

C 反应蛋白对人脐静脉内皮细胞表达 基质金属蛋白酶 2 的影响

沈彬¹, 吴宗贵², 蒋逸风¹, 林晓耘¹

(1. 中国人民解放军第 411 医院心内科, 2. 第二军医大学附属长征医院心内科, 上海市 200003)

[关键词] 内科学; C 反应蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 基质金属蛋白酶 2; 普伐他汀; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 通过观察 C 反应蛋白对人脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶 2 的影响, 探讨 C 反应蛋白导致动脉粥样硬化斑块不稳定的可能机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 给予不同浓度的人重组 C 反应蛋白及普伐他汀干预, 分为空白对照组、C 反应蛋白 5 mg/L 组、C 反应蛋白 20 mg/L 组、C 反应蛋白 100 mg/L 组及 C 反应蛋白 20 mg/L+ 普伐他汀组, 培养 24 h 后采用 Western blot 及逆转录聚合酶链反应法在蛋白及 mRNA 水平观察各组细胞表达基质金属蛋白酶 2 的差异。结果 C 反应蛋白 5 mg/L 组、20 mg/L 组及 100 mg/L 组基质金属蛋白酶 2 蛋白条带的相对灰度值逐渐增高, 呈浓度依赖性; 而普伐他汀干预组相对灰度值明显低于 C 反应蛋白 20 mg/L 组 ($P < 0.05$)。随着 C 反应蛋白干预浓度的增加, 基质金属蛋白酶 2 mRNA 的表达量也相应增加, 呈浓度依赖性, 普伐他汀可以减轻这种作用。结论 C 反应蛋白干预体外培养的人脐静脉内皮细胞后, 可上调基质金属蛋白酶 2 的表达, 因此 C 反应蛋白在导致动脉粥样硬化斑块不稳定方面有直接致炎症作用及炎症放大作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

C-Reactive Protein Enhances the Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

SHEN Bin, WU Zong-Gui, JIANG Yi-Feng, and LIN Xiao-Yun

(Department of Cardiology, the 411th Hospital of People's Liberation Army, Shanghai 200083, China)

[KEY WORDS] C-Reactive Protein; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Matrix Metalloproteinase-2; Pravastatin; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of C-reactive protein (CRP) on expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) and the influence of CRP on matrix remodeling in atherogenesis and plaque rupture. **Methods** hUVEC were cultured in vitro and intervened by different concentrations of recombination human CRP and pravastatin. The MMP-2 mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and MMP-2 protein was measured by Western blot. **Results** In comparison with the control, the expression of mRNA and protein of MMP-2 was significantly increased in 20 mg/L and 100 mg/L CRP groups ($P < 0.05$), and this up-regulation of the expression of MMP-2 could be inhibited in pravastatin group. **Conclusions** CRP can enhance the expression of MMP-2 in hUVEC and may cause advanced inflammation in atherosclerosis plaques. It may provide an explanation for the phenomenon that patients who have high concentration of CRP are prone to have atherosclerotic lesions and plaque rupture.

目前认为, Ross 的“炎症假说”^[1] 是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的主要发病机制, 而 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是由肝脏产生的急性期反应蛋白, 正常情况下以微量形式存在于正常人血清中, 特异和非特异性炎症刺激可使之显著升高, 是一种炎症反映标志。近年来分子生物学研究认为, CRP 不仅仅是一种临床血清标志物, 其本身还有炎

症因子的作用, 直接参与致 As 的形成。本研究通过体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)并用人重组 CRP(rhCRP)干预, 观察 CRP 对 hUVEC 表达基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的影响, 探讨 CRP 导致 As 斑块不稳定甚至破裂的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

人重组 C 反应蛋白购自 Calbiochem 公司, 兔抗人 MMP-2 多抗和辣根过氧化物酶结合的抗兔 IgG 购自武汉博士德公司, 琼脂糖购自上海博亚公司, DNA

[收稿日期] 2007-01-31 [修回日期] 2007-04-10

[作者简介] 沈彬, 博士, 主治医师, 主要研究方向为冠心病诊治, E-mail 为 shenbin0094@163.com。吴宗贵, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病诊治。蒋逸风, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为冠心病的诊治、起搏与电生理。

分子质量标准、蛋白分子质量标准 and 总 RNA 抽提 Trizol 试剂购自上海生工生物工程公司, 一步法 RT-PCR 试剂盒购自大连 Takara 公司, RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, Super Singal 化学发光试剂盒购自 PIERCE 公司。MMP-2 和 β -actin 引物由北京赛百胜公司合成。

