

水蛭素抑制人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶-2的生成及活化

王敏* 张维东¹ 崔连群 王晓军 烟玉琴² 秦凤菊²

(山东大学临床医学院省立医院心内科, 济南 250021; ¹ 山东省医学科学院基础研究所, 济南 250012;

² 山东科技大学信息与电气工程学院生物医学系, 济南 250031)

摘要 研究凝血酶对人脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶的影响及重组水蛭素的作用。将原代培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的第2~5代分组后与凝血酶(4.0 ku/L)共同温育, 同时分别加入水蛭素(6.0 ku/L)和肝素(6.0 ku/L), 在不同时间, 用逆转录聚合酶链反应和免疫组织化学分析的方法评价基质金属蛋白酶-2的表达情况。结果显示凝血酶促进血管内皮细胞产生和活化基质金属蛋白酶-2。重组水蛭素可以有效地阻断凝血酶的上述作用。

关键词 水蛭素; 凝血酶; 基质金属蛋白酶-2; 人脐静脉内皮细胞

研究表明凝血酶除参与凝血过程, 还使血管内皮细胞钙离子浓度增加、通透性增强、形态改变导致内皮屏障作用减弱^[1,2], 同时释放多种细胞因子和水解酶^[3,4]进而参与多种复杂动脉粥样硬化斑块的发生、发展过程。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是造成生成动脉粥样硬化斑块纤维帽厚度和抗损伤强度降低、粥样斑块稳定性下降的主要机制之一。水蛭素是利用基因重组技术生产的高效特异性凝血酶抑制剂, 因而它可以抑制凝血酶介导冠心病及冠状动脉介入术后再狭窄的多个环节。本研究用体外人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)培养的方法证明, 凝血酶上调HUVEC基质金属蛋白酶-2(MMP-2)生成及活化, 水蛭素(hirudin)能显著抑制凝血酶对HUVEC的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

凝血酶, 胶原酶I型, 胰蛋白酶, DMEM培养基, 购自Sigma公司。重组水蛭素(12 500 u/ml, pH 6.5, 酵母真核表达系统表达的65个氨基酸多肽)由山东阿华生物药物有限公司馈赠;胎牛血清, 杭州四季青公司生产。VIII因子相关抗原和MMP-2抗体, SABC(streptavidin biotin complex)试剂盒, 购自武汉博士德公司。RT-PCR检测细胞因子试剂盒, 购

自贝西生物技术有限公司。超净工作台(JHT), CO₂培养箱(Nuare), 倒置相差显微镜(Olympus), PCR仪(Thermal 4800), 电泳仪(EC 250-90), 紫外透射反射分析仪(2F-4), 凝胶成像分析系统(DC120型), 购自济南医疗设备公司或由其代理。

1.2 细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞用胶原酶I消化法获得后, 进行体外培养。经VIII因子免疫细胞化学染色鉴定后并选用生长良好的第2~5代HUVEC用于实验。用培养液调整细胞密度为 2×10^9 个/L, 接种在6孔培养板内的盖玻片上, 培养24~48 h后培养板内已有80%的细胞呈汇合状态, 换无血清DMEM同步24 h。实验分4组: 凝血酶(4.0 ku/L)组; 凝血酶(4.0 ku/L)+水蛭素(6.0 ku/L)组; 凝血酶(4.0 ku/L)+肝素(6.0 ku/L)组; 以无血清DMEM培养液为空白对照组。每组实验重复3次。

1.3 免疫细胞化学染色

用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法进行免疫细胞化学分析。按上述分组进行干预培养24 h后取出盖玻片。冷丙酮固定, 吹干。将盖玻片固定在洁净的载玻片上, 加含0.5% H₂O₂的甲醇, 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗涤; 再滴加正常山羊血清封闭液。滴加兔抗人MMP-2多

