

糖基化终末产物对巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响以及辛伐他汀的干预作用

李永军, 刘政操, 杨向红, 王跃中, 张亚加

(中国医科大学附属盛京医院实验病理学教研室, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 病理学与病理生理学; 糖基化终末产物; 基质金属蛋白酶 9; 巨噬细胞; 辛伐他汀; 动脉粥样硬化; 糖尿病

[摘要] 目的 研究糖基化牛血清白蛋白对巨噬细胞的活化与基质金属蛋白酶 9 活性的影响, 并观察辛伐他汀的干预效应。方法 体外培养小鼠腹腔巨噬细胞, 与不同浓度糖基化牛血清白蛋白、辛伐他汀共同培养, 采用明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 9 活性。结果 糖基化牛血清白蛋白可在体外诱发小鼠腹腔巨噬细胞形态变化。不同浓度的糖基化牛血清白蛋白(0、50、100、200、400 mg/L)作用 48 h 后, 细胞培养基中基质金属蛋白酶 9 活性明显增强, 且均明显高于对照组($n=5$, $P<0.05$), 呈剂量依赖效应。400 mg/L 糖基化牛血清白蛋白处理小鼠腹腔巨噬细胞不同时间后, 作用 12 h 时基质金属蛋白酶 9 活性与对照组比差异无显著性($n=5$, $P>0.05$), 作用 24、36、48 h 时基质金属蛋白酶 9 活性均明显高于对照组, 呈时间依赖效应($n=5$, $P<0.05$)。加入辛伐他汀后, 基质金属蛋白酶 9 活性明显降低。结论 糖基化牛血清白蛋白可在体外活化巨噬细胞, 使基质金属蛋白酶 9 活性增加, 提示其致动脉粥样硬化及斑块破裂作用; 辛伐他汀可明显降低基质金属蛋白酶 9 活性, 说明其治疗作用的多向性。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Advanced Glycation End Products on Macrophage Matrix Metalloproteinase-9 Activity and the Intervention Effect of Simvastatin

LI Yong-Jun, LIU Zheng-Cao, YANG Xiang-Hong, WANG Yue-Zhong, and ZHANG Ya-Jia

(Experimental Pathology Department of Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Matrix Metalloproteinase-9; Macrophage; Simvastatin; Atherosclerosis; Diabetes

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of advanced glycation end product bovine serum albumin (AGE-BSA) on macrophage matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity and the effects of Simvastatin. **Methods** Mouse peritoneal macrophages were incubated with AGE-BSA and Simvastatin at different levels. MMP-9 activity was determined by Gelatin Zymography.

Results AGE-BSA induced morphological changes of macrophage in vitro. After treatment with AGE-BSA (0, 50, 100, 200, 400 mg/L) for 48 hours, macrophage MMP-9 was significantly increased in contrast to the control, showing the dose-dependent effect ($n=5$, $P<0.05$). After treatment with 400 mg/L AGE-BSA for different duration, MMP-9 activity showed no significant difference at the time point of 12 hour ($n=5$, $P>0.05$), but MMP-9 activity was significantly increased in contrast to the control at the time point of 24, 36 and 48 hour, showing the time dependent effect ($n=5$, $P<0.05$). Simvastatin decreased MMP-9 activity significantly.

Conclusion AGE-BSA can activate macrophages in vitro and enhance MMP-9 activity, indicating its effect of atherogenesis and plaque rupture. Simvastatin can lower MMP-9 activity, showing statins' pleiotropic effects.

糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)是蛋白质非酶糖基化的终末不可逆聚合物,以高水平聚集在糖尿病患者体内。大量研究表明,AGE在糖尿病血管并发症发病中起重要作用^[1]。基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是 MMP 家族一个重要成员,在动脉粥样

硬化斑块内细胞外基质降解中起主要作用^[2]。辛伐他汀作为一种有效的他汀类降血脂药,更因为其降血脂外的多种功效,被广泛用于冠心病的一级及二级预防^[3]。本实验通过观察 AGE 作用后巨噬细胞形态变化并测定 MMP-9 活性改变,来研究 AGE 对巨噬细胞活化及其与斑块破裂的关系,并初步探讨辛伐他汀是否可通过抑制 MMP 来发挥稳定斑块的作用。

