

氯化镁对同型半胱氨酸诱导的 A7r5 细胞增殖及 MMP-2、MMP-9 表达的影响

禹 莉 陈昌杰¹ 王 惠² 章 尧^{3*}

(蚌埠医学院, 临床检验诊断学教研室, ¹生物化学与分子生物学教研室, ²临床检验诊断学实验中心, 蚌埠 233030;

³皖南医学院生物化学教研室, 芜湖 241002)

摘要 观察MgCl₂对同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)诱导的大鼠胸主动脉平滑肌细胞(A7r5细胞)增殖及基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和MMP-9表达的影响,旨在探讨镁剂治疗心血管疾病的分子机制。采用细胞培养、MTT法、Western印迹以及RT-PCR等方法,研究0.5 mmol/L Hcy分别与不同浓度的MgCl₂共同作用A7r5细胞48 h后, MgCl₂对Hcy诱导的A7r5细胞增殖及MMP-2、MMP-9的mRNA及其蛋白质表达的影响。MTT法结果显示,随着MgCl₂浓度增加,吸光度值逐渐减少,各实验组与对照组差异均有统计学意义($P < 0.05$); MgCl₂使Hcy诱导的A7r5细胞MMP-2、MMP-9的mRNA和蛋白质表达均减少,其中2.0、3.0 mmol/L MgCl₂组抑制作用显著($P < 0.05$)。研究结果表明Hcy促进A7r5细胞增殖的效应能被MgCl₂抑制; MgCl₂能抑制Hcy诱导的A7r5细胞MMP-2、MMP-9的表达。这一效应可能是镁剂治疗心血管疾病的分子机制之一。

关键词 MgCl₂; 同型半胱氨酸; A7r5细胞; MMP-2; MMP-9

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是蛋氨酸代谢的中间产物,血浆Hcy水平升高是高血压、动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)等心血管疾病发生的独立、危险因素^[1-4]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖和迁移在AS等心血管病病理过程的发生、发展中起关键作用。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)可以降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM),而ECM是VSMC迁移必须克服的生理屏障。我们前期研究表明Hcy呈剂量依赖性地促进A7r5细胞增殖,可在蛋白质及mRNA水平使A7r5细胞MMP-2表达增加^[5],同时MMP-9表达也增加。

临床研究发现^[6,7],镁对心脑血管有保护作用,可以预防、治疗心律失常、心力衰竭、心肌梗塞和AS等疾病。已有的实验表明^[8],镁可降低血清胆固醇、甘油三酯浓度,使高密度脂蛋白升高,低密度脂蛋白降低,扩张血管,抑制血小板聚集,而达到预防AS的作用。镁剂治疗心血管疾病的机制是否和改变MMP-2、MMP-9的表达以及抑制VSMC的增殖有关?本研究通过观察不同浓度的MgCl₂对Hcy诱导的大鼠A7r5细胞增殖及MMP-2、MMP-9的表达是否有影响,旨在进一步探讨镁剂治疗心血管疾病的

分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠胸主动脉平滑肌细胞株A7r5细胞购于中科院上海生化细胞所。DMEM培养基、胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自Gibco公司; Hcy购自Sigma公司; Trizol试剂购自Invitrogen公司; Taq酶购自MBI Fermentas公司; 小鼠抗MMP-2抗体、羊抗MMP-9抗体购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A7r5细胞株接种于含10% FCS的新鲜DMEM培养液中,置37℃、饱和湿度、5% CO₂培养箱中。0.1%胰蛋白酶消化传代。所有实验操作均采用对数生长期的细胞。

1.2.2 MTT法检测吸光度值 A7r5细胞以 4×10^3 个/ml密度接种于96孔板,每孔200 μl,培养48 h后,吸弃原培养液,用含0.4% FCS的DMEM培养24 h,使细胞同步化增长。换含10% FCS的DMEM培养

收稿日期: 2009-05-11 接受日期: 2009-09-10

安徽省教育厅自然科学基金资助项目(No.2001kj170)

