

## 同型半胱氨酸对大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 表达的影响

邢杨波<sup>1</sup>, 郭航远<sup>1</sup>, 马孝泉<sup>1</sup>, 何 红<sup>2</sup>

(1. 绍兴市人民医院心内科, 浙江省绍兴市 312000; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院心内科, 浙江省杭州市 310016)

[关键词] 病理学与病理生理学; 同型半胱氨酸致动脉粥样硬化作用; 明胶酶谱分析法; 同型半胱氨酸; 血管平滑肌细胞; 基质金属蛋白酶 2; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察同型半胱氨酸对大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 表达的影响, 探讨其致动脉粥样硬化可能的机制。方法 体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞, 加入不同浓度的同型半胱氨酸分别作用 24、48 和 72 h, 采用免疫印迹法和明胶酶谱分析法检测细胞培养基中基质金属蛋白酶 2 的表达。结果 同型半胱氨酸浓度在 0.5~1.0 mmol/L 时促进血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 的表达; 浓度在 5.0 mmol/L 以上时抑制血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 的表达。同一浓度同型半胱氨酸作用 72 h 明显强于 24 h 和 48 h。结论 同型半胱氨酸可影响血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 的表达, 在动脉粥样硬化中可能起着一定的促进作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Homocysteine on the Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

XING Yang-Bo<sup>1</sup>, GUO Hang-Yuan<sup>1</sup>, MA Xiao-Quan<sup>1</sup>, and HE Hong<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Shaoxing Hospital, Shaoxing 312000, China; 2. Department of Cardiology, Sir Run Run Shaw Hospital, Hangzhou 310016, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Vascular Smooth Muscle Cells; Matrix Metalloproteinase-2; Atherosclerosis; Zymography; Western blotting

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of homocysteine (Hcy) on the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Cultured rat VSMC was incubated with different concentration of Hcy in vitro for 24, 48 and 72 h. The expression of MMP-2 was determined by using the methods of gelatin zymography and western blotting. **Results** 0.05~1.0 mmol/L Hcy increased the expression of MMP-2 significantly. Incubated with the same concentration of Hcy the level of MMP-2 of 72 h was higher than that of 24 h and 48 h. Hcy > 5.0 mmol/L reduced the expression of MMP-2. Incubated with the same concentration of Hcy (> 5.0 mmol/L) the level of MMP-2 of 72 h was lower than that of 24 h and 48 h. **Conclusions** These datas suggested that Hcy can affect the expression of MMP-2 in VSMC. It may be one of factors in the pathogenesis of atherosclerosis induced by Hcy.

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是动脉粥样硬化发生的一个独立危险因素<sup>[1]</sup>, 但它致动脉粥样硬化机制目前还不十分明确, 已有研究表明 Hcy 与动脉粥样斑块中胶原代谢关系密切, Majors 等<sup>[2]</sup>报道它能促进胶原的合成, 国内王金凤等<sup>[3]</sup>报道它可抑制大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)基质金属蛋白酶 1 的表达, 然而它对 VSMC 基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)表达的影响如何, 至今国内尚未见报道。本研究旨在通过研究 Hcy 对大鼠主动脉平滑肌细胞

MMP-2 表达的影响, 探讨其致动脉粥样硬化可能的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物与试剂

SD 大鼠(体重 150 g)由浙江大学医学院动物室提供。DMEM 培养基和胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司; Hcy 及兔抗 MMP-2 抗体购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

#### 1.2 平滑肌细胞的培养

胸主动脉平滑肌细胞原代培养参考文献[4]。采用 HHF35 免疫组织化学鉴定 VSMC。取第 5~7 代细胞接种于 100 mL 培养瓶中, 加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 48 h, 待瓶内细胞长满 80% 左右, 换

[收稿日期] 2005-09-05

[修回日期] 2006-04-10

[作者简介] 邢杨波, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 xingyangbo@sohu.com。郭航远, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。马孝泉, 主任医师。

无胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h, 使细胞同步增长后再消化接种于含 10% 胎牛血清六孔细胞培养板中, 每孔细胞数为  $1 \times 10^5$  个/ $\text{cm}^2$ 。然后加入不同浓度的 Hcy, 使其终浓度分别为 0、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0 及 10.0 mmol/L<sup>[3]</sup>, 分别作用 24、48 及 72 h, 收集各细胞培养液,  $-70^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.3 样品制备