克隆抗体(一抗), 阴性对照片滴加 PBS, 4 °C 过夜。PBS 洗 3 次, 依次滴加生物素化山羊抗兔 IgG(二抗)、SABC 试剂, PBS 各洗 3 次。DAB(联苯二胺)显色, 蒸馏水洗涤。镜下观察 MMP-2 阳性细胞浆染成棕黄色; 用蒸馏水洗涤、脱水、透明、封片、照相并用计算机图象分析系统随机测量 10 个高倍视野中 MMP-2 阳性细胞数、吸光度及 HUVEC 总数, 求出 MMP-2 表达的阳性细胞百分率、平均吸光度值。

1.4 细胞总 RNA 提取

将细胞按 2×10^9 个/L 密度接种于 25 ml 培养瓶。实验分组: 凝血酶(4.0 ku/L)组, 按与 HUVEC 温育时间再分为 1、6、24、48h 亚组; 凝血酶(4.0 ku/L)+ 水蛭素(6.0 ku/L)组, 按时间点再分为 6、24 h 亚组; 凝血酶(4.0 ku/L)+ 肝素(6.0 ku/L)组, 按时间点再分为 6、24 h 亚组。以相同时间正常培养的 HUVEC 为对照组。每组实验重复 3 次。细胞用无钙镁离子 PBS 冲洗 2 遍, 用刮棒将细胞刮下, 连同少量残存的 PBS 液一起离心、弃上清液。加入 Trizol 变性液吹打细胞, 依次加入 2 mol/L 乙酸钠、水饱和酚和氯仿, 每步均需混匀。旋涡振荡器混匀 10 s, 冰浴 10 min, 离心(10 000 g, 10 min, 4 °C)。取上清液, 加入等体积的异丙醇, -20 °C 放置 1 h。离心, 弃上清液, 沉淀用 Trizol 变性液重溶, 加入等体积的异丙醇混匀, -20 °C 放置 1 h。离心, 弃上清液, 加入适量 0.1% DEPC 水, 混匀。取 2 μ l 总 RNA, 稀释 100 倍后在紫外分光光度计测定 A_{260} 及 A_{280} 处的值, 计算所提总 RNA 的含量。

1.5 RT-PCR

按 PR-PCR 检测试剂盒提供的说明书, 分 RT 及 PCR 两步进行。① 分别加入总 RNA、MMLV 逆转录酶、逆转录反应体系、下游引物、去 RNase 水, 进行 RT 反应, 快速离心混匀, 37 °C, 1 h, 95 °C, 10 min 灭活 MMLV, 快速离心混匀使蒸气沉于管底。② 加入 PCR 反应体系、上游引物、超净水进行 PCR 反应。PCR 循环条件: 94 °C 1 min、58 °C 1 min、72 °C 1 min, 循环 30 次, 末次延长 7 min。PCR 扩增 MMP-2 和 MT1-MMP cDNA, 并同时扩增 β -肌动蛋白作为内参照。扩增 MMP-2 的引物: 5'-ACCTGGATGCCGTCGTG-GAC-3' 和 5'-TGTGGCAGCACCAGGGCAGC-3', 扩增片段长度为 447 bp; 扩增 MT1-MMP 的引物: 5'-GCCCATTGGCCAGTTCTGGCGGG-3' 和 5'-

CTCGTCCACCTCAATGATGATC-3', 扩增片段长度为 530 bp; β -肌动蛋白引物顺序为: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3' 和 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 扩增片段长度为 300 bp。

1.6 RT-PCR 产物分析

经 1.2% 琼脂糖凝胶(经 1% 溴化乙锭染色)电泳鉴定(电压 75 V)。用凝胶成像分析系统测出阳性表达产物和 β -肌动蛋白的表达强度, 按如下公式计算相对系数: 相对系数 = 表达产物/ β -肌动蛋白的表达强度, 根据相对系数作统计学处理。

1.7 统计学处理

测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SAS 统计软件系统分别进行统计学分析, 各组均数间差异性检验用单因素方差分析, 组间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 免疫细胞化学染色

