

## · 基础研究 ·

# 基质金属蛋白酶 9 在大鼠单纯收缩期高血压模型发生中的作用

雷梦觉<sup>1\*</sup>, 朱光照<sup>2</sup>, 陈慰云<sup>3</sup>, 艾文伟<sup>1</sup>, 邬 甦<sup>1</sup>, 吴克琴<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>江西省人民医院干部心内二科 江西省心血管病研究所 江西省老年医学研究所, 南昌 330006; <sup>2</sup>江西省新余市人民医院心内科, 新余 330046; <sup>3</sup>南昌大学医学院基础部, 南昌 330008)

**【摘要】** 目的 研究基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 在单纯收缩期高血压形成中的作用。方法 选用 8 周龄 Wistar 雄性大鼠 20 只作为研究对象, 随机分成两组, 模型组 ( $n=10$ ) 和对照组 ( $n=10$ )。应用华法林和维生素 K<sub>1</sub> 诱导动脉中层钙化, 8 周后右侧颈动脉插管进行有创血压和心室内压力的检测。以及取材主动脉, Von Kossa 染色分析动脉钙化程度; 采用原子吸收光谱法测定血管组织中钙含量。采用弹性纤维染色法观察主动脉组织中弹性纤维形状; 应用免疫组织化学和 Western blot 检测主动脉组织中 MMP-9 的表达水平。结果 模型组大鼠血压与对照组相比明显增高[收缩压: ( $151 \pm 9$ ) vs ( $113 \pm 7$ ) mmHg,  $P < 0.01$ , 舒张压: ( $122 \pm 10$ ) vs ( $98 \pm 8$ ) mmHg,  $P < 0.05$ ]; 而各组间平均左室内压无明显变化。模型组大鼠血压变化的同时伴有动脉形态结构的改变, 主动脉和颈动脉中层钙化明显, 模型组主动脉钙含量明显高于对照组[( $17.9 \pm 1.8$ ) vs ( $5.8 \pm 0.6$ ) mg/g,  $P < 0.01$ ]。弹力纤维断裂变直, 失去波浪形状。Western 免疫印迹法分析模型组 MMP-9 蛋白表达较对照组明显升高。结论 利用华法林和维生素 K<sub>1</sub> 诱导的单纯收缩期高血压大鼠是可重复性好, 便捷, 以及与人体衰老相似较为理想的模型。MMP-9 酶表达明显增多可促使大动脉中层弹力蛋白降解和钙在弹力纤维薄层的沉积, 从而在单纯收缩期高血压形成中发挥着一定作用。

**【关键词】** 大鼠; 单纯收缩期高血压; 动脉钙化; 基质金属蛋白酶 9

**【中图分类号】** R541.3

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2012.00015

## Matrix metalloproteinase-9 in rat model of isolated systolic hypertension

LEI Mengjue<sup>1\*</sup>, ZHU Guangzhao<sup>2</sup>, CHEN Weiyun<sup>3</sup>, AI Wenwei<sup>1</sup>, WU Su<sup>1</sup>, WU Keqin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Geriatric Cardiology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, Jiangxi Provincial Xinyu Municipal People's Hospital, Xinyu 330046, China; <sup>3</sup>Department of Basic Medicine, Medical College, Nanchang University, Nanchang 330008, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in the formation of isolated systolic hypertension so as to provide a new model of isolated systolic hypertension. **Methods** Twenty 8-week old male Wistar rats were randomly divided into the model group ( $n=10$ ) and control group( $n=10$ ). To induce large artery calcification, rats were treated with warfarin and vitamin K<sub>1</sub>. Eight weeks later, blood pressure and left ventricular pressure were measured by right carotid arterial cannulation. The segments from each aorta were processed for histological analysis by Von Kossa method. Aortic calcium contents were calculated in each group with atom-spectrum. Elastic fiber structure in aorta was analyzed by elastic fiber staining. MMP-9 expression was determined by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with control group, blood pressures were significantly higher in model group[systolic blood pressure: ( $151 \pm 9$ ) vs ( $113 \pm 7$ )mmHg,  $P < 0.01$ ; diastolic blood pressure: ( $122 \pm 10$ ) vs ( $98 \pm 8$ )mmHg,  $P < 0.05$ ]. The mean left ventricular pressure was not significantly different between the two groups. In model group, the blood pressure fluctuation was associated with morphological change of the aorta, such as extensive arterial medial elastocalcinosis. Compared with control group, calcium content in aorta was significantly higher in model group [( $17.9 \pm 1.8$ ) vs ( $5.8 \pm 0.6$ )mg/g,  $P < 0.01$ ]; the elastic lamellae was flatten and lost natural waviness. Western blot analysis showed that MMP-9 protein expression level was significantly higher in model group than in control group. **Conclusion** Chronic treatment with warfarin and vitamin K<sub>1</sub> produce a satisfactory model of isolated systolic hypertension which is identical to the disorder in humans. The elevated expression of MMP-9 enhances the elastin degeneration and calcification of the aortic elastic fibers and plays a role in the formation of isolated systolic hypertension.

