

洛伐他汀抑制人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 表达和活性

曾钧发¹, 王佐², 罗勇¹, 雷建军², 桂培根¹

(1. 南华大学附属第二医院重症监护室, 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 洛伐他汀; 脐静脉内皮细胞; 基质金属蛋白酶 9; 表达; 活性

[摘要] **目的** 观察洛伐他汀对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 表达的影响。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 加入 20 $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 α 诱导后, 再用 0.05 ~ 1.35 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀处理 0 ~ 24 h, 蛋白印迹以及逆转录聚合酶链反应分别检测基质金属蛋白酶 9 的蛋白和 mRNA 表达情况, 明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 9 活性。**结果** 肿瘤坏死因子 α 能诱导人脐静脉内皮细胞的基质金属蛋白酶 9 表达和活性增强, 洛伐他汀处理后, 基质金属蛋白酶 9 的 mRNA 水平、蛋白量及活性均降低, 且呈明显的时间和剂量依赖性, 其中 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀能显著降低基质金属蛋白酶 9 的 mRNA 水平, 但在蛋白水平和基质金属蛋白酶 9 活性上, 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀并没有表现出显著的降低效果, 其余洛伐他汀各浓度均能对基质金属蛋白酶 9 的 mRNA 水平、蛋白量及活性产生显著的抑制作用, 以 1.35 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀的抑制效果最显著。**结论** 洛伐他汀能抑制肿瘤坏死因子 α 诱导的人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Lovastatin Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Activity of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ZENG Jun-Fa¹, WANG Zuo², LUO Yong¹, LEI Jian-Jun², and GUI Pei-Gen¹

(1. Intensive Care Unit, The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Institute of Cardiovascular Research, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Lovastatin; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Matrix Metalloproteinase-9; Expression; Activity

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of lovastatin on expression and activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in a human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) line. **Methods** Cultured HUVECs were stimulated by 20 $\mu\text{g/L}$ tumor necrosis factor- α (TNF- α), and then incubated with 0.05-1.35 $\mu\text{mol/L}$ of lovastatin for 0-24 h. The protein and mRNA level were detected by Western blotting and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively, and the activity of MMP-9 was analyzed by gelatin zymography. **Results** MMP-9 expression was induced by TNF- α in HUVECs, lovastatin attenuated both expression and activity of MMP-9 in a time and dose-dependent manner. 0.05 $\mu\text{mol/L}$ lovastatin inhibited MMP-9 expression in mRNA level, but not in protein level, but activity of MMP-9 cannot be inhibited by 0.05 $\mu\text{mol/L}$ lovastatin. Other concentration of lovastatin groups can inhibit MMP-9 expression both in mRNA and protein levels, including activity of MMP-9, the maximum inhibitory effect was induced by 1.35 $\mu\text{mol/L}$ lovastatin. **Conclusion** Expression and activity of MMP-9 can be inhibited by lovastatin in HUVECs.

他汀类药物是一类广泛应用于临床的降低胆固醇生物合成药物。除了其调脂作用外, 研究发现他汀类药物能有效改善内皮细胞的功能, 并具有抗炎和稳定粥样斑块等功能^[1,2]。近年来, 基质金属蛋

白酶(matrix metalloproteinase, MMP)在动脉粥样硬化中的作用日益受到重视^[3,4]。研究发现, 抑制MMP的活性, 有利于稳定斑块从而降低各种心血管系统并发症。本研究试图探讨洛伐他汀能否抑制人

[收稿日期] 2011-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81070221)及湖南省卫生厅项目(B2011-054)资助

[作者简介] 曾钧发, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病的基因治疗, 联系电话为 0734-8288999、13873463650, E-mail 为 zjf_1320@163.com。王佐, 博士, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 nb12@263.net。罗勇, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病的基因治疗。

脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)产生 MMP-9,从而丰富他汀类药物的药理功能。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和材料

洛伐他汀为德国 Merck 公司产品,人脐静脉内皮细胞购自中国典型培养物保存中心。RPMI-1640 培养基和南美胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Invitrogen 公司。鼠抗人 MMP-9 抗体购自 Santa Cruz 公司,二抗、 β -actin 兔抗人一抗、ECL 化学发光试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、TRIzol 购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购于 Fermentas 公司,2 \times PCR MasterMix 购自北京天根生化科技有限公司,BCA 蛋白含量测定试剂购自 Hyclone-Pierce 公司,引物、明胶、胰蛋白酶、青霉素、链霉素等为上海生工产品。

