

氟伐他汀对急性心肌梗死患者循环单核细胞基质金属蛋白酶 9 和组织因子表达的影响

夏 勇¹, 李先进², 杨 煜¹, 李东野¹

(1. 徐州医学院附属医院心内科, 江苏省徐州市 221002; 2. 徐州中心医院心内科, 江苏省徐州市 221009)

[关键词] 内科学; 氟伐他汀; 急性心肌梗死; 基质金属蛋白酶 9; 组织因子; 单核细胞

[摘要] 目的 观察氟伐他汀对急性心肌梗死患者循环单核细胞基质金属蛋白酶 9、组织因子表达的影响。方法 分离 30 例急性心肌梗死患者和 30 例正常对照者循环血单核细胞, 在体外无血清培养, 设两孔, 一孔直接培养, 一孔加入氟伐他汀(360 μg/L)干预 48 h, 酶联免疫吸附法测定上清液中基质金属蛋白酶 9、组织因子的含量。结果 急性心肌梗死非干预组基质金属蛋白酶 9、组织因子均高于正常对照非干预组(351±141 μg/L 比 121±10 μg/L, $P < 0.01$; 41.4±13.6 ng/L 比 25.5±5.4 ng/L, $P < 0.01$)。急性心肌梗死氟伐他汀组较非干预组基质金属蛋白酶 9 和组织因子表达明显下降(226±89 μg/L 比 351±141 μg/L, $P < 0.01$; 31.4±11.2 ng/L 比 41.4±13.6 ng/L, $P < 0.05$)。结论 急性心肌梗死患者循环血单核细胞产生基质金属蛋白酶 9、组织因子增加, 氟伐他汀能抑制单核细胞表达基质金属蛋白酶 9、组织因子。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Fluvastatin on Expression of Matrix Metalloproteinase-9, Tissue Factor from Circulating Monocytes in Patients with Acute Myocardial Infarction

XIA Yong¹, LI Xiann Jin², YANG Yu¹, and LI Dong-Ye¹

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 2. Department of Cardiology, the Centre Hospital of Xuzhou City, Xuzhou 221009, China)

[KEY WORDS] Fluvastatin; Acute Myocardial Infarction; Matrix Metalloproteinase-9; Tissue Factor; Monocytes

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of fluvastatin on expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue factor (TF) from the peripheral blood monocytes in patients with acute myocardial infarction (AMI). Methods Monocytes from 30 AMI patients and 30 control subjects were separated and added into two bores, one cultivated directly, one cultivated with fluvastatin (360 μg/L). The contents of MMP-9, TF were assayed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results Compared with control noninterfering group, the productions of MMP-9, TF in AMI noninterfering group were increased significantly (351±141 μg/L vs 121±10 μg/L, $P < 0.01$; 41.4±13.6 ng/L vs 25.5±5.4 ng/L, $P < 0.01$). In AMI group, compared with the noninterfering group, the productions of MMP-9, TF in fluvastatin group have been decreased significantly (226±89 μg/L vs 351±141 μg/L, $P < 0.01$; 31.4±11.2 ng/L vs 41.4±13.6 ng/L, $P < 0.05$). Conclusion The productions of MMP-9, TF in monocytes from patients with AMI were increased. Fluvastatin inhibited the expression of MMP-9 and TF.

斑块破裂和血栓形成是急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)发病过程中的两个基本环节。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是降解细胞外基质的主要酶, 人粥样斑块的肩区、脂质中心边缘及微血管形成区 MMP-9 的含量及活性均增高, 提示 MMP-9 可能与斑块不稳定有关。粥样斑块内的脂质核心有非常强的促血栓形成作用, 斑块破裂后脂质核心与血液接触, 触发血栓形成是导

致管腔闭塞的重要原因。组织因子(tissue factor, TF)是脂质核心内的促血栓形成最重要的活性因子之一。目前他汀类药物的非调脂作用已成为研究的热点, 本研究旨在探讨氟伐他汀对 AMI 患者循环血单核细胞产生 MMP-9、TF 的影响, 从而探讨氟伐他汀在稳定粥样斑块及抑制血栓形成的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

急性心肌梗死组 30 例患者, 均为徐州医学院附属医院心内科 2003 年 9 月至 2004 年 4 月住院患者, 发病时间在 24 h 内, 并符合下述三项中两项者: 持续胸痛时间超过 30 min; ④相邻两个以上导联 ST

[收稿日期] 2005-05-23 [修回日期] 2006-02-19

[基金项目] 江苏省社会发展基金资助项目(BS2002009)

[作者简介] 夏勇, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 xayongphd@yahoo.com.cn。李先进, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床。杨煜, 硕士研究生, 研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 xzyangyu@163.com。

