

[文章编号] 1007-3949(2010)18-11-0861-04

• 实验研究 •

血管紧张素 Ang^{II} 对载脂蛋白 E 敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达影响

杨智华, 杨丽霞, 郭瑞威, 齐峰, 石燕昆, 王红, 叶金善, 梁星

(成都军区昆明总医院心血管内科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 血管紧张素 Ang^{II} ; 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; 动脉粥样硬化; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] 目的 探讨血管紧张素 Ang^{II} 对载脂蛋白 E 敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达的影响。方法 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠经高脂饮食饲养建立动脉粥样硬化模型, 用血管紧张素 Ang^{II} 干预。用免疫组织化学法观察粥样硬化斑块内细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达, 用 RT-PCR 及 Western blotting 检测主动脉内细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达。结果 血管紧张素 Ang^{II} 干预组细胞外基质金属蛋白酶诱导因子在动脉粥样硬化斑块内阳性表达较对照组明显增加; 血管紧张素 Ang^{II} 干预组主动脉内细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 mRNA 及蛋白表达较对照组明显增加。结论 血管紧张素 Ang^{II} 能诱导动脉粥样硬化斑块内细胞外基质金属蛋白酶诱导因子的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Angiotensin Ang^{II} Influence Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Expression in Aortic Atherosclerotic Plaques in Apolipoprotein E Knock-out Mice

YANG Zhihua YANG Lixia GUO Ruiwei QI Feng SHI Yan-Kun WANG Hong YE Jin-Shan and LIANG Xing
(Department of Cardiology, Kunming General Hospital, Kunming 650032, China)[KEY WORDS] Angiotensin Ang^{II} ; EMMPRN; Atherosclerosis; Apolipoprotein E Knock-out Mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate angiotensin Ang^{II} (Ang^{II}) influence extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRN) expression in aortic atherosclerotic plaques in apolipoprotein E knock-out mice. **Methods** ApoE^{-/-} mice were fed with a western diet for atherosclerosis model. Interfered with Ang^{II} . EMMPRN gene and its protein were measured by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry. **Results** EMMPRN positive expression significantly increased in Ang^{II} intervention group compared with the control group in atherosclerotic plaque. EMMPRN gene and protein expression significantly increased in Ang^{II} intervention group compared with the control group in atherosclerotic plaque. **Conclusion** Angiotensin Ang^{II} can induce EMMPRN expression in aortic atherosclerotic plaque.

急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 的发病机制为易损斑块的破裂。近年研究发现, 具有薄纤维帽和较大脂质核的粥样硬化斑块 (易损斑块) 较血管腔严重狭窄者更容易继发冠状动脉内急性血栓事件^[1]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 具有降解细胞外基质的作用, 被认为参与动脉粥样斑块去稳定性作用, 并通过降解粥样斑块纤维帽促进斑块破裂, 是斑块破裂的关键因素^[2]。而细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRN) 能诱导 MMP 合成和表达, 并在人颈动

脉粥样斑块内表达, 调控 MMP 活性^[3]。

血管紧张素 Ang^{II} ($\text{angiotensin}^{\text{II}}$, Ang^{II}) 不仅是肾素-血管紧张素系统的重要的血管活性肽, 更是促动脉粥样硬化因子, 在动脉粥样硬化斑块发展过程中促进内皮细胞分泌内皮素, 促进血栓形成, 增加细胞氧化应激水平, 诱导细胞炎症, 促进细胞凋亡, 引起内皮功能障碍, 最新研究发现 Ang^{II} 不但能诱导血管平滑肌细胞表达 MMP^[4], 而且能够上调巨噬细胞表达 EMMPRN^[5,6]。然而 Ang^{II} 对粥样硬化斑块中 MMP 的诱导因子 EMMPRN 的作用目前尚不清楚。因此, 作者利用目前认为在普通饮食或者高脂饮食 (西方饮食) 喂养条件下, 均可形成与人类极为类似病理学改变的动脉粥样硬化斑块的 ApoE 基因敲除小鼠^[7], 给予高脂饮食饲养建立动脉粥样硬化模型, 探讨 Ang^{II} 在动脉粥样硬化斑块中对 EMMPRN 表达的影响。

