基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0183-03

缬沙坦对肾性高血压大鼠脑缺血再灌注后脑组织 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

祝 红,詹 剑,杨 丽
(遵义医学院附属医院神经内科,遵义 56300)

【摘 要】目的:通过观察血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(Angiotensin receptor blocker,ARB)对肾性高血压大鼠脑缺血再灌注后脑组织中基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2,MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9,MMP-9)表达的影响,探讨 ARB 的脑保护机制。方法:将 Wistar 雄性大鼠 32 只随机分为高血压组和正常血压组。前组采用狭窄肾动脉方法建立肾性高血压大鼠模型,再随机分为高血压缺血再灌注组(Hypertension ischemic reperfusion,HIR)和 HIR 缬沙坦组(G),分别采用生理盐水和缬沙坦 12 mg/kg 进行灌胃治疗 4 周;正常血压组分为假手术组(N)和缺血再灌注组(Ischemic reperfusion,IR),分别行假手术和缺血再灌注处理。采用大脑中动脉线栓法造成大脑缺血再灌注模型,缺血时间为 2 h,再灌注 22 h。采用免疫组织化学技术检测脑组织 MMP-2 和 MMP-9 的表达,用图象分析仪测定灰度值。结果:与 N 组比较,IR 组 MMP-2、MMP-9 灰度值明显增高($P<0.01$);与 IR 组比较,HIR 组 MMP-2、MMP-9 灰度值增高($P<0.05$);与 HIR 组比较,G 组 MMP-2、MMP-9 灰度值减少($P<0.01$)。结论:高血压加重缺血再灌注后脑组织 MMP-2 和 MMP-9 的表达;ARB 能明显抑制脑组织 MMP-2 和 MMP-9 的表达。

【关键词】缬沙坦;肾性高血压;缺血再灌注损伤;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-9;
【中国图书分类法分类号】R363 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-21

Effects of valsartan on the expression of MMP-2 and MMP-9 in the brain tissue of renal hypertensive rats after cerebral ischemia-reperfusion

ZHU Hong, et al
(*Department of Neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To explore the mechanisms of angiotensin Ⅱ receptor antagonist(ARB) -induced brain protection by investigating the effect of ARB on the expression of metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the brain of renal hypertensive rats after cerebral ischemia-reperfusion. *Methods*: Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into a hypertensive group and a normal blood pressure group. Hypertension was produced by renal artery occlusion. The rats in the renal hypertensive group were randomly sub-divided into an ischemia-reperfusion (hypertension ischemic reperfusion HIR) group treated with normal saline and a HIR valsartan (G) group treated with valsartan (12 mg/kg per day) by gavage for 4 weeks. The normal blood pressure group was sub-divided into a sham operated group (N) and ischemia-reperfusion group (IR). Cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion with suture for 2 hours followed by 22 hours of reperfusion. The expression of MMP-2 and MMP-9 in brain tissue was detected by immunohistochemistry and their gray values were measured using image analysis. *Results*: The gray values of MMP-2 and MMP-9 in the IR group were significantly higher than those in the N group ($P<0.01$). The gray values of MMP-2 and MMP-9 in the HIR group were significantly increased when compared with that in the IR group ($P<0.05$). The gray values of MMP-2 and MMP-9 in the G group were reduced when compared with that in the HIR group ($P<0.01$). *Conclusion*: Hypertension aggravates ischemia-reperfusion-induced expression of MMP-2 and MMP-9 in brain tissue. The increased expression of MMP-2 and MMP-9 in brain tissue can be inhibited by angiotensin Ⅱ receptor antagonist.

