

## · 论著 ·

## 肝素对脂多糖诱导内皮细胞损伤中基质金属蛋白酶及其组织抑制剂基因表达的影响

李旭 张晓娟 马晓春

**【摘要】** 目的 探讨基质金属蛋白酶 9(MMP-9)及其组织抑制剂 -1(TIMP-1)在脂多糖(LPS)诱导内皮细胞损伤中的表达,并观察肝素对其水平的影响。方法 LPS 10  $\mu\text{g/ml}$  刺激人肺微血管内皮细胞(HPMEC)诱导损伤,肝素预处理组分别于 LPS 刺激前 15 min 加入 0.1 U/ml 及 1 U/ml 普通肝素,对照组加入等量磷酸盐缓冲液(PBS)。分别在刺激 2、6、12 h 收集细胞提取 RNA,应用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组细胞中 MMP-9 及 TIMP-1 的 mRNA 表达。结果 与对照组比较,LPS 刺激 2 h 组 MMP-9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达明显增高,12 h 达高峰 (MMP-9 mRNA:  $4.26 \pm 0.81$  比  $1.00 \pm 0.46$ , TIMP-1 mRNA:  $4.93 \pm 0.08$  比  $1.00 \pm 0.13$ , 均  $P < 0.05$ ),以 TIMP-1 增高明显。预防性应用肝素可明显降低 MMP-9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达 (0.1 U/ml 组: MMP-9 mRNA  $2.74 \pm 0.30$ , TIMP-1 mRNA  $2.96 \pm 0.13$ ; 1 U/ml 组: MMP-9 mRNA  $3.08 \pm 0.48$ , TIMP-1 mRNA  $2.93 \pm 0.27$ , 均  $P < 0.05$ )。不同剂量肝素组间基因表达水平差异无统计学意义。结论 LPS 诱导内皮细胞损伤时 MMP-9、TIMP-1 表达增加,肝素可能通过调节 MMP-9、TIMP-1 表达水平发挥其保护作用。

**【关键词】** 脂多糖; 内皮细胞; 普通肝素; 基质金属蛋白酶 9; 金属蛋白酶组织抑制剂 -1

**Therapeutic effects of unfractionated heparin on lipopolysaccharide-activated matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in endothelial cells** LI Xu, ZHANG Xiao-juan, MA Xiao-chun. Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China  
Corresponding author: MA Xiao-chun, Email: xcma2972@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expressions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in injured endothelial cells induced by lipopolysaccharide (LPS) and the effects of unfractionated heparin (UFH) on the level of expressions. **Methods** The human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) were injured by LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ). In UFH pretreatment group, the cells were interfered with 0.1 U/ml or 1 U/ml UFH within 15 minutes before stimulus of LPS. In control group, the cells were cultured in equal volume of phosphate buffered saline (PBS). The RNA of the respectively cells were extracted at 2, 6, 12 hours after stimulus, and the expressions of MMP-9 mRNA and TIMP-1 mRNA were detected by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** Compared with control group, the expressions of MMP-9 mRNA and TIMP-1 mRNA were increased after stimulation of LPS, and peaked at 12 hours (MMP-9 mRNA:  $4.26 \pm 0.81$  vs.  $1.00 \pm 0.46$ , TIMP-1 mRNA:  $4.93 \pm 0.08$  vs.  $1.00 \pm 0.13$ , both  $P < 0.05$ ), the change in TIMP-1 was more significant. While as UFH pretreatment could significantly down-regulated the mRNA expressions of MMP-9 and TIMP-1 (UFH 0.1 U/ml group MMP-9 mRNA:  $2.74 \pm 0.30$ , TIMP-1 mRNA:  $2.96 \pm 0.13$ ; UFH 1 U/ml group MMP-9 mRNA:  $3.08 \pm 0.48$ , TIMP-1 mRNA:  $2.93 \pm 0.27$ , all  $P < 0.05$ ). There were no significant differences in mRNA expressions between two UFH groups. **Conclusions** The expressions of MMP-9 and TIMP-1 of HPMEC injured by LPS were obviously increased, UFH might attenuate the injury via inhibiting the expressions of MMP-9 and TIMP-1.

