

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子和尿激酶型纤溶酶原激活物在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块中的表达

梁星, 杨丽霞, 郭瑞威, 刘宏, 杨智华, 朱国富, 齐峰, 石燕昆

(中国人民解放军成都军区昆明总医院心血管内科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; 尿激酶型纤溶酶原激活物; 动脉粥样硬化; 不稳定性斑块; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] **目的** 探讨细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)与尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)在载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠主动脉粥样硬化斑块中的表达,并探讨两者的相互关系。**方法** 研究对象采用 ApoE^{-/-}小鼠,共喂养 18 周,分别于 6 周、10 周、14 周和 18 周 4 个时间点处死小鼠行 HE 染色切片观察动脉粥样硬化斑块形态;并采用 RT-PCR 及 Western blot 检测主动脉粥样硬化斑块内 EMMPRIN 和 uPA 的表达。**结果** 成功建立动脉粥样硬化模型;在主动脉粥样硬化斑块中检测到 EMMPRIN 和 uPA 表达均增高,与普通饮食组比较有统计学意义($P < 0.05$)。EMMPRIN 和 uPA 表达随喂养时间延长而增高。**结论** EMMPRIN 和 uPA 在 ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化斑块中随着斑块病变程度的严重性增加表达增高,两者可能共同参与粥样硬化斑块的发生发展过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer and Urokinase-Type Plasminogen Activator in Aortic Atherosclerotic Plaques of ApoE Knockout Mice

LIANG Xing, YANG Li-Xia, GUO Rui-Wei, LIU Hong, YANG Zhi-Hua, ZHU Guo-Fu, QI Feng, and SHI Yan-Kun
(Department of Cardiology, Kunming General Hospital, Chengdu Command of PLA, Kunming, Yunnan 650032, China)

[KEY WORDS] Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer; Urokinase-Type Plasminogen Activator; Atherosclerosis; Vulnerable Plaque; Apolipoprotein E Knockout Mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and urokinase-type plasminogen activator(uPA) in aortic atherosclerotic plaques of apolipoprotein E knockout(ApoE^{-/-}) mice and to explore the relationship between the two. **Methods** ApoE^{-/-} mice were randomized into ordinary diet fed group and high-fat diet fed group, raising for 18 weeks. At 6 weeks, 10 weeks, 14 weeks, 18 weeks mice were sacrificed and observed by HE staining of atherosclerotic plaque morphology. EMMPRIN and uPA expression in aortic atherosclerotic plaques were detected by semi-quantity RT-PCR and Western blot. **Results** Atherosclerosis model was successfully established; EMMPRIN and uPA in aorta atherosclerotic plaques were highly expressed, with statistically significant difference from normal diet group ($P < 0.05$). Expression of EMMPRIN and uPA increased with feeding time extended. **Conclusion** Expression of EMMPRIN and uPA in ApoE^{-/-} mice aortic atherosclerosis increased with plaque lesions degree of severity, both of EMMPRIN and uPA may play a role in the atherosclerotic plaques development.

冠心病(CHD)的病理基础是动脉粥样硬化(As),急性冠状动脉综合征(ACS)的发病主要是由于不稳定性斑块的破裂,其分子病理机制错综复杂。新近发现,细胞外基质金属蛋白酶诱导因子

(EMMPRIN)可影响基质金属蛋白酶家族(MMP)的表达水平^[1,2],从而影响 As 斑块的稳定性^[3,4]。尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)是纤溶酶原的重要组成部分,具有致 As 作用。有研究发现,EMMPRIN及

[收稿日期] 2011-11-15

[基金项目] 成都军区医学科“十一五”计划课题(MB09029)

[作者简介] 梁星,硕士研究生,医师,主要从事急性冠状动脉综合征的基础和临床研究,E-mail 为 sunandstar523@hotmail.com。通讯作者杨丽霞,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事急性冠状动脉综合征的基础和临床研究,E-mail 为 doctorylx@yahoo.com。郭瑞威,博士研究生,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,主要从事内皮损伤及修复研究。

uPA 在冠心病患者的 As 斑块中及斑块破裂的好发部位“肩部”均有高表达^[5-7]。在肿瘤的侵袭和转移中,EMMPRIN 不仅可以诱导 MMP 的表达,同时也可以通过 uPA 发挥作用^[8]。在动物实验中 EMMPRIN 和 uPA 在 As 斑块中的表达情况并不完全清楚。因此,本实验以载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠高脂饮食喂养建立 As 模型^[5],在体探讨 As 斑块中 EMMPRIN 及 uPA 的表达及两者间的相互关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

