

[文章编号] 1007-3949(2005)13-05-0583-03

• 实验研究 •

吸烟大鼠脑血管内皮细胞基质金属蛋白酶 9 的表达

刘 菲¹, 柳忠兰², 刘淑杰³

(1. 沈阳医学院附属第二医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110002;

2. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001; 3. 沈阳市 242 医院内科, 辽宁省沈阳市 110034)

[关键词] 神经病学; 脑缺血发病机制; 免疫组织化学; 脑梗死; 基质金属蛋白酶; 吸烟; 内皮细胞

[摘要] 目的 观察不同吸烟量的大鼠脑血管内皮细胞基质金属蛋白酶 9 的表达, 初步探讨吸烟导致脑缺血的发病机制。方法 选择健康 Wistar 大鼠 60 只, 分为正常对照组、短期大量吸烟组、长期大量吸烟组、长期少量吸烟组、戒烟组和非吸烟组。通过免疫组织化学染色观察大鼠脑血管内皮细胞基质金属蛋白酶 9 的表达。结果 基质金属蛋白酶 9 阳性反应物呈棕黄色, 正常对照组及非吸烟组细胞基质金属蛋白酶 9 表达极少, 余各组有不同程度表达, 且与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 吸烟可致脑血管内皮细胞基质金属蛋白酶 9 表达增加, 且随着吸烟量和吸烟时间的增加表达增多, 戒烟后表达下降。细胞基质金属蛋白酶 9 在吸烟时脑血管内皮细胞的表达增加可能是吸烟致脑梗死的主要途径之一。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Expression of Matrix Metalloproteinase-9 on Vascular Endothelial Cell in Smoked Rat Brain

LIU Fei¹, LIU Zhong-Lan², and LIU Shu-Jie³

(1. The Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110002; 2. The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001; 3. Shenyang 242 Hospital, Shenyang 110034, China)

[KEY WORDS] Cerebral Infarction; Matrix Metalloproteinase; Smoking; Endothelial Cell; Atherosclerosis; Cerebrovascular Disease

[ABSTRACT] **Aim** The ischemic cerebrovascular disease (ICVD) has been commonly thought one of the three main causes of death in human. The dangerous factors include hypertension, diabetes, atherosclerosis, smoking, drinking and so on. Smoking has been confirmed independent factor in stroke. Matrix metalloproteinase is one of main enzyme dissolved extral cell membrane. Studies have indicated that matrix metalloproteinase-9 had played an important role in the arteriosclerosis. They all join the appearance of the cerebral infarction. **Methods** Materials 60 healthy Wistar rats supplied by Department of experiment animal of China Medical University were used. Monoclonal antibody of MMP-9 and SABC test box were from BOSTER Biotechnology CO. LTD. Cigarettes were purchased from markets. Method The Wistar rats were divided into 6 groups: normal group ($n = 6$), short-time and big-dose smoking group ($n = 12$), long-time and big-dose smoking group ($n = 12$), long-time and small-dose smoking group ($n = 12$), giving-up smoking group ($n = 12$), control group ($n = 6$). We obtained brain following experiment ending and observed expression of smoked rat by immunohistochemistry stain. **Results** The positive substance of MMP-9 showed brown. The expression of MMP-9 in normal group and control group is weak. The significant different expression is observed in other groups ($P < 0.05$). Giving up smoking can reduce the expression of MMP-9. **Conclusions** Smoking can make MMP-9 express more in endothelial cell. The expression of MMP-9 is dose-dependent and time-dependent. Giving up smoking can reduce expression of MMP-9. The expression of MMP-9 in cerebrovascular endothelial cell may be one of main ways in cerebral infarction caused by smoking.

