

基质金属蛋白酶-8 在急性 Stanford A 型主动脉夹层中的表达及临床意义

王 恋, 严中亚, 章庆春, 宋晓蓉

摘要 目的 探讨基质金属蛋白酶-8 (MMP-8) 在急性 Stanford A 型主动脉夹层中的表达及临床意义。方法 30 例急性 Stanford A 型主动脉夹层患者为实验组, 30 例同期接受单纯主动脉瓣置换的患者为对照组, 采用 ELISA 法、Western blot 法、免疫组化法等检测 MMP-8 在实验组和对照组血浆及升主动脉壁中的表达。结果 主动脉夹层患者血浆中 MMP-8 的表达 $[(106.51 \pm 28.27) \text{ ng/ml}]$ 明显高于对照组 $[(25.65 \pm 12.95) \text{ ng/ml}]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组升主动脉中层病变显著, 炎性细胞浸润夹层边缘。弹性纤维与胶原纤维层变性、排列紊乱、破碎、崩解。其主动脉壁中层 MMP-8 大量表达。而对照组主动脉壁结构完整, 弹性

纤维与胶原纤维排列紧密有序, 无中层退行性变。MMP-8 在其主动脉中层仅少量表达或不表达。结论 MMP-8 在病变的升主动脉中层内高表达, 在正常的弹性纤维层低表达, 提示其在主动脉疾病的发生发展中可能发挥作用。

关键词 急性 Stanford A 主动脉夹层; 基质金属蛋白酶; 细胞外基质

中图分类号 R 543.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0330-04

2013-11-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81071376)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院心脏外科, 合肥 230001

作者简介: 王 恋, 男, 硕士研究生;

严中亚, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yan20047

@163.com

急性 Stanford A 型主动脉夹层是一种病情凶险、病死率极高的心血管疾病。随着生活水平提升及检测手段的增加, 其发病率呈上升趋势, 但其发病机制目前仍不清楚^[1]。基质金属酶是一个 Zn^{2+} 依赖性, 参与细胞外基质降解代谢的酶家族。其在血管重塑过程中发挥重要作用^[2]。研究^[3]表明, 在主动脉夹层中金属蛋白酶家族许多成员表达升高, 而关于基质金属蛋白酶 8 (matrix metalloproteinase-8,

Study on the relationship between T cell subsets and count and virus load in patients with hepatitis C

Yin Xianyao^{1,2}, Zheng Meijuan¹, Xu Yuanhong¹

(¹Dept of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Laboratory, Tradition Hospital of Feixi, Feixi 231200)

Abstract Objective To investigate the correlation between T cell subsets and HCV viral load in HCV infection.

Methods Flow cytometry was used to detect peripheral T cell subsets count of 69 patients with hepatitis C and 20 cases of normal health human, and fluorescent quantitative PCR was used to detect viral load in patients with hepatitis C.

Results ① The study showed that the percentage ratio of CD4^+ T cells (42.87 ± 6.11) and of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ (1.34 ± 0.25) in patients was significantly lower than those of normal health group, it was 49.55 ± 6.68 and 1.82 ± 0.11 ($P < 0.01$); but the percentage ratio of CD8^+ T cells (32.78 ± 5.48) was higher than that of the normal health human (27.35 ± 4.32) ($P < 0.01$). There were no significant differences between the two groups in the percentage ratio of CD3^+ T cells. ② The viral load gradually increased as the percentage ratio of CD8^+ T cells increased, while the percentage ratio of CD4^+ T cells and the percentage ratio of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ were decreased gradually. **Conclusion** It may be one of the important reasons as the chronic infection of hepatitis C virus by change of T cell subsets, and may be an important cause leading to the decrease of T lymphocyte response ability as the expression level of HCV RNA increases.

Key words HCV RNA; T cell subsets; correlation

MMP-8) 在主动脉夹层中的相关表达报道较少。该研究分析 MMP-8 在实验组和对照组血浆及主动脉壁中层的表达, 初步探讨其在急性 Stanford A 型主动脉夹层发生发展中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集 2011 年 8 月~2013 年 6 月安徽医科大学附属省立医院心脏外科 Stanford A 型主动脉夹层患者 30 例为实验组, 其中男 18 例, 女 12 例, 年龄 34~67 (49.7 ± 11.2) 岁。选取同期住院单纯主动脉瓣病变患者 30 例为对照组, 男 16 例, 女 14 例, 年龄 35~74 (49 ± 11.1) 岁。患者经主动脉 CTA、超声心动、冠脉造影检查确诊。入选患者标准: 排除胸部损伤感染、炎症、主动脉瓣二叶畸形、马凡综合征、冠心病、升主动脉内径 > 40 mm。以上研究对象在年龄、性别方面等均匹配, 具有可比性。术前所有患者均签署知情同意书, 并报我院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 ELISA 试剂盒购自武汉优尔生科技股份有限公司; 兔抗人 MMP-8 多克隆抗体购自武汉博士德生物有限公司; 通用型二抗 PV6000 工作液购自北京中杉金桥生物技术有限公司; β -actin 抗体和兔抗人 MMP-8 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ELISA 法检测血浆中 MMP-8 的含量 采集患者入院首次空腹静脉血, 所有血液样本均 4 ℃、4 000 r/min 离心 20 min 分离血清, -80 ℃ 冰箱中保存备用。所有样本按 ELISA 试剂盒说明书提供的方法检测血清中 MMP-8 的含量。

