

## • 基础研究 •

# 沙尘暴 PM<sub>2.5</sub> 对小鼠心肌基质金属蛋白酶表达的影响

王立君 韩俊先 华永芬 王晨晨 李星辉 谢萍

**【摘要】** 目的:分析不同浓度沙尘暴 PM<sub>2.5</sub> 对小鼠心肌细胞中基质金属蛋白酶(MMP)及基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)表达的影响。 方法:将 36 只 ApoE 基因敲除小鼠随机分为对照组、PM<sub>2.5</sub> 低剂量暴露组、PM<sub>2.5</sub> 中剂量暴露组和 PM<sub>2.5</sub> 高剂量暴露组,每组 9 只,分别给予每组不同浓度 PM<sub>2.5</sub> 暴露处理,暴露浓度由低到高分别为 1.6 mg/L、8.0 mg/L、40.0 mg/L,共 20 周。取小鼠心肌组织,采用实时聚合酶链反应和 Western blot 检测各组 MMP-2、MMP-9 和 TIMP 的 mRNA 及蛋白表达水平。 结果:小鼠心肌细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达水平随小鼠 PM<sub>2.5</sub> 暴露浓度的增加呈现升高趋势( $P$  均 $<0.05$ ),TIMP 的表达水平随小鼠 PM<sub>2.5</sub> 暴露浓度的增加呈现下降趋势( $P$  均 $<0.05$ )。 结论:在 PM<sub>2.5</sub> 暴露环境中,小鼠心肌细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达水平增加,TIMP 的表达水平降低。

**【关键词】** 沙尘暴颗粒;动脉粥样硬化;基质金属蛋白酶;基质金属蛋白酶抑制剂

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.02.010

## Effects of dust storm PM<sub>2.5</sub> on the expression of matrix metalloproteinase in myocardium of mice

WANG Lijun<sup>1</sup>, HAN Junxian<sup>2</sup>, HUA Yongfen<sup>1</sup>, WANG Chenchen<sup>1</sup>, LI Xinghui<sup>3</sup>, XIE Ping<sup>3</sup>.

1. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. Department of Cardiology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China

**【Abstract】 Objective:** To analyze the effect of dust storm PM<sub>2.5</sub> in different concentrations on the expression levels of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in myocardium of mice. **Methods:** Thirty-six apolipoprotein E (apoE) knockout mice were randomly divided into control group, PM<sub>2.5</sub> low-dose exposure group, PM<sub>2.5</sub> medium-dose exposure group and PM<sub>2.5</sub> high-dose exposure group, with 9 mice in each group. Each group was exposed to different concentrations of PM<sub>2.5</sub>. The exposure concentrations from low to high were 1.6 mg/L, 8.0 mg/L and 40.0 mg/L. Western blot and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the protein and mRNA expression levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP. **Results:** After exposure to different concentrations of PM<sub>2.5</sub>, the expression levels of MMP-2 and MMP-9 increased in a dose-dependent manner (all  $P<0.05$ ). On the contrary, with the increase of exposure concentration, the expression level of TIMP gradually decreased (all  $P<0.05$ ). **Conclusions:** The expression levels of MMP-2 and MMP-9 in myocardium of mice increased, while the expression levels of TIMP decreased when exposing to PM<sub>2.5</sub>.

**【Key words】** Sandstorm particles; Atherosclerosis; Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitor of metalloproteinase

基金项目:国家自然科学基金(81660065)

作者单位:750004 银川,宁夏医科大学临床医学院(王立君,华永芬,王晨晨);730000 兰州大学临床医学院(韩俊先);730000 兰州,甘肃省人民医院心内科(李星辉,谢萍)

通信作者:李星辉,E-mail:xinghui415@163.com

大气颗粒污染物与心血管系统疾病的相关性近年来受到关注。PM<sub>2.5</sub>是粒径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的颗粒和液滴,是常见的大气污染物。流行病学研究发现,PM<sub>2.5</sub>水平与心血管疾病死亡有一定联系<sup>[1]</sup>。PM<sub>2.5</sub>会引起炎症反应并加速动脉粥样硬化,影响血管功能,引发心血管疾病。基质金属蛋白酶(MMP)为含锌内肽酶家族,可以调节血管细胞外基质(ECM)的降解,参与动脉硬化斑块产生和破裂<sup>[2-3]</sup>。MMP-2和MMP-9为降解弹性胶原的主要成分,与平滑肌细胞迁移和增殖密切相关,可促进动脉硬化发生发展<sup>[4]</sup>。基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)是体内MMP的天然特异性抑制剂,它可通过共价键与MMP结合,并与MMP共同维持ECM的动态平衡。ECM动态平衡的破坏可促进动脉粥样硬化斑块的形成和破裂<sup>[5-7]</sup>。本研究旨在建立沙尘暴PM<sub>2.5</sub>暴露模型,探讨PM<sub>2.5</sub>对MMP-2、MMP-9及TIMP表达水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 PM<sub>2.5</sub>收集及PM<sub>2.5</sub>溶液的配制

