

基质金属蛋白酶-9 和内皮祖细胞在心脏移植术患者中表达的相关性及临床意义

戴备军¹, 翁剑枫², 胡志斌¹

¹ 浙江省人民医院心胸外科, 杭州 315000, 浙江; ² 浙江科技学院, 杭州 310023, 浙江

摘要 目的: 探讨基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和内皮祖细胞(EPCs)在心脏移植术患者中表达的相关性及临床意义。方法: 选取2012年1月至2016年1月在本院接受心脏移植手术的120例患者作为病例组。同期在本院体检中心按年龄、性别匹配抽取120例健康人群作为对照。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆MMP-9水平, 采用流式细胞术检测EPCs, 对比分析两组MMP-9和EPCs差异及相关性。结果: 病例组心脏移植术后血浆MMP-9和EPCs较移植前明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 病例组心脏移植前后MMP-9和EPCs均明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 心脏移植术发生并发症病例组血浆MMP-9和EPCs分别为(128.46 ± 7.32) mg/L、(166.84 ± 14.82)个, 明显高于正常病例组的(94.25 ± 7.14) mg/L、(134.68 ± 13.68)个($P < 0.05$); 心脏移植术死亡病例组血浆MMP-9和EPCs分别为(137.36 ± 8.13) mg/L、(168.24 ± 14.62)个, 明显高于正常病例组的(92.85 ± 7.06) mg/L、(98.41 ± 13.24)个($P < 0.05$); 心脏移植术患者血浆MMP-9表达与EPCs表达呈正相关($r = 0.686, P = 0.000$)。结论: 血浆MMP-9和EPCs水平与心脏移植术后心脏移植植物血管病变早期病理变化有密切关系, 通过监测

血浆MMP-9和EPCs动态变化可能有助于尽早发现心脏移植术后心脏移植植物血管病变倾向的高危患者, 并及时调整治疗方案。

关键词 心脏移植术; 基质金属蛋白酶-9; 内皮祖细胞

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-2501(2018)03-0296-05

doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2018.03.009

随着医疗技术不断发展及心脏移植术临床经验的积累, 心脏移植术患者生存时间得到明显延长^[1], 然而心脏移植术后病发症的发生仍是临床医生及研究学者关注的热点问题。心脏移植植物血管病变(CAV)是心脏移植的常见并发症, 是多种免疫和非免疫因素参与并相互作用的复杂病理过程, 其发病机制目前尚未完全阐明。文献^[2]报道, 心脏移植后CAV的5年发病率约为30%, 10年发病率约为50%, 是导致移植失败和患者死亡的重要原因之一。基质金属蛋白酶9(MMP-9)是MMPs家族重要成员, 研究^[3]表明, 血浆MMP-9水平已被证实与多种心血管疾病的发生、发展密切相关。内皮祖细胞(EPCs)是一类能分化为成熟内皮细胞的内皮前体细胞, 具有促进损伤血管修复和新生血管形成的特点。研究^[4]发现EPCs在心脏移植植物血管病变的发生和发展中起着重要作用, 移植后供心血管内皮损伤可以触发EPCs的修复过程。鉴于以上所述, 本研究探讨MMP-9和EPCs在心脏移植术患者表达的相关性及临床意义。

2017-03-20 收稿 2017-07-28 修回

浙江省医药卫生科学基金(2009a021)

戴备军, 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 心脏移植术后相关并发症的研究。

Tel: 13958193039 E-mail: dbj99@sohu.com

胡志斌, 通信作者, 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 血管外科的临床与基础理论研究。

Tel: 15158885138 E-mail: hulinet169@163.com

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2016 年 1 月在本院接受心脏移植手术的 120 例患者作为研究对象,作为病例组。年龄 32~64 岁,平均年龄 (42.8 ± 12.4) 岁,其中男 72 例,女 48 例。原发病为心肌疾病 85 例,冠心病 24 例,其他 11 例。同期在本院体检中心按年龄、性别匹配抽取 120 例健康人群作为对照,年龄 32~64 岁,平均年龄 (42.4 ± 12.7) 岁,其中男 72 例,女 48 例。两组研究对象均签署知情同意书,自愿参加。本研究通过本院医学伦理委员会审核通过,未违反医学伦理。

1.2 方法 病例组患者分别于切除原位心脏前、心脏移植手术完成后 48~72 h 内晨起抽取肘静脉血 5 mL,对照组晨起抽取肘静脉血 5 mL。将抽取的静脉血放置 30 min,然后送至检验室进行离心分离血浆 (1 500 r/min, 离心 15 min), 将血浆分装至冻存管,每管 1 mL,保存于低温冰箱备检。