*通讯作者: Tel: 0553-3932581, E-mail: zhangyao@ahedu.gov.cn

液, 各组分别加入 200 μl 终浓度为 0.5 mmol/L Hcy、0.5 mmol/L Hcy+1.0 mmol/L MgCl_2 、0.5 mmol/L Hcy+2.0 mmol/L MgCl_2 、0.5 mmol/L Hcy+3.0 mmol/L MgCl_2 的 DMEM 培养液, 同时设空白组和对照组, 每组设 5 个复孔, 培养 44 h。每孔加入 20 μl 5 mg/ml MTT 继续培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 150 μl 二甲亚砜, 避光振荡 10 min, 酶标仪 553 nm 波长下测各孔吸光度值 A 。实验重复 3 次。按照下列公式计算细胞增殖抑制率: 增殖抑制率(%)=(对照组 A_{553} 值-实验组 A_{553} 值)/ 对照组 A_{553} 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 RT-PCR 检测 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达

A7r5 细胞以 2×10^5 个/ml 密度接种于培养瓶, 细胞同步化增长后分成 4 组, 各组分别加入终浓度为 0.5 mmol/L Hcy、0.5 mmol/L Hcy+1.0 mmol/L MgCl_2 、0.5 mmol/L Hcy+2.0 mmol/L MgCl_2 、0.5 mmol/L Hcy+3.0 mmol/L MgCl_2 的 DMEM, 继续培养 48 h。参照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA。取 3 μl 总 RNA 为模板, 用随机引物逆转录合成 cDNA, 以此 2 ml cDNA 为模板, PCR 扩增, 所用引物见表 1, 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系终体积为 25 μl , 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 59 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 36 个循环后 72 $^\circ\text{C}$ 平衡 7 min, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Smart view 图

像分析处理系统进行灰度扫描分析。

1.2.4 Western 印迹法检测 MMP-2、MMP-9 的蛋白质表达 细胞处理同 RT-PCR 步骤, 提取蛋白质, Bradford 法进行蛋白质定量, SDS-PAGE (8% 分离胶、5% 浓缩胶) 电泳后, 蛋白质湿转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入稀释的一抗 37 $^\circ\text{C}$ 温育 2 h, TBST 洗膜后, 加入相应的辣根酶标记的二抗 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 h, TBST 洗膜。化学发光增强液与膜充分接触, 暗室曝光, 凝胶成像系统扫描成像。

1.3 统计学方法

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 MgCl_2 对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 各浓度组 MgCl_2 单独作用于 A7r5 细胞, 吸光度 A 值与对照组相比无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 MgCl_2 对细胞生长无毒性作用。当 Hcy 浓度固定在 0.5 mmol/L 时, 随着 MgCl_2 浓度升高, 吸光度 A 值逐渐减少, 各浓度组与实验对照组 (0.5 mmol/L Hcy+0 mmol/L MgCl_2 组) 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 抑制率也逐渐增加, 分别为 8.57%、11.45%、17.42% (表 2), 说明 MgCl_2 能抑制 Hcy 引起的 A7r5 细胞增殖, 随着 MgCl_2 浓度增加, 抑制作用增强。

Table 1 Primer sequences and annealing temperature and length of productions of objective genes and β -actin

Gene	Primer sequences (5'-3')	Annealing temperature ($^\circ\text{C}$)	Length of productions (bp)
MMP-2	GTC CTG ACC AAG GAT ATA GCC AGA CCC AGT ACT CAT TCC CTG	59	465
MMP-9	TGG GCA AAG GCG TCG TGA CAC AGC TCT CCT GCC GAG TT	59	405
β -actin	TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG	59	285