[收稿日期] 2005-11-23

[修回日期] 2006-09-15

[作者简介] 李永军, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的发生机制, E-mail 为 pathocrazc@yahoo.com.cn。刘政操, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发生机制。通讯作者杨向红, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化、高血压等心血管疾病的发病机制, E-mail 为 xhyang4933@vip.sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级昆明种小鼠, 共 80 只, 8~12 周龄, 体重

22~25 g, 雌雄兼用, 由中国医科大学实验动物学部提供。RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司; D-葡萄糖、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)从华美公司购得;明胶购自 Fluka 公司;辛伐他汀为三精药业产品。

1.2 糖基化牛血清白蛋白的制备^[4]

将小牛血清白蛋白 20 g/L 与 500 mmol/L 葡萄糖溶于磷酸盐缓冲液中, 混匀、室温过夜放置。对照组中不含葡萄糖, 余条件一致。过滤除菌后, 避光孵育 3 个月。糖基化牛血清白蛋白(AGE-BSA) 孵化结束后, 置于透析膜中, 广泛透析。AGE-BSA 的鉴定采用荧光分光光度法。最后将 AGE-BSA 及其对照物用培养基平衡, 调整葡萄糖浓度至 5.5 mmol/L, 滤过除菌, 4℃冰箱储存备用。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养

共取 80 只清洁级昆明种小鼠, 采用腹腔取材法分离细胞。3% 淀粉腹腔注射, 每只小鼠 1 mL。72 h 后, 小鼠颈椎脱臼处死, 75% 酒精浸泡, 腹腔注射 RPMI1640 培养基 2 mL, 轻揉小鼠腹部, 取出腹水, 离心, 1000 r/min × 10 min。去上清液, 沉淀以无血清 RPMI1640 洗 2 次, 调细胞密度至 1×10^6 /mL。吸取细胞悬液加至 24 孔细胞培养板, 每孔 1 mL。置 37℃、5% CO₂ 温箱中培养 2 h, 洗去非粘附细胞即得巨噬细胞单层, 每孔加入 0.5 mL RPMI1640 培养基, 以备使用。

1.4 药品准备

因为辛伐他汀在体内转化为活性的 β -羟酸形式后才能发挥药理作用, 所以将其溶于 95% 乙醇, 50℃孵育 2 h, 使其在体外转化为活性形式。

1.5 实验分组

每组取 5 只小鼠的腹腔巨噬细胞进行实验。第一组实验为对照组与 AGE-BSA 作用组(400 mg/L), 作用 48 h, 然后进行细胞形态观察。第二组实验为不同浓度 AGE-BSA 作用组(0、50、100、200 和 400 mg/L), 作用 48 h。第三组实验为相同浓度 AGE-BSA (400 mg/L) 作用不同时间(0、12、24、36 和 48 h)。第四组实验为对照组、辛伐他汀组(50 μ mol/L)、AGE-BSA(400 mg/L) 组、AGE-BSA(400 mg/L) + 辛伐他汀(50 μ mol/L) 组和 AGE-BSA(400 mg/L) + 辛伐他汀(50 μ mol/L) 组, 作用 48 h。

1.6 明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 9 活性

在实验组与对照组中, 取培养细胞上清液与等体积的上样缓冲液混匀, 上样于分离胶中, 140 V 电泳 70 min。将胶浸泡于 Triton X-100 中温和振荡洗涤 120 min, 再浸泡于复性液中孵育 18 h, 考马斯亮

蓝染色, 用脱色液脱色, 观察。并使用 Fluorchem Imaging System 对实验结果进行扫描分析。

1.7 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。应用 microsoft excel 进行统计分析和处理。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖基化牛血清白蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞形态的影响

对照组小鼠腹腔巨噬细胞贴壁后多为圆形, 只有少数变形为梭形或星状。AGE-BSA 作用组巨噬细胞贴壁后, 几乎全部变形, 细胞明显增大, 伸出伪足, 表明其向外延展的能力显著增强, 是巨噬细胞活化的形态学标志(图 1)。

