文章编号:1000-5404(2009)09-0839-04

论著

结缔组织生长因子和Ⅰ类膜型基质金属蛋白酶在主动脉瓣狭窄患者心室间质重塑中的表达及作用

郑德志,陈 林,肖颖彬,郝 嘉 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)和Ⅰ类膜型基质金属蛋白酶(membrane type 1 matrix metalloproteinases,MT1-MMP)在瓣膜疾病所产生压力超负荷导致心室间质重塑中的表达及作用。**方法** 32例手术患者分为2组:压力超负荷组(PO)16例,以主动脉瓣狭窄为主的双瓣病变,主动脉瓣口径长≤1.3 cm,跨瓣压差≥40 mmHg,瓣膜反流不超过4.0 cm^2;二尖瓣狭窄组(MS)16例,为单纯二尖瓣狭窄进行单瓣置换术患者。对照组为5例意外死亡成年正常人,标本在死亡0.5 h内取得。采用心脏彩超分析术前患者心功能状况;术中取患者左心室乳头肌同对照组心肌一起做心肌胶原纤维Masson染色,测定心肌胶原纤维含量;运用RT-PCR技术对各例标本CTGF、MT1-MMP mRNA表达情况进行分析。**结果** PO组患者由于左心室压力超负荷,形成向心性肥厚,MS组心肌肥厚不明显。PO组患者心肌胶原纤维较MS组及对照组增生明显,血管壁增厚,管腔变窄,腔外胶原纤维增生($P<0.01$)。PO组CTGF、MT1-MMP mRNA表达量均明显高于MS组和对照组($P<0.01$);MS组与对照组CTGF、MT1-MMP mRNA表达量均明显偏低,MS组CTGF mRNA表达高于对照组($P<0.05$);MS组与对照组MT1-MMP mRNA表达差异不明显($P>0.05$)。**结论** CTGF与MT1-MMP在压力超负荷情况下的表达增强,可能参与了心肌向心性肥厚的发展过程。

关键词: 瓣膜置换术;压力超负荷;主动脉瓣狭窄;结缔组织生长因子;Ⅰ类膜型基质金属蛋白酶
中图法分类号: R322.11; R363; R543.102 **文献标识码:** A

Expressions and roles of CTGF and MT1-MMP in extracellular matrix remodeling of left ventricle in patients with aorta valve stenosis

ZHENG De-zhi, CHEN Lin, XIAO Ying-bin, HAO Jia (Cardiovascular Surgery Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To approach the expressions and the roles of connective tissue growth factor (CTGF) and membrane type 1 matrix metalloproteinases (MT1-MMP) in valve disease with pressure overload which induces extracellular matrix remodeling of left ventricle. Methods Of 32 patients, 16 cases were pressure overload group (PO), who had the multiple valve disease with predominately aortic valve stenosis, having a ring diameter of aorta valve less than 1.3 cm, cross valve pressure gradient equal or more than 40 mmHg, and valvular regurgitation less than 4.0 cm^2; The other 16 cases, as mitral stenosis group (MS), were simple mitral stenosis patients with single valve replacement. Meanwhile, 5 normal individuals served as control, who died from accident. Echocardiography was used to analyze the left ventricular function and detect the hypertrophic level of the left ventricle. Left ventricle muscle samples were obtained during operation. Histological features were studied by Masson staining, and collagenous contents were quantitated with a computer-assisted imaging analysis system. The mRNA expressions of CTGF and MT1-MMP were detected with RT-PCR. Results Concentric hypertrophy was observed significant in PO group, but myocardial hypertrophy was not found in MS group. Compare to the MS group and control, PO group had significantly more collagenous contents in left ventricle, thickened vessel wall, and narrow lumen of blood vessel ($P<0.05$). The mean mRNA levels of CTGF and MT1-MMP were significantly increased in PO group than in MS group and control ($P<0.01$). The mRNA levels of CTGF and MT1-MMP expressions in MS and control group were both lower. There was no statistically difference of MT1-MMP mRNA expression between MS group and control group ($P>0.05$),

作者简介: 郑德志,男,山西省寿阳县人,硕士研究生,医师,主要从事心脏瓣膜疾病的外科治疗与相关基础方面的研究。E-mail:onlylittleghost@sohu.com
通信作者: 陈 林,电话:(023)68774607,E-mail:chenlin_xq@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-11-02;**修回日期:** 2008-12-19

but CTGF mRNA expression was increased in MS group compare to control ($P<0.01$). **Conclusion** CTGF and MT1-MMP expressions are significantly increased at mRNA level in pressure overload induced by valve disease. It may be one of the important factors which is involved in the progress of concentric hypertrophy and the process of extracellular matrix remodeling of left ventricle.