**【Key words】** rats; vascular calcification; matrix metalloproteinase 9

*This work was supported by the Foundation for Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Health Bureau (20074002).*

收稿日期: 2011-04-20; 修回日期: 2011-10-12

基金项目: 江西省卫生厅重大攻关课题(20074002)

通讯作者: 雷梦觉, Tel: 0791-86896319, E-mail: leimengjue@medmail.com.cn

单纯收缩期高血压 (isolated systolic hypertension, ISH) 是老年人高血压的主要类型, 具有很高心脑血管病并发症风险, 随着年龄的增加发病率日趋增高<sup>[1]</sup>。2003 年美国预防、检测、评估与治疗高血压全国联合委员会第七次报告 (JNC7) 明确提出“50 岁以上成年人, 收缩压 > 140mmHg 是比舒张压更为重要的心血管病危险因素”。

ISH 动脉壁结构的异常包括动脉钙化, 弹力纤维断裂、减少, 以及胶原的增多、沉积<sup>[2]</sup>。钙化在动脉壁可沉积于不同的层面, 所形成的机制也不完全相同, 内膜钙化发生在动脉粥样硬化斑块病变区, 中层钙化出现在弹性纤维薄层<sup>[2]</sup>。Blumenthal 就曾记载在 582 例尸检主动脉标本中, 20~30 岁年龄组只有 4% 的患者有明显钙化, 而 50 岁以后中层钙化比例高达 98%<sup>[2]</sup>。Elliott 等也从 58 例尸检胸主动脉标本发现钙含量的变化在平均生命周期中增长约 30~40 倍, 并主要集中在动脉弹力纤维中层<sup>[3]</sup>。临床上很早就发现动脉中层钙化 (medial elastocalcinosis, MEC) 随着年龄增长而越来越明显, 在一些疾病过程中如高血压、糖尿病和终末期肾疾病, MEC 形成更为突出<sup>[4]</sup>。Gillesen 等<sup>[5]</sup>应用血管内超声发现 ISH 患者年龄和动脉钙化程度呈正相关。Guerin 等<sup>[6]</sup>也通过动脉超声学检查和高分辨摄片综合评分, 发现血管钙化程度与收缩压及脉压增高密切相关。London 等<sup>[7]</sup>进一步发现在高分辨摄片下内膜钙化呈现不规则斑片状分布, 中层钙化呈现出均一的双轨样线性分布; 其收缩压和脉搏波传导速度与无钙化患者相比均明显增高, 而舒张压相对较低。因此, 钙在弹力纤维薄层的沉积最终结果是促进 ISH 形成, 动脉中层钙化可能是引起 ISH 的主要原因之一, 但由于缺乏合适的 ISH 动脉中层钙化动物模型, 基础研究相对薄弱。