1.2.2 HE 染色 Stanford A 型主动脉夹层手术标本取材方法: 经右腋动脉联合右心房上下腔静脉建立体外循环。术中可见升主动脉内膜撕裂, 升主动脉壁二层分离。根据主动脉瓣瓣叶受累及程度行单纯升主动脉置换(或 Bentall 术或 David 术)联合单分支覆膜支架置入术。取材位置距主动脉瓣瓣环约 3 cm 处, 取材包括与主动脉壁撕裂部位相延续的 2 cm 正常血管壁组织。对照组取材相应部位的血管壁全层组织。手术标本取下后立即放入 4% 甲醛溶液中固定 24 h 后, 冲洗、脱水、浸蜡、包埋, 以 4 μ m 厚度连续切片备用。HE 染色: 观察对照组主动脉壁的组织学形态与实验组主动脉壁的病理改变。

1.2.3 Western blot 法检测主动脉夹层主动脉及正

常主动脉血管组织中 MMP-8 表达水平 取约 5 g 冻存升主动脉组织冰上裂解后煮沸 5 min, 于 4 ℃、10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液备用。上样, 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 电转至 PVDF 膜上, 室温下 TBS 洗膜 5 min, 膜置于含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 封闭 1 h, TBS-T 洗 3 次 (5 min/次)。加入一抗 (1:500) 4 ℃ 过夜, 取出膜在 TBS-T 洗 3 次 (5 min/次), 加入辣根过氧化物酶耦联的二抗 (1:1 000), 室温下振荡孵育 1 h, 室温下 TBS-T 洗 3 次 (5 min/次), TBS 洗 1 次, 增强的化学发光剂显色曝光。

1.2.4 免疫组化法检测 MMP-8 的表达 采用免疫组化 SP 法, 严格按照试剂盒说明书操作。烘片后脱蜡, PBS 洗涤, 灭除内源性过氧化物酶, 滴加正常山羊血清封闭液。滴加一抗 4 ℃ 过夜, PBS 洗涤后加入二抗, 滴加辣根酶标记链霉卵白素, DAB 显色。苏木精复染, 盐酸酒精分化, 脱水、透明、封片、烤片、显微镜拍照。使用 Nikon80i 荧光显微镜及图像采集软件进行图像采集分析。400 倍显微视野下分别选取 10 个视野, 计算阳性细胞占整个视野细胞百分比。评估标准^[4]: 0~5% 为阴性 (-), 6%~25% 为弱阳性 (+), 26%~50% 为阳性 (++) , > 50% 为强阳性 (++)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件包进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 定量变量组间差异采用 *t* 检验, 定性变量组间差异采用秩和检验。

2 结果

2.1 血浆中 MMP-8 的含量 实验组患者血浆中 MMP-8 的表达 [(106.51 ± 28.27) ng/ml] 明显高于对照组 [(25.65 ± 12.95) ng/ml], 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

2.2 升主动脉组织 HE 染色 实验组主动脉壁弹性纤维与胶原纤维层变性, 排列杂乱无序, 并伴有不同程度的炎性细胞浸润。而对照组主动脉壁结构完整, 弹性纤维与胶原纤维排列紧密有序。见图 1。

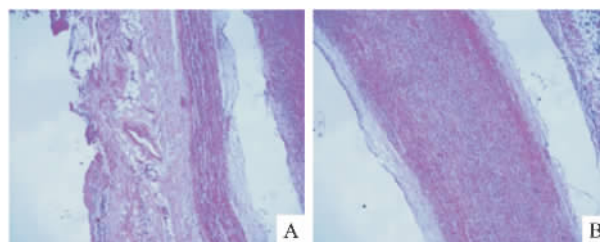


图 1 升主动脉壁 HE 染色 ×40
A: 实验组; B: 对照组

2.3 MMP-8 的蛋白表达

2.3.1 Western blot 法检测 Western blot 结果显示, MMP-8 在实验组及对照组患者血管组织中均有表达, 但实验组患者升主动脉中 MMP-8 (灰度相对值 1.04 ± 0.11) 水平明显高于对照组 (灰度相对值 0.60 ± 0.16), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



