

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0007-04

• 实验研究 •

广谱基质金属蛋白酶抑制剂多西环素对 高血压大鼠主动脉结构的影响

韩智奇^{1,2}, 胡海鹰², 恽佳例², 周欣², 曾山², 庞伟², 李玉明²

(1. 天津医科大学研究生院; 2. 中国人民武装警察部队医学院附属医院 心血管病研究所, 天津市 300162)

[关键词] 多西环素; 基质金属蛋白酶; 高血压; 主动脉; 弹力纤维

[摘要] 目的 利用多西环素的非特异性基质金属蛋白酶抑制剂特性, 研究该药对高血压性主动脉重塑的影响。方法 80只 7周龄雄性卒中易感型自发性高血压 (SHR-SP) 大鼠随机分为药物干预组和对照组, 同时饲养同周龄雄性 WKY 大鼠。药物干预组每天经自由饮水给予多西环素 30 mg/(kg·d)。观察 6个月 after 处死动物留取主动脉, 一部分组织用于制备石蜡切片并进行 HE、维多利亚蓝 (弹力纤维特异性染色) 和 von Kossa 银 (异常钙沉积染色) 染色, 另一部分组织用于交联胶原测定和明胶酶谱分析。结果 两组高血压大鼠的主动脉内膜周长、外膜周长和血管中膜面积差异无显著性。采用明胶酶谱法, 在各组均未检测到基质金属蛋白酶 9 活性; 与对照组比较, 药物干预组基质金属蛋白酶 2 活性显著降低 (2.43 ± 0.14 比 3.15 ± 0.23 , $P < 0.05$)。维多利亚蓝动脉弹力纤维染色分析显示, 与对照组比较, 药物干预组弹力纤维占中膜面积百分比显著降低 [$3.46\% \pm 1.62\%$ 比 $5.72\% \pm 3.87\%$, $P < 0.05$]。药物干预组交联胶原浓度与对照组比差异无统计学意义 (26.4 ± 7.0 mg/g 比 28.0 ± 8.7 mg/g, $P > 0.05$)。与对照组比较, 药物干预组钙沉积占中膜面积百分比虽无统计学差异, 但存在降低的趋势 [$0.688\% \pm 0.718\%$ 比 $0.960\% \pm 0.999\%$, $P = 0.177$]。结论 多西环素可以抑制 SHR-SP 主动脉中基质金属蛋白酶 2 活性, 但在血压没有得到有效控制的前提下会加重高血压性主动脉硬化的程度。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Broad-Spectrum Matrix Metalloproteinases Inhibitor, Doxycycline, on Aortic Structure in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats

HAN Zhiqu^{1,2}, HU Haiying², YUN Jiali², ZHOU Xin², ZENG Shan², PANG Wei², and LI Yuming²

(1. Graduate School of Medicine, Tianjin Medical University; 2. Institute of Cardiovascular Disease Division of Cardiology, Affiliated Hospital Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

[KEY WORDS] Doxycycline; Matrix Metalloproteinases; Hypertension; Aorta; Elastic Fiber

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of non-specific matrix metalloproteinases (MMP) inhibitor doxycycline (DOX), on hypertensive aortic remodeling. **Methods** 80 male stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP) of 7 weeks age were randomly divided into 2 groups (DOX and control group, respectively, $n = 40$ each). Five male Wistar-Kyoto rats (WKY) with same age were also investigated. SHR-SP were chronically treated from the end of 7 weeks after birth with doxycycline (30 mg/(kg·d)) in drinking water. Follow-up was terminated when the mortality rate of control group reached 50%. Rats were killed and aorta was dissected and prepared for histological and biochemical assays. For pathological analysis, we used hematoxylin and eosin (HE) staining, Victoria blue (elastic fiber staining) and von Kossa silver (calcium staining). For biochemical analysis, soluble collagen assay and gelatin zymography were carried out. **Results** There were no difference in intima perimeter, adventitia perimeter and media area in hypertensive rats. MMP-9 activity by gelatin zymography was not detected in all animals. Compared with control group, MMP-2 activity in DOX group were significantly reduced (2.43 ± 0.14 vs 3.15 ± 0.23 , $P < 0.05$). Compared with control group, the ratio of elastic fiber area to intima area was dramatically decreased in DOX group [$3.46\% \pm 1.62\%$ vs $5.72\% \pm 3.87\%$, $P < 0.05$]. Sircol soluble collagen assay showed that there had no statistical difference between control and DOX groups (26.4 ± 7.0 mg/g vs 28.0 ± 8.7 mg/g, $P > 0.05$). Although calcium deposition as revealed by von Kossa silver staining was no statistical difference between control and DOX groups, there was decreasing trend in DOX group ($0.688\% \pm 0.718\%$ vs $0.960\% \pm 0.999\%$, $P = 0.177$). **Conclusion** Despite the fact that doxycycline could inhibit aortic MMP-2 activity in SHR-SP, in the setting of uncontrolled hypertension, doxycycline may aggravate the process of hypertensive aortic stiffening.