免疫细胞化学染色显示, 不同分组处理与内皮细胞温育 24 h 后, 显示体外培养的血管内皮细胞在正常条件下 MMP-2 表达极低; 加入凝血酶组 MMP-2 阳性细胞浆染成棕黄色; 阳性细胞数量和吸光度明显高于其他对照组(53.1%; 0.3327 ± 0.45)($P < 0.05$), 而加入水蛭素组(24.4%; 0.1892 ± 0.24)、和肝素组(29.2%; 0.1921 ± 0.47)($P < 0.05$)较凝血酶组 MMP-2 阳性细胞数量和吸光度显著减少。见图 1~4。

2.2 RT-PCR

不同浓度的凝血酶对 HUVEC 表达 MMP-2 mRNA 的影响(图 5)。正常培养的对照组(0 h)无 MMP-2 基因表达; 凝血酶加入 HUVEC 后 1 h 可见 MMP-2 表达, 较高表达持续在 6 h~24 h[相对系数较对照组升高(0.363 ± 0.284)~(0.672 ± 0.312)]; 48 h 仍有表达但明显减弱[相对系数较对照组升高(0.296 ± 0.249)]。

水蛭素、肝素干预不同时间对 HUVEC 表达 MMP-2 mRNA 的影响(图 6)。图 6 显示 6 h 水蛭素、肝素均能够抑制 HUVEC 凝血酶诱导的 MMP-2 的表达, 当 24 h MMP-2 表达水平较高, 水蛭素仍能完全抑制, 但肝素的抑制作用不完全, 仍有较低浓度的 MMP-2 表达[相对系数较水蛭素组高(0.189 ± 0.291)]。

不同浓度的凝血酶对 HUVEC 表达 MT1-MMP mRNA 的影响(图 7)。正常培养的对照组(0 h)有少量 MT1-MMP 基因表达(相对系数 0.145 ± 0.136); 凝血酶加入 HUVEC 后 1 h(相对系数 0.155 ± 0.203)与对

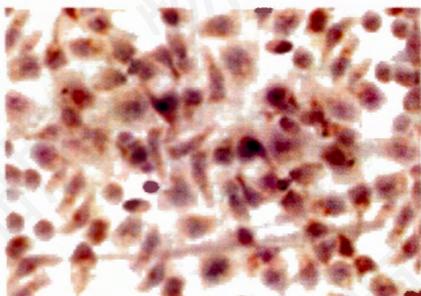


图1 正常体外培养的UVEC
MMP-2 抗体染色阴性。

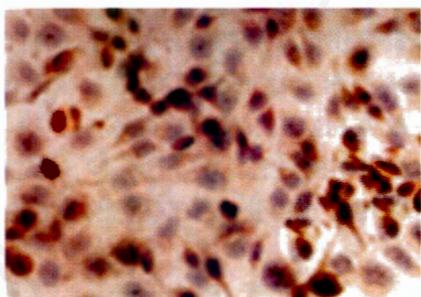


图2 凝血酶诱导体外培养HUVEC
MMP-2 抗体染色阳性细胞数约 53.1%，平均光密度 0.3327±0.45。

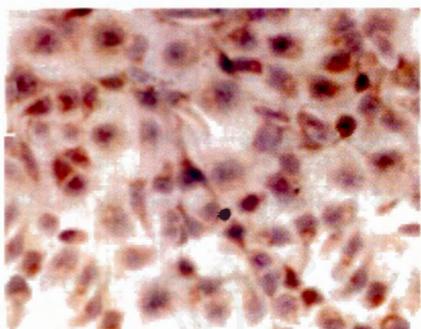


图3 水蛭素拮抗凝血酶诱导体外培养HUVEC
MMP-2 抗体染色阳性细胞数约 24.4%，平均光密度 0.1892±0.24。

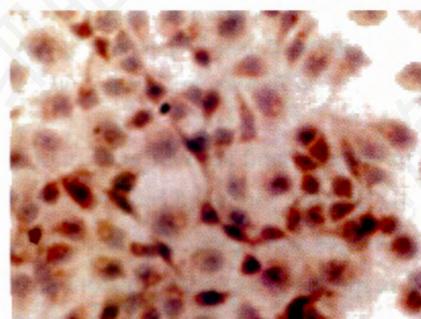


图4 肝素拮抗凝血酶诱导体外培养HUVEC
MMP-2 抗体染色阳性细胞数约 29.2%，平均光密度 0.1921±0.47。

照组比较差异无显著性；6 h 表达升高明显，较高表达持续在 6 h 至 24h[相对系数较对照组升高(0.244±0.284)~(0.407±0.212)]；48 h 表达水平基本至基础水

