论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0792-03

基质金属蛋白酶-2在兔颈动脉内膜损伤后动脉粥样硬化斑块中的表达

赵 瑾[1],迟路湘[1],陈德英[2] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科,重庆市介入脑血管病学研究所,[2]慧康组织学技术中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察基质金属蛋白酶-2在兔颈动脉内膜损伤后动脉粥样硬化斑块中的表达。**方法** 高脂喂养加气体干燥术建立兔颈动脉内膜损伤模型,将实验动物分为正常饲料组;高脂饲料组;高脂饲料加气体干燥术后1个月组,2个月组,3个月组。用免疫组织化学法检测各组的金属蛋白酶-2表达情况。**结果** MMP-2在普通饲料组兔颈动脉组织中低水平表达;在高脂喂养组和高脂喂养加气体干燥术组兔颈动脉组织中表达水平升高,两组有非常显著的差异($P<0.01$),且高脂加气体干燥组1个月组与2个月组,1个月组与3个月组有非常显著的差异($P<0.01$),2个月组与3个月组有显著差异($P<0.05$)。高脂组1个月组与3个月组有显著差异($P<0.05$)。**结论** MMP-2随着兔颈动脉内膜损伤后时间的延长,动脉粥样硬化斑块的生长表达增多。

关键词: 动脉粥样硬化;基质金属蛋白酶-2;兔

中图法分类号: R322.121;R345;R543.502 **文献标识码:** A

MMP-2 expression in atherosclerosis plague after injury of carotid intima

ZHAO Jin[1], CHI Lu-xiang[1], CHEN De-ying[2] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Huikang Histology Technique Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of MMP-2 in rabbit carotid artery injured by airing drying. **Methods** Fifty-four rabbits were assigned to normal diet ($n=18$), fat diet ($n=36$), 18 of fat diet rabbits underwent airing drying of carotid intima after one-week fat diet. Then fed on fat diet after operation. All animals were sacrificed respectively at 1, 2, 3 months after airing drying ($n=6$ at each time piont), and MMP-2 expression was evaluated by immunohistochemistry. **Results** MMP-2 expression was low in the carotid of normal diet group, high in the fat diet group including the rabbits underwent airing drying with significant difference between them ($P<0.01$). There was significant difference of MMP-2 expression at 1 month and 2 month ($P<0.01$), 1 month and 3 month ($P<0.01$), 1 month and 3 month ($P<0.05$) in fat diet rabbits underwent airing drying, at 1 month and 3 month in only fat diet rabbits ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of MMP-2 is elevated with the time prolongation after injury and the growing of atherosclerosis plaque.

Key words: atherosclerosis; MMP-2; rabbit

基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2)又称明胶酶A,它表达广泛,能够降解明胶、多种胶原和基底膜成分,对于平滑肌细胞的增殖和迁移起着重要作用[1]。本实验用高脂喂养加气体干燥术建立兔颈动脉内膜损伤动物模型,并观察基质金属蛋白酶-2在兔颈动脉内膜损伤后动脉粥样硬化斑块中的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性日本大耳白兔54只,体质量2.3~3.0 kg,4个月龄,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 胆固醇、花生油、精密气体流量计、MMP-2试剂盒。

1.2 实验动物分组及不同处理

将动物按抽签法随机分为3组,分别为正常饲料组($n=18$),喂普通颗粒兔饲料;高脂饲料加气体干燥术组($n=18$),喂含按2%胆固醇、6%花生油的颗粒兔饲料,1周后实施颈动脉内膜气体干燥术,术后继续高脂饲料喂养,分别于术后第1、2、3个月各处死6只;单纯高脂饲料组($n=18$),除不实施内膜干燥术外,处理均同高脂饲料加空气干燥术组,于相对应的时间点各处死6只。所有动物均单笼喂饲,饮水不限,自由摄食,每日每只进食150 g饲料。

1.3 内膜气体干燥术的实施

速眠新0.2 ml/kg肌肉注射麻醉动物,颈部脱毛清洁消毒后,作颈正中切皮,于甲状软骨上方水平分离右侧颈总动脉,长约2.5 cm,两端以动脉夹阻断血流。4.5号头皮针尽可能平行

