

# 黄酒多酚对 Hcy 诱导的血管平滑肌细胞 MMP-2/9 表达与活性的影响

刘龙斌 孟立平 季政 许富康 池菊芳 郭航远

**【摘要】** 目的 探讨黄酒多酚(YWPC)对同型半胱氨酸(Hcy)诱导的大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达和活性的影响及其信号通路。方法 SD大鼠主动脉VSMCs原代细胞培养鉴定,取4~7代细胞用于实验。YWPC组VSMCs分别用1、10、100mg/L的YWPC干预,采用Western blot法检测VSMCs中MMP-2、MMP-9、AKT、pAKT的表达情况;明胶酶谱检测VSMCs中MMP-2和MMP-9的活性。用IGF-1(3ng/ml)干预VSMCs 8h激活PI3K/AKT通路后,用YWPC干预VSMCs,检测MMP-2、MMP-9的表达和活性。结果 Western blot结果显示,与Hcy组比较,YWPC组VSMCs中MMP-2/9的表达减少,pAKT表达减少(均 $P<0.01$ );明胶酶谱结果显示,与Hcy组比较,YWPC组VSMCs中MMP-2/9的活性降低。在加入IGF-1后,与对照组比较,IGF-1组VSMCs中pAKT、MMP-2/9的表达和活性增加( $P<0.01$ );与YWPC组比较,YWPC+IGF-1组VSMCs中pAKT、MMP-2/9的表达和活性增加( $P<0.01$ )。结论 YWPC通过抑制PI3K/AKT信号通路抑制Hcy诱导的VSMCs中MMP-2/9的表达和活性。

**【关键词】** 血管平滑肌细胞 黄酒多酚 PI3K/AKT 基质金属蛋白酶

Yellow wine polyphenol compounds inhibit homocysteine-induced expression of MMP-2/9 in vascular smooth muscle cells through inhibiting PI3K/AKT pathway LIU Longbin, MENG Liping, JI Zheng, et al. Department of Cardiology, Shaoxing People's Hospital, Shaoxing 312000, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of yellow wine polyphenol compounds(YWPC) on expression of MMP-2/9 in rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by homocysteine (Hcy) and its mechanism. Methods The primarily cultured VSMCs were incubated with 500 $\mu$ mol/L Hcy for 12h; then VSMCs were treated with YWPCs in concentration of 1mg/L, 10mg/L or 100mg/L, respectively. IGF-1 (3ng/ml) was used to activate PI3K/AKT pathway. The expressions of MMP-2, MMP-9, AKT, pAKT in VSMCs were detected with Western blotting; the activity of MMP-2/9 was examined with gelatin zymography. Results Western blotting showed that compared with Hcy group, the expressions of MMP-2/9, pAKT in YWPC groups were decreased. Gelatin zymography demonstrated that compared with Hcy group, the activity of MMP-2/9 was decreased in the YWPC groups. Compared with control group, the expressions of pAKT, MMP-2/9 was increased in the IGF-1 group ( $P<0.01$ ). Compared with YWPC groups the expression of pAKT, MMP-2/9 was increased in YWPC+IGF-1 group ( $P<0.01$ ). Conclusion YWPC inhibits Hcy-induced expression of MMP-2/9 in VSMCs by suppressing PI3K/AKT signaling pathway.

**【Key words】** Vascular smooth muscle cells Yellow wine polyphenol PI3K/AKT Matrix Metalloproteinase

黄酒采用红粬、糯米和水为原料,人工自然发酵酿制而成。现已证实黄酒中含有丰富的多酚、氨基酸、多肽、维生素、低聚糖、有机酸以及矿物质等有益于心脑血管健康的成分<sup>[1]</sup>。我们过去的研究已经证实黄酒不但可以抑制大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和迁移,而且

