

血管内皮生长因子对内皮细胞产生基质金属蛋白酶 2 的影响

王杰松, 芮耀诚, 李铁军, 张 黎, 邱 彦, 杨鹏远

(中国人民解放军第二军医大学药学院药理学教研室, 上海市 200433)

[关键词] 药理学; 血管内皮生长因子刺激基质金属蛋白酶的产生; 酶联免疫吸附测定; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶 2; 内皮细胞; 细胞培养

[摘要] 研究血管内皮生长因子对人脐静脉内皮细胞产生基质金属蛋白酶 2 的影响。用免疫组织化学染色方法和酶联免疫吸附测定法测定基质金属蛋白酶 2 的蛋白含量, 明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶 2 的活性。在基础条件下, 内皮细胞自发产生基质金属蛋白酶 2, 在 50 $\mu\text{g/L}$ 血管内皮生长因子刺激下, 基质金属蛋白酶 2 的产生显著增加 ($P < 0.05$), 血管内皮生长因子浓度达到 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 基质金属蛋白酶 2 的产生进一步增加。与蛋白产生相一致, 基质金属蛋白酶 2 分解明胶的活性也显著升高。血管内皮生长因子促进 ECV304 细胞产生基质金属蛋白酶 2 的作用可能与其促血管生成和增加血管通透性有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Production of Matrix Metalloproteinase-2 in ECV304 Cells

WANG Jie-Song, RUI Yao-Cheng, Li Tie-Jun, ZHANG Li, QIU Yan, and YANG Peng-Yuan

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[KEY WORDS] Vascular Endothelial Growth Factor; Matrix Metalloproteinase-2; Endothelial Cells; Cell Culture; ECV304; Zymography

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of recombinant human vascular endothelial growth factor (VEGF) on the production of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) protein and activity in human umbilical veins endothelial cell line (ECV304). **Methods** MMP-2 protein was determined by immunohistochemistry and enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA). MMP-2 activity was detected by zymography. **Results** MMP-2 could be constitutively secreted by ECV304 cells. Upon VEGF stimulation, a significant upregulation of MMP-2 protein expression was observed at concentration of 50 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$), further elevation at 100 $\mu\text{g/L}$ according to ELISA assay. The activity of MMP-2 for gelatin degradation by zymography confirmed the ELISA result. **Conclusion** VEGF can induce MMP-2 production in ECV304 cells, the responses probably contribute to the angiogenic and vascular permeable potential of the peptide.

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 属于同源二聚体糖蛋白 (34 ~ 46 kDa) 家族的一员, 是内皮细胞特异性的丝裂原。由于在转录水平剪切不同, VEGF 有 4 种不同的剪切变体, 分别是 VEGF₂₀₆、VEGF₁₈₉、VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁^[1], 其中 VEGF₁₆₅ 是活性较强且研究最多的变体。VEGF 的体内作用是通过两种特异性的酪氨酸激酶受体——fms 样酪氨酸激酶受体 (fms-like tyrosine kinase, Flt-1) 和激酶插入区受体 (kinase-insert domain recep-

tor, KDR/Flk-1) 介导的。通过这两种特异性受体, VEGF 可以促进新生血管生成, 刺激血管内皮细胞增殖和增加血管通透性等^[2,3]。此外, VEGF 还可能与动脉粥样硬化有关^[4]。

基质金属蛋白酶 2 (明胶酶 A) (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 是以锌为辅助因子的蛋白酶家族的成员^[5], 主要分解血管内皮基底膜 IV 型胶原, 还能分解 V、VII、X 型胶原和明胶以及纤维连接蛋白等。在血管生成过程中, 内皮细胞需要从细胞外基质释放和迁移, 此一过程需要分解血管内皮基底膜 IV 型胶原, 所以作为 IV 型胶原的重要分解酶, MMP-2 的产生和活化与新生血管生成密切相关^[6,7], 此外 MMP-2 还与血管通透性作用有关^[8]。在动脉粥样硬化形成过程中, 血管平滑肌细胞从中膜迁移至内膜层, 需要穿过以 IV 型胶原为主的内皮基底膜, 此过程也需要

[收稿日期] 2002-12-31 **[修回日期]** 2003-11-05

[基金项目] 国家自然科学基金 (39870870) 资助

[作者简介] 王杰松, 1966 年出生, 安徽省怀宁县人, 药理学博士, 主要从事心脑血管药理研究, 现工作单位为解放军 306 医院药剂科; 为通讯作者, 电话: 010-66356171, E-mail: jiesongwang@yahoo.com。芮耀诚, 1942 年出生, 北京市人, 教授, 博士研究生导师, 全军药专业委员会主任委员, 研究方向为心脑血管药理。李铁军, 1970 年出生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 讲师, 研究方向为心脑血管药理。

