

• 论著 •

脑出血灶周脑组织 MMP-2 和 MMP-9 的表达

柯绍发 金笑平 张可浩 王俊兴 胡小铭 张丹红 陈秋月 周元林

【摘要】 目的 观察急性脑出血患者灶周脑组织基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 的表达及其意义。**方法** 选择 42 例采用外科手术治疗的急性脑出血患者破碎脑组织病理标本;另选 30 例脑外伤患者出血灶周破损脑组织作为对照。用免疫组化法测定脑组织 MMP-2、MMP-9 阳性细胞表达情况。**结果** 两组患者脑组织 MMP-9 和 MMP-2 阳性细胞表达明显升高。42 例急性脑出血早期患者灶周脑组织 MMP-9、MMP-2 阳性细胞表达分别为 39 例和 37 例;而 30 例脑外伤出血患者脑组织 MMP-9、MMP-2 阳性细胞表达分别为 28 例和 27 例,两组比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。**结论** MMP-2 和 MMP-9 参与了人类急性脑出血脑水肿的形成。

【关键词】 脑出血; 脑组织; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9

Study on expression of matrix metalloproteinase - 2 and matrix metalloproteinase - 9 in brain tissue adjacent to hemorrhage after brain hemorrhage in human KE Shao-fa, JIN Xiao-ping, ZHANG Ke-hao, WANG Jun-xing, HU Xiao-ming, ZHANG Dan-hong, CHEN Qiu-yue, ZHOU Yuan-lin. Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Linhai 317000, Zhejiang, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of matrix metalloproteinase - 2 (MMP-2) and MMP-9 in perihematoma brain tissues after acute brain hemorrhage in human. **Methods** Forty-two patients with acute brain hemorrhage received surgery, the brain tissues adjacent to hemorrhagic site were obtained during surgery, and positive expressions of MMP-2 and MMP-9 were determined with immunohistochemical staining. Brain tissues from 30 patients with cerebral trauma were obtained to serve as controls. **Results** The positive expressions of MMP-2 and MMP-9 in focal brain tissues were significantly elevated in early acute brain hemorrhage. Compared with 28 and 27 cases with MMP-2 and MMP-9 positive expression respectively in control group, there were 39 and 37 cases with MMP-2 and MMP-9 positive expression respectively in acute brain hemorrhage group. There were no significant differences between two groups (both $P>0.05$). **Conclusion** MMP-2 and MMP-9 might contribute to brain edema formation in the acute intra-cerebral hemorrhage of human.

【Key words】 brain hemorrhage; brain tissue; matrix metalloproteinase - 2; matrix metalloproteinase - 9

为了解人类急性脑出血后灶周脑组织基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 MMP-9 的表达及其规律,我们收集了 2003 年 6 月—2006 年 5 月本院收治的 42 例急性脑出血患者外科手术过程中破损的脑组织标本,测定其 MMP-2 和 MMP-9 的表达,以期临床防治脑出血提供理论依据。因脑外伤出血灶周破损脑组织同样存在脑肿胀和脑水肿^[1],故作为对照研究,报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源:42 例急性脑出血患者中男 27 例,女 15 例;年龄 43~72 岁,平均 (60 ± 1) 岁。出血部位:基底节区 33 例,脑叶 9 例;病程 6~24 h。另外选择脑外伤出血灶周破损脑组织作为对照,对照组

30 例患者中男 23 例,女 7 例;年龄 26~67 岁,平均 (53 ± 8) 岁,出血部位:额颞叶 22 例,顶叶 8 例。所有组织标本经体积分数为 10%的甲醛溶液固定 18~24 h 后,石蜡包埋。

1.2 主要试剂和实验仪器:石蜡切片机(Leica RM 2135)、一次性石蜡切片刀、显微镜(Leica DM 2000)、数码像机(Leica DFC 280)均为德国徕卡公司产品,组织芯片制备系统(HT-1)购自辽宁朝阳恒泰科技发展有限公司。MMP-2 鼠抗人单克隆抗体、MMP-9 兔抗人多克隆抗体为美国 Lab Vision 公司产品。多聚物酶标二抗(EnVision-4001B 检测系统)为丹麦 DAKO 公司产品。

1.3 组织芯片石蜡块制备

1.3.1 空心受体蜡模制备:利用组织芯片制备系统空心受体蜡模制备模具,一次性成型制备空心受体蜡模,每块组织芯片空心受体蜡模包含 42(6×7)个阵列孔,孔径均为 2 mm。

基金项目:浙江省台州市科技计划基金资助项目(051KY18)

