制因子在心肌纤维化中的作用进行综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

正常心脏是由心肌细胞(cardiac myocyte)及周围的心脏间质组成。心脏间质主要包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及其脉管系统。其中 ECM 围绕在心肌细胞周围, 以保持心脏结构与功能的完整性, 它在细胞与细胞的相互联系中发挥着重要作用^[1]。同时许多研究证实, ECM 不仅对支持和连接心肌起重要作用, 它也决定着心肌的顺应性^[2]。正常生理状态下心脏 ECM 的合成与降解维持着一动态平衡。心脏 ECM 成分的过度生成或异常降解都会破坏心肌的力学性质和心室的结构, 影响心脏的功能。心肌纤维化(myocardial fibrosis)是指在许多病理状态下(如心肌梗死、高血压和扩张性心脏病等)心肌间质成纤维细胞增殖, ECM(主要是Ⅰ型和Ⅲ型胶原纤维)沉积异常增加, 使心肌结构与功能发生重塑(myocardial remodeling)。以往对纤维化形成机制的研究多聚焦在对 ECM 合成的调节方面。近年来, 人们注意到 ECM 降解也与心肌纤维化形成关系密切, 其中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)与基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)的调节起着重要的作用。

1 基质金属蛋白酶及其抑制因子概述

基质金属蛋白酶是一组锌离子依赖性内肽酶, 包括多个结构相似、能够消化基质和基膜的酶, 目前至少已确定了 18 种。根据结构域及酶与底物亲和力的不同分为胶原酶、明胶酶、间质溶解酶和膜型金属蛋白酶^[3]。所有 MMP 均有以下理化特性: ①以酶原形式分泌; ②含有 2 个锌离子, 其中一个位于催化活性中心, 为酶活性所必需的辅助因子; ③含有 2 个钙离子, 参与酶活性的激活, 并为酶活性的稳定性所必需;

均为内肽酶(endopeptidases), 能从肽链中裂解底物; ④酶活性可被相应的特异性抑制因子 TIMP 所抑制。MMP 的功能其一是几乎能降解除多糖以外的所有 ECM 成分; 其二可激

活其它 MMP, 形成瀑布效应, 在胚胎发育、组织重塑中起着极为重要的作用^[4,5]。MMP 表达下调和酶激活过度受抑, 可能参与了许多表现为 ECM 过多沉积的病理过程(如动脉粥样硬化、多种结缔组织疾病和重要脏器纤维化形成过程等)^[6]。

大多数 MMP 在正常成人组织中低水平表达, 但多种炎症细胞因子如白细胞介素 1(interleukin 1, IL-1)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、生长因子如转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等均可诱导 MMP 的表达。此外, 细胞外基质金属蛋白酶诱导物(extracellular matrix metalloproteinase inducers, EMMPRIN), 具有诱导 MMP 基因表达的作用^[7-10]。MMP 主要以酶原的形式分泌到细胞外, 需经过蛋白酶的水解才能活化, 已发现 MMP 有 3 种不同的激活方式, 第一种是细胞外由血清蛋白酶所介导, 即通过丝氨酸蛋白酶(如血清酶、胰蛋白酶、尿激酶等)分解酶原, 使金属蛋白酶中半胱氨酸序列的 Zr-Cys 断裂而具有部分活性, 再通过别的金属蛋白酶如 MMP-3 进一步分解, 形成具有完全活性的 MMP; 第二种是原生质膜上由膜型 MMP 所介导, 这一机制被认为在细胞转移、降解细胞周围基质过程中起着重要作用; 第三种是细胞内激活。文献^[11]也证实 MT-MMP 也存在着细胞内激活, 但其机制有待进一步研究^[11]。

基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)为 MMP 的特异性抑制因子, 存在于多种组织中。现已发现 4 种 TIMP, 分别命名为 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4。TIMP-1(28 kDa)由巨噬细胞和结缔组织细胞产生, 广泛存在于组织和体液中, 能被多种细胞因子诱导产生; 而 TIMP-2(21 kDa)多随 MMP-2 的表达而表达, 很少受细胞因子的诱导; TIMP-3 仅存在于 ECM 中; TIMP-4 在心脏中有较高表达。TIMP 分为两个功能区, 其 N 端功能区的半胱氨酸残基与 MMP 的锌离子活性中心结合, 其 C 端功能区与 MMP 的其它部位结合, 以 1:1 的比例形成 MMP-TIMP 复合体, 从而阻断 MMP 与底物结合, 属于转录后调节机制^[12,13]。