2018年4月沙尘暴频发,在河西走廊非工业区使用EOM1405D双通道颗粒物监测仪采集沙尘颗粒,PM<sub>2.5</sub>来自系统可更换的TEOM滤膜。将滤膜裁剪成1 cm $\times$ 3 cm小片,放入超纯水中,超声下震荡处理0.5 h,共3次。震荡液经纱布过滤,所得滤液在冷冻后进行真空干燥处理,获得PM<sub>2.5</sub>粉末,置入-20℃冰箱保存。使用无菌生理盐水配制PM<sub>2.5</sub>溶液,配制时精确称量PM<sub>2.5</sub>粉末量,超声处理15 min进行混匀。

### 1.2 沙尘暴PM<sub>2.5</sub>暴露模型的建立

将36只雄性6周龄ApoE基因敲除小鼠随机分为对照组、PM<sub>2.5</sub>低剂量暴露组、PM<sub>2.5</sub>中剂量暴露组、PM<sub>2.5</sub>高剂量暴露组,测量小鼠心率、体质量、体温等指标。10%水合氯醛麻醉小鼠,仰卧位固定,消毒处理后在颈前正中切口,切口长度约1 cm,组织分离后暴露气管,刺入针头后滴入PM<sub>2.5</sub>溶液,PM<sub>2.5</sub>低、中、高剂量暴露组的PM<sub>2.5</sub>溶液浓度分别为1.6、8.0、40.0 mg/L,滴入量为0.15 mL/100 g,对照组注入生理盐水,注入量为0.15 mL/100 g,每日滴注1次。饲养20周后脱颈椎处死小鼠,获取心脏组织,-80℃低温保存。

### 1.3 Westernblot检测MMP-2、MMP-9和TIMP的蛋白表达水平

RIPA缓冲液裂解蛋白,BCA法检测蛋白浓度。

蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,5%脱脂乳室温封闭2 h,MMP-2、MMP-9、TIMP一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育2 h,ECL染色后,于凝胶成像仪中成像。通过ImageJ软件对条带进行灰度值分析,计算蛋白相对表达水平。

### 1.4 实时聚合酶链反应(RT-PCR)检测MMP-2、MMP-9和TIMP的mRNA表达水平

Trizol法提取RNA,紫外分析仪检测RNA浓度。将RNA反转录为cDNA后,进行SYBR Green荧光定量RT-PCR。MMP-2引物序列:上游5'-CAACGGTCGGAATACAGCA-3',下游5'-TGTTAAACAAGGCTTCATGGG-3'。MMP-9引物序列:上游5'-TGGTCTTGAACAGGAGCAAA-3',下游5'-ACATTCAGTGGTCTCAGCCTTT-3'。TIMP引物序列:上游5'-CTGGCATCTGGCATCTCTT-3',下游5'-GGGAACCCATGAATTTAGCCC-3'。PCR反应条件:95℃初始变性5 min,60℃退火20 s,72℃延伸20 s,共40个循环。2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法计算目的基因的相对表达水平。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异比较采用方差分析,两两比较采用LSD检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠心肌细胞MMP-2的表达水平比较

4组MMP-2的mRNA及蛋白表达水平均有统计学差异( $P$ 均 $<0.05$ )。两组间比较,PM<sub>2.5</sub>低剂量暴露组MMP-2的mRNA及蛋白表达水平明显高于对照组,PM<sub>2.5</sub>中剂量暴露组MMP-2的mRNA及蛋白表达水平明显高于PM<sub>2.5</sub>低剂量暴露组,PM<sub>2.5</sub>高剂量暴露组MMP-2的mRNA及蛋白表达水平明显高于PM<sub>2.5</sub>中剂量暴露组( $P$ 均 $<0.05$ ),见表1。

### 2.2 各组小鼠心肌细胞MMP-9的表达水平比较

4组MMP-9的mRNA及蛋白表达水平均有统计学差异( $P$ 均 $<0.05$ )。两组间比较,PM<sub>2.5</sub>低剂量暴露组MMP-9的mRNA及蛋白表达水平明显高于对照组,PM<sub>2.5</sub>中剂量暴露组MMP-9的mRNA及蛋白表达水平明显高于PM<sub>2.5</sub>低剂量暴露组,PM<sub>2.5</sub>高剂量暴露组MMP-9的mRNA及蛋白表达水平明显高于PM<sub>2.5</sub>中剂量暴露组( $P$ 均 $<0.05$ ),