【Key words】Valsartan; Renal hypertension; Ischemia-reperfusion injury; Matrix metalloproteinase-2; Matrix metalloproteinase-9

众所周知高血压既是缺血性脑血管病发病诱因,也是脑血管病的独立危险因素。其发病率及致残率极高,因此抗高血压药物干预治疗及脑缺血性再灌注损伤时脑保护一直是临床上研究的课题,本课题通过抗高血压药物缬沙坦对肾高血压大鼠脑缺血再灌注后脑组织中基质金属蛋白酶-2

作者介绍:祝 红(1963-),副主任医师,研究方向:脑血管病。
通讯作者:杨 丽,女,教授,E-mail:yangli1668@126.com。
基金项目:贵州省遵义市科技局资助项目(编号:遵义市科合社字(2006)11 号)。

（Matrix metallo proteinase-2，MMP-2）和基质金属蛋白酶 -9（Matrix metallo proteinase-9，MMP-9）表达的影响，探讨 MMP-2 MMP-9 的脑保护机制。为抗高血压药物在临床上治疗缺血性脑血管病提供脑保护的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康 Wistar 大鼠 32 只，6～8 周，雌雄不拘，体重 200～250 g，购自第三军医大学大坪医院动物中心，清洁级，动物中心许可证号：SCXK（渝）20020003。饲养条件：室温 22℃～28℃，相对湿度 40%～70%，每日 12 h 光照维持，昼夜循环，饲以蛋白质，含量为 21%的标准饲料块，自由饮水，分笼饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周，经筛选，32 只 Wistar 大鼠按随机分为 2 组：高血压组和正常血压组。前者再随机分为：高血压缺血再灌注组（Hypertension ischemic reperfusion，HIR）和 HIR 缬沙坦组（G），每组 8 只，分别采用生理盐水和缬沙坦 12 mg/kg 进行灌胃治疗 4 周；正常血压组不夹闭肾动脉，分为假手术组（N）6 只；正常血压缺血再灌注组（Ischemic reperfusion，IR）10 只。术中出血较多、出现呼吸困难、取脑时发现蛛网膜下腔出血及提前死亡者剔除，并补足相应例数。

1.2.2 动物筛选 在适应性喂养 1 周后，所有的大鼠每天测 1 次体重以确定用药量，用鼠尾法测 1 次鼠尾动脉血压，血压过高或过低者不用作本实验。

1.2.3 肾性高血压大鼠模型的制备 参考黄如训等[1]的方法，高血压组采用夹闭左肾动脉制成肾性高血压大鼠模型，术后 4 周，血压上升趋于稳定，收缩压在 160 mmHg 以上或较手术前上升 30 mmHg 视为已形成高血压[2]。

1.2.4 脑缺血再灌注模型的制备 参照 Nagasawa H 等[3]的方法并予改良，HIR，IR 采用大脑中动脉线栓法制作脑缺血再灌注模型，线栓插入后 2 h 缓慢拉出线栓约 1 cm，再灌注 22 h。假手术组线栓未造成同侧大脑中动脉的阻塞。

1.2.5 动物取材 在相应时间点，用 3.5%水合氯醛（300～450 mg/kg）麻醉，打开胸腔，立即经升主动脉快速灌注生理盐水，直至右心房流出液清亮为止。再以 4%多聚甲醛灌流固定；断头取脑，浸泡在 10%甲醛溶液中固定 1 周；以视交叉前后 4 mm 冠状位切块包含海马组织，石腊包埋，制成 7.5 μm 厚的相邻切片进行免疫组化染色。

1.2.6 MMP-2、MMP-9 免疫组织化学检测 检测试剂盒由福建迈新生物技术有限公司提供，免疫组织化学染色法：切片脱蜡、水化，PBS 洗 3 次各 5 min，3%H_2O_2 甲醇溶液（Quenching solution）灭活内源性酶，蒸馏水洗涤 3 次，PBS 浸泡 5 min，滴加正常山羊血清封闭液，室温 20 min，甩去多余液体，不同的切片分别适量加入即用型羊抗大鼠 MMP-2、MMP-9 抗体，4℃湿盒内过夜。PBS 冲洗，3 次各 5 min，滴加生物素化山羊抗鼠 IgG，37℃ 20 min；PBS 冲洗，3 次各 5 min，然后滴加链霉亲合素 - 生物素 - 过氧化氢酶复合物 37℃ 20 min。最后用 DAB 显色，常规脱水、透明、封片。用已知阳性切片作为阳性对照，PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.2.7 图像分析 实验结果光镜观察后采用 Leica QwinV3 细胞图像分析系统进行定量分析，每张切片于 400 倍光镜下随机选取 5 个视野，测量阳性细胞或假手术组细胞的平均灰度值。

