

## 急性冠状动脉综合征患者血清基质金属蛋白酶 2 水平的检测

孟晓萍<sup>1</sup>, 王超<sup>2</sup>, 孙健<sup>1</sup>, 费瑜<sup>1</sup>, 崔燕<sup>1</sup>, 王莉<sup>1</sup>

(1. 吉林大学附属第二医院心血管内科, 吉林省长春市 130041;

2. 长春市中心医院心内科, 吉林省长春市 130031)

[关键词] 内科学; 基质金属蛋白酶与不稳定性斑块的关系; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 基质金属蛋白酶 2; 急性冠状动脉综合征; 不稳定性斑块

[摘要] 目的 检测急性冠状动脉综合征患者血清基质金属蛋白酶 2 的水平, 探讨其与不稳定性斑块及临床危险度的内在联系。方法 应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western 免疫印迹法分别检测急性冠状动脉综合征患者血清基质金属蛋白酶 2 的水平。其中不稳定型心绞痛组 28 例, 分属低、中、高危 3 个亚组, 急性心肌梗死组 50 例, 正常对照组 50 例, 稳定型心绞痛组 51 例。结果 对照组、稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组和急性心肌梗死组基质金属蛋白酶 2 水平分别为  $236 \pm 33 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$ 、 $224 \pm 23 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$ 、 $455 \pm 51 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$  和  $503 \pm 45 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$ 。急性心肌梗死组和不稳定型心绞痛组分别与稳定型心绞痛组和对照组之间比较, 基质金属蛋白酶 2 水平差异有显著性, 对照组与稳定型心绞痛组之间基质金属蛋白酶 2 水平无统计学差异。4 组之间血清基质金属蛋白酶原水平无明显差别。Western 免疫印迹法也显示了类似的结果。不稳定型心绞痛低危、中危、高危 3 个亚组间比较, 无论是酶原还是活性酶的水平均未发现显著差别。结论 血清基质金属蛋白酶 2 水平在急性冠状动脉综合征患者中明显升高, 提示血清基质金属蛋白酶 2 增高可作为急性冠状动脉综合征的一个危险信号, 但基质金属蛋白酶 2 与急性冠状动脉综合征危险度并无相关性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## The Level of Matrix Metalloproteinase 2 in Patients of Acute Coronary Syndromes

MENG Xiao-Ping<sup>1</sup>, WANG Chao<sup>2</sup>, SUN Jian<sup>1</sup>, FEI Yu<sup>1</sup>, CUI Yan<sup>1</sup>, and WANG Li<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041; 2. Department of Cardiology, Central Hospital of Changchun, Changchun 130031, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase; Unstable Plaque; SDS-PAGE; Western Blotting; Acute Coronary Syndromes; Zymograph

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether serum levels of matrix metalloproteinase (MMP) are associated with the degree of risk in patients with acute coronary syndromes (ACS). **Methods** Using SDS-PAGE Zymography and Western-Blotting, Serum Pro-MMP-2, MMP-2 were measured in 78 patients ACS, 28 with unstable angina (UA) and 50 with acute myocardial infarction (AMI). Control group includes 50 healthy volunteers. 51 cases were in stable angina group. **Results** Serum MMP-2 was significantly increased in both UA ( $455 \pm 51 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$ ) and AMI group ( $503 \pm 45 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$ ) compared with those in control group ( $236 \pm 33 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$ ) and stable angina ( $224 \pm 23 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$ ) ( $P < 0.05$ , respectively) by Zymography. But there was no difference between UA and AMI group ( $P > 0.05$ ), and there were no difference between each two subgroups of UA (which are defined low-risk, mid-risk and high-risk group) in duration time of ischemia, ECG and CK-MB/cTnI. **Conclusions** Increased serum level of activity MMP-2 was detected in patients with ACS. Their findings provide an insight into the unstable plaque association with MMP-2. Serum MMP-2 level appears to be a marker of plaque unstable in patient with acute coronary syndrome.