Table 2 Effect of magnesium chloride on the A value of Hcy-induced A7r5 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Hcy (mmol/L)	MgCl_2 (mmol/L)	A value	Inhibition rate (%)
0	0	0.3219 \pm 0.044	-
0	1.0	0.2995 \pm 0.069	-
0	2.0	0.3133 \pm 0.055	-
0	3.0	0.3085 \pm 0.064	-
0.5	0	0.4140 \pm 0.033 Δ	-
0.5	1.0	0.3785 \pm 0.043*	8.57
0.5	2.0	0.3666 \pm 0.014*	11.45
0.5	3.0	0.3419 \pm 0.025* Δ $\#$	17.42

* $P < 0.01$ vs 0.5 mmol/L Hcy group; Δ $P < 0.01$ vs 0.5 mmol/L Hcy+1.0 mmol/L MgCl_2 group; $\#P < 0.05$ vs 0.5 mmol/L Hcy+2.0 mmol/L MgCl_2 group; Δ $P < 0.01$ vs control group.

2.2 MgCl₂ 对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞 MMP-2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, MMP-2 电泳条带灰度随着 MgCl₂ 浓度的增加而降低, 见图 1。经 Smart view 图像软件分析, 2.0 和 3.0 mmol/L MgCl₂ 处理组 MMP-2 mRNA 的相对表达量与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.3 MgCl₂ 对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, MMP-9 电泳条带灰度随着 MgCl₂ 浓度的增加而降低, 2.0 和 3.0 mmol/L MgCl₂ 处理组 MMP-9 mRNA 的相对表达量显著下降 ($P < 0.05$, 图 2、表 3)。

2.4 MgCl₂ 对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞 MMP-2 的

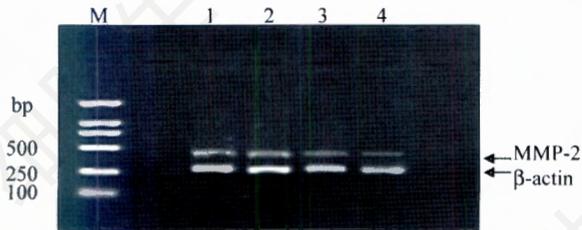


Fig.1 Effect of magnesium chloride on the production of Hcy-induced MMP-2 mRNA in A7r5 cells

M: marker; 1: control (0.5 mmol/L Hcy group); 2: 0.5 mmol/L Hcy+1.0 mmol/L MgCl₂ group; 3: 0.5 mmol/L Hcy+2.0 mmol/L MgCl₂ group; 4: 0.5 mmol/L Hcy+3.0 mmol/L MgCl₂ group.

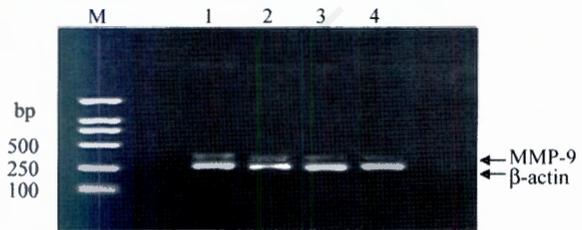


Fig.2 Effect of magnesium chloride on the production of Hcy-induced MMP-9 mRNA in A7r5 cells

M: marker; 1: control (0.5 mmol/L Hcy group); 2: 0.5 mmol/L Hcy+1.0 mmol/L MgCl₂ group; 3: 0.5 mmol/L Hcy+2.0 mmol/L MgCl₂ group; 4: 0.5 mmol/L Hcy+3.0 mmol/L MgCl₂ group.