收集培养液, 2 000 r/min 常温离心 5 min, 去除细胞碎片, 冷冻干燥后,  $-70^\circ\text{C}$  保存备用。紫外分光光度法检测蛋白含量, 加入蛋白处理液 (0.5% 溴酚兰, 40% 蔗糖, 2.5% SDS, 0.1 mol/L Tris-HCl),  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min 后即可。

### 1.4 明胶酶谱分析法

取经处理过的细胞培养液放在含 10 g/L 明胶的聚丙烯酰胺凝胶片上电泳 (100 v), 待溴酚蓝到达凝胶底部, 在室温下用洗涤缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 1 mol/L  $\text{ZnCl}_2$ , 2.5% Triton 100) 冲洗 30 min, 共 3 次; 再用缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 1 mol/L  $\text{ZnCl}_2$ , 1% Triton 100) 在  $37^\circ\text{C}$  温箱摇床平摇过夜。然后凝胶再用 2.5% 考马斯亮兰溶液染色 1 h, 脱色液 (10% 冰乙酸, 45% 甲酸溶液) 脱色 40 min, 蓝色背景下白色区域即为 MMP 所在位置, 用数字成像系统进行拍照及定量分析, 每组 4 个样本, 多次重复试验。

### 1.5 免疫印迹法检测

取经处理过的细胞上清液在 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (100 v), 待溴酚蓝到达凝胶底部, 然后将凝胶转移至硝酸纤维素膜 (PVDF) 上, 转移后的硝酸纤维素膜置于含 10% 脱脂奶粉的洗涤缓冲液 (0.2 mmol/L Tris-HCl, pH7.6, NaCl 137 mmol/L, 0.1% Tween 20) 中, 室温下摇床轻摇 2 h 进行封闭, 然后将膜置于用上述同样缓冲液 1:1 000 稀释的兔抗 MMP-2 抗体中  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜; 次日用 TBS 液洗涤 5 min, 3 次, 加入含羊抗兔二抗的同样缓冲液在室温下轻摇 2 h, 最后经洗涤后扫描成像。

### 1.6 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学差异; 并对存在显著性差异者采用 LSD- $t$  法行多样本比较。

## 2 结果

### 2.1 血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 的鉴定

免疫印迹法检测细胞培养上清液中蛋白, 结果发现条带分子质量为 72 kDa, 即为 MMP-2 (图 1)。

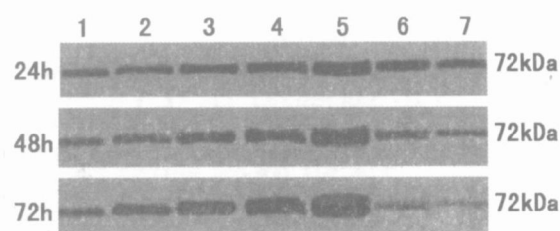


图 1. 血管平滑肌细胞培养上清液免疫印迹法分析 1 为 0 mmol/L Hcy (对照组), 2 为 0.05 mmol/L Hcy, 3 为 0.1 mmol/L Hcy, 4 为 0.5 mmol/L Hcy, 5 为 1.0 mmol/L Hcy, 6 为 5.0 mmol/L Hcy, 7 为 10.0 mmol/L Hcy。

### 2.2 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 表达的影响

明胶酶谱分析发现, 蓝色背景上的白色透明条带分子质量为 72 kDa, 即为 MMP-2 所在的条带。用酶解量表示 MMP-2 活性, Hcy 在 0.5~1.0 mmol/L 时促进 MMP-2 的表达 ( $P < 0.01$ ), 而 Hcy 在 5.0~10.0 mmol/L 时抑制 MMP-2 的表达 ( $P < 0.01$ ); 同一浓度 Hcy 作用下, 72 h 的作用明显强于 48 h 和 24 h ( $P < 0.01$ )。见表 1 和图 2。

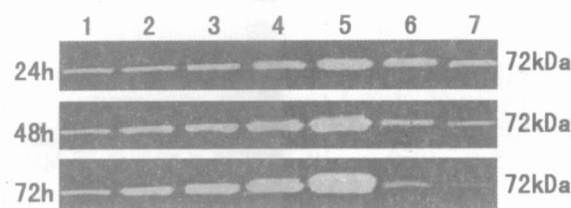


图 2. 血管平滑肌细胞培养上清液明胶酶谱分析 1 为 0 mmol/L Hcy (对照组), 2 为 0.05 mmol/L Hcy, 3 为 0.1 mmol/L Hcy, 4 为 0.5 mmol/L Hcy, 5 为 1.0 mmol/L Hcy, 6 为 5.0 mmol/L Hcy, 7 为 10.0 mmol/L Hcy。