基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)基因表达与多种

[收稿日期] 2004-08-27

[修回日期] 2005-07-14

[作者简介] 王丽萍, 硕士研究生, 研究方向为器官纤维化形成机制及其防治, 联系电话为 0315-3725747/13509104541。杨方, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为器官纤维化形成机制及其防治, 联系电话为 0315-3725740。

细胞因子和生长因子调节密切相关。如 $\text{TNF-}\alpha$ 可以诱导成纤维细胞明胶酶 B (MMP-9) 和胶原酶表达。TGF- β 转基因大鼠中, TIMP-1、4 的表达升高 2.5 倍, TIMP-2 表达升高 6 倍^[14,15]; 一些转录因子(如核因子- κ B 等)在某些 TIMP 基因启动子上也具有其特异性结合位点, 细胞外激活这些转录因子后即可诱导 TIMP 的表达。

2 基质金属蛋白酶及其抑制因子与心肌纤维化

心肌间质内纤维性胶原成分构成心肌的胶原网络, 对心肌细胞的效能甚至整体心脏的工作都起着重要作用。在一些诱发事件(如急性心肌梗死、基因编码的调整、急性炎症、高血压等)的作用下, 胶原成分降解, 胶原网络结构破坏, 使心肌细胞间的连接趋于松散, 心肌细胞排列紊乱, 正常的间质结构消失。心肌胶原网络的破坏在大多数心血管疾病的心脏间质重塑过程中具有重要意义^[16,20]。已发现在许多心血管疾病状态下, 心肌间质胶原纤维的数量、比例、结构形态发生改变。在缺血性心脏病和缺血性心肌病出现替代性心肌纤维化时, 心肌细胞的凝固性坏死或凝固性肌溶解的同时胶原纤维逐渐增多; 而在心肌细胞的液化性溶解中, 肌原纤维与细胞器广泛溶解消失, 胶原沉积而使网架变得粗厚。王长谦等^[21]研究提示, 压力负荷增加性心肌肥厚时伴有心肌胶原网络的重构, 心肌胶原的增多和纤维化先发生在冠状动脉小血管周围, 以后逐渐累及心肌细胞间隙。Sun 等^[16]在为期 4 周的大鼠心肌梗死实验模型中发现, 胶原合成在心肌梗死后不久被激活, 并一直维持到实验研究结束, 而胶原降解在组织修复的早期阶段被激活, 在纤维形成阶段受到了抑制。在人、大鼠和小鼠的透壁性心肌梗死发生后, 由纤维组织增生引起心脏结构的重塑, 不仅仅发生在心肌梗死的部位, 也发生在远离梗死的心室部位, 导致室壁组织顺应性下降及硬度增加, 心室舒张功能障碍。

心肌间质胶原的沉积一方面有胶原的过量生成, 另一方面也有胶原的降解受抑。MMP 不仅在基质降解中起作用, 而且也参与胶原合成的调节, 最终的结果常常是 MMP 表达增高同时伴随纤维化的增多。研究发现, 心力衰竭患者的 MMP 活性增加, 且与进行性左心室扩张和球形增大有关, 这表明 MMP 在调节 ECM 更新和影响心肌几何形状中具有重要作用^[22]。在心肌梗死的病例中, 胶原的损伤发生甚早, 甚至在心肌细胞坏死之前即已出现, 非梗死区胶原大量蓄积, 导致心肌的纤维化。虽然梗死后 MMP 活性及表达时间及时相各学者报道不尽一致, 但可以肯定, 一些 MMP 在心肌梗死发生一天内就被激活来分解过多产生的胶原, 这可能是机体的一种自我调节机制。而 MMP 基因多态性而导致其转录水平的差异, 可能与患者梗死区的愈合、左心室的重塑、终末期心力衰竭的进展、心脏破裂等不同的心肌梗死后临床事件的差异密切相关^[23,25]。这在一些动物模型中已得到证实。如在猪进展型心力衰竭模型中发现, 选择性 MMP-1 抑制剂可减轻心室壁张力, 降低血清去甲肾上腺素水平^[26]。在 MMP-9 基因缺陷的大鼠, 其心肌梗死区白细胞浸润减少和梗死区域扩大, 心肌梗死后愈合过程延长^[27]。Romanic 等^[28]在