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)是临床常见的心血管急症, 包括不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)、急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)及急性缺血性心源性猝死<sup>[1]</sup>。

ACS 发病的主要原因是由于冠状动脉粥样硬化斑块不稳定, 发生破裂继发血栓形成, 阻塞管腔所致<sup>[2]</sup>。Brown 等<sup>[3]</sup>发现降脂治疗后急性心脏缺血事件和总死亡率显著降低, 而冠状动脉斑块体积无明显或仅有轻度缩小, 血管腔大小改变并不显著。因而认为冠状动脉病变的严重程度主要由斑块的稳定性而非大小决定。影响斑块稳定性的主要因素包括内皮功能、斑块脂质含量、斑块局部炎症反应程度和血流剪切力的作用<sup>[4]</sup>。目前基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)调控紊乱被认为是引起斑块不稳

[收稿日期] 2005-05-08

[修回日期] 2006-03-13

[作者简介] 孟晓萍, 留美博士后, 教授, 主要研究基质金属蛋白酶与动脉粥样斑块的内在联系, 联系电话为 0431-8796942, E-mail 为 xiaopingmeng@yahoo.com。王超, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病与基质金属蛋白酶。孙健, 硕士, 教授, 主要从事冠心病与炎症因子方面的研究。

定的关键性因素。Galis 等<sup>[5]</sup>发现在动脉粥样硬化斑块中 MMPs 合成活跃,特别是在破裂区域的肩部。巨噬细胞诱导的泡沫细胞产生大量 MMPs,被激活后作用于斑块的纤维帽,降解其基质成分,使脆弱易损的斑块活跃破裂<sup>[7]</sup>。本研究主要探讨观察血清中 MMP-2 的水平与不稳定性斑块及 ACS 危险度的内在关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选择自 2004 年 1 月至 12 月于本院住院的冠心病患者。其中 AMI 患者 50 例,男 36 例,女 14 例,包括下壁心肌梗死 15 例,前间壁并前壁心肌梗死 13 例,广泛前壁心肌梗死 15 例,前间壁并广泛前壁心肌梗死 3 例,高侧壁心肌梗死 4 例,50 例 AMI 患者均伴有血清酶学的改变;AMI 诊断标准 典型胸痛持续 30 min 或以上,④心电图 2 个或 2 个以上导联 ST 段抬高  $\geq 0.1$  mV ( $V_{1-3} \geq 0.2$  mV),④典型的心肌坏死生物化学标记物(cTnI/cTnT)或 CK-MB 的动态改变,符合其中任意两条即可诊断。不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)患者 28 例,诊断包括初发心绞痛、恶化劳力性心绞痛、自发性心绞痛及梗死后心绞痛(变异型心绞痛不入选),危险度分层采用 2001 年中华医学会心血管病分会关于 UA 危险度分层的建议,其中低危组 9 例,中危组 8 例,高危组 11 例。稳定型心绞痛(stable angina, SA)患者 51 例,诊断标准 运动中出现典型心绞痛,④在 R 波占优势的导联上运动后出现水平或下斜型 ST 压低超过或等于 1 mm 持续性 2 min 原有 ST 压低,运动后在原基础上再压低 1 mm 持续性 2 min,④在 R 波占优势的导联上运动后出现 ST 上升(弓背向上型)超过 3 mm,符合上述之一即可诊断。患者均于胸痛发作 1~6 h 内急诊入院,所有患者均除外肿瘤、感染性疾病、自身免疫性疾病和肝肾疾病。对照组为 50 例健康体检者,无糖尿病、无心血管病及肝肾疾病。所有研究对象基线特征见表 1。

所有患者入院后即刻采集肘静脉血 2 mL。所有血样均于采集后立即离心提取血清,储存于 -70℃冰箱中待测。

所有患者入院后即刻采集肘静脉血 2 mL。所有血样均于采集后立即离心提取血清,储存于 -70℃冰箱中待测。

表 1. 各组临床基线特征的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	对照组	UA 组			SA 组	AMI 组
		低危	中危	高危		
例数	50	11	8	9	51	50
年龄	53.2±3.8	57.5±10.1	56.1±8.7	60.1±7.4	54±2.8	57.4±6.5
男/女	25/15	8/3	6/2	7/2	30/21	36/14
吸烟	12	7	4	6	18	29
高血压	0	5	6	7	5	26
糖尿病	0	0	1	2	4	6
TC (mmol/L)	3.9±0.8	5.0±1.0	5.2±0.9	5.1±0.8	3.8±0.7	5.3±0.7
TG (mmol/L)	1.5±0.7	1.6±0.5	1.6±0.9	1.7±0.5	1.6±0.8	1.8±0.6
HDL (mmol/L)	1.2±0.5	1.1±0.7	0.9±0.6	1.0±0.4	1.2±0.4	0.8±0.5

