

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-01-0050-03

辛伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶9表达的影响

张承俊¹, 朱兴雷²

(1. 济南市第一人民医院, 山东省济南市 250011; 2. 山东省立医院, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 他汀类药物的抗动脉粥样硬化作用; 逆转录聚合酶链反应; 辛伐他汀; 人脐静脉内皮细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 基质金属蛋白酶9

[摘要] 目的 观察辛伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶9表达的影响, 以期探讨辛伐他汀可能的非调脂抗动脉粥样硬化的作用。方法 选用体外培养的人脐静脉内皮细胞加 20 μ g/L 肿瘤坏死因子 α 及 0.01、0.1、1.0 和 10 μ mol/L 辛伐他汀共同孵育 6 h、12 h 和 24 h, 采用免疫组织化学和逆转录聚合酶链反应分别测定基质金属蛋白酶9的免疫荧光及 mRNA 表达水平。结果 肿瘤坏死因子 α 可明显诱导人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶9的表达, 辛伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的基质金属蛋白酶9 mRNA 的表达有明显的抑制作用, 且呈浓度依赖性和时间依赖性。结论 辛伐他汀抑制肿瘤坏死因子 α 诱导的人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶9的表达, 可能对抗动脉粥样硬化、稳定硬化斑块、防治斑块破裂和预防急性冠状动脉综合征的发生产生有益的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Simvastatin on Expression of Matrix Metalloproteinase 9 Induced by Tumor Necrosis Factor α in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

ZHANG Cheng Jun¹, and ZHU Xing Lei²

(1. Jinan First Hospital, Jinan 250011; 2. Shandong Provincial Hospital, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Simvastatin; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Tumor Necrosis Factor α ; Matrix Metalloproteinase 9; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Concentration Dependent; Time Dependent

[ABSTRACT] **Aim** To observe the influence of simvastatin on tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced expression of metalloproteinase 9 (MMP-9) in human umbilical vein endothelial cell (hUVEC) and to investigate the non-lipid mechanisms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors on anti-atherosclerosis. **Methods** The expression of MMP-9 in protein level and mRNA level was detected with immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** TNF- α could induce the expression of MMP-9 in hUVEC. Simvastatin could inhibit the expression of MMP-9 and their inhibitory effects were concentration dependent and time dependent. **Conclusion** The inhibition of TNF- α induced MMP-9 expression in hUVEC by simvastatin may crucially contribute to the clinical benefits of HMG-CoA reductase inhibitors on coronary artery disease, independent of cholesterol-lowering effects.

辛伐他汀 (Sim) 作为一种有效的他汀类降血脂药, 除了降低血浆胆固醇的作用外, 更因为其降脂之外的多种功效被广泛用于冠心病的一级及二级预防。它和其它种类的他汀类药物一样可以稳定脂质斑块, 防治脂质斑块的破裂。但是, 它是否可以通过调节内皮细胞基质金属蛋白酶表达和分泌的途径来发挥其稳定脂质斑块的功能, 在国内外未见报道, 本文对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞原代培养

无菌取分娩 4 h 内健康新生儿脐带, 立刻浸泡于 D-Hanks 液中, 选择无夹痕、无扭曲、无凝血阻塞、长约 25 cm 的脐带进行消化。在脐静脉两端开口处, 分别用丝线扎紧并固定在 50 mL 注射器和静脉输液胶管上 (去针头), 注入 D-Hanks 液冲洗脐静脉至无血迹。用止血钳夹住输液器胶管, 从注射器端向脐静脉端徐徐注入 0.1% 胶原酶溶液, 至血管充盈, 封闭两端置于 37 $^{\circ}$ C D-Hanks 液中消化 10 min。通过注射器收集酶液, 同时注入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基冲洗脐静脉, 于同一离心管内以 1 000 r/min 离心 10 min。弃去离心后的上清液, 加入含