2003 年 Essalihi 等<sup>[8]</sup>应用华法林和维生素 K (WVK) 慢性施药模拟出一个 ISH 动物模型。WVK 模型主要的病理过程缘于大动脉弹力纤维薄层钙化、断裂和胶原增多, 代表了老年人 ISH 的一些特征。在 Essalihi 的研究中探讨了血管中层钙化与单纯收缩压变化的关系, 但对于 ISH 大鼠动脉钙化为什么会局限在血管中层却没有进一步的阐明。在腹主动脉损伤的大鼠中, 损伤处钙化明显并伴明胶酶大量生成<sup>[9]</sup>。因此本课题研究: 我们拟在成功建立 WVK 模型的基础上, 研究明胶酶在 MEC 可能的形成机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验采用健康 Wistar 雄性大鼠 20 只, 体质量

175~200 g 或年龄 6~7 周, 均由中国医学科学院动物中心提供。华法林钠购自芬兰奥立安药厂, 维生素 K 购自芜湖制药公司。钙盐染色试剂盒和弹力纤维染色试剂盒购自福建迈新公司, 弹力纤维 EVG 染色试剂盒购自广东贝索公司, 总蛋白提取试剂盒购自普利莱基因技术有限公司, 免疫组织化学染色试剂盒以及免疫印迹染色试剂盒购自北京中杉公司。

### 1.2 分组

动物购回适应性喂养 1 周, 饲以随意鼠类颗粒饮食, 随后随机分成两组, 对照组 ( $n=10$ ) 和 WVK 制模组 ( $n=10$ ), 每 3 天记录体质量, 并分别于 8 周后进行有创血液动力学测定、组织形态学检测和生化分析。WVK 制模组给予华法林 [ $15\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ] 于自由饮水中, 维生素  $\text{K}_1$  [ $15\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ] 背部皮下注射。维生素  $\text{K}_1$  比华法林提前 1 周用药, 华法林的用量根据饮水量于第 2 天相对调节。其余大鼠则同时给予等量温开水灌胃, 一直到实验结束。

### 1.3 有创血压及心功能的检测

大鼠统一深度麻醉后右侧颈动脉插管, 接通多道生理记录系统, 稳定 5 min 测定实验动物的动脉和心室内波形及压力值, 记录收缩压、舒张压、脉压、心率和心室内压力。分析颈动脉血压和心室内压力关系, 以明确颈动脉血压变化的同时心功能有无变化。

### 1.4 原子吸收法测定动脉组织中钙的含量

将主动脉组织 (约 10mg) 于 80℃ 彻底烤干, 加入 2 mol/L 浓硝酸消化并烤干后, 用去离子水 (含 27 nmol/L 氯化钾溶液和 27  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氯化镧溶液) 复融, 取 1.5 ml 样品, 加入 1% 氯化锶溶液 150  $\mu\text{l}$ 。用原子吸收分光光度计在 422.7 nm 波长下测定各管的吸光度值, 从标准曲线上查出钙含量, 并换算成  $\mu\text{mol}/\text{g}$  干重组织。

### 1.5 Van kossa 染色检测血管钙沉积

- 1.5.1 固定 4% 甲醛溶液固定或其他固定液均可。
- 1.5.2 试剂配制 2% 硝酸银水溶液即硝酸银 2g, 蒸馏水 100 ml。
- 1.5.3 操作步骤 (1) 石蜡切片按常规脱腊、水洗, 蒸馏水洗涤 3 次。(2) 浸入 2% 硝酸银水溶液, 置于强日光下或紫外线光下处理 10~60 min。(3) 蒸馏水洗涤 3 次, 大约 3~5 min。(4) 5% 硫代硫酸钠水溶液 2 min。(5) 蒸馏水洗涤。(6) 0.5% 伊红或丽春红-苦味酸-维多利亚蓝染色法对比染色。(7) 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。结果: 钙盐染色呈黑色, 其他组织染色呈对比染色的颜色。

