

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-0285-04

· 实验研究 ·

## 白细胞介素 18和基质金属蛋白酶 9在人冠状动脉粥样硬化斑块中的表达

郭静<sup>1</sup>, 于霄<sup>2</sup>, 孙雷<sup>2</sup>

(1. 抚顺矿务局总医院病理科, 辽宁省抚顺市 113008 2 大连医科大学病理教研室, 辽宁省大连市 116027)

[关键词] 冠状动脉粥样硬化; 斑块; 白细胞介素 18; 基质金属蛋白酶 9; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链反应

[摘要] 目的 探讨白细胞介素 18和基质金属蛋白酶 9在不同程度的人冠状动脉病变中的表达情况及意义。方法 收集 14例尸检的人冠状动脉共 48个冠状动脉标本, 根据 HE染色将标本分为不稳定斑块组、稳定斑块组和正常对照组。用免疫组织化学及逆转录聚合酶链反应检测白细胞介素 18和基质金属蛋白酶 9蛋白及 mRNA在以上不同类型标本中的分布表达。结果 白细胞介素 18和基质金属蛋白酶 9表达于冠状动脉粥样硬化斑块区, 在不稳定斑块中的表达明显高于稳定斑块。并且二者的表达强度呈正相关。结论 白细胞介素 18和基质金属蛋白酶 9可能参与冠状动脉粥样硬化斑块的发生、发展, 与斑块不稳定性密切相关。并且二者协同参与粥样斑块发展。[中图分类号] R36 [文献标识码] A

### Expression of Interleukin-18 and Matrix metalloproteinase-9 in Atherosclerosis Plaque of Human Coronary Artery

GUO Jing<sup>1</sup>, YU Xiao<sup>2</sup>, and SUN Lei<sup>2</sup>

(1 Department of Pathology, General Hospital of Fushun Coal Mining Group, Fushun 113008 China; 2 Department of Pathology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

[KEY WORDS] Coronary Atherosclerosis Plaque; Interleukin-18; Matrix metalloproteinase-9; Immunohistochemistry; Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression and significance of interleukin-18 and matrix metalloproteinase-9 in human coronary arteries with different atherosclerotic lesions. **Methods** 48 coronary arteries specimens from 14 autopsy cases were divided into 3 different groups according to HE staining which were unstable plaque group, stable plaque group and normal group. These specimens were detected by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction for protein and mRNA analysis. **Results** Interleukin-18 and matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein expression can be detected in atherosclerosis and there is significant difference between unstable plaques and stable plaques. The levels are significantly higher in unstable plaques. Positive association between interleukin-18 and matrix metalloproteinase-9 expression intensity showed in Spearman tests. **Conclusions** These results indicates interleukin-18 and matrix metalloproteinase-9 both participate in the initiation and development of atherosclerosis and are highly relevant to the unstable plaque. These findings suggests that interleukin-18 is in coordination with matrix metalloproteinase-9 during the development of atherosclerosis.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)被认为是一个主动的有免疫系统参与的炎症性过程, 而不是单纯的脂质被动浸润<sup>[1]</sup>。急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndromes, ACS)为冠心病急症, 是导致冠心病患者发生不良预后及猝死的主要原因。在 As 斑块形成、进展以及发生破裂过程中有众多的炎性

因子的参与及表达。其中, 白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18)是近年来发现的一个重要多效能细胞因子。它其中的一个效能就是通过直接和间接途径促进基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的分泌和表达, 促进 As 的发生和发展。本研究检测 IL-18与 MMP-9在正常冠状动脉及粥样硬化冠状动脉的表达情况, 探讨二者与斑块稳定性的关系。

[收稿日期] 2008-11-26 [修回日期] 2009-01-28

[作者简介] 郭静, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠状动脉粥样硬化发生机制, 联系电话为 0413-2645881, E-mail为 guojingzh@126.com。于霄, 硕士, 助教, 研究方向为冠状动脉粥样硬化发生机制。联系电话为 0411-86110297, E-mail为 yuqiqi@yahoo.com.cn。通讯作者孙雷, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠状动脉粥样硬化基础与临床研究, 联系电话为 0411-86110297, E-mail为 sunleil00@yahoo.com.cn。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料及分组