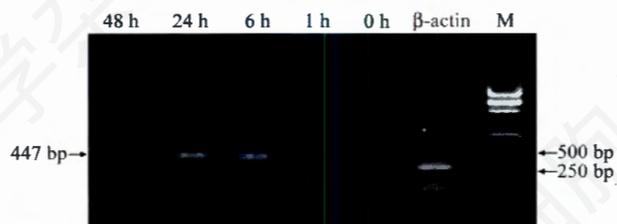


图5 不同时间凝血酶诱导HUVEC表达MMP-2 mRNA的情况
M: marker; 0 h: 无 MMP-2 表达; 1 h: MMP-2 表达; 6 h, 24 h: MMP-2 较高表达; 48 h: MMP-2 持续表达。



图6 水蛭素抑制凝血酶诱导 6 h 和 24 h 后 HUVEC 表达 MMP-2 mRNA 的情况

H: 肝素; Hi: 水蛭素; T: 凝血酶; C: 对照; M: marker; 水蛭素可以完全抑制，肝素在 6 h 时间水蛭素，24 h 不能完全抑制。

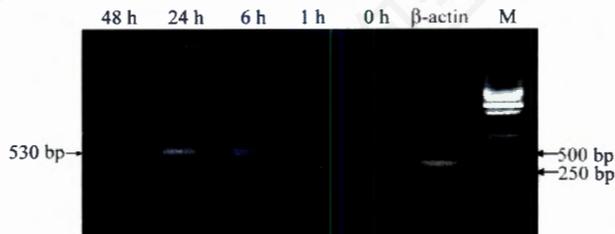


图7 不同时间凝血酶诱导 HUVEC 表达 MT1-MMP mRNA 的情况

M: marker; 0 h: MT1-MMP 少量表达; 1 h: MT1-MMP 表达; 6 h, 24 h: MT1-MMP 较高表达; 48 h: MT1-MMP 持续表达。

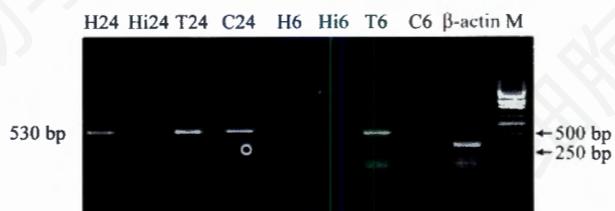


图8 水蛭素抑制凝血酶诱导6h和24h后HUVEC表达MT1-MMP mRNA的情况

H: 肝素; Hi: 水蛭素; T: 凝血酶; C: 对照; M: marker; 水蛭素可以完全抑制，肝素在 6 h 时间水蛭素，24 h 不能完全抑制。

平(相对系数 0.139±0.492)。

水蛭素、肝素干预不同时间对 HUVEC 表达 MT1-MMP mRNA 的影响(图 8)。图 8 显示 6 h 水蛭素、肝素均能够抑制 HUVEC 凝血酶诱导的 MT1-

MMP 的表达, 当 24 h 在凝血酶作用下 MT1-MMP 表达水平较高, 水蛭素仍能完全抑制, 但肝素的抑制作用不完全, 仍有较低浓度的 MT1-MMP[表达相对系数较水蛭素组高(0.197±0.101)]。