表 1. 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Hcy (mmol/L)	24 h	48 h	72 h
0 (对照组)	0.35 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.02
0.05	0.65 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.13 <sup>ac</sup>
0.1	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.82 $\pm$ 0.16 <sup>ac</sup>
0.5	1.48 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	2.48 $\pm$ 0.21 <sup>ac</sup>
1.0	2.02 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	2.59 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	3.22 $\pm$ 0.25 <sup>ac</sup>
5.0	1.19 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.67 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>
10.0	0.76 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.35 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.01$ , 与 1.0 mmol/L 同型半胱氨酸组相比; c 为  $P < 0.01$ , 与 24 h 和 48 h 组相比。

## 3 讨论

同型半胱氨酸 (Hcy) 致动脉粥样硬化的机制之

一可能是促进 VSMC 的迁移与聚集<sup>[1]</sup>。Woo 等<sup>[5]</sup>报道 D, L-型 Hcy 能刺激牛主动脉平滑肌细胞的增殖,可能的机制为促进有丝分裂,增加蛋白激酶活性, Hcy 的起始作用是促进 VSMC 钙离子的释放而启动血管的反应,这种瞬间的钙离子的变化会对细胞外基质产生影响。Taha 等<sup>[6]</sup>也报道 Hcy 刺激平滑肌细胞的生长是通过过氧化物独立途径,促进氧化作用,并能促进大鼠主动脉平滑肌细胞中 DNA 的合成,加速动脉粥样硬化。MMP-2, 又称明胶酶 A, 分子量为 72 kDa, VSMC 能分泌 MMP-2, 它的功能主要是降解血管基底膜。在动脉粥样硬化的形成过程中, 血管中膜平滑肌细胞突破基底膜向内膜迁移是一个重要的病理环节, Zempo 等<sup>[7]</sup>报道 VSMC 的迁移与增殖而致动脉粥样斑块的形成需 MMP-2 所介导的细胞外基质的重构, Brown 等<sup>[8]</sup>也证实在冠状动脉粥样硬化过程有 MMP-2 的参与, 并起着十分重要的作用。

本实验通过明胶酶谱分析法及免疫印迹法, 以不同浓度 Hcy 作用于体外培养的 VSMC, 结果发现 Hcy 在 0.5~1.0 mmol/L 时促进 MMP-2 的表达, 72 h 作用最明显, 表明 Hcy 可促进 VSMC MMP-2 的表达, 从而有效降解基底膜, 为平滑肌细胞迁移至血管内皮下扫清道路, 促使动脉粥样斑块的形成, 这可能是 Hcy 致动脉粥样硬化的机制之一。本实验还发现 Hcy 在 5.0~10.0 mmol/L 时抑制平滑肌细胞 MMP-2 的表达。Bescond 曾报道不同浓度 Hcy 直接加入 MMP-2 溶液中, 结果发现低摩尔比(10:1)促进 MMP-

2 的活性, 而高摩尔比(1 000:1)抑制 MMP-2 活性, 内在机制是高浓度 Hcy 改变了 MMP-2 的分子结构, 从而使 MMP-2 活性降低<sup>[9]</sup>, 但 Hcy 对平滑肌细胞 MMP-2 表达的双重影响的机制是否与此相似, 还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 王玉芳, 王树人. 同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(3): 259-263
- [2] Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease: Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(10): 2 074-081
- [3] 王金凤, 任立群, 李广生. 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 1 活性的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(1): 15-18
- [4] 任立群, 张秀云, 孙波, 王金凤. 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的组织贴块法培养及鉴定[J]. 吉林大学学报·医学版, 2002, 28(2): 135-136
- [5] Woo DK, Dudrick SJ, Sumpio BE. Homocysteine stimulates MAP kinase in bovine aortic smooth muscle cells[J]. *Surgery*, 2000, 128(1): 59-66
- [6] Taha S, Azzi A, Ozer NK. Homocysteine induces DNA synthesis and proliferation of vascular smooth muscle cells by hydrogen peroxide independent mechanism[J]. *Antioxid Redox Signal*, 1999, 1(3): 365-369
- [7] Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(1): 28-33
- [8] Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92 kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina[J]. *Circulation*, 1995, 91(8): 2 125-131
- [9] Bescond A, Augier T, Chareyre C, Garcon D, Homebeck W, Charpiot P. Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase 2: Activation and activity[J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 1999, 263(2): 498-503

(此文编辑 文玉珊)