作者简介:赵 瑾(1978-),女,河南省洛阳市人,硕士研究生,主要从事缺血性脑血管疾病介入诊断和治疗方面的研究。电话:13527525132

通讯作者:迟路湘,电话:(023)68754154

收稿日期:2005-10-17;修回日期:2005-12-25

于血管纵轴方向穿刺阻断血管的两端，生理盐水冲洗置换出管腔内的血液后，接上已调节好流量为 250 ml/min 的气流，历时 5 min 造成内皮干燥，然后管腔内重新充满生理盐水，放开临时动脉夹恢复血流。湿润棉片轻轻压迫穿刺点 3 ~ 5 min 止血。庆大霉素滴于手术野中，缝合皮肤创口并包扎。术后肌注庆大霉素[2,3]。

1.4　血管造影颈动脉狭窄程度的判定

各实验组到达设计时间点后，速眠新 0.2 ml/kg 肌肉注射麻醉动物，经右股动脉插管，肝素抗凝，使用 300 g/L 的碘普罗胺造影剂行压力控制的颈动脉血管造影。以软件精确测量造影片每根颈动脉最狭窄区的最小残腔直径（DMS）和狭窄远端正常颈总动脉直径（DCC）。狭窄率 =（DCC - DMS）/DCC × 100%，狭窄程度的判定：狭窄率 < 30% 为轻度狭窄，30% ~ 69% 为中度狭窄，70% ~99% 为重度狭窄，100% 为闭塞。

1.5　病理标本的留取

各实验组到达设计时间点后，速眠新过量麻醉动物，经心脏插管，4% 多聚甲醛灌注固定后取下颈总动脉，4% 甲醛固定后 24 h 后行常规石蜡切片，切片厚度 5 μm。

1.6　免疫组织化学检测

一抗 MMP-2 购自武汉博士德公司，工作浓度为 1∶100，S-P 9000 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。蜡片 60 ℃烤片 1 h，常规脱蜡至水。3% H_2O_2 室温 5 ~ 10 min，蒸馏水洗 3 次，微波热修复抗原，0.1 ml/L PBS 缓冲液 5 min 冲洗 3 次。羊血清封闭 37 ℃孵育 20 min，滴加一抗（1∶100），37 ℃孵育 15 h，0.01 ml/L PBS 缓冲液 5 min 冲洗 3 次。滴加生物素化羊抗兔二抗，37 ℃孵育 20 min，0.01 ml/L PBS 缓冲液 5 min 冲洗 3 次，滴加辣根过氧化酶标记的链霉素卵白素液，37 ℃孵育 15 min，0.01 ml/L PBS 缓冲液 5 ml 冲洗 3 次。DAB 显色。镜下控制显色时间。苏木精复染，脱水，透明，封固。

1.7　结果判定

MMP-2 阳性表达为细胞质内或细胞膜棕黄色颗粒，每张切片在 200 倍光镜下，在斑块的肩部、基底部和纤维帽各随机选取 2 个视野，利用 Olympus BH2 显微镜观察，在控制相同曝光强度和曝光时间的条件下拍照，Image pro plus 5.0 软件进行灰度扫描，分别测定抗 MMP-2 免疫沉淀物积分吸光度值（IA），取其平均值作为分析指标。分别比较普通颗粒兔饲料组；高脂饲料加气体干燥术组；单纯高脂饲料组 MMP-2 表达的差异。

1.8　统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计软件，组间比较用配对样本 t 检验。

2　结果

2.1　一般情况

所有实验动物无中途死亡或患病，实验组动物未发现局部感染征兆，创口愈合良好。

2.2　颈动脉狭窄程度

所有颈动脉经血管造影后发现，普通饲料组及单纯高脂饲料组未见狭窄；高脂饲料加气体干燥术 1 个月组 6 根血管狭窄程度均为轻度；2 个月组 4 根血管狭窄程度为中度狭窄，2 根血管狭窄程度为轻度狭窄；3 个月组 3 根血管狭窄程度为重度狭窄，2 根血管狭窄程度为中度狭窄，1 根血管狭窄程度为轻度狭窄。

