

·综述·

血管成形术后平滑肌细胞的迁移与基质金属蛋白酶

王永利 贺能树

平滑肌细胞(VSMC)的迁移是血管成形术后血管再狭窄形成机制中的重要环节之一,细胞外基质(ECM)的降解是 VSMC 迁移的前提条件。血管成形术后的 VSMC 的迁移,涉及到细胞外基质的破坏和再修复,即结缔组织修复维持细胞外基质的完整性。此过程中蛋白质的合成及缺失依赖于蛋白激酶及其抑制因子作用的程度。实验提示血管壁上存在两个系统,相互作用达到内环境的稳定,即纤溶酶原系统和基质金属蛋白酶(MMPs)系统。在 VSMC 的迁移中作为主要角色——MMPs 受到重点关注。本文将对血管成形术后,平滑肌细胞的迁移与 MMPs 的关系作一综述。

一、MMPs 家族

MMPs 是 Zn^{2+} 及 Ca^{2+} 依赖酶超家族,在生理和病理状态下,对细胞外基质有降解吸收的重要作用。目前,已辨别出 9 种 MMPs,并经克隆、测序。被分成 4 类,见表 1。

当考虑到识别的顺序、分子质量及作用的特异底物时,MMPs 有不同的术语。MMPs 亚组包括只降解 I、II 结构型胶原的胶原蛋白酶,作用于基膜成分和部分降解胶原的 IV 型胶原蛋白酶/明胶蛋白酶,以及广泛作用于特异底物的基质降解酶(作用底物:蛋白多糖、层粘蛋白、纤粘蛋白、明胶及基膜胶原)。此外 MMPs 家族中还有一新成员 MT-MMPs,其特征是浆膜的整体部分,而不是被分泌的蛋白。

总的来说,MMPs 一旦激活将产生细胞外基质完全降解,这一过程对血管成形术后的 VSMC 迁移非常重要。酶的激活过程紧密受控,分别在三个层次上进行:转录、潜在酶原的激活和蛋白降解活性的抑制(示意于图 1)。

二、转录水平调节

一系列细胞因子和生长因子能够刺激诱导 MMPs 的合成,这些因子包括 IL-1, PDGF, 和 TNF-

表 1 MMPs 分类

亚组	名字	MMPs 序号	分子质量 $\times 10^3$	底物	VSMC 调节子	抑制因子
胶原蛋白酶	间质胶原蛋白酶中性粒细胞胶原	1	55	I, II, III, VII 和 X 型胶原, 蛋白多糖	IL-1, THF- α PDGF, 伏波醇	TIMP-1, -2
	蛋白酶	8	75	I, II, III 型胶原, 蛋白多糖		TIMP-1, -2
明胶酶	明胶酶 A	2	72	IV, V, VII 和 X 型胶原, 明胶	基质	TIMP-2, -1
	明胶酶 B	9	92	IV, V, VII 和 X 型胶原, 明胶		
基质降解酶	基质降解酶 I	3	57	III, IV, V 和 IX 型胶原	IL-1, T NF- α	TIMP-1, -2
	基质降解酶 2	10	57	同基质降解酶-1		TIMP-1, -2
	基质降解酶 3	11	51	明胶, 纤粘蛋白, 蛋白多糖		TIMP-1, -2
	PUMP-1	7	28	明胶, 纤粘蛋白, 层粘蛋白, IV 型胶原, 胶原蛋白酶原, 蛋白多糖核蛋白		TIMP-1, -2
	金属蛋白酶	12	57	弹性蛋白		TIMP-1, -2
膜型 MMPs	MT-MMPs		66	IV 型胶原酶, 明胶, 明胶酶原 A		TIMP-1, -2
	...					

