

基质金属蛋白酶 9 及转化生长因子 $\beta 1$ 在人动脉粥样硬化斑块的表达及其与斑块稳定性的关系

周志斌¹, 郭毅², 王思鸿¹, 李小好¹, 尤玉兰¹, 顾惠娟¹, 丁秋华³

(常州市第三人民医院 1. 神经内科, 3. 急诊科, 江苏省常州市 213001;

2. 暨南大学附属第二医院神经内科, 广东省广州市 510632)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化斑块; 基质金属蛋白酶 9; 转化生长因子 $\beta 1$; 转化生长因子 β 受体 iv; 动脉粥样硬化; 斑块稳定性

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶 9、转化生长因子 $\beta 1$ 及转化生长因子 β 受体 iv 在人动脉粥样硬化粥样斑块中的表达水平, 以及三者与粥样斑块稳定性的关系。方法 收集人冠状动脉斑块组织共 41 例, 常规石蜡包埋切片, 作 HE 染色, 根据镜下结构将斑块组织分为稳定组和不稳定组, 采用免疫组织化学方法分析基质金属蛋白酶 9、转化生长因子 $\beta 1$ 及转化生长因子 β 受体 iv 在人粥样斑块中的表达, 并通过计算机图像分析系统进行定量。结果 不稳定性斑块内, 基质金属蛋白酶 9 的表达要明显强于稳定性斑块(面积密度为 0.21 ± 0.04 比 0.16 ± 0.02 , 吸光度为 3.48 ± 0.65 比 2.84 ± 0.27 , $P < 0.01$); 转化生长因子 $\beta 1$ 则明显弱于稳定性斑块(面积密度为 0.17 ± 0.02 比 0.23 ± 0.05 , $P < 0.01$; 吸光度为 3.16 ± 0.65 比 3.60 ± 0.55 , $P < 0.05$); 两者在斑块内的表达呈明显的负相关(面积密度为 $r = -0.332$, $P = 0.034$; 吸光度为 $r = -0.373$, $P = 0.016$), 转化生长因子 β 受体 iv 的表达无明显差异。结论 基质金属蛋白酶 9、转化生长因子 $\beta 1$ 同斑块的稳定性密切相关, 基质金属蛋白酶 9 是形成不稳定性斑块的重要促进因素, 转化生长因子 $\beta 1$ 则是重要的斑块稳定因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Expression of Matrix Metalloproteinases-9, Transforming Growth Factor-Beta1 and Transforming Growth Factor-Beta Receptor iv in Human Atherosclerotic Plaque and their Relationship with Plaque Stability

ZHOU Zhi-Bin, GUO Yi, WANG Si-Hong, LI Xiao-Hao, YOU Yu-Lan, GU Hui-Juan, and DING Qiu-Hua

(Department of Neurology, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerotic Plaque; Matrix Metalloproteinases-9; Transforming Growth Factor-Beta1; Transforming Growth Factor-Beta Receptor iv; Atherosclerosis; Plaque Stability

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta 1$) and TGF-beta receptor iv (T β R-iv) in human atherosclerotic plaque and the relationship between them and plaque stability. **Methods** 41 specimen of human coronary artery atherosclerotic plaque were obtained from patients undergoing cardiovascular surgery, and then were routine paraffin embedded, sectioned at 4 μ m, and stained with hematoxylin and eosin. They were divided into stable (with no or only little lipid core) and unstable plaques (with lipid core size > 40%) according to the structure under the optical microscope, the qualitative and quantitative analyses of MMP-9, TGF- $\beta 1$ and T β R-iv were performed by using immunohistochemical staining technique and auto picture analysis system. **Results** The immunopositive stain of MMP-9, TGF- $\beta 1$ and T β R-iv were all located in the vascular smooth muscle cells, endothelial cells, fibroblast, and particularly in the foam cells and macrophage in the atherosclerotic plaque tissue. The protein expression of MMP-9 in the unstable plaques was much stronger than that in the stable ones (average area density: 0.21 ± 0.04 vs 0.16 ± 0.02 , average absorbent values: 3.48 ± 0.65 vs 2.84 ± 0.27 , $P < 0.01$), and was also stronger on the shoulder of the plaque, in the foam cells and macrophage around the lipid core, while the protein expression of TGF- $\beta 1$ was much stronger in the stable plaques (average area density: 0.23 ± 0.05 vs 0.17 ± 0.02 , $P < 0.01$; average absorbent values: 3.60 ± 0.55 vs 3.16 ± 0.65 , $P < 0.05$). There were no significant difference for immunopositive stain of T β R-iv between the stable and unstable plaques. Correlation analysis showed that there was a negative correlation between the expression of MMP-9 and TGF- $\beta 1$ with both average area density and average absorbent values ($r = -0.332$, $P = 0.034$ for average area density; $r = -0.373$, $P = 0.016$ for average absorbent values). **Conclusions**