可以抑制LDLR<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化形成<sup>[2-4]</sup>。大量的研究证实规律适量的饮用红酒具有心血管保护作用<sup>[5-6]</sup>,并且已经阐明红酒的心血管保护作用主要缘于其中的多酚类成分<sup>[7]</sup>。我们推测,黄酒主要也是通过多酚类物质发挥其心脑血管保护作用。基质金属蛋白酶(MMPs)和组织型基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)共同维持着细胞外基质的平衡,在动脉粥样硬化斑块的发生、发展中具有重要的作用<sup>[8-10]</sup>。本实验旨在研究黄酒多酚(YWPC)抑制同型半胱氨酸(Hcy)诱导的VSMCs中MMP-2/9的表

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY14H020002)

作者单位:312000 绍兴市人民医院心内科

通信作者:郭航远, E-mail:ghangyuan@hotmail.com

达以及是否通过抑制 PI3K/AKT 途径来实现这一作用, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** SPF 级 SD 大鼠购自浙江省医学科学院实验动物中心, 雌雄不限, 60d 左右, 体重 150~180g; 遗传背景为 C57BL/6J 10 代后雄性 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠 (购于南京医科大学实验动物中心)。YWPC 由上海中药制药技术有限公司分离提取, 纯度约 60%; 乙醚、甲醇、75% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、甲醇购自杭州化学试剂有限公司; DMEM 高糖培养基、PBS、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、青霉素和链霉素购自杭州吉诺公司; Hcy、雷帕霉素购自美国 Sigma 公司; DMSO 购自美国 MP Biomedicals 公司, FBS 购自美国 GIBCO 公司, MTT 购自美国 Emresco 公司; DAPI 购自瑞士 Rcohe 公司; 兔抗 akt、p-akt 多克隆抗体、兔抗大鼠 SM-actin 单克隆抗体、兔抗 MMP-2/9、明胶购自美国 ABCOM 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或者抗鼠二抗、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 Jackson 公司; 蛋白免疫印迹以及明胶酶谱相关试剂购自江苏碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 VSMCs 原代细胞培养及鉴定** 采用组织贴块法培育大鼠胸主动脉 VSMCs, 采用形态学观察和细胞免疫荧光检测平滑肌肌动蛋白(SM-actin)鉴定 VSMCs, 通过 SM-actin 与 DAPI 核染之间的关系鉴定 VSMCs 的纯度<sup>[1]</sup>。取第 4~7 代细胞用于后续实验, 细胞加干预因素时用含 2.5% FBS 的培养基。实验分为 2 部分, 第 1 部分用以验证 YWPC 对 VSMCs 中 MMP-2/9 表达和活性的影响, 将细胞分为对照组、Hcy 组、YWPC1mg/L 组、YWPC 10mg/L 组及 YWPC 100mg/L 组, 除对照组外所有细胞先用 500  $\mu$ mol/L Hcy 干预 12h, 再用不同浓度的 YWPC 干预 VSMCs。第 2 部分实验用以验证 YWPC 抑制 VSMCs 中 MMP-2/9 表达和活性的机制, VSMCs 分为对照组、IGF-1(3ng/ml)组、YWPC(10mg/L)组和 YWPC+IGF-1 组。

**1.2.2 Western blot 测定 VSMCs 中 MMP-2/9、AKT/pAKT 的表达** 在用不同浓度的 YWPC 干预 48h 之后, 裂解 VSMCs 提取蛋白, BCA 法蛋白定量, SDS-PAGE 胶每孔加入 20 $\mu$ l 样品, 80V 30min 进行蛋白浓聚, 120V 2h 进行凝胶电泳, 并用孔径 0.45 $\mu$ m 硝酸纤维素膜 250mA 90min 进行转膜。转膜完毕经常温下 TBST 洗膜 $\times$ 3、脱脂奶粉封闭 2h 后, 以 1:1 000 浓度加入兔抗鼠 MMP-2 一抗 (或抗 MMP-9、AKT/pAKT 一抗), 4 $^{\circ}$ C 孵育

过夜, 常温下 TBST 洗膜 $\times$ 3, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育后 ECL 化学发光法检测目标蛋白。暗室柯达胶片显影, Quantity one 软件定量分析。