选取 2006年大连医科大学中日临床病理中心

尸检的人冠状动脉,共 14 例。其中 1 例死于急性冠状动脉综合征,8 例死于非心脏疾病的其他事件而有冠心病病史,5 例死于非心脏病事件并无冠心病病史。分离选定死亡病例的主要冠状动脉,包括左冠状动脉前降支、回旋支,右冠状动脉,共获取冠状动脉标本 48 个。部分标本液氮冷冻后用于逆转录聚合酶链反应。根据病史、光镜观察结果及 HE 染色病理特征,参照病理学分类标准<sup>[2]</sup>将标本分为不稳定斑块组(16 个)、稳定斑块组(21 个)和正常对照组(11 个,包括 5 个正常冠状动脉标本及 6 个粥样硬化冠状动脉非斑块区标本)。

## 1.2 方法

将 48 个冠状动脉标本进行常规免疫组织化学染色。SP 试剂盒和鼠抗人 IL-18 单克隆抗体、鼠抗人 CD-68 单克隆抗体及鼠抗人  $\alpha$ -actin 单克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体购自福州迈新生物技术有限公司。对液氮冷冻的标本进行逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测。RT-PCR 反应试剂盒购自 TaKaPa 公司。IL-18 引物序列:正义 5'-GCC TAG AGG TAT GGC TGT AA-3';反义 5'-GCC TCA CTA CAC TCA GCT AA-3',扩增产物大小约为 455 bp。MMP-9 引物序列:正义 5'-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3';反义 5'-GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG-3',扩增产物大小约为 262 bp。 $\beta$ -actin 作为内参照,正义 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC ACA ATG AGC TGC G-3';反义 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3',扩增产物大小约为 838 bp。引物由上海英骏生物技术公司合成。

## 1.3 统计学分析

应用 SPSS 11.5 统计软件中的秩和检验、卡方检验、非参数等级相关性(spearm an)检验。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织形态学观察

正常冠状动脉可见内膜光整,内弹力板无增厚,中膜由平滑肌细胞和成纤维细胞构成。不稳定性斑块病理特征表现为: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,厚度小于 65  $\mu$ m,其内可见大量的泡沫细胞和巨噬细胞,平滑肌细胞成分极少。稳定性斑块镜下特征为:脂核面积较小(小于斑块面积的 40%)或没

有,纤维帽比较厚,厚度大于 65  $\mu$ m,泡沫细胞以及巨噬细胞较少,平滑肌细胞较多。

### 2.2 免疫组织化学检测结果

依据 CD-68 和  $\alpha$ -actin 染色,判定巨噬细胞和平滑肌细胞表达 IL-18 与 MMP-9 情况。参照文献[3]的免疫组织化学反应结果的判定标准,综合考虑切片中阳性细胞所占观察同类细胞数的百分比和阳性细胞着色强度两项指标,半定量判断结果。

IL-18 表达主要见于巨噬细胞、泡沫细胞及内膜平滑肌细胞,定位于胞浆。MMP-9 染色阳性主要位于巨噬细胞、泡沫细胞、平滑肌细胞和内皮细胞胞浆。各组 IL-18 和 MMP-9 表达在三组之间均有差异,正常对照组无表达,稳定斑块组表达弱,不稳定斑块组表达最强。并且二者的表达强度呈正相关关系( $r_s = 0.401$ ,  $P = 0.014$ , 表 1~表 3 图 1)。

表 1 白细胞介素 18 的表达情况

分 组	n	阳性细胞表达强度				阳性率
		-	+	++	+++	
对照组	11	11	0	0	0	0.00%
稳定斑块组	21	10	7	3	1	52.38% <sup>a</sup>
不稳定斑块组	16	2	6	4	4	87.50% <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与稳定斑块组比较。

表 2 基质金属蛋白酶 9 的表达情况

分 组	n	阳性细胞表达强度				阳性率
		-	+	++	+++	
对照组	11	11	0	0	0	0
稳定斑块组	21	13	5	3	0	38.10% <sup>a</sup>
不稳定斑块组	16	4	5	4	3	75.00% <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与稳定斑块组比较。