1.2 细胞培养与干预

无菌条件下取健康产妇分娩后新生儿脐带 25 ~ 30 cm, 挤出血液置于灭菌的脐带保存液(含 NaCl 0.14 mol/L、KCl 4 mol/L、Glucose 11 mmol/L、Hepes 15 mmol/L)^[2] 中, 参照王立岩等^[3] 的方法并加以改进。4~6 h 内行脐静脉内皮细胞培养。无菌条件下, 取新生儿脐带, 找到脐静脉, 一端插上带有胶管的玻璃管结扎固定, 经胶管接注射器, 用生理盐水灌洗, 残血除尽后, 用 37℃ PBS 冲洗, 灌入 37℃ 0.25% 胰蛋白酶 12~15 mL, 置入含 37℃ PBS 的灭菌盒中, 孵育箱中孵育 12~15 min, 在此期间经常翻动脐带使酶溶液在血管内流动以促使内皮细胞与酶均匀接触。取出脐带后将脐带内消化液引流至锥形离心管中, 加入小牛血清终止酶反应, 再以 30 mL PBS 冲洗静脉管腔, 流出液一并入离心管, 离心所获细胞再洗一次, 再次离心, 加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 调节细胞数至 1×10^5 , 接种于 25 cm² 培养瓶, 37℃、5% CO₂ 条件下静置 24 h 后, 内皮细胞贴壁, 更换培养基, 以除去未贴壁细胞。以后每 2 天换液一次, 以维持细胞的营养和内环境的稳定。原代内皮细胞汇合后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 传代培养, 将 3~7 代细胞用于实验。参照 Jaffe 法^[4], 用兔抗人 V α 因子相关抗原抗血清与羊抗兔 IgG 抗体进行免疫组织化学染色鉴定。细胞分为空白对照组、人重组 CRP 5 mg/L 组、20 mg/L 组、100 mg/L 组及人重组 CRP 20 mg/L+ 普伐他汀 10^{-3} mol/L 干预组, 继续培养 24 h 后用于 Western blot 检测及 RT-PCR。每个实验重复 3 次。

1.3 Western blot 检测

将各组干预后用于蛋白提取的 hUVEC 用预冷的 PBS 缓冲液漂洗 2 次, 加入 85℃ 的 1×SDS 凝胶加样缓冲液溶解细胞, 细胞裂解物收集于微量离心管, 沸水浴中加热 10 min, DNA 剪切, 于室温以 10 000 g 将样品离心 10 min, 将上清液移于另一管中, 弃去沉淀物。取 20 μ L 总蛋白样品用于 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至硝酸纤维素膜, 丽春红染色。转印后的硝酸纤维素膜放入 TBS 液中封闭 2 h, 用含 0.1% Tween-20 的 TBS 洗膜 3 次。将兔抗人 MMP-2 一抗以 1:300 于 TBS 中稀释, 与硝酸纤维素

膜 37℃ 反应 2 h。弃去一抗, 加入二抗, 反应 1 h。弃去二抗后 TTBS 洗 2 次, PBS 缓冲液洗 1 次。按照化学发光试剂盒的使用说明进行显色, 在自显影胶片上曝光 1 min。蛋白条带经计算机图像分析仪扫描, 进行灰度测定及分析。以对照组的灰度值为 1, 实验组与对照组相比取值。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测

弃细胞培养基后加入 1 mL 总 RNA 抽提 Trizol, 按 Trizol 法提取细胞总 RNA。RNA 经定量后行 RT-PCR, 设计引物序列^[5], MMP-2 引物为 5'-ACC TGG ATG CCG TCG TGG AG-3' 和 5'-TGT GGC AGC ACC AGG GCA GC-3' (447 bp), 内参照 β -actin 引物为 5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3' 和 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3' (621 bp)。按照一步法 RT-PCR 试剂盒的使用说明加入各种所需试剂, 混合物总量 50 μ L, 使用 PCR 热循环仪, 50℃ 30 min 及 94℃ 2 min 后, 以 94℃ 变性 30 s \rightarrow 55℃ 退火 30 s \rightarrow 72℃ 延伸 60 s, 扩增 30 个循环, 随后 72℃ 延伸 7 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶进行凝胶电泳, 所得电泳条带经摄片后, 经计算机图像分析仪扫描, 进行灰度测定及分析。以同一样品的 β -actin 信号值作校正, 对照组的灰度值为 1, 实验组与对照组相比取值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS10.0 进行统计软件分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析、SNK 法两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