缺血性脑血管病是常见病及多发病, 约占所有疾病死亡人数的 10%, 是目前人类疾病的三大死亡原因之一。导致该病的危险因素很多, 包括年龄、性别、高脂血症、高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、TIA、心脏病、肥胖、吸烟及饮酒等。许多临床研究也已证

实吸烟是动脉粥样硬化和脑血栓形成的重要危险因素, 然而吸烟引起脑血栓形成的确切机制尚不清楚。基质金属蛋白酶是分解细胞外基质的蛋白酶类中最重要的一类。它们参与多种病理过程, 包括血管再生、肿瘤浸润及转移、炎症反应等。它们与动脉粥样硬化、缺血性脑损伤关系密切。体外和体内实验均证实细胞基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在动脉粥样硬化这一病理过程中发挥极为重要的作用^[1, 2]。Romomic 等结合运用多种方法

[收稿日期] 2004-10-11 [修回日期] 2005-05-18

[作者简介] 刘菲, 硕士, 主治医师, 主要从事急性脑梗死的介入治疗研究, E-mail 为 liufei@126.com。柳忠兰, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。刘淑杰, 硕士, 副主任医师。

观察大鼠大脑中动脉闭塞后 MMP-9 的表达,发现其出现在缺血区及周边区的内皮细胞、中性粒细胞和巨噬细胞上,提示 MMP-9 表达的增加与脑缺血损伤有强相关性,但目前未见到有关吸烟对 MMP-9 表达的影响的报道。本研究观察不同吸烟量的大鼠脑血管内皮细胞基质金属蛋白酶 9 的表达,初步探讨吸烟导致脑缺血的发病机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康 Wistar 大鼠 60 只购于中国医科大学动物实验中心, MMP-9 单克隆抗体、SABC 试剂盒购于武汉博士德生物制品实验有限公司, 用烟为市售 x 牌香烟。

1.2 动物模型的制备

健康 Wistar 大鼠 60 只分为 6 组: 正常对照组不做任何处理; ④短期大量吸烟组每次吸烟 10 支, 每天 2 次, 连续吸烟 30 天; ④长期大量吸烟组每次吸烟 10 支, 每天 2 次, 连续吸烟 90 天; 长期小量吸烟组每次吸烟 4 支, 每天 2 次, 连续吸烟 90 天; 戒烟组每次吸烟 10 支, 每天 2 次, 连续吸烟 30 天, 戒烟 30 天; 非吸烟组放入同样烟仓不吸烟。

1.3 切片制备

实验结束后次日各组随机取鼠, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉。经左心室—主动脉用 1% 肝素化生理盐水 100 mL 快速冲洗, 冲洗液变清后, 再以 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 150 mL 灌注固定。开颅取脑, 常规脱水, 浸蜡, 石蜡包埋, 连续于石蜡切片机上自视交叉平面切取冠状切片。

1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片经二甲苯、乙醇脱蜡至水。经 0.1 mol/L PBS 反复冲洗 3 次, 每次 5 min。蒸馏水冲洗, 3% H₂O₂ 孵育 10 min, 微波抗原修复后 PBS 冲洗。滴加正常山羊血清工作液室温孵育 40 min 封闭。倾去血清, 滴加 MMP-9 抗体, 4℃冰箱过夜。PBS 冲洗, 滴加生物素标记的第二抗体, 37℃室温孵育 30

min, PBS 冲洗 3 次。滴加 SABC 工作液, 37℃孵育 30 min, PBS 冲洗。DAB 显色, 自来水充分冲洗。苏木素轻度复染, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。免疫组织化学染色阴性对照以 PBS 代替一抗孵育, 余步同上。

1.5 统计学处理

在 40×10 倍的光镜视野下, 对切片的 MMP-9 阳性细胞进行计数, 每只鼠每组各 1 张切片。每个切片分别随机取 5 个不重叠视野。阳性反应物为突出于背景的棕黄色沉积, 未见明确棕黄色沉积或着色浅淡与背景几乎一致者为阴性, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS8.0 软件包进行数据处理。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义的判定标准。