**【Key words】** Lipopolysaccharide; Endothelial cell; Unfractionated heparin; Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitors of metalloproteinase-1

基质金属蛋白酶(MMPs)是一类生物活性依赖于锌离子、有降解细胞外基质(ECM)能力的内肽酶家族,在过去的几十年中,已有大量研究证实 MMPs

在基质重构中的关键作用<sup>[1]</sup>。近年研究表明,MMPs除降解基质外,在调控炎症等诸多方面有重要作用。金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)是 MMP-9 的天然抑制剂。在体内 MMP-9 与 TIMP-1 建立了基质合成和降解的平衡,两者的失衡导致内皮功能受损<sup>[2]</sup>。肝素在临床应用中,对脓毒症患者有积极的作用<sup>[3-4]</sup>,但具体机制尚未完全阐述清楚,近年研究表明,内皮细胞在脓毒症进展过程中起到关键作用<sup>[5]</sup>。因此,本研究旨在探讨 MMP-9 及 TIMP-1 的 mRNA

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1003-0603.2012.08.012

基金项目:辽宁省科技厅药物源头创新研究课题(20071027-7);辽宁省医学高峰建设工程项目(2010-1067);辽宁省沈阳市科技计划项目(F10-205-1-01)

作者单位:110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院 ICU

通信作者:马晓春,Email:xcma2972@sina.com

在脂多糖(LPS)诱导内皮细胞损伤中的动态表达,并观察肝素对其水平的影响,从而为肝素在临床脓毒症患者中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料:人肺微血管内皮细胞株(HPMEC)购自上海拜力生物技术有限公司;胎牛血清、DMEM培养基(美国HyClone公司);LPS(O55:B5,美国Sigma公司);TRIzol(美国Invitrogen公司);TaKaRa反转录试剂盒(大连宝生物工程公司)。

1.2 细胞培养及分析:将HPMEC培养于含胎牛血清的DMEM培养基中,置37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中培养,1~2d换液1次。按1×10<sup>6</sup>个/ml将HPMEC接种于6孔板,每孔2ml。实验分为对照组、LPS刺激组、LPS+肝素0.1U/ml组和LPS+肝素1U/ml组4组。肝素作用组于LPS(10μg/ml)刺激前15min加入相应剂量的肝素;对照组应用等量磷酸盐缓冲液(PBS)。各组分别在培养2、6、12h后收集细胞提取RNA,于-80℃下保存待测。

1.3 MMP-9和TIMP-1的mRNA表达测定:应用TRIzol提取细胞总RNA,紫外分光光度计测定总RNA浓度和纯度,进行逆转录,采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)测定MMP-9和TIMP-1的mRNA表达,操作按照试剂盒说明书进行。选取β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照,MMP-9及TIMP-1的相对表达量用2<sup>-ΔΔCt</sup>计算。

1.4 统计学处理:采用SPSS 18.0软件处理数据,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,单因素多水平

比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),正态分布及方差齐性时,各组均值多重比较采用LSD检验,方差不齐时采用非参数的秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝素对MMP-9mRNA表达的影响(表1;图1):LPS刺激后2hMMP-9mRNA表达即明显增加,随时间延长逐渐上调,12h达高峰(均 $P < 0.05$ )。肝素预处理后可明显减少MMP-9mRNA表达(均 $P < 0.05$ ),不同剂量肝素组间无差异。

2.2 肝素对TIMP-1mRNA表达的影响(表1;图1):LPS刺激后2hTIMP-1mRNA表达即明显增高,随时间延长逐渐上调,12h达高峰(均 $P < 0.05$ )。肝素预处理后可明显减少TIMP-1mRNA表达(均 $P < 0.05$ ),不同剂量肝素组间无差异。