1.3 统计学分析

所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多个样本均数的两两比较采用 q 检验，全部数据采用 SPSS12.0 软件包进行统计学处理，以 $P<0.05$ 有显著性差异，$P<0.01$ 有极显著性差异。

2 实验结果

2.1 Wistar 大鼠血压的变化（见表 1）

各组制模前血压、体重均无显著性差异（$P>0.05$）。肾性高血压大鼠模型制作 4 周后，血压升高趋于稳定，于第 5 周时测血压显示高血压制模组与正常血压组差异有显著性（$P<0.05$）。

2.2 各组大鼠脑组织 MMP-2 和 MMP-9 的表达（灰度值）（见表 2，图 1、2、3）

缺血 2 h，再灌注 22 h，MMP-2、MMP-9 灰度表达阳性细胞染成黄色，N 组偶见阳性细胞，MMP-2、MMP-9 表达存在于脑血管基底部和胶质细胞。与 N 组比较，IR 组 MMP-2、MMP-9 表达增加；与 IR 组比较，HIR 组 MMP-2、MMP-9 表达增加；与 HIR 组和 IR 组比较，G 组 MMP-2、MMP-9 表达降低。

3 讨 论

近年来，在脑缺血再灌损伤机制研究中，基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 备受关注，是研究的热点。

文献资料表明，MMP-2 和 MMP-9 表达主要见于脑组织缺血灶内和周边内皮细胞，星形胶质细胞和血管基底部，是脑血管壁受损后导致脑水肿和白细胞浸润的重要原，并参与脑缺血再灌注损伤过程。国外有实验表明[4]，早期选择性抑制 MMP-2、MMP-9 可显著减轻脑梗死，清楚表明了这种因子在促进局灶性缺血性脑损伤中的重要作用，而缬沙坦（ARB）有

表 1 各组大鼠血压的比较（$\bar{x} \pm s$）(mmHg)

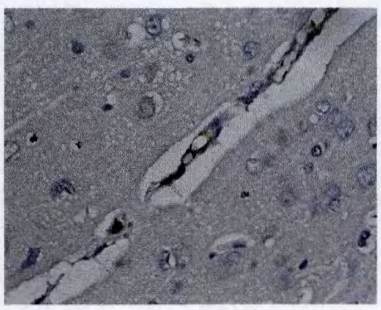
分组	n	制模前	制模 5 周后	喂药 4 周
G 组	8	107 ± 1.6	172 ± 3.4*	141 ± 2.1□△
HIR 组	8	104 ± 1.5	176 ± 4.2*	177 ± 3.8
N 组	6	106 ± 1.8	107 ± 3.8	110 ± 4.0
IR 组	10	103 ± 1.6	104 ± 1.4	104 ± 1.7

注：制模 5 周时 HIR 组、G 组和 N 组比较，*$P<0.05$；喂药 4 周时 G 组与 HIR 组比较，□$P<0.05$；喂药 4 周时与制模 5 周时比较，△$P<0.05$

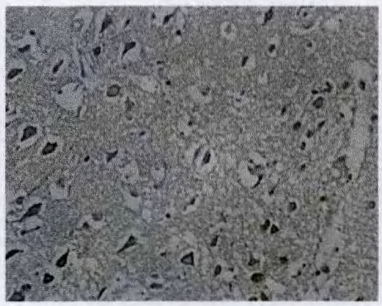
表 2 各组大鼠局灶性脑缺血大鼠 MMP-2 和 MMP-9 灰度值的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	MMP-2	MMP-9
G 组	8	163.89 ± 11.28	168.14 ± 11.75
HIR 组	8	180.64 ± 9.64	182.37 ± 10.36
N 组	6	156.41 ± 9.10	150. 77 ± 9.78
IR 组	10	174.82 ± 10.31	177.63 ± 11.56