[收稿日期] 2004-08-21 [修回日期] 2005-11-10

[作者简介] 张承俊, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病介入及再狭窄机理, 联系电话为 0531-86302186, E-mail 为 zhangchengjun@yaho.com.cn。朱兴雷, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病介入及再狭窄机理, 联系电话为 0531-85186416。

20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,重新悬浮细胞,调整细胞密度为 2×10^5 ,接种于培养瓶中,37℃ CO₂ 孵育箱内培养。第二天弃培养基,用 D-Hanks 液轻洗 1 次,以除去不贴壁的细胞或死细胞,换液后继续置 37℃ CO₂ 孵育箱内培养,每 2~3 天换液一次。换液时将原培养基弃掉 2/3,然后加入新鲜的培养基至原来的量。待细胞长至汇合状态时,进行传代培养。

1.2 人脐静脉内皮细胞传代培养

弃去已长成致密单层的原代内皮细胞培养瓶中的培养基,加入 2~3 mL D-Hanks 液,轻轻震荡漂洗细胞后倾去,以去除残留血清和衰老脱落的细胞及碎片。加入适量(盖满细胞即可)含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的混合消化液,室温下(或 37℃)消化 2~3 min 后,倒置显微镜下动态观察细胞,待细胞成片地收缩出现许多空隙时即可倒去消化液,再加 D-Hanks 液轻轻洗 1 遍后倾去。养瓶中加入 3 mL 培养基,以终止消化。用吸管反复吹打瓶壁上的细胞层,直至全部细胞被冲下,轻轻吹打混匀,制成单细胞悬液,按 1:2 或 1:3 分配,接种到 2~3 个培养瓶内,再向各瓶补加培养基到 5 mL。或按取细胞悬液计数,分别按需要的细胞浓度接种,再补足培养基。培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)其细胞形态学符合内皮细胞特征,抗人 CD31 抗体染色阳性,取第 2~3 代内皮细胞用于实验。

1.3 辛伐他汀干预及分组

生长良好的内皮细胞用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合消化,以 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个细胞/孔接种于 96 孔板,待细胞完全汇合生长后,换含 2% 胎牛血清 M199 培养基过夜,然后用含 5% 胎牛血清的 M199 培养基培养,并将 HUVEC 分为 4 组:① 不加肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)及辛伐他汀(原粉由浙江京新药业有限公司提供);② TNF- α 组:加 TNF- α 20 μ g/L;③ Sim1 组:加 TNF- α 20 μ g/L 和 Sim 0.01 μ mol/L; Sim2 组:加 TNF- α 20 μ g/L 和 Sim 0.1 μ mol/L; Sim3 组:加 TNF- α 20 μ g/L 和 Sim 1.0 μ mol/L; Sim4 组:加 TNF- α 20 μ g/L 和 Sim 10 μ mol/L。孵育时间分别为 6 h、12 h 和 24 h。

1.4 免疫组织化学检测人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 蛋白表达

去上清后, PBS 洗 2 次,再用乙醇和丙酮混合液固定细胞,自然风干, -20℃ 保存备用。3% 过氧化氢孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗, 5 min \times 3 次。滴加复合消化液,室温下 10 min。蒸馏水冲洗, 5 min \times 3 次。滴加山羊血清封

闭,室温孵育 20 min,倾去,不洗。滴加一抗,稀释基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9),均为 1:100, 4℃ 过夜。PBS 冲洗, 3 min \times 3 次。滴加试剂生物素化羊抗兔、鼠 IgG, 37℃ 孵育 30 min。PBS 冲洗, 3 min \times 3 次。滴加链霉菌抗生物素蛋白一过氧化物酶, 37℃ 孵育 20 min。PBS 冲洗, 3 min \times 4 次。显色剂(DAB)显色室温下 20 min。自来水充分冲洗,苏木素复染,脱水,透明,封片。在 10 \times 20 倍视野下,每组随机选出 10 个视野细胞,用图像分析系统测定细胞平均吸光度值。

