

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)13-1211-03

适度铜缺乏对大鼠颈动脉内皮剥脱术后 MMP-9 表达和活性的影响

周景昱 郭文怡 周宏志 贾国良 张荣庆 (第四军医大学西京医院心内科 陕西 西安 710033)

Influence of moderate copper deficiency on expression and activity of MMP-9 and restenosis in balloon-injured rat carotid arteries

ZHOU Jing-Yu, GUO Wen-Yi, ZHOU Hong-Zhi, JIA Guo-Liang, ZHANG Rong-Qing

Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To study the influence of moderate copper deficiency induced by tetrathiomolybdate (TM) on expression and activity of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) and restenosis in balloon-injured rat carotid arteries. **METHODS:** Male Sprague-Dawley rat were prefed distilled water or TM at a dosage of 10 mg/kg 2 weeks before balloon injury. Plasma ceruloplasmin levels were monitored, and the oral administration of TM could rapidly reduce and sustain the plasma level of ceruloplasmin in all TM-treated animals at a 70% - 80% level of reduction after 2 weeks. All rats were subjected to balloon injury and then were killed at 1, 3, 7 and 14 d. TM-treated rats were administrated TM daily after injury. The extent of neointimal thickening was evaluated. Western blot and gelatin-zymography were used to detect the expression and activity of MMP-9. **RESULTS:** Compared with the control group, the extent of neointimal hyperplasia in TM-treated rats was significantly reduced 2 weeks after injury. The expression and activity of MMP-9 were lower significantly in TM-treated rats than those in control rats from 1 to 7 d ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** The oral administration of the Cu^{2+} chelator TM could reduce neointimal thickening after balloon injury in the rat. And the expression and activity of MMP-9 were significantly suppressed by moderate copper deficiency induced by TM.

【Keywords】 matrix metalloproteinases-9; copper; tetrathiomolybdate; restenosis

【摘要】目的 探讨四硫钼酸盐(TM)引起的适度铜缺乏对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性和表达的影响。方法 SD 雄性大鼠随机分为铜缺乏组

(TM组)和对照组, TM组术前2 wk及术后给予TM强饲,使血清铜蓝蛋白降至基础值的(20±2)%。对照组给予蒸馏水强饲。每组分为5个时相点(1, 3, 7, 14 d),建立颈总动脉球囊损伤模型,于术后相应时间点处死动物。利用含1 g/L明胶的SDS-PAGE非变性凝胶电泳检测各点损伤的颈总动脉组织MMP-9活性,Western blot法检测MMP-9蛋白表达水平。结果 TM组血管内膜增生程度较对照组显著降低,管腔无明显狭窄。术后1~7 d, TM组MMP-9活性显著低于对照组, TM组MMP-9蛋白表达水平也较对照组明显降低($P < 0.01$)。结论 TM诱导的适度铜缺乏能够显著抑制MMP-9的表达和活性,这可能是起抑制血管球囊损伤后再狭窄的机制之一。

【关键词】 基质金属蛋白酶-9 铜 四硫钼酸盐 再狭窄

【中图分类号】 R543 **【文献标识码】** A

0 引言

四硫钼酸盐(tetrathiomolybdate, MoS_4^{2-} , TM)是一种快速、有效的铜螯合剂,能够与食物中和血浆中的铜及蛋白质形成复合物,使之清除,从而降低体内可利用的铜离子。研究表明铜具有显著的诱导血管生成作用^[1],并且是动脉损伤后再狭窄的促进因子^[2]。有研究表明,适当降低血铜可抑制球囊成形术后的血管损伤反应^[3],但其相关的机制还待进一步探讨。血管球囊损伤后,血管平滑肌(VSMC)增殖、迁移和细胞外基质(ECM)重塑等一系列反应是导致内膜过度增殖、血管腔狭窄主要原因。MMPs的表达受核转录因子 κB (NF- κB)的调节^[4],后者是一种铜依赖蛋白。本实验试图探讨体内适度铜缺乏对MMP-9表达和血管再狭窄的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 选用SD雄性大鼠50只(由第四军医大学实验动物中心提供),质量350~450 g,随机分为TM组和对照组,均给予普通混合饲料喂养。TM组术前2 wk给予四硫钼酸盐强饲,10 mg/kg,测定血浆铜蓝蛋白作为铜水平的代表^[5]。在服用TM前、手术当日和服用TM最后一天测定血浆铜蓝蛋白水平,使之在手术前降低到基础水平的(20±2)%,并维持到取材当天。对照组给予蒸馏水强饲。