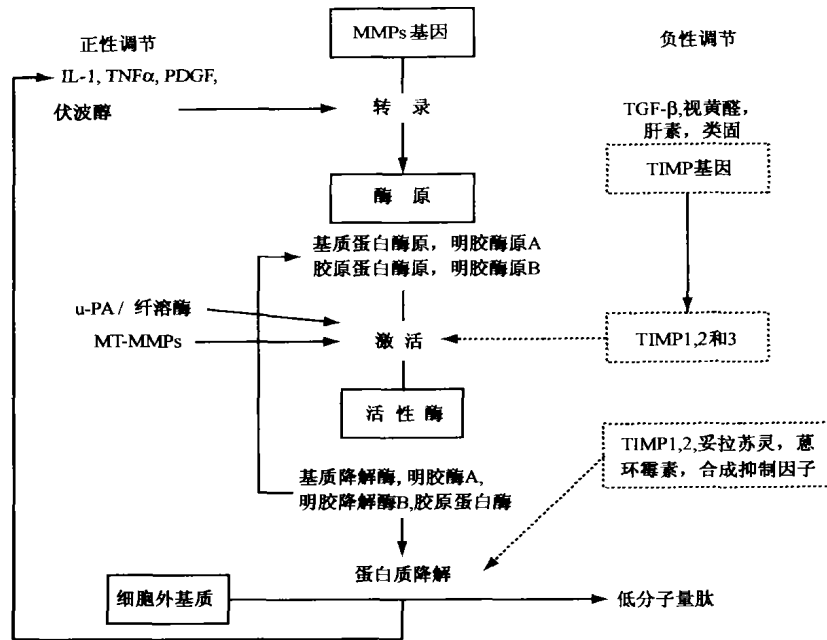


图 1 MMP 级联调控示意图

α ;相反另有些因子或生物制剂抑制这一过程,如 TGF- β ,肝素和皮质类固醇。在胶原酶和基质降解酶的研究中,已识别出两者在核连结蛋白上有许多相同的系列,包括 12-O-14 烷-伏波醇-13 醋酸盐反应原和激活剂蛋白-1 的位点^[1]。其中许多细胞因子和生长因子在动脉粥样硬化和再狭窄中被视作重要的介质。

三、MMPs 的激活

(一) 酶原水平的激活 对 MMPs 调控的第二个层次发生在对潜在的酶前体的激活。尽管存在许多纤维蛋白溶酶依赖途径,但纤维蛋白溶酶仍然是绝大多数 MMPs 的激活因子,启动潜在前肽,分裂成活性分子^[2,3]。在与组织的侵袭和细胞表面蛋白分解的关系中,尿激酶纤维蛋白溶酶 A(uPA)及其特异受体(uPA-R)和抑制因子(PAI-1 和 PAI-2)的作用,已有学者作过研究^[4]。uPA 与其受体的结合和激活,为细胞引导边缘上的局部蛋白分解提供了相应的机制。多种细胞可以表达 uPA 和 uPA-R,其中包括巨噬细胞。uPA 的抗体和抑制因子能阻断细胞外基质的降解^[5]。此外,蛋白降解系统和凝血机制类似,如纤维蛋白溶酶分解时,激活基质降解酶,已激活的酶再活化其他酶原,形成正性反馈。基质降解酶在碳氧末端触发胶原酶降解,蛋白分解活性可增加 5~8 倍。

(二) 细胞因子的激活 TNF- α 自身就是一种生长因子,在转录水平上调节金属蛋白酶,同时也为 MMP 所调节。TNF- α 也是一种潜在的致炎因子和

免疫细胞因子,作为前体合成,其降解物成为活性形式。金属蛋白酶抑制因子能阻断其翻译后的激活,胶原酶、明胶酶和基质降解酶的增加可以恢复其活性^[6,7]。因此,MMP 能够调节细胞因子的活性,可以激励并参与细胞过程。