MMP-9 基因敲除小鼠模型中发现, 与普通小鼠相比, 心肌梗死面积减少 35%。

正常心肌组织 MMP 主要以非活性状态存在, 细胞外间质存在的组织金属蛋白酶抑制物 TIMP 是 MMP 呈非活性状态存在的主要原因^[29,30]。研究发现, 大鼠在心肌梗死后第 3 天, 心肌梗死部位 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 mRNA 表达增加, 一直维持超过 4 周, TIMP 在心肌梗死后合成的激活能进一步抑制 MMP 的活性, 从而抑制梗死心脏胶原的降解。也有研究证实, TIMP-1 基因在野生型大鼠中的过度表达可导致心肌梗死区白细胞浸润减少, 血管新生减少, 胶原含量减少, 同时坏死区域扩大, 这些因素最终共同导致心肌梗死愈合延迟^[27]。在缺血性心脏病和特发性扩张性心脏病病人的心脏组织中, TIMP-1 及 TIMP-3 mRNA 及蛋白表达水平均下降, TIMP-2 及 TIMP-4 mRNA 水平无显著变化, 但 TIMP-4 蛋白水平下降, 而 TIMP-2 蛋白水平各家报道不一^[31,32]。虽然 TIMP 在大鼠心脏中的过度表达会对心肌纤维化带来不利影响, 但研究证实, 它可减少心肌梗死后心脏破裂的发生。

3 基质金属蛋白酶及其抑制因子的平衡失调与心肌纤维化

胶原的代谢维持着一个动态的平衡, 每天新合成的胶原占胶原总量的 5%, 每天有 60% 的胶原在成纤维细胞的线粒体和溶酶体中被降解, 这对于维持器官的结构与功能具有十分关键的作用。一旦这种平衡被破坏, 胶原产生增多或降解下降, 均可使胶原过多沉积, 导致纤维化的发生。而 MMP/TIMP 系统的表达平衡对于胶原代谢的平衡是至关重要的。MMP 与 TIMP 相互作用形成动态平衡, 维持正常心肌 ECM 的合成与分解。各种原因引起的 MMP/TIMP 的平衡失调都将导致 ECM 降解水平的失衡^[33]。充血性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF) 发展中出现内源性 MMP 抑制性调控丧失, MMP 表达增加和激活, 从而导致 MMP/TIMP 平衡失调。Sivarubramanian 等^[34]实验观察到, 血浆中 MMP/TIMP 活性平衡随时间的改变, 导致转基因小鼠 (MHCsTNF) 左心室重塑时心肌胶原纤维含量的变化。动脉粥样硬化的同时也伴随着 MMP-1/TIMP-1 平衡的改变^[35]。这些研究表明, TIMP 是心肌 MMP 活性的重要内源性抑制因子, 它在心肌中的表达可直接参与心脏几何形状和心功能的维持。高血压大鼠心肌成纤维细胞的体外培养证实, 成纤维细胞通过产生过多的胶原而在心肌纤维化中发挥重要作用, 而 MMP/TIMP 的平衡变化又成为这一作用的关键。当左心室肥大转化成心力衰竭时, 高血压大鼠心肌成纤维细胞中 TIMP-2、4 和 MMP-2 表达均增高, MMP-2 的活性在发生心力衰竭之前即有明显增高, 而 TIMP-2、4 的增高晚于 MMP-2, 导致 MMP/TIMP 的平衡失调, 纤维化形成, 加速了心力衰竭的发生。临床研究也发现, 在慢性高血压患者中, MMP-1 表达下降的同时, TIMP-1 的表达上升或无变化。这种 MMP-1/TIMP-1 平衡的失调与慢性高血压的纤维化进展关系密切。Roten 等^[30]在 TIMP-1 基因敲除大鼠中发现, 在其 4 个月龄时, 左心室舒张末期容积、舒张末期压力、左心室舒张末期室壁应力显著增加, 同时发现心肌胶原

的含量下降。据报道,跨膜蛋白 EMMPRIN(the human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor)能在体外诱导人左心室心肌 MMP 产生,在心肌纤维化中可以观察到,EMMPRLN 水平增高,伴随着特定 MMP 的增加,但 TIMP-1 水平却没有改变或实际上下降了。

基质金属蛋白酶(MMP)参与了心脏 ECM 的重塑过程,MMP 相互之间的作用以及它们与其调节因素之间的相互作用在心肌纤维化发生、进展过程中的作用还有待深入研究。同时,MMP 抑制剂可以调节动物模型心脏重塑过程,改善心功能,这使得人们开始设想用 MMP 抑制剂来治疗心肌梗死、扩张性心肌病以及充血性心力衰竭的病人。虽然这些仍处在动物模型的实验阶段,但 MMP 抑制剂在动物实验模型中的良好效果提示,MMP 抑制剂将有可能成为心肌梗死、扩张性心肌病及心力衰竭等疾病的一种治疗方法与手段。

[参考文献]