注：MMP-2：IR 组与 N 组比较，$P<0.01$；HIR 与 IR 组比较，$P<0.05$；HIR 与 G 组比较，$P<0.05$；MMP-9: IR 组主与 N 组比较，$P<0.01$；HIR 与 IR 组比较，$P<0.05$；HIR 与 G 组比较，$P<0.05$



MMP-2



MMP-9

图 1 正常血压缺血再灌注组免疫组化染色（×400），血管周围基底部或胶质细胞黄染，胞核微量黄染，MMP-2 和 MMP-9 在胞浆中大量表达，在胞核中微量表达

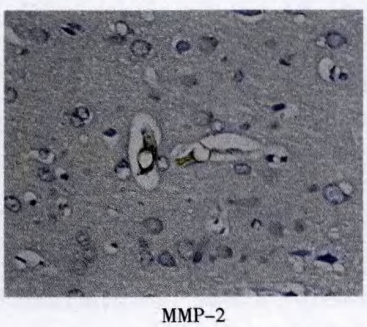


MMP-2



MMP-9

图 2 高血压血压缺血再灌注组免疫组化染色（×400），血管周围基底部或胶质细胞胞浆棕黄染，胞核少量黄染，MMP-2 和 MMP-9 的表达呈大量表达



MMP-2



MMP-9

图 3 缬沙坦组免疫组化染色（×400），血管周围基底部或胶质细胞胞浆少量黄染，胞核无黄染，MMP-2 和 MMP-9 呈少量表达

抑制 MMP-2、MMP-9 的作用，能减轻 HIR 缺血性脑损伤。

本组实验表明，缺血再灌注组与假手术组比较，MMP-2 和 MMP-9 表达明显增多，证实了 MMP-2 和 MMP-9 是参与脑缺血再灌注后神经损害的重要炎症因子；HIR 与 IR 比较 MMP-2 和 MMP-9 表达明显增多，促进了炎症反应，说明肾性高血压加重了局灶性缺血性再灌注后神经损伤；G 组与 HIR 比较 MMP-2 和 MMP-9 明显减少，说明缬沙坦（ARB）控制高血压能抑制 MMP2 和 MMP9，减轻炎症反应，从而减轻肾性高血压局灶性脑缺血再灌注后脑损伤，具有脑保护作用。

以往缺血性脑血管病研究表明肾性高血压大鼠体内肾素血管紧张素Ⅱ（AT-Ⅱ）活性增高，与高血压病人卒中后的病理生理过程有相似之处。AT-Ⅱ通过激动中枢性 AT1R 和 AT2R 两种受体在脑缺血后发挥不同的效应：目前认为

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0186-03

hBMP9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中的内源性表达

吴丽美[1],何焕玲[1],李星星,卫 佳[1],陈英华[1],马 闻[1],周 兰[2]

(1. 重庆医科大学生物医学工程系、重庆市生物医学工程学重点实验室、重庆市超声医学工程重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地;2. 重庆医科大学医学检验系, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人骨形态发生蛋白(Human bone morphogenetic protein,hBMP)9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中的内源性表达,为下一步研究 hBMP9 对骨肉瘤的体内外作用奠定实验基础。方法:利用免疫细胞化学法和 Western blot 法检测 hBMP9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中的内源性表达。结果:在 MG63、U2OS 和 143B 中,hBMP9 均呈不同程度的阳性表达,并且两种检测方法所得结果一致。结论:hBMP9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中均有内源性表达。