### 1.2 酶图分析(SDS-Page-Zymograph)

10% Polyacrylamide 胶中含有 1 g/L Gelatin,应用同等量血清蛋白(40 μg)行蛋白电泳。电泳结束后把蛋白胶放入 2.5% Triton X-100 清洗 20 min,然后将蛋白胶放入培养基中(50 mmol/L Tris-HCL, pH7.4, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Brij35), 37℃水浴箱孵育 24 h。Colloidal Brilliant BlueG-250 染色 60 min。MMPs 在胶中显示白色区带,根据分子量判定酶原和酶。根据目的带的亮度和面积用 NIH image 1.57 software

程序自动读取并记录每条带密度的相对定量值,单位用 INT•mm<sup>2</sup> 表示<sup>[6,7]</sup>。

### 1.3 Western 印迹法

40 μg 血清蛋白运行在 10% 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离。然后把胶中的蛋白转印到硝酸纤维素膜上(Nitrocellulose Bio-Rad), 1% PBS(含有 0.1% Tween20 和 5% 无脂奶粉)封闭非特异性结合位点。Anti-MMP-2 单克隆抗体(oncogene sience) 1:500 稀释。应用化学发光反应(ECL)试剂

盒(Amersham 公司)显示特异性抗原。

#### 1.4 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。对照组与 UA 组、SA 组、AMI 组间及 UA 各亚组间比较行单因素方差分析(ANOVA), 每 2 组间比较行  $q$  检验, 应用 prism 3.03 统计分析程序进行分析, 双侧检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 酶谱法检测各组血清中基质金属蛋白酶 2 水平的比较

对照组与 SA 组比较 MMP-2 无统计学差异, AMI 组与 SA 组比较 MMP-2 增高 239% ( $P < 0.001$ ), UA 组与 SA 组比较, MMP-2 增高 205% ( $P < 0.001$ ), UA 组与 AMI 组比较有增高趋势, 但统计学分析无意义 ( $P > 0.05$ )。4 组酶原 pro-MMP-2 表达差异无显著性(图 1 和表 2)。

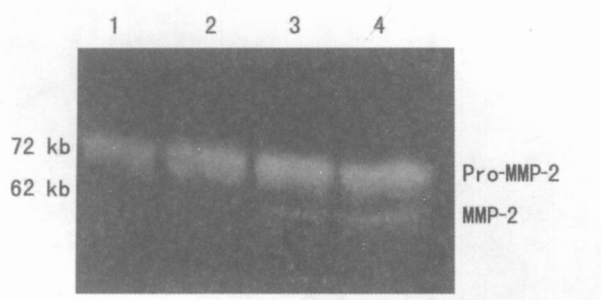


图 1. 酶谱法检测各组基质金属蛋白酶 2 酶原(72 kDa)及活性酶(62 kDa) 1 为对照组, 2 为稳定型心绞痛组, 3 为不稳定型心绞痛组, 4 为急性心肌梗死组。

表 2. 酶谱法检测各组间血清基质金属蛋白酶 2 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 单位  $\text{INT} \cdot \text{mm}^2$ )

分 组	pro-MMP-2	MMP-2
对照组	1 001 $\pm$ 15	236 $\pm$ 33
SA 组	1 112 $\pm$ 21	224 $\pm$ 21
UA 组	1 128 $\pm$ 34	455 $\pm$ 51 <sup>a</sup>
AMI 组	1 238 $\pm$ 21	503 $\pm$ 45 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与 SA 组比较。

### 2.2 Western 印迹法检测各组血清中基质金属蛋白酶 2 水平的比较

Western 印迹法也显示了与酶谱法检测类似的结果, 即 4 种酶原表达差别无统计学意义, MMP-2 水平 AMI 组与 SA 组比较增高约 230% ( $P < 0.001$ ), UA 组与 SA 组比较增高约 204% ( $P < 0.001$ ), UA