1.2 实验分组与细胞培养

人脐静脉内皮细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下培养。当细胞生长到对数期后弃去培养液,用 0.5% FBS 的培养液预处理 24 h 以使细胞同步化,用于实验研究。实验分为对照组和干预组,每组样本数为 6。其中对照组中仅加入培养基和 20 μ g/L TNF- α ,干预组中在上述基础上加入不同浓度(0.05、0.15、0.45、1.35 μ mol/L)的洛伐他汀处理 24 h。时效实验用 1.35 μ mol/L 洛伐他汀处理 0、6、12、24 h 四个时间点。

1.3 mRNA 分析

按照 Qiagen 公司试剂盒提供的方法提取处理后细胞 RNA,逆转录成 cDNA 后,在 20 μ L 反应体系中加入 1 μ L MMP-9 或 β -actin 引物[上海生工合成。MMP-9: sense(正义)为 5'-CATTTCACCCAC-TATCCCT-3', anti-sense(反义)为 5'-CCACTTCTT-GTCGCTGTC-3',扩增产物长度 406 bp; β -actin: sense 为 5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGGGG-3', anti-sense 为 5'-ATGATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-GAT-3',PCR 扩增产物长度为 379 bp,2 μ L Tag 酶。充分混匀后,在 95 $^{\circ}$ C 5 min,随后进入 94 $^{\circ}$ C 60 s、58 $^{\circ}$ C 60 s、72 $^{\circ}$ C 60 s 的循环,共 35 循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应结束后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,并用凝胶成像分析软件对 MMP-9/ β -actin 的强度进行扫描分析,获取光密度值。

1.4 蛋白印迹

细胞处理结束后,采用总蛋白提取试剂盒提取

全细胞蛋白。用 BCA 方法定量后,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,取 20 μ L 蛋白用于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。电泳结束后,用半干转印法转膜,洗膜结束后用 MMP-9 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)孵育,洗膜,孵育二抗(武汉博士德生物有限公司),ECL 化学发光显影。同时采用 β -actin 抗体作为内参。

1.5 基质金属蛋白酶 9 活性测定

采用明胶酶谱法。取等体积细胞培养上清液与上样缓冲液混匀,加样到分离胶孔,在 140 V 电泳 70 min。电泳完成后将胶在 Triton X-100 中温和浸泡振荡 120 min,然后浸泡于复性液中孵育 18 h,考马斯亮蓝染色,脱色液脱色观察。并用 Labwork 凝胶图像分析系统对实验结果进行扫描分析。

1.6 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 SPSS 15.0 进行分析,组间比较采用 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 判断为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 洛伐他汀对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 的影响

逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)结果显示, HUVECs 经 20 μ g/L TNF- α 处理后能明显诱导 MMP-9 的表达,当经过不同浓度的洛伐他汀处理 12 h 后, MMP-9 mRNA 的表达情况如图 1 所示。可见,随着洛伐他汀浓度的递增, MMP-9/ β -actin 的比例随之降低,呈明显的剂量依赖性(图 1)。

2.2 洛伐他汀对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 蛋白表达的影响

蛋白印迹结果显示, TNF- α 处理的对照组当中, MMP-9 呈高水平表达。当 HUVECs 用 0.05 ~ 1.35 μ mol/L 洛伐他汀处理 24 h 后,随着洛伐他汀浓度的增加, MMP-9 含量随之降低(图 2)。当用 1.35 μ mol/L 洛伐他汀处理 24 h 后,与 6 h 和 12 h 相比,能进一步降低 MMP-9 蛋白的水平(图 3)。

2.3 洛伐他汀对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 活性的影响

人脐静脉内皮细胞经 20 μ g/L TNF- α 作用后, MMP-9 有分泌(图 4),其条带酶解量为 21.43 \pm 3.57 INT. mm²。0.05 μ mol/L 洛伐他汀干预下 MMP-9 活性几乎不受抑制(22.36 \pm 2.85 比 21.43 \pm 3.57, $P >$