见表 2。

2.3 各组小鼠心肌细胞 TIMP 的表达水平比较

4 组 TIMP 的 mRNA 及蛋白表达水平均有统计学差异( $P$  均 $<0.05$ )。两组间比较,PM<sub>2.5</sub> 低剂量暴露组 TIMP 的 mRNA 及蛋白表达水平明显低于 PM<sub>2.5</sub> 对照组,PM<sub>2.5</sub> 中剂量暴露组 TIMP 的 mRNA 及蛋白表达水平明显低于 PM<sub>2.5</sub> 低剂量暴露组,PM<sub>2.5</sub> 高剂量暴露组 TIMP 的 mRNA 及蛋白表达水平明显低于 PM<sub>2.5</sub> 中剂量暴露组( $P$  均 $<0.05$ )。见表 3。

表 1 各组小鼠心肌细胞 MMP-2 的表达水平比较

组别	MMP-2 蛋白表达水平	MMP-2 mRNA 表达水平
对照组	1.033 ± 0.311	1.002 ± 0.077
PM <sub>2.5</sub> 低剂量暴露组	2.105 ± 0.201 <sup>(1)</sup>	1.341 ± 0.107 <sup>(1)</sup>
PM <sub>2.5</sub> 中剂量暴露组	2.655 ± 0.215 <sup>(1)(2)</sup>	1.851 ± 0.078 <sup>(1)(2)</sup>
PM <sub>2.5</sub> 高剂量暴露组	3.068 ± 0.085 <sup>(1)(2)(3)</sup>	2.125 ± 0.155 <sup>(1)(2)(3)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与 PM<sub>2.5</sub> 低剂量暴露组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$ ;与 PM<sub>2.5</sub> 中剂量暴露组比较,<sup>(3)</sup> $P<0.05$

表 2 各组小鼠心肌细胞 MMP-9 的表达水平比较

组别	MMP-9 蛋白表达水平	MMP-9 mRNA 表达水平
对照组	1.000 ± 0.340	1.001 ± 0.046
PM <sub>2.5</sub> 低剂量暴露组	1.897 ± 0.265 <sup>(1)</sup>	1.473 ± 0.133 <sup>(1)</sup>
PM <sub>2.5</sub> 中剂量暴露组	2.412 ± 0.149 <sup>(1)(2)</sup>	2.010 ± 0.160 <sup>(1)(2)</sup>
PM <sub>2.5</sub> 高剂量暴露组	2.972 ± 0.219 <sup>(1)(2)(3)</sup>	2.312 ± 0.194 <sup>(1)(2)(3)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与 PM<sub>2.5</sub> 低剂量暴露组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$ ;与 PM<sub>2.5</sub> 中剂量暴露组比较,<sup>(3)</sup> $P<0.05$

表 3 各组小鼠心肌细胞 TIMP 的表达水平比较

组别	TIMP 蛋白表达水平	TIMP mRNA 表达水平
对照组	1.090 ± 0.073	1.002 ± 0.075
PM <sub>2.5</sub> 低剂量暴露组	0.812 ± 0.190 <sup>(1)</sup>	0.855 ± 0.069 <sup>(1)</sup>
PM <sub>2.5</sub> 中剂量暴露组	0.527 ± 0.067 <sup>(1)(2)</sup>	0.727 ± 0.043 <sup>(1)(2)</sup>
PM <sub>2.5</sub> 高剂量暴露组	0.254 ± 0.048 <sup>(1)(2)(3)</sup>	0.549 ± 0.060 <sup>(1)(2)(3)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与 PM<sub>2.5</sub> 低剂量暴露组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$ ;与 PM<sub>2.5</sub> 中剂量暴露组比较,<sup>(3)</sup> $P<0.05$

3 讨论

近年来,大气颗粒物污染有所加重,威胁人类健康。统计研究发现,在沙尘暴高发时期,受沙尘暴影响区域医院心血管疾病就诊人数大幅度增加,死亡率也明显升高<sup>[8]</sup>。大气颗粒物污染的相关研究主要针对呼吸系统毒性方面,较少针对心血管系统。长期高浓度 PM<sub>2.5</sub> 暴露易引发血管内皮细胞损伤<sup>[9]</sup>,而内皮细胞损伤与动脉粥样硬化密切相关。血管内皮屏障相关的功能物质为 ECM,ECM 代谢平衡的打破会导致血管重构,显著增加动脉粥样硬化风险。MMP 可通过特殊类型的连接蛋白结合 ECM,进而降解 ECM,在动脉粥样硬化的发生发展中发挥作用<sup>[10]</sup>。TIMP 属于 MMP 的特异性抑制剂,可通过氨基端功能区的半胱氨酸残基结合活化的 MMP,形成 MMP-TIMP 复合体,从而阻断 MMP 与底物的结合<sup>[11]</sup>。MMP 与内源性抑制剂相互协同,调节细胞活化、增殖、迁移、凋亡、血管生成以及心肌 ECM 的动态平衡<sup>[12-13]</sup>。研究表明,小鼠血管内膜损伤时,MMP-2 和 MMP-9 表达水平升高<sup>[14-15]</sup>,提示 MMP 可促进内膜增厚并加速血管平滑肌细胞迁移。在 MMP-9 缺失时,小鼠内膜细胞的生成也会出现异常或延迟。