[收稿日期] 2005-03-14

[修回日期] 2006-02-18

[作者简介] 周志斌, 硕士, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化及脑血管病相关基础和临床研究, E-mail 为 zhouzhibin74@163.com。郭毅, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病临床研究。王思鸿, 副主任医师, 从事脑血管病的临床研究。

There was a close relationship between MMP-9, TGF- β 1 and plaque stability. Enhanced production MMP-9 may participate in the formation of unstable plaque, while TGF- β 1 may be an important stabilizing factor to prevent the transition into an unstable plaque phenotype.

不稳定的动脉粥样硬化斑块及在其基础上形成血栓是引起缺血性心、脑卒中的重要发病机制。近来研究表明,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)是造成斑块不稳定的重要因素之一,它们可以通过降解纤维帽内胶原纤维及结缔组织致使纤维帽变薄,从而易于形成不稳定斑块^[1]。MMP-9, 又称明胶酶 B, 是 MMP 家族中的一个重要成员,其作用底物包括明胶(Ⅲ型)胶原及弹性蛋白等。而Ⅲ型胶原是粥样斑块基底膜和纤维帽的重要组成部分,因此 MMP-9 在动脉粥样硬化斑块内细胞外基质降解过程中起着重要的作用。而转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是一种多效能细胞因子,可促进细胞外基质的合成与分泌,调节 MMP 的含量与活性,在粥样斑块的发生过程中起着重要的作用^[2]。本实验旨在通过对人动脉粥样硬化斑块的免疫组织化学研究来探讨 MMP-9、TGF- β 1 及转化生长因子 β 受体 iv(transforming growth factor- β receptor-iv, T β R-iv)在人动脉粥样硬化斑块中的表达水平及其与粥样斑块稳定性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

具有完整结构的人冠状动脉粥样硬化斑块共 41 例(取自深圳市孙逸仙心血管医院患者手术剥离的冠状动脉)石蜡包埋切片,作 HE 染色, MMP-9、TGF- β 1 及 T β R-iv 免疫组织化学染色。所有患者均无严重的感染或恶性疾病,近 4 周也没有潜在的感染体征及症状。

1.2 免疫组织化学染色

标本连续切片,每个标本切片 3 张,组织切片厚 4 μ m,微波 5 min,分别对标本进行 MMP-9、TGF- β 1 及 T β R-iv 免疫组织化学染色(SP 法;MMP-9 单克隆鼠抗、TGF- β 1 及 T β R-iv 多克隆兔抗购自北京中山公司,稀释度均为 1:60,SP 试剂盒购自福州迈新公司),石蜡切片脱蜡至水。3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。5%~10% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 min。倾去血清,勿洗,滴加适当比例稀释的一抗或一抗工作液,37℃孵育 1~2 h 或过夜。PBS 冲洗,5 min×3 次。滴加适当比例稀释的生物素标记二抗(1% BSA-PBS 稀释),37℃孵育

10~30 min。PBS 冲洗,5 min×3 次。显色剂显色(DAB 或 AEC)。自来水充分冲洗,复染,封片。用已知染色阳性的标本作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 分组分析与判断

根据斑块组织 HE 染色后光镜下结构将斑块组织分为稳定组和不稳定组^[3],稳定性斑块指斑块没有或仅有很小的粥样坏死中心(脂核),小于斑块面积 40%,纤维帽厚,而不稳定性斑块粥样坏死中心大,超过斑块面积 40%,表面的纤维帽薄,或斑块表面糜烂、形成溃疡或破裂。光学显微镜下见细胞胞质中出现明确的棕黄色颗粒为阳性细胞,采用 HPIAS-1000 型全自动图像分析系统进行分析,每片随机选择 10 个视野,计算 MMP-9、TGF- β 1 及 T β R-iv 表达阳性的细胞平均面积密度[阳性信号面积/(窗口面积×窗口数)]和吸光度[A,指光线通过溶液或某一物质前的入射光强度(I₀)与该光线通过溶液或物质后的透射光强度(I_b)比值的对数,即:OD=log(I₀/I_b)。吸光度值越大,则光线被吸收程度愈大,溶质含量越高;反之吸光度值越小,则光线被吸收程度愈小,溶质含量越低]。