羊抗 EMMPRIN 多克隆抗体 sc-9757 (Santa Cruz 公司),羊抗 uPA 多克隆抗体 ab64520 (AbCom 公司),小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 NB600-501 (Novus Biologicals 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒和超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天),DAB 显色液 (北京中杉),Total RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒 DRR047S (TAKARA),Premix Taq Version 2.0, Nucleic Acid Stain 核酸染料。PCR 扩增仪 (美国 PTC-200),核酸蛋白分析仪 (美国 DU800),酶标仪 (奥地利 FO39300),ChimilMager 5500 型凝胶成像分析系统 (Alpha Inntotech Corporation, USA),Leica DMIRB 荧光倒置显微镜。胆固醇 (科龙公司)。

1.2 动物模型的建立和干预

6 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 32 只 (北京威通利华公司),平均体重 18 g。随机分为普通饮食组及高脂饮食组,每组 16 只,高脂饮食组小鼠按照普通小鼠饲料 + 21% 猪油 + 0.15% 胆固醇比例配制高脂饮食饲料,共喂养 18 周建立 As 模型,分批在 6 周、10 周、14 周和 18 周时处死小鼠。

1.3 标本采集

将小鼠固定于手术台上,腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥 0.5 ~ 1.0 mL 麻醉,取主动脉弓浸于 4% 的多聚甲醛备做 HE 染色,取降主动脉至腹主动脉血管 -70°C 保存备做 Western blot 和 PCR。石蜡包埋主动脉弓,从三个主动脉瓣同时出现的第一张起连续切片,第一个主动脉瓣出现到三个主动脉瓣全部出现的距离不超过 80 μ m,切片厚度 10 μ m,每隔 10 张取 1 张做 HE 染色。

1.4 主动脉粥样硬化斑块病理学观察

主动脉石蜡切片 HE 染色观察主动脉粥样硬化斑块形态。

1.5 RT-PCR 分析主动脉 EMMPRIN 和 uPA 的 mRNA 表达

每组分别取降主动脉至腹主动脉部分血管 4 根,液氮中研磨组织,RNAiso Plus 提取总 RNA,核酸蛋白分析仪测定 RNA 浓度,两步法逆转录试剂盒转录为 cDNA。所有引物均参照 Gengbank 提供的序列,由大连宝生物公司合成。引物设计如下:EMMPRIN 为 5'-GCA GAG GAC ACA GGC ACT TAC-3' (正义链) 和 5'-ACA GGC TCA GGA AGG AAG ATG-3' (反义链);uPA 为 5'-CCC CAA GGT TTA CTG ATG TGC TC-3' (正义链) 和 5'-GAA GTG TGA GAC CCT CGT GTA GA-3' (反义链); β -actin 为 5'-AGA TTA CTG CTC TGG CTC CTA GC-3' (正义链) 和 5'-ACT CAT CGT ACT CCT GCT TGC T-3' (反义链)。RT-PCR 仪扩增目的基因后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪分析其图像并测得灰度值,以 EMMPRIN、uPA 与 β -actin 光密度比值表示 EMMPRIN 和 uPA mRNA 的表达水平。

1.6 蛋白提取和 Western blot 分析 EMMPRIN 和 uPA 的蛋白表达

每组分别取降主动脉至腹主动脉部分血管 4 根,液氮中研磨后按 1 mg 组织加入预冷的 10 μ L 裂解液 (含终浓度为 1 mol/L 的 PMSF) 裂解组织,收集裂解的组织在 4°C 下,12000 r/min 离心 5 min,使用 BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度。常规电泳、转膜、封闭后结合相应的 EMMPRIN、uPA 抗体,内参 anti-GAPDH,4°C 孵育过夜,TBST 洗膜,结合相应的辣根过氧化物酶标二抗。用化学发光试剂 (ECL) 盒与 PVDF 膜共孵育 1 min 后,将 PVDF 膜与 X 光片放入暗盒内曝光 3 min,显影后再定影。扫描胶片,用软件分析条带光密度值,以 EMMPRIN、uPA 与 GAPDH 条带的吸光面积积分比值评定 EMMPRIN、uPA 蛋白表达水平。

1.7 统计学分析

Image Pro Plus 软件分析 Western blot 和 PCR 的灰度值。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 主动脉粥样硬化斑块病理学观察