[收稿日期] 2010-08-09

[修回日期] 2010-10-20

[作者简介] 杨智华, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事急性冠状动脉综合征的基础和临床研究。Email 为 yang_zh@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。郭瑞威, 博士, 主治医师, 主要从事内皮损伤及修复研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ang^①A9525 (Sigma公司), 羊抗 EMMPRN 多克隆抗体 sc-9757 (Santa Cruz公司), 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 NB600-501 (Novus Biologicals公司), 动物 RNAout (天泽恩公司), ReverTra Ace- α 试剂盒 FSK-100 (东洋纺公司), 2 \times Taq Plus PCR Master Mix (天根公司), RIPA 蛋白裂解液 (申能博彩公司), 辣根酶标记兔抗山羊 IgGZB-2306 DAB 显色试剂盒 (中杉金桥公司), 胆固醇 (科龙公司)。

1.2 建立动物模型

6周龄 ApoE 基因敲除雄性小鼠 14只 (北京维通利华公司), 体重 18.5 ± 0.5 g 均给予高脂饮食 (常规小鼠饲料 + 21.0% 猪油 + 0.15% 胆固醇)^[8] 喂养 12周后, 随机分为对照组和 Ang^①干预组, 每组 7只。分别植入微量渗透泵 MODEL2004 (Alzet 公司), 具体操作: 戊巴比妥 (0.02 g/kg) 腹腔注射麻醉, 将小鼠俯卧于手术台上, 背部除毛, 碘伏消毒, 用剪刀剪开背部皮肤、皮下, Ang^①组埋入已预装 0.75 g/(kg \cdot d) Ang^①微量泵, 对照组埋入已预装蒸馏水微量泵, 缝合皮下、皮肤。所有小鼠均给予高脂饮食喂养 4周。

1.3 标本采集

将小鼠固定于手术台上, 取出主动脉, 剪下升主动脉, 4% 多聚甲醛固定, 从主动脉根部开始, 行连续石蜡切片, 切片厚 4 μ m。主动脉 - 70 $^{\circ}$ C 保存。

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 免疫组织化学检测主动脉粥样硬化斑块细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达

组织化学染色用 ABC 法: 3% H₂O₂, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 羊抗 EMMPRN 多克隆抗体 1: 100 稀释, 兔抗山羊二抗 1: 500 稀释, DAB 显色, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 替代一抗作为阴性对照, 光镜下所见黄褐色颗粒为阳性, 用 IPP6.0 彩色显微图像分析软件进行半定量分析。每组随机选取 5 张 DAB 染色切片, 测定阳性染色积分光密度值 (IOD), 取 5 张切片的平均值作为每组的 IOD 值。IOD 值越高表明组织内 EMMPRN 含量越高。

1.6 RT-PCR 分析主动脉细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 mRNA 水平

每组分别取主动脉 (降主动脉至腹主动脉) 血管 3 根, 用 RNAout 匀浆, 抽提组织总 RNA。RT-

PCR 试剂盒逆转录为 cDNA, 所有引物均参照 Gengbank 提供的序列, 用 Primer Premier 5.0 设计, 由大连宝生物公司合成。引物设计如下: EMMPRN 5'-GGC AAG TAT GTG GTG GTA TCC-3' (正义链), 5'-AGT GAG ATG GTT TCC CGA GTA G-3' (反义链); β -actin 5'-AGA TTA CTG CTC TGG CTC CTA GC-3' (正义链), 5'-ACT CAT CGT ACT CCT GCT TGC T-3' (反义链)。PCR 后经 1.5% 琼脂糖电泳鉴定, 凝胶成像系统 (Bio-Rad 2000) 进行图像分析测得其灰度值, 以 EMMPRN 与 β -actin 光密度比值, 表示 EMMPRN mRNA 表达水平。

1.7 Western blotting 分析主动脉细胞外基质金属蛋白酶诱导因子蛋白表达

每组取 4 根主动脉血管 (降主动脉至腹主动脉), RIPA 裂解液匀浆后提取总蛋白质, 以 BSA 作标准曲线, 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。常规电泳, 转膜, 封闭后分别加入如下抗体: EMMPRN、 β -actin, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记二抗, 化学发光试剂增强反应, X 线压片曝光, 用 GSD8000 密度扫描分析系统 (英国 UVP 公司) 进行图像分析, 以 EMMPRN 与 β -actin 条带的吸光面积积分比值来评定 EMMPRN 蛋白表达水平。