Key words: valves replacement; pressure overload; aorta valve stenosis; connective tissue growth factor; membrane type 1 matrix metalloproteinases

心脏瓣膜病是常见的慢性心脏疾病,在我国发病率高,基数巨大,心脏瓣膜置换术仍是目前治疗瓣膜疾病的最主要的有效手段。研究表明瓣膜置换手术后心脏的功能恢复不佳可能与心室间质重塑恢复不良有关[1]。在主动脉瓣狭窄患者中,因其主动脉瓣狭窄,对左心室产生压力超负荷,心肌细胞外基质成分合成与降解代谢失平衡,导致心室间质重塑。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)和Ⅰ类膜型基质金属蛋白酶(membrane type 1 matrix metalloproteinases,MT1-MMP)可能是心室间质重塑形成与转归的重要因子。本研究主要通过 RT-PCR 方法从基因水平对瓣膜置换术患者心肌组织中 CTGF、MT1-MMP 表达情况进行半定量分析,探讨 CTGF、MT1-MMP 在瓣膜疾病产生压力超负荷所致心室间质重塑中的表达特征,同时为预防和逆转瓣膜疾病所致心室间质重塑提供理论依据和新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 临床资料 选择32例于2007年3-6月在我院心血管外科行瓣膜置换术的患者,将入选病例分为2组:左心室压力超负荷(pressure overload,PO)组,以主动脉瓣狭窄为主的双瓣病变,共16例;单纯二尖瓣狭窄病变(mitral stenosis,MS)组,共16例。分组标准以我院术前心脏彩超检查为准。PO组患者术前心脏较MS组左心室增大,室间隔及左心室后壁明显增厚,形成向心性肥厚,左心室质量指数增加,心脏收缩功能未见明显减退,主动脉瓣口跨瓣压差明显升高。而MS组患者心肌无肥厚,心脏收缩功能尚可。2组患者术前超声检查资料见表1。要求PO组患者主动脉瓣瓣膜增厚黏连比较明显,瓣口径长≤1.3 cm^2,跨瓣压差≥40 mmHg,同时主动脉瓣口反流不超过4.0 cm^2;MS组为单纯二尖瓣狭窄进行单瓣置换术患者。其中PO组男性6例,女性10例,年龄14~66(44±10)岁;MS组男性7例,女性9例,年龄33~65(52±9)岁。术前患者均无发热、关节炎、心脏炎(表现为心悸、气短)、环形红斑、皮下结节、舞蹈病等临床表现。术前NYHA心功能Ⅱ级20例,Ⅲ级11例,Ⅳ级1例,心电图、血常规、红细胞沉降率、抗链O及C反应蛋白等检测均无风湿活动的证据。入选各组患者均排除有肺、肾纤维化的影响及患有其他内分泌系统、结缔组织疾病等可能导致心肌纤维化的可能。对照组5例为成年尸检标本,取自意外死亡成年健康人左心室乳头肌,其中男性2例,女性3例,年龄28~44(35±6)岁。本研究取得医学伦理委员会的批准,并得到患者家属的知情同意。

1.1.2 标本收集 瓣膜置换术患者左心室乳头肌标本在术中取材,对照组标本在死亡0.5 h内取材。标本一分为二,一部分标本保存于液氮中备用(用于提取左心室乳头肌组织细胞总RNA),另一部分置于40 ml/L多聚甲醛固定4~6 h,常规石蜡包埋,连续切片厚0.4 μm,3~5张,备用,Masson染色。

1.1.3 主要试剂 Trizol(Invitroge公司),ReverTra Ace-α-™ First Strand cDNA Synthesis Kit(TOYOBO公司),PCR master mix(2×)(Fermentas公司),DNA标准DL 2000(TaKaRa公司),CTGF、MT1-MMP引物均由上海英骏生物工程技术公司合成。

1.1.4 主要仪器 UNOⅡPCR仪(Biometra公司),JY-SPC水平电泳槽(北京君意东方仪器公司),DG-Ⅲ双稳数显电泳仪(北京鼎国生物技术发展中心),1-13高速离心机(Sigma公司),400 W像素紫外显像系统(柯达公司)。

1.2 心肌细胞和胶原的定性和定量分析

心肌组织经40 ml/L多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋,连续系列切片,片厚0.4 μm。Masson染色,光镜下观察。每例标本选2张组织切片,应用IPP 6.0图像分析软件分析心肌胶原纤维,各测量数据由计算机自动统计得出。Masson染色下胶原纤维为蓝色,心肌细胞为深红色。测量心肌胶原容积分数(CVF)和心肌血管周围胶原面积与管腔面积之比(PVCA),其中CVF=心肌胶原面积/所测视野面积,PVCA=小动脉管腔周围胶原面积/管腔面积。所有标本随机取4个视野测量,取平均值。