作者单位:317000 浙江临海,浙江省温州医学院附属台州医院

作者简介:柯绍发(1965-),男(汉族),湖北省人,医学硕士,主任医师,主要从事脑血管病的研究。

1.3.2 目标组织定位:所有组织芯片供体石蜡块均行石蜡切片,片厚 4 μm ,常规苏木素-伊红(HE)染色,进行组织形态学观察,核对组织病理学诊断,并在组织切片和相应供体样本蜡块上进行标记。

1.3.3 目标石蜡组织取样:利用组织芯片制备系统阵列组织标本取样仪(取样针内径 2 mm),对已标记好的供体蜡块组织进行逐一钻取取样。依照预先设计好的组织芯片阵列将所钻取的石蜡组织芯逐一放入组织芯片空心受体蜡模指定的位置,钻取组织结束后,用蜡密封钻孔以保护剩余石蜡组织。

1.3.4 组织芯片石蜡块再次包埋:用直径 1.9 mm 的实心针芯将组织芯片受体蜡块内的石蜡组织柱逐一轻轻压下,使其处于同一平面,小心将其整体移到组织芯片制备系统二次包埋仪上,在真空泵负压吸引下,向受体蜡块注入融化的石蜡(75 $^{\circ}\text{C}$),进行组织芯片受体蜡块二次包埋。

1.4 组织芯片制备:使用石蜡切片机对组织芯片石蜡块进行常规切片,片厚 4 μm 。邻近的组织芯片切片分别铺于洁净的载玻片以及用体积分数为 2% 的多聚赖氨酸(APES)-丙酮溶液处理过的载玻片上,进行常规 HE 染色检查以及免疫组化检测。

1.5 组织芯片的免疫组化检测:按下列步骤操作:切片脱蜡出水;阻断内源性过氧化物酶 198 ml (加 2 ml 体积分数为 30% 的 H_2O_2),室温下 20 min,自来水洗。抗原修复:按说明书要求用蒸馏水洗,加入抗原修复液(pH 6.0),高压锅中出气后 3 min 快

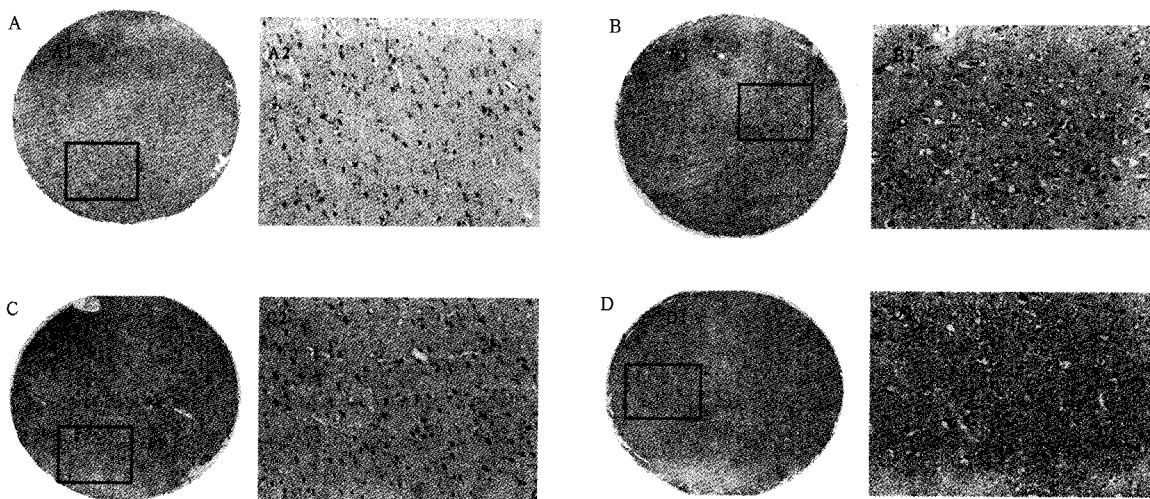
速冷却;用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,滴加正常血清,20 min 后擦去多余血清,加一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 下 60 min;用 pH 7.2 的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(TBS)洗涤 3 次;滴加多聚物酶标二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 min;用 pH 7.2 的 TBS 洗 3 次;十二烷基苯磺酸钠(DBS)显色 3~10 min 后水洗;苏木素漆染、蓝化、脱水、透明、封固。