ApoE^{-/-} 小鼠主动脉石蜡切片 HE 染色观察结果显示,喂养至 6 周时,普通饮食组及高脂饮食组小鼠

主动脉均未见 As 斑块形成,高脂饮食组可见极少量脂质条纹形成。喂养 10 周时,普通饮食组小鼠未见明显 As 斑块形成,可见脂质条纹;高脂饮食组小鼠可见 As 斑块形成,可见明显增厚的内膜中膜,有少量纤维帽。喂养至 18 周时,普通饮食组小鼠可见少量 As 斑块形成;高脂饮食组小鼠可见混合斑块形成,脂质沉积明显,纤维帽偏薄,斑块稳定性差(图 1)。

维帽。喂养至 18 周时,普通饮食组小鼠可见少量 As 斑块形成;高脂饮食组小鼠可见混合斑块形成,脂质沉积明显,纤维帽偏薄,斑块稳定性差(图 1)。

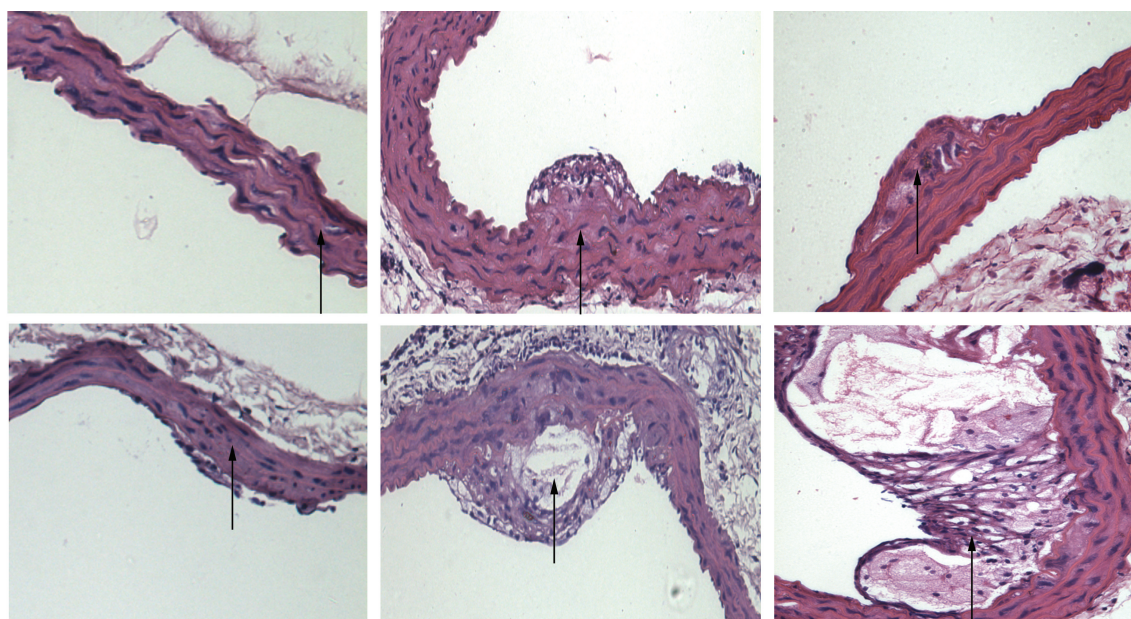


图 1. 喂养至 6 周(左)、10 周(中)和 18 周(右)时主动脉病理形态学变化(×400) 上为普通饮食组,下为高脂饮食组。

Figure 1. Aortic pathology change of normal diet and high-fat diet group fed to 6th, 10th and 18th weeks (×400)

2.2 主动脉及粥样硬化斑块内 EMMPRIN 和 uPA 的 mRNA 表达

与普通饮食组相比,高脂饮食组 EMMPRIN 和 uPA mRNA 表达在主动脉内明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$;图 2 和表 1),同时 EMMPRIN 和 uPA 的 mRNA 表达随着喂养时间的延长而增高(图 3)。

2.3 主动脉及粥样硬化斑块内 EMMPRIN 和 uPA 的蛋白表达

与普通饮食组相比,高脂饮食组 EMMPRIN 和 uPA 蛋白表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$;图 4 和表 2),同时 EMMPRIN 和 uPA 的蛋白表达量随喂养时间的延长均出现增高(图 5)。