**1.2.3 明胶酶谱法测定 VSMCs 中 MMP-2/9 的活性** 取 20 $\mu$ l 各组蛋白样品在含 1 $\mu$ g/ml 明胶的 10% 聚丙烯酰胺凝胶片上电泳, 待溴酚蓝到达凝胶底部, 在室温下用含 2.5% Triton X-100 洗涤缓冲液平摇洗涤 30min $\times$ 2; 37 $^{\circ}$ C 摇床平摇孵育缓冲液 (pH8.8, 50mmol/L Tris-HCl, 5mmol/L CaCl<sub>2</sub>)。然后凝胶染色 2 h (含 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 溶液, 10% 冰乙酸, 45% 甲醇溶液, 45% 去离子水), 脱色 (10% 冰乙酸, 45% 甲醇溶液, 去离子水 45%) 直到蓝色背景下出现白色条带, 即为 MMP-2/9, 用双蒸水冲洗终止脱色, 用凝胶成像系统进行拍照, 用 Quantity One 软件定量分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 法。

## 2 结果

**2.1 VSMCs 原代培养及鉴定结果** 用组织贴块法培养大鼠胸主动脉 VSMCs, 8d 左右组织块周围有细胞爬出, 2 周后细胞融合可以传代。传代后细胞呈典型“峰谷”状排列生长, 用 SM-actin 细胞免疫荧光鉴定 VSMCs, DAPI 核染之后确定细胞纯度在 99% 以上, 见图 1。

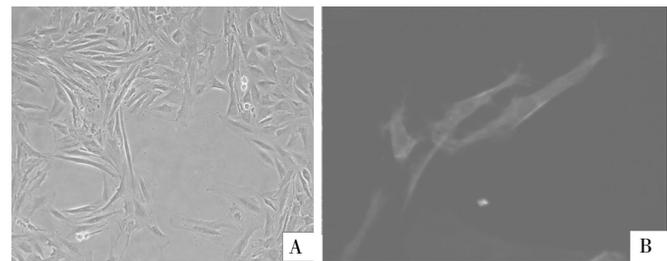


图 1 大鼠主动脉 VSMCs 形态学及细胞免疫荧光鉴定结果(A: VSMCs 呈典型的“峰谷”样生长,  $\times$  100; B: 免疫荧光结果显示 SM-actin 在细胞中高表达,  $\times$  400)。

**2.2 两种方法检测各组 VSMCs 中 MMP-2/9 及 AKT、pAKT 的表达** 见图 2, 3, 表 1、2。

由图 2、3, 表 1、2 可见, 与对照组比较, Hcy 组 VSMCs 中 MMP-2/9 的表达均升高 (均  $P < 0.05$ )。Western blot 法中, 与 Hcy 组比较, YWPC 不同浓度组 VSMCs 中 MMP-2 的表达均减少 ( $P < 0.05$  或 0.01), YWPC 10mg/L 组、YWPC 100mg/L 组 VSMCs 中 MMP-9 的表达均减少 ( $P < 0.05$  或 0.01); 明胶酶谱法中, 与 Hcy