1.2 方法

1.2.1 大鼠颈总动脉内膜剥脱模型的建立 用浓度

收稿日期 2005-12-23; 接受日期 2006-04-12

通讯作者: 贾国良. Tel 13909239442 Email zhjyfmmu@fmmu.edu.cn

作者简介: 周景昱. 博士生(导师贾国良). Tel 13700242083 Email:

zhjyfmmu@fmmu.edu.cn

为 0.3 g/L 戊巴比妥腹腔内注射麻醉 SD 大鼠,颈正中切口,经左颈外动脉插入 Fogarty 2F 球囊导管至左颈总动脉根处,注入适量生理盐水充盈球囊,回拉导管至颈总动脉分支处,重复 3 次,移出球囊导管,结扎左颈外动脉。大鼠分别在术后 1、3、7 和 14 d 处死,取左侧颈总动脉液氮冻存或用 40 g/L 甲醛固定,取右侧颈总动脉为正常组织对照。

1.2.2 形态学观察 40 g/L 甲醛固定的颈总动脉常规脱水、石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察、照相。

1.2.3 蛋白提取液制备 液氮冻存的大鼠颈总动脉用剪刀剪碎,加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 7.6,10 g/L SDS,1 mmol/L PMSF,10 mg/L 亮氨酸)玻璃匀浆器匀浆,冰孵 15 min,收集于 1.5 mL 离心管中,以 13 500 g 于 4℃ 离心 10 min。收集上清液,分装,储存于 -70℃ 冰箱。蛋白浓度用 BCA 法(PIERCE 公司)测定。

1.2.4 Western blot 各组取等量的大鼠颈总动脉组织蛋白(20 μg)提取液与电泳上样缓冲液(0.5 mmol/L Tris-HCl pH 6.8,20 g/L SDS,200 mL/L 丙三醇,0.15 μmol/L 溴酚蓝和 50 mmol/L β-巯基乙醇)按 1:1 混合,在沸水中煮 5 min 使蛋白变性。采用 10 g/L 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离待测蛋白样品,电转膜法将蛋白转移到 PVDF 膜上,0.5 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,加抗 MMP-9 的 I 抗(Santa Claus)4℃ 孵育过夜,TBST 洗涤后加 II 抗,DAB 法显色。

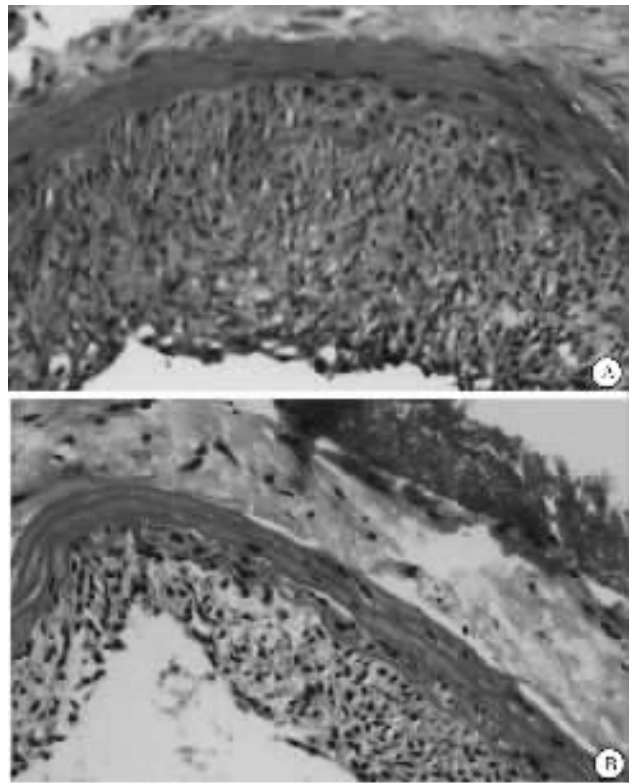
1.2.5 MMP-9 活性明胶酶谱分析 各组取等量蛋白(20 μg)提取液与电泳上样缓冲液(0.5 mmol/L Tris-HCl pH 6.8,20 g/L SDS,200 mL/L 丙三醇和 0.15 μmol/L 溴酚蓝)按 1:1 混合,用含 1 g/L 明胶的 0.08 浓度的 SDS-PAGE,100 V 恒压下做非变性凝胶电泳。电泳结束后,用 25 mL/L 的 Triton X-100 漂洗 30 min 2 次,以去除凝胶中的 SDS。随后将凝胶浸泡在反应缓冲液(0.05 mol/L Tris, pH 7.5,10 mmol/L CaCl₂,200 mmol/L NaCl,1 mmol/L ZnCl₂)中,37℃ 孵育 18 h,10 g/L 考马斯亮蓝 R-250 染色 1.5~2 h,以 300 mL/L 甲醇加 100 mL/L 乙酸适当脱色。凝胶成像仪拍照,灰度分析法分析。