新近发现 MT-MMP 是一膜整体蛋白,也是 MMP₂(明胶酶原 A)的激活因子^[8]。使蛋白分解激活过程局限于细胞表面,从而调节纤维蛋白溶酶原-纤维蛋白溶酶活化因子系统。这一点增加了经膜调控系统对所有的 MMPs 并行调节的可能性。实验中,如果鼠的纤维蛋白溶酶原-纤维蛋白溶酶激活因子系统表达基因受到抑制,在 uPA 缺乏的鼠中,血管损伤诱导的新生内膜形成和去内皮化显著减少,在组织型纤维蛋白溶酶原激活因子缺乏的动物中则没有改变,而在有目的去除 PAI-1 的动物中新生内膜形成和去内皮化显著加速^[9]。表明在细胞表面的系统调控中有高度的冗余。因此,病理学的(和可能药理学的)事件或许能够阻断单一的基质降解,为 VSMC 的迁移提供可选择的抑制方法。

四、MMPs 的抑制因素

MMPs 可被自然发生的抑制因子家族如 TIMP、少特异性的 α_2 -巨球蛋白及外源性物质如肝素阻抑。然而, α_2 -巨球蛋白的作用被其巨大的分子质量所限制。TIMPs 是多功能的分泌蛋白,这一多功能蛋白是结缔组织代谢调节的基本物质。这一家族已甄别出 3 个成员,即 TIMP1, TIMP2 和 TIMP3。TIMP-1 和 TIMP2 之间有 42% 的氨基酸

序列相同,在抑制 MMPs 的能力上两者基本上可以相互转化,但两者可以通过与明胶酶原的相互作用加以区分^[10]。TIMP3 与 TIMP1 有 37% 氨基酸同原,与 TIMP2 有 42% 氨基酸同原,特异性地位于细胞外基质,与其他 TIMPs 不同。这 3 个抑制因子均含有 6 个二硫键以维持三维空间结构。TIMP-1 为绝大多数结缔组织所合成,巨噬细胞也能合成,拮抗所有胶原酶、明胶酶和基质降解酶家族成员。以非共价键结合的形式,与活性酶高度亲和,形成不可逆的复合物,在活动吸收的组织中高度表达。从酶的潜在形式和催化活性两方面,在 MMPs 的激活水平上,密切调节酶的活性^[11]。蛋白酶活性的净水平取决于活性酶与抑制因子的相对浓度。TIMP2 具有双抑制效应;与 MMP₂ 结合,使其失去活性;相反与活化的 MMP₂ 结合使其对抑制因子的敏感性提高。TIMP1 可被细胞因子和激素诱导,而 TIMP2 的表达发生于 MMP₂ 的表达之后,与后者特异性地相互作用。在某些条件下观察 TIMP2 对特定的刺激的反应,可以发现其反应与 TIMP1 直接相反。这说明了出现在两种基因启动子上的调控元素不同,相应产生不同的表达方式。VSMC 被 ECM 包围禁锢,损伤后的 VSMC 迁移必须先行降解 ECM,这有赖于 MMPs 介导基质蛋白分解,启动 VSMC 向损伤的内膜迁移,因此,失去 TIMP 的抑制,MMPs 充分介导病理性的级联效应。Lijnen 等^[12] 实验证实:TIMP1 缺乏,内膜形成显著增加。

在分子水平机制上,MMPs 和其抑制因子的共同调节,有着一个平行而紧密调控的系统,构成一级联反应,调控所有的细胞外基质成分。

五、MMPs 与 VSMC 的迁移

正常或病理性血管壁上的诸多细胞成分能够降解细胞外基质,如 VSMC、巨噬细胞和成纤维细胞。VSMC 自身能生成酶,降解细胞外基质和基膜^[13]。VSMC 的迁移与 MMPs 的研究中,对 2 种 MMPs 的研究较多,即 MMP₉ (明胶酶 B) 和 MMP₂ (明胶酶 A)。MMP₉ 的过度表达增强了 VSMC 的迁移,机制尚不明确^[14]。一种可能的解释,即 MMP₉ 裂解 III 型胶原,开启前迁移系列 (promigratory sequence),MMP₂ 已显示这一过程,后者分解层粘蛋白-5 (LN-5, 前未知 MMP₂ 底物) 的 γ -2 亚单位^[15]。体外 MMP₉ 和纤维原结合,有可能通过释放化学趋化肽直接导致 VSMC 的迁移。此外,VSMC 生成前迁移信号,引发 MMP₉ 降解 VSMC 合成的基质成分^[16]。除引起基质降解,MMP₉ 可改变细胞基质结构连