段抬高 0.2 mV, 心电图有动态演变; ④血清心肌型肌酸激酶同工酶(MB isoenzyme of creatine kinase, CK-MB) 超过正常值 2 倍以上。病人入院后常规予肠溶阿斯匹林、肝素、卡托普利、倍他乐克等药物应用。对照组 30 例正常者为同期徐州医学院附属医院心内科住院患者, 经临床检查、标准 12 导联心电图、心脏彩超、活动平板及冠状动脉造影等排除冠心病。上述两组均排除现在或近期感染、肿瘤、全身免疫性疾病、严重肝肾疾病、血液系统疾病、服用免疫抑制剂者及入选前已予肝素类、他汀类药物治疗者。

1.2 试剂与仪器

主要试剂及仪器有淋巴细胞分离液(上海华美生物有限公司), 肝素钠(常州千红制药厂), MMP-9 检测试剂盒(美国 R&D 公司), TF 检测试剂盒(American Diagnostic Inc), RPMI1640 培养基及 10% 小牛血清, 24 孔培养板, 水平离心机, 二氧化碳孵箱, 低温冰箱等。

1.3 方法

急性心肌梗死组病人入院后即刻、对照组病人排除冠心病后采血。无菌采取肘静脉血 5 mL, 枸橼酸钠抗凝, 等量 PBS 稀释, 利用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞, 再贴壁 2 h 去除悬浮的淋巴细胞及红细胞获得单核细胞, 加入含 10% 小牛血清、 10^5 u/L 青霉素与 10^5 u/L 链霉素的 1640 完全培养基, 台盼蓝染色证明细胞活力 > 95%, 调整细胞浓度为 5×10^8 /L, 移入 24 孔培养板, 设 2 孔, 一孔直接培养、一孔加入氟伐他汀(360 μ g/L, 相当于成人 40 mg/d 口服时血清中的峰值浓度)。37℃、5% CO₂ 孵箱培育 48 h, 离心取上清液, -20℃保存。按试剂盒说明操作采用酶联免疫吸附法统一检测 MMP-9、TF, 首先得到每个标准品和标本的 OD 值, 以标准品浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 以平滑线连接各标准品的坐标点得到标准曲线, 通过标本的 OD 值可在标

准曲线上查出其浓度。得出各样本浓度, 乘稀释倍数即为 MMP-9 和 TF 的浓度。

1.4 统计学方法

应用统计软件 SPSS11.0 数据分析系统进行统计分析, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用非配对 *t* 检验; 计数资料用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

两组患者一般临床资料经统计学处理, 差异均无统计学意义($P < 0.05$), 具有可比性(表 1)。

表 1. 两组患者一般临床资料的比较

临床资料	对照组 ($n=30$)	AMI 组 ($n=30$)
年龄 (岁)	61.0 \pm 10.1	62.0 \pm 10.0
男/女 (例)	22/8	23/7
吸烟 (例, %)	10 (33.3%)	11 (36.7%)
高血压 (例, %)	10 (33.3%)	9 (30.0%)
糖尿病 (例, %)	4 (13.3%)	5 (16.7%)
TC (mmol/L)	4.73 \pm 1.21	4.85 \pm 1.22
TG (mmol/L)	2.03 \pm 0.73	2.05 \pm 0.64

2.2 基质金属蛋白酶 9 表达的变化

急性心肌梗死非干预组较正常对照非干预组 MMP-9 的表达明显增高($P < 0.01$)。AMI 氟伐他汀干预组较非干预组 MMP-9 表达明显下降($P < 0.01$), 但未降至正常水平(表 2)。

2.3 组织因子表达的变化

急性心肌梗死非干预组较正常对照非干预组 TF 的表达明显增高($P < 0.01$)。AMI 氟伐他汀干预组较非干预组 TF 表达明显下降($P < 0.05$), 但亦未降至正常(表 2)。

表 2. 两组基质金属蛋白酶 9 和组织因子的含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组		AMI 组	
	非干预组	氟伐他汀组	非干预组	氟伐他汀组
MMP-9 (μ g/L)	121 \pm 10	117 \pm 9	351 \pm 141 ^a	226 \pm 89 ^{ac}
TF (ng/L)	25.5 \pm 5.4	24.9 \pm 5.3	41.4 \pm 13.6 ^a	31.4 \pm 11.2 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相应组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 AMI 非干预组比较。

3 讨论

粥样斑块的不稳定可导致不稳定型心绞痛、急性心肌梗死、猝死等急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)。冠状动脉造影显示, 引发这些

事件的粥样斑块大多数仅造成 70% 以下的狭窄, 粥样斑块的不稳定及在其基础上形成血栓是造成 ACS 的主要原因^[1]。新近研究发现, ACS 的炎症反应并非局限于斑块局部, 而是遍布全身系统^[2]。而 ACS