1.4 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS10.0 统计软件,采用独立样本 *t* 检验,Person 相关分析。

2 结果

2.1 冠状动脉粥样硬化斑块组织的形态学观察

41 例冠状动脉粥样硬化斑块组织块中,27 例为不稳定性斑块(图 1A),斑块脂质坏死核心面积较大,超过斑块面积的 40% 以上,其表面覆盖的纤维帽较薄,尤其以斑块与正常内膜交界处(“肩部”)最为薄弱,其内可见大量的泡沫细胞和巨噬细胞,可见较多的新生血管,斑块内出血也比较常见。14 例为稳定性斑块,脂核面积较小(小于斑块面积的 40%)或没有,或者已经钙化,纤维帽比较厚,泡沫细胞以及巨噬细胞较少(图 1B)。

2.2 免疫组织化学检测

斑块组织内血管平滑肌细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、泡沫细胞以及巨噬细胞均可见到 MMP-9、TGF- β 1 及 T β R-iv 表达,但三者均于泡沫细胞及巨噬细胞大量见到。不稳定性斑块内, MMP-9 表达明显

强于稳定性斑块,且大量出现在粥样斑块的肩部和脂核周围的泡沫细胞和巨噬细胞内(图2),而TGF- β 1表达明显弱于稳定性斑块(图3)。T β R-iv在稳定性及不稳定性斑块内的表达差异无显著性(表1)。MMP-9与TGF- β 1表达阳性细胞平均面积密度和吸光度作Person相关分析表明,两者在斑块内的表达呈明显负相关(面积密度: $r = -0.332$, $P = 0.034$; 吸光度: $r = -0.373$, $P = 0.016$)。

表1. 基质金属蛋白酶9、转化生长因子 β 1及转化生长因子 β 受体iv在稳定性及不稳定性斑块内的表达结果比较

指标	阳性细胞面积密度		阳性细胞吸光度	
	稳定性斑块	不稳定性斑块	稳定性斑块	不稳定性斑块
MMP-9	0.16 \pm 0.02	0.21 \pm 0.04 ^b	2.84 \pm 0.27	3.48 \pm 0.65 ^b
TGF- β 1	0.23 \pm 0.05	0.17 \pm 0.02 ^b	3.60 \pm 0.55	3.16 \pm 0.65 ^a
T β R-iv	0.19 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	3.23 \pm 0.42	3.04 \pm 0.18

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与稳定性斑块比较。

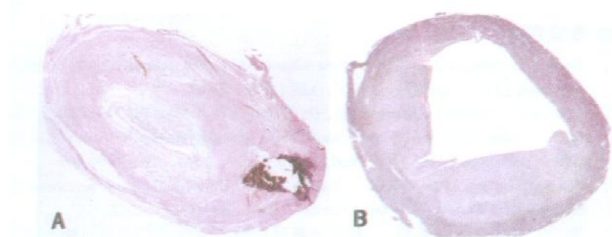


图1. 冠状动脉粥样硬化斑块组织光镜照片(HE \times 10) A 为不稳定性斑块, B 为稳定性斑块。

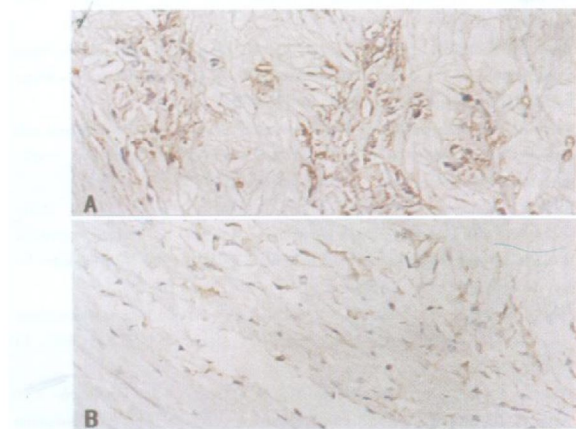


图2. 基质金属蛋白酶9在不稳定性斑块(A)与稳定性斑块(B)内的表达(SP法 \times 200)

