

活化淋巴细胞诱导人血管平滑肌细胞 基质金属蛋白酶表达

李飞雪, 黄体钢, 周丽娟

(天津医科大学第二医院心脏科, 天津市 300211)

[主题词] 淋巴细胞, 活化; 肌, 平滑, 血管; 基质金属蛋白酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[摘要] 为探讨活化的淋巴细胞直接接触对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达的影响, 用乙酸肉豆蔻佛波醇活化并经 1% 多聚甲醛固定的人外周血淋巴细胞, 与培养的人类胚胎血管平滑肌细胞共同孵育, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定细胞培养上清液中基质金属蛋白酶的活性。结果发现, 基础状态下的体外培养人血管平滑肌细胞合成基质金属蛋白酶 2 的酶原形式, 有少量基质金属蛋白酶 2 的活性形式存在。经佛波醇活化淋巴细胞组上清液中可检测到基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 3 和基质金属蛋白酶 9 活性, 并且基质金属蛋白酶 2 活性形式较对照组增加 $198\% \pm 27\%$ ($P < 0.01$), 未经佛波醇活化的淋巴细胞不影响血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶的合成和分泌。以上结果提示, 活化固定的淋巴细胞可以通过细胞直接接触诱导血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达增加及活化, 在动脉粥样硬化的斑块破裂过程中可能起重要作用。

[中图分类号] Q55

[文献标识码] A

Activated Lymphocytes Induces the Expression of Matrix Metalloproteinase in Cultured Human Vascular Smooth Muscle Cells

LI Fei Xue, HUANG Ti Gang, and ZHOU Li Juan

(Department of Cardiology, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[MeSH] Lymphocyte, Activated; Muscle, Smooth, Vascular; Matrix Metalloproteinase; Polyacrylamide Gel Electrophoresis Technique

[ABSTRACT] **Aim** To Investigate whether activate lymphocyte contact induces the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells. **Methods** The healthy human peripheral blood lymphocytes, which were activated by incubating with PMA and then fixed in 1% paraformaldehyde, were incubated with cultured human fetal aortic vascular smooth muscle cells (hVSMC). The gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and stromelysin (MMP-3) activity in conditioned culture media were demonstrated by gelatin SDS-PAGE and casein SDS-PAGE. **Results** Unstimulated cultured hVSMC constitutively express 72 kDa zymogen of MMP-2 (pro-MMP-2) with a little of 66 kDa activated MMP-2, and no MMP-1, MMP-3, MMP-9 were detected by SDS-PAGE. After incubating with PMA-stimulated lymphocytes for 24 hours, zymography showed the MMP-1, MMP-3 and MMP-9 activity in the conditioned culture media, and activated MMP-2 increased $198\% \pm 27\%$ compared with the control group ($P < 0.01$). The unstimulated lymphocytes had no effect on MMPs synthesis of human fetal aortic vascular smooth muscle cells and PMA-activated lymphocyte had no gelatinolytic and caseinolytic activity on its own. **Conclusions** Activated lymphocytes may play an important role in atherosclerotic plaque rupture through inducing vascular smooth cells to produce increased MMP and activate MMP-2.

在不稳定斑块的肩部易损区, 存在大量的巨噬细胞和 T 淋巴细胞^[1], 这些进入动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块内的炎症细胞激活后, 表达和释放多种细胞因子和基质降解蛋白, 激活斑块内膜增生的主要细胞成份——血管平滑肌细胞, 使后者表

型和生理功能发生变化。本实验应用体外细胞培养的方法, 研究激活的外周血淋巴细胞直接接触对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达的影响, 以探讨细胞免疫在动脉粥样硬化斑块破裂中的作用。

1 材料与方法

1.1 血管平滑肌细胞的培养

选择 5 个月以上水囊引产的健康胎儿, 取材时间不超过引产后 10 h。组织块种植法培养引产胎儿主动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)。原代培养采用含 10% 胎牛血清、10% 人 AB