1.6 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达测定:取连续组织切片在同一强度及放大倍数下观察,采用阳性细胞计数法,免疫组化阳性细胞胞浆或胞核内可见棕黄色颗粒。每个标本选一张切片,在 200 倍光镜下随机选取血肿周围的 3 个互不重叠视野,计数阳性细胞染色的患者例数。

1.7 统计学分析:统计学处理采用 SPSS10.0 软件包进行,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行方差分析和相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

图 1 显示了急性脑出血及脑外伤两组患者灶周脑组织芯片免疫组化染色阳性细胞表达情况。组织切片中胞浆或胞核内棕黄色颗粒为阳性细胞。42 例急性脑出血患者中,有 39 例患者灶周脑组织可见 MMP-9 阳性细胞表达,37 例可见 MMP-2 阳性细胞表达;30 例脑外伤患者脑组织中,MMP-9 和 MMP-2 阳性细胞表达例数分别为 28 例和 27 例。两组间 MMP-9 和 MMP-2 阳性细胞表达比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。



A、B 为 MMP-2 表达;B、D 为 MMP-9 表达;A1~D1 为组织芯片微阵列组织块($\times 50$);
A2~D2 为 A1~D1 中方框标记处组织的放大图像($\times 200$)

图 1 急性脑出血及脑外伤患者灶周脑组织芯片免疫组化染色检测

Figure 1 Result of test of immunohistochemistry staining of focal brain tissue chip of patients with brain hemorrhage and trauma

3 讨论

MMPs 为降解细胞外基质 (ECM) 的一组蛋白酶, 而 ECM 是构成血管基底膜的主要成分, 其完整性在一定程度上决定血管的完整性^[2]。有多种细胞参与了 MMP-2 和 MMP-9 的合成与分泌, 如星形细胞、内皮细胞、小胶质细胞、神经细胞、间质细胞、T 细胞、巨噬细胞、嗜酸粒细胞和中性粒细胞等。在正常脑组织内, 微血管内皮细胞可分泌 MMP-2 和 MMP-9, 星形细胞可产生无活性 MMP-2, 小胶质细胞在炎症因子刺激下可产生 MMP-9^[3,4]。

Romanic 等^[5]报道, MMPs 参与了脑缺血/再灌注损伤过程, 并促进了脑水肿形成; 应用 MMP-9 单克隆抗体后可显著减轻脑梗死面积。有研究表明, 内皮细胞可分泌 MMPs, 包括基底膜的 MMP-9, 从而促进基底膜降解^[6]。李章平等^[7]亦发现, 心肺复苏早期大鼠脑组织 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达均升高, 且其组织抑制剂 mRNA 表达亦明显上调, 抑制了 MMP-9 活性, 使 MMP-9 及其组织抑制剂的动态平衡破坏, 从而导致 ECM 异常降解。缺血灶内和周边内皮细胞表达 MMP-9 可能是脑血管壁受损导致脑水肿和白细胞浸润的原因, 血管下基底膜 ECM 成分的蛋白水解与血管通透性增加和血管完整性丧失有关^[8]。MMP-9 一旦活化就攻击血脑屏障, 主要降解毛细血管基底膜的某些基质蛋白, 如胶原、层黏素、黏蛋白以及内皮细胞间的紧密连接蛋白^[9], 导致血管的完整性受到破坏, 血脑屏障的功能受损, 最终形成血管源性脑水肿。

脑水肿形成是脑出血后最重要的病理学过程, 水肿体积是决定患者预后的重要因素。动物实验结果显示, 大鼠脑出血后 72 h, 血肿周围形成明显的脑水肿, 且伴随 Na⁺内流, 这些区域的血脑屏障通透性也显著增加^[10]。Abilleira 等^[11]研究 59 例脑出血患者发病 24 h 内的血清 MMP-9 含量后发现, MMP-9 含量升高与血肿周围水肿体积和病情恶化程度有关, 与深部出血的相对水肿体积 (绝对水肿体积/颅内出血体积) 有关。对深部颅内出血而言, MMP-9 升高预示着急性期周围水肿扩大和病情加重。Power 等^[12]研究脑出血后 MMPs 表达及其病理作用后发现, 血肿周围 MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9 和 MMP-12 的 mRNA 水平均明显增高, 急性脑出血灶周围脑组织 MMP-2、MMP-9 免疫组化染色阳性细胞数明显增多, 说明 MMP-2、MMP-9 参与了脑出血后脑水肿形成。