1.5 细胞总 RNA 的提取

将各组细胞收集于 Eppendorf 管中加入 500 μ L GIT 变性液,轻轻吹打至细胞裂解,每管加入 pH 4.0 2 mol/L NaOAc 50 μ L,颠倒混匀,再加入 500 μ L 水饱和酚,轻轻混匀,最后加入 100 μ L 氯仿,颠倒充分混匀,冰浴 10~15 min。4℃ 1 200 r/min 离心 10 min,吸取上清移至另一新 1.5 mL Eppendorf 管中,加入等体积异丙醇, -20℃ 放置 1 h。4℃ 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 100 μ L GIT 变性液,轻轻吹打,使沉淀溶解,加入等体积异丙醇, -20℃ 放置 1 h。4℃ 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,用无水乙醇洗 1 遍,弃上清,自然凉干,溶于适量的无 RNase 去离子水中,直接应用。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达

基质金属蛋白酶 9 mRNA 引物:上游 5'-TGG ACG ATG CCT GCA ACG TG-3', 下游 5'-GTC GTG CGT GTC CAA AGG CA-3' (454 bp)。内参 β -actin 引物:5'-ACC ACA GCT GAG AGG GAA ATC G-3', 5'-AGA GGT CCT TAC GGA TGT CAA CG-3' (281 bp),均为上海康成生物工程有限公司合成。将凝胶电泳图像输入美国 Kodak 凝胶分析系统,应用 1D Image Analysis Software 进行表达强度分析,按下列公式计算相对系数:相对系数=细胞因子表达强度/ β -actin 表达强度。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 蛋白表达的比较

肿瘤坏死因子 α 可明显刺激人脐静脉内皮细胞 MMP-9 蛋白的表达,随着时间的延长, MMP-9 蛋白

的表达越明显。不同浓度辛伐他汀对 MMP-9 表达的影响不同,随着浓度升高,作用时间延长,辛伐他汀对 MMP-9 蛋白表达有明显的抑制作用,且呈时间依赖性和浓度依赖性(表 1)。

表 1. 各组不同作用时间人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	6 h	12 h	24 h
对照组	0.108 ± 0.010	0.117 ± 0.009	0.121 ± 0.009
TNF-α 组	0.129 ± 0.021 ^a	0.135 ± 0.014 ^a	0.156 ± 0.021 ^a
Sim1 组	0.122 ± 0.011	0.097 ± 0.009 ^b	0.077 ± 0.035 ^c
Sim2 组	0.110 ± 0.045 ^b	0.068 ± 0.008 ^c	0.058 ± 0.016 ^c
Sim3 组	0.109 ± 0.061 ^b	0.046 ± 0.002 ^c	0.034 ± 0.031 ^c
Sim4 组	0.089 ± 0.043 ^b	0.034 ± 0.011 ^c	0.029 ± 0.015 ^c

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 TNF-α 组比较。

2.2 辛伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的影响

肿瘤坏死因子 α 可明显刺激人脐静脉内皮细胞 MMP-9 mRNA 表达,不同浓度的辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响不同,随着浓度升高,作用时间延长,辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞 MMP-9 mRNA 表达有明显的抑制作用,且呈时间依赖性和浓度依赖性(表 2)。

表 2. 各组不同时间人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	6 h	12 h	24 h
对照组	0.858 ± 0.025	0.896 ± 0.018	0.915 ± 0.017
TNF-α 组	0.918 ± 0.023 ^a	0.929 ± 0.026 ^a	0.958 ± 0.031 ^a
Sim1 组	0.882 ± 0.021 ^b	0.856 ± 0.034 ^b	0.841 ± 0.027 ^b
Sim2 组	0.792 ± 0.030 ^b	0.721 ± 0.029 ^c	0.682 ± 0.034 ^c
Sim3 组	0.693 ± 0.018 ^c	0.653 ± 0.024 ^c	0.584 ± 0.030 ^c
Sim4 组	0.591 ± 0.012 ^c	0.461 ± 0.019 ^c	0.384 ± 0.015 ^c