[收稿日期] 2008-03-24

[修回日期] 2009-12-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (30871072)

[作者简介] 韩智奇, 研究方向为高血压靶器官损害的机制与防治。周欣, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管系统细胞外基质重塑。通讯作者李玉明, 教授, 主任医师, 研究方向为高血压发病机制及靶器官损伤, E-mail: cardiolab@gmail.com。

在高血压性主动脉重塑过程中,两种主要蛋白质即弹力蛋白和胶原蛋白发挥着关键作用。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)可以降解包括弹力蛋白和胶原在内的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),从而参与血管重塑。研究表明,增龄和高血压的持续和进展与主动脉MMP-2表达和活性升高有关^[1]。鉴于MMP活性增高引起的ECM过度降解与多种心血管疾病的发生、发展有重要关联,提示抑制过度增高的MMP活性可以延缓乃至逆转病程的发展。多西环素是一种四环素类抗生素,且能广谱抑制MMP。新近研究显示多西环素可通过这一机制,对腹主动脉瘤和Marfan综合征伴发的胸主动脉瘤具有一定的治疗作用^[2-3]。本研究旨在利用多西环素的非特异性MMP抑制剂特性,研究该药对高血压性主动脉重塑的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验动物为7周龄卒中易感型自发性高血压大鼠(stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SHR-SP) 80只,体重150~200 g之间;同周龄WKY大鼠10只,体重170~220 g之间,购自中国科学院上海实验动物中心。多西环素(doxycycline, DOX)购自Sigma Aldrich。

1.2 实验设计

80只7周龄雄性SHR-SP大鼠随机分为药物干预组和对照组,每组40只。同时对同周龄雄性WKY大鼠进行平行观察。药物干预组每天经自由饮水给予多西环素[30 mg/(kg·d)],此剂量为国内外文献所广泛采用,已证实能有效抑制MMP活性。当对照组病死率达到50%时,观察终止,取主动脉于液氮速冻后保存于-80℃中。

1.3 主动脉基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9活性测定

MMP-2和MMP-9活性的分析采用明胶酶谱法。组织匀浆、蛋白定量后,在10%的聚丙烯酰胺中进行非还原条件明胶电泳,经2.5%的Triton X-100复性后孵育24 h考马斯亮蓝染色并脱色后,利用薄层扫描仪扫描,经Image Pro Plus 4.5图像分析软件进行定量分析。

1.4 主动脉细胞外基质改变分析

主动脉弹力纤维分析采用维多利亚蓝(Victoria blue)染色。切片入Victoria blue染色液中染1 h,95%乙醇分色后再用丽春红S液染5 min,图像分析

软件自动计算视野区域中阳性区域(弹力纤维呈蓝色)占中膜面积百分比。胶原含量分析采用Sircol Assay试剂盒测定^[4]:样品匀浆后与Sircol Dye Reagent染料混匀30 min,再用染料释放剂Alkali Reagent溶解5 min,酶标仪570 nm测光密度,根据标准曲线计算样品交联胶原浓度。异常钙沉积分析采用von Kossa银染色法^[5]:切片在强光下用5%硝酸银浸染1 h,0.1%核固红染液复染5 min,在100倍视野普通光镜下,对血管选取6~8个视野进行扫描,保存图像后,利用Image Pro Plus 4.5软件打开一幅图像,采用软件的Count&Size功能,自动计算阳性区域(黑色点状沉积物)的面积和相应视野中动脉中膜的面积,从而计算出钙沉积占中膜面积百分比。