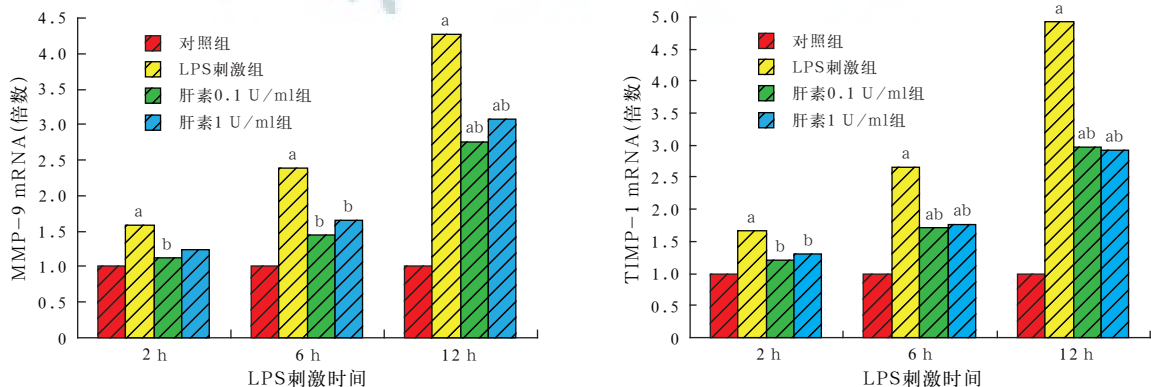
3 讨论

微循环功能障碍对器官功能状态起到重要作用<sup>[6]</sup>,是脓毒症的主要病理生理过程。微循环功能障碍可以分成高凝状态导致的血栓形成和血管内皮细胞功能障碍<sup>[5]</sup>。绝大部分重症感染患者凝血系统被活化,尤其是感染性休克患者几乎均会发生凝血变化<sup>[7]</sup>。因此,脓毒症时不仅会发生炎症反应,同时血管内皮细胞和凝血系统也会发生变化,并相互作用

表1 肝素预处理对LPS诱导HPMEC损伤中MMP-9和TIMP-1mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别          | 样本数 | MMP-9 mRNA               |                          |                           | TIMP-1 mRNA              |                           |                           |
|-------------|-----|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|             |     | 2 h                      | 6 h                      | 12 h                      | 2 h                      | 6 h                       | 12 h                      |
| 对照组         | 3   | 1.00 ± 0.23              | 1.00 ± 0.28              | 1.00 ± 0.46               | 1.00 ± 0.25              | 1.00 ± 0.10               | 1.00 ± 0.13               |
| LPS刺激组      | 3   | 1.58 ± 0.35 <sup>a</sup> | 2.39 ± 0.33 <sup>a</sup> | 4.26 ± 0.81 <sup>a</sup>  | 1.66 ± 0.21 <sup>a</sup> | 2.66 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 4.93 ± 0.08 <sup>a</sup>  |
| 肝素0.1 U/ml组 | 3   | 1.13 ± 0.08 <sup>b</sup> | 1.44 ± 0.57 <sup>b</sup> | 2.74 ± 0.30 <sup>ab</sup> | 1.21 ± 0.10 <sup>b</sup> | 1.70 ± 0.04 <sup>ab</sup> | 2.96 ± 0.13 <sup>ab</sup> |
| 肝素1 U/ml组   | 3   | 1.23 ± 0.04              | 1.65 ± 0.28 <sup>b</sup> | 3.08 ± 0.48 <sup>ab</sup> | 1.31 ± 0.12 <sup>b</sup> | 1.75 ± 0.04 <sup>ab</sup> | 2.93 ± 0.27 <sup>ab</sup> |

注:LPS:脂多糖,HPMEC:人肺微血管内皮细胞株,MMP-9:基质金属蛋白酶9,TIMP-1:金属蛋白酶组织抑制剂-1;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与LPS刺激组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$



注:LPS:脂多糖,HPMEC:人肺微血管内皮细胞株,MMP-9:基质金属蛋白酶9,TIMP-1:金属蛋白酶组织抑制剂-1;

与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与LPS刺激组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图1 肝素预处理对LPS诱导HPMEC损伤中MMP-9和TIMP-1mRNA表达的影响

用影响机体稳态<sup>[8]</sup>。肝素是临床应用的传统抗凝剂,是预防和治疗深静脉血栓形成的主要药物。研究发现,肝素除具有抗凝作用外,还具有抗炎作用,可抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活化,减少促炎细胞因子表达<sup>[9-10]</sup>,抑制白细胞的黏附、迁移和活化<sup>[11]</sup>;下调黏附分子水平<sup>[9]</sup>;抑制补体活化和血小板活化因子的产生,从而削弱其在感染性休克过程中促进炎症和凝血之间恶性循环的作用<sup>[11]</sup>。同时,肝素还有减少呼吸“爆发”过程中超氧阴离子生成<sup>[12]</sup>,减少白细胞吞噬<sup>[13]</sup>等作用。但肝素是否会在 ECM 破坏中起作用,国内外报道较少。