倒置相差显微镜下, 呈典型的卵石样排列, 折光性强, 多角形(图 1)。免疫组织化学染色细胞被染成棕黄色, 证明该细胞上存在内皮细胞特有的 V α 因子抗原, 为内皮细胞(图 2)。

2.2 人重组 C 反应蛋白对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 2 蛋白表达的影响

在位于 72 kDa 处可见一条深色条带, 对应分子质量为 MMP-2(图 3)。人重组 CRP 5 mg/L 组、20 mg/L 组及 100 mg/L 组 MMP-2 蛋白条带的相对灰度值逐渐增高, 呈浓度依赖性; 而普伐他汀干预组相对灰度值明显低于 CRP 20 mg/L 组($P < 0.05$; 表 1)。

2.3 人重组 C 反应蛋白对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 2 mRNA 表达的影响

RNA 样品的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值均大于 1.8, 提示样品的

纯度较高, RNA 无降解, 并且蛋白质无明显污染。随着人重组 CRP 干预浓度的增加, MMP-2 mRNA 的表达量也相应增加, 呈浓度依赖性, 而普伐他汀可以减轻这种作用(表 1 和图 4)。

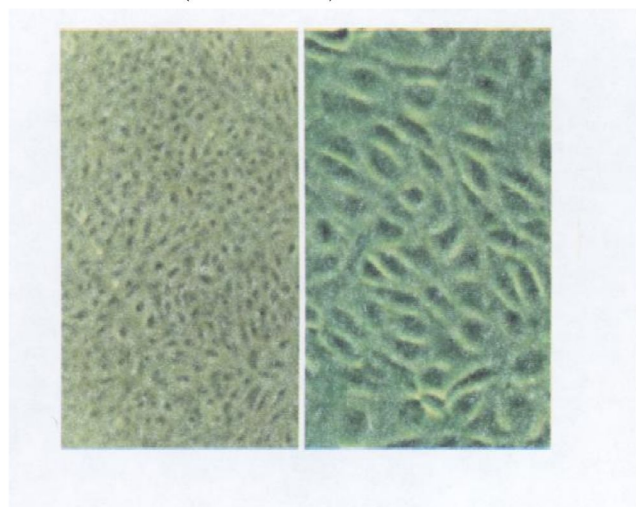


图 1. 倒置相差显微镜下人脐静脉内皮细胞形态 左为 $\times 100$, 右为 $\times 400$ 。

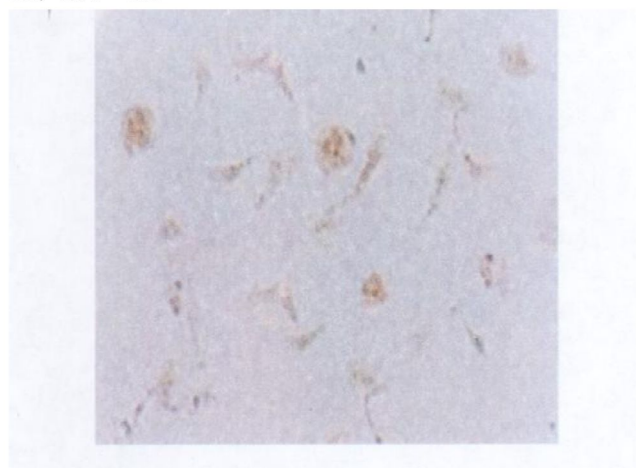


图 2. 人脐静脉内皮细胞 VEGF 因子鉴定 ($\times 400$)

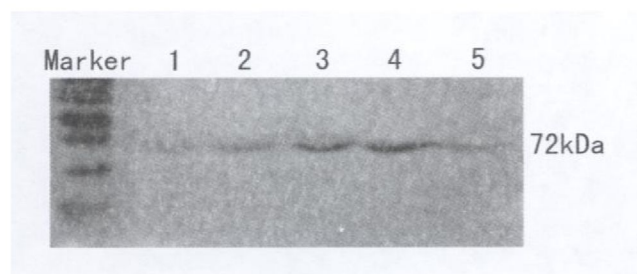


图 3. Western blot 检测基质金属蛋白酶 2 蛋白的表达 1 为空白对照组, 2~4 分别为 5 mg/L、20 mg/L 和 100 mg/L rhCRP 组, 5 为 rhCRP+ 普伐他汀组。

表 1. 人重组 C 反应蛋白及普伐他汀干预后人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 2 蛋白和 mRNA 表达的相对灰度值