1.3 MMP-9 检测 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 进行检测,试剂盒购自美国 BD 公司, MK3 酶标仪购自美国热电公司。实验操作步骤按照试剂盒附带说明书进行。

1.4 EPCs 检测 采用流式细胞术分析血浆中 EPCs 水平,采用美国 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪以 CellQuest 软件进行流式细胞分析。取 100 μ L 血浆,分别加入 FITC-CD34 抗体和 PE-KDR 抗体各 10 μ L。分别在前向角和侧向角散射光双参点图上对淋巴细胞群进行门 (gate) 设置,收集细胞数共 7 000 个,分析计算 CD34 和 KDR 双阳性细胞所占比例。实验操作步骤按照试剂盒附带说明书进行。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合正态分布及方差齐性,采用独立 *t* 检验,反之则采用秩和检验。采用 Pearson 相关分析进行相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-9 和 EPCs 在心脏移植术患者移植前后和正常人表达情况的比较 病例组心脏移植后血浆 MMP-9 和 EPCs 较移植前明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 病例组心脏移植前后 MMP-9 和 EPCs 均明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果详见 Tab. 1。

Tab. 1 Comparison of MMP-9 and EPCs expressions before and after transplantation and between groups ($\bar{x} \pm s, n = 120$)

Group	MMP-9 (mg/L)	EPCs (counts)
Study group (before transplantation)	15.24 ± 4.65	62.14 ± 8.45
Study group (after transplantation)	98.57 ± 6.42	167.21 ± 14.66
Control group	14.23 ± 4.42	56.24 ± 12.46
<i>F</i>	10239.60	3178.05
<i>P</i>	0.000	0.000
Study group (before transplantation) vs.	$t_{\text{pair}} = 115.154$	$t_{\text{pair}} = 68.021$
Study group (after transplantation)	$P_{\text{pair}} = 0.000$	$P_{\text{pair}} = 0.000$
Study group (before transplantation) vs.	$t = 1.725$	$t = 4.293$
Control group	$P = 0.086$	$P = 0.000$
Study group (after transplantation) vs.	$t = 118.533$	$t = 63.183$
Control group	$P = 0.000$	$P = 0.000$

2.2 心脏移植术正常病例与发生并发症病例 MMP-9 和 EPCs 表达情况的比较 心脏移植术发生并发症病例组血浆 MMP-9 和 EPCs 分别为 (128.46 ± 7.32) mg/L、(166.84 ± 14.82) 个, 明

显高于正常病例组的 (94.25 ± 7.14) mg/L、(134.68 ± 13.68) 个, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果详见 Tab. 2。

Tab. 2 Comparison of MMP-9 and EPCs expressions between complication group and normal group after heart transplantation ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MMP-9(mg/L)	EPCs(counts)
Complication group	24	128.46 ± 7.32	166.84 ± 14.82
Normal group	96	94.25 ± 7.14	134.68 ± 13.68
<i>t</i>		20.891	10.131
<i>P</i>		0.000	0.000

2.3 心脏移植术存活病例与死亡病例 MMP-9 和 EPCs 表达情况的比较 心脏移植术死亡病例组血浆 MMP-9 和 EPCs 分别为 (137.36 ± 8.13)

mg/L、(168.24 ± 14.62) 个, 明显高于正常病例组的 (92.85 ± 7.06) mg/L、(98.41 ± 13.24) 个, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 结果详见 Tab. 3。

Tab. 3 Comparison of MMP-9 and EPCs expressions between death cases and survival cases after heart transplantation ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MMP-9(mg/L)	EPCs(counts)
Death cases	11	137.36 ± 8.13	168.24 ± 14.62
Survival cases	109	92.85 ± 7.06	98.41 ± 13.24
<i>t</i>		19.659	16.519
<i>P</i>		0.000	0.000

2.4 MMP-9 和 EPCs 表达相关性分析 Pearson 相关分析显示, 心脏移植术患者血浆 MMP-9 表达与 EPCs 表达呈正相关 (*r* = 0.686, *P* = 0.000)。

3 讨论

心脏移植术是治疗各种原因引起的终末期心力衰竭患者最有效的手段。近年来, 随着外科手术不断发展及免疫抑制剂发明应用, 心脏移植术后患者存活率明显升高。研究^[5-6] 表明, 移植心脏血管病变 (CAV) 是心脏移植术较为常见的并发症, 是心脏移植术患者近期及远期生存率的重要影响因素, 预防并发症发生有助于改善患者术后生存率。