1.3 心肌组织中CTGF、MT1-MMP mRNA表达的半定量分析

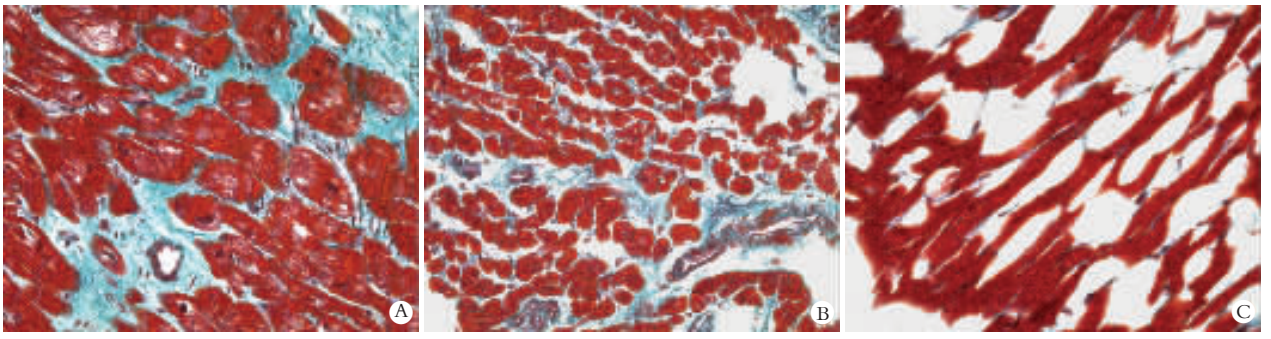
1.3.1 实验方法

1.3.1.1 RNA提取及反转录 取标本组织30 mg加液氮研磨,加入Trizol溶液,匀浆(冰上操作)。操作步骤参照试剂说明

表1 瓣膜置换术前患者心脏超声资料($n=16$, $\bar{x}\pm s$)

组别	左心室舒张末内径(mm)	室间隔厚度(mm)	左心室后壁厚度(mm)	短轴缩短率(%)	射血分数(%)	二尖瓣跨瓣压差(mmHg)	主动脉瓣跨瓣压差(mmHg)	左心室质量指数(g/m^2)
PO组	51.66±2.27[a]	10.73±2.26[a]	10.55±1.55[a]	32.51±4.32	59.87±7.08	10.23±3.17[a]	56.26±18.84[a]	152.35±23.14[a]
MS组	45.9±2.60	8.90±1.21	8.94±0.82	33.83±4.54	61.84±6.62	21.74±5.12	8.56±1.55	103.00±10.38

a:$P<0.01$,与MS组比较



A:PO 组;B:MS 组;C:对照组

图 1　左心室肌组织病理观察　(Masson 染色 ×400)

书,所提 RNA −80 ℃保存备用。反转录体系 20 μl:RNA 模板 1 μg, Oligo(dT)20(10 pmol/μl)1 μl, RNase Free H_2O 体积与 RNA 模板体积之和为 11 μl, 5 × RT buffer 4 μl, RNA 酶抑制剂 1 μl(10 U/μl),10 mol/l NTP 2 μl,反转录酶 1 μl(200 U/μl),产物 cDNA −20 ℃保存备用。

1.3.1.2　PCR 实验　各目的片段的扩增反应体系均 25 μl,包含 cDNA 模板 1 μl,上游及下游引物各 0.75 μl, PCR master mix(2 ×)12.5 μl, PCR H_2O 10 μl。各指标退火温度:CTGF 为 58 ℃,MT1-MMP 为 55.5 ℃,GAPDH 为 54 ℃。各指标引物序列,CTGF 上游:5′-GCATCTTCGGTGGTACGGT-3′,下游:5′-GGACCAGGCAGTTGGCTCTA-3′,扩增片段 297 bp;MT1-MMP 上游:5′-CAACATCTGTGACGGGAACT-3′,下游:5′-CAGCAT-CAATCTTGTCGGTAG-3′,扩增片段 305 bp;GADPH 上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游:5′-TCCACCACCCTGTT-GCTGTA-3′,扩增片段 450 bp。

1.3.2　结果分析　10 μl 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 120 V 电泳完毕后在溴化乙锭(EB)中染色,紫外灯下观察结果并照相。用凝胶分析软件 Geopro-32 进行条带灰度分析,以平均光密度值表示其条带的相对数值。将目的基因平均光密度值/内参基因 GADPH 平均光密度值得到各例标本目的基因的相对表达量。

