

血管再狭窄发生过程中MM P-2基因表达与胶原转换的动态变化*

周秀霞 温进坤** 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生化研究室, 石家庄 050017)

摘要 建立主动脉内皮剥脱后血管再狭窄大鼠模型, 用Northern印迹分析、含明胶SDS-PAGE、羟脯氨酸含量测定及流式细胞术动态观察血管再狭窄发生过程中MM P-2基因表达与胶原转换及血管细胞增殖之间的关系。实验结果表明, 血管内皮剥脱后, MM P-2基因表达被显著诱导, MM P-2活性及胶原转换明显增高, 在第7 d, MM P-2表达活性及胶原合成与降解均达到峰值; 第21 d, MM P-2表达恢复正常, 胶原合成和降解仍维持在较高水平。流式细胞分析结果显示, 血管内皮剥脱后进入增殖状态及发生凋亡的细胞显著增加, 增殖细胞所占比例高于凋亡细胞, 且两者均随内皮损伤后的时间延长而增加。

关键词 球囊损伤, 血管再狭窄, 基质金属蛋白酶-2, 基因表达, 胶原转换, 细胞增殖, 细胞凋亡

The Change of MM P-2 Gene Expression and Collagen Turnover during Vascular Restenosis Development

ZHOU Xiuxia, WEN Jinkun, HAN Mei

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

Abstract A rat model of vascular restenosis was established by balloon injury. Using Northern blot analysis, SDS-PAGE containing gelatin, hydroxyproline concentration determination and flow cytometry analysis, MM P-2 gene expression, collagen turnover and vascular cell proliferation activity were analyzed during vascular restenosis development. The results showed that MM P-2 gene expression was markedly induced by vascular de-endothelialization, then MM P-2 activity and collagen turnover increased obviously. On day 7, MM P-2 gene expression, the collagen synthesis and degradation reached the peaks; On day 21, MM P-2 expression returned to basic level. Cell cycle analysis suggested that the number of proliferating and apoptotic cells increased remarkably during vascular restenosis development. With the extension of the time of endothelial injury, both the proliferating cells and apoptotic cells increased, but the proportion of the former was higher than that of the latter.

Key words Balloon injury, Vascular restenosis, MM P-2, Gene expression, Collagen turnover, Cell proliferation, Cell apoptosis

细胞外基质(ECM)异常积聚是球囊血管成形术后血管再狭窄的重要原因。在病变部位, ECM可达组织总量的90%。胶原是ECM的主要成分, 其过度合成不仅是造成ECM异常积聚的原因, 而且还影响血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖和迁移。因此, 胶原合成与降解平衡失调在血管再狭窄的发生发展过程中发挥重要作用^[1]。已经证明, 胶原转换过程受基质金属蛋白酶(MMP)的调节, 其中降解基底膜主

要结构成分的IV型胶原酶(亦称MM P-2或明胶酶

* 国家自然科学基金(39770312)及河北省自然科学基金(398284)资助项目

** 联系人 Tel: (0311)6044121-5563, Fax: (0311)6048177
E-mail: WJK@hebm.u.edu.cn

周秀霞, 女, 1965年10月生, 博士, 讲师

收稿日期: 1999-01-22, 修回日期: 1999-04-07

A, 以下称MMP-2)可能担任着重要角色^[2].为进一步探讨MMP-2在血管成形术后再狭窄的发生过程中的作用,本文建立大鼠主动脉内皮细胞剥脱模型,在新生内膜形成及血管再狭窄的发生过程中,动态观察MMP-2基因表达与胶原转换及VSMC增殖之间的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

SD大鼠由河北省实验动物中心提供;MMP-2探针及大肠杆菌JM109为本室保存;各种限制性内切酶,随机引物标记试剂盒为Promega公司产品; α -³²P-dCTP购自北京亚辉生物医学公司.其它试剂均为国产或进口分析纯.

1.2 方法

1.2.1 大鼠主动脉内皮细胞剥脱模型的建立:参照Bendeck等人的方法^[3],选用体重310~350g雄性SD大鼠,20%乌来糖腹腔麻醉(0.3ml/kg体重)后,将球囊导管经左颈总动脉插入至腹主动脉,注入适量生理盐水充盈球囊,回拉导管至主动脉弓处,重复6次,移出球囊导管,结扎左颈总动脉,分别于术后3、7、14及21d取损伤部位血管段进行形态学观察,提取RNA和蛋白质.对照组行左颈总动脉结扎术.