表 3 白细胞介素 -18 与基质金属蛋白酶 -9 在粥样硬化冠状动脉中的表达

MMP-9 表达强度	IL-18 表达强度			
	-	+	++	+++
-	7	6	4	0
+	5	3	1	1
++	0	3	2	2
+++	0	1	0	2

$r_s = 0.401$ ,  $P = 0.014$

### 2.3 RT-PCR 检测结果

正常冠状动脉及粥样硬化冠状动脉非斑块区未见 IL-18 mRNA 的表达,在 A<sub>s</sub> 斑块可见 IL-18 及 MMP-9 mRNA 的表达,其中不稳定斑块的表达高于稳定斑块。经过 Labworks TM image acquisition and analysis software 软件分析积分光密度值,采用秩和

检验, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。并且二者的表达呈正相关关系 ( $r_s = 0.375, P < 0.05$ , 表 4)。

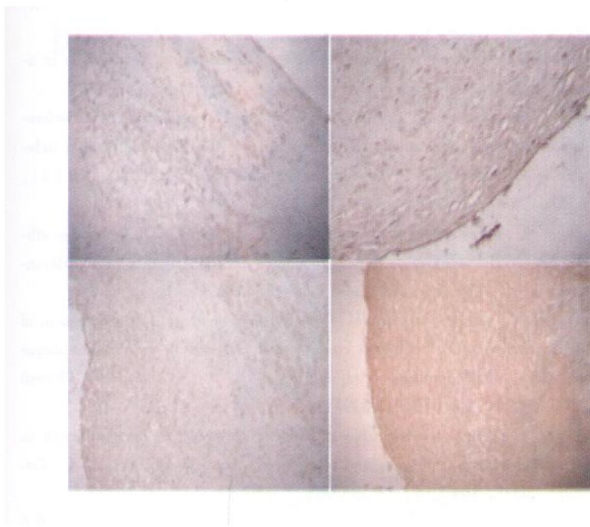


图 1 白细胞介素 18(上图)和基质金属蛋白酶 9(下图)的表达 ( $\times 100$ ) 左为稳定斑块, 右为不稳定斑块。

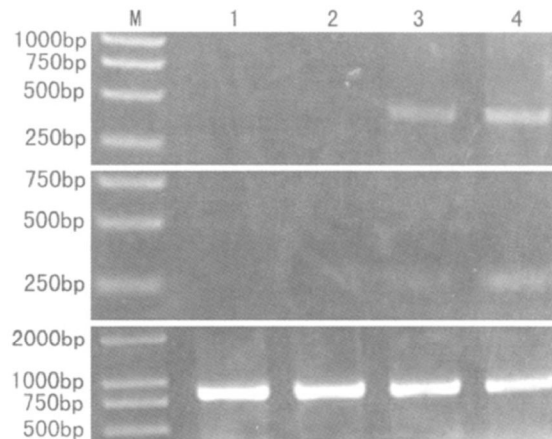


图 2 RT-PCR 检测结果 上图为白细胞介素-18mRNA 的表达, 碱基对为 455 bp 中图为基质金属蛋白酶-9mRNA 的表达, 碱基对为 262 bp 下图为  $\beta$ -actin mRNA 的表达, 碱基对为 838 bp。1 为正常冠状动脉, 2 为粥样硬化冠状动脉非斑块区, 3 为稳定斑块, 4 为不稳定斑块。

表 4 白细胞介素 18 和基质金属蛋白酶 9 的积分光密度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	IL-18	MMP-9	$\beta$ -actin	IL-18 / $\beta$ -actin	MMP-9 / $\beta$ -actin
正常对照组	11	0	0	50460.40 $\pm$ 10926.99	0	0
稳定斑块组	21	16646.19 $\pm$ 3116.31	6979.38 $\pm$ 1159.02	44628.14 $\pm$ 4400.75	0.38 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.03
不稳定斑块组	16	26646.19 $\pm$ 5328.02	13498.81 $\pm$ 2660.93	44119.13 $\pm$ 5605.04	0.57 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.04