分 组	蛋白	mRNA
空白对照组	1	1
rhCRP 5 mg/L	1.28 ± 0.16	1.36 ± 0.18^a
20 mg/L	1.65 ± 0.19^a	2.13 ± 0.27^b
100 mg/L	3.37 ± 0.32^b	4.07 ± 0.31^b
rhCRP+ 普伐他汀组	1.14 ± 0.12	1.21 ± 0.14^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与人重组 C 反应蛋白 20 mg/L 组比较。

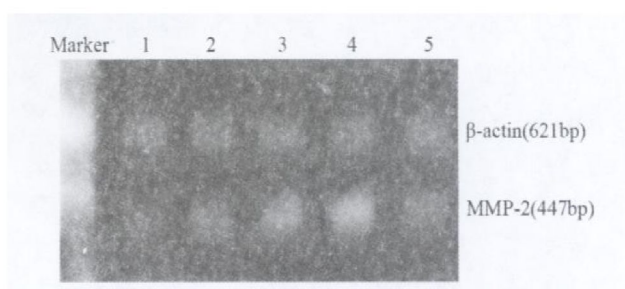


图 4. 逆转录聚合酶链反应检测基质金属蛋白酶 2 mRNA 的表达 1 为空白对照组, 2~4 分别为 5 mg/L、20 mg/L 和 100 mg/L rhCRP 组, 5 为 rhCRP+ 普伐他汀组。

3 讨论

在人的 As 斑块特别是复杂斑块中, 发现有大量的 CRP 沉积。1985 年 Vlaicu 等^[6] 从人主动脉粥样硬化内膜中提取 CRP 分子, 首次证明 CRP 在 As 病变中存在; 1998 年 Torzewski 等^[7] 发现人类早期冠状动脉粥样斑块中 CRP 广泛分布, 内皮下大多数巨噬细胞源性泡沫细胞呈 CRP 染色阳性, 并有 CRP、C5b-9 及平滑肌细胞沉积于内膜深层。1999 年 Zhang 等^[8] 的尸检资料显示 CRP 在人类正常冠状动脉中无沉积, 在增厚的内膜及早期斑块中首先出现, 随着斑块大小的增加, CRP 沉积增多, CRP 沉积的强度直接与脂质沉积数量相关, 炎性细胞浸润的区域特别是坏死斑块的边缘, CRP 免疫反应较强, 而富含脂质的斑块核心 CRP 免疫反应最强。Burke 等^[9] 也证实 As 斑块的脂质核心及巨噬细胞的细胞浆内有大量 CRP 的沉积, 并且进一步证实患者的血清 CRP 水平与其冠状动脉内薄纤维帽数量之间存在相关性, 提示 CRP 可刺激斑块不稳定。这些客观证据表明 CRP 在 As 中不仅仅单纯作为炎性标志物存在, 在致 As 方面可能有直接致炎作用。

Pasceri 等^[10] 将 CRP 与 hUVEC 或人冠状动脉内皮细胞一起在人血浆中孵育, 发现细胞间粘附分子

1 表达增加 10 倍, 血管细胞粘附分子 1 及 E-选择素表达也明显增加, 而其中细胞间粘附分子 1 是内皮细胞上淋巴细胞功能相关抗原的主要受体, 在白细胞与内皮粘附并向血管壁移动的过程中起关键作用。另外, 有研究表明, CRP 还可促进单核细胞趋化蛋白 1 的分泌, 从而使单核细胞对内皮细胞的粘附性明显增加; 可降低内皮型一氧化氮合酶的表达及其生物活性; 可刺激巨噬细胞表达细胞因子及组织因子, 增加对低密度脂蛋白的摄入, 同时对其它炎症介质的致 As 作用有放大作用^[11, 12]。

基质金属蛋白酶 (MMP) 是一类以 Zn^{2+} 为辅助因子的蛋白酶家族, 在体内主要降解细胞外基质, 参与结缔组织的降解和重建、炎症反应、肿瘤扩散转移和缺血缺氧损伤等。MMP 酶原一经激活, 即成为具有活性的 MMP, 降解纤维帽中细胞外基质成分, 使纤维帽变薄, 斑块不稳定而易于破裂。内皮细胞在基础状态下表达一定水平的 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。体外培养的内皮细胞一旦形成卵石样单层, 即表达合成 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 MMP-14, 但不表达 MMP-7 和 MMP-13。炎症条件下, 有不同程度的炎性细胞浸润和炎性细胞因子产生, 炎性细胞与内皮细胞粘附, 相互诱导 MMP 的表达。大多数情况下, MMP 的产生发生在炎性细胞浸润之前, 故 MMP 首先可能是由内皮细胞等血管内细胞分泌, 当炎性细胞侵入后, 侵入的炎性细胞才成为 MMP 的主要产生细胞^[13]。