3 讨论

近年来,大量研究表明动脉粥样硬化斑块破裂

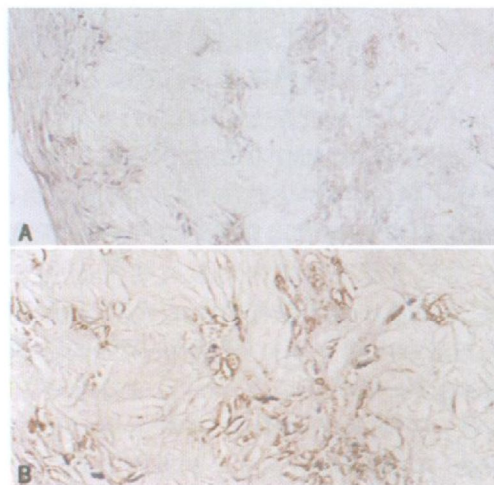


图3. 转化生长因子 β 1在不稳定性斑块(A)与稳定性斑块(B)内的表达(SP法 \times 200)

后脱落栓子以及随后的血栓形成是引起急性心脑血管缺血性卒中的主要原因,而斑块破裂几乎均发生在不稳定性斑块的基础之上。在粥样斑块中,斑块表面纤维帽的厚度、强度及其胶原组织含量的多少对于防止粥样斑块破裂至关重要,是影响斑块稳定与否的一个重要因素。纤维帽的重要作用在于防止动脉腔内的血液与纤维帽下组织接触,一旦接触,纤维帽下富含脂质的组织迅速激活血液中的凝血系统,形成血栓阻塞管腔。纤维帽越薄,其周围压力越大,越容易破裂。多数情况下,纤维帽肩部最薄,故该处纤维帽的机械性能最弱,最易破裂。纤维帽的完整性及其对破裂的抵抗能力主要依靠细胞外基质来维持。

细胞外基质赋予了斑块完整性,其中含有的胶原具有弹性和韧性,因此细胞外基质的含量、厚度、强度对于防止斑块破裂至关重要。正常情况下,细胞外基质成分合成与降解保持着动态平衡。MMP是一组同源的酶活性依赖 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的中性蛋白酶家族,其主要功能就是降解和再塑造细胞外基质,维持细胞外基质的动态平衡^[4]。MMP几乎可降解所有细胞外基质,它们在斑块内增高势必使纤维帽内胶原纤维及结缔组织降解增多,以致纤维帽变薄,易于形成不稳定性斑块。MMP-9可由中性粒细胞、单核巨噬细胞、血管内皮细胞等多种细胞合成并以无活性酶原形式分泌,在体内通过纤溶酶等水解而活化,其作用底物包括粥样斑块基底膜和纤维帽的重要组成部分(Ⅰ型明胶原。明胶酶对其降解促进中膜平滑肌细胞向内膜迁移,加速了动脉粥样硬化进