统计学处理 实验重复 3 次,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并对数据进行 *t* 检验。 $P < 0.05$ 即认为有统计学差异。

2 结果

2.1 对血管损伤后内膜增殖的形态学影响 光镜下观察(图 1)血管球囊损伤术后 14 d,对照组血管内膜呈弥漫性增厚,增厚的内膜中以细胞成分(VSMC)

为主,而 TM 组血管内膜仅略有增生。



A:对照组;B:TM组。

图 1 血管横断面 HE × 10

2.3 对 MMP-9 蛋白表达的影响 术后 1 d,对照组 MMP-9 蛋白表达显著增高,持续 7 d,之后逐渐降低到基础水平。TM 组术后 1~7 d,MMP-9($M_r 9.2 \times 10^4$)表达也有所升高,但明显低于对照组($P < 0.01$,图 2)。

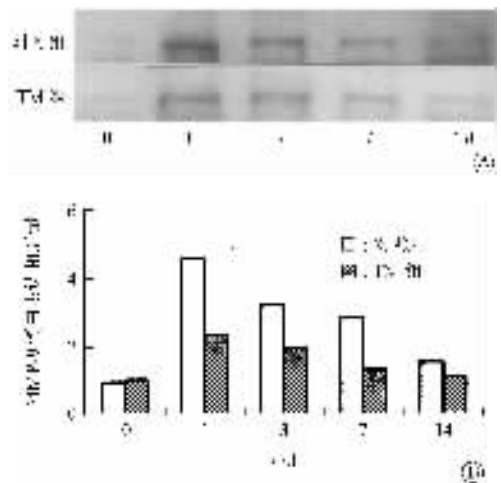


图 2 对照组和 TM 组 MMP-9 蛋白表达水平

2.2 对 MMP-9 活性的影响 活性的 MMP-9 在 $M_r 9.2 \times 10^4$ 的位置使明胶发生降解。在正常的颈总动

脉组织, MMP-9 无活性. 颈总动脉内皮剥脱术后 1 d, MMP-9 活性迅速升高, 术后 7 d, MMP-9 活性仍维持在较高水平. TM 组术后 1~7 d, MMP-9 活性也有明显升高, 但各时相点均明显低于对照组 ($P < 0.01$, 图 3).