本研究结果发现, CRP 可在蛋白水平及 mRNA 水平刺激上调 hUVEC 表达 MMP-2, 表明 CRP 的直接致炎症作用可能是 As 形成初期的作用机制之一。而且, 在斑块形成后, 急性感染等各种原因导致的 CRP 骤然增高可通过促进内皮细胞的 MMP-2 表达而使斑块不稳定, 进而导致斑块破裂, 形成急性冠状动脉综合征。我们以前的临床调查表明, 不稳定型心绞痛患者血清 CRP 水平在 5~10 mg/L, 在这一水平下, CRP 也许不足以刺激内皮细胞表达 MMP 增高^[14]。但是, 以往研究表明, 轻度炎症或微生物病原体感染可使 CRP 升高至大约 10~40 mg/L, 甚至可高达 200 mg/L。并且, 由于 CRP 长期在斑块局部的沉积及斑块内细胞同时表达分泌 CRP, 因而 As 斑块内的 CRP 浓度可能远高于血浆中的测定水平。Yasojima 等^[15]证实在 As 斑块中 CRP mRNA 的水平比正常动脉及肝脏分别高出 10.2 倍及 7.2 倍, 而且还证实在斑块增厚内膜中的平滑肌细胞及巨噬细胞均有 CRP mRNA 的表达。因此, 本实验中采用了 5 mg/

L、20 mg/L 及 100 mg/L 三种浓度, 大致与冠心病患者体内的血清 CRP 水平相符, 结果发现在这三个浓度水平上, hUVEC 表达 MMP-2 依次增加, 呈浓度依赖性, 而普伐他汀可以抑制这种作用, 也同时进一步证实了他汀类药物的抗炎症作用^[16, 17]。

本研究只是在蛋白及 mRNA 水平初步证实了 CRP 对 hUVEC 表达 MMP-2 有促进作用, 可能进一步导致斑块不稳定, 甚至破裂。但是, 其相应的作用机制及信号通路等方面仍需要作进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammation disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126.
- [2] Lorenzi M, Cadliero E, Markey B, Henriksen T, Witztum JL, Sampietro T. Interaction of human endothelial cells with elevated glucose concentrations and native and glycosylated low density lipoproteins [J]. *Diabetologia*, 1984, **26** (3): 218-222.
- [3] 王立岩, 佟晓红, 宫桂兰, 朱凤全. 人脐静脉内皮细胞的体外培养、鉴定及形态观察 [J]. *白求恩医科大学学报*, 2000, **26** (1): 26-28.
- [4] Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells [J]. *J Clin Invest*, 1973, **52** (11): 2757-764.
- [5] 颜春洪, 田方, 肖凤君, 李克勤, 李春海. 粘附诱导卵巢癌细胞基质金属蛋白酶-9 基因的表达 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, **24** (1): 101-103.
- [6] Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A. Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima [J]. *Atherosclerosis*, 1985, **55** (1): 35-50.
- [7] Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (9): 1386-392.
- [8] Zhang YX, Cliff WJ, Schoeffl GI, Higgins G. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **145** (2): 375-379.
- [9] Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, Malcom GT, Zieske A, Kutys R, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies [J]. *Circulation*, 2002, **105** (17): 2019-023.
- [10] Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells [J]. *Circulation*, 2000, **102** (18): 2165-168.
- [11] Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein 1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs [J]. *Circulation*, 2001, **103** (21): 2531-534.
- [12] Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells [J]. *Circulation*, 2002, **106** (12): 1439-441.
- [13] Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia/reperfusion injury in the heart [J]. *Circulation*, 2000, **101** (15): 1833-839.
- [14] 沈彬, 吴宗贵. 不稳定型心绞痛患者超敏 C 反应蛋白的测定及临床意义 [J]. *上海医学*, 2004, **27** (4): 234-236.
- [15] Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques [J]. *Am J Pathol*, 2001, **158** (3): 1039-051.
- [16] 邓平, 赵水平. 环氧合酶 2 在动脉粥样硬化炎症中的意义和他汀类药物的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 241-245.
- [17] 沈彬, 吴宗贵. C 反应蛋白对 U937 细胞表达基质金属蛋白酶 2 的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 25-28.

(此文编辑 文玉珊)