IV型胶原酶的参与^[9]。

本文旨在研究 VEGF₁₆₅ 对脐静脉内皮 ECV304 细胞产生 MMP-2 的影响,以探讨 VEGF 的血管生成作用及血管通透性作用与 MMP-2 活性的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人重组 VEGF₁₆₅ 为美国 CalBiochem 公司产品。ECV304 细胞购自中国科学院细胞所。新生牛血清(natal bovine serum, NBS)为杭州四季青生物工程材料研究所产品。MEM 为 Gibco 公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 和卵白素—生物素系统免疫测定试剂盒为华美生物技术公司产品。兔抗人 MMP-2 特异性抗体由 William G 博士惠赠。鼠抗人 MMP-2 单抗购自 Neomakers 公司。蛋白超滤膜(YM-30)为 Millipore 公司产品。

1.2 细胞培养

ECV304 细胞用含 10% 新生牛血清的 MEM,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。在实验中,ECV304 细胞分别种植到 24 孔板酶联免疫吸附测定,enzyme linked immuno-sorbent assay, ELISA 和 6 孔板(酶谱法)中,待细胞生长融合成单层,用无血清培养基洗 3 次,加入含不同浓度 VEGF(ELISA 法:6.25~100;酶谱法:50、100 μg/L)的无血清条件培养基,空白组不加 VEGF,孵育 24 h,其上清用于 ELISA 法和酶谱法的测定。

1.3 免疫组织化学染色法

ECV304 细胞种植在预先用 0.1% 多聚赖氨酸包被的盖玻片上,37℃、5% CO₂ 条件下培养。24 h 后,用无血清培养基洗 3 次,加入含 100 μg/L VEGF 的无血清条件培养基,以不加 VEGF 组为对照,继续孵育 12 h。细胞层用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min。MMP-2 的检测按照卵白素—生物素系统免疫测定试剂盒说明书步骤进行。染色切片用 CA6300 型颗粒图像分析系统分析各切片的阳性颗粒,用切片 3 个区域阳性面积比例的平均值来衡量 MMP-2 在各组细胞中的表达强度。

1.4 酶联免疫吸附测定法

参考文献[10],用 MMP-2 多克隆抗体包被酶标板,加 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭,再加入待测培养上清液和 4 g/L 的鼠抗人 MMP-2 单抗检测特异性抗原,37℃ 孵育 1 h。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:1 000),37℃ 孵育 1 h,用 PBS 充分洗涤。加 0.4 g/L 邻苯二胺(O-

phenylenediamine, OPD)和 0.045% H₂O₂ 显色,最后加 50 μL 的 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,在 492 nm 处测定吸光度(absorbance, A)值。

1.5 明胶酶谱法

参照文献[11]的方法。将 ECV304 细胞培养上清以 12 000 r/min 离心 10 min,以去除细胞碎片。吸上清,经超滤膜超滤浓缩,Bradford 法定量蛋白,等量蛋白加到含 1 g/L 明胶的 10% 聚丙烯酰胺凝胶中,100 mA 恒流电泳。电泳结束后,取下胶块,加复性液(25% 曲拉通 X-100,50 mol/L 三羟甲基氨基甲烷,10 mmol/L CaCl₂ 和 1 μmol/L ZnCl₂)漂洗 3 次,在孵育液(50 mol/L 三羟甲基氨基甲烷,10 mmol/L CaCl₂, 1 μmol/L ZnCl₂, 0.1% NaN₃)中 37℃ 孵育 20 h,用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色,脱色液脱色至有明显的蛋白溶解条带出现。

1.6 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用 ANOVA 分析。

2 结果

2.1 血管内皮生长因子对 ECV304 细胞产生基质金属蛋白酶 2 的影响

常规条件下培养的 ECV304 细胞能合成和分泌 MMP-2,VEGF 刺激其表达增加。将免疫组织化学染色切片置于 CA6300 型颗粒图像分析系统中,分析各切片的阳性颗粒,结果 VEGF 处理组阳性率为 15.12% ± 2.03%,空白对照组为 11.63% ± 1.04%,两组差异非常显著($P < 0.01$)。

2.2 血管内皮生长因子对 ECV304 细胞产生基质金属蛋白酶 2 的影响

血管内皮生长因子呈剂量依赖性地促进 ECV304 细胞产生 MMP-2,在 50 μg/L 时 MMP-2 的产生与对照组相比增加 22.56% ($P < 0.05$),100 μg/L 刺激作用进一步增强,与对照组相比增加 26.02% (表 1, Table 1)。

2.3 血管内皮生长因子对基质金属蛋白酶 2 活性的影响

用 50 μg/L 和 100 μg/L 的 VEGF 刺激 ECV304 细胞,收集培养基用于酶谱法测定。结果明胶溶解条带大约位于 72 kDa 附近,表明是 MMP-2 条带,VEGF 显著升高其活性(图 1, Figure 1),实验中未见 92 kDa IV 型胶原酶 MMP-9 的溶解条带。

