

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.14.010

文章编号: 1005-8982(2016)14-0048-04

论著

缝隙连接蛋白 43 与基质金属蛋白酶 9 在人股动脉粥样硬化斑块中表达分析

王耀磊, 周志强, 吴成稳, 李祥波, 李飞

(郑州大学第二附属医院 血管外科, 河南 郑州 450014)

摘要:目的 探讨缝隙连接蛋白 43(CX-43)与基质金属蛋白酶 9(MMP-9)在人股动脉粥样硬化(AS)斑块中的表达及其与斑块稳定性关系。**方法** 收集股动脉内膜剥脱术后所得 AS 斑块标本 47 例,正常脾动脉、肠系膜上动脉组织标本 21 例作为对照组。根据术前彩超及术后病理检查结果进行分组:稳定斑块组(22 例)和不稳定斑块组(25 例),免疫组织化学 SP 法检测各标本中 CX-43 和 MMP-9 的表达以及两者之间的相关性。**结果** CX-43 和 MMP-9 蛋白在对照组、稳定斑块组及不稳定斑块组中的表达均有差异($F_{CX-43}=662.971$, $F_{MMP-9}=397.716$),差异有统计学意义($P<0.05$)。和对照组比较,斑块组 CX-43 和 MMP-9 表达均增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。不稳定斑块组较稳定斑块组 CX-43 和 MMP-9 表达明显增强,且差异有统计学意义($P<0.05$)。相关性研究结果显示,CX-43 和 MMP-9 在 AS 组表达呈正相关($r_{\text{稳定斑块组}}=0.640$, $P<0.05$; $r_{\text{不稳定斑块}}=0.715$, $P<0.05$),对照组研究结果提示 CX-43 与 MMP-9 无明显相关性。**结论** CX-43 和 MMP-9 蛋白表达的上调促进人股动脉粥样硬化斑块形成以及斑块组织的不稳定性。

关键词: 动脉粥样硬化;缝隙连接蛋白 43;基质蛋白酶 9

中图分类号: R654.3;R543.5

文献标识码: A

Expression of CX-43 and MMP-9 in atherosclerotic plaques of human femoral artery

Yao-lei Wang, Zhi-qiang Zhou, Cheng-wen Wu, Xiang-bo Li, Fei Li

(Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital Of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China)

Abstract: Objective To discuss the expression levels of CX-gap junction protein 43 (CX-43) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in atherosclerotic plaques of human femoral artery, and their correlations with the stability of the plaques. **Methods** Totally 68 specimens were collected, of which 47 atherosclerotic plaque specimens were from patients who underwent femoral artery endarterectomy (experimental group) and 21 specimens were from normal splenic artery or superior mesenteric artery (control group). Then the 47 atherosclerotic plaque specimens were divided into stable-plaque group (22 cases) and unstable-plaque group (25 cases) according to ultrasonography and pathological results. Using immunohistochemical SP method the expression levels of the CX-43 and the MMP-9 were detected, and their relationship was investigated. **Results** There were significant differences in the expression levels of CX-43 and MMP-9 among the control group, the stable plaque group and the unstable plaque group ($F_{CX-43} = 662.971$, $P < 0.05$; $F_{MMP-9} = 397.716$, $P < 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of CX-43 and MMP-9 in the atherosclerosis group were significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of CX-43 and MMP-9 in the unstable plaque group were significantly higher than those in the stable plaque group ($P < 0.05$). The result of the correlation research showed that the expression levels of CX-43 and MMP-9 in the atherosclerosis groups were positively correlated ($r_{\text{stable}} = 0.640$, $P < 0.05$; $r_{\text{unstable}} = 0.715$, $P < 0.05$), but they had no

收稿日期: 2016-01-26

[通信作者] 周志强, E-mail: qiang6364@sohu.com; Tel: 13937104760

significant correlation in the control group. **Conclusions** Up-regulation of CX-43 and MMP-9 protein expressions could promote the formation of atherosclerosis plaques in human femoral artery and cause instability of the plaque tissue.

