

二甲双胍通过基质金属蛋白酶抑制血管内皮损伤后的内膜增生

王 强, 杨大春, 马双陶, 张 彦, 李 德, 唐 兵, 杨永健

(成都军区总医院心血管内科, 四川省成都市 610083)

[关键词] 血管内皮损伤; 内膜增生; 二甲双胍; 基质金属蛋白酶

[摘要] **目的** 观察二甲双胍对血管内皮损伤后内膜增生的影响,并探讨其可能机制。**方法** 选用 300 ~ 350 g 的健康雄性 SD 大鼠 45 只,随机分为对照组、颈动脉球囊损伤组、颈动脉球囊损伤 + 二甲双胍组,3 周后 HE 染色观察内膜增生情况,real-time PCR、Western blot 和免疫组织化学染色检测颈动脉组织中基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的表达情况。**结果** 球囊损伤后,颈动脉出现明显的内膜增生,颈动脉组织中 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 和蛋白表达显著上调($P < 0.01$);二甲双胍削弱血管内皮损伤所致 MMP-2 和 MMP-9 的表达上调($P < 0.05$),并抑制血管内皮损伤后的内膜增生($P < 0.01$)。**结论** 二甲双胍可能通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达防止血管损伤后内膜增生。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Metformin Prevents Intimal Hyperplasia After Arterial Injury via Inhibiting Matrix Metalloproteinases

WANG Qiang, YANG Da-Chun, MA Shuang-Tao, ZHANG Yan, LI De, TANG Bing, and YANG Yong-Jian

(Department of Cardiovascular, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

[KEY WORDS] Arterial Injury; Intimal Hyperplasia; Metformin; Matrix Metalloproteinases

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of metformin on intimal hyperplasia after arterial injury and explore the underlying mechanisms. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, carotid arterial balloon injury group and carotid arterial balloon injury plus metformin group, 15 rats in each group. After the intervention for three weeks, the histological structure of carotid artery was evaluated by HE staining, the expressions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were determined by real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry staining. **Results** Intimal hyperplasia was caused by carotid arterial balloon injury. The expressions of MMP-2 and MMP-9 in carotid artery were significantly upregulated after balloon injury ($P < 0.01$). Treatment of metformin attenuated the upregulation of MMP-2 and MMP-9 and inhibited intimal hyperplasia induced by arterial injury ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Metformin may prevent intimal hyperplasia through inhibiting MMP-2 and MMP-9 expression after arterial injury.

冠心病是严重影响人类健康的重大疾病,经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)已成为冠心病患者血运重建的最常用方法,然而,支架内再狭窄影响了 PCI 的治疗效果,即便是在药物支架时代,复杂病变支架内再狭窄的发生率仍高达 20%^[1],是冠心病治疗领域尚未解决的难题。血管内皮损伤后的内膜增生是冠状动脉支架内再狭窄的重要原因^[2]。二甲双胍是临床广泛应用的双胍类

降糖药物,大量循证医学证据显示,二甲双胍具有良好的心血管保护作用^[3,4],然而其机制有待于进一步研究。本研究拟观察二甲双胍对血管内皮损伤后内膜增生的影响,通过研究基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 2(MMP-2)、MMP-9 的表达变化以探讨其可能机制,旨在为二甲双胍用于支架内再狭窄的防治提供实验依据。

[收稿日期] 2014-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81100232);全军医学科技青年培育项目(13QN058)

[作者简介] 王强,博士,主治医师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 qwang_86@163.com。杨大春,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 yangdc71@1126.com。杨永健,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为心血管重构,E-mail 为 y.yongjian@yahoo.com。

1 材料和方法

1.1 主要材料

健康雄性 SD 大鼠 45 只,体重 300 ~ 350 g,购自成都达硕实验动物有限公司,所有实验严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。二甲双胍(商品名格华止)购自百时美施贵宝(中国)投资有限公司;1.5 F 球囊(Cordis)购自美国强生公司;总 RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、逆转录试剂盒(PrimeScript® RT reagent Kit)、real-time PCR 试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™ II)购自日本 TaKaRa 公司;抗 MMP-2、抗 MMP-9 抗体购自英国 Abcam 公司,抗 GAPDH 抗体购自杭州贤至生物科技有限公司。