3 讨论

凝血酶除了凝血作用外, 还是一种重要的血管活性物质。对血管壁平滑肌细胞、内皮细胞及单核细胞等有广泛的影响。本实验用体外细胞培养的方法, 观察研究了凝血酶对 HUVEC 的作用。半定量 RT-PCR 方法结果显示, 在基因转录水平凝血酶诱导 HUVEC 表达 MMP-2 mRNA、MT1-MMP mRNA。凝血酶与 HUVEC 共同温育作用 1 h 可见 MMP-2 mRNA 表达, 6~24 h 保持较高水平, 48 h 又降至较低水平, 说明在一定的时间内二者呈一定的时间依赖关系。MT1-MMP mRNA 的表达呈现与 MMP-2 mRNA 基本一致的趋势, 这一结果支持 MMP-2 表达需要经 MT1-MMP 介导的观点。正常培养的 HUVEC 可少量表达 MT1-MMP, 说明凝血酶发挥的是促进作用。本实验与 Lafleur 等^[5,6]研究凝血酶使体外培养 HUVEC 的通过 MT1-MMP 介导 MMP-2 活化的研究有共同之处。MMP-2 抗体染色结果进一步证明, 在蛋白质水平凝血酶还促使 MMP-2 活化。Calis 等^[7]在体外实验显示凝血酶能够直接激活 MMP-2,

并且促体外培养的正常或动脉粥样硬化斑块血管平滑肌细胞释放 MMP-2。多个实验证明了凝血酶对血管壁细胞产生 MMP-2 的作用。结合凝血酶在凝血中的作用, 推测在动脉硬化过程中凝血酶使内皮细胞、平滑肌细胞等释放 MMP-2, 降解细胞基质促使内皮平滑肌细胞迁移、内皮损伤最终导致动脉斑块形成、血栓和出血, 最终斑块不稳定。斑块急性破裂在损伤血管局部产生凝血酶, 将有助于 MMP-2 激活, 因此凝血酶与 MMP-2 在动脉粥样硬化中是两个相互反馈因素。

水蛭素是作用最强的特异性凝血酶抑制剂。本实验显示水蛭素有比肝素更强的对凝血酶抑制作用, 进而减少 MMP-2 对血管的影响, 参与防治多种复杂动脉损伤的过程。进一步深入研究有望在防治动脉粥样硬化与再狭窄中获得突破性进展。

参考文献 (References)

- [1] Schaphorst KL *et al.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, **17**: 443
- [2] Moore TM *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279**: L691
- [3] Shimizu S *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279**: L503
- [4] Papadimitriou E *et al.* *Am J Physiol*, 1997, **272**: C1112
- [5] Lafleur MA *et al.* *Biochem J*, 2001, **357**:107
- [6] Lafleur MA *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282**: 463
- [7] Galis ZS *et al.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 483

Influence of Hirudin on the Activation of Matrix Metalloproteinase-2 in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

Min Wang*, Wei-Dong Zhang¹, Lian-Qun Cui, Xiao-Jun Wang, Yu-Qin Yan², Feng-Ju Qin²

(Department of Cardiology, Shandong Provincial Hospital, the Clinical Medical College of Shandong University, Jinan 250021, China; ¹Department of Basic Research, Shandong Medical Science Institute, Jinan 250031, China; ²Department of Biomedicine, College of Informational and Electrical Engineering, Shandong University of Science and Technology, Jinan 250031, China)

Abstract To investigate whether hirudin has effects on the production and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in cultured human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) induced by thrombin. HUVECs were isolated from primary human umbilical vein. The cultured 2-5 passages were incubated with thrombin (4.0 ku/L), while hirudin (6.0 ku/L) and heparin (6.0 ku/L) were added respectively except for control group. At different time, the expression of MMP-2 was determined by RT-PCR and immunocytochemistry. It was found that thrombin could upregulate the expression of matrix MMP-2 on HUVEC with time-dependent pattern (1-48 h). Hirudin showed remarkably inhibition to activation of MMP-2.

Key words hirudin; thrombin; matrix metalloproteinase-2; human umbilical vein endothelial cell

Received: July 30, 2003 Accepted: March 23, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-531-5903366, E-mail: minwang859@hotmail.com