Keywords: atherosclerosis; CX-gap junction protein 43; matrix metalloproteinase 9

近年来随着生活水平的提高、运动量减少及人口老龄化的加快,动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)发病率逐年升高,已严重威胁人类健康。下肢动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis obliterans, ASO)是 AS 局部表现,一般表现为间歇性跛行、静息痛、坏疽甚至面临截肢风险,因此探究 AS 病因及发病机制、寻找预防和治疗手段、提高生存率、降低截肢率并改善患者生活质量意义重大。缝隙连接蛋白 43(connexin 43, CX-43)是一种六聚体亲水性蛋白,巨噬、平滑肌、血管内皮以及成纤维细胞通过其达成信息和物质交流,其关键作用点在于促进血管内皮的损伤、泡沫细胞形成、平滑肌细胞增殖和内迁以及不稳定斑块形成。基质蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP-9)又名明胶酶 B,主要作用于由胶原、蛋白聚糖及糖蛋白组成网状结构的细胞外基质,从而引起动脉粥样硬化不稳定斑块的形成、纤维帽破裂、血栓形成等一系列继发性病变。本实验旨在通过研究 CX-43 和 MMP-9 在动脉粥样硬化斑块中表达情况,探讨两者表达变化在 AS 发生发展中作用机制以及可能的治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集郑州大学第二附属医院 2013 年 9 月-2015 年 11 月通过股动脉内膜剥脱术获得的股 AS 斑块标本 47 例。其中,男性 29 例,女性 18 例。另外收集因腹部外伤、门静脉高压行脾脏切除术以及胃肠道手术获得完整脾动脉、肠系膜上动脉标本共 21 例(对照组)。其中,男性 15 例,女性 6 例。每位患者术前均已签署《股 AS 斑块手术标本研究知情同意书》,术中标本离体后迅速置于液氮保存,石蜡包埋切片备检。

1.2 标本分组及染色

根据彩超及病理检测结果将收集的标本分组,对照组(21 例)、稳定斑块组(22 例)及不稳定斑块组(25 例),然后常规进行固定、脱水包埋、切片(厚 4 μ m/张)、脱蜡、水化、最后苏木素-伊红(HE)染色。

1.3 方法与仪器设备

采用链霉菌抗生物素酶蛋白-过氧化物酶(SP)免疫组织化学法,具体步骤参照 SP 试剂盒说明书。光学显微镜下观察股动脉斑块组织和正常动脉,可见:以可见棕黄色或棕褐色颗粒作为 CX-43 和 MMP-9 蛋白阳性表达标准。每张图片取 5 个视野进行图像采集,应用 IPP 6.0 测量计算所采集切片积分吸光度值,该样本被测蛋白的表达以 5 个视野的平均值表示。兔抗人 CX-43 单克隆抗体、兔抗人 MMP-9 单克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司,切片图像采集应用 Iecia 显微照相系统(德国 Iecia 公司),应用 Biosens Digital Imaging System v1.6(上海山富科学仪器有限公司)对所采集切片的阳性细胞积分吸光度值(integral optical density, IOD)进行计算,求出其平均值作为该样本蛋白阳性表达量。SP900 试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)试剂盒均购自北京中杉生物工程有限公司。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组间做比较采用单因素方差分析, Bonferroni 法两两比较,股 AS 斑块中 CX-43 和 MMP-9 蛋白表达做相关性分析时采用 Pearson 法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人股动脉粥样硬化斑块病理检测结果

对照组脾动脉和肠系膜上动脉内皮细胞整齐,内膜光滑且内、中、及外 3 层膜结构均完整存在。稳定斑块组脂质核心区小于斑块面积 40%,光镜下内皮细胞紊乱无序,纤维帽较厚,相对较少的泡沫及炎症细胞及钙化灶存在;不稳定斑块组脂质核心区较大,超过斑块面积 40%,内皮细胞排列呈偏心性,较薄的纤维帽,相对较多的炎症、泡沫细胞,斑块基底可见大量新生血管和胆固醇结晶。

2.2 股 AS 斑块组织、正常动脉组织中 CX-43 与 MMP-9 表达比较

MMP-9 和 CX-43 蛋白主要表达在单核-巨噬细胞、泡沫细胞以及血管平滑肌细胞中。其中

CX-43 蛋白在炎症细胞浸润区及血管分叉处内皮细胞中表达尤其明显。(见附表、附图)。

CX-43 和 MMP-9 蛋白表达:与对照组比较,斑块组表达升高,且两者在稳定斑块组表达明显弱于不稳定斑块组 ($F_{CX-43}=662.971, P<0.05, F_{MMP-9}=397.716, P<0.05$), (见附表、附图)。