1.2 动物的分组及干预

大鼠随机分为三组:对照组、颈动脉球囊损伤组、颈动脉球囊损伤 + 二甲双胍组,每组 15 只。按照课题组前期的方法建立颈动脉球囊损伤模型^[5],采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 SD 大鼠,沿颈前正中中线切开皮肤,在颈前三角区暴露左颈总动脉及颈内、外动脉,自颈外动脉向近心端插入 1.5 F 球囊导管至颈总动脉起始部,4 个大气压扩张球囊,阻断血流 30 s,而后慢速回拉球囊至颈内外动脉分叉处,反复 3 次,退出导管,结扎颈外动脉,逐层缝合皮下组织与皮肤,术后常规肌注青霉素以预防感染,并注射肝素防止血栓形成。对照组除不用球囊导管损伤血管内皮外,其余同颈动脉球囊损伤组。二甲双胍组于手术前 1 周开始采用二甲双胍[250 mg/(kg·d)]灌胃,对照组和颈动脉球囊损伤组采用生理盐水灌胃,至手术后 3 周。实验结束后处死大鼠,取出颈动脉标本,分别冻存于 -80℃ 冰箱及置于福尔马林中固定。

1.3 血管组织病理检测

各组颈动脉组织经福尔马林固定后,常规石蜡切片,行 HE 染色。用显微镜图像分析软件(Image-Pro Plus)测量血管中膜和增生内膜面积,计算内膜/中膜面积比。免疫组织化学染色检测颈动脉 MMP-2、MMP-9 的表达,石蜡切片后常规脱蜡,过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,热修复抗原后,滴加一抗(MMP-2、MMP-9 分别 1:200、1:160 稀释)4℃ 过夜,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃ 孵育 30 min, DAB 显色,封片。用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件分析各组颈动脉 MMP-2、MMP-9 的表达情况。

1.4 real-time PCR 检测颈动脉 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达

取颈动脉血管组织,去除外膜,提取组织总

RNA,检测纯度和浓度,将其逆转录成 cDNA,在 ABI 7500 real-time 系统上进行 real-time PCR 反应。引物序列:MMP-2 上游为 5'-CAG GGA ATG AGT ACT GGG TCT ATT-3',下游为 5'-ACT CCA GTT AAA GGC AGC ATC TAC-3';MMP-9 上游为 5'-AAT CTC TTC TAG AGA CTG GGA AGG AG-3',下游为 5'-AGC TGA TTG ACT AAA GTA GCT GGA-3';GAPDH 上游为 5'-TAT GAC TCT ACC CAC GGC AAG T-3',下游为 5'-ATA CTC AGC ACC AGC ATC ACC-3'。反应条件:预变性(95℃,30 s),PCR 反应(95℃,5 s;64℃,34 s;45 个循环),根据 2^{-ΔΔCt} 值进行比较。

1.5 Western blot 检测颈动脉 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

参照课题组前期的方法^[6],RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,每孔上样量 30 ~ 40 μg,湿转法转移到 PVDF 膜上,含 5% BSA 的 TBST 室温下封闭 1 ~ 2 h,一抗(MMP-2、MMP-9、GAPDH 分别 1:1200、1:1000、1:500 稀释)4℃ 过夜,TBST 洗膜 10 min × 3 次,二抗(1:5000 稀释)室温 1 h,TBST 洗膜 10 min × 3 次,ECL 化学发光法显色、曝光。Quantity one 图像分析系统进行蛋白条带灰度分析,测量 MMP-2、MMP-9 和 GAPDH 蛋白的电泳条带光密度,以二者与 GAPDH 的比值代表其蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