组与 AMI 组 MMP-2 表达差别则无统计学意义(图 2 和表 3)。

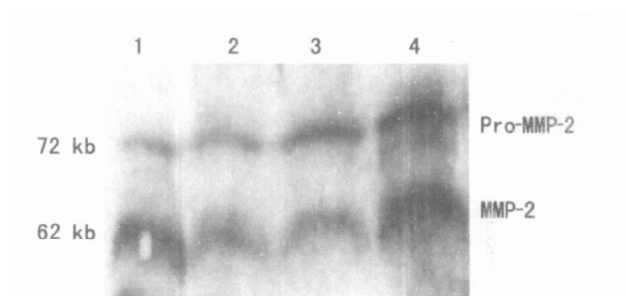


图 2. Western 印迹法检测各组基质金属蛋白酶 2 酶原(72 kDa)及活性酶(62 kDa) 1 为对照组, 2 为稳定型心绞痛组, 3 为不稳定型心绞痛组, 4 为急性心肌梗死组

表 3. Western 印记法检测各组间血清基质金属蛋白酶 2 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 单位  $\text{INT} \cdot \text{mm}^2$ )

分 组	pro-MMP-2	MMP-2
对照组	1 400 $\pm$ 24	259 $\pm$ 32
SA 组	1 421 $\pm$ 25	258 $\pm$ 31
UA 组	1 411 $\pm$ 30	507 $\pm$ 46 <sup>a</sup>
AMI 组	1 511 $\pm$ 31	571 $\pm$ 46 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与 SA 组比较。

### 2.3 不稳定型心绞痛各亚组间基质金属蛋白酶 2 表达的比较

不稳定型心绞痛低危组、中危组和高危组之间比较, 对酶原和活性酶进行单因素方差分析, 均未发现差异有统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 4. 不稳定型心绞痛各亚组间基质金属蛋白酶 2 表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 单位  $\text{INT} \cdot \text{mm}^2$ )

分 组	pro-MMP-2	MMP-2
UA 低危组	1 436 $\pm$ 64	456 $\pm$ 70
UA 中危组	1 426 $\pm$ 77	439 $\pm$ 34
UA 高危组	1 446 $\pm$ 70	466 $\pm$ 63

## 3 讨论

冠状动脉斑块破裂, 触发血栓形成是导致 ACS 的一个主要原因。粥样斑块纤维帽的完整性及抗张强度是决定斑块是否易于破裂的关键因素<sup>[8]</sup>。纤维帽主要由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组成, 成分主要是胶原, 具有弹性和韧性, 其他还包括弹性蛋白、非胶原糖蛋白及蛋白多糖。ECM 合成减

少或降解增多使斑块的完整性受损,纤维帽抗张强度减弱,导致斑块破裂<sup>[9]</sup>。基质金属蛋白酶在这个过程中起着关键的作用。MMP 是一种  $Zn^{2+}$  依赖的蛋白酶超家族,目前已知有 23 个家族成员,能与特异性降解细胞外基质的某种成分相结合,如胶原蛋白和弹力蛋白等,并降解血管壁的基底膜,使中层血管平滑肌细胞迁移和增殖。其中 MMP-2 及 MMP-9 起重要的作用。研究表明许多炎症因子可以强有力地刺激巨噬细胞及血管平滑肌细胞中 MMP-2 的表达<sup>[10,11]</sup>。斑块纤维帽的肩部有大量巨噬细胞和巨噬细胞诱导的泡沫细胞分泌的 MMP-2<sup>[12,13]</sup>。研究显示巨噬细胞诱导的泡沫细胞分泌的 MMP-2 和 MMP-9 使动脉粥样硬化斑块纤维帽处的胶原破裂,而 MMP 的抑制剂 TIMPs 部分地阻断此过程<sup>[14,15]</sup>。Pasterkamp 等<sup>[16]</sup>在对人正常动脉和动脉粥样硬化斑块进行对比分析时发现,正常动脉壁和斑块都含有 MMP-2 酶原,但正常动脉壁 MMP-2 表达很低,而动脉粥样硬化斑块内含有较多 MMP-2。文献<sup>[17-20]</sup>报道 ACS 患者血清 MMP-2 和血浆 MMP-9 明显升高,并发现运动诱发典型心肌缺血后并不改变外周血的 MMP-2 和 MMP-9 水平。