Rosenberg 等^[13]应用胶原酶诱导脑出血模型,

观察到脑出血后 24 h MMP-9 含量升高, 脑组织含水量亦增高, 给予 MMP-9 抑制剂后, 显著减轻了脑组织含水量。Gasche 等^[14]用伊文思蓝染色法也显示, 在脑水肿高峰期给予外源性 MMP-9 抑制剂 BB-1101, 可明显减少注射区域远隔部位脑内水和钠的含量。Cunningham 等^[15]研究认为, MMP 抑制剂在脑卒中的治疗和对脑组织的修复中起非常重要的作用。说明阻断脑出血后 MMP-9 的激活是防治人类脑水肿的一个潜在途径。

研究表明, 脑外伤后局部脑组织细胞因缺血、缺氧而出现脑肿胀和脑水肿^[1]。人脑出血和脑外伤后脑水肿的发生具有某些相同的病理机制, 缺血、缺氧作为一种信号, 刺激炎性细胞、神经元、内皮细胞和胶质细胞, 激活了 MMPs 系统, 导致 MMP-2、MMP-9 的表达上调^[2]。本研究结果表明, 急性脑出血患者灶周脑组织中 MMP-9、MMP-2 阳性细胞表达率与脑外伤脑组织 MMP-9、MMP-2 阳性细胞表达率比较差异均无显著性, 说明 MMP-2、MMP-9 参与了脑水肿的形成。因此, 用 MMP-2、MMP-9 抑制剂可减轻人类脑出血后脑水肿, 降低脑出血患者病死率和致残率, 值得临床进一步研究。

参考文献:

- 1 裘五四, 刘国伟, 姜启周, 等. 外伤后急性脑肿胀的临床分型与治疗[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(5): 280-282.
- 2 Matrisian L M. The matrix-degrading metalloproteinases[J]. Bioessays, 1992, 14(7): 455-463.
- 3 Planas A M, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(5): 834-846.
- 4 Jiang X, Namura S, Nagata I. Matrix metalloproteinase inhibitor KB-R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice[J]. Neurosci Lett, 2001, 305(1): 41-44.
- 5 Romanic A M, White R F, Arleth A J, et al. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats; inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size[J]. Stroke, 1998, 29(5): 1020-1030.
- 6 Unemori E N, Bouhana K S, Werb Z. Vectorial secretion of extracellular matrix proteinase, matrix-degrading proteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinase by endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1990, 265(1): 445-451.
- 7 李章平, 陈寿权, 王姗姗, 等. 大鼠心肺复苏后脑组织基质金属蛋白酶及其组织抑制剂表达的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(9): 548-551.
- 8 Hamann G F, Okada Y, Fitridge R, et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2120-2126.
- 9 Lohmann C, Krischke M, Wegener J, et al. Tyrosine phosphatase inhibition induces loss of blood-brain barrier integrity by matrix metalloproteinase-dependent and -independent pathways[J]. Brain Res, 2004, 995(2): 184-196.
- 10 何纲, 刘茂才, 黄培新, 等. 脑脉 I 号口服液对高血压脑出血大鼠

脑损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(6): 326-329.

11 Abilleira S, Montaner J, Molina C A, et al. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosurg, 2003, 99(1): 65-70.

12 Power C, Henry S, Del Bigio M R, et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases[J]. Ann Neurol, 2003, 53(6): 731-742.

13 Rosenberg G A, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat [J]. Neurology, 1997, 48(4): 921-926.

14 Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice; a possible role in blood-brain barrier dysfunction[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(9): 1020-1028.

15 Cunningham L A, Wetzel M, Rosenberg G A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia[J]. Glia, 2005, 50(4): 329-339.

(收稿日期: 2006-11-23 修回日期: 2007-01-13)

(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

不同方法治疗高龄急性冠状动脉综合症的疗效评价

李朋合 于志刚

【关键词】 高龄； 急性冠状动脉综合征； 经皮冠脉介入； 冠状动脉旁路移植术

报告 1998 年 1 月—2006 年 1 月在我们两家医院治疗的高龄急性冠状动脉综合征(ACS)患者的近期与远期疗效。

1 临床资料

1.1 病例与治疗方法: 144 例临床诊断为 ACS, 经冠状动脉(冠脉)造影证实存在冠脉病变, 年龄≥75 岁, 分别接受冠脉介入(PCI)、冠脉旁路移植术(CABG)和单纯药物治疗患者。男 112 例, 女 32 例; 年龄 75~90 岁, 平均(77±3)岁。不稳定型心绞痛 132 例, 非 ST 段抬高型心肌梗死(心梗)5 例, ST 段抬高型心梗 7 例。按患者病情决定治疗方案。依治疗方法分为 PCI 组(57 例)、CABG 组(41 例)和单纯药物治疗组(46 例)。每组分别观察近期与远期疗效。