蛋白质表达的影响

Western 印迹结果显示, 随着 MgCl₂ 浓度的增加, MMP-2 电泳条带密度逐渐降低, 2.0 和 3.0 mmol/L MgCl₂ 组下降显著 ($P < 0.05$, 图 3、表 3)。

2.5 MgCl₂ 对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞 MMP-9 的蛋白质表达的影响

Western 印迹结果显示, 随着 MgCl₂ 浓度的增加, MMP-9 电泳条带灰度逐渐降低, 2.0 和 3.0 mmol/L MgCl₂ 处理组显著下降 ($P < 0.05$, 图 4、表 3)。

3 讨论

高 Hcy 血症作为心血管疾病的独立、危险因素, 其致病机制之一是诱导 VSMC 的增殖^[9]。VSMC 迁移至血管内皮下并不断增殖是心血管疾病的重要发

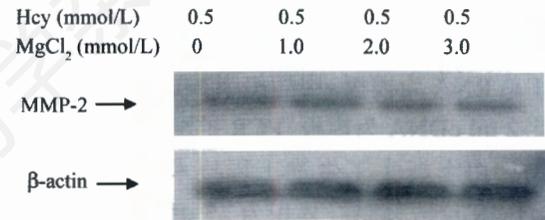


Fig.3 Effect of magnesium chloride on the production of Hcy-induced MMP-2 in A7r5 cells

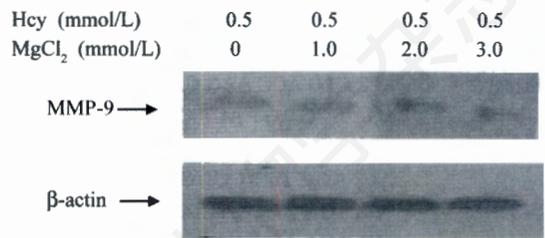


Fig.4 Effect of magnesium chloride on the production of Hcy-induced MMP-9 in A7r5 cells

Table 3 Effect of magnesium chloride on the productions of Hcy-induced MMP-2, MMP-9 mRNA and protein in A7r5 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

MgCl ₂ (mmol/L)	MMP-2 (mRNA, %)	MMP-9 (mRNA, %)	MMP-2 (protein, %)	MMP-9 (protein, %)
Control	37.40±6.27	13.77±2.50	29.86±1.82	9.53±1.65
1.0	34.17±5.35	11.97±1.40	25.13±6.71	7.87±1.56
2.0	26.93±2.78*	7.23±1.22 ^Δ	19.36±2.85*	6.10±2.05*
3.0	25.40±4.37*	6.67±1.27 ^Δ	18.33±4.65*	4.17±1.89 ^Δ

* $P < 0.05$ vs control group; ^Δ $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs 1.0 mmol/L MgCl₂ group.

病机制。MMP 是一个能够分解 ECM 成分的蛋白酶家族^[10], 胶原是 ECM 的主要成分, IV 型胶原参与血管基底膜的形成, ECM 尤其是基底膜是 VSMC 迁移必须克服的生理屏障, 而 MMP-2、MMP-9 是降解 IV 型胶原最主要的 MMP, 对于 VSMC 的增殖和迁移起着重要作用。我们前期研究表明 Hcy 呈剂量依赖性地促进 A7r5 细胞增殖, 可在蛋白质及 mRNA 水平使 A7r5 细胞 MMP-2、MMP-9 表达增加。

目前临床上有使用镁剂来预防、治疗心律失常、心力衰竭、心肌梗塞和 AS 等疾病, 研究发现镁剂对心脑血管有保护作用, 已有的实验表明, 镁可降低血清胆固醇、甘油三酯浓度, 使高密度脂蛋白升高, 低密度脂蛋白降低, 扩张血管, 抑制血小板聚集, 而达到预防动脉硬化的作用。镁剂治疗 AS 等心血管疾病的机制是否与抑制 MMP-2、MMP-9 的表达, 从而减少 ECM 尤其是基底膜的降解, 抑制 VSMC 的增殖和迁移有关呢?