表 1. 血管内皮生长因子对 ECV304 细胞产生基质金属蛋白酶 2 的影响

Table 1. Effect of VEGF on MMP-2 protein secreted by ECV304 in vitro ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 分 组 | 基质金属蛋白酶 2 ($A_{492\text{ nm}}/10^5$ 细胞) | 升高 | P |
|----------------------|---|--------|---------|
| 对照组 | 0.665 \pm 0.063 | | |
| 血管内皮生长因子组 | | | |
| 6.25 $\mu\text{g/L}$ | 0.707 \pm 0.013 | 6.32% | 0.321 4 |
| 12.5 $\mu\text{g/L}$ | 0.733 \pm 0.022 | 10.23% | 0.152 3 |
| 25 $\mu\text{g/L}$ | 0.762 \pm 0.057 | 10.08% | 0.120 5 |
| 50 $\mu\text{g/L}$ | 0.815 \pm 0.024 ^a | 22.56% | 0.018 5 |
| 100 $\mu\text{g/L}$ | 0.838 \pm 0.027 ^a | 26.02% | 0.011 9 |

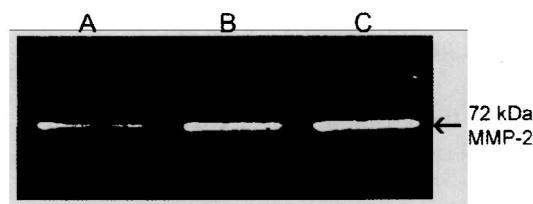
a: $P < 0.05$, 与对照组比较。图 1. 明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 2 活性 A: 对照组; B: 50 $\mu\text{g/L}$ VEGF; C: 100 $\mu\text{g/L}$ VEGF。

Figure 1. Determination of matrix metalloproteinase-2 activity by zymography

3 讨论

在生理条件下,内皮细胞需要维持稳定和非迁移的状态来行使其功能,此稳定状态的维持部分依赖其细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成,如胶原、纤维连接蛋白和蛋白聚糖等,这些大分子物质主要存在于内皮细胞下的基底膜,起到调节内皮细胞功能和作为大分子屏障的作用。同时内皮细胞在生理和病理条件下还产生 MMP 来调节其 ECM 内环境。虽然内皮细胞产生的全部 MMP 目前仍未完全确定,但内皮细胞确能产生多种 MMP,且不同来源的内皮细胞产生的 MMP 类型不同^[5,12]。

我们的实验结果显示,常规培养的 ECV304 能合成和分泌 MMP-2,受 VEGF 刺激后, MMP-2 的产生

显著增加,且具有浓度依赖性。随着 MMP-2 蛋白水平增加,其活性也相应升高。MMP-9 为另一种 IV 型胶原分解酶,在某些种类的细胞中, MMP-2 和 MMP-9 同时表达^[12],但在我们的实验中,无论有无 VEGF 刺激,均未观察到 MMP-9 的明胶溶解条带。资料报道, VEGF 具有增加血管通透性和促进新生血管生成的作用,而 MMP-2 在新生血管生成中起到重要的介导作用,此外 MMP-2 在体外还被证实与内皮细胞通透性增加有关^[8]。因此我们推测 VEGF 可能通过促进血管内皮细胞产生 MMP-2,从而导致病理和生理性的新生血管生成和血管通透性增加。

【参考文献】

- [1] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor: Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 1991, 266 (18): 11 947-954
- [2] De-Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, 55 (5047): 989-991
- [3] Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 1993, 72 (6): 835-846
- [4] 李建芝, 常青, 唐海兰, 黄华梅, 关结宾, 李自成. 血管内皮生长因子与家兔动脉粥样硬化病变进展的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (6): 476-478
- [5] Johnso LL, Dyer R, Hupe DJ. Matrix metalloproteinase. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2 (4): 466-471
- [6] Fan TPD, Jaggar R, Bicknell R. Controlling the vasculature: Angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16 (2): 57-66
- [7] Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, 1998, 58 (5): 1 048-051
- [8] Ehringer WD, Wang OL, Haq A, Miller FN. Bradykinin and α -thrombin increase human umbilical vein endothelial macromolecular permeability by different mechanisms. *Inflammation*, 2000, 24 (2): 175-193
- [9] 孙红霞, 温进坤. IV 型胶原酶与动脉粥样硬化. *中国动脉硬化杂志*, 1998, 6 (3): 271-274
- [10] Cookley S, Hipkiss JB, Tickle SP, Holmes Levers E, Docherty AJ, Murphy G, et al. Immunoassays for the detection of human collagenase, stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) and enzyme-inhibitor complexes. *Matrix*, 1990, 10 (5): 285-291
- [11] Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, 1980, 102 (1): 196-202
- [12] Belkhir A, Richards C, Wnaley M, McQueen SA, Orr FW. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H_2O_2 exposure. *Lab Invest*, 1997, 77 (5): 533-539

(此文编辑 曾学清)