1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,各组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　各组左心室肌胶原纤维含量测定

各组心肌标本 Masson 染色,镜下观察胶原纤维为被染为蓝绿色条带状,心肌细胞为深红色。PO 组患者心肌间质中胶原纤维极为丰富,呈网状分布,血管壁增厚明显,管腔变狭窄,CVF、PVCA 值较 MS 组及对照组明显升高。MS 组患者心肌间质中胶原纤维沉着较对照组丰富,CVF、PVCA 值较对照组增大。各组左心室肌胶原纤维含量分析见图 1、表 2。

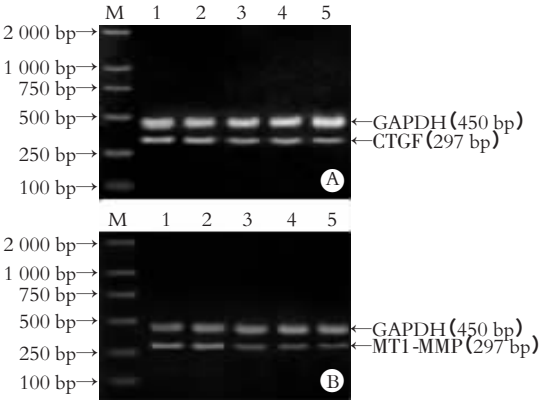
2.2　各组左心室乳头肌 CTGF、MT1-MMP mRNA 表达

PO 组 CTGF、MT1-MMP mRNA 表达量明显高于 MS 组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);MS 组与对照组 CTGF、MT1-MMP mRNA 表达量均明显偏低,MS 组 CTGF mRNA 表达高于对照组,其差异有统计学意义($P < 0.05$);MS 组与对照组 MT1-MMP mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2,表 3)。

表 2　各组患者左心室肌胶原纤维含量比较(%,$\bar{x} \pm s$)

组别	例数	胶原容积分数	血管周围胶原面积与管腔面积比
PO 组	16	14.25 ± 2.03^{ab}	1.52 ± 0.17^{ab}
MS 组	16	7.12 ± 1.30^{a}	0.98 ± 0.24^{a}
对照组	5	4.01 ± 1.15	0.76 ± 0.27

a:$P < 0.01$,与对照组比较;b:$P < 0.01$,与 MS 组比较



A:CTGF mRNA;B:MT1-MMP mRNA

1,2:PO 组;3,4:MS 组;5:对照组;M: DNA 标准(DL 2000)

图 2　PCR 检测各组 CTGF、MT1-MMP mRNA 的表达

表 3　各组患者左心室乳头肌 CTGF、MT1-MMP mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CTGF mRNA	MT1-MMP mRNA
PO 组	16	0.569 ± 0.041^{ab}	0.433 ± 0.011^{ab}
MS 组	16	0.299 ± 0.016^{c}	0.177 ± 0.017
对照组	5	0.279 ± 0.020	0.168 ± 0.006

a:$P < 0.01$,c:$P < 0.05$,与对照组比较;b:$P < 0.01$,与 MS 组比较

3　讨论

心室间质重塑的主要病理特征之一是心肌间质胶原异常增生堆积,心肌纤维化并严重影响心功能[2,3]。

左心室压力超负荷可引起心肌细胞肥大,细胞间质胶原纤维,尤其Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维增加更明显,这是心肌对血液动力学超负荷的适应性重构[4]。研究表明瓣膜置换手术后心脏功能恢复不佳,影响手术的中远期疗效,可能与心室间质重塑恢复不良的有关[1,5]。主动脉瓣狭窄时由于跨瓣压差升高,心室后负荷(压力负荷)增加,导致患者心室心肌纤维肌节并联性生长,心肌纤维变粗,心室壁增厚,产生向心性肥厚。单纯二尖瓣狭窄患者左心室充盈不足,长期处于低负荷状态,加之瓣膜疾病导致二尖瓣口及瓣下结构的纤维化、融合及挛缩,左心室心肌纤维肌节变短,细胞萎缩,心室腔轻度缩小,室壁出现废用性萎缩。