[收稿日期] 2001-11-15 [修回日期] 2002-07-10

[基金项目] 天津市科委重点课题资助。

[作者简介] 李飞雪, 女, 1970 年出生, 天津市人, 汉族, 心血管内科博士, 主治医师, 研究方向为冠心病的发病机制研究。黄体钢, 男, 1936 年出生, 浙江省温州市人, 心血管内科教授, 博士研究生导师, 长期从事心血管疾病的临床和基础研究工作。周丽娟, 女, 1952 年出生, 主管技师, 长期从事临床生物化学和分子生物学研究工作。

血清、1 mmol/L 丙酮酸钠、25 mmol/L HEPES、50 μ mol/L β -巯基乙醇、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基。传代后换为含 5% 胎牛血清和 5% 人 AB 血清的 RPMI1640 培养基。实验采用第 7 代细胞。

1.2 人外周血淋巴细胞的分离、活化及固定

健康人枸橼酸钠抗凝 200 mL 外周全血购自天津市中心血站。用室温 PBS 等量稀释全血, 在 25 mL 离心管内加入淋巴细胞分离液 7 mL, 稀释血 14 mL, 2 100 r/min, 离心 20 min。小心吸取灰白色的单个核细胞层。用 PBS 重悬细胞 1 600 r/min, 离心 10 min 洗 2 次。用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞密度为 3×10^9 /L, 移细胞悬液于直径为 10 cm 的塑料培养皿(Nunc), 37℃、5% CO₂ 孵箱中静置 2 h。吸取培养基, 离心收集未贴壁细胞即为淋巴细胞(下层贴壁细胞为单核细胞)。以含 1% 人 AB 血清的 RPMI1640 培养基调整细胞数为 1×10^9 /L, 转入 50 mL 培养瓶中, 部分细胞悬液加入乙酸肉豆蔻佛波醇(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, Sigma 公司产品) 50 μ g/L。37℃、5% CO₂ 孵育 24 h。24 h 后收集淋巴细胞, 1% 多聚甲醛 4℃固定 2 h, 为防止 PMA 污染, PBS 充分洗 3 次, 用 PBS 调整细胞密度为 4×10^9 /L, 贮存于 4℃备用。

1.3 实验分组

第 7 代人主动脉平滑肌细胞以 5×10^7 /L 种植于 24 孔板, 每孔加细胞悬液 1 mL。细胞长满融合后, 用 PBS 冲洗 2 遍, 加入无血清培养基(RPMI1640、0.2% 水解乳蛋白、青霉素 100 万单位/L 和链霉素 100 mg/L) 孵育 24 h, 以使细胞同步, 24 h 后换新鲜无血清培养基, 每孔 500 μ L。实验分为 5 组, 每组 5 次单独实验。对照组只加无血清培养基; 第二组加入未经 PMA 共育活化的淋巴细胞 1×10^6 /孔(简称 SMC/LC- 组); 第三组加入经 PMA 共育活化的淋巴细胞 1×10^6 /孔(简称 SMC/LC+ 组); 第四组加入 PMA 25 μ g/L(简称 PMA 组), 作为酶谱法测定的阳性对照和分子量标准(以往文献已证实 PMA 可诱导血管平滑肌细胞合成 MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9); 第五组只加经 PMA 共育活化的淋巴细胞 1×10^6 /孔(简称 LC+ 组), 无平滑肌细胞。24 h 后收集细胞培养上清液, 用于 MMPs 活性测定。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定基质金属蛋白酶活性

取上述细胞培养上清液 35 μ L, 上样于含 0.1% 明胶或酪蛋白的 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 将凝胶置于洗脱液(2.5%