1.8 统计学分析

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

与对照组比较, 用 Ang^①干预 ApoE 基因敲除小鼠主动脉斑块含巨噬细胞及脂质较多, 纤维帽较薄, 斑块较易损 (图 1)。

2.2 血管紧张素^①对主动脉粥样硬化斑块细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达的免疫组织化学测定

Ang^①和生理盐水分别干预成功建立动脉粥样硬化斑块模型, 用免疫组织化学法检测主动脉粥样硬化斑块内 EMMPRN 表达, 主动脉内粥样斑块内棕黄色为阳性表达 (图 2), Ang^①组 IOD 值与对照组相比 EMMPRN 表达明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 表 1)。

2.3 血管紧张素^①对主动脉内细胞外基质金属蛋白酶诱导因子基因表达测定

以 Ang^①干预动脉粥样硬化斑块模型, 用 RT-PCR 法检测主动脉 EMMPRN 基因表达, 与对照组

相比 AngⅡ组 EMPRI N在主动脉内基因表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2和图 3)。

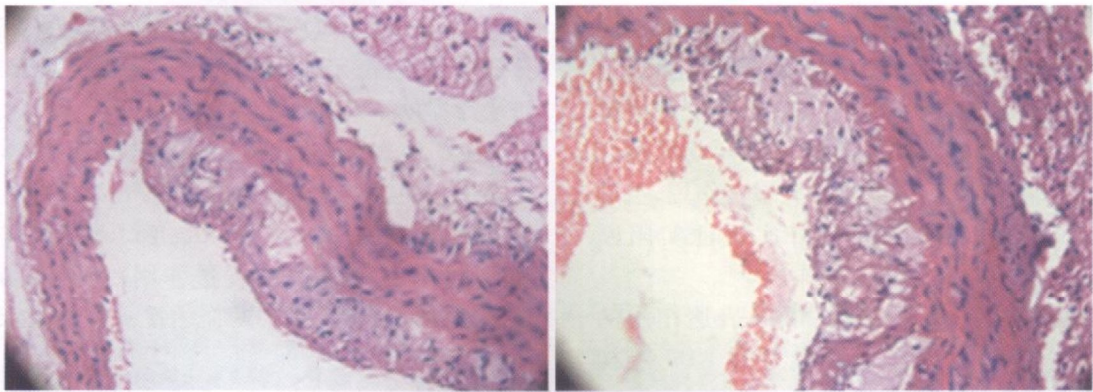


图 1. 动脉粥样硬化斑块模型在生理盐水和 AngⅡ干预后主动脉斑块病理学形态 (×400) 左为对照组, 右为 AngⅡ组。

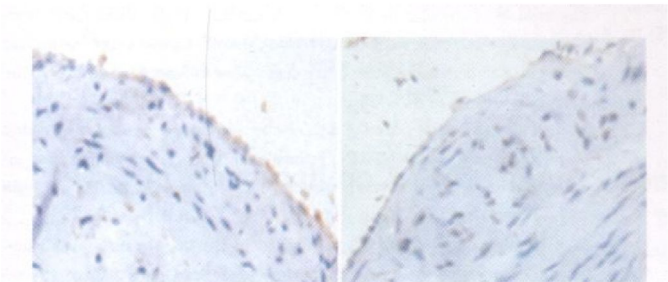


图 2. 动脉粥样硬化斑块模型在生理盐水和血管紧张素Ⅱ干预后主动脉斑块内 EMPRI N 表达情况 (×400) 左为对照组, 右为 AngⅡ组。

表 1. 动脉粥样硬化斑块模型在生理盐水和血管紧张素Ⅱ干预后主动脉斑块内 EMPRI N 阳性表达 OD 值

分 组	OD 值
对照组	2.203 862 7 ± 0.107 405 3
AngⅡ组	4.302 011 3 ± 0.171 095 6

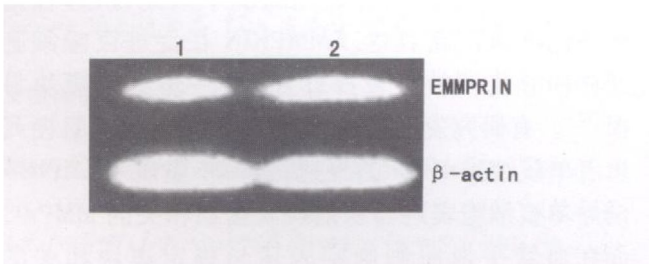


图 3. 动脉粥样硬化斑块模型在生理盐水和血管紧张素Ⅱ干预后主动脉内 EMPRI N 基因表达情况 1 为对照组, 2 为 AngⅡ组。

2.4 血管紧张素Ⅱ对主动脉内细胞外基质金属蛋白酶诱导因子蛋白表达的影响

同对照组相比, AngⅡ组主动脉内 EMPRI N 蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4 和表 3)。