2.3 相关性分析

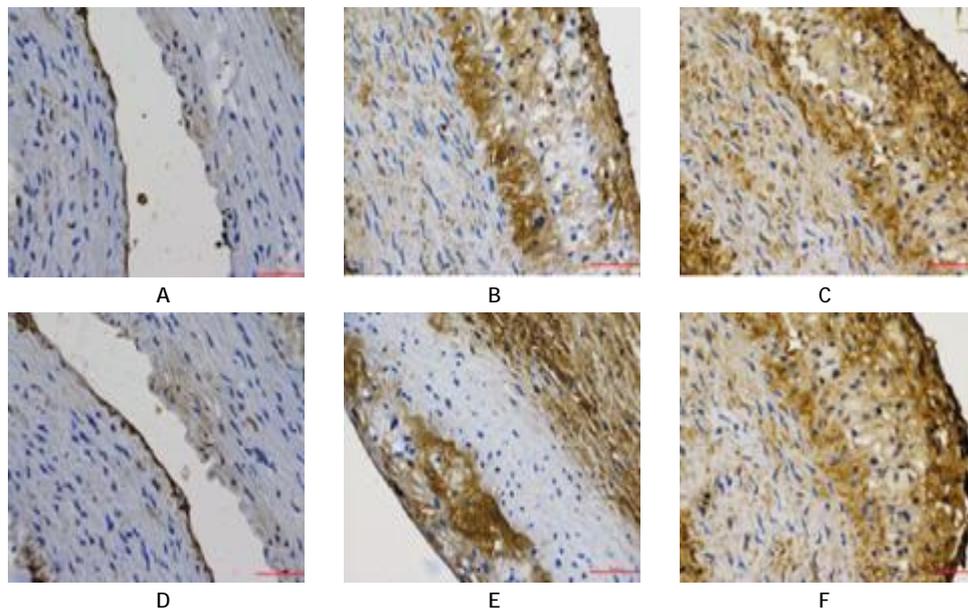
CX-43 与 MMP-9 蛋白在稳定斑块组表达呈正相关($r=0.640, P<0.05$), 不稳定斑块组中也具有正

相关关系($r=0.715, P<0.05$)。

附表 各组标本中 CX-43 与 MMP-9 蛋白的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CX-43 蛋白	MMP-9 蛋白
对照组	21	1.954 ± 0.082	1.964 ± 0.009
稳定斑块组	22	2.061 ± 0.034 ¹⁾	2.077 ± 0.031 ¹⁾
不稳定斑块组	25	2.248 ± 0.032 ¹⁾²⁾	2.169 ± 0.027 ¹⁾²⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$; 2)与稳定斑块组比较, $P<0.05$



A: 对照组CX-43 蛋白; B: 稳定斑块组CX-43 蛋白; C: 不稳定斑块组CX-43 蛋白; D: 对照组MMP-9 蛋白; E: 稳定斑块组MMP-9 蛋白; F: 不稳定斑块组MMP-9 蛋白

附图 各组标本中 CX-43 和 MMP-9 蛋白的表达 (SP, × 400)

3 讨论

AS 是动脉壁慢性炎症反应过程^[1], 其本质是脂质沉积、泡沫细胞生成、内膜局灶状纤维化和粥样硬化斑块形成, 最终导致一系列继发性病变。CX-43 是一种六聚体亲水性蛋白, 巨噬、平滑肌、血管内皮以及成纤维细胞中通过其达成信息和物质交流, 其中 CX-43 蛋白与 AS 关系最密切, 血流剪切力较大部位如血管分叉处表达尤其明显^[2], 内皮细胞受损导致细胞因子、生长因子以及血管活性物质分泌失调, 进而引起平滑肌增殖和迁徙^[3]。平滑肌细胞以表型转化方式通过内弹力膜向内膜增生和迁徙, 后经受体介导的方式吞噬脂质, 肌源性泡沫细胞形成, 以上过程均体现在国外学者研究中。平滑肌细胞增生迁徙形成粥样斑块纤维帽, 同时细胞中 CX-43 表达上调, 该结果提示 CX-43 过表达在平滑肌增生和迁徙

过程中发挥关键作用。单核细胞与内皮细胞发生黏附, 由中膜内迁至内膜后, 转化为巨噬细胞并经受体介导吞噬大量氧化变性的低密度脂蛋白, 大量胆固醇被摄入, 单核源性泡沫细胞形成^[4-6], 该过程往往发生在血管内皮损伤或炎症反应后。国外学者对 AS 发病机制研究后发现, 对内皮细胞采用选择性敲除 CX-43 基因等手段, 可减少黏附分子表达, 进而减少单核 - 内皮细胞的黏附与迁徙^[7]。大量氧化低密度脂蛋白在巨噬细胞释放活性氧后生成, 进而使平滑肌源、单核细胞源泡沫细胞均崩解坏死, 形成糜粥样坏死物。近年来研究发现, CX-43 通过 Ras 基因家族的 RhoA 影响巨噬细胞的胞吞作用, 因而间接证实巨噬细胞摄取氧化低密度脂蛋白的增多由 CX-43 表达增多所致^[8]。另外由巨噬细胞分泌的基质金属蛋白酶激活后具有生物活性, 分解基质削弱