所有计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对血管内皮损伤后内膜增生的影响

术后 3 周,颈动脉球囊损伤组出现明显的内膜增生;与颈动脉球囊损伤组比较,二甲双胍干预后内膜增生明显减轻($P < 0.01$;表 1 和图 1)。

表 1. 二甲双胍对血管内皮损伤后内膜增生的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1. Effect of metformin on intimal hyperplasia after arterial injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	内膜面积(mm ²)	内膜/中膜面积比
对照组	0.012 ± 0.004	0.042 ± 0.013
颈动脉球囊损伤组	0.168 ± 0.031 ^a	0.625 ± 0.108 ^a
颈动脉球囊损伤 + 二甲双胍组	0.093 ± 0.024 ^b	0.351 ± 0.072 ^b

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与颈动脉球囊损伤组比较。

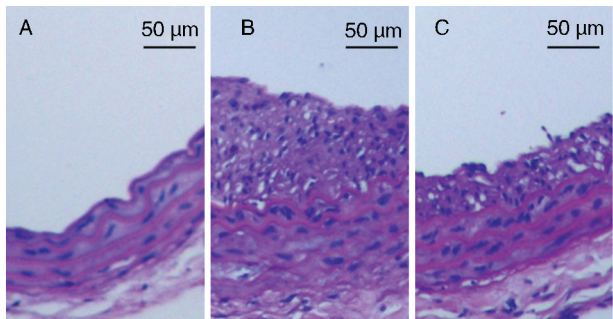


图 1. 颈动脉 HE 染色 A 为对照组,B 为颈动脉球囊损伤组,C 为颈动脉球囊损伤 + 二甲双胍组。

Figure 1. The representative imaging of carotid artery with HE staining

2.2 二甲双胍对 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响

与对照组相比,球囊损伤组颈动脉 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达水平明显增加 ($P < 0.01$),而二甲双胍可以显著抑制血管内皮损伤后 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的上调 ($P < 0.05$;图 2)。

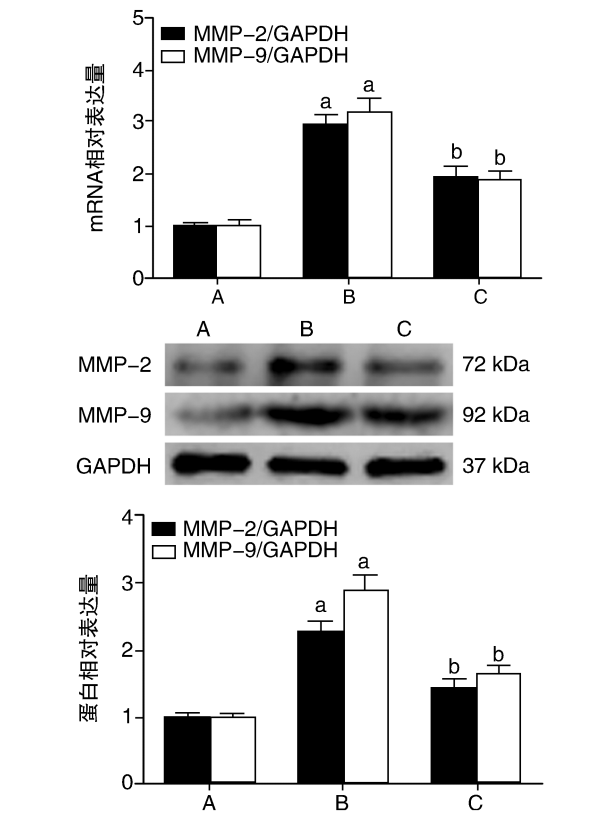


图 2. 颈动脉 MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白的表达 ($n = 7$) A 为对照组,B 为颈动脉球囊损伤组,C 为颈动脉球囊损伤 + 二甲双胍组。a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与颈动脉球囊损伤组比较。

Figure 2. The mRNA and protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in carotid artery ($n = 7$)