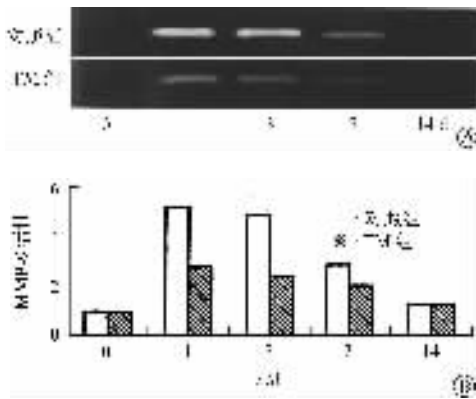


图 3 对照组和 TM 组 MMP-9 明胶酶谱活性变化

3 讨论

MMP-9 也称 IV 型胶原酶、明胶酶 B, 血管内皮剥脱术后其过度表达可通过多种方式参与血管损伤修复反应. 首先, MMP-9 促进胶原、胶原降解后形成的明胶和弹性蛋白的降解, 这是 VSMC 迁移的必要条件. 其次, MMP-9 可结合 I 型胶原, 通过受体 CD44 促进 VSMC 与基质结合以促进 VSMC 迁移^[6-7]. 第三, MMP-9 切开 III 型胶原, 胶原片段可以促进中性粒细胞、单核细胞和成纤维细胞的化学趋化作用^[7]. 第四, MMP-9 在体内可通过增加血管周长、管腔面积和细胞核密度以及减少内膜基质含量来改变血管重构^[7]. 第五, Mason 等^[7]还发现 MMP-9 有促进血管扩张的作用, 可能的机制有 ① MMP-9 降解动脉胶原蛋白和弹性蛋白可增加血管扩张; ② 内膜通过一氧化氮在调节血管变化及急性中膜和外膜扩张中起主要作用^[8]; ③ MMP-9 降解基质可产生 RGD 片段, 在 RGD 多肽和弹力酶降解的胶原片段的作用下, VSMC 中的整合素 $\alpha v \beta 3$ 介导动脉的血管扩张反应.

MMP-9 的表达和活性受核转录因子- κB (NF- κB) 的调节^[4]. NF- κB 是属于 Rel 家族的转录因子, 能与调控免疫应答、炎症反应、细胞分化和生长、细胞粘附和细胞凋亡所必需的许多细胞因子、粘附因子等基因启动子或增强子部位的 κB 位点发生特异性结合, 启动和调节这些基因的转录. 在机体的免疫应答、炎症反应和细胞的生长发育等方面发挥重要的作用^[9]. NF- κB 是铜依赖的重要转录因子, 已有研究证明降低血清铜水平能够抑制 NF- κB 的激活^[10]. 因此, TM 组 MMP-9 的表达和活性的抑制可能是通过 NF- κB 途径发挥作用.

本研究证实, TM 诱导的适度铜缺乏能够抑制血管损伤后再狭窄的发生, 对 MMP-9 表达和活性的抑制可能是其机制之一. TM 通过口服吸收, 作用于全身, 使用方便. 通过监测血清铜蓝蛋白 (Cp) 可简便的监测 TM 用量, 副作用极少, 主要是使用过量导致的贫血和/或白细胞减少, 减少用药量或停药后即可恢复. 研究发现, Cp 水平在 50~150 mg/L 时, 生长因子、炎症因子的分泌可被阻断, 只要人类血浆 Cp 水平保持在 50 mg/L 以上, 既可满足细胞铜的需求又可避免副作用^[11], 长期治疗没有毒性发生^[12]. TM 诱导的适度铜缺乏在肿瘤治疗的临床实验中的已取得了初步的成功^[11-12], 对于再狭窄的影响研究尚处于起步阶段. 本研究表明适度铜缺乏对减少介入术后血管再狭窄的发生有着有益的影响, 或许可作为可考虑的治疗手段之一.

【参考文献】

- [1] Raju KS, Alessandri G, Ziche M, et al. Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1982, 69(5): 1183-1188.
- [2] Volker W, Dorszewski A, Unruh V, et al. Copper-induced inflammatory reactions of rat carotid arteries mimic restenosis/arteriosclerosis-like neointima formation [J]. *Atherosclerosis*, 1997, 130(1-2): 29-36.
- [3] Mandinova L, Mandinova A, Kyurkchiev S, et al. Copper chelation represses the vascular response to injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(11): 6700-6705.
- [4] Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1 β [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(38): 39513-39519.
- [5] Brewer GJ, Dick RD, Grover DK, et al. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1): 1-10.
- [6] Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD34-mediated tumor invasion [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(1): 35-48.
- [7] Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery [J]. *Circ Res*, 1999, 85(12): 1179-1185.
- [8] Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis [J]. *Cell Res*, 1998, 8(3): 171-177.
- [9] 徐祥, 梁华平. 核因子- κB 的结构和功能研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(1): 92-95.
- [10] Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, et al. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(17): 4854-4859.
- [11] Brewer GJ, Merajver SD. Cancer therapy with tetrathiomolybdate: antiangiogenesis by lowering body copper - a review [J]. *Integr Cancer Ther*, 2002, 1(4): 327-337.
- [12] Brewer GJ. Copper control as an antiangiogenic anticancer therapy: Lessons from treating Wilson's Disease [J]. *Exp Biol Med*, 2001, 226(7): 665-673.