程并导致不稳定性斑块的形成^[5]。MMP-9 过度表达在血管重构中起重要作用,通过降解细胞外基质,增大管径、内膜面积及细胞核密度,为斑块的生长提供空间,当这种过程达到极点无法阻止时,可导致斑块破裂^[6]。有研究表明,MMP-9 在粥样斑块以及斑块基底部血管中膜,粥样硬化损伤处的平滑肌细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞中均显著表达^[7]。本研究发现 MMP-9 在不稳定性斑块内的表达要显著强于稳定性斑块,且大量出现在粥样斑块的肩部(动脉粥样硬化斑块与正常内膜交界处)和脂核周围的泡沫细胞和巨噬细胞内,表明斑块内 MMP-9 表达水平与斑块的稳定性存在明显的相关性,MMP-9 是形成不稳定性斑块的一个重要促进因素。转化生长因子 β 是一组具有多种功能的蛋白多肽,在人体内只存在 TGF- β 1、2、3 三种形式,三种的生物学特性基本相同,广泛地存在于全身各组织中,其中 TGF- β 1 在体细胞系中所占比例最高(> 90%),活性最强。血管壁的许多细胞如平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞等均可分泌,是血管壁细胞自分泌和旁分泌的主要细胞因子之一,在动脉硬化的形成过程中有着重要的作用。TGF- β 通过与细胞表面受体特异性结合而发挥生物学效应,TGF- β 受体有三种类型,几乎存在于所有细胞表面。iv型受体参与介导 TGF- β 对细胞外基质的合成与沉积。TGF- β 可以刺激 MMP 天然抑制剂的合成,从而抑制 MMP 合成,它可以与 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 启动子上游的 TGF- β 一致性元件结合,从而抑制其 mRNA 的表达^[8]。研究发现 TGF- β 可刺激细胞外基质的产生,抑制蛋白酶和包括 MMP-9 在内的 MMP 的活性,促进胶原的合成,从而促进细胞外基质在动脉内膜的沉积,并增加动脉内膜对脂蛋白的捕获,可导致斑块的生长和进展^[9]。而 Mallat 等^[10]发现阻滞 TGF- β 后,显著地促进粥样硬化的进展,此外,还导致斑块损伤处炎性细胞的增加和胶原含量的减少,而这正是不稳定性斑块的特征。Lutgens 等^[11]也发现在鼠粥样硬化模型中阻滞 TGF- β 后,脂核显著增大,炎性细胞成倍增加,纤维变性增加,斑块内出血,含铁血黄素和纤维蛋白沉积也非常常见。这表明 TGF- β 在保持粥样斑块炎症和纤维化之间的平衡起着关键的作用^[11]。上述研究显示,TGF- β 是动脉粥样硬化始发的保护因素,但同时也是维持斑块稳定性的重要因素。因此在动脉粥

样硬化中 TGF- β 是一个极重要的炎症免疫调节因子和斑块稳定因子^[10]。我们的研究发现,TGF- β 1 与 MMP-9 在斑块内的表达呈明显负相关(面积密度: $r = -0.332$, $P = 0.034$; 吸光度: $r = -0.373$, $P = 0.016$),并且 TGF- β 1 在不稳定性斑块中的表达明显弱于稳定性斑块(面积密度: 0.17 ± 0.02 比 0.23 ± 0.05 , $P < 0.01$; 吸光度: 3.16 ± 0.65 比 3.60 ± 0.55 , $P < 0.05$),而 T β R-iv 在两种斑块中的表达却无明显差异。表明 TGF- β 1 在斑块形成后是一个重要的斑块稳定因子,其受体 T β R-iv 表达水平则不受 TGF- β 表达水平变化的影响,与斑块的稳定性无明显关联。

总之,本研究提示 MMP-9、TGF- β 1 分别是形成不稳定性斑块重要的促进和抑制因素。拮抗或抑制 MMP-9 的表达以及激活或增强 TGF- β 1 的表达有可能作为稳定斑块的治疗方向或靶点之一,但不稳定性斑块的形成是多因素造成的,对此尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Reiner Z, Tedeschi-Reiner E. New information on the pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Lijec Vjesn*, 2001, **123** (1-2): 26-31
- [2] Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, De Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, et al. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induce a stable plaque phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **13**: 7464-469
- [3] Steen DK, Ravn HB, Falk E. Insight to the pathophysiology of instable coronary artery disease [J]. *Am J Cardiol*, 1997, **80** (5A): 5E-9E
- [4] 梅宇, 王桂照, 黄永麟. 基质金属蛋白酶与血管成形术后再狭窄[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, **11** (4): 376-379
- [5] 杨彬, 马颖哲, 马岩, 刘坤. 基质金属蛋白酶与动脉粥样硬化[J]. 吉林大学学报(医学版), 2004, **30** (5): 831-834
- [6] Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowers-Pope DF, Seifert RA, Coats S, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery [J]. *Circ Res*, 1999, **85** (12): 1179-185
- [7] Hong BK, Kwon HM, Lee BK, Kim D, Kim IJ, Kang SM, et al. Coexpression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human aortic atherosclerotic lesions [J]. *Yonsei Med J*, 2000, **41** (1): 82-88
- [8] Delay AM, Brinckerhoff CE. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts [J]. *J Cell Biochem*, 1992, **50** (4): 400-410
- [9] Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, et al. Distinct patterns of transforming growth factor- β isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions: colocalization implicates TGF- β in fibrofatty lesion development [J]. *Circulation*, 1999, **99** (22): 2883-891
- [10] Mallat Z, Tedgui A. The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2002, **13** (50): 523-529
- [11] Lutgens E, Gijbel M, Smook M, De Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, et al. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (6): 975-982

(此文编辑 胡必利, 许雪梅)