## 1.6 弹力纤维染色法和弹力纤维 EVG 染色法

1.6.1 弹力纤维染色法试剂配制 试剂: 高锰酸钾(试剂 A); 草酸(试剂 B); 醛品红染液(试剂 C); 橙黄 G 染液(试剂 D)。操作步骤: (1) 甲醛溶液固定石蜡切片常规脱腊止水; (2) 滴加 1 滴高锰酸钾(试剂 A) 孵育 5min, 稍水洗; (3) 滴加 1 滴草酸(试剂 B) 处理 15s; (4) 流水稍冲, 甩干, 70% 乙醇稍洗, 甩干; (5) 滴加 1 滴醛品红染液(试剂 C) 染色 10min, 70%乙醇浸洗 2 次(每次 30s, 至切片不再脱色为止) 稍水洗; (6) 滴加 1 滴橙黄 G 染液(试剂 D) 染色 1s, 稍水洗; (7) 95%乙醇、无水乙醇、透明、封固。结果: 弹力纤维呈深紫色, 底色为不同程度的黄色。

1.6.2 弹力纤维 EVG 染色法试剂配制 试剂: 0.25%高锰酸钾溶液; 0.5%草酸溶液; Elastin Stain Van Gieson。操作步骤: (1) 组织切片常规脱腊止水; (2) 高锰酸钾氧化 5min, 蒸馏水洗; (3) 草酸漂白 5min, 蒸馏水洗; (4) 95%乙醇稍洗, 入弹力纤维染色液(Elastin Stain) 中 8~24h; (5) 95%乙醇或 1%盐酸风化(必要时镜下观察); (6) 充分自来水洗, 蒸馏水洗; (7) 用 VG 液对比染色 1min, 95%乙醇急速分化数秒, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。结果: 弹力纤维呈蓝黑色, 胶原纤维呈红色, 肌纤维、红细胞呈黄色。

## 1.7 免疫组织化学染色检测 MMP-9

1.7.1 试剂配制 试剂: 3% $H_2O_2$  去离子水; 试剂 A: 封闭用正常兔血清工作液; 试剂 B: 生物素标记兔抗山羊 IgG 二抗工作液; 试剂 C: 辣根酶标记链霉素卵白素工作液。

1.7.2 操作步骤 (1) 石蜡切片常规脱腊止水。(2) 3% $H_2O_2$  去离子水孵育 5~10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性。(3) 抗原热修复。(4) 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。(5) 滴加试剂 A 室温孵育 10~15min, 倾去, 勿洗。(6) 滴加适当 1:100 稀释的一抗, 37 孵育 2~3h。(7) PBS 冲洗, 3min×3 次。(8) 滴加试剂 B, 室温孵育 10~15min。(9) PBS 冲洗, 3min×3 次。(10) 滴加试剂 C, 室温孵育 10~15min。(11) PBS 冲洗, 3min×3 次。(12) DAB 显色。(13) 自来水充分冲洗。(14) 复染, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。

## 1.8 Western 免疫印迹法测定 MMP-9

1.8.1 试剂准备 30% 储备胶溶液 100 ml, 1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.0) 100ml, 1mol/L Tris-HCl (pH6.8) 100ml, 10%SDS 100ml, 10×电泳缓冲液 100ml, 10%过硫酸铵(AP) 10ml, 2×SDS 电泳上样

缓冲液, 考马斯亮兰 225ml, 脱色液, 匀浆缓冲液, 转膜缓冲液 1000ml, 0.01 mol/L PBS(pH7.4)1000ml, 膜染色液 118ml, 包被液。显色液, 10%分离胶, 10%积层胶。