MMP 及其抑制剂 TIMP 是反映动脉粥样硬化进程的重要标志物,本研究主要分析暴露于不同浓度 PM<sub>2.5</sub> 时,MMP 及 TIMP 表达的变化情况,以阐述 ECM 失衡对动脉粥样硬化疾病发生发展的影响及机制。结果显示,暴露于 PM<sub>2.5</sub> 的小鼠心肌细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达水平高于正常小鼠,TIMP 的表达水平低于正常小鼠,且 MMP-2、MMP-9 的表达水平随小鼠 PM<sub>2.5</sub> 暴露浓度的增高

呈上升趋势, TIMP 的表达水平随小鼠  $PM_{2.5}$  暴露浓度的增高呈下降趋势。研究结果提示暴露于  $PM_{2.5}$  可以促进小鼠心肌细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达, 沙尘颗粒物浓度越高, 小鼠动脉粥样硬化程度可能越重。

动脉粥样硬化是长期复杂的病变过程, 影响因素较多。在甘肃河西走廊等沙尘暴高发地区进行冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)防治时, 可以在减少大气颗粒物控制环境污染的同时, 分析患者的 MMP-2、MMP-9 及 TIMP 表达水平, 以深入探讨与 ECM 动态平衡破坏相关的冠心病的发病机制。

### 参 考 文 献

- [1] 李成橙, 李亚伟, 路凤. 大气颗粒物  $PM_{2.5}$  和  $PM_{10}$  暴露与人群缺血性心脏病死亡关系的荟萃分析[J]. 中国心血管杂志, 2019, 24(2):1007-5410.
- [2] Yang S, Lee SP, Park JB, et al.  $PM_{2.5}$  concentration in the ambient air is a risk factor for the development of high-risk coronary plaques[J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2019, 20(12):1355-1364.
- [3] 孔凡玲, 赵琳, 崔亮亮.  $PM_{2.5}$  与心血管疾病[J]. 山东大学学报:医学版, 2018, 56(11):1671-7554.
- [4] 李科, 刘俊明. 基质金属蛋白酶-2、-9 与冠心病关系的研究进展[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2011, 19(2):108-111.
- [5] 陈玥琦, 刘毅敏, 张定林. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与心血管疾病[J]. 数理医药学杂志, 2015, 28(6):829-831.
- [6] 吴伟东, 刘丹, 侯文进, 等. 基质金属蛋白酶及其抑制剂在心血管疾病中的研究进展[J]. 分子影像学杂志, 2015, 38(4):397-399.
- [7] 赵婉晴, 高伟勤. 基质金属蛋白酶及其抑制剂在心血管疾病中的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2020, 37(1):63-65.
- [8] Li Y, Zheng C, Ma Z, et al. Acute and cumulative effects of haze fine particles on mortality and the seasonal characteristics in Beijing, China, 2005—2013: a time-stratified case-crossover study[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(13):2383.
- [9] 华畅, 黄亮然, 罗艳侠.  $PM_{2.5}$  损伤血管内皮细胞的研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2018, 19(07):1009-6639.
- [10] 童辉煜. 基质金属蛋白酶 9 在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(8):855-859.
- [11] Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis[J]. Matrix Biol, 2015, 44-46:247-254.
- [12] 郭文安, 杜心清. 基质金属蛋白酶及其抑制物表达平衡失调与心肌梗塞后心室重塑[J]. 心血管康复医学杂志, 2007, 16(3):302-305.
- [13] Radosinska J, Barancik M, Vrbjar N. Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9[J]. Panminerva Med, 2017, 59(3):241-253.
- [14] 刘音, 宁文虎, 申星花, 等. 细胞因子-基质金属蛋白酶轴促进小鼠血管内膜增生的机制研究[J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(11):961-967.
- [15] Guo L, Ning W, Tan Z, et al. Mechanism of matrix metalloproteinase axis-induced neointimal growth[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 66:116-125.

(收稿:2020-07-27 修回:2021-01-26)

(本文编辑:胡晓静)