【关键词】骨形态发生蛋白;骨肉瘤细胞;免疫细胞化学;Western blot

【中国图书分类法分类号】R738.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-22

Expression of hBMP9 in human osteosarcoma cell lines

WU Li-mei, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of human bone morphogenetic protein 9 (hBMP9) in osteosarcoma cell lines. *Methods*: Immunocytochemistry and Western blot were applied to detect the endogenous expression of hBMP9 in the human osteosarcoma cell line MG63, U2OS and 143B. *Results*: hBMP9 were positive in three cell lines and the results of two methods were consistent. *Conclusion*: There are endogenous expressions

作者介绍:吴丽美(1983-),女,硕士,研究方向:分子肿瘤学。现工作单位:广州市花都区妇幼保健院检验科。

通讯作者:周 兰,女,教授,E-mail: zhoulan0111@gmail.com。

基金项目:超声医疗国家工程研究中心[编号:发改高技(2005)2181 号]。

AT1R 加重缺血性脑损伤。AT1R 能激活 MMP-2 和 MMP-9 的活性,激发脑缺血后脑水肿,加重脑损伤[5];AT1R 激活可产生脑血管收缩作用加重脑缺血[6];中枢性 AT2R 激活可产生脑血管舒张作用,恢复脑供血供养[6];中枢性 AT2R 激动后在缺血性脑损伤中能通过改善脑供血量及减少超氧化物的产生发挥脑保护作用[7]。ATⅡRA 分别通过减少血管紧张素Ⅱ生成和阻断血管紧张素Ⅱ与 AT1R 结合产生的生物学效应减轻缺血再灌注损伤。ATⅡRA 通过下调中枢性 AT1R 和上调中枢性 AT2R 表达,对脑缺血后脑损伤产生良性作用[8]。缬沙坦是非肽类血管紧张素Ⅱ受体(AT1 亚型)拮抗剂,对 AT1 受体有高度选择性,能抑制血管收缩,减少醛固酮和肾上腺素分泌,降低血压。

本组实验选用缬沙坦作为治疗药物,通过治疗组与高血压组比较,降压效果明显,说明肾性高血压大鼠对该药具有良好的反应性,同时有研究表明肾性高血压大鼠体内肾素血管紧张素系统活性增高,与高血压病人形成高血压的病理生理过程有相似之处,适合用于与高血压有关的研究。

本组实验表明,HIR 与 IR 比较,MMP-2 和 MMP-9 表达明显增多,说明 MMP-2 和 MMP-9 表达增多不但参与了缺血性脑损伤过程,而且加重肾性高血压大鼠缺血再灌注后的炎症反应,是缺血性脑损伤不可忽略的机制之一,高血压能够促进这种炎症反应。而缬沙坦能降低血压,明显抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性,对肾性高血压大鼠脑缺血再灌注产生脑保护。

参 考 文 献

[1] 黄如训, 苏镇培.肾性高血压大鼠脑血管病变的初步观察[J],中国神经精神疾病杂志,1990,16(6):136-140.

[2] 卢昌均.肾性高血压大鼠血浆内皮素,一氧化氮含量变化及老年降压冲剂对其影响[J],中国现代医学杂志,2001,11(9):8-9.

[3] Nagasawa H, Kogura K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20: 1037-43.

[4] Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia[J]. J Neurochem, 2006, 96: 314-323.

[5] Mikami C. Effect of nicardipine and magnesiumon cerebral infarction-brain surface perfusion technique[J]. Cerebrovasc Dis, 2001, 11 (1): 44-50.

[6] Ravati A, Junker V, Kouklei M, et al. Enalapril and moexipril protect from free radical-induced neuronal damage in vitro and reduce ischemic brain injury in mice and rats[J].Pharmacol, 1999, 373(1): 21-33.

[7] Lou M. Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(5): 536-47.

[8] Hanon O. Prevention of dementia and cerebroprotection with antihypertensive drugs[J]. Curr Hypertens Rep, 2004, 6(3): 201-207.

(责任编辑:关蕴良)