1.8.2 操作步骤 (1) 将大鼠动脉组织与匀浆缓冲液低温条件下 1:5 混合后手动匀浆, 提取动脉组织总蛋白后检测蛋白浓度并定量。(2) 样品处理: 将 40 $\mu$ g 样品加入等量的 2×SDS 上样缓冲液, 100 加热 3~5 min, 离心 12000×g, 1min, 取上清作 SDS-PAGE 分析, 同时将预染 Marker 作平行处理。(3) 上样: 取 10 $\mu$ l 样品加入样品池中, 并加入 20 $\mu$ l 低分子量蛋白标准品作对照。(4) 电泳: 在电泳槽中加入 1×电泳缓冲液, 连接电源, 负极在上, 正极在下, 电泳时, 胶电压 180V, 电泳至溴酚兰行至电泳槽下端停止。(5) 电泳结束后将胶条割至合适大小, 用转膜缓冲液平衡, 5min×3 次。(6) 膜处理: 预先裁好与胶条同样大小的滤纸和醋酸纤维膜, 浸入转膜缓冲液中 10min。(7) 转膜: 转膜装置从下至上依次按阳极碳板、24 层滤纸、醋酸纤维膜、凝胶、24 层滤纸、阴极碳板的顺序放好, 滤纸、凝胶、醋酸纤维膜精确对齐, 每一步去除气泡, 上压 500g 重物, 将碳板上多余的液体吸干。接通电源, 恒压 100V, 转移 90 min。转移结束后, 断开电源将膜取出, 割取待测膜条做免疫印迹。将有蛋白标准的条带染色, 放入膜染色液中 50s 后, 在 50%甲醇中多次脱色, 至背景清晰, 然后用双蒸水洗, 风干夹于两层滤纸中保存, 留与显色结果作对比。(8) 用 0.01mol/L PBS 洗膜, 5min×3 次。(9) 加入包被液, 平稳摇动, 室温 2h。(10) 弃包被液, 用 0.01 mol/L PBS 洗膜, 5min×3 次。(11) 加入一抗, 4 放置 12h 以上。(12) 弃一抗和 1%BSA, 用 0.01mol/L PBS 分别洗膜, 5min×4 次。(13) 加入辣根过氧化酶偶联的二抗, 平衡摇动, 室温 2h。(14) 弃二抗, 用 0.01mol/L PBS 洗膜, 5min×4 次。(15) 加入显色液, 避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。(16) 光密度扫描进行表达的定量分析。

## 1.9 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析, 计量资料结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 经方差齐性检验后, 进行成组  $t$  检验和直线相关分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组间血流动力学变化

WVK 模型组给予华法林于自由饮水中和维生素  $K_1$  皮下注射后无明显出血倾向和不良反应, 体质

量增长与空白对照组相似,无动物死亡。多道生理记录系统能准确地记录和分析实验动物的血压变化,各组实验大鼠均成功进行颈总动脉插管并取得较好的实验效果。

表1结果表明,华法林和维生素K<sub>1</sub>用药8周后收缩压水平明显高于对照组( $P < 0.01$ );舒张压水平也高于对照组;平均动脉压和脉压水平均高于对照组( $P < 0.01$ );心率与对照组比较,差异也有统计学意义( $P < 0.01$ );平均左室内压与对照组相比无明显变化。

表1 两组间血流动力学参数和相关比较

Table 1 Effect of warfarin/vitaminK<sub>1</sub> treatment on hemodynamics parameters (n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

指标	对照组	模型组
HR(次/min)	403 ± 14	445 ± 25**
SBP(mmHg)	113 ± 7	151 ± 9**
DBP(mmHg)	98 ± 8	122 ± 10*
LVP(mmHg)	61 ± 6	61 ± 6
PP(mmHg)	15 ± 3	28 ± 3**
MAP(mmHg)	106 ± 7	136 ± 12**
BM(g)	460 ± 14	456 ± 10
HM(g)	11.60 ± 0.05	11.30 ± 0.04
HM/BM	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.07

注: 1mmHg=0.133kPa。HR: 心率; SBP: 收缩压; DBP: 舒张压; LVP: 左室内压; PP: 脉压; MAP: 平均动脉压; BM: 体质量; HM: 心脏质量。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

### 2.2 两组主动脉与脏器钙含量的变化

如表2所示,华法林和维生素K<sub>1</sub>用药8周后能诱导主动脉钙含量增加。火焰原子吸收法测定动脉组织钙含量 WVK 模型组明显高于对照组( $P < 0.05$ );

心脏左心室和肾脏的钙含量与空白对照组相比没有发生明显的变化( $P > 0.05$ )。图1所示动脉中层钙化与脉压变化呈正相关( $r=0.71, P < 0.01; r^2=0.51$ )。Von Kossa 染色显示主动脉钙化严重,钙化呈现波浪状或斑片状,主要局限分布于弹力纤维中层,并与外膜相连(图2)。