- [1] Tayebie MH, MacFadyen RJ, Lip GYH. Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *Hypertension*, 2003, **21** (6): 2 211-218
- [2] Shen Xiang-chun, Qian Zhuyu. Matrix metalloproteinases: A new target of the treatment of cardiac hypertrophy. *Pharmaceut Biotechnol*, 2003, **10** (2): 325-328
- [3] Marti HP. Role of matrix metalloproteinases in the progression of mallesions. *Press Med*, 2000, **29** (14): 811-817
- [4] Haas TL, Davis SJ, Madri JA. Three dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1998, **273** (6): 3 604-610
- [5] Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tiss Res*, 1998, **291** (1): 133-148
- [6] Celentano De, Frishman WH. Matrix metalloproteinases and coronary artery disease: a novel therapeutic target. *J Clin Pharmacol*, 1997, **37** (11): 991-1 000
- [7] Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest*, 1998, **101** (6): 1 478-487
- [8] Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem*, 1996, **271** (48): 30 375-380
- [9] Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*, 2000, **102** (16): 1 944-949
- [10] Wassenaar A, Verschuur T, Kievits F, Der Hartog MT, Kapsenberg ML, Everts V, et al. CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinase by gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 1999, **115** (1): 161-167
- [11] 张涛, 李自成. 基质金属蛋白酶与心脏疾病. *中华临床杂志*, 2003, **3** (6): 47-50
- [12] Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinase. *Biol Chem*, 1997, **378** (3-4): 151-160
- [13] Route-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C. Angiotensin I^{25} induces nuclear factor- κ B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signalling pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32** (10): 1 767-778
- [14] 孙桂玲, 张莉, 管耕园. 基质金属蛋白酶抑制剂与冠心病. *J Clin Cardiol (China)*, 2003, **19** (10): 634-636
- [15] Seeland U, Haeseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfizner T, Scharfetter-Kochanek K, et al. Myocardial fibrosis in transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest*, 2002, **32** (5): 295-303
- [16] Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*, 2000, **135** (4): 316-323
- [17] Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, et al. myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpression tumor necrosis factor α can be modulated by anti-tumor necrosis factor therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (23): 12 746-751
- [18] Cavin MA, Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA. ACE-SDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction. *Hypertension*, 2004, **43** (5): 229-236
- [19] 宋丽娟, 王洪霞, 李剑, 施海明. 基质金属蛋白酶与左心室重构. *中国实用内科杂志*, 2003, **23** (8): 505-506
- [20] Fang Y, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA, et al. Myocardial infarction and cardiac remodeling in mice. *Exp Physiol*, 2002, **87** (5): 547-555
- [21] 王长谦, 黄定九, 丁弘毅, 谢秀兰, 徐依敏, 陈润芬. 肥厚心肌胶原及基质金属蛋白酶的活性变化. *基础医学与临床*, 2000, **20** (2): 118-121
- [22] Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF Jr. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy: Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol*, 1996, **148** (5): 1 639-648
- [23] Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berber-Bertrand L, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci*, 2001, **68** (7): 799-814
- [24] Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemic and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30** (7): 1 431-442
- [25] Hojo Y, Ikeda U, Ueno S, Arakawa H, Shimada K. Expression of matrix metalloproteinase in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J*, 2001, **65** (2): 71-75
- [26] King MK, Coker ML, Goldberg A, McElmurray JH, Gunasinghe HR, Mukherjee R, et al. Selective matrix metalloproteinase inhibition with developing heart failure: Effects on left ventricular function and structure. *Circ Res*, 2003, **92** (2): 177-185
- [27] Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*, 1999, **5** (10): 1 135-142
- [28] Romanic AM, Harrison SM, Ban W, Burns-Kurtis CL, Pickering S, Gu J. Myocardial protection for ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res*, 2002, **54** (3): 549-558
- [29] Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S, et al. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39** (8): 1 384-391
- [30] Roten L, Nemoto S, Sinsic J, Coker ML, Rao V, Baicu S. Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32** (1): 109-120
- [31] Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ, Spinale FG, et al. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 1998, **97** (17): 1 708-715
- [32] Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation*, 1998, **98** (17): 1 728-734
- [33] 陈晓峰, 顾振纶, 唐礼江. 基质金属蛋白酶在心力衰竭中作用的研究进展. *中国药理学通报*, 2004, **20** (2): 137-140
- [34] Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, Madellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation*, 2001, **104** (7): 826-831
- [35] Lopez B, Gonzalez A, Diez J. Role of matrix metalloproteinases in hypertensive associated cardiac fibrosis. *Current Opinion Nephrology Hypertension*, 2004, **13** (11): 197-204

(此文编辑 胡必利, 朱雯霞)