本研究结果发现 AMI 组及 UA 组与正常对照组比较酶原无明显差别,而活性 MMP-2 分别升高 2~3 倍( $P < 0.05$ ),与近期国外报道一致。本研究还比较了 UA 组与 AMI 组之间以及 UA 按危险度分层的 3 个亚组之间 MMP-2 表达的差别,但均无统计学意义。推测虽然 MMP 活化、降解基质的作用削弱了斑块纤维帽,但斑块破裂也受其他因素的影响:如剧烈活动、情绪激动、寒冷及药物所致的交感神经系统激活使血压升高、心率加快及心肌收缩力加强,导致斑块承受的机械应力明显增加达到某一临界点致使斑块破裂<sup>[18]</sup>。UA 的另一种类型——动力性阻塞(冠状动脉收缩)在 ACS 中也占有一定比例,而随机入选的病例无法完全剔除。因而根据心绞痛类型、胸痛时间、心电图、心肌酶学改变和肌钙蛋白 I 等条件确定的危险度与 MMP-2 水平可能不存在线性相关。综上所述,急性冠状动脉综合征患者血清 MMP-2 水平明显升高,与 ACS 危险度无相关性,可以认为 MMP 是有前途的监测不稳定性斑块的血清学指标。

#### [参考文献]

- [1] Shak PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture[J]. *Circulation*, 1995, **92**: 1565-569
- [2] Lendon CL, Daies MJ, Born GV, Richardson PD. Atherosclerotic plaque apses are locally weakened when macrophages density is increased[J]. *Atherosclerosis*, 1991, **87**: 87-90
- [3] Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease[J]. *Circulation*, 1993, **87**: 1781-791
- [4] Libby P. Molecular basis of the acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 1995, **91**: 2844-850
- [5] Galis ZS, Sukhova GK, Kranszhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cell from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 402-406
- [6] Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases[J]. *Anal Biochem*, 1994, **218** (2): 325-329
- [7] 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
- [8] Moreno PR, Falk E, Palacios IF. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 1994, **90**: 775-778
- [9] De Korte CL, van der Steen AF. Characterization of plaque components and vulnerability with intravascular ultrasound elastography[J]. *Phys Med Biol*, 2000, **45**: 1465-475
- [10] 沈彬, 吴宗贵. C 反应蛋白对 U937 细胞表达基质金属蛋白酶 2 的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 25-28
- [11] 王长谦, 汤大明, 谢秀兰, 徐依敏, 丁弘毅, 王利民, 等. 氧化型低密度脂蛋白对入血单核细胞基质金属蛋白酶表达及活性的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 126-130
- [12] Watanabe N, Ikeda U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Current Atherosclerosis Reports[J]. *J Article Review*, 2004, **6** (2): 112-120
- [13] Fukuda D, Shinada K, Tanaka A, Kusuyama T, Yamashita H, Ehara S, et al. Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris versus stable angina pectoris[J]. *Am J Cardiol*, 2006, **97** (2): 175-180
- [14] Nakaya R, Uzui H, Shimizu H, Nakano A, Mitsuke Y, Yamazaki T, et al. Pravastatin suppresses the increase in matrix metalloproteinase-2 levels after acute myocardial infarction[J]. *Inter J Cardio*, 2005, **105** (1): 67-73
- [15] Shah PK, Falk E, Badimon JJ. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture[J]. *Circulation*, 1995, **92**: 1585-189
- [16] Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hiinen DI. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery[J]. *Atherosclerosis*, 2000, **150** (2): 245-253
- [17] Yanagi H, Sasaguri Y, Sugama K. Production of tissue collagenase (matrix metalloproteinase-1) by human aortic smooth muscle cell in response to platelet-derived growth factor[J]. *Atherosclerosis*, 1991, **91**: 207-216
- [18] Moreno PR, Falk E, Palacios IF. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 1994, **90**: 775-778
- [19] Sasaguri Y, Murahashi N, Sugama K. Development-related changes in matrix metalloproteinase expression in human aortic smooth muscle cell[J]. *Lab Invest*, 1994, **71**: 261-269
- [20] 陈祥新, 傅国胜, 徐耕, 单江. 急性冠状动脉综合征患者血清基质金属蛋白酶 2 的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 363-366

(此文编辑 朱雯霞)