### 3 讨论

近年来大量的研究证实炎症反应在 AS 的发生和发展及并发症的发生中起决定性作用。AS 与各种炎性因子之间的相关性, 尤其是斑块不稳定发生破裂的中介和中心环节已受到国内外众多学者的高度关注。IL-18 是新近发现的一种多效能前炎症因子和炎症标记物, 其与 AS 发生、发展密切相关<sup>[4]</sup>。动物实验<sup>[5-7]</sup>证明 IL-18 能增大粥样斑块面积, 使脂质核心明显增大, 提升斑块内 T 淋巴细胞数目, 显著降低斑块胶原含量及纤维帽厚度, 提示 IL-18 的致 AS 及促进斑块不稳定作用。Mallat 等<sup>[8]</sup>检测到在人的颈动脉粥样斑块内有 IL-18 mRNA 及蛋白的表达, 并且不稳定斑块中 IL-18 的表达明显强于稳定斑块。刘娟等<sup>[9]</sup>在人的冠状动脉不稳定斑块内检测到 IL-18 的表达明显高于稳定斑块。这些研究都提示 IL-18 与斑块稳定性密切相关。国内外临床实验及研究<sup>[10-13]</sup>结果显示, ACS 患者血清中 IL-18 的含量明显增高。血浆 IL-18 浓度与冠状动脉粥样斑块严重程度及稳定性状态显著相关。IL-18 作为

一种前炎症因子能诱导单核巨噬细胞和 T 淋巴细胞分泌干扰素  $\gamma$ , 后者在 AS 斑块形成和破裂过程中起着一种关键性作用。IL-18 除了通过 IFN  $\gamma$  介导致 AS 外, 还可直接激活单核巨噬细胞、T 淋巴细胞, 参与斑块形成, 促进斑块不稳定。本研究采用免疫组织化学和 RT-PCR 对 IL-18 在人冠状动脉中的表达进行了研究。结果发现在正常冠状动脉中没有见到 IL-18 的表达, 在 AS 斑块中检测到 IL-18 蛋白及 mRNA 表达。并且不稳定斑块表达强于稳定斑块, 差异具有统计学意义。这一结果说明 IL-18 参与冠状动脉粥样斑块的形成, 并与斑块不稳定密切相关。此结果进一步证实了 Mallat 等的研究, 提示 IL-18 参与了粥样斑块早期炎症反应过程, 并且影响斑块发展, 导致斑块不稳定。

MMP-9 又称明胶酶 B, 主要由中性粒细胞和巨噬细胞以前酶原的形式合成与分泌, 其细胞外基质底物包括 I、II 型明胶原、弹性蛋白, 而胶原是粥样斑块基底膜和纤维帽的重要组成部分。MMP-9 可降解细胞外基质, 促进血管平滑肌增殖和移行, 因此

MMP-9在As的发生、发展和斑块破裂过程中发挥着重要的作用<sup>[14-15]</sup>。国内外研究<sup>[16-18]</sup>证实MMP-9在人As斑块中表达,并且不稳定斑块比稳定斑块表达增强。这说明MMP-9与斑块稳定性明显相关,是斑块不稳定性的一个促进因素。本研究发现在正常冠状动脉中无MMP-9的表达。在粥样斑块中通过免疫组织化学及RT-PCR检测到MMP-9蛋白及mRNA的表达,并且不稳定斑块表达强于稳定斑块,差异具有统计学意义。这一结果说明MMP-9参与冠状动脉粥样斑块的形成,并与斑块不稳定密切相关。此结果与以前的研究结果相符合,进一步支持了MMP-9是不稳定斑块形成的一个重要因素。

IL-18作为一种前炎性细胞因子,除了通过干扰素 $\gamma$ 介导促进MMP-9表达外,还可直接促进MMP-9分泌,在斑块破裂中起重要作用。Chandrasekar B等<sup>[19]</sup>的实验研究说明IL-18能诱导MMP-9的转录及mRNA的表达从而引起平滑肌细胞迁移及基质降解,这一过程是由核因子 $\kappa$ B和激活蛋白1介导的。另外IL-18作为多效能前炎性因子,具有多样的生物学活性,能促进IL-1 $\beta$ 、IL-8、肿瘤坏死因子、单核细胞趋化蛋白、细胞间黏附分子、血管细胞黏附分子等因子的产生。其中IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子等细胞因子以自分泌和旁分泌的形式作用于内皮细胞、血管平滑肌细胞等促进MMP-9的分泌,进一步增强对细胞外基质的降解作用<sup>[20-21]</sup>。本研究结果显示在不稳定斑块中IL-18和MMP-9的mRNA和蛋白表达均显著高于稳定斑块,差异具有统计学意义。RT-PCR结果统计分析IL-18与MMP-9在As斑块中mRNA的表达具有相关性,呈正相关关系,免疫组织化学结果统计分析IL-18与MMP-9在As斑块内蛋白表达有相关性。此结果提示IL-18与MMP-9可能相互协同和作用,共同促进不稳定粥样斑块的形成。