2.3 二甲双胍对 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达影响

Western blot 结果显示,与对照组相比,球囊损伤组颈动脉组织 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平明显增加 ($P < 0.01$),而二甲双胍可以显著抑制血管内皮损伤后 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达上调 ($P < 0.05$;图 2)。免疫组织化学染色同样证实,球囊损伤后颈动脉组织 MMP-2、MMP-9 表达显著增加 ($P < 0.01$),二甲双胍可以抑制血管内皮损伤后 MMP-2、MMP-9 的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;图 3 和表 2)。

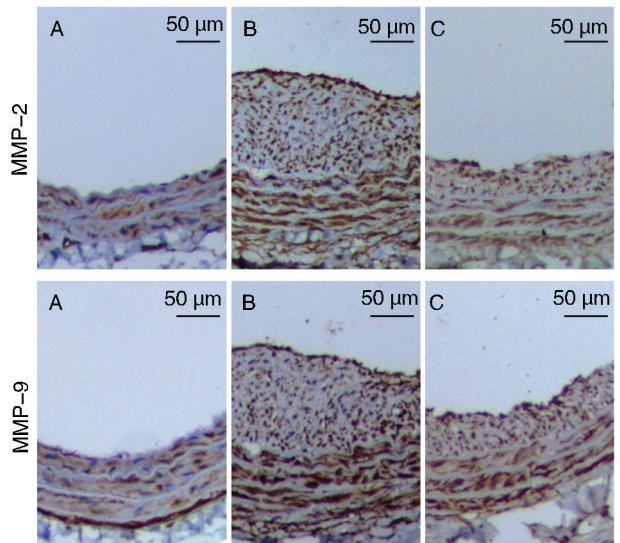


图 3. 颈动脉免疫组织化学染色 A 为对照组,B 为颈动脉球囊损伤组,C 为颈动脉球囊损伤 + 二甲双胍组。

Figure 3. The representative imaging of carotid artery with immunohistochemistry staining

3 讨论

二甲双胍是一个古老的药物,早在中世纪的欧洲,人民发现一种名叫法国丁香的植物可以缓解伴有尿多症状的疾病——即现在大家熟悉的糖尿病^[7]。1922 年爱尔兰的科学家将法国丁香具有降糖作用的成分二甲双胍首次合成成功,1957 年二甲双胍在法国首次获准作为降糖药物用于临床。二甲双胍用于糖尿病治疗五十多年的循证医学证据表明,二甲双胍除了降低血糖、改善胰岛素抵抗之外,还具有心血管保护作用,且二甲双胍的心血管保护作用不依赖于其降糖作用^[3,4,8]。前期临床研究和动物实验发现,二甲双胍可以防止糖尿病患者和胰岛素抵抗患者血管损伤后新生的内膜增生,降低冠状动脉支架内再狭窄的发生率^[9,10]。本研究中,我们进一步证实,二甲双胍可以抑制正常大鼠血管损伤后的内膜增生,提示二甲双胍抑制内膜增

表 2. 免疫组织化学染色检测颈动脉 MMP-2、MMP-9 的表达($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2. The expressions of MMP-2 and MMP-9 in carotid artery were determined by immunohistochemistry staining ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分 组	阳性面积(%)		平均光密度值	
	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
对照组	28. 5 \pm 3. 4	29. 2 \pm 2. 8	12. 4 \pm 1. 4	13. 5 \pm 1. 7
颈动脉球囊损伤组	58. 3 \pm 6. 1 ^a	62. 5 \pm 6. 8 ^a	27. 8 \pm 3. 1 ^a	32. 5 \pm 3. 8 ^a
颈动脉球囊损伤 + 二甲双胍组	43. 9 \pm 4. 4 ^b	45. 1 \pm 4. 7 ^b	19. 3 \pm 2. 4 ^b	22. 1 \pm 2. 7 ^b

a 为 $P < 0. 01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0. 05$, 与颈动脉球囊损伤组比较。