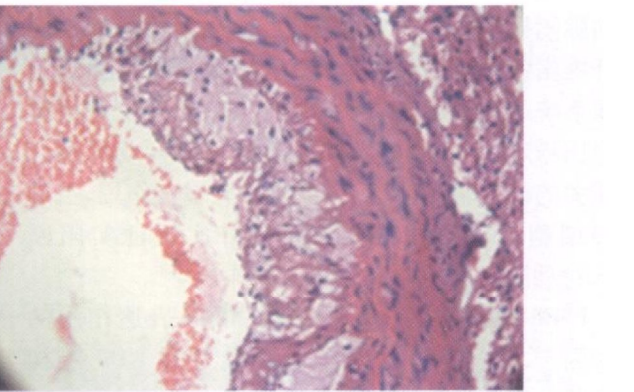


图 4. 动脉粥样硬化斑块模型在生理盐水和血管紧张素Ⅱ干预后主动脉内 EMPRI N 蛋白表达情况 1 为对照组, 2 为 AngⅡ组。

表 2. 动脉粥样硬化斑块模型在生理盐水和血管紧张素Ⅱ干预后主动脉内 EMPRI N 基因表达灰度值比值

分 组	灰度值
对照组	0.8345 ± 0.0164
AngⅡ组	1.0959 ± 0.1354

表 3. 动脉粥样硬化斑块模型在生理盐水和血管紧张素Ⅱ干预后主动脉内 EMPRI N 蛋白表达光密度比值

分 组	OD 值
对照组	0.4079 ± 0.0396
AngⅡ组	0.7420 ± 0.0342

3 讨论

动脉粥样硬化性疾病是一种慢性炎症疾病, 其发病基础是动脉粥样硬化斑块形成, 然而随着循证医学证实, 急性冠状动脉综合征的发生与粥样硬化斑块的易损性相关, 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。MMP是一个迄今至少有二十种锌和钙依赖性的内肽酶组成的家族, 在

单核巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞广泛表达^[9]。MMP具有降解细胞外基质的作用,参与动脉粥样斑块去稳定性作用,并通过降解粥样斑块纤维帽促进斑块破裂^[10]。AngⅡ是肾素-血管紧张素系统的重要的血管活性肽,AngⅡ不仅发挥维持血压稳定作用,还可发挥与动脉粥样硬化斑块产生相关的调节脂质代谢、平滑肌细胞增殖作用、更是一种细胞生长因子。体内及体外实验证实阻断RAS对动脉粥样硬化起到有益的作用^[11]。

EMMPRN具有诱导和调控MMP表达作用的重要因子,是一跨膜糖蛋白,分子量为58 KDa,结构上有两个细胞外免疫球蛋白区域,一个跨膜区域,以及3个糖基化位点。免疫组织化学显示EMMPRN与MMP在人动脉粥样硬化斑块中共定位,并在粥样硬化斑块内高表达,EMMPRN在促进巨噬细胞迁移和分化调控中发挥作用,进一步导致斑块易损^[12]。有研究发现,EMMPRN能够上调心肌梗死患者单核细胞MMP的表达,进一步发现EMMPRN诱导单核细胞表达与易损斑块密切相关的MMP-9,而在血管平滑肌细胞则表达与稳定斑块相关的MMP-2,提示EMMPRN在不同细胞表达不同的MMP,说明EMMPRN的表达和调控存在细胞和相应途径的特异性,并与急性冠状动脉综合症的发病有直接或者密切关系^[13]。Zhu等^[14]在脑卒中动物模型中也发现EMMPRN与MMP在缺血性脑卒中部位高表达并且表达的改变在时间和空间上相一致,说明EMMPRN调控MMP的表达。