粥样硬化纤维蛋白帽,是不稳定斑块的形成、纤维帽的破裂及血栓形成的主要原因。

MMP-9 又名明胶酶 B,是具有 Zn^{2+} 离子依赖性的肽链内切酶,主要作用于由胶原、蛋白聚糖及糖蛋白组成的网状结构细胞外基质。MMP-9 首先以无活性酶原的形式分泌到细胞外,CatS 将其前驱肽链水解,封闭 Zn^{2+} 活性中心的半胱氨酸脱离,MMP-9 激活完成,MMP-9 活化后可降解细胞外基质重要成分,基膜 IV 型胶原,引起斑块 ECM 降解大于合成^[9],进而导致血管壁屏障破坏,其与单核、平滑肌细胞增生和内迁、低密度脂蛋白的沉积关系密切,另外分解基质削弱粥样硬化纤维蛋白帽,是不稳定斑块的形成、纤维帽的破裂及血栓形成的主要原因^[10]。国外学者对动脉粥样硬化致颈动脉狭窄患者抽血研究表明,MMP-9 在不稳定斑块组患者血浆中表达明显,进一步证实 MMP-9 致斑块不稳定作用^[11]。本实验结果显示:与对照组比较,CX-43 和 MMP-9 表达量在斑块组较高,且两者在稳定斑块组表达明显弱于不稳定斑块组,同时相关性分析结果显示,在 AS 形成过程中两者正相关,且就相关系数(r)而言稳定斑块组明显低于不稳定斑块组,以上结果均提示 CX-43 和 MMP-9 蛋白与 AS 疾病发生发展关系密切。有国外学者研究表明激活的单核细胞通过增强 CX-43 构建的缝隙连接通道而释放基质金属蛋白酶^[12],该结论正好与本实验中 CX-43 与 MMP-9 正相关相符。缝隙连接的建立来源于 CX-43 的高表达,单核细胞激活后通过该通道,以电信号、化学信号的形式将信息传递至周围细胞,从而引起单核细胞的瀑布效应,导致更多的 MMP-9 形成,最终以不稳定斑块的形成、纤维帽的破裂、以及血栓的形成结局。

综上所述,股 AS 的形成是多方面原因共同作用结果,抑制或者拮抗 CX-43 与 MMP-9 的表达可减缓 AS 发展、增加斑块稳定性,以上这些都为临床治疗动脉粥样硬化提供了新思路及治疗靶点。

参 考 文 献:

- [1] 蒋米尔,赵振. 动脉粥样硬化实验研究的热点与展望[J]. 中华实验外科学杂志, 2014, 31(4): 699-701.
- [2] BRISSET A C, ISAKSON B E, KWAK B R. Connexins in vascular physiology and pathology [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(2): 267-282.
- [3] LI I, DAI M. The cause of atherosclerosis: secretory dysfunction in vascular endothelial cells and proliferation of smooth muscle cells[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26(2): 155-158.
- [4] LEGEIN B, TEMMERMAN L, BIESSEN E A, et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20): 3847-3869.
- [5] TEDGUI A, MALLAT Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2): 515-581.
- [6] YUAN D, WANG Q, WU D A. Monocyte-endothelial adhesion is modulated by CX-43-stimulated ATP release from monocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(3): 536-541.
- [7] KWAK B R, VEILLARD N, PELLI G A. Reduced connexin 43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, 107(7): 1033-1039.
- [8] ANAND R J, DAI S, GRIBAR S A. A role for connexin 43 in macrophage phagocytosis and host survival after bacterial peritoneal infection[J]. *J Immunol*, 2008, 181(12): 8534-8543.
- [9] 吴成稳,周志强,王耀磊,等. 基质蛋白酶-9 及组织蛋白酶 S 在人股动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. 中华实验外科学杂志, 2015, 32(5): 1137-1139.
- [10] ARMSTRONG E J, MORROW D A, SABATINE M S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part IV: matrix metalloproteinases and biomarkers of platelet activation[J]. *Circulation*, 2006, 113(1): 382-385.
- [11] ALVARET B, RUIZ C, CHACON P, et al. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis [J]. *J Vasc Surg*, 2004, 3(40): 469-475.
- [12] EUGENIN E A, BRANES M C, BERMAN J W, et al. TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin 43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses [J]. *J Immunol*, 2003, 170(1): 1320-1328.

(张蕾 编辑)