生的作用可能独立于其降低血糖和改善胰岛素抵抗的作用。

MMP 是一类包含锌原子的内源性水解酶,通过调节血管平滑肌细胞、成纤维细胞的表型转换、迁移和增殖,在血管损伤后内膜增生的过程中发挥了重要的作用,降低 MMP 的表达或抑制 MMP 的活性可以显著延缓血管损伤内膜增生、支架内再狭窄的过程,其中尤其以 MMP-2 和 MMP-9 最为重要^[11,12]。本研究中,我们发现,血管损伤后 MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白的表达明显增加,而二甲双胍可以削弱血管损伤导致的 MMP-2 和 MMP-9 表达上调。因此,抑制 MMP-2 和 MMP-9 的过度表达可能是二甲双胍防止血管损伤后内膜增生的分子机制。

本研究证实,二甲双胍可以抑制血管损伤内膜增生,且不依赖于其降低血糖和改善胰岛素抵抗的作用。然而,最近一项单中心随机双盲临床实验表明,在无糖尿病的冠心病患者中,并没有发现二甲双胍可缩小颈动脉粥样斑块和降低颈动脉的内膜/中膜面积比^[13]。这可能与上述的冠心病患者均已强化他汀治疗有关。重要的是,动脉粥样硬化与血管损伤后内膜增生的发病机制并不相同,动脉粥样硬化主要以脂质沉积、泡沫细胞形成和炎症反应为主^[14],而血管损伤后内膜增生的主要病理生理基础是血管平滑肌细胞、成纤维细胞的增殖、迁移和多种细胞外基质成分的产生^[15]。因此,二甲双胍对血管损伤后内膜增生、支架内再狭窄的影响还有待于进一步的大动物实验和临床研究。

综上所述,本研究提示二甲双胍可能通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达防止血管损伤后内膜增生,该研究结果为二甲双胍用于支架内再狭窄的防治提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Dangas GD, Claessen BE, Caixeta A, et al. In-stent restenosis in the drug-eluting stent era[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56 (23): 1 897-907.

[2] Mills B, Robb T, Larson DF. Intimal hyperplasia: slow but deadly [J]. Perfusion, 2012, 27 (6): 520-528.

[3] El Messaoudi S, Rongen GA, de Boer RA, et al. The cardioprotective effects of metformin [J]. Curr Opin Lipidol, 2011, 22 (6): 445-453.

[4] 杨迪, 叶山东. 二甲双胍降糖外作用的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33 (6): 553-557.

[5] Li D, Ma S, Yang Y, et al. BTEB2 knockdown suppresses neointimal hyperplasia in a rat artery balloon injury model [J]. Mol Med Rep, 2011, 4 (3): 413-417.

[6] 马陶陶, 杨大春, 唐兵, 等. 白藜芦醇抑制基质金属蛋白酶抗酒精性心肌纤维化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (1): 21-24.

[7] Witters LA. The blooming of the French lilac [J]. J Clin Invest, 2001, 108 (8): 1 105-107.

[8] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) [J]. Lancet, 1998, 352 (9131): 854-865.

[9] Lexis CP, Rahel BM, Meeder JG, et al. The role of glucose lowering agents on restenosis after percutaneous coronary intervention in patients with diabetes mellitus [J]. Cardiovasc Diabetol, 2009, 8: 41.

[10] Lu J, Ji J, Meng H, et al. The protective effect and underlying mechanism of metformin on neointima formation in fructose-induced insulin resistant rats [J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 58.

[11] 李巍, 黄岚. PCI 术后再狭窄的病理生理及其危险因素 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (4): 375-380.

[12] Katsaros KM, Kastl SP, Zorn G, et al. Increased restenosis rate after implantation of drug-eluting stents in patients with elevated serum activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2010, 3 (1): 90-97.

[13] Preiss D, Lloyd SM, Ford I, et al. Metformin for non-diabetic patients with coronary heart disease (the CAMERA study): a randomised controlled trial [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2 (2): 116-124.

[14] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options [J]. Nat Med, 2011, 17 (11): 1 410-422.

[15] Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis [J]. Circ Cardiovasc Interv, 2011, 4 (1): 104-111.

(此文编辑 文玉珊)