时循环血中免疫、炎性细胞活化, 炎性产物表达增加。循环血单核细胞中调控炎症反应最重要的核转录因子之一核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 活化, 并且活化发生于临床症状之前, 提示单核细胞活化可能直接参与 ACS 发病过程^[3]。

基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 属于 MMP 中的明胶酶, 降解 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型胶原及副纤维蛋白、弹性蛋白等^[4]。Ⅳ型胶原是粥样斑块基底膜和纤维帽的重要组成部分, 明胶酶对其降解促进中膜内平滑肌细胞向内膜迁移, 加速了动脉粥样硬化进程, 并导致斑块的不稳定^[5]。本研究发现, AMI 患者循环单核细胞体外培养时分泌 MMP-9 较对照组明显增加, 推测 MMP-9 可导致斑块的不稳定或破裂。氟伐他汀在 ACS 中的非调脂作用已引起临床及基础研究的广泛关注, 与之有关的实验研究成为热点。本研究采用分离 AMI 患者外周循环单核巨噬细胞进行体外培养, 在培养过程中用氟伐他汀干预, 结果发现氟伐他汀可减少 MMP-9 的表达, 提示氟伐他汀可能通过调节 MMP-9 的表达达到稳定动脉粥样斑块的作用。其可能的机制为: 他汀类药物被细胞摄取后能抑制羟甲基戊二酰辅酶 A 转化为甲羟戊酸, 造成细胞内甲羟戊酸缺乏。甲羟戊酸是合成双香叶酯基焦磷酸盐和角鲨烯的共同前体物质, 双香叶酯基在细胞内许多重要蛋白质翻译后修饰中起重要作用, 包括 eNOS、Ras 样蛋白如 Rho 蛋白, 而角鲨烯则是合成胆固醇的前体物质。氟伐他汀通过抑制细胞内蛋白双香叶酯化使 MMP-9 的合成减少, 而与其降低血浆胆固醇作用无关^[6]。④MMP-9 的表达受转录因子 AP-1 的调控^[7]。氟伐他汀明显抑制 AP-1 的结合活性, 表明氟伐他汀可能抑制 MMP-9 的转录。④AMI 时细胞内氧自由基大量产生, 氧自由基可使 MMP-9 合成增加, 而氟伐他汀使氧自由基产生大量减少, 从而抑制 MMP-9 的合成。

组织因子 (TF) 是外源性凝血的起始因子, 它与因子生成复合物激活 Ⅲ因子 (传统通路), 也可激活 Ⅲ因子 (选择通路), 从而启动凝血反应。本研究发现, AMI 患者外周循环单核细胞较对照组 TF 的表达明显增加。提示单核细胞在 AMI 发病机制中发

挥重要作用, 它分泌 TF 显著增高开启外源性凝血机制, 导致斑块破裂后的血栓形成。本研究亦发现氟伐他汀干预后单核巨噬细胞表达 TF 明显减少, 提示氟伐他汀可能主要通过抑制 TF 的表达调节斑块破裂后的血栓形成, 改善患者的预后。氟伐他汀抑制 TF 表达的作用可能通过以下机制: 氟伐他汀降低单核细胞内胆固醇含量, 而单核细胞内胆固醇含量在调控 TF 表达中有重要作用^[8]。④氟伐他汀能抑制脂多糖诱导的 TF 表达。TF 的调控区有转录因子 NF- κB 的结合位点, 受 NF- κB 调控, 炎症因子和脂多糖可通过活化 NF- κB 上调 TF^[9]。而他汀类药物可抑制 NF- κB 活化。④一些蛋白质的异戊烯化在发挥其细胞功能中起重要作用。因而他汀类药物抑制蛋白质的异戊烯化可能是其抑制 TF 表达的又一重要机制。

综上所述, 氟伐他汀可能通过抑制单核细胞 MMP-9 和 TF 的表达, 稳定动脉粥样斑块及抑制血栓形成。

参考文献

- [1] Plutzky J. Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities [J]. *Am J Cardiol*, 1999, **84** (1): 15-20
- [2] Rabhani R, Topol EJ. Strategies to achieve coronary arterial plaque stabilization [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (2): 402-407
- [3] Ritchie ME. Nuclear factor- κB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris [J]. *Circulation*, 1998, **98** (17): 1707-713
- [4] Feldman LJ, Mazighi M, Scheuble A, Deux JF, De Benedetti E, Badier-Commanche C, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit [J]. *Circulation*, 2001, **103** (25): 3117-122
- [5] Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (9): 845-851
- [6] Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro [J]. *Circulation*, 2001, **103** (2): 276-283
- [7] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinase and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 1995, **77** (5): 863-868
- [8] Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, et al. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity [J]. *Circulation*, 2003, **107** (7): 973-977
- [9] Marx N, Mackman N, Schonbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, et al. PPAR α activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes [J]. *Circulation*, 2001, **103** (2): 213-219

(此文编辑 胡必利, 许雪梅)