

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-06-0430-03

组织蛋白酶 B 及其抑制剂 Cystatin C 在人腹主动脉瘤平滑肌细胞中的表达

向洪洲, 任 为

(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆市 400016)

[关键词] 腹主动脉瘤; 组织蛋白酶 B; Cystatin C; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 观察组织蛋白酶 B 及其抑制剂 Cystatin C 在人腹主动脉瘤平滑肌细胞中的表达情况, 以探讨其在腹主动脉瘤发生发展中的作用。方法 对 21 例腹主动脉瘤患者和 8 例正常腹主动脉尸检者的腹主动脉血管标本行苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色, 观察组织蛋白酶 B 及其抑制剂 Cystatin C 对血管中膜的影响。结果 免疫组织化学染色可见组织蛋白酶 B 和 Cystatin C 分别在腹主动脉瘤、正常腹主动脉中免疫反应阳性, 阳性定位于平滑肌细胞质; 腹主动脉瘤平滑肌细胞中组织蛋白酶 B 阳性细胞平均光密度值明显增高, Cystatin C 明显降低, 与正常腹主动脉之间有显著差异 ($P < 0.01$)。结论 腹主动脉瘤平滑肌细胞中组织蛋白酶 B 表达增强, Cystatin C 表达下降, 组织蛋白酶及其抑制剂 Cystatin C 间的不平衡可能引起动脉瘤壁细胞外基质广泛降解, 从而导致腹主动脉瘤的发生和破裂。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expressions of Cathepsin B and Cystatin C in Smooth Muscle Cells of Abdominal Aortic Aneurysms

XIANG Hong-Zhou and REN Wei

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Abdominal Aortic Aneurysms; Cathepsin B; Cystatin C; Vascular Smooth Muscle Cells

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression and significance of cathepsin B and Cystatin C in vascular smooth muscle cells (VSMC) of patients with abdominal aortic aneurysms (AAA) and to investigate underlying roles in pathogenesis of AAA. **Methods** 21 cases of AAA and 8 cases of normal abdominal aortas were collected in this study. HE staining and immunohistochemical technique were used to evaluate the change of cathepsin B and Cystatin C in the media of AAA.

Results Immune reaction of cathepsin B was positive in the AAA, and immune reaction of Cystatin C was positive in the normal abdominal aortas. The positive cells were mainly localized in the smooth muscle cell (SMC). Image analysis results showed that the MOD value of cathepsin B in SMC of AAA evidently increased while Cystatin C evidently decreased. There were significant differences in cathepsin B and Cystatin C between the AAA and normal abdominal aortas.

Conclusion The expression of cathepsin B promoted and expression of Cystatin C reduced in the SMC of AAA. An imbalance between cysteine cathepsins and their inhibitor may cause the excessive breakdown of extracellular matrix (ECM) in the arterial walls leading to the progression and rupture of AAA.

腹主动脉瘤 (AAA) 是一种以腹主动脉局限性扩张为表现的血管退行性疾病, 可发生栓塞, 致远端肢体缺血坏死或破裂而危及生命。目前认为 AAA 的发生是一个多因素的复杂过程, 遗传、生化、免疫、炎症、血流动力学等多因素参与了 AAA 的形成。组织蛋白酶 B 属于溶酶体半胱氨酸蛋白酶, 能降解细胞外基质, 促进 AAA 的形成。Cystatin C 又称半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白 C, 对组织蛋白酶有较强的抑

制作用。本研究通过检测组织蛋白酶 B 及其抑制剂 Cystatin C 在 AAA 平滑肌细胞 (SMC) 中的表达情况, 探讨组织蛋白酶 B 及其抑制剂 Cystatin C 对 AAA 发病的作用及意义。

1 材料和方法

1.1 组织来源

21 例标本取材于 2005 年 3 月 ~ 2009 年 4 月我院行 AAA 置换术的患者, 男 13 例, 女 8 例, 年龄 40 ~ 78 岁, 平均 62.9 ± 12.0 岁; 瘤体直径在 4.6 cm ~ 7.1 cm 之间, 平均 5.8 ± 0.7 cm。8 例正常动脉组织取自非正常死亡的健康成人尸体, 标本于死亡后

[收稿日期] 2010-01-15 [修回日期] 2010-06-04

[作者简介] 向洪洲, 硕士研究生, 主要从事血管外科基础和临床研究, Email 为 xianghongzhou1010@yahoo.cn。通讯作者任为, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事血管外科基础和临床研究, Email 为 renwei9771@yahoo.com.cn。