本实验结合前期研究^[5], 0.5 mmol/L Hcy 组能明显促进 A7r5 细胞增殖, 且细胞形态较好。当 Hcy 浓度增大到 1.0 mmol/L 时, 虽然也能促进 A7r5 细胞增殖, 但细胞大小不一, 形态不整。故实验分组选择 0.5 mmol/L Hcy 与不同浓度的 MgCl₂ 处理组共同作用 A7r5 细胞。

正常人血清镁离子浓度为 0.70~1.10 mmol/L^[11], 而 DMEM 粉中含无水硫酸镁 97.67 mg/L (0.81 mmol/L), 说明培养液中镁离子浓度与维持正常人体细胞生长所需要的镁离子浓度范围是一致的。本实验外加镁离子浓度最高为 3 mmol/L, 是结合临床治疗来设计的, 因为临床上治疗性补充镁能达到的最高水平是 3 mmol/L, 否则会引起高镁血症, 发生中毒症状, 表现为抑制延髓呼吸中枢和血管运动中枢, 使外周肌肉松弛^[12]。

实验采用 MTT 法检测 MgCl₂ 对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞增殖的影响。随着 MgCl₂ 浓度升高, 吸光度值逐渐减少, 抑制率逐渐增加, 说明 MgCl₂ 对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞增殖具有较好的抑制作用。至于抑制原因尚需进一步探讨, 推测可能与 Mg²⁺ 是 Ca²⁺ 内流的拮抗剂有关。细胞内钙离子浓度的变化是触发细胞增殖相关信号转导的始动因素, 作为第二信使, 可激活增殖相关基因转录, 促进细胞蛋白质合成, 引起细胞增殖^[13]。已有研究表明 Hcy 可促进 VSMC 钙离子内流和线粒体内钙离子释放而启动血管的反应, Ca²⁺ 变化会对 ECM 产生影响^[14]。镁可能通过拮抗钙离

子, 抑制细胞增殖相关信号的转导, 从而抑制 Hcy 诱导的 VSMC 的增殖, 这也为临床使用镁剂治疗 AS 等心血管疾病提供理论基础。

本实验将不同浓度的 MgCl₂ 与 0.5 mmol/L Hcy 共同作用 A7r5 细胞 48 h 后, RT-PCR 结果显示, MMP-2、MMP-9 mRNA 表达随 MgCl₂ 浓度增加而逐渐减少。Western 印迹结果显示 MgCl₂ 使 Hcy 诱导的 A7r5 细胞 MMP-2、MMP-9 的蛋白质表达也减少, 其中 2.0 和 3.0 mmol/L MgCl₂ 组与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 1.0 mmol/L 的 MgCl₂ 不能抑制 Hcy 诱导的 A7r5 细胞增殖, 当浓度升高至 2.0 mmol/L 时, 对 A7r5 细胞增殖的抑制效应较为明显, 再增加浓度至 3.0 mmol/L, 对细胞增殖的抑制作用也较为明显, 但与 2.0 mmol/L 浓度差异无显著性。该结果对临床防治 AS 的镁剂浓度选择具有一定的指导意义。同时表明 RT-PCR 和 Western 印迹结果具有一致性, 说明 Hcy 诱导 A7r5 细胞 MMP-2、MMP-9 表达增多的效应可被 MgCl₂ 抑制。MgCl₂ 可能通过抑制 MMP-2、MMP-9 的表达, 减少 ECM 尤其是基底膜的降解, 使 VSMC 的迁移和增殖减少, 从而起到控制和治疗心血管疾病的目。

本研究通过探讨镁剂对 Hcy 诱导的 A7r5 细胞增殖及其 MMP-2、MMP-9 表达的影响, 不但为临床使用镁剂治疗 AS 等心血管疾病提供了理论基础, 也为防治提供了更多干预的靶点。

参考文献(References)