MMP-9 是基质金属蛋白酶家族重要成员, 多种细胞都能合成和分泌 MMP-9, 其中以巨噬细胞的合成和分泌作用最强。MMP-9 参与 CAV 发生、发展的机制主要涉及以下几个方面^[7]: 促进血管平滑肌细胞形态和功能改变, 促进心室和血管重构; 加重炎症反应; 参与心肌缺血再灌注损伤; 引起动脉粥样硬化斑块纤维帽变薄, 诱发动脉粥样硬化斑块破裂; 促进心脏移植术后急性排斥反应的发生。研究^[8] 表明, 心脏移植后移植心脏内 MMP-9 表达水平明显升高, 并与炎症、纤维化及心脏移植排斥程度呈正相关。

EPCs 是一类能分化为成熟内皮细胞的内皮前体细胞, 其主要存在于骨髓、外周血和脐带血, 少量存在于心脏、血管壁、骨骼肌和脂肪组织, 骨髓中含有的大量造血干细胞和间充质干细胞等可分化为 EPCs^[9]。其功能主要参与缺血组织的血管发生和血管损伤后的修复。研究^[10] 发现 EPCs 在移植心脏血管病变的发生和发展中起着重要作用, 移植后供心血管内皮损伤可以触发 EPCs 的修复过程。有研究^[11] 提示外周血中 EPCs 的数量与移植动脉内膜损伤的修复密切相关。可能成为 CAV 的发病指标和干预靶点。

本研究结果显示, 患者行心脏移植术后血浆 MMP-9 和 EPCs 表达水平较移植前明显升高, 且明显高于对照组患者, 说明 MMP-9 和 EPCs 在心脏移植术后患者血浆中高表达。国外研究^[12] 表明, 移植心脏患者血浆 MMP-9 表达水平明显升高, 并与炎症、纤维化及心脏移植排斥程度呈正相关。国内有关 MMP-9 和 EPCs 在心脏移植患者中表达的研究甚少。国内动物实验研究^[13] 表明, 心脏移植动物模型中 MMP-9 表达升高。吴钟伟等^[14] 研究表明, EPCs 数量在急性心肌梗死 ST 段抬高型心肌梗死患者外周血中明显增加。本研究结果也显示, 血浆中 MMP-9 和 EPCs 表达水平明显高于无并发症发生患者或存活患者, 上述研究

结果说明, 血浆中 MMP-9 和 EPCs 表达水平在心脏移植术患者中具有重要的临床意义。主要原因分析: MMP-9 高表达, 降解细胞外基质、破坏基膜, 肌纤维完整性遭受到破坏, 炎性细胞浸入到更深层次的心肌组织中, 出现心肌纤维坏死和吞噬现象等一系列病理改变^[15]; MMP-9 过度释放, 加重心肌缺血再灌注损伤; MMP-9 高表达, 促进心脏移植后急性排斥反应的发生。心脏移植后供心血管内皮损伤是 CAV 发生和发展的重要环节, 内皮损伤后, EPCs 会聚集到损伤部位, 对损伤内皮进行修复, 以恢复血管内皮结构和功能, 血浆中 EPCs 个数明显增加。血管内皮生长因子激活 MMP-9 表达, 动员 EPCs 并促进其向内皮损伤部位聚集、增殖和分化^[16]。

综上所述, 血浆 MMP-9 和 EPCs 与心脏移植术后心脏移植物血管病变早期病理变化有密切关系, 通过监测血浆 MMP-9 和 EPCs 动态变化可能有助于尽早发现心脏移植术后心脏移植物血管病变倾向的高危患者, 并及时调整治疗方案。