2.3　病理形态学观察

2.3.1　肉眼观　　空白对照组和高脂饮食对照组的兔颈动脉柔软有弹性，管腔内膜光滑。实验组经气体干燥的颈动脉出现明显的管壁僵硬、增厚，内膜可见白色条纹状隆起。

2.3.2　光镜　　空白对照组内皮细胞完整，单层紧贴内弹力板。中层平滑肌细胞排列整齐，呈长形或椭圆形，细胞质呈嗜酸性红染。高脂饮食对照组颈动脉内皮细胞完整，无明显内膜增生现象。内弹力板连续完整，中膜平滑肌细胞均呈梭形，排列整齐，细胞质嗜酸性，无明显脂质沉积。空气干燥后 1 个月组内膜下层可见大量梭形增生细胞，细胞质强嗜酸性，细胞核呈椭圆形或圆形，支持平滑肌细胞来源。中膜肌层内细胞质嗜酸性的平滑肌细胞减少，代之以大量的细胞质淡染和充满脂质空泡的泡沫细胞。空气干燥后 2 个月组内膜继续明显增厚，细胞质嗜酸性更不明显，代之以更典型的泡沫细胞。内膜中细胞间基质增多，泡沫细胞比例也较 1 个月时增多。空气干燥后 3 个月组在内膜增生的细胞团中还可见新生滋养血管的形成。这些新生血管呈不规则的扁平腔隙，腔隙表面由一层内皮细胞覆盖。

2.4　MMP-2 表达结果

MMP-2 在普通饲料组兔颈动脉组织中低水平表达；在高脂喂养组和高脂喂养加气体干燥术组兔颈动脉组织中表达水平升高，两组有非常显著的差异（$P < 0.01$）。且高脂加气体干燥组 1 个月组与 2 个月组，1 个月组与 3 个月组有非常显著的差异（$P < 0.01$），2 个月组与 3 个月组有显著差异（$P < 0.05$）。高脂组 1 个月组与 3 个月组有显著差异（$P < 0.05$），见表 1。

表 1　MMP-2 在兔颈动脉组织中的表达

组别	1 个月组	2 个月组	3 个月组
损伤组	159.46 ± 34.13^{a}	208.77 ± 31.36^{ab}	244.80 ± 39.03^{abc}
高脂组	121.53 ± 17.60^{a}	134.28 ± 13.54^{a}	129.34 ± 18.33^{ad}
正常组	37.84 ± 7.46	35.53 ± 8.76	34.61 ± 5.21

a：$P < 0.01$，与正常组比较；b：$P < 0.01$，与 1 个月损伤组比较；c：$P < 0.05$，与 2 个月损伤组比较；d：$P < 0.05$ 与 1 个月高脂组比较

3　讨论

MMP-2 是参与基质降解的关键酶之一，可特异降解动脉壁基膜的主要成分——Ⅳ型胶原，这一过程对血管平滑肌细胞穿过基膜屏障迁移至内膜上起着至关重要的作用。在动脉粥样硬化形成过程中，细胞外基质的合成与降解的平衡在不同病变部位和病变的不同时相均不相同。如疾病早期阶段，平滑肌细胞迁移增殖，基质降解明显；在斑块生长的过程中，基质合成增加并且沉积，可引起管腔狭窄；随着病变的发展，细胞外基质的降解又可使斑块抵抗外力减弱，容易发生破裂或斑块脱落。

MMP-2 的其他底物包括明胶（胶原降解后的产

物），Ⅰ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ型胶原，弹性蛋白，层黏连蛋白及纤连蛋白等。以往认为：MMP-2 仅对明胶有底物特异性，但有研究证实 MMP-2 同样可以切割间质胶原[4]。MMP-2 对细胞外基质的降解是动脉粥样斑块不稳定的重要因素，MMP-2 并不最先参与动脉粥样斑块破裂，在胶原被分解为一些片段后，MMP-2 再进一步降解这些胶原片段。尽管参与不稳定斑块破裂的 MMP 有许多种，但是 MMP-2 以分布及降解底物的广泛性，一直是学者研究的热点。

正常血管壁的内皮细胞不能分泌 MMP-2。内皮细胞损伤后，细胞因子、局部缺氧、氧化低密度脂蛋白、血小板活化因子等可诱导内皮细胞分泌 MMP-2。血液循环中的单核细胞与内皮细胞黏附，在血管壁中迁移、吞噬脂质后，在演化为巨噬源性泡沫细胞的过程中分泌大量 MMP-2。在平滑肌细胞泡沫化的过程中，也可分泌大量的 MMP-2。血管壁的机械牵张力可以通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）的介导而增加 MMP-2 的 mRNA 表达和其酶原的释放[5]，血流动力学的不稳定、血管壁侧压力和切应力的变化，是导致 MMP-2 分泌的重要原因[6]。