### 2.3 两组间动脉结构的改变

ISH 大鼠心脏质量与对照组相比没有发生明显的增加,同时也没有增加心脏质量/体质量(表1)。弹力纤维 EVG 染色法显示,华法林和维生素K<sub>1</sub>用药8周后血管壁弹力纤维和胶原面积并没有明显改

表2 两组间主动脉与脏器钙含量的比较

Table 2 Effect of warfarin/vitaminK<sub>1</sub> treatment on aortic and organ calcium content (n=10, mg/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	主动脉	心脏	肾脏
对照组	5.8 ± 0.6	1.78 ± 0.15	0.79 ± 0.10
模型组	17.9 ± 1.8**	1.75 ± 0.14	0.81 ± 0.17

注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$

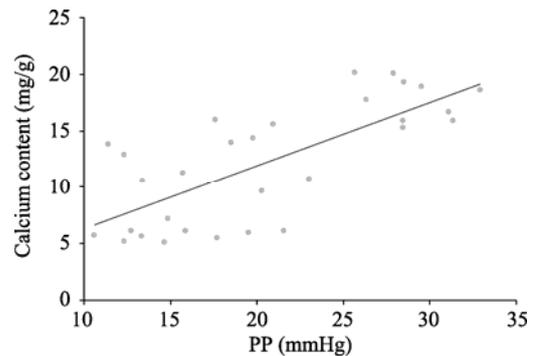


图1 脉压与主动脉钙含量直线相关分析  
Figure 1 Linear regression between aortic calcium content and pulse pressure(PP) ( $r^2=0.51$ )

图2 两组大鼠主动脉 Von Kossa 染色结果

Figure 2 Light microscopy of aortic sections (Von Kossa ×40)

A: 模型组, 颈动脉和主动脉钙化严重, 钙化呈现波浪状或斑片状, 主要局限分布于弹力纤维中层; B: 对照组, 动脉不发生钙化

变, 但胶原/弹力纤维明显增大 (C/E), 从图 3 可看出, WVK 模型组大鼠在动脉中层钙化部位弹力纤维层变直变薄或断裂, 波浪状外观消失, 减少的部分被胶原补充。因此, 随着钙沉积在弹力纤维之间, 逐渐融和于邻近组织, 弹力纤维减少, 胶原沉积增多, 动脉结构被破坏。

#### 2.4 两组间 MMP-9 活性水平改变

免疫组化显示华法林和维生素 K<sub>1</sub> 用药 8 周后

MMP-9 生成增多, 在胞核部位及少量胞质可见散在棕黄色分布, 对照组未见棕黄色颗粒 (图 4)。Western blot 结果显示两个条带 (图 5), 分别为 92ku (pro-MMP-9) 和 82ku (MMP-9 活酶)。pro-MMP-9 为 MMP-9 酶原, 不具有酶活性。对照组 MMP-9 表达很弱, MMP-9 活酶低水平表达; WVK 模型组 MMP-9 表达较对照组明显增多, 酶原和活酶从量上看基本相当 (图 5B)。

图 3 两组主动脉弹力纤维染色结果  
Figure 3 Elastin and collagen in aorta (EVG ×40)  
A: 模型组; B: 对照组

图 4 两组主动脉免疫组化检测 MMP-9 结果  
Figure 4 A matrix metalloproteinase MMP-9 in aorta evaluated by immunohistochemistry (DAB ×40)  
A: 模型组; B: 对照组