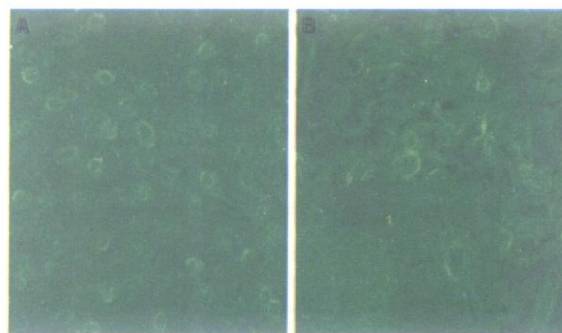


图 1. 小鼠腹腔巨噬细胞形态学观察 (×100) A 为对照组, B 为糖基化牛血清白蛋白作用组。

2.2 糖基化牛血清白蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响

不同浓度的 AGE-BSA (50、100、200 和 400 mg/L) 作用 48 h 后, 细胞培养基中 MMP-9 活性明显增强 (OD 值分别为 $46\ 189 \pm 5\ 556$ 、 $69\ 276 \pm 8\ 641$ 、 $100\ 061 \pm 12\ 043$ 和 $123\ 194 \pm 8\ 150$), 与对照组 (OD 值为 $38\ 489 \pm 4\ 503$) 相比, 其活性分别为对照组的 1.2、1.8、2.6 和 3.2 倍 ($n = 5$, $P < 0.05$), 呈剂量依赖效应 (图 2)。相同浓度的 AGE-BSA (400 mg/L) 作用于小鼠腹腔巨噬细胞不同时间 (12、24、36 和 48 h), 作用 12 h 时 MMP-9 活性 (OD 值为 $50\ 027 \pm 1\ 001$) 与对照组 (OD 值为 $49\ 916 \pm 553$) 比差异无显著性 ($n = 5$, $P > 0.05$), 而作用 24、36 和 48 h 时 MMP-9 活性 (OD 值分别为 $157\ 071 \pm 5\ 271$ 、 $224\ 612 \pm 5\ 657$ 和 $244\ 578 \pm 9\ 113$) 分别为对照组的 3.2、4.5 和 4.9 倍 ($n = 5$, $P < 0.05$), 随着时间延长 MMP-9 活性亦增强, 呈时间依赖效应 (图 2)。

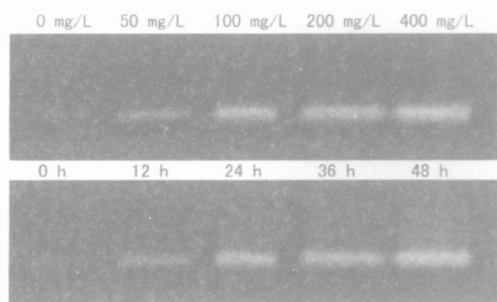


图 2. 糖基化牛血清白蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 活性的剂量(上图)及时间(下图)依赖效应

2.3 辛伐他汀对小鼠腹腔巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响

辛伐他汀组 MMP-9 活性(OD 值为 $49\ 154 \pm 654$)与对照组(OD 值为 $47\ 448 \pm 375$)比差异无显著性($n = 5$, $P > 0.05$); AGE-BSA (400 mg/L) 组、AGE-BSA (400 mg/L) + 辛伐他汀 (5 μ mol/L) 组和 AGE-BSA (400 mg/L) + 辛伐他汀 (50 μ mol/L) 组 MMP-9 活性(OD 值分别为 $259\ 946 \pm 7\ 076$ 、 $194\ 536 \pm 4\ 560$ 和 $152\ 578 \pm 4\ 823$)分别为对照组的 5.5、4.1 和 3.3 倍($n = 5$, $P < 0.05$)。与 AGE-BSA (400 mg/L) 组相比, AGE-BSA (400 mg/L) + 辛伐他汀 (5 μ mol/L) 组 MMP-9 活性减少 25.5%, AGE-BSA (400 mg/L) + 辛伐他汀 (50 μ mol/L) 组减少 41.8% ($n = 5$, $P < 0.05$) (图 3)。