1.2.2 形态学观察样品制备:按光镜样品制备方法常规固定、脱水、包埋、切片、染色,光镜下观察、照相.

1.2.3 蛋白提取液的制备:取损伤部位血管,加适量组织提取液(20mmol/L NaCl, 100mmol/L Tris-HCl, pH7.8),冰浴下匀浆,补加1/10体积10% SDS,充分裂解细胞后,4℃, 12000r/min离心10min,取上清,用改良酚试剂法测定蛋白质含量.

1.2.4 Northern印迹分析:用异硫氰酸胍一步法^[4]分别从对照及主动脉内皮剥脱后不同时间的大鼠血管中提取RNA,各取30 μ g,进行1%琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳,转移至尼龙膜上后,按文献^[5]方法与用随机引物法标记的MMP-2 cDNA进行杂交及放射自显影.

1.2.5 MMP-2活性的检测:用含明胶的SDS-PAGE检测MMP-2活性的方法按文献^[6]进行,分离胶浓度为8%(含0.2%明胶),浓缩胶为5%.取球囊损伤后不同时间及对照血管提取液(各含15 μ g蛋白),120V恒压电泳2h.电泳结束后,凝胶经2.5% Triton X-100漂洗两次,15min/次,使胶原酶复性,随后加入反应缓冲液(50mmol/L Tris-HCl,

50mmol/L NaCl, 10mmol/L CaCl₂, 1% Triton X-100), 37℃温育9h, 0.5%考马斯亮蓝染色1.5~2h,脱色液(10%乙酸-40%甲醇)脱色至蓝色背景下白色条带清晰.

1.2.6 羟脯氨酸含量测定:按文献^[7]方法,将损伤部位血管经丙酮-乙醚(1:1)脱脂,干燥后称取3~5mg,加0.9%NaCl制成匀浆,用2mol/L HCl调pH至2~2.5,胃蛋白酶消化72h,加50 μ l 1mol/L pH8.0的Tris-HCl终止反应后,加入200 μ l 1.2mol/L高氯酸沉淀大分子胶原,4000r/min离心10min,将其与降解的小分子胶原分开.沉淀与上清分别收集,置110℃烤箱干燥后,6mol/L HCl 110℃水解24h,4mol/L NaOH调pH至5.0~7.0,定容,过滤.取滤液0.2ml,加入0.5ml 0.5mol/L 氯胺T溶液混匀,室温氧化6min,高氯酸终止反应.加入0.5ml 10%对二甲氨基苯甲醛,75~80℃显色20min,冷却后于波长560nm比色测定羟脯氨酸含量.

1.2.7 流式细胞术检测:按文献^[8]方法,取内皮剥脱后不同时间的血管(每个时间点的标本均来自3只大鼠)固定于70%乙醇,采用匀浆法分散细胞,PBS洗涤后,PI染色30min,300目尼龙网过滤,FACS420型流式细胞仪测定.

2 结果

2.1 形态学变化

光镜下观察,主动脉内皮剥脱后7d,新生内膜中可见局灶性细胞增殖,中膜VSMC核排列紊乱,腔内无内皮细胞.术后14~21d,内膜呈弥漫性增厚,增厚的内膜中以细胞(VSMC)成分为主.提示本研究所建立的内皮剥脱后血管再狭窄动物模型是成功的.

2.2 MMP-2基因表达水平的改变

如图1所示,从对照和内皮剥脱后不同时间的主动脉提取的RNA与MMP-2 cDNA探针杂交后,在大约3.1kb的位置上出现一条杂交带,其长度与文献报道的大鼠MMP-2 mRNA相一致^[9].从杂交信号的强度可知,在对照血管中MMP-2基因表达水平很低,主动脉内皮剥脱后,该基因的表达被显著诱导,在第3d时比对照血管增加4.7倍,第7d,其表达活性达到高峰,比对照增加18.5倍.此后,随内皮剥脱时间的延长,MMP-2基因的表达逐渐下降,21d时恢复到正常水平.