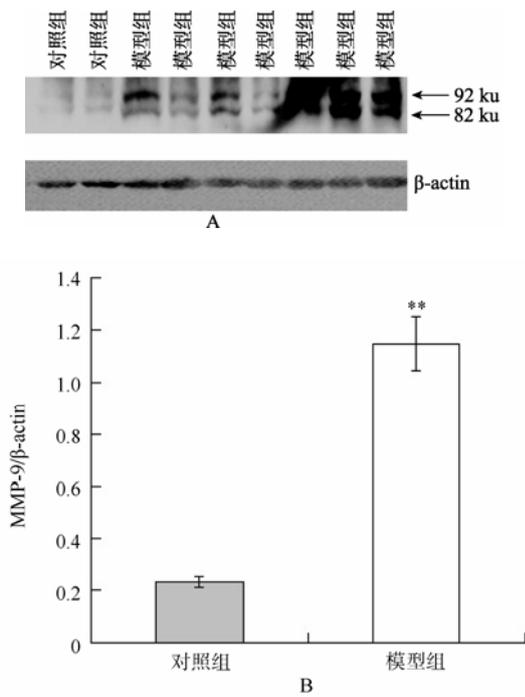


图5 主动脉MMP-9 Western blot检测  
Figure 5 MMP-9 in aorta determined by Western blot  
A: 电泳结果; B: 定量分析结果. 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

本实验大鼠经过华法林和维生素K<sub>1</sub> 8周的干预, 其血流动力学监测表现: 收缩压与舒张压升高和脉压差增大, 心率加快, 与文献报道有差异<sup>[8]</sup>, Essalihi等<sup>[8]</sup>研究中舒张压和心率与对照组无显著性差异, 而本研究舒张压升高的原因可能系心率加快的结果。从病理结果看钙化主要局限在大动脉中层即分布于弹力纤维中层, 同时弹力纤维断裂减少, 胶原沉积增多, 动脉的结构被破坏, 与Essalihi等<sup>[8]</sup>研究中结果相似。结构的改变导致了动脉硬化, 脉压差增大。实验数据表明: 动脉钙化水平与脉压成正相关, 动脉钙含量与脉压变化的相关分析提示, 50%动脉钙含量变化可解释脉压的变化, 而平均左室内压并无明显变化, 说明血压变化来自血管本身而不是心脏功能的改变。

因此, 从ISH大鼠模型的实验中我们发现钙在动脉的沉积是血压和脉压增高的重要原因, 其中也包括C/E比值变化的影响。在健康人体大动脉弹力纤维中层存在基质Gla蛋白(matrix Gla protein, MGP), 当大动脉弹力纤维中层发生钙化时, 其MGP明显减少, 但钙化与正常组织交界区可见大量MGP分解的肽, 表明MGP成熟障碍是人体大动脉中层钙化重要原因<sup>[8]</sup>。MGP是能够抑制异位钙化的钙调蛋白, 敲除MGP基因大鼠动脉中层出现广泛

钙化并于出生后不久大动脉破裂导致死亡<sup>[10]</sup>。MGP在最初合成时并不具有生物学活性, 只有羧化后才能充分发挥其作用。MGP活化过程需要维生素K协助。华法林属香豆类抗凝药, 能够干扰维生素K循环, 引起Gla生成障碍, 从而阻止了MGP功能的正常发挥。WVK模型主要的病理过程缘于大动脉弹力纤维薄层钙化、断裂和胶原增多, 代表了老年人ISH的一些特征, 并与敲除MGP鼠具有基本一致的病变特点, 说明了MGP在抑制动脉钙化中的重要作用<sup>[11]</sup>。在临床发现透析患者MGP减少可引起动脉钙化<sup>[10]</sup>。但由于WVK模型出现时间短, 在国内还未有系统报道。