参 考 文 献

- [1] 史立英, 黄洁, 胡盛寿, 等. 心脏移植受体性别对心脏移植术后生存影响的研究 [J]. 中国循环杂志, 2015, 30(5): 465-468.
- [2] 张健. 2013 ACCF/AHA 心力衰竭指南解读(下)——器械、外科治疗和心脏移植 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(5): 443-444.
- [3] 马小欣, 彭萍, 徐光泽, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆 MMP-2、MMP-9 水平变化的临床观察 [J]. 心脑血管病防治, 2016, 16(5): 353-355.
- [4] 孙青. 内皮祖细胞在心血管疾病治疗中的作用 [J]. 中国心血管病研究, 2014, 12(7): 633-636.
- [5] 王珂, 周诚, 夏家红. 心脏移植物血管病变的研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(4): 923-924.
- [6] 李君权, 安守宽, 章佰承, 等. 心脏移植术后长期存活病例移植物血管病变的临床分析 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(4): 364-366.
- [7] 王嘉慧, 孙博, 王丹, 等. MMP-9 在心脏移植物血管病变中的作用研究进展 [J]. 山东医药, 2016, 56(22): 102-104.
- [8] Li H, Xu D, Chen Z, et al. Prognostic analysis for survival after resections of localized primary cardiac sarcomas: a single-institution experience [J]. Ann Thorac Surg, 2014, 97(4): 1379-1385.
- [9] Loukovaara S, Gucciardo E, Repo P, et al. A Case of Abnormal Lymphatic-Like Differentiation and Endothelial Progenitor Cell Activation in Neovascularization Associated with Hemi-Retinal Vein Occlusion [J]. Case Rep Ophthalmol, 2015, 6(2): 228-238.
- [10] 胡馗, 洪涛. 内皮祖细胞(EPCs)在心脏移植物血管病变(CAV)中的研究进展 [J]. 复旦学报医学版, 2013, 40(4): 491-494.
- [11] 孙丽娜, 高海娜, 陈树春. 内皮祖细胞在缺血性疾病治疗中的临床应用 [J]. 河北医科大学学报, 2015, 36(2): 234-236.
- [12] Jolie E. Preliminary Insights from the Cache Cave Textile Assemblage [J]. European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 2015, 22(1): 53-58.
- [13] 伊雪, 李占清, 杨述亮, 等. N-乙酰半胱氨酸对大鼠心脏移植缺血再灌注损伤时基质金属蛋白酶的影响 [J]. 新医学, 2014, 45(9): 593-596.
- [14] 吴钟伟, 王圣, 李斌, 等. 重组人脑利钠肽对急性 ST 段抬高型心肌梗死内皮祖细胞血管生成能力的影响 [J]. 中国急救医学, 2015, 28(3): 243-247.
- [15] Zamilpa R, Ibarra J, de Castro-Bras LE, et al. Ransgenic over expression of matrix metalloproteinase-9 in macrophages attenuates the inflammatory response and improves left ventricular function post-myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53(3): 599-608.
- [16] 胡馗, 洪涛. 内皮祖细胞(EPCs)在心脏移植物血管病变(CAV)中的研究进展 [J]. 复旦学报医学版, 2013, 40(4): 491-494.

Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 and endothelial cells in patients undergoing cardiac transplantation

DAI Beijun¹, WENG Jianfeng², HU Zhibin¹

Department of Cardiothoracic Surgery, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 315000, Zhejiang, China; Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

ABSTRACT **AIM:** To investigate the expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and endothelial cell (EPCs) in patients undergoing cardiac transplantation. **METHODS:** From January 2012 to January 2016, 120 patients undergoing cardiac transplantation in our hospital were selected as the study group. At the same time, 120 healthy people were selected as the control group according to age and sex matching. The level of MMP-9 in plasma was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The level of EPCs was detected by Flow cytometry, the difference and correlation between MMP-9 and EPCs in two groups were compared and analyzed. **RESULTS:** The levels of MMP-9 and EPCs in plasma of patients after heart transplantation were significantly increased, compared with those before transplantation, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The levels of MMP-9 and EPCs before and after heart transplantation in the study group were significantly higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The levels of MMP-9 and EPCs in the patients plasma with heart transplantation complication were

(128.46 ± 7.32) mg/L and 166.84 ± 14.82 , which were significantly higher than those in the normal group (94.25 ± 7.14) mg/L and 134.68 ± 13.68 ($P < 0.05$). The levels of MMP-9 and EPCs in the patients plasma with heart transplantation death cases were (137.36 ± 8.13) mg/L and 168.24 ± 14.62 , which were significantly higher than those in the survival cases (92.85 ± 7.06) mg/L and 98.41 ± 13.24 ($P < 0.05$). The expression of MMP-9 was positively correlated with the expression of EPCs ($r = 0.686$, $P = 0.000$) in patients undergoing heart transplantation. **CONCLUSION:** The levels of MMP-9 and EPCs in plasma is closely related to early pathologic changes of allograft vasculopathy after heart transplantation; monitoring the dynamic changes of plasma MMP-9 and EPCs of high-risk patients may contribute to observe the early after cardiac allograft vasculopathy tendency after heart transplantation, and timely adjust the treatment plan.

KEYWORDS heart transplantation; matrix metalloproteinase-9; endothelial cell

本文编辑:钟正灵