(A) 1 2 3 4 5

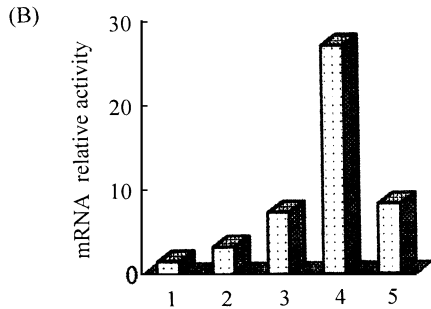


Fig 1 mRNA expression of MM P-2 gene in normal and de-endothelialized rat aortas
 (A) A autoradiogram; (B) Densitometric scanning
 1: control; 2: 21 d; 3: 14 d; 4: 7 d; 5: 3 d

2.3 MMP-2活性的变化

用含明胶 SDS-PA GE 对MM P-2活性进行检测的结果表明, 对照及内皮剥脱不同时间主动脉组织提取液均可在95 kD、72 kD 和68 kD 的位置使明胶发生降解 根据已知MM P 的分子量, 95 kD 处的明胶降解区带为MM P-9(明胶酶B)的明胶降解活性所导致, 72 kD 和68 kD 的区带分别是MM P-2原及其活性形式所造成(Fig 2) Fig 2显示, 主动脉内皮剥脱后第7 d, MM P-2和MM P-9活性最高, 前者活性升高更为明显, 其它时间点的活性与对照无显著差别.

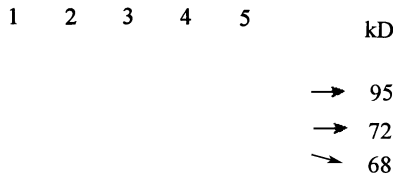


Fig 2 Measurement of MM P-2 activity in tissue extracts by SDS-PA GE containing gelatin
 1: control; 2: 3 d; 3: 7 d; 4: 14 d; 5: 21 d

2.4 羟脯氨酸含量测定结果

在所观察的时间范围内, 大鼠主动脉内皮剥脱后胶原合成和降解均显著增加, 虽两者变化的谱型

相类似(Fig 3 A, B), 但在内皮损伤后的第7 d, 胶原合成所增加的幅度远高于降解所增加的幅度. 内皮剥脱7 d 时, 胶原合成和降解达到峰值, 分别达对照的4.9倍和1.6倍. 之后胶原合成与降解都逐渐下降, 但直至21 d 时仍显著高于对照血管.

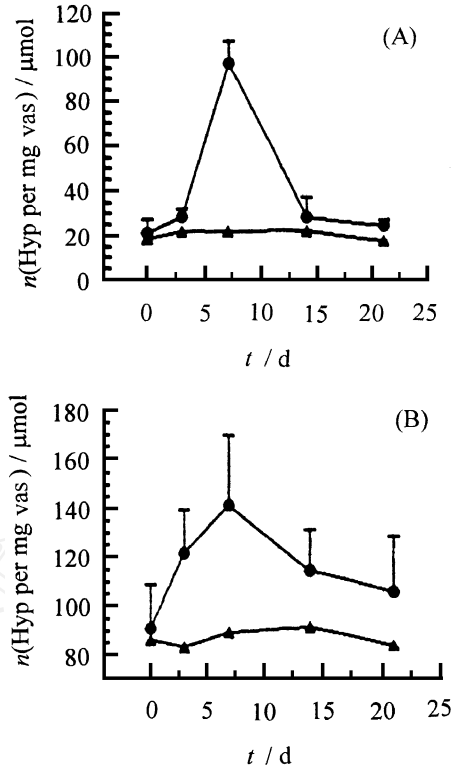


Fig 3 Measurement of hydroxyproline concentration in the balloon-injured aortas
 (A) Synthesis of collagen; (B) Degradation of collagen
 The experiment; The control

2.5 细胞周期分析

Fig 4显示, 从对照大鼠主动脉分离的细胞有86.9% 处于 G₀/G₁期, 随血管内皮损伤后时间的延长, 进入 G₂/M 期及发生凋亡的细胞数逐渐增多, 至第21 d, G₂/M 期细胞达细胞总数的14.5%, 凋亡细胞达11.8% .