2 结果

正常对照组及非吸烟组 MMP-9 的表达极少; 长期大量吸烟组 MMP-9 的表达明显高于其他各吸烟组及戒烟组; 戒烟组 MMP-9 的表达明显低于其他给各吸烟组, 但高于对照组和非吸烟组(表 1, Table 1)。MMP-9 阳性反应物呈棕黄色, MMP-9 定位于血管内皮细胞的细胞浆, 在血管内皮细胞及血脑屏障处均有表达(图, Figure 1)。

表 1. 基质金属蛋白酶 9 阳性血管内皮细胞数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The positive cell of Matrix metalloproteinase 9 in vascular endothelial cell

分 组	n	阳性血管内皮细胞数 (个/5 高倍视野)
正常对照组	8	0.6 ± 0.2
非吸烟组	6	0.6 ± 0.2
长期大量吸烟组	8	21.3 ± 1.2 ^a
长期小量吸烟组	9	14.1 ± 1.6 ^{ab}
短期大量吸烟组	9	12.3 ± 1.1 ^{ab}
戒烟组	10	10.0 ± 0.4 ^{ab}

a: $P < 0.05$, 与对照组及非吸烟组比较; b: $P < 0.05$, 与长期大量吸烟组比较。

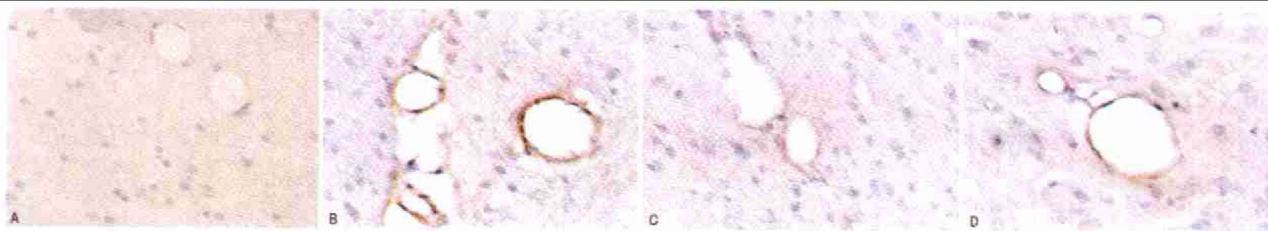


图 1. 基质金属蛋白酶 9 免疫组织化学染色 (×100) A 为正常对照组, 未见阳性血管内皮细胞; B 为长期大量吸烟组, 大量内皮细胞染成棕色; C 为戒烟组, 少量内皮细胞染成棕色; D 为短期大量吸烟组, 较多内皮细胞染成棕色。

Figure 1. Expression of MMP-9 by immunohistochemistry stain

3 讨论

流行病学调查显示,吸烟是缺血性脑血管病的重要危险因素之一,但其引起脑梗死的发病机制目前尚不清楚。近年来研究表明脑血管张力的增加,血管壁本身的破坏,特别是动脉粥样硬化的形成,是脑缺血最重要、最直接的原因。基质金属蛋白酶是分解细胞外基质的蛋白酶类中最主要的一类,它参与血管再生、炎症反应等病理过程。是可以降解细胞外基质分子的锌依赖性酶,降解基底膜的细胞外基质成分依据其组织特异性可分为胶原酶、明胶酶、基质溶素、基质裂素等,其中 MMP-9 即 92kDa 的 ⑤型胶原酶(又称明胶酶 B)是可降解基底膜的细胞外基质成分的主要酶类^[3,4]。它由角化细胞产生,贮存在中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的颗粒中,主要由中性粒细胞和巨噬细胞、上皮细胞等以无活性的酶原分泌在降解其底物前需被激活。激活此酶的蛋白酶为纤溶酶、furin 等丝氨酸蛋白酶^[5,6],其主要的胶原底物为构成基底膜的 ③型胶原。已有研究证明内皮细胞可分泌基质金属蛋白酶包括基底面的 MMP-9,它可促进基底膜的降解。血栓的形成有三要素:血管壁的损伤、血液成分的改变及血流的异常。其中血管壁的损伤特别是动脉粥样硬化的形成是血栓形成的重要病理基础。目前认为血管平滑肌细胞迁移和增殖是导致血管内膜增厚和动脉粥样硬化斑块形成的重要原因。细胞外基质的降解与血管平滑肌细胞从血管中膜向内膜迁移及增殖密切^[7-10]相关。本实验中观察到长期大量吸烟组中内皮细胞上 MMP-9 有大量表达,长期小量吸烟组、短期大量吸烟组、戒烟组中 MMP-9 均有不同程度的表达,且它们之间存在着显著性差异($P < 0.05$)。这提示随着吸烟量及吸烟时间的增加 MMP-9 的表达亦有上调,这可能与吸烟时刺激内皮细胞分泌的组织型纤溶酶原激活物将血中的纤溶酶原转变成纤溶酶有关。MMP-9 可促进基质的溶解从而为巨噬细胞的粘附及穿过内皮形成斑块及血管平滑肌细胞的迁移创造了条件^[11]。这样由于细胞增殖和细胞外基质沉积最终导致斑块的形成,从而进一步导致脑内血栓的形成。本实验中观察到随着吸烟的量和时间的增