Triton X100、50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L CaCl₂ 和 1 μ mol/L ZnCl₂, pH 7.6) 中振荡洗脱 2 次, 每次 45 min, 然后用漂洗液(除不含 Triton X100 外其余同洗脱液)漂洗 2 次, 每次 20 min, 以上各步均在 4℃进行。接着将凝胶置于孵育液(50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L CaCl₂、1 μ mol/L ZnCl₂ 和 0.02% Brj-35, pH 7.6) 中 37℃孵育 42 h。孵育结束后经染色液(0.5% 考马斯亮蓝、30% 甲醇和 10% 乙醇)染色 3 h, 用脱色液 A、B 和 C(甲醇浓度分别为 30%、20% 和 10%, 乙酸浓度分别为 10%、10% 和 5%) 分别脱色 0.5、1 和 2 h 后, 显示出 MMP 为位于蓝色背景上的透亮带。凝胶经 MICROTEK Phantom336 扫描仪扫描后存档。经 Band Leader 图像处理软件处理, 条带酶解量用(条带平均灰度-底色平均灰度) \times 条带面积表示。

1.5 统计学方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较用非配对 t 检验。

2 结果

2.1 活化的淋巴细胞对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 表达及活化的影响

由图 1(Figure 1) 可见, 基础条件下 SMC 合成分子量为 72 kDa 的 MMP-2 酶原(pro-MMP-2), 并有少量 66 kDa 的 MMP-2 活化形式(activated MMP-2)。经 PMA 共育活化的淋巴细胞对结构性分泌 MMP-2 酶原无明显影响($P > 0.05$), 但使 MMP-2 活性形式增加, 较对照组增加 $198.0\% \pm 27\%$ ($P < 0.01$) (表 1, Table 1)。未经活化的淋巴细胞对 MMP-2 酶原和 MMP-2 的活性形式无明显影响($P > 0.05$)。无平滑肌细胞存在时, 单纯激活的淋巴细胞无任何明胶酶活性。

表 1. 活化的淋巴细胞对基质金属蛋白酶 2 活化的影响。

Table 1. The effect of activated lymphocytes on MMP-2 activation.

Groups	pro-MMP-2	MMP-2
SMC/LC-	0.97	0.95
SMC/LC+	1.08	2.98 ^a
LC+	0	0

a: $P < 0.01$, compared with control group. pro-MMP-2: the ratio of pro-MMP-2 arbitrary value to control group; MMP-2: the ratio of activated MMP-2 arbitrary value to control group.

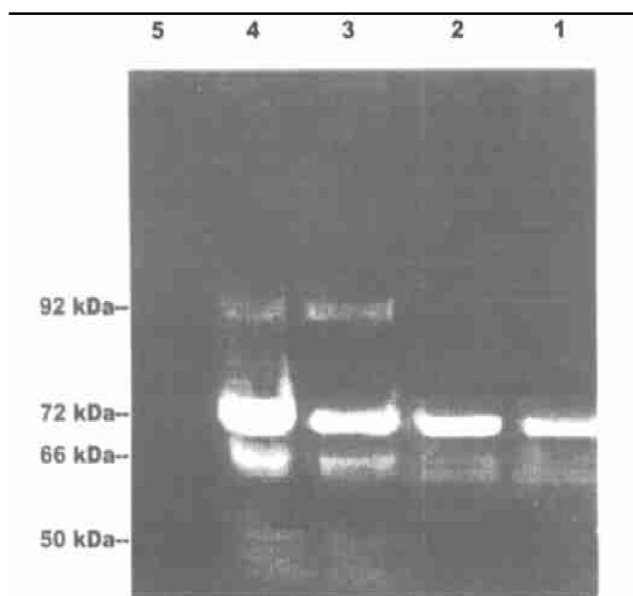


图 1. 活化的淋巴细胞对胎儿主动脉平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达及活化的影响。

Figure 1. The effect of activated lymphocytes on MMPs expression and activation in hVSMC, as indicated by SDS-PAGE gelatin zymography. 1: Control; 2: SMC/LC-; 3: SMC/LC+; 4: PMA; 5: LC+.