3 讨 论

V SMC 增殖及其从动脉中层向内膜迁移是动脉粥样硬化斑块形成和血管成形术后再狭窄的主要原因. 近年证明, V SMC 的迁移和增殖与 ECM 的降解密切相关, 因而降解 ECM 的MM P 在 V SMC 迁移过程中起着重要作用. 晚近, 人们对MM P 表达调节机制进行了一些研究^[2], 但是用整体动物动态观察血管再狭窄发生过程中MM P-2基因表达与胶原转换及 V SMC 增殖之间关系的报道尚不多见. 本研

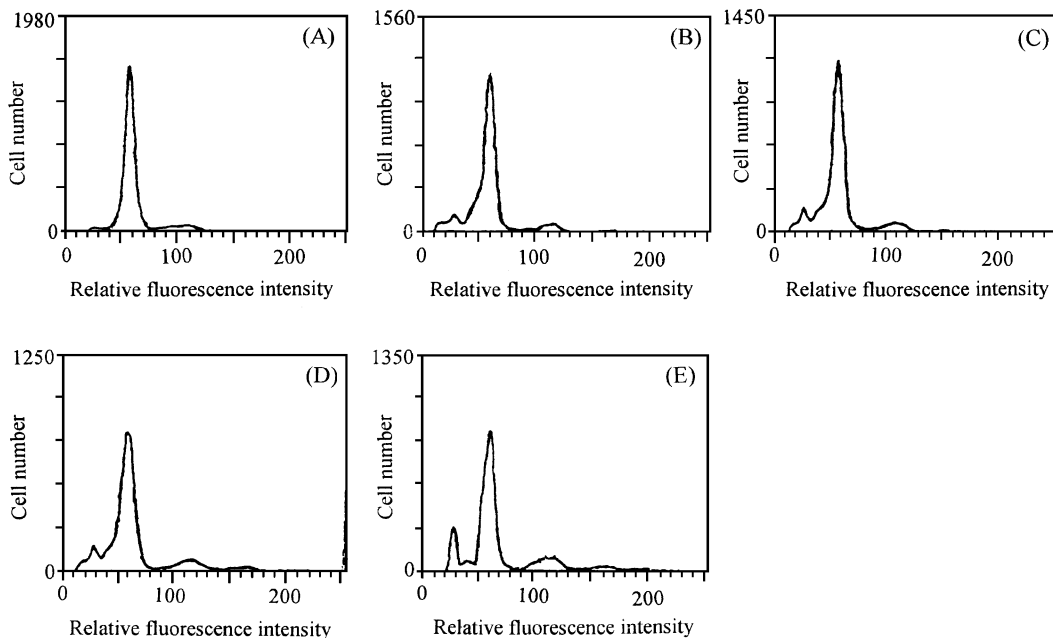


Fig 4 Flow cytometry analysis of rat vascular cells from the balloon-injured aorta

- (A) control G_0/G_1 : 86.9%, S: 6.9%, G_2/M : 6.2%, apoptosis rate: 1.8%
 (B) 3 d G_0/G_1 : 86.4%, S: 4.9%, G_2/M : 8.7%, apoptosis rate: 6.1%
 (C) 7 d G_0/G_1 : 87.1%, S: 5.3%, G_2/M : 7.5%, apoptosis rate: 8.4%
 (D) 14 d G_0/G_1 : 82.6%, S: 6.6%, G_2/M : 10.9%, apoptosis rate: 9.7%
 (E) 21 d G_0/G_1 : 78.2%, S: 7.3%, G_2/M : 14.5%, apoptosis rate: 11.8%

究结果表明,在对照大鼠主动脉搏血管中,MM P-2基因表达水平及MM P-2活性均很低,胶原合成与降解较慢,V SMC 处于静止状态.血管内皮细胞剥脱后,MM P-2基因表达被显著诱导,MM P-2活性及胶原转换均明显增高.至第7 d,MM P-2基因表达、MM P-2活性及胶原合成与降解均达到峰值.但在该时间点,胶原合成所增加的幅度(对照血管的4.9倍)远大于降解所增加的幅度(对照的1.6倍),这可能是造成血管再狭窄部位 ECM 异常积聚的主要原因.之后,MM P-2基因表达活性、胶原转换逐渐降低,至第21 d时,MM P-2 mRNA 水平及MM P-2活性均恢复到对照水平,但胶原合成与降解仍显著高于对照血管,这可能与此时V SMC 的增殖活性仍居高不下,而处于增殖状态的V SMC 不断分泌MM P-2与胶原合成酶有关.因为细胞周期分析结果显示,随血管内皮剥脱后时间的延长,进入增殖状态的V SMC 数量不断增多,直至21 d时,仍呈进一步上升的趋势.另外,在进行增殖的V SMC 不断增加的同时,发生凋亡的细胞也在增加,但处于增殖状态的细胞所占百分比远高于凋亡细胞的百分比,这可能也是导致血管内膜增厚、管腔狭窄的原因之一.