加 MMP-9 的表达上调,同时也观察到 MMP-9 的表达在血脑屏障的表达较多,这与文献中报道的一致。提示吸烟可能通过 MMP-9 的上调而致血管壁动脉粥样硬化的形成,最终而致血栓的形成,同时吸烟也可致血脑屏障的破坏而使炎细胞侵入脑组织而导致神经组织的损伤。

吸烟引起脑血管疾病发生的机制是一个复杂的多因素共同作用的结果,本实验揭示吸烟可能通过引起内皮细胞结构和功能的损害而激发脑血管内皮细胞 MMP-9 的表达增加,从而进一步引起血管内皮细胞的屏障功能破坏动脉粥样硬化的形成,最终导致血栓的形成。这为我们了解缺血性脑血管病的发病机制及临床治疗提出了新的途径。目前关于吸烟所致 MMP-9 表达上调的机制尚不清楚,这为进一步研究吸烟与血栓的关系提出了新的课题。

[参考文献]

- [1] Lofus IM, Ross Naylor A, Stephen Goodall, Matthew Crowther, Louise Jones, Bell PRF, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke*, 2000, 31 (1): 40-47
- [2] 陈兴洲, 陆冰勋. 基质金属蛋白酶与脑血管病. 国外医学·脑血管病分册, 1999, 7 (4): 197-200
- [3] 谢逸群, 杨期东. MMP-2, MMP-9 与脑缺血损伤研究进展. 国外医学·神经病学神经外科学分册, 2000, 27 (4): 172-174
- [4] 周冀英, 董为伟, 贾建平. 脑梗死患者外周血中白细胞基质金属蛋白酶 9 表达的研究. 实用医学杂志, 2004, 20 (4): 371-373
- [5] Rajavashisth TB, Xu XP, Stefan Joving, Simcha Meisel, Xu XQ, Chai NN, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*, 1999, 99: 3 130-109
- [6] Ferrans VJ. New insights into the world of MMPs. *Circulation*, 2002, 105: 405-407
- [7] Rolfe BE, Muddiman JD, Smith NJ, Campbell GR, Campbell JH. Matrix metalloproteinase can facilitate the heparanase induced promotion of phenotype change in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 2000, 149: 97-106
- [8] Aernout Lutun, Esther Lutgens, Ann Manderveld, Kathleen Maris, D'sir Collen, Peter Carmeliet, Lieve Moons. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation*, 2004, 109: 1 408-414
- [9] Amesim Cho, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circulation Research*, 2002, 91: 845-851
- [10] 于滢, 杨向红. 基质金属蛋白酶与动脉粥样硬化及斑块破裂的关系. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (6): 592-595
- [11] 李江, 赵水平, 彭道泉, 李全忠, 聂赛. 西立伐他汀对 THP-1 细胞 CD-40 和基质金属蛋白酶 9 表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (6): 533-536

(此文编辑 文玉珊)