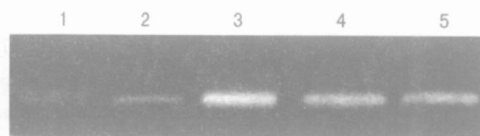


图 3. 辛伐他汀对小鼠腹腔巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响 1 为空白对照组, 2 为辛伐他汀 (50 μ mol/L) 组, 3 为糖基化牛血清白蛋白 (400 mg/L) 组, 4 为糖基化牛血清白蛋白 (400 mg/L) + 辛伐他汀 (5 μ mol/L) 组, 5 为糖基化牛血清白蛋白 (400 mg/L) + 辛伐他汀 (50 μ mol/L) 组。

3 讨论

长期高血糖导致的代谢紊乱, 如过度的非酶糖基化、多元醇代谢失衡、信号传导通路紊乱等, 可引起一系列病理改变。高血糖状态下, 机体内各种蛋白质可发生非酶促糖基化反应, 产生 AGE, 引发血管及神经病变^[5]。本实验所采用的 AGE 浓度分别为 50、100、200 及 400 mg/L, 而糖尿病患者血浆 AGE 浓度多在 100~400 mg/L 之间, 故本实验中所用的 AGE 浓度基本符合人体的病理条件^[6]。

动脉粥样斑块中有多种 MMP 异常表达, 导致纤

维帽内基质降解及斑块破裂。斑块内的内皮细胞、巨噬细胞及平滑肌细胞等均可产生 MMP, 其中巨噬细胞源 MMP 对斑块的不稳定性影响最大。因为斑块破裂通常发生于富含单核/巨噬细胞的斑块纤维帽与正常血管交界处; 并且巨噬细胞可产生多种 MMP。有报道表明, AGE 多分布于该区域。本研究结果表明, AGE 可在体外促进巨噬细胞活化, 增强巨噬细胞 MMP-9 活性, 并呈剂量及时间依赖效应。本研究与以往的血管壁组织免疫组织化学研究结果相一致^[2], 进而从体外实验角度证实 MMP-9 参与了糖尿病性动脉粥样硬化的病变形成与进展。

他汀类药物治疗冠状动脉粥样硬化除降脂作用外, 还可稳定斑块和减少炎症反应。临床实验证实, 他汀类药物在冠心病患者治疗中可减少心血管相关的发病率和死亡率, 但其机制尚不十分清楚。Wong 等^[7]体外培养巨噬细胞发现, 氟伐他汀可明显抑制 MMP-9 活性。本研究证实辛伐他汀可明显降低 MMP-9 活性, 表明辛伐他汀可通过抑制 MMP 活性而发挥稳定斑块的作用。因此, 我们认为他汀类药物可减少炎性细胞浸润, 抑制其分泌 MMP, 防止胶原蛋白和弹性蛋白降解, 从而对维持纤维帽的完整、稳定斑块起重要作用。

综上所述, AGE 在体外可促进巨噬细胞活化, 增强 MMP-9 活性, 这可能是糖尿病性病变成与进展的机制之一, 提示对 AGE 干预可作为糖尿病性动脉粥样硬化新的治疗靶点; 辛伐他汀可通过抑制 MMP-9 活性发挥其血管保护作用, 但具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (24): 15 596-601
- [2] 周一军, 张锦, 李莉, 彭扬. 糖尿病患者动脉粥样硬化斑块内基质金属蛋白酶 2 和 9 与斑块稳定的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 69-72
- [3] Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high risk individuals: a randomized placebo controlled trial [J]. *Lancet*, 2002, **360** (9326): 7-22
- [4] Horiuchi S, Araki N, Morino Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of maillard reaction [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266** (12): 7 329-332
- [5] 郑超, 文格波. 晚期糖基化终产物在糖尿病血管并发症中的致病机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 270-272
- [6] 孟馨, 张锦, 吴伟. 糖基化终产物对培养的人脐静脉内皮细胞巨噬细胞炎症蛋白-1 α 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, **20** (4): 598-602
- [7] Wong B, Lumma WC, Smith AM, Sisko JT, Wright SD, Cai TQ. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, **69** (6): 959-962

(此文编辑 许雪梅)