用体外培养的V SMC 对MM P-2表达调控机制进行研究的提示,一些生长因子或细胞因子,如bFGF、PDGF等能显著刺激MM P-2表达^[10].已经证明,血管内皮受到损伤时,受损部位的细胞合成与分泌这些因子增加,在在体血管,它们也可能作为MM P-2基因表达的诱导因子,促进MM P-2基因表达,并分解ECM,进而引发V SMC 迁移与增殖,导致内膜增厚、管腔狭窄.

References

- 1 孙红霞,温进坤. IV型胶原酶与动脉粥样硬化. 中国动脉硬化杂志(*Chin Arterioscler*), 1998, 6(3): 271~ 274
- 2 Dollery C M, McEwan J R, Henney A M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 1995, 77: 863~ 868
- 3 Bendek M P, Irvin C, Reidy M A. Inhibition of matrix metalloproteinases activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res*, 1996, 78: 38~ 43
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156~ 159
- 5 乔亚明,温进坤. 脂多糖对血管平滑肌细胞一氧化氮合酶基因表

- 达及细胞增殖的影响 生物化学杂志 (Effects of LPS on expression of nitric oxide synthase gene and proliferation in vascular smooth muscle cells *Chin Biochem J*), 1997, **13**(4): 401~ 405
- 6 Overall CM, W rana J L, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72 kD progelatinase and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β *J Biol Chem*, 1989, **264**: 1860~ 1869
- 7 李玉瑞 细胞外基质的生物化学及研究方法 北京: 人民卫生出版社 (Li Yurui *The Biochemistry and Research Method of Extracellular Matrix*. Beijing: People's Hygiene Press), 1988
- 8 左连富 流式细胞术样品制备技术 北京华夏出版社 (Zuo Lianfu *The Technology of Sample Preparation in Flow Cytometry Analysis* Beijing: Beijing Huaxia Press), 1991
- 9 Haas T L, Davis S J, Madri J A. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells *J Biol Chem*, 1998, **273**: 3604~ 3610
- 10 Galis Z S, Muszynski M, Sukhova G K, Simon-Morrissey E, Uremori E N, Lark M W, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion *Circ Res*, 1994, **75**: 181~ 189

吴显荣主编《基础生物化学》第2版出版

由全国高等农业院校教材指导委员会审定的全国高等农业院校教材《基础生物化学》第二版, 已由中国农业出版社于1999年5月出版, 全书486千字, 16开本, 328页。本书第一版由阎隆飞、李明启主编。从1985年6月到1994年6月, 已经重印9次。多年来经过各高等院校试用, 受到广大读者的欢迎, 因而被评为首届农业部优秀教材, 并获优秀教材奖。

鉴于经过十多年的时间, 生物化学与分子生物学又有迅速的进展, 有些旧的内容已不适用, 需要在原有基础上进行修订及改编。作者根据国家教委及农业部编写教材的有关规定, 进行了改编, 作为《基础生物化学》第二版。

改编的指导思想和第一版基本相同, 在继承原有教材理论和结构体系的基础上, 删去了“细胞的生物化学”及“光合作用”两章, 以避免与细胞生物学及植物生理学教材重复; 充实和修改了生物大分子结构、性质和分离提纯、主要物质代谢、生物膜及遗传信息代谢等新内容。

第二版的作者除第一版的作者吴显荣外, 又增加了焦鸿俊、叶茂炳、陈珈, 并邀请徐朗莱编写第八章, 全书由阎隆飞、李明启两教授主审。

本书可作高等农业院校教材, 也可供有关院校生物化学与分子生物学专业有关教师、学生及有关科研人员作参考。

本书定价22.70元, 需要者可与中国农业出版社发行部联系。地址: 北京市朝阳区农展馆北路2号 邮编: 100026。