立即采集,经大体和镜下病理检查证明为正常腹主动脉。以上标本均经 4% 多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水及石蜡包埋,切片厚度为 5 μm 。

1.2 试剂

兔抗人组织蛋白酶 B(北京博奥森公司);兔抗人 Cystatin C(英国 Abcam 公司);SABC 复合物、DAB 显色液(武汉博士德公司)。

1.3 苏木精-伊红染色

常规脱蜡至水,苏木精染色,盐酸乙醇分化,伊红染色,常规脱水后,中性树胶封闭。

1.4 免疫组织化学染色

常规切片脱蜡入水;0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 微波抗原修复 (92℃ ~ 98℃) 15 min;2% H_2O_2 1 min;正常羊血清封闭,室温 30 min。滴加兔抗人组织蛋白酶 B(1:100)、兔抗人 Cystatin C(1:100),4℃ 冰箱过夜;滴加 SABC 复合物,37℃ 温育 1 h;DAB 显色 5~10 min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。空白对照切片以 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行同步免疫组织化学染色。切片在统一放大倍数 (10×40) 下随机选 4 个视野,输入计算机图像分析系统,分别计算 AAA 组和正常腹主动脉组平滑肌细胞中组织蛋白酶 B 及 Cystatin C 免疫阳性细胞的平均光密度 (MOD) 值。

1.5 统计学方法

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苏木素-伊红染色情况

正常腹主动脉内皮细胞、平滑肌细胞排列整齐,很少出现炎性细胞浸润(图 1A)。AAA 中动脉内膜增厚,部分区域内膜撕裂;中膜层有较多的弹性纤维降解甚至消失,平滑肌细胞排列紊乱、变性、萎缩;动脉壁全层有炎性细胞浸润,尤以动脉外膜最为明显(图 1B)。

2.2 免疫组织化学染色情况

正常腹主动脉平滑肌细胞中组织蛋白酶 B 不表达或轻度表达(图 2A),Cystatin C 免疫反应阳性,位于中膜平滑肌细胞质中,呈棕褐色细或粗颗粒状(图 3A);AAA 平滑肌细胞质内含有棕黄色组织蛋白酶 B 颗粒(图 2B),无明显 Cystatin C 免疫阳性细胞(图 3B)。

2.3 计算机图像分析

与正常腹主动脉比较,AAA 平滑肌细胞中组织

蛋白酶 B 阳性细胞 MOD 值增高,Cystatin C 阳性细胞 MOD 值降低,差异具有显著性 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1 平滑肌细胞中组织蛋白酶 B 和 Cystatin C 阳性细胞 MOD 值 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	例数	视野数	组织蛋白酶 B	Cystatin C
AAA 组	21	84	0.147 $\pm$ 0.027	0.187 $\pm$ 0.041
正常腹主动脉组	8	32	0.323 $\pm$ 0.034 ^a	0.084 $\pm$ 0.026 ^a

a 为 $P < 0.01$ 与正常腹主动脉组比较。



图 1. 苏木素-伊红染色 (×400) 上为正常腹主动脉组,下为 AAA 组。



图 2. 免疫组织化学染色观察组织蛋白酶 B 的表达 (×400) 上为正常腹主动脉组,下为 AAA 组。

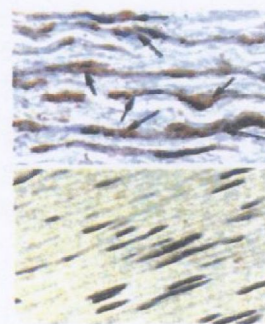


图 3. 免疫组织化学染色观察 Cystatin C 的表达 (×400) 上为正常腹主动脉组,下为 AAA 组。

3 讨论

血管平滑肌细胞 (VSMC) 直接或间接地分泌一些蛋白酶,如基质金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶,这

些蛋白酶对动脉弹力层的构筑和修复起重要作用。组织蛋白酶 B 属于溶酶体半胱氨酸蛋白酶, 是一种有效的哺乳动物弹性蛋白酶和胶原蛋白酶, 具有广谱的水解活性, 存在于 VSMC 及多种溶酶体内, 在降解蛋白质途径中发挥着必不可少的作用, 使蛋白质的合成与降解保持精确的平衡, 损伤或炎症反应可调控其表达^[1]。细胞外基质的主要成分是胶原和弹力蛋白, VSMC 可以合成胶原和弹力蛋白。本研究中, 组织蛋白酶 B 在 AAA 组表达明显增加, 免疫组织化学显示 VSMC 分泌大量组织蛋白酶 B, 而在正常腹主动脉组中是不表达或是低表达组织蛋白酶 B。可能是损伤或血管炎性因子刺激 VSMC 释放组织蛋白酶 B, 组织蛋白酶 B 溶解细胞外基质, 使得动脉瘤细胞外基质中的弹力纤维和胶原分布发生改变, 动脉壁抵抗外界压力的能力降低, 从而导致动脉瘤的形成及最终破裂。一些炎症因子, 如 II-1 、 TNF-2 等的孵化可诱导培养的 VSMC 表达和分泌组织蛋白酶 K 和 $\text{S}^{[2]}$ 。 II-1B 是表达于动脉瘤壁 VSMC 中的一种重要炎症因子, 它可促进脑动脉瘤的进程^[3]。另外一些表达在动脉瘤壁的炎症因子也能参与组织蛋白酶的诱导。