0.05, $n = 3$), 当其浓度达到 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 时, 开始对 MMP-9 活性产生显著的抑制作用 (12.78 ± 0.73 比 21.43 ± 3.57 , $P < 0.05$, $n = 3$), 与对照组比较, 0.45、1.35 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀均可显著抑制 MMP-9 的活性, 以 1.35 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀的抑制效果最显著 (4.28 ± 0.51 比 21.43 ± 3.57 , $P < 0.001$, $n = 3$)。

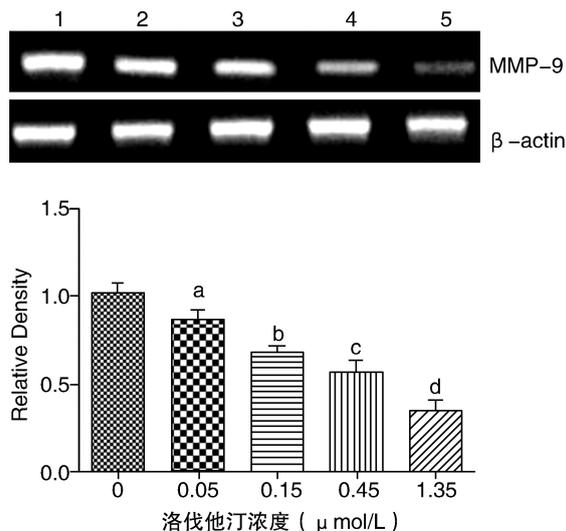


图 1. 洛伐他汀对 MMP-9 mRNA 表达的影响 1 为对照组, 2 为 TNF- α + 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀, 3 为 TNF- α + 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀, 4 为 TNF- α + 0.45 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀, 5 为 TNF- α + 1.35 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, d 为 $P < 0.001$, 与对照组相比 ($n = 3$)。

Figure 1. Effect of lovastatin on expression of MMP-9 mRNA

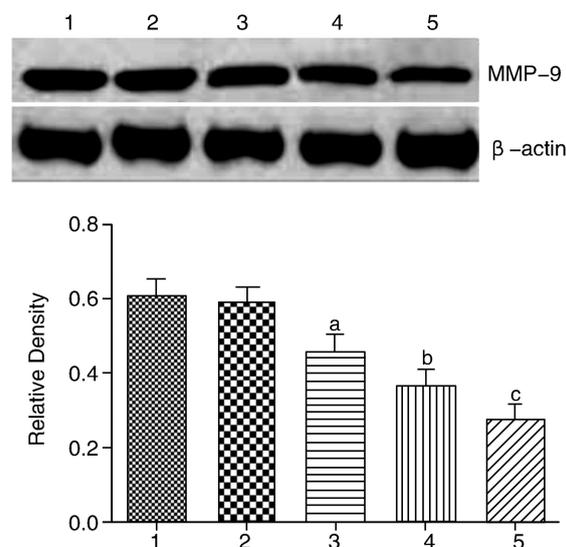


图 2. 不同浓度洛伐他汀对 HUVECs MMP-9 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2~5 分别为 0.05、0.15、0.45、1.35 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与对照组相比 ($n = 3$)。

Figure 2. Effect of different concentration lovastatin on protein expression of MMP-9

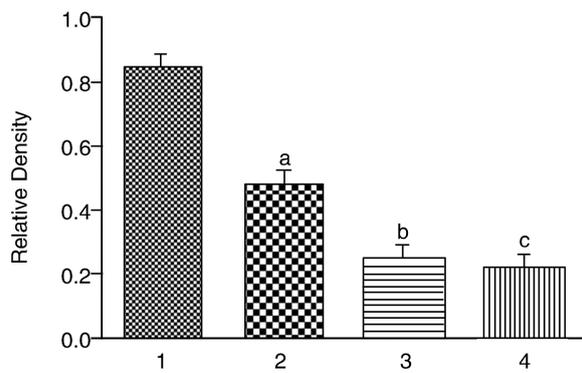
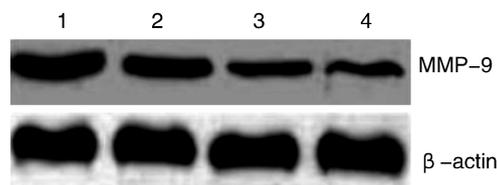


图 3. 洛伐他汀作用不同时间对 HUVECs MMP-9 蛋白表达的影响 1 为对照组 (0 h), 2~4 分别为 6、12、24 h。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, c 为 $P < 0.01$, 与对照组相比 ($n = 3$)。