1.5 主动脉壁整体结构分析

石蜡包埋切片经常规HE染色后,在1倍物镜视野下,对血管整体图像进行扫描,保存图像后,利用Image Pro Plus 4.5软件打开一幅图像,采用手动描记方式,分别描绘出血管内膜、外膜和中膜的轮廓,计算该图像中主动脉壁内膜周长、外膜周长和血管中膜面积。

1.6 统计学处理

所有数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较在方差齐时用LSD-t检验,方差不齐时采用Tamhane检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

当对照组病死率达到50%时,本研究共持续6个月。观察结束时两高血压组大鼠的脑卒中发生率和病死率差异无统计学意义^[6-7]。至观察结束时,WKY组、对照组和药物干预组体重分别为 356 ± 25 g、 328 ± 30 g和 312 ± 35 g。两高血压组大鼠体重均明显低于WKY大鼠($P < 0.05$),但对照组和药物干预组之间差异无统计学意义。

2.2 主动脉基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9活性

采用明胶酶谱分析,在所有大鼠主动脉中未检测到MMP-9活性(对应92 kDa)。与对照组比较,药物干预组MMP-2活性显著降低(2.43 ± 0.14 比 3.15 ± 0.23 , $P < 0.05$,采用WKY的相对活性作为1,对照组和药物干预组活性为其倍数变化)(图1)。

2.3 维多利亚蓝染色病理图像分析

对照组主动脉弹力纤维占中膜面积百分比比较

WKY 组明显升高 ($P < 0.05$); 而药物干预组弹力纤维占中膜面积百分比比较对照组显著降低 ($P < 0.05$), 但与 WKY 组比较差异无统计学意义 (表 1 和图 2)。

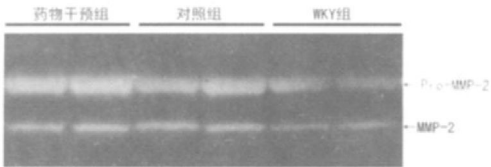


图 1 Gelatin Zymography 分析基质金属蛋白酶 2 活性结果

2.4 交联胶原浓度测定结果

对照组、药物干预组主动脉交联胶原浓度均较 WKY 组显著降低 ($P < 0.05$), 但对照组与药物干预组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.5 von Kossa 银染色病理图像分析

对照组、药物干预组主动脉钙沉积占中膜面积百分比均较 WKY 组明显升高 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 药物干预组钙沉积占中膜面积百分比虽无统计学差异, 但有降低趋势 ($P = 0.177$, 表 1 和图 2)。

表 1 主动脉细胞外基质改变

分 组	弹力纤维	交联胶原浓度		异常钙沉积
		(mg/g)		
WKY 组	2.19% ± 1.00%	55.2 ± 13.3	0.232% ± 0.237%	
对照组	5.72% ± 3.87% ^a	28.0 ± 8.7 ^a	0.960% ± 0.999% ^a	
药物干预组	3.46% ± 1.62% ^b	26.4 ± 7.0 ^a	0.688% ± 0.718% ^a	

a 为 $P < 0.05$ 与 WKY 组比较; b 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.6 各组主动脉壁整体结构变化

HE 染色结果发现, 对照组和药物干预组内膜周长及外膜周长均明显高于 WKY 组 ($P < 0.05$), 血管中膜面积较 WKY 组明显增加 ($P < 0.05$); 但对照组与药物干预组之间上述指标差异无统计学意义 (表 2 和图 2)。

表 2 各组大鼠主动脉内、外膜周长及血管中膜面积 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	内膜周长 (μm)	外膜周长 (μm)	血管中膜面积 (μm ²)
WKY 组	5 820.4 ± 371.5	6 669.2 ± 540.5	736 100.2 ± 300 121.5
对照组	6 322.4 ± 640.2 ^a	7 418.9 ± 786.2 ^a	905 547.6 ± 344 201.9 ^a
药物干预组	6 294.4 ± 271.6 ^a	7 434.0 ± 392.2 ^a	990 607.8 ± 175 468.7 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与 WKY 组比较。