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 TNF-α 组比较。

3 讨论

内皮细胞在基础状态下表达一定水平的基质金属蛋白酶(MMP),在受到刺激或处于某种特定状态下其表达谱或表达量有所改变^[1,2]。体外培养内皮细胞一旦形成卵石样单层,即表达合成 MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9。在 TNF 刺激下基质金属蛋白酶表达量发生变化,其中 MMP-1、MMP-3 和

MMP-9 的 mRNA 及蛋白量均上调^[3,4]。

近年来研究发现 MMP 的活性很大程度上决定了纤维帽厚度及其胶原含量。因此, MMP 与动脉粥样硬化斑块稳定性的研究已成为目前研究的热点之一。动脉粥样硬化斑块内的 MMP 主要来源于巨噬细胞及平滑肌细胞,已发现动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞聚积区有大量的 MMP 存在,巨噬细胞源性的泡沫细胞内也有大量的 MMP 表达。破裂斑块中 MMP-9 的合成比稳定斑块内 MMP-9 的合成要多, MMP-9 的作用底物为胶原(Ⅲ、Ⅳ)、明胶酶和弹性蛋白,对血管壁有较强的损伤作用^[5]。

他汀类药物在降低血脂的同时可能有以下作用^[6-8]: 影响和改善内皮功能,这可能与他汀类药物诱导内皮细胞的 NO 合成有关; ④影响和改善动脉粥样硬化斑块内的细胞构成,他汀类药物对血管平滑肌细胞及巨噬细胞的增殖有抑制作用; ⑤减少血栓形成和减轻动脉粥样硬化斑块处的炎症反应。近年来应用他汀类药物的大规模临床试验(一、二级预防试验和斑块消退试验)所获得的与降血脂胆固醇不成比例的冠心病临床事件的减少及心血管病死率的降低,引发了人们对其调脂以外的抗动脉粥样硬化作用的重视^[9,10]。本研究证实辛伐他汀可明显降低 TNF-α 诱导的人脐静脉内皮细胞 MMP-9 mRNA 表达,揭示了他汀类药物又一可能的非调脂抗动脉粥样硬化的机制。

[参考文献]

- [1] Krane SM, Byrne MH, Lemaitre V. Different collagenase gene products have different roles in degradation of Type I collagen[J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 28509
- [2] Du Pont BR, Linn R, Knight CB. Assignment of MMP-9 to mouse chromosome 2 bands H1-H2 cytogenetic[J]. *Cell Genet*, 1996, **74**: 118
- [3] Renonen P, Leivo I, Sahlberg C. Expression of 72 kDa and 92 kDa type V collagenase(MMP-1 and MMP-9) and TIMPs 1, 2, and 3 during mouse embryo implantation[J]. *Develop Dynamics*, 1995, **202**: 388
- [4] Canete SR, Gui YH, Linask KK. MMP-9(gelatinaseB) mRNA is expressed during mouse neurogenesis and may be associated with vascularization[J]. *Develop Brain Res*, 1995, **88**: 37
- [5] Canete SR, Gui YH, Linask KK. Developmental expression of MMP-9(gelatinaseB) mRNA in mouse embryos[J]. *Develop Dynamics*, 1995, **204**: 30
- [6] Lichtinghagen R, Seifert T, Kracke A. Expression of matrixmetalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cell of patients with multiplesclerosis[J]. *J Neuroimmunol*, 1999, **1** (1): 19
- [7] Itoh T, Tanioka M, Matsuda H. Experimental metastasis suppressed in MMP-9-deficient mice[J]. *Clin Exp Met*, 1999, **17** (2): 177
- [8] Canete SR, Gui YH, Linask KK. MMP-9(gelatinaseB) mRNA is expressed during mouse neurogenesis and may be associated with vascularization[J]. *Develop Brain Res*, 1995, **88**: 37
- [9] Ueda Y, Tsuchiya H, Fujimoto N. MMP-9 is expressed in multinucleated giant cell of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion[J]. *Am J Pathol*, 1996, **148**: 611
- [10] Rosenson RS, Tangney CC. Antithrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction[J]. *JAMA*, 1998, **279**: 1643-650 (此文编辑 朱雯霞)