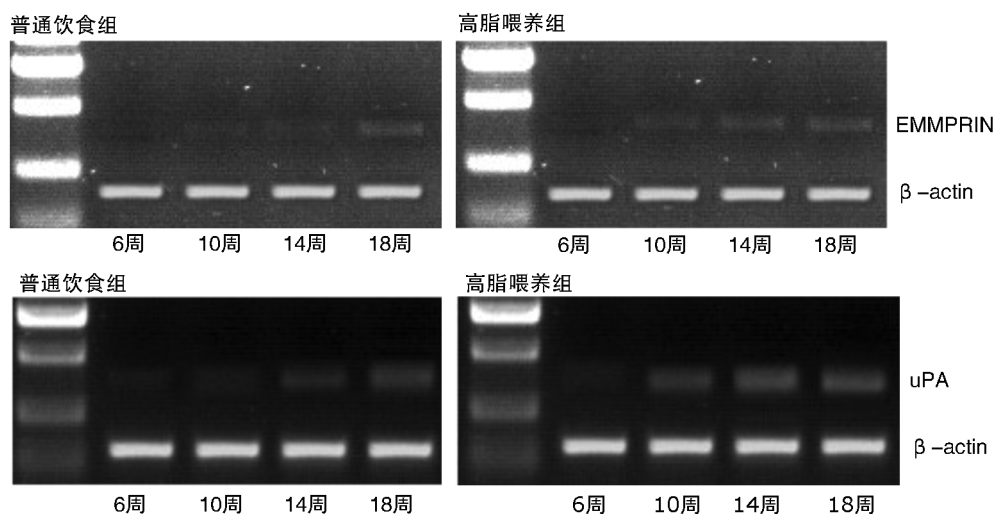


图 2. RT-PCR 检测主动脉内 EMMPRIN 和 uPA 的 mRNA 表达

Figure 2. mRNA expression of EMMPRIN and uPA in the aorta by RT-PCR

表 1. 喂养不同时间后两组主动脉内 EMMPRIN 和 uPA 的 mRNA 表达

Table 1. mRNA expression of EMMPRIN and uPA in the aorta of two groups mice fed for different time

指 标	喂养时间	普通饮食组	高脂饮食组
EMMPRIIN mRNA	6 周	0.1087 ± 0.0028	0.3384 ± 0.0540 ^a
	10 周	0.1725 ± 0.0036	0.4596 ± 0.0651 ^a
	14 周	0.2095 ± 0.0041	0.5127 ± 0.0873 ^a
	18 周	0.2506 ± 0.0047 ^b	0.9262 ± 0.1095 ^{ab}
uPA mRNA	6 周	0.0203 ± 0.0034	0.4227 ± 0.0991 ^a
	10 周	0.1563 ± 0.0223	0.5751 ± 0.1003 ^a
	14 周	0.2795 ± 0.0778	0.8654 ± 0.1347 ^a
	18 周	0.3633 ± 0.1110 ^b	1.1372 ± 0.1548 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与普通饮食组比较; b 为 $P < 0.05$, 与喂养 6 周比较。

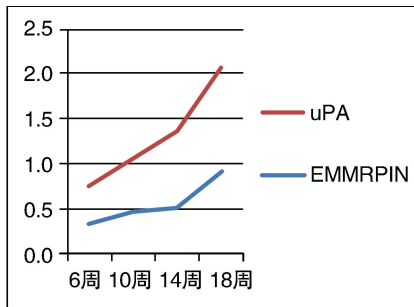


图 3. EMMPRIN 和 uPA mRNA 表达随喂养时间而变化

Figure 3. EMMPRIN and uPA mRNA expression with the feeding time

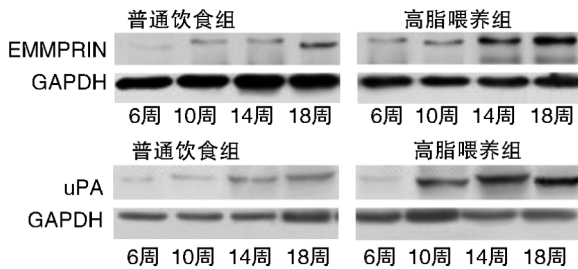


图 4. Western blot 检测主动脉内 EMMPRIN 和 uPA 的蛋白表达

Figure 4. Protein expression of EMMPRIN and uPA in the aorta by Western blot

3 讨 论

冠心病的基础病理变化是冠状动脉内粥样硬化斑块的形成。ACS 的发生与粥样硬化斑块的不稳定性相关,即富含脂质核和薄纤维帽的易损斑块破裂激活血栓级联放大效应形成冠状动脉内急性血栓事件,而与粥样硬化斑块导致冠状动脉管腔的狭窄程度并无直接关系。EMMPRIIN 是一种高度糖基化的跨膜糖蛋白,广泛表达于人体的各种组织细