特性,增强非活化和蛋白水解依赖方式的迁移。MMP₉ 和 I 型胶原结合但未见胶原的降解^[17],并且通过受体如 CD₄₄ 与 MMP₉ 连结,可增加 VSMC 与基质结合^[18]。过度表达的 MMP₉ 前体也有可能改变血管损伤后基膜形成,通过 MMP₉ 的连结释放 α_2 (IV) 胶原^[19]。MMP₉ 还可能与整合素结合影响 VSMC 的迁移,如 Patridge 等^[20] 所述: MMP₉ 与 β 1 整合素结合, MMP₂ 与 $\alpha_v\beta_3$ 整合素结合。MMP₂ 和 MMP₉ 介导 bFGF 或 PDGF 产生 VSMC 迁移的部分刺激效应^[21]。球囊损伤的鼠颈动脉或在培养的 VSMC 中加 ET-1, PDGF-BB, 早期,反应基因 *ets-1* 被诱导激活^[22]。许多动物模型进一步提供相关信息。鼠颈动脉实验中,动脉成形后 4~5 d 诱导表达 MMP₂ (明胶酶 A), 而血管损伤后第 1 天即表达 MMP₉^[23], 调控 VSMC 从中膜向内膜迁移。在鼠和兔模型中,对纤维蛋白溶酶激活系统研究发现:球囊损伤后,uPA 即刻上调^[24,25], 导致 MMPs 级联反应的激活。猪模型也显示相同的酶激活方式,3~5d 诱导生成明胶酶 B,7d 生成明胶酶 A,在 21d 内两者持续上升。早期各种 MMPs 包括明胶酶 A、明胶酶 B、胶原酶和基质降解酶协同刺激 VSMC 的增殖,后期以明胶酶 A 为主发挥促 VSMC 迁移的作用,对 VSMC 增殖不再起作用^[26]。系统给予金属蛋白酶抑制剂,早期可减少 97% 的 VSMC 向内膜的迁移,从而证实 MMPs 调节 ECM 的降解与 VSMC 迁移密切相关^[23]。适当的细胞因子刺激后,VSMC 能够改变其周围的基质,借道向内膜迁移,这将取决于对介质结构主要是细胞外基质的去除。体外实验证实,机械性损伤的 VSMC 可诱导胶原酶和基质降解酶的基因表达。这表明损伤后的再狭窄可能存在一分子开关。然而 Clare 等^[27] 认为阻抑 VSMC 的迁移或许并不能阻断再狭窄,原因在于,细胞增殖的代偿性增加导致同样程度的管腔阻塞,晚期再狭窄病变成分中,80% 为结缔组织,而不是 VSMC。

综上所述,MMPs 的转录、翻译及激活决定了其他酶的活化,血管成形术后血管损伤引起的 MMPs 的级联反应,介导了 VSMC 的迁移所必须的基本条件——细胞外基质蛋白成分的降解,从而解除了 VSMC 的“束搏”。对级联反应中 MMPs 每一环节的调控均有可能阻抑或减缓 VSMC 的迁移,抑制或缓解血管成形术后的再狭窄。细胞增殖的代偿性增加导致同样程度的管腔阻塞,晚期再狭窄病变成分中,80% 为结缔组织,而不是 VSMC。