本实验显示，MMP-2 主要在动脉粥样硬化斑块的内皮细胞和平滑肌细胞中大量表达，并在间质中沉积。随着兔颈动脉内膜损伤后时间的延长，MMP-2 在动脉粥样硬化斑块的表达、沉积增多，尤其在斑块肩部、基底部、纤维帽部表达密集。MMP-2 表达的增多表明粥样硬化斑块内促进胶原的分解的酶的增多，胶原分解的增多可促进平滑肌细胞的迁移，增加斑块抵抗外力的能力，但同时又可促进基质的降解，使斑块抵抗外力的能力减弱。我们可结合其他指标如 TIMP（tissue inhibitor of metalloproteinase，基质金属蛋白酶组织抑制因子）的多少，平滑肌细胞的密度、基质的含量等因素对斑块的生长情况做进一步的研究。

参考文献：

[1] LI Z, LI L, ZIELKE H R, *et al*. Increased expression of 72-kd type Ⅳ collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions[J]. Am J Pathol, 1996, 148(1): 121-128.

[2] 徐永革，周定标，郑集义，等. 颈动脉粥样硬化性狭窄动物模型的建立[J]. 中华神经外科杂志，2003，19(4)：255-258.

[3] CHEN X, REN S, MA M G, *et al*. Hirulog-like peptide reduces restenosis and expression of tissue factor and transforming growth factor-beta in carotid artery of atherosclerotic rabbits[J]. Atherosclerosis, 2003, 169(1): 31-40.

[4] AIMES R T, QUIGLEY J P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments[J]. J Biol Chem, 1995, 270(11): 5872-5876.

[5] GROTE K, FLACH I, LUCHTEFELD M, *et al*. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species[J]. Circ Res, 2003, 92(11): e80-e86.

[6] ISHIKAWA Y, ASUWA N, ISHII T, *et al*. Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors[J]. Virchows Arch, 2000, 437(2): 138-148.

（编辑 陈聪连）

（上接 791 页）

的观察，镇痛，减少刺激，注意保持呼吸道通畅，持续吸氧，监测生命体征变化。对放置腹腔引流管的患者应注意妥善固定，防止拔脱，观察引流液的量、颜色、性质，一般 48 h 内拔管[4]。

2.2.2 合并心血管疾病 对老年患者术后重点是预防心肺并发症的发生，特别是原有心血管疾病的患者，术后均应持续心电监护，密切观察心率及律的变化，及时发现心律失常并分析其原因。对高血压患者，因气管插管、手术应激、术后创口疼痛，这些因素可使血压进一步升高，有并发意外及出血的可能性，可予适量镇痛，保持患者得到充分的休息，使血压相对维持在正常范围之内。

2.2.3 合并呼吸系统疾病 呼吸系统病变是引起术后并发症率增加的原因之一。LC 术中，CO_2 气腹作用是抬高膈肌，影响气体交换，导致血中 CO_2 潴留增加，为降低危险性，术后应注意保持呼吸道通畅，翻身拍背协助排痰，予持续低流量吸氧，监测氧饱和度等呼吸功能情况。半卧位既有利于上腹部手术本身，也有利于深呼吸横膈的活动，情况允许下，应鼓励患者尽早下床活动。

2.2.4 合并糖尿病 糖尿病患者在手术和麻醉时，体内儿茶酚胺、胰高血糖素及类固醇等分泌增加，血浆胰岛素则相对下降，从而有发生酮症酸中毒的可能，且易导致切口感染，愈合延迟或不愈合。术后应定期测血糖，根据血糖变化及时调节胰岛素用量及输液速度，输注过程中防止发生低血糖等情况。如患者开始进食，则制定食谱，将血糖控制在一个较为理想的水平。

3 讨论

高龄患者随着年龄的增长，重要生命器官发生生理退行性变化，无论应激性、代偿、修复、愈合、消化吸收等能力都较差，特别是在伴有不同程度的器质性疾病时，对 LC 术后会有潜在的危险，加强围手术期护理对降低术后并发症有明显意义。

关键词：腹腔镜；胆囊切除术；围手术期护理
中图法分类号：R473.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 汤建萍. 高龄慢性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术的围术期护理[J]. 当代护士，2003，(4)：28-30.

[2] 赵淑坤. 老年患者腹腔镜胆囊切除术围手术期的护理[J]. 实用诊断与治疗杂志，2003，17(4)：336-337.

[3] 王云霞，屈清荣，马继红. 高龄患者腹腔镜胆囊切除术后护理[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：576-577.

[4] 徐菊玲. 全麻术后精神障碍的观察及护理[J]. 护士进修杂志，2004，19(8)：728-729.

（编辑 张大春）