本研究通过对14例尸检冠状动脉标本的检测、分析发现IL-18与MMP-9协同参与了冠状动脉粥样硬化斑块的形成和发展,并与斑块的不稳定性有关。二者在冠状动脉局部导致斑块形成与发展、促进斑块不稳定的具体机制虽未清楚,但通过本分析,可知它们是复杂的As过程中的重要环节。通过本研究为冠状动脉粥样硬化的病理学研究提供实验依据,可以为临床有效的对冠心病诊断、治疗及愈合的评估提供新思路。

#### [参考文献]

[1] Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease [J].

*Circulation*. 2005; **111** (25): 3481-488

- [2] 韦立新. 重视冠心病的病理学研究 [J]. 中华病理学杂志, 2006; **35** (3): 132-135
- [3] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996; **6** (4): 229-231
- [4] Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes [J]. *Circulation*. 2006; **113** (6): 72-75
- [5] Tenger C, Sundborger A, Jawien J et al. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN- $\gamma$  and CXCL16 expression independently of T cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; **25** (4): 655-657
- [6] Whithan SC, Ravisankan P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E (-/-) mice through release of interferon- $\gamma$  [J]. *Circ Res*. 2002; **90** (2): E34-38
- [7] de Nooijer R, von der Thusen JH, Verkleij CJ et al. Overexpression of IL-18 decreases intimal collagen content and promotes a vulnerable plaque phenotype in apolipoprotein-E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; **24** (12): 2313-319
- [8] Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability [J]. *Circulation*. 2001; **104** (14): 1598-603
- [9] 刘娟, 陈丽琴, 苏秀兰, 等. 人冠状动脉粥样硬化斑块内白细胞介素6和18及肿瘤坏死因子 $\alpha$ 表达与斑块稳定性有关 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008; **16** (7): 537-540
- [10] Hulthe J, McPheat W, Sannegard A, et al. Plasma interleukin (IL)-18 concentrations is elevated in patients with previous myocardial infarction and related to severity of coronary atherosclerosis independently of C-reactive protein and IL-6 [J]. *Atherosclerosis*. 2006; **188** (2): 450-454
- [11] Chalkias GK, Tziakas DN, Kaski JC, et al. Interleukin-18/interleukin-10 ratio is an independent predictor of recurrent coronary events during a 1-year follow-up in patients with acute coronary syndrome [J]. *Int J Cardiol*. 2007; **117** (3): 333-339
- [12] 游陆, 陈晓英, 高昕媛. 急性冠状动脉综合征与白细胞介素-18临床关系的研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2006; **27** (4): 12-16
- [13] 李曦铭, 王林, 周丽娟, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清白细胞介素-18水平及其临床意义 [J]. 中国心血管杂志, 2005; **10** (1): 17-19
- [14] Lessner SM, Martinson DE, Galis ZS. Compensatory vascular remodeling during atherosclerotic lesion growth depends on matrix metalloproteinase-9 activity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; **24** (11): 2123-129
- [15] Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, 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
- [16] Chen F, Eriksson P, Hansson GK, et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque [J]. *Int J Mol Med*. 2005; **15** (1): 57-65
- [17] Amo G, Kaski JC, Smith DA, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression is associated with the presence of Chlamydia pneumoniae in human coronary atherosclerotic plaques [J]. *Heart*. 2005; **91** (4): 521-525
- [18] 郭毅, 姜昕, 左彦方, 等. 基质金属蛋白酶9和转化生长因子 $\beta$ 1在人冠状动脉斑块的表达及其与粥样斑块稳定性的关系 [J]. 中国临床康复, 2005; **9** (3): 58-60
- [19] Chandrasekar B, Mummidi S, Mahalingam L, et al. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF- $\kappa$ B- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin [J]. *J Biol Chem*. 2006; **281** (22): 15099-109
- [20] Annabi B, Shedid D, Ghosn P, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms [J]. *J Vasc Surg*. 2002; **35** (3): 539-546
- [21] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities [J]. *J Cell Sci*. 2002; **115** (19): 3719-727.

(此文编辑 李小玲)