2.2 活化的淋巴细胞对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 9 表达的影响

由图 1(Figure 1)可见,基础条件下,明胶酶谱法未检测到 MMP-9 活性。加入活化的淋巴细胞后可见 92 kDa 处有明显的 MMP-9 分解明胶活性。与 PMA 刺激 SMC 合成分泌的 MMP-9 分解明胶带一致。未活化淋巴细胞与 SMC 共育后,细胞上清液中未检测到 MMP-9 活性。

2.3 活化的淋巴细胞对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 1 表达的影响

佛波醇共育活化的淋巴细胞使 SMC 上清液在 50 kDa 左右处出现 2 条紧密相连的较弱的明胶分解亮带,与具微弱明胶分解活性的 MMP-1 分子质量一致。文献[2]经 Western 杂交证实该区域分解明胶活性确为 MMP-1 所致。

2.4 活化的淋巴细胞对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 3 表达的影响

MMP-3 可以特异性分解酪蛋白,因此以酪蛋白作为底物的酶谱法,可以检测 MMP-3。由图 2(Figure 2)可见,基础条件下,酪蛋白酶谱法未检测到 MMP-3 活性。加入活化的淋巴细胞后可见 52 kDa 处与 MMP-3 分子质量一致的酪蛋白分解活性。未活化淋巴细胞与 SMC 共育后,细胞上清液中未检测到 MMP-3 活性。

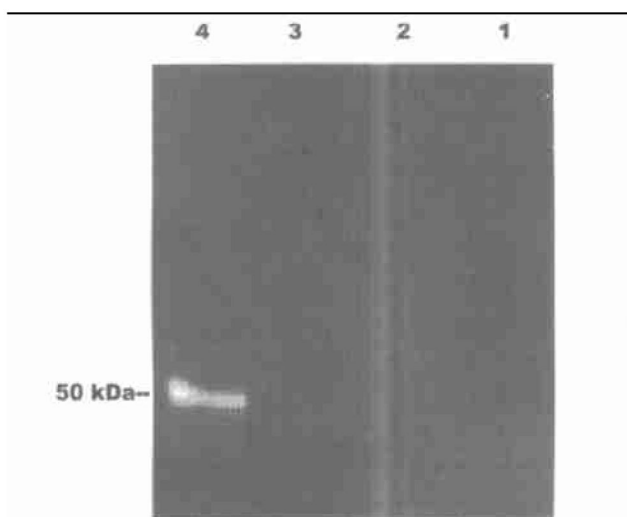


图 2. 酪蛋白酶谱法显示活化淋巴细胞对胎儿主动脉平滑肌细胞基质金属蛋白酶 3 表达的影响。

Figure 2. The effect of activated lymphocytes on MMP-3 expression in hVSMC, as indicated by SDS-PAGE casein zymography.

3 讨论

急性冠状动脉粥样斑块破裂及其后诱发的血栓形成,是急性冠状动脉综合症,即急性心肌梗死、不稳定性心绞痛和缺血性心源性猝死的共同病理基础^[3,4]。易于破裂的不稳定粥样斑块的特点是脂核巨大而覆盖其上的纤维薄弱。纤维帽的完整性对于维持斑块的稳定至关重要^[5]。

基质金属蛋白酶家族可通过降解细胞外基质破坏纤维帽完整性。基质金属蛋白酶的几个成员与胶原降解有关。其中基质金属蛋白酶 1(间质胶原酶)特异性分解细胞外基质,首先攻击稳定致密的三联纤维网状胶原;基质金属蛋白酶 2(明胶酶 A)及基质金属蛋白酶 9(明胶酶 B)进一步分解胶原片段;基质金属蛋白酶 3 能将其它基质金属蛋白酶由酶原形式转化成活性基质金属蛋白酶,并降解构成基质的另外 2 种主要成份弹性蛋白及蛋白多糖中的蛋白质^[6]。

血管平滑肌细胞是正常血管壁中最多的细胞成分。体外培养的人类平滑肌细胞结构性表达基质金属蛋白酶 2,无可检测到的基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 3 和基质金属蛋白酶 9 表达。然而,As 斑块内的 SMC 可表达以上全部 4 种基质金属蛋白酶免疫活性蛋白^[7]。