本实验以ApoE基因敲除小鼠建立动脉粥样硬化模型,在体探讨了AngⅡ在主动脉粥样斑块中对EMMPRN表达的调控作用。本研究免疫组织化学结果显示AngⅡ干预组主动脉粥样硬化斑块内EMMPRN有阳性表达且较对照组增强,进一步对主动脉粥样硬化斑块内EMMPRN表达量进行研究后发现,AngⅡ干预组主动脉粥样硬化斑块内EMMPRN表达明显增加,提示AngⅡ可能与粥样硬化斑块易损相关的MMP的诱导因子EMMPRN密切相关,可以上调其表达。再次证明AngⅡ对动脉粥样硬化斑块的发展有重要促进作用。Guo等^[4]对相关信号通路研究发现,AngⅡ是通过AT1R及NF-κB途径促进MMP-9表达,由此可以推断AT1R及NF-κB可能也参与了AngⅡ诱导EMMPRN的表达,也将对这一信号通路进行深入研究。另有研究证实MMP-9与易损斑块相关,MMP-2与稳定斑块相关,而EMMPRN的N端糖基化是其发挥作用的关键,提示EMMPRN糖基化与MMP的调控和粥样斑块

的去稳定性有关^[15]。因此,是否能够通过抑制不同糖基化的EMMPRN进一步抑制不同MMP的表达在维持粥样硬化斑块稳定及延缓粥样硬化斑块进展有重要意义,值得进一步研究,为临床ACS早期预防治疗提供新的药物靶点。

本研究在体实验证实AngⅡ与导致粥样硬化斑块易损相关的MMP的诱导因子EMMPRN密切相关,可以上调其表达,提示AngⅡ对动脉粥样硬化斑块的发展和去稳定性有促进作用,为阐明AngⅡ在动脉粥样硬化性疾病中的作用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Vimanir R, Burke AP, Farb A. Pathology of the vulnerable plaque [J]. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47** (6): c13-18
- [2] Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-κB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner [J]. *J Vasc Res* 2005; **42** (5): 415-423
- [3] Yoon YW, Kwon HM, Hwang KC, et al. Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRN: extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque [J]. *Atherosclerosis*, 2005; **180** (1): 37-44
- [4] Guo RW, Yang LX, Wang H. Angiotensin II induces matrix metalloproteinase-9 expression via a nuclear factor-κB-dependent pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Regul Pept* 2008; **147** (1-3): 37-44
- [5] 刘宏, 杨丽霞, 郭瑞威, 等. 血管紧张素Ⅱ通过核因子-κB上调巨噬细胞基质金属蛋白酶诱导因子的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **9** (28): 780-784
- [6] 叶金善, 杨丽霞, 郭瑞威, 等. 环氧化酶-2/前列腺素E2在血管紧张素Ⅱ刺激巨噬细胞表达细胞外基质金属蛋白酶诱导因子中的作用 [J]. *中华高血压杂志*, 2009; **10** (17): 906-911
- [7] Rosenfeld ME, Polinsky P, Vimanir R, et al. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20** (12): 2 587-592
- [8] Johnson JL, Jackson CL. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse [J]. *Atherosclerosis* 2001; **154** (2): 399-406
- [9] Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28** (12): 2 108-114
- [10] Koenig W, Khuseynova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27** (1): 15-26
- [11] Lucia M, Duchosal MA, Korber M. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice [J]. *Hypertension*, 2004; **44** (3): 277-282
- [12] Iacono KT, Brown AL, Greene M I, et al. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology [J]. *Exp Mol Pathol* 2007; **83** (3): 283-295
- [13] Schmidt R, Böhm A, Ungerer M, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2006; **113** (6): 834-841
- [14] Zhu W, Khachis H, Qiao Q, et al. Upregulation of EMMPRN after permanent focal cerebral ischemia [J]. *Neurochem Int* 2008; **52** (6): 1 086-091
- [15] Sluiter JP, Pulsken WP, Schoneveld AH, et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinase 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms [J]. *Stroke* 2006; **37** (1): 235-239

(此文编辑 李小玲)