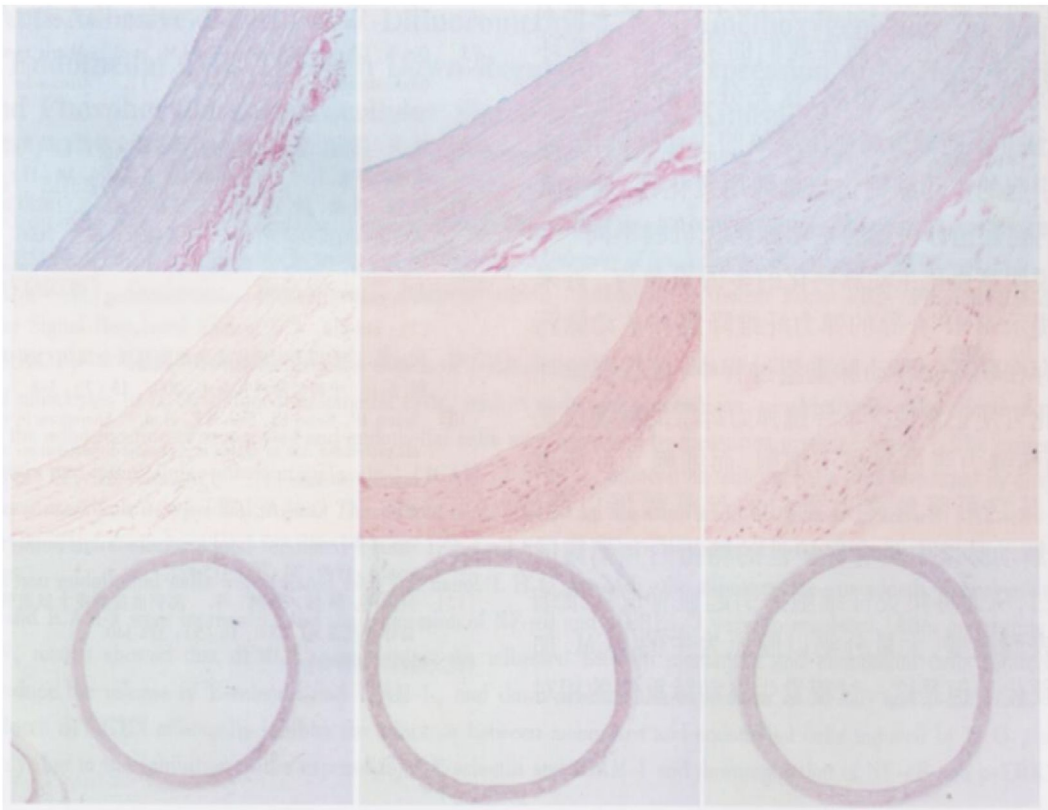


图 2 主动脉组织染色图片 上图为维多利亚蓝染色 (×20), 中图为 von kossa 银染色 (×10), 下图为 HE 染色 (×1); 左为 WKY 组, 中为对照组, 右为药物干预组。

3 讨论

在高血压性动脉重塑的发展过程中, MMP 系统

活性的动态变化与不同的病理学进程有关。血管重塑早期, 在血管内应力的作用下, 内皮细胞和血管壁

的其他细胞会通过分泌 MMP-2 和 MMP-9 使血管出现外向型重塑^[8,9]。这种早期的 MMP 活性增加属于生理性代偿反应。动脉硬化发展至后期时,由于氧化应激和炎症细胞的作用, MMP 系统活性也会出现明显上调,此时会降解主动脉 ECM 最主要的两种成分——弹力纤维和胶原,引起中膜弹力板的过渡降解和破坏。已证实,增龄和高血压的持续进展与主动脉 MMP-2 表达和活性升高有关^[10]。此外,Marque 等^[11]研究不同月龄 SHR 主动脉弹力蛋白与胶原比值后发现 15 月龄较 9 月龄下降。这说明不同时期 SHR 主动脉 ECM 存在差异。由于本研究始于 SHR-SP 7 周龄时,观察时间为 6 个月,因此长期使用 MMP 抑制剂无疑会影响高血压早期动脉壁的外向型重塑过程,在一定程度上抑制了血管的这种代偿反应。由于 SHR-SP 的血压在幼龄时会逐渐增高,而此时如血管壁不能适时地增加,无疑会使动脉收缩压更高、脉压增大。结合我们前期研究结果^[6,7],药物干预组的收缩压、脉压值较对照组存在增高趋势。所以在高血压性动脉重塑过程中,基质金属蛋白酶抑制剂的作用时间窗可能治疗结局产生影响。