图 2 MMP-8 在升主动脉中的表达

2.3.2 免疫组织化学检测 免疫组化阳性表达为细胞质棕黄色颗粒样或片状阴影。30 例主动脉夹层中有 24 例 MMP-8 阳性表达, 阳性率 80%, 其中强阳性表达 4 例。病变在弹力纤维与胶原纤维变性、排列紊乱的升主动脉壁中层, MMP-8 高表达, 可见大量棕黄色物质呈片状分布, 而在残余的正常组织内 MMP-8 低表达。对照组 30 例中 4 例阳性表达, 阳性率 13.3%, 且阳性表达为弱阳性。升主动脉壁中层弹力纤维与胶原纤维排列整齐有序, MMP-8 低表达或不表达, 仅散在染色点。见图 3。两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 MMP-8 在实验组与对照组主动脉壁中的表达 (例 $n = 30$)

组别	-	+	++	+++
实验	6	5	15	4
对照	26	4	0	0

3 讨论

目前研究^[5]显示血流动力学因素与主动脉壁薄弱因素共同作用导致夹层的发生。升主动脉壁中层在维持主动脉力学结构中最重要, 其完整性依赖于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成与降解的动态平衡。升主动脉中层 ECM 主要由胶原纤维与弹性纤维组成, 弹性纤维维持血管的扩张与收缩, 胶原纤维韧性大, 抗拉力强, 起维持血管张力作用^[6]。研究^[7]显示弹性蛋白酶的减少是引起主动脉瘤形成的重要原因, 而胶原蛋白酶的减少引起主动脉的破裂。报道^[8]表明主动脉壁病理改变与主动脉机械性能改变的主因是 ECM 的改变, 而 MMPs

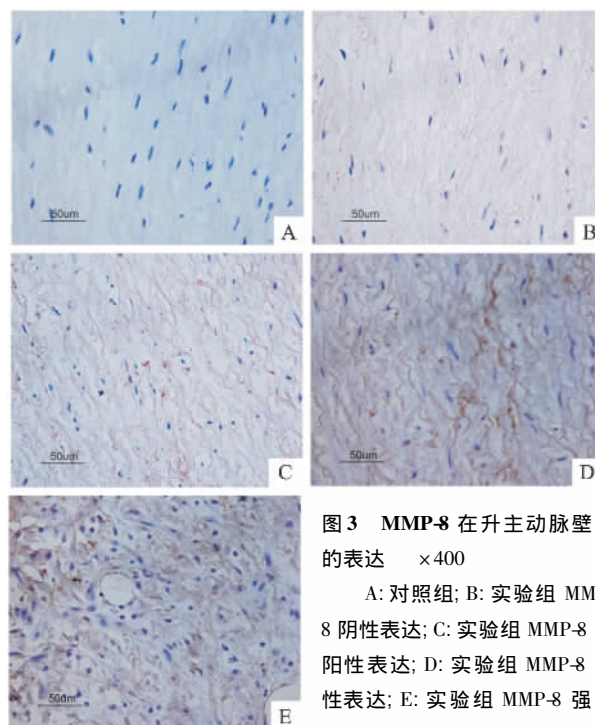


图 3 MMP-8 在升主动脉壁中的表达 $\times 400$

A: 对照组; B: 实验组 MMP-8 阴性表达; C: 实验组 MMP-8 弱阳性表达; D: 实验组 MMP-8 阳性表达; E: 实验组 MMP-8 强阳性表达

是降解 ECM 最主要的酶, MMP-8 属胶原酶, 能裂解 I、II、III、IV、V 型间质胶原蛋白的天然螺旋结构, 参与并促进主动脉中层胶原蛋白与弹性蛋白的降解。本研究表明, 主动脉夹层患者升主动脉壁中层弹性纤维与胶原纤维稀疏断裂, 杂乱无序, 病变区 MMP-8 高表达。推测其可能在升主动脉夹层的发生发展中发挥作用。

本研究中急性 Stanford A 型主动脉夹层患者组织切片中 24 例为阳性表达, 阳性率 80%, 其中阳性 15 例, 强阳性 4 例。而 30 例对照组组织切片中 4 例为阳性表达, 阳性率 13.3%, 且表达为弱阳性。实验组免疫组化显示, MMP-8 的强阳性表达主要集中于主动脉壁中膜, 夹层撕裂边缘。主动脉壁中 I 型胶原蛋白的含量远高于其他型, 且 MMP-8 降解 I 型胶原蛋白的能力是最强的^[9]。各种病理因素作用下 MMP-8 表达增加, 活性增强, 导致主动脉壁中层胶原纤维与弹性纤维降解增加, 使主动脉壁纤维网络受损, 抗张力下降, 主动脉发生中层退行性变或囊性坏死, 升主动脉血管结构完整性受损, 在高压、高速的血流冲击下, 夹层发生易感性增加。根据本实验结果, MMP-8 在病变升主动脉中膜层表达明显升高, 且其高表达处胶原纤维与弹性纤维破坏严重, 杂乱无序。由此推测 MMP-8 的含量升高与升主动脉结构的破坏存在相关性。Rahkonen et al^[10]认为摘除小鼠调控 I 型胶原纤维生长的 Colla1 基因, 小鼠主动脉夹层的发生率上升。也与本研究观点一