MGP成熟障碍为什么引起弹力纤维降解和钙化? 对于MGP抗钙化的详细机制仍不很清楚, 一些研究认为可能与其含有的5个Gla基团有关, Gla能够结合钙并抑制钙质沉积和羟基磷灰石晶体的增长<sup>[12]</sup>。可激活成骨性基因表达, 如碱性磷酸酶和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)等表达增多<sup>[13,14]</sup>。Bendeck等<sup>[15]</sup>研究证明: 在动脉平滑肌细胞中OPN与 $\alpha_v \beta_3$ 整合素受体结合可刺激血管平滑肌细胞大量产生MMPs。国外文献报道<sup>[9]</sup>: 明胶酶参与了弹力蛋白和基质降解, 降解的弹力蛋白肽易于钙化。MMPs可能在动脉中层钙化形成过程中起非常重要的作用。MMPs是一种内源性锌-依赖性酶家族, 目前已发现有20余种之多, 根据MMPs作用底物的不同, 可分为胶原酶、明胶酶、基质降解酶和模型基质蛋白酶, 几乎能够降解血管基质的所有成分。华法林和维生素K<sub>1</sub>用药8周后MMP-9酶原和活酶都明显增多, 动脉中层钙化严重。Niederhoffer等<sup>[16]</sup>和Yang等<sup>[17]</sup>在用CaCl<sub>2</sub>渗透血管外膜造成腹主动脉中膜钙化的动物模型中, MMP-9和MMP-2基因缺失鼠却并不会产生弹力纤维的降解和钙化, 这提示明胶酶在动脉中层钙化中有显著作用。MMP-9和MMP-2现在已被普遍认为能够和弹力蛋白相结合, 这也是弹力蛋白降解的第一步。降解的弹力蛋白肽易于钙化, 并且血管平滑肌细胞钙化后也能与降解的弹力蛋白肽紧密结合促成弹力纤维薄层钙化<sup>[18]</sup>。因此弹力蛋白长久以来被认为是钙化的成核位点<sup>[9]</sup>。Basalyga等<sup>[9]</sup>发现, 在MEC形成的初始阶段, 主要表现为弹力纤维附近的微小钙沉着的形成, 弹力纤维薄层的自然波状外观并不改变。随后钙沉积在弹力纤维之间, 逐渐融和于邻近组织, 弹力纤维断裂变薄, 波状外观消失, 胶原沉积并且结构破坏。在本

实验 ISH 大鼠模型中主要表现大动脉中层弹力纤维断裂、破坏, 钙盐沉积, 胶原增生和 MMP-9 酶活性及表达增加。而 MMP-9 在大动脉组织升高则可能发挥着一定的作用。

【参考文献】

- [1] Franklin SS, Khan SA, Wong ND, *et al.* Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease[J]? *Circulation*, 1999, 100(4): 354-360.
- [2] Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, *et al.* Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension[J]. *Cardiovas Res*, 2005, 66(2): 307-317.
- [3] Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging[J]. *Calcif Tissue Int*, 1994, 54(4): 268-273.
- [4] Davies MR, Hruska KA. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease[J]. *Kidney Int*, 2001, 60(2): 472-479.
- [5] Gillissen T, Gillissen F, Sieberth H, *et al.* Age-related changes in the elastic properties of the aortic tree in normotensive properties of the aortic tree in normotensive patients: investigation by intravascular ultrasound[J]. *Eur J Med Res*, 1995, 1(3): 144-148.
- [6] Guerin AP, London GM, Marchais SJ, *et al.* Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(7): 1014-1021.
- [7] London GM, Guerin AP, Marchais SJ, *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(9): 1731-1740.
- [8] Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, *et al.* A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment[J]. *Am J Hypertens*, 2003, 16(2): 103-110.
- [9] Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, *et al.* Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases[J]. *Circulation*, 2004, 110(22): 3480-3487.
- [10] Luo G, Ducey P, McKee MD, *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein[J]. *Nature*, 1997, 386(6620): 78-81.
- [11] 朱光照, 雷梦觉. 单纯收缩期高血压大动脉中层钙化形成机制[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16(4): 300-302.
- [12] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(9): 1400-1407.
- [13] Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286(5): E686-E696.
- [14] Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification[J]. *Circ Res*, 2005, 97(2): 105-114.
- [15] Bendeck MP, Irvin C, Reidy M, *et al.* Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via  $\alpha_5\beta_3$  integrin[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(6): 1467-1472.
- [16] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, *et al.* Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine[J]. *J Vasc Res*, 1997, 34(5): 386-398.
- [17] Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization *in vitro*[J]. *Kidney Int*, 2004, 66(6): 2293-2299.
- [18] Bailey M, Xiao H, Ogle M, *et al.* Aluminum chloride pretreatment of elastin inhibits elastolysis by matrix metalloproteinases and leads to inhibition of elastin-oriented calcification[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(6): 1981-1986.

(编辑: 周宇红)