其它研究显示多西环素可以显著减少维生素 D 诱导的主动脉钙化^[5],而在我们的实验中,多西环素对钙沉积并无明显影响,这充分说明单纯抑制 MMP 活性并不能减少高血压导致的主动脉钙化,而高血压引起的主动脉钙化与单纯用氯化钙、维生素 D 或高钙血症诱导引起的主动脉钙化机制不同^[12],同时也说明高血压主动脉钙化的多因素参与。近来的研究提示 MMP 介导的弹力纤维降解和主动脉钙化之间存在联系。在动脉重塑过程中,血管壁微环境的变化可使正常情况下环绕弹力纤维的糖蛋白瓦解,从而使弹力蛋白暴露于细胞,而细胞又可产生 MMP 或其它可降解弹力蛋白的丝氨酸蛋白酶。MMP 降解动脉壁中具有保护性的糖蛋白和暴露的弹力蛋白,从而募集炎性细胞并引起血管成纤维细胞发生表型改变,大量分泌以胶原为主的 ECM,加重动脉硬化。但是这一过程发生在动脉重塑的相对

晚期,由于 7 至 8 月龄 SHR-SP 主要的死亡原因是脑卒中,而主动脉病变相对较轻,故这也是本文对多西环素加速动脉硬化作用未能从机制上进行深入解释的原因之一。

因此在本研究中,长期应用多西环素虽然能够抑制主动脉 MMP-2 活性,但可改变动脉弹力纤维和胶原的比例,表明在高血压持续存在的前提下,单纯抑制 MMP 活性不足以改善高血压性主动脉结构重塑,相反可增加动脉硬化。同时本文的结果也提示 MMP 抑制剂用于高血压性主动脉重塑可能存在特殊的治疗时间窗。

[参考文献]

- [1] Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease [J]. *Biochem Pharmacol* 2008; **75** (2): 346-359
- [2] Lindeman JH, AbduHussien H, van Bockel JH, et al. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells [J]. *Circulation* 2009; **119** (16): 2209-2216
- [3] Chung AW, Yang HH, Radomski MW, et al. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 [J]. *Circ Res* 2008; **102** (8): e73-85
- [4] Li YY, Kadokami T, Wang P, et al. MMP inhibition modulates TNF- α in a transgenic mouse phenotype early in the development of heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **282** (3): H983-989
- [5] Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26** (7): 1510-1516
- [6] 姚旻,周欣,涂悦,等. 广谱基质金属蛋白酶抑制剂对高血压肾纤维化的影响 [J]. *中华高血压杂志*, 2006; **14** (11): 909-914
- [7] 涂悦,周欣,姚旻,等. 广谱基质金属蛋白酶抑制剂对高血压性脑卒中影响的实验研究 [J]. *中华高血压杂志*, 2006; **14** (9): 730-734
- [8] Flamant M, Placier S, Dubroca C, et al. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling [J]. *Hypertension* 2007; **50** (1): 212-218
- [9] 何运胜. 剪切力对内皮表达细胞基质金属蛋白酶 9 的调节作用及机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (7): 548
- [10] Spiers JP, Kelso EJ, Siah WF, et al. Alterations in vascular matrix metalloproteinase due to ageing and chronic hypertension: effects of endothelin receptor blockade [J]. *J Hypertens* 2005; **23** (9): 1717-1724
- [11] Marque V, Kieffer P, Atkinson J, et al. Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension* 1999; **34** (3): 415-422
- [12] 吴胜英,蔡嫣,薛林,等. 高钙血症加重大鼠血管钙化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (5): 337-340

(此文编辑 许雪梅)