Cystatin C 又称半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白 C, 是一种内源性组织蛋白酶抑制剂^[4]。本研究中, 正常腹主动脉组动脉壁 VSMC 可表达 Cystatin C, AAA 组动脉壁 VSMC 有较低水平的 Cystatin C 表达。AAA 患者血浆 Cystatin C 浓度与 AAA 的大小及其年扩张率呈负相关^[5]。载脂蛋白 E 不足的大鼠 Cystatin C 不足可导致大动脉扩张^[6]和可促进动脉粥样硬化^[7], 这表明 Cystatin C 在 AAA 和动脉粥样硬化中起保护作用。小鼠和人血管壁中膜 SMC 在正常脑动脉也能大量表达 Cystatin C, 其 Cystatin C mRNA 在动脉瘤早期表达减少, Cystatin C mRNA 在动脉瘤成熟期基本不表达, 这种表达模式表明组织蛋白酶及其抑制剂间的不平衡可引起动脉壁细胞外基质降解, 从而导致脑动脉瘤的形成^[8]。最近, 有研究证明在脑动脉瘤中基质金属蛋白酶和基质金属蛋白酶抑制剂之间同样存在不平衡^[9]。但是, 这种负向调

节在组织蛋白酶和 Cystatin C 显得更明显, 因为基质金属蛋白酶抑制剂的表达在动脉瘤形成的早期是正向调节的, 而 Cystatin C 的表达在动脉瘤形成的早期是负向调节的。

总之, 半胱氨酸组织蛋白酶 B 在 AAA 进程的后期表达增强, 相反, 作为半胱氨酸组织蛋白酶的内源性抑制剂, Cystatin C 在 AAA 进程中表达降低。动脉壁上半胱氨酸组织蛋白酶和 Cystatin C 之间的不平衡可引起动脉瘤壁上细胞外基质的广泛降解, 最终导致 AAA 的进展和破裂。已有研究表明半胱氨酸组织蛋白酶抑制剂 NC-2300 可通过抑制由组织蛋白酶缺乏引起的动脉瘤壁上细胞外基质的降解从而阻止脑动脉瘤的进展^[8]。因此, 半胱氨酸组织蛋白酶和 Cystatin C 可成为防止动脉瘤形成和破裂的一种治疗目标。

[参考文献]

- [1] Gerber A, Wille A, Welte T, et al. Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 control expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells [J]. *J Interferon Cytokine Res* 2001; **21** (1): 11-19
- [2] Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, et al. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells [J]. *J Clin Invest* 1998; **102** (3): 576-583
- [3] Moriwaki T, Takagi Y, Sadanaga N, et al. Impaired progression of cerebral aneurysms in interleukin-1 beta-deficient mice [J]. *Stroke* 2006; **37** (3): 900-905
- [4] Hansen T, Petrow PK, Gaumann A, et al. Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium [J]. *J Rheumatol* 2000; **27** (4): 859-865
- [5] Lindholt JS, Erlandsen EJ, Henneberg EW. Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms [J]. *Br J Surg* 2001; **88** (11): 1472-475
- [6] Sukhova GK, Wang B, Libby P, et al. Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice [J]. *Circ Res* 2005; **96** (3): 368-375
- [7] Bengtsson E, To F, Hakansson K, et al. Lack of the cysteine protease inhibitor cystatin C promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25** (10): 2151-156
- [8] Tomohiro Aoki, Hirohisa Kataoka, Ryota Ishibashi, et al. Cathepsin B, K, and S are expressed in cerebral aneurysms and promote the progression of cerebral aneurysms [J]. *Stroke* 2008; **39** (9): 2603-610
- [9] Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, et al. Role of TMP-1 and TMP-2 in the progression of cerebral aneurysms [J]. *Stroke* 2007; **38** (8): 2337-345

(此文编辑 文玉珊)