1.2 疗效评价: 观察死亡、非致死性心梗以及再次行心肌血运重建术(包括 PCI 和 CABG)等终点事件的发生情况; 其中近期疗效指住院期间的疗效, 远期疗效是指从出院到随访时的疗效。

1.3 统计学处理: 应用 SPSS10.0 统计软件包; 计数资料比较采用 χ^2 检验, 计量资料比较采用方差分析和 q 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 近期疗效比较(表 1): CABG 组院内病死率最高, 与 PCI 组和药物组比较差异均有显著性(P 均 <0.05)。

作者单位: 300480 天津市汉沽区医院内一科(李朋合); 天津汉沽盐场医院(于志刚)

作者简介: 李朋合(1968-), 男(汉族), 天津市人, 副主任医师。

表 1 各组近期疗效比较 例(%)

组别	例数(例)	急性心梗	死亡	急诊血运重建
PCI 组	57	1(1.7)	1(1.7)	0(0)
CABG 组	41	0(0)	51(11.9)*	0(0)
药物组	46	0(0)	0(0)△	0(0)

注: 与 PCI 组比较: * $P<0.05$, 与 CABG 组比较: △ $P<0.05$

2.2 远期疗效比较(表 2): 未进行血运重建的药物组远期病死率最高, 显著高于 PCI 组($P<0.05$), CABG 组远期病死率虽然低于药物组, 但差异无显著性($P>0.05$), 而 PCI 组与 CABG 组的远期病死率比较差异无显著性。

表 2 各组远期疗效比较 例(%)

组别	例数(例)	远期心梗	远期心源性死亡	心绞痛复发
PCI 组	51	2(3.9)	2(3.9)	17(33.3)
CABG 组	33	3(7.3)	4(12.1)	8(24.2)
药物组	40	4(10.0)	10(25.0)*	2(5.0)

注: 与 PCI 组比较: * $P<0.05$

3 讨论

目前, 已有很多关于 ACS 血运重建治疗的临床试验结果作为循证医学证据, 但大部分试验未包括老年人。随着年龄的增加, 高龄冠心病患者的病理生理特点发生了很大变化, 其中 ACS 患者的冠脉病变复杂, 临床表现危重^[1], 临床上采取哪种治疗方法更为合理, 值得探讨。

我们的分析结果表明, 从近期疗效看, CABG 组的院内病死率明显高于其他两组, 其原因是该组患者冠脉病变比较严重, 左主干和三支病变患者较多, 高龄患者其他脏器的状况也比较差, 使手术期病死率增高^[2]。Blackman 等^[3]对大量临床试验结果进行了荟萃分析, 认为 75~80 岁的不稳定型心绞痛患者行

CABG 的院内病死率为 12.1%, 与我们的结果相近。从远期疗效看, 未进行血运重建的药物组远期心源性病死率高达 25.0%, 显著高于 PCI 组, 而与 CABG 组比较差异无显著性, PCI 组与 CABG 组的远期病死率差异亦无显著性。此结果说明高龄 ACS 患者可从早期积极的冠脉血运重建中获益。Himbert^[4]通过对 FRISC I (比较不稳定型心绞痛早期有创治疗与无创治疗) 和 TACTICSTIMI (比较 ACS 早期有创治疗与保守治疗的临床研究) 等 18 个临床试验荟萃分析后建议, 在 ACS 患者中, 高龄是预测院内病死率的一个重要危险因素, 应尽可能进行 PCI, 达到血运重建。结合本结果我们认为, 对高龄 ACS 患者治疗措施的选择应强调早期冠脉血运重建, 减少远期病死率, 由于 CABG 近期病死率较高, 故血运重建治疗首选 PCI, 对于不适合 PCI 治疗的病变可进行 CABG。

参考文献:

- 尹力, 李广平, 李健, 等. 急性心肌梗死死亡及梗死相关因素的分析[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(8): 465-468.
- 杨胜利, 刘惠亮, 何作云. 炎症和急性冠脉综合征[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(9): 570-573.
- Blackman D J, Ferguson J D, Sprigings D C, et al. Revascularization for acute coronary syndromes in older people[J]. Age Ageing, 2003, 32(2): 129-135.
- Himbert D. Unstable angina in the elderly[J]. Am Cardiol Angeiol (Paris), 2001, 50(7-8): 397-403.

(收稿日期: 2007-04-04)
(本文编辑: 李银平)