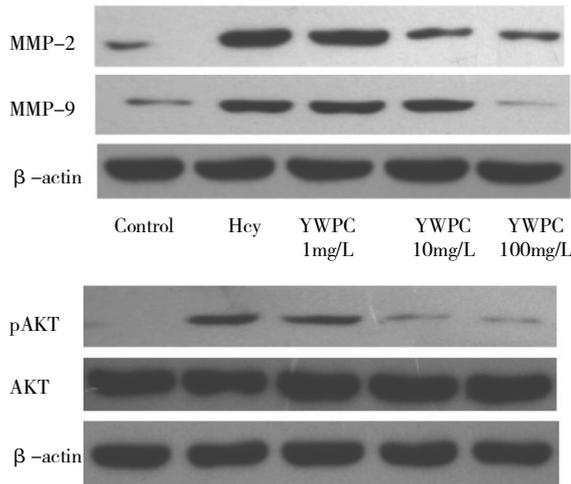


图 2 Western blot 法检测各组 VSMCs 中 MMP-2/9 及 AKT 和 pAKT 的表达电泳图

表 1 Western blot 法检测各组 VSMCs 中 MMP-2/9 及 AKT 和 pAKT 的表达

指标	Hey 组	YWPC 1mg/L 组	YWPC 10mg/L 组	YWPC 100mg/L 组	对照组
MMP-2	0.84 ± 0.07 <sup>Δ</sup>	0.73 ± 0.09*	0.55 ± 0.03**	0.34 ± 0.06**	0.23 ± 0.04
MMP-9	0.55 ± 0.05 <sup>Δ</sup>	0.50 ± 0.06	0.43 ± 0.04*	0.13 ± 0.02**	0.26 ± 0.07
pAKT	0.45 ± 0.08 <sup>Δ</sup>	0.38 ± 0.06*	0.17 ± 0.02**	0.08 ± 0.01**	0.04 ± 0.01
AKT	1.46 ± 0.42	1.53 ± 0.64	1.39 ± 0.51	1.46 ± 0.38	1.49 ± 0.44

注:与对照组相比, <sup>Δ</sup>P<0.05;与 Hey 组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01

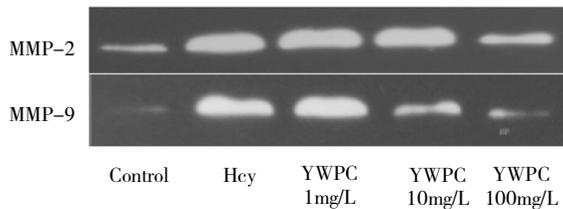


图 3 明胶酶谱法检测各组 MMP-2/9 的表达电泳图

表 2 明胶酶谱法检测各组 VSMCs 中 MMP-2/9 的表达

指标	Hey 组	YWPC 1 mg/L 组	YWPC 10 mg/L 组	YWPC 100 mg/L 组	对照组
MMP-2	5.45 ± 1.27 <sup>Δ</sup>	4.73 ± 1.09	3.55 ± 1.43*	1.34 ± 0.26**	1
MMP-9	6.53 ± 0.05 <sup>Δ</sup>	5.07 ± 0.96*	2.23 ± 0.44**	1.13 ± 0.62**	1

注:与对照组相比, <sup>Δ</sup>P<0.05;与 Hey 组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01

组比较, YWPC 不同浓度组 VSMCs 中 MMP-9 的表达均减少 ( $P<0.05$  或  $0.01$ ), YWPC 10mg/L 组、YWPC 100mg/L 组 VSMCs 中 MMP-2 的表达均减少 ( $P<0.05$  或  $0.01$ )。各组 VSMCs 中 AKT 的表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 与对照组比较, Hey 组 VSMCs 中 pAKT

的表达升高 ( $P<0.05$ ); 与 Hey 比较, YWPC 各浓度组 VSMCs 中 pAKT 的表达均减少 ( $P<0.05$  或  $0.01$ )。