ECM 结构及功能的完整性对细胞生理活动具有重要的影响。而内皮细胞一旦脱离其 ECM 则会发生凋亡<sup>[14]</sup>。在细菌毒素、细胞因子等外源性或内源性因素刺激下,MMPs 可由炎性细胞(T 细胞、巨噬细胞、嗜酸粒细胞、中性粒细胞)及血管内皮细胞大量释放,破坏血管基底膜及组织结构,导致组织损伤<sup>[1]</sup>。同时内皮细胞失去了生存和活动的依托,可促进内皮细胞凋亡,造成内皮细胞不可逆损伤<sup>[14]</sup>。有研究表明,MMP-9 调节炎症的过程有:水解内皮间紧密连接的成分,增加血管通透性<sup>[15]</sup>;促进中性粒细胞的黏附和浸润,导致全身炎症反应综合征(SIRS),并引发炎症反应的级联放大效应<sup>[16]</sup>;活化趋化因子,从而促进中性粒细胞聚集到受损伤的组织<sup>[17]</sup>。Nakamura 等<sup>[18]</sup>首次报道重症感染患者早期 MMP-9 水平与病死率相关。Hoffmann 等<sup>[19]</sup>报道重症感染患者 1 d 血清中 MMP-9、TIMP-2、TIMP-1 水平增高,死亡者 TIMP-1 水平异常增高。Maitra 等<sup>[20]</sup>研究提示,TIMP-1 水平增高及 MMP-9/TIMP-1 水平下降是预测重症感染患者病死率的重要指标。本研究 LPS 诱导内皮细胞表达 MMP-9 及 TIMP-1 增多,肝素可降低其水平,提示肝素可能通过调节 MMP-9 及 TIMP-1 表达发挥其保护作用。

综上所述,许多病理情况下均有 MMP 的过度表达,表明调控 MMP 基因对维持正常稳态的重要性。肝素作为传统的抗凝剂,同时具有抗炎症和抗凋亡作用,可能为脓毒症患者治疗提供新方向。

#### 参考文献

[1] Chen H, Inocencio R, Alam HB, et al. Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in rat model of hemorrhagic shock and resuscitation. *J Surg Res*, 2005, 123: 235-244.  
 [2] Yamamoto S, Nguyen JH. TIMP-1/MMP-9 imbalance in brain edema in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res*, 2006, 134: 307-314.  
 [3] 艾宇航,张丽娜,龚华,等.低分子肝素治疗脓毒症的前瞻性临

床研究. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 736-739.  
 [4] 赵聪,章志丹,张晓娟,等.小剂量肝素治疗脓毒症的临床分析. *中华内科杂志*, 2009, 48: 566-569.  
 [5] Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med*, 2002, 347: 966-967.  
 [6] 马晓春. 应加深对脓毒症微循环功能障碍的认识. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 66-67.  
 [7] Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*, 1999, 341: 586-592.  
 [8] 马晓春,李旭.肝素在脓毒症治疗中的应用前景. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 566-569.  
 [9] Lever R, Hoult JR, Page CP. The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. *Br J Pharmacol*, 2000, 129: 533-540.  
 [10] 栾正刚,娜拉·普鲁,章志丹,等.低分子肝素和阿司匹林对急性肺损伤的治疗作用. *中国危重病急救医学*, 2006, 18: 456-458.  
 [11] Tyrrell DJ, Horne AP, Holme KR, et al. Heparin in inflammation: potential therapeutic applications beyond anticoagulation. *Adv Pharmacol*, 1999, 46: 151-208.  
 [12] Bazzoni G, Beltrán Nuñez A, Mascellani G, et al. Effect of heparin, dermatan sulfate, and related oligo-derivatives on human polymorphonuclear leukocyte functions. *J Lab Clin Med*, 1993, 121: 268-275.  
 [13] Freischlag JA, Colburn MD, Quiñones-Baldrich WJ, et al. Alteration of neutrophil (PMN) function by heparin, dexamethasone, and enalapril. *J Surg Res*, 1992, 52: 523-529.  
 [14] Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477: 267-283.  
 [15] Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, et al. Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *FASEB J*, 2006, 20: 2550-2552.  
 [16] Volman TJ, Goris RJ, Lomme RM, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases in the murine zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome. *J Pathol*, 2004, 203: 968-975.  
 [17] McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, et al. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*, 2002, 100: 1160-1167.  
 [18] Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, et al. Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fiber-immobilized polymyxin B treatment. *Am J Med Sci*, 1998, 316: 355-360.  
 [19] Hoffmann U, Bertsch T, Dvorsak E, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J Infect Dis*, 2006, 38: 867-872.  
 [20] Maitra SR, Jacob A, Zhou M, et al. Modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in sepsis. *Int J Clin Exp Med*, 2010, 3: 180-185.