表 2. 喂养不同时间后两组主动脉内 EMMPRIN 和 uPA 的蛋白表达

Table 2. Protein expression of EMMPRIN and uPA in the aorta of two groups mice fed for different time

指 标	喂养时间	普通饮食组	高脂饮食组
EMMPRIIN 蛋白	6 周	0.0664 ± 0.0033	0.4446 ± 0.0376 ^a
	10 周	0.2394 ± 0.0105	0.4979 ± 0.0604 ^a
	14 周	0.2808 ± 0.0147	0.7482 ± 0.0825 ^a
	18 周	0.2813 ± 0.0161 ^b	0.9777 ± 0.1158 ^{ab}
uPA 蛋白	6 周	0.4095 ± 0.0165	0.7087 ± 0.0214 ^a
	10 周	0.6102 ± 0.0187	0.7617 ± 0.0270 ^a
	14 周	0.6988 ± 0.0219	0.8137 ± 0.0281 ^a
	18 周	0.7000 ± 0.2535 ^b	1.0785 ± 0.0314 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与普通饮食组比较; b 为 $P < 0.05$, 与喂养 6 周比较。

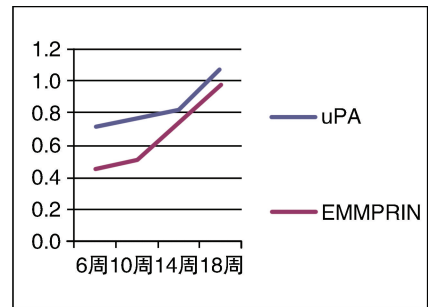


图 5. EMMPRIN 和 uPA 蛋白表达随喂养时间而变化

Figure 5. EMMPRIN and uPA protein expression with the feeding time

胞,其重要生理作用之一是诱导和调控 MMP 的表达^[9],从而参与到影响 As 斑块去稳定性作用的分子机制中^[10]。MMP 表达在平滑肌细胞、巨噬细胞中,具有降解细胞外基质的作用,通过影响脂质核及降解纤维帽来改变粥样斑块的稳定性,参与 As 斑块去稳定性作用,并通过降解粥样斑块纤维帽促进斑块破裂^[11]。EMMPRIIN 诱导单核细胞表达与易损斑块密切相关相关的 MMP-9,诱导血管平滑肌细胞表达与稳定性斑块相关的 MMP-2,通过诱导 MMP 的表达参与到细胞外基质降解,降解 As 斑块纤维帽,表现对斑块的去稳定作用。uPA 是纤溶酶原系统的重要组成部分,具有致 As 作用,可在动脉壁局部起到促使基质降解、细胞黏附、细胞迁移增殖及细胞因子调节等作用^[12]。Pawlak 等^[13]发现,人冠状动脉内 uPA 的含量与粥样硬化病变的存在和严重性明确相关。Quemener^[8]在研究肿瘤细胞的侵袭性过程中发现,EMMPRIIN 通过刺激 MMP-2、MMP-9 和 uPA 的表达提高了肿瘤细胞的侵袭能力。还有研究发现,EMMPRIIN 和 uPA 共定位于冠心病患者的 As 斑块破裂的好发部位“肩部”。基于以上的发现及认识,作者推测在 As 斑块表现去稳定作用这一过程中,EMMPRIIN 和 uPA 两者均起到

了促进作用,EMMPRN 和 uPA 均可能在粥样硬化斑块中出现高表达。

本研究以 ApoE^{-/-} 小鼠建立 As 模型,在体观察了主动脉及粥样硬化斑块中 EMMPRN 和 uPA 的表达情况,探讨 EMMPRN 和 uPA 两者在主动脉粥样硬化斑块形成过程中的表达情况及与斑块的严重程度的关系。组织切片 HE 染色结果显示,随着喂养时间的延长,ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化斑块的严重程度随喂养时间延长明显加重,逐渐出现薄纤维帽、富含脂质的核心等不稳定性特征,不同时间阶段斑块的形态有明显变化。高脂饮食组较普通饮食组动脉粥样硬化出现早,同一时期相比病变程度较普通饮食组严重。进一步对主动脉及其粥样硬化斑块内 EMMPRN 及 uPA 的表达量进行检测后发现,在基因及蛋白质的水平上,EMMPRN 和 uPA 的表达均随着喂养时间的延长而逐渐增加;同一时间点,高脂饮食组主动脉及粥样硬化斑块中 EMMPRN 和 uPA 的表达水平较普通饮食组明显增高。这一现象与 As 斑块的病变严重程度变化相一致,提示两者在 As 斑块中的高表达可能与 As 斑块不稳定性增加的过程有关。