CTGF 是新近发现的一种被认为在纤维化发生过程中起重要作用的生长因子,可能和慢性心肌纤维化的发展与维持有关。研究表明,CTGF 可以明显加强 TGF-β1 诱导的成纤维细胞活化为成肌纤维细胞,上调成肌纤维细胞标志蛋白 α-SMA 的水平[6]。基质金属蛋白酶(MMPs)是典型的 ECM 降解酶,在哺乳动物体内,已经被证明在Ⅰ、Ⅲ胶原纤维和基底膜成分的降解中扮演着重要的角色[7]。Sivasubramanian 等[8]研究证实:在心室重构及扩大的早期(4 周内)即有 MMPs 活性的明显增强及心肌纤维胶原含最显著下降,MMPs 活性的增强早于心室扩大。可见 MMPs 的活性增强可促进心肌细胞外基质的降解,心室的正常胶原网络受到破坏,导致心室扩大。MT1-MMP 不仅降解细胞外基质,还与 TIMP-2 形成受体复合物,激活 MMP-2,此过程又不能为 TIMP-1 所抑制,形成级联反应,导致左心室扩大、间质纤维化[9]。推测这 2 种因子在瓣膜疾病导致的心室间质重塑中扮演重要的作用。

本研究观察到:①术前超声检查示 PO 组患者跨瓣压差增高明显,左心室略增大,左心室后壁、室间隔增厚,形成向心性肥厚,左心室重量指数增大,但左心室收缩功能无明显下降,可认为是心肌针对压力超负荷产生的一种代偿性反应。MS 组患者由于心排量降低,长期容量低负荷,室腔较小,室壁及室间隔较薄,心肌无肥厚,左心室重量指数未见升高,心脏收缩功能尚可。②PO 组患者心肌细胞外基质中胶原纤维较 MS 组及正常心肌增生相当明显,血管壁增厚,管腔变窄,腔外胶原纤维增生。可见压力负荷导致左心室发生向心性肥厚,心肌纤维化程度较重,导致心肌顺应性下降明显,舒张功能损伤严重。MS 组心肌与正常心肌比较也有明显增生,这说明除了血流动力学的影响外,心排量降低导致的心肌供血减少,胶原纤维退行性病变,还有疾病本身所致的神经、体液、内分泌系统的改变也是导致左心室间质重塑的重要原因。③CTGF、MT1-MMP mRNA 在 PO 组中表达明显增强,MS 组及对照组中两者表达均不明显,CTGF mRNA 在 MS 组中表达稍强于对照组。说明 PO 组患者在压力超负荷刺激下,MT1-MMP、CTGF mRNA 表达明显增强,在心肌肥厚的同时,促纤维化作用及细胞外基质降解作用增强,既促进基质中胶原纤维异常增生堆积,又由于细胞外基质的降解,心肌正常胶原网络被破坏,心室腔在压力容量等负荷的作用下扩大。这样肥厚的心肌既保证了心室能强有力的收缩,有效代偿压力负荷对心室产生的影响,又因胶原纤维的异常堆积导致心肌顺应性下降,出现舒张功能减退。MS 组患者与对照组正常心肌相比,仅 CTGF mRNA 表达略增高,MT1-MMP mRNA 均无明显表达,心肌出现轻度的纤维化,对左心室舒张收缩功能影响较少。由此可见在瓣膜疾病导致压力超负荷情况下,CTGF 及 MT1-MMP 表达增强,推测其参与了心肌向心性肥厚、心室间质重塑的发展过程,并发挥了重要作用。

参考文献:

[1] Derumeaux G, Mulder P, Richard V, *et al*. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats[J]. Circulation, 2003, 105(13): 1602 – 1608.

[2] 张海燕,魏宗德. 心肌胶原网络重构的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2003, 24(5): 359 – 362.

[3] Spinale F G, Coker M L, Bond B R, *et al*. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target[J]. Cardiovasc Res, 2000, 46(2): 225 – 238.

[4] 何作云,罗惠兰, 冯 兵,等. 血液动力学超负荷患者心肌肥大时 bFGF , TGFβ1 的变化[J]. 中国病理生理杂志,2000, 16(10): 994 – 995.

[5] 陈 林,肖颖彬,肖 娟,等. 主动脉瓣狭窄为主联合瓣膜病左心室病理改变与术后恢复的关系[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15): 1523 – 1526.

[6] Folger P A, Zekaria D, Grotendorst G, *et al*. Transforming growth factor-beta-stimulated connective tissue growth factor expression during corneal myofibroblast differentiation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(11): 2534 – 2541.

[7] Timonen P, Magga J, Risteli J, *et al*. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy [J]. Int J Cardiol, 2008, 124(3): 293 – 300.

[8] Sivasubramanian N, Coker M L, Kurrelmeyer K M, *et al*. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor[J]. Circulation, 2001, 104(7): 826 – 831.

[9] Deschamps A M, Spinale F G. Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs[J]. Curr Opin Cardiol, 2005, 20(3): 211 – 216.

(编辑 张 维)