- [1] Zhou J, Austin RC. Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: Causal relationship and potential mechanisms, *Biofactors*, 2009, 35(2): 120-129
- [2] Vizzardi E, Bonadei I, Zanini G, et al. Homocysteine and heart failure: an overview, *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2009, 4(1): 15-21
- [3] Herrmann W, Herrmann M, Joseph J, et al. Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: a critical review, *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45(12): 1633-1644
- [4] Sun Y, Chien KL, Hsu HC, et al. Use of serum homocysteine to predict stroke, coronary heart disease and death in ethnic Chinese, *Circ J*, 2009, 73(8): 1423-1430
- [5] 禹 莉, 章 尧, 陈昌杰, 等。同型半胱氨酸对 A7r5 细胞增殖及 MMP-2 表达的影响, *蚌埠医学院学报*, 2008, 33(3): 266-269
- [6] Cojocaru IM, Cojocaru M, Burcin C, et al. Serum magnesium in patients with acute ischemic stroke, *Rom J Intern Med*, 2007, 45(3): 269-273
- [7] Dabrowski W, Rzecki Z, Sztanke M, et al. The efficiency of magnesium supplementation in patients undergoing cardiopulmonary bypass: changes in serum magnesium concentrations and

- atrial fibrillation episodes, *Magn Res*, 2008, 21(4): 205-217
- [8] 余飞苑, 刘浩宇, 刘锡仪. 微量元素与血脂代谢及心血管疾病的关系, *微量元素与健康的研究*, 2005, 22(5): 10-12
- [9] 徐志红, 陆国平, 吴春芳. 同型半胱氨酸对大鼠血管平滑肌细胞增殖及胶原生成的影响, *中华老年心脑血管病杂志*, 2007, 9(1): 45-48
- [10] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry, *Circ Res*, 2003, 92 (8): 827-839
- [11] 吴在德. *外科学*, 第五版, 北京: 人民卫生出版社, 2000, 27
- [12] 施应华. 产科静滴硫酸镁的护理要点, *中国医药导报*, 2006, 3(33): 149
- [13] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, *et al.* Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration, *Nature*, 1997, 386(6627): 855-858
- [14] Mujumdar VS, Hayden MR, Tyagi SC. Homocyst(e)ine induces calcium second messenger in vascular smooth muscle cells, *J Cell Physiol*, 2000, 183(1): 28-36

Effects of Magnesium Chloride on the Proliferation and Productions of Matrix Metalloproteinase 2 and 9 in Homocysteine-induced A7r5 Cells

Li Yu, Chang-Jie Chen¹, Hui Wang², Yao Zhang^{3*}

(Department of Clinical Laboratory Science, ¹Department of Biochemistry & Molecular Biology, ²Research Center of Clinical Laboratory Science, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; ³Department of Biochemistry, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

Abstract To observe the effects of magnesium chloride on the proliferation and production of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) in homocysteine-induced A7r5 cells and to further explore the molecular mechanism of magnesium curing cardiovascular diseases. Various concentrations of magnesium chloride together with 0.5 mmol/L Hcy acted on A7r5 cells for 48 h, the effect of magnesium chloride on the proliferation of Hcy-induced A7r5 cells was detected by MTT. The effects of magnesium chloride on the productions of Hcy-induced MMP-2 and MMP-9 mRNA and protein in A7r5 cells were examined by RT-PCR and Western blot. MTT results showed that the optical density value decreased compared with control group when the concentration of magnesium chloride increased ($P < 0.05$). Magnesium chloride could decrease the productions of MMP-2 and MMP-9 mRNA and protein in Hcy-induced A7r5 cells. The inhibition effect was significant in 2.0 and 3.0 mmol/L magnesium chloride group ($P < 0.05$). Thus, the results in this study suggested that the effect that Hcy promotes the proliferation of A7r5 cells can be suppressed by magnesium chloride. Magnesium chloride can restrain the productions of MMP-2 and MMP-9 protein in Hcy-induced A7r5 cells. This effect may be one of the molecular mechanisms magnesium curing cardiovascular diseases.

Key words magnesium chloride; homocysteine; A7r5 cell; MMP-2; MMP-9

Received: May 11, 2009 Accepted: September 10, 2009

The work was supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (No.2001kj170)

*Corresponding author. Tel: 86-553-3932581, E-mail: zhangyao@ahedu.gov.cn