2.3 两种方法检测 IGF-1 预处理后各组 VSMCs 中 MMP-2/9 及 AKT、pAKT 的表达 见图 4、5, 表 3、4。

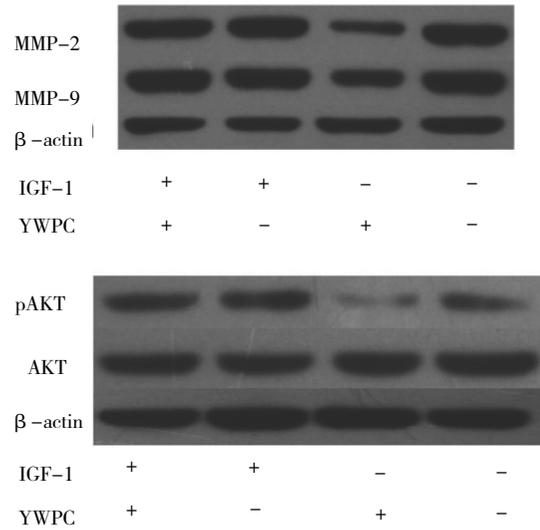


图 4 Western blot 检测各组 VSMCs 中 MMP-2/9 及 AKT、pAKT 的表达电泳图

表 3 Western blot 检测各组 VSMCs 中 MMP-2/9 及 AKT、pAKT 的表达

指标	YWPC+IGF-1 组	IGF-1 组	YWPC 组	对照组
MMP-2	1.23 ± 0.44 <sup>Δ</sup>	1.34 ± 0.37	0.63 ± 0.09*	1.05 ± 0.23
MMP-9	1.76 ± 0.87 <sup>Δ</sup>	1.55 ± 0.65	0.61 ± 0.06*	1.43 ± 0.24
pAKT	2.49 ± 0.37 <sup>Δ</sup>	2.46 ± 0.27	0.20 ± 0.02*	0.45 ± 0.07
AKT	1.11 ± 0.17	1.20 ± 0.15	1.09 ± 0.23	1.21 ± 0.13

注:与对照组相比, \*P<0.05;与 YWPC 组相比, <sup>Δ</sup>P<0.05

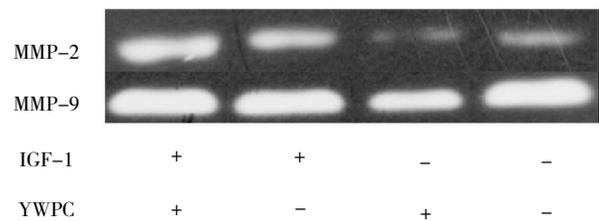


图 5 明胶酶谱法检测各组 MMP-2/9 及 AKT、pAKT 的表达电泳图

表 4 明胶酶谱法检测各组 MMP-2/9 的表达

指标	YWPC+IGF-1 组	IGF-1 组	YWPC 组	对照组
MMP-2	4.69 ± 0.47 <sup>Δ</sup>	2.46 ± 0.87	0.41 ± 0.02*	1
MMP-9	1.32 ± 0.47 <sup>Δ</sup>	1.25 ± 0.45	0.52 ± 0.03*	1

注:与对照组相比, \*P<0.05;与 YWPC 组相比, <sup>Δ</sup>P<0.05

由图 4、5, 表 3、4 可见, 与对照组比较, YWPC 组

VSMCs 中 MMP-2/9 的表达均降低 (均  $P < 0.05$ ); 与 YWPC 组比较, YWPC+IGF-1 组中 MMP-2/9 的表达均增加 (均  $P < 0.05$ )。各组 VSMCs 中 AKT 的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与对照组相比, YWPC 组 VSMCs 中 pAKT 的表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与 YWPC 组比较, YWPC+IGF-1 组 VSMCs 中 pAKT 的表达增加 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

红酒多酚由白藜芦醇、儿茶素、花青素等组成, 通过调节血脂、改善血管功能、抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移等作用而发挥心血管保护作用。我们过去的实验已经证明 YWPC 具有抑制 LDL 受体基因敲除小鼠动脉粥样硬化的作用, 然而其抑制小鼠动脉粥样硬化的具体机制尚未阐明<sup>[12]</sup>。在本实验中, 我们证实了 YWPC 可以通过抑制 PIK/AKT 通路来抑制 Hcy 诱导的 VSMCs 中 MMP-2/9 的表达和活性, 这可能是其具有抗动脉粥样硬化作用的机制之一。

MMPs 的过度分泌和激活可以导致粥样斑块的纤维帽降解破裂、增加局部的炎症反应<sup>[13]</sup>。最近的研究还发现 MMPs 除了降解细胞外基质的作用之外, 还可以通过降解细胞间黏附分子、诱导细胞分泌生长因子、激活其他的 MMPs 等路径调节细胞内信号, 从而在血管重构的发生、发展中发挥重要的作用<sup>[13]</sup>。自从 Oak 等<sup>[14]</sup>发现红酒多酚主要通过降低 MMP-2 的表达和活性从而发挥抑制 VSMCs 增殖和迁移的作用, 后续研究基本证实抑制 MMP-2/9 的表达和活性是红酒多酚抗动脉粥样硬化的主要机制之一<sup>[15]</sup>。我们的实验结果证明 YWPC 不仅可以抑制 VSMCs 中 MMP-2/9 的表达, 还可以抑制 MMP-2/9 的活性。这可能是黄酒发挥抗动脉粥样硬化作用的机制之一。