Figure 3. Effect of lovastatin on protein expression of MMP-9 at different time

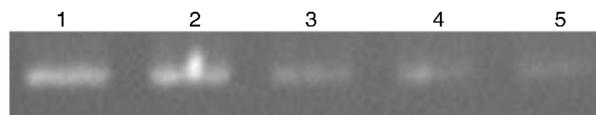


图 4. 洛伐他汀对 MMP-9 活性的影响 1 为对照组, 2 为 TNF- α + 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀, 3 为 TNF- α + 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀, 4 为 TNF- α + 0.45 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀, 5 为 TNF- α + 1.35 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀。

Figure 4. Effect of different concentration lovastatin on activity of MMP-9

3 讨论

胶原纤维是动脉粥样硬化粥样主要成分, 它含量的高低决定了斑块的稳定与否。胶原成分越多, 斑块越稳定。在动脉粥样硬化斑块当中, 通常伴有大量的炎症细胞浸润, 这些炎症细胞能产生和分泌一类特异性的 MMPs, 这些 MMPs 可以降解细胞外胶原纤维而导致斑块的不稳定。斑块在血流产生的牵拉、压迫或剪切等作用下, 极易破裂而引起各类临床并发症。在众多的 MMPs 当中, 以 MMP-9 最重要^[4]。因此以 MMP-9 为治疗靶点, 对减少心血管事件的发生具有重要意义。

洛伐他汀是羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxy methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制

剂,主要用于高胆固醇的治疗^[2]。有报道称,洛伐他汀还可能影响和改善内皮细胞功能,减少血栓形成以及抑制粥样斑块炎症反应等功能^[5,6]。在本研究当中,我们应用不同浓度的洛伐他汀干预内皮细胞内 MMP-9 的表达,结果显示,洛伐他汀能抑制 HUVECs 细胞 MMP-9 的蛋白和 mRNA 水平,且 MMP-9 蛋白的表达与 mRNA 的改变具有一定的同步性,但值得注意的是 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀干预下 MMP-9 无论是蛋白表达还是活性均与对照组没有显著差异,虽然 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀干预下 MMP-9 在 mRNA 表现出显著差异性。不同浓度洛伐他汀对 mRNA 以及蛋白的抑制不同,浓度越大,抑制效果越显著。随着处理时间的延长,MMP-9 的表达也越低,说明同时具有时间依赖性。这也从另一层面揭示了洛伐他汀又一可能的调脂外机制:通过抑制 MMP-9 的合成,有利于硬化斑块的趋于稳定,对于急性冠脉综合征患者而言,有利于病情稳定,改善预后。

洛伐他汀抑制 MMP-9 的机制目前依然不是很清楚,它可能是抑制细胞因子的产生而发挥作用,或者通过抑制核因子 κB 的激活,从而在转录水平抑制 MMP-9 mRNA 的表达,也有可能是抑制 HMG-CoA 还原酶,减少了甲羟戊酸的产生,最终导致异戊二烯化受阻^[4,5,7]。

[参考文献]

[1] Pasha MK, Muzeeb S, Basha SJ, et al. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors--atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological,

pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and in vitro metabolism studies[J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(3): 282-293.

- [2] Bar EE, Stearns D. New developments in medulloblastoma treatment: the potential of a cyclopamine-lovastatin combination[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17(2): 185-195.
- [3] Sigala F, Kotsinas A, Savari P, et al. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability[J]. *J Vasc Surg*, 2010, 52(3): 704-713.
- [4] Saragusti AC, Ortega MG, Cabrera JL, et al. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity molecular mechanism and structure-activity relationship of the flavonoid-enzyme interaction[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 644(1-3): 138-145.
- [5] Frisinghelli A, Mafri A. Regression or reduction in progression of atherosclerosis, and avoidance of coronary events, with lovastatin in patients with or at high risk of cardiovascular disease: a review[J]. *Clin Drug Investig*, 2007, 27(9): 591-604.
- [6] Skjot-Arki H, Barascuk N, Register T, et al. Macrophage-mediated proteolytic remodeling of the extracellular matrix in atherosclerosis results in neoepitopes: a potential new class of biochemical markers[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2010, 8(5): 542-552.
- [7] Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(7): 517-526.

(此文编辑 曾学清)