致。MMP-8 不仅作用于 ECM 还可以通过活化 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 等其他蛋白加速 ECM 的降解^[11]。而对照组中 MMP-8 不表达或仅有少量表达,则反映生理状态下, MMP/TIMPs(金属蛋白酶组织抑制因子)存在平衡。本实验显示实验组患者血清中 MMP-8 水平明显高于对照组。MMP-8 在主动脉患者血浆中表达增高,其也可以作为急性 Stanford A 型主动脉夹层诊断的一个指标因子。

综上所述,主动脉夹层患者血清及主动脉壁中 MMP-8 的表达升高,此种改变直接影响 ECM 的结构改变。因此推测 MMP-8 可作为急性 Stanford A 型主动脉夹层诊断的一个指标,而 MMP-8 特异性抑制剂可能有助于修复或保持升主动脉中层结构完整性,对于升主动脉增宽的患者,可预防主动脉病或夹层的形成,具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] Nienaber C A, Eagle K A. Aortic dissection: new frontiers in diagnosis and management: part I: from etiology to diagnostic strategies [J]. *Circulation*, 2003, 108 (5): 628-35.
- [2] Zhang X, Shen Y H, Lemaire S A. Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved? [J]. *Vascular*, 2009, 17 (3): 147-57.
- [3] 魏涛,洪涛,胡朝晖等.急性升主动脉夹层基质金属蛋白酶-9 的表达和血管平滑肌细胞病变[J].中华胸心血管外科杂志 2010 26(3): 176-9.
- [4] Liu L K, Jiang X Y, Zhou X X, et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome [J]. *Mod Pathol*, 2010, 23 (2): 213-24.
- [5] Khalil A, Helmy T, Porembka D T, et al. Aortic pathology: aortic trauma, debris, dissection, and aneurysm [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35 (8 Suppl): S392-400.
- [6] 林吉进,罗建方,黄文晖等.基质金属蛋白酶 13 在主动脉夹层患者表达水平研究[J].岭南心血管病杂志,2010,16 (3): 193-4 203.
- [7] 杨守国,王春生,陈昊等.胸主动脉夹层动脉壁 TGF- β 1 表达与细胞外基质分布[J].中华胸心血管外科杂志,2010,26 (1): 33-6.
- [8] Barbetseas J, Alexopoulos N, Brili S, et al. Atherosclerosis of the aorta in patients with acute thoracic aortic dissection [J]. *Circ J*, 2008, 72 (11): 1773-6.
- [9] 许飙,李云,吴海卫等.基质金属蛋白酶-1、-8、-13 在急性胸主动脉夹层中的表达及意义[J].医学研究生学报,2010,23 (8): 848-51.
- [10] Rahkonen O, Su M, Hakovirta H, et al. Mice with a deletion in the first intron of the Colla1 gene develop age-dependent aortic dissection and rupture [J]. *Circ Res*, 2004, 94 (1): 83-90.
- [11] Sukhova G K, Schonbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques [J]. *Circulation*, 1999, 99 (19): 2503-9.

The expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-8 in the acute Stanford A aortic dissection

Wang Luan, Yan Zhongya, Zhang Qingchun, et al

(Dept of Cardiac Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in the acute Stanford A aortic dissection. **Methods** Blood samples were collected from 30 acute Stanford A aortic dissection patients and 30 aortic valve replacement patients. ELISA was used to measure the contents of MMP-8 in the plasma. The tissue expressions of MMP-8 in the surgically obtained samples were detected by Western blot and immunohistochemistry. **Results** The acute Stanford A aortic dissection patients showed a significantly higher level of MMP-8 in the plasma [(106.51 \pm 28.27) ng/ml] than the aortic valve replacement patients [(25.65 \pm 12.95) ng/ml] ($P < 0.05$). Significant lesions of aortic intima, inflammatory cell infiltration laminated edge, elastic fibers and collagen fiber fragmentation, disintegration were observed in the experimental group, but not in the control group. The MMP-8 was significant expression in the experimental group than in the control group. **Conclusion** The MMP-8 is highly expressed in the middle of aortic lesions but lowly expressed in the normal fibrous tissue layer suggesting that it may play a role in development of the aortic disease.

Key words acute Stanford A aortic dissection; matrix metalloproteinase; extracellular matrix