参 考 文 献

- 1 Feldman LJ, Mazihi M, Scheuble A, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation*, 2001, 103: 3117-3122.
- 2 Cherr GS, Motew SJ, Travis JA, et al. Metalloproteinase inhibition and the response to angioplasty and stenting in atherosclerotic primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 161-166.
- 3 Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, et al. Matrix metalloproteinase expression in the coronary circulation induced by coronary angioplasty. *Atherosclerosis*, 2002, 161: 185-192.
- 4 Xiang D, He J, Yang C, et al. Dynamic changes in type I collagen, MMP-1 and TIMP-1 after angioplasty. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115: 352-354.
- 5 Li C, Cantor WJ, Nili N, et al. Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39: 1852-1858.
- 6 Jormsjo S, Whatling C, Walter DH, et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 1834-1839.
- 7 Gurjar MV, DeLeon J, Sharma RV, et al. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-9 induction by NO in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, 2001, 91: 1380-1386.
- 8 Siervogel MJ, Psterkamp G, Velema E, et al. Oral matrix metalloproteinase inhibition and arterial remodeling after balloon dilatation: an intravascular ultrasound study in the pig. *Circulation*, 2001, 103: 302-307.
- 9 Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J*, 2001, 141: 211-217.
- 10 Lovdahl C, Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A, et al. The synthetic metalloproteinase inhibitor batimastat suppresses injury-induced phosphorylation of MAP kinase ERK1/ERK2 and phenotypic modification of arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res*, 2000, 37: 345-354.
- 11 de Smet BJ, de Kleijn D, Hanemaaijer R, et al. Metalloproteinase inhibition reduces constrictive arterial remodeling after balloon angioplasty: a study in the atherosclerotic Yucatan micropig. *Circulation*, 2000, 101: 2962-2967.
- 12 Lijnen HR, Soloway P, Collen D, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice. *Circ Res*, 1999, 85: 1186-1191.
- 13 Jormsjo S, Ye S, Moritz J, et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res*, 2000, 86: 998-1003.
- 14 David P, Richard D, Kenagy, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, 1999, 85: 1179-1185.
- 15 Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, et al. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 1997, 277: 225-228.
- 16 Rocnik E, Chan B, Pickering J. Evidence for a role of collagen synthesis in arterial smooth muscle cell migration. *J Clin Invest*, 1998, 101: 1889-1898.
- 17 Allan J, Docherty A, Barker P, et al. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*, 1995, 309: 299-306.
- 18 Yu Q, Staameenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44 mediated tumor invasion. *Genes*, 1999, 13: 35-48.
- 19 Olson MW, Toth M, Gervasi DC, et al. High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem*, 1998, 273: 10672-10681.
- 20 Patridge C, Phillips P, Niedbala M, et al. Localization and activation of type IV collagenase/gelatinase at endothelial focal contacts. *Am J Physiol*, 1997, 272: 813-822.
- 21 Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC, et al. eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 2871-2877.
- 22 Naito S, Shimizu S, Maeda S, et al. Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1998, 274(2 Pt 1): C472-480.
- 23 Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, et al. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*, 1994, 75: 539-545.
- 24 Dollery CM, Humphries SEM, McClellan A, et al. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 by use of an adenoviral vector inhibits smooth muscle cell migration and reduces neointimal hyperplasia in the rat model of vascular balloon injury. *Circulation*, 1999, 99: 3199-3205.
- 25 More R, Underwood M, Brack MJ, et al. Changes in vessel wall plasminogen activator activity and smooth muscle cell proliferation and activation after arterial injury. *Cardiovasc Res*, 1995, 29: 22-26.
- 26 Aoyagi M, Yamamoto M, Azuma H, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases in rabbit carotid arteries after balloon denudation. *Histochem Cell Biol*, 1998, 109: 97-102.
- 27 Clare M, Dollery A, Jean R, et al. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 1995, 77: 863-868.

(收稿日期: 2001-09-03)