PIK/AKT 通路在 VSMCs 增殖和迁移以及表型转化中发挥着重要作用<sup>[16]</sup>, pAKT 可以进一步激活 mTOR/P70S6K 通路, 增加 p-P70S6K1 的表达, 最终增加 VSMCs 的增殖和迁移<sup>[17]</sup>。本研究表明 YWPC 可以抑制 PI3K/AKT 通路, 减少 pAKT 的表达。以上结果提示 YWPC 可能是经 PI3K/AKT 通路抑制 VSMCs 中 MMP-2 的表达和活性。IGF-1 是 PI3K 的激动剂, 可以激活 PI3K, 增加 pAKT 的表达, 在本实验中, 在加入 IGF-1 (3ng/ml) 之后, YWPC 抑制 VSMCs 中 MMP-2/9 的表达和活性的作用被逆转。以上结果证实 YWPC 是经 PI3K/AKT 通路抑制 VSMCs 中 MMP-2/9 的表达和活性。

本实验也存在一定的局限性, 黄酒中的多酚类物质是由不同的单体成分组成的混合物, 究竟是其中的何种

确切成分在发挥作用我们尚不清楚。

### 4 参考文献

- [1] 谢广发, 徐榕, 樊阿萍. 古越龙山黄酒中有益心血管健康的成分分析[J]. 酿酒, 2011, 38(5): 64-66.
- [2] Guo H Y, Wang P, You B Q, et al. Chinese yellow wine inhibits production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. *Clinical Nutrition*, 2007, 26(3): 348-354.
- [3] Guo H Y, Liu L B, Shi Y F, et al. Chinese Yellow Wine and Red Wine Inhibit Matrix Metalloproteinase-2 and Improve Atherosclerotic Plaque in LDL Receptor Knockout Mice [J]. *Cardiovascular Therapeutics*, 2010, 28(3): 161-168.
- [4] 孟立平, 周昌钻, 郭艳, 等. 黄酒中抑制同型半胱氨酸诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖和迁移成分的探讨 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2015, 31(5): 437-442.
- [5] Li H, Forstermann U. Red wine and cardiovascular health [J]. *Circ Res*, 2012, 111(8): 959-961.
- [6] Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martinez P, et al. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer [J]. *Nutrients*, 2012, 4(7): 759-781.
- [7] Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, et al. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(3): 201-211.
- [8] Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family' [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(3): 445-453.
- [9] DeCoux A, Lindsey M L, Villarreal F, et al. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 77: 64-72.
- [10] 郑如莲, 陈徐亮, 李继武, 等. 基质金属蛋白酶-2、9 在舒张性心力衰竭大鼠中的表达 [J]. *心电与循环*, 2013, 32(6): 470-472, 477.
- [11] 孟立平, 蒋承建, 赵飞, 等. 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞原代培养方法的改进 [J]. *温州医科大学学报*, 2015, 45(8): 593-596.
- [12] Zhai X, Chi J, Tang W, et al. Yellow wine polyphenolic compounds inhibit matrix metalloproteinase-2, -9 expression and improve atherosclerotic plaque in LDL-receptor-knockout mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 125(2): 132-141.
- [13] Spinale F G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1285-1342.
- [14] Oak M H, El Bedoui J, Anglard P, et al. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2004, 110(13): 1861-1867.
- [15] Ruel G, Pomerleau S, Couture P, et al. Plasma matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels are reduced following low-calorie cranberry juice supplementation in men [J]. *J Am Coll Nutr*, 2009, 28(6): 694-701.

(下转第 935 页)