高脂饮食组成功建立了 As 斑块的模型,并随喂养时间的增加,出现不稳定性特征,如纤维帽变薄和脂质核心增大^[15]等。与这一病理变化趋势相符合的是 EMMPRN 和 uPA 两个指标随时间延长表达增高。现有研究认为 EMMPRN 通过诱导 MMP 表达参与降解 As 斑块纤维帽而影响斑块稳定性,促进易损斑块的形成;同时也有研究表明,uPA 亦存在促使局部动脉壁基质降解等作用而影响斑块的不稳定性,由此推测 EMMPRN 可能与 uPA 共同作用于 As 斑块影响斑块的稳定性。在肿瘤细胞中,EMMPRN 可以刺激 uPA 及 MMP 家族的产生,影响肿瘤细胞的侵袭能力。而 EMMPRN 和 uPA 在动脉粥样硬化的形成与斑块的去稳定性过程中是否存在相互影响及可能存在的内部机制并不清楚。结合本实验结果,提示在 As 的形成与斑块的去稳定性过程中,两者可能相互影响,共同发挥作用。因此,是否能够通过抑制或诱导 EMMPRN 表达进一步影响 uPA 的表达在维持粥样硬化斑块稳定及延缓其进展中具有重要意义,值得进一步研究,为临床 ACS 早期预防和治疗提供新的药物靶点。

本研究在体实验证实 EMMPRN 和 uPA 在 As 斑块中均存在高表达,两者随粥样硬化斑块的严重程度加重而表达增加,再次证实 EMMPRN 和 uPA 均参与 As 斑块形成及去稳定过程,并为阐明 EMMPRN 及

uPA 在 As 疾病中的作用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRN) is a member of the immunoglobulin superfamily[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 434-439.
- [2] Huet E, Gabison EE, Mourah S, et al. Role of EMMPRN/CD147 in tissue remodeling[J]. *Connect Tissue Res*, 2008, 49: 175-179.
- [3] Schmidt R, Bultmann A, Fischel S, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes[J]. *Circ Res*, 2008, 102: 302-309.
- [4] Huang Z, Wang C, Wei L, et al. Resveratrol inhibits EMMPRN expression via P38 and ERK1/2 pathways in PMA-induced THP-1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374: 517-521.
- [5] Major TC, Liang L, Lu X, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer(EMMPRN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(7):1 200-207.
- [6] Steins MB, Padro T, Schwaenen C, et al. Overexpression of urokinase receptor and cell surface urokinase-type plasminogen activator in the human vessel wall with different types of atherosclerotic lesions[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2004, 15: 383-391.
- [7] Salame MY, Samani NJ, Masood I, et al. Expression of the plasminogen activator system in the human vascular wall[J]. *Atherosclerosis*, 2000, 152: 19-28.
- [8] Quemener C, Gabison EE, Naimi B, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 9-15.
- [9] Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 2 276-281.
- [10] Kim JY, Kim WJ, Kim H, et al. The stimulation of CD147 induces MMP-9 expression through ERK and NF-kappaB in macrophages: implication for atherosclerosis[J]. *Immune Netw*, 2009, 9(3): 90-97.
- [11] Koenig W, Khuseynova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1): 15-26.
- [12] Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, et al. Plasminogen activation and cancer[J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93: 676-681.
- [13] Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. The urokinase-type plasminogen activator/its soluble receptor system is independently related to carotid atherosclerosis and associated with CC-chemokines in uraemic patients[J]. *Thromb Res* 2008;122:328-35.
- [14] Bougateg F, Quemener C, Kellouche S, et al. EMMPRN Promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2alpha-mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2[J]. *Blood*, 2009, 114(27): 3347-5556.
- [15] Vimani R, Burke AP, Farb A. Pathology of the vulnerable plaque [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(6): c13-18.

(此文编辑 许雪梅)