斑块的破裂经常发生在斑块的肩部区。在这一区域含有大量巨噬细胞和 T 淋巴细胞等炎症细胞。这些细胞不但可以自行分泌基质金属蛋白酶(如巨

噬细胞),产生可溶性介质(如白细胞介素 1、肿瘤坏死因子和组织胺)促进其它细胞表达基质金属蛋白酶,而且可通过细胞间相互接触这一细胞免疫途径诱导基质金属蛋白酶的表达。对 71 例不同程度急性冠状动脉综合征行斑块切除术的病人进行回顾性研究表明,斑块内含白细胞介素 2R(CD25)阳性 T 淋巴细胞随缺血性冠状动脉综合征的严重程度显著增高,提示不稳定斑块内存在免疫反应活化和放大,T 淋巴细胞随缺血性冠状动脉综合征的严重程度显著增高,提示不稳定斑块内存在免疫反应活化和放大,T 淋巴细胞活化是不稳定斑块生物学进程的特征。活化的 T 细胞与单核细胞或平滑肌细胞直接接触可诱导后者表达多种基质金属蛋白酶^[8,9]。

本实验通过酶谱法显示经 PMA 活化的正常人外周血淋巴细胞经固定后作用于平滑肌细胞可以明显诱导 SMC 表达基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9,促进基质金属蛋白酶 2 活化。与 Sch^[9]beck 等^[9]报道的活化 T 细胞胞膜对平滑肌细胞的作用结果相同。本实验中淋巴细胞除 T 细胞外,还含有部分 B 细胞,仅靠本实验不能确定基质金属蛋白酶的诱导作用来源于 T 细胞或 B 细胞。目前尚未见到 B 淋巴细胞接触促进基质金属蛋白酶的报道,但多家报道 T 细胞膜直接接触促进平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达。结合本实验结果,推测 PMA 活化的淋巴细胞对平滑肌细胞基质金属蛋白酶诱导作用来源于活化 T 细胞,而活化 B 细胞对活化 T 细胞的诱导无明显抑制作用。

活化 T 细胞诱导基质金属蛋白酶的机制已基本阐明。As 斑块 CD4⁺ T 细胞可以表达一种位于胞膜上的免疫调节物——CD40 配体,而血管平滑肌细胞表面存在其受体——CD40。Sch^[9]beck 等^[9]用抗体

中和法揭示 CD40-CD40 配体结合是活化 T 细胞直接接触诱导 SMC 基质金属蛋白酶表达的分子基础,并且通过与白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 诱导作用相比较,被认定为是体内基质金属蛋白酶的最强诱导剂。因此抑制 As 斑块 T 淋巴细胞活化对于提高斑块稳定性具有重要的临床应用价值。积极的降脂和抗氧化治疗,预防巨细胞病毒和肺炎衣原体感染,通过避免抗原刺激斑块中免疫反应活化可能具有稳定斑块的作用。另外通过基因治疗手段抑制 CD40 信号转导环节对于提高斑块稳定可能有一定的应用前景。

[参考文献]

- [1] 石怀银, 韦立新, 郭爱桃, 等. 稳定性和不稳定性心绞痛冠状动脉斑块形态和狭窄程度的对比研究. 中华心血管病杂志, 2000, 28 (6): 420-422
- [2] Pickering JG, Ford CM, Tang B, et al. Coordinated effects of fibroblast growth factor-2 on expression of fibrillar collagens, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human vascular smooth muscle cells: evidence for repressed collagen production and activated degradative capacity. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17: 475-482
- [3] Kullo IJ, Edwards WD, Schwartz RS. Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implication. Ann Intern Med, 1998, 129: 1 050-060
- [4] 覃 军. 冠状动脉粥样硬化斑块破裂的细胞与分子生物学研究进展. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (1): 79-81
- [5] Cheng GC, Loree HM, Kamm RD, et al. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. Circulation, 1993, 87: 1 179-187
- [6] Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. Bioessays, 1992, 14: 455-463
- [7] Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8 154-158
- [8] Lacraz S, Isler P, Vey E, et al. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is an major pathway for induction of metalloproteinase expression. J Biol Chem, 1994, 269: 22 027-033
- [9] Sch^[9]beck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? Circ Res, 1997, 81: 448-454

(此文编辑 胡必利, 朱雯霞)