

文章编号:1005-6947(2007)06-0565-05

· 基础研究 ·

# 兔动脉壁剪切力改变对 MMP-2 表达及动脉瘤形成的影响

刘晟, 舒畅

(中南大学湘雅二医院 血管外科, 湖南 长沙 410011)

**摘要:**目的 观察局部动脉壁剪切力改变对基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 表达的影响及其与动脉瘤形成的关系。方法 新西兰大白兔 48 只, 实验组和对照组各 24 只。实验组行同种异体腹主动脉补片腹主动脉成瘤术, 于术后 1, 7, 14, 28d 取标本, 并在取标本时测量动脉管径。免疫组化观察 MMP-2 的动态表达。结果 腹主动脉成瘤术后 7d, 瘤体、流入道、流出道外径均增大 (均  $P < 0.05$ ); 管壁炎性细胞浸润, 中层弹力纤维病变; MMP-2 表达于术后 1d 达高峰 ( $P < 0.01$ ), 并持续性高表达 ( $P < 0.01$ )。结论 动脉壁剪切力的改变可使局部血管直径增加, 管壁 MMP-2 表达上调。瘤体直径的增大与 MMP-2 的持续高表达有关; MMP-2 可能在动脉壁剪切力改变与动脉瘤形成之间起到一定作用。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(6):565-569]

**关键词:** 动脉瘤/病因学; 剪切力; 基质金属蛋白酶 2

**中图分类号:** R654.31 **文献标识码:** A

## Effect of leporine arterial wall shear stress change on matrix metalloproteinase 2 expression and aneurysm formation

LIU Sheng, SHU Chang

(Department of Vascular Surgery, the Second Xiang Ya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract: Objective** To observe the relation between the change of arterial wall shear stress and the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), and analyze its role in aneurysm formation.

**Methods** Forty-eight New Zealand rabbits were equally divided into experimental and control groups. During the operation of the experiment group, a homogenic patch was implanted to the abdominal aorta to form an aneurysm, while sham operation was done in the control group. The arterial wall was harvested 1d, 7d, 14d, and 28d after operation, respectively. The diameter of the aorta was measured before harvesting. The level change of MMP-2 was observed by immunohistochemistry. **Results** In experimental group, the diameter of the aneurysm and its inflow and outflow tracts were enlarged at the 7-day after operation ( $P < 0.05$ ). Large amount of inflammatory cells infiltrated the arterial wall, and with pathologic change of elastic fibers of the media. MMP-2 reached the peak value in 1d after operation ( $P < 0.01$ ), and remained at a high level of expression continually ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** When shear stress changes, the diameter of arteries increases and the expression of MMP-2 in the vessel wall is up-regulated. The enlargement of the aneurysm has a relationship with the continuous high expression of MMP-2. MMP-2 may be involved in the relationship between arterial wall shear stress changes and the formation of the aneurysm.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(6):565-569]

**Key words:** Aneurysm/etiol; Shear Stress; MMP-2

**CLC number:** R654.31 **Document code:** A

**基金项目:**湖南省科技厅科技计划资助项目(04fj3003)。

**收稿日期:**2006-10-23; **修订日期:**2007-01-30。

**作者简介:**刘晟,男,湖南省株洲人,中南大学湘雅二医院硕士研究生,主要从事大动脉疾病方面的研究。

**通讯作者:**刘晟 E-mail:tocter@sina.com

目前国内外对主动脉瘤成因的研究比较多。其中,基质金属蛋白酶(MMPs)的表达与主动脉瘤形成的关系已得到很多实验研究的肯定。近年来,血流动力学的改变也引起众多国内外专家的关注。血流动力学的改变可刺激管壁,引起一系列生化指标的改变。而这些表达的改变在动脉瘤的发生发展过程中究竟起何种作用,尚待研究。本实验通过一种建立动物腹主动脉瘤模型的新方法,直接导致兔腹主动脉血流动力学以及局部动脉壁剪切力改变,并使用免疫组织化学方法以及计算机技术分析基质金属蛋白酶2(MMP-2)在正常动脉壁以及动脉瘤组织中的表达,以探讨这些表达在动脉瘤的发病机制中所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 新西兰大白兔48只,体重( $1.95 \pm 0.15$ )kg,雄雌不限。动物随机分为实验组和对照组,每组24只。两组按时间先后各分为术后1,7,14,28d 4个时段,每时段6只。另有12只兔作为腹主动脉补片供兔。

1.1.2 实验试剂 麻醉剂为3%戊巴比妥钠;肝素化药剂为12 500 U 肝素钠配于100mL生理盐水中的溶液;固定液为10%甲醛溶液;MMP-2多克隆抗体及显色试剂盒,购于武汉博士德公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立 (1)备片:供补片兔麻醉后开腹,暴露腹主动脉,静脉给予肝素;3min后取出腹主动脉,裁剪成大小为(5~7)mm × (7~8)mm补片,置于冰肝素盐水中备用。(2)补片:兔麻醉后开腹,暴露及分离肾动脉平面以下腹主动脉。全身肝素化。纵向切开肾动脉平面下方2cm处腹主动脉,取准备好的同种异体腹主动脉壁供片进行修补,以9-0丝线补片缝合成瘤。彻底止血后腹腔内注射青霉素20万U,关腹。(3)对照组手术同实验组,但不切开腹主动脉仅阻断腹主动脉,阻断时间同实验组。

1.2.2 标本采集 实验组和对照组按各时段分别于术后1,7,14,28d再次麻醉开腹。处死1min后,灌注甲醛溶液于成瘤处近心侧3cm处;取腹主动脉标本组织,置于甲醛溶液中固定。对照组取相应节段腹主动脉于甲醛溶液中固定。

1.2.3 病理切片形态学检测 将固定后的标本制成常规石蜡切片,行HE常规染色以及VVG特殊染色。

### 1.2.4 免疫组化(SABC法)检测MMP-2的表达

操作按试剂盒说明书进行。阴性对照为以磷酸盐缓冲液(PBS)代替特异性一抗。结果判断:显微镜下观察,免疫组化阳性染色为细胞质内棕黄色颗粒。根据染色强度分为4级:阴性(-)为无阳性细胞;弱阳性(+)为阳性细胞<30%;阳性(++ )为阳性细胞占30%~60%;强阳性(+++)为阳性细胞>60%。

阳性颗粒面积及MMP-2表达蛋白总量分析:采用光学显微镜下非重叠摄影,计算机软件随机截图。每张截图均借助计算机软件Image-Pro Plus(IPP)分析统计腹主动脉壁全层的MMP-2免疫组化染色阳性颗粒的相对面积(%)和相对光密度(%)。

### 1.3 统计学处理

结果中数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。瘤体、流入道、流出道外径成瘤时与取标本时比较采用配对 $t$ 检验。相对面积、相对光密度与对照组比较采用两个独立样本 $t$ 检验。同组间均数比较采用单因素方差分析。阳性表达例数比较采用卡方检验。以上检验均采用SPSS10.0软件分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

## 2 结果

### 2.1 术后腹主动脉成瘤效果

实验组24只兔。大体观察:术后1d相对于补片时无明显改变;动脉壁外表面光滑,无明显粘连(图1)。术后7d开始,补片动脉节段与周围组织粘连严重,动脉壁外表面欠光滑;瘤体、流入道、流出道外径较手术成瘤时均有不同程度的增大。比较成瘤时开始有显著改变( $P < 0.05$ ),术后14,28d差别有极显著性( $P < 0.01$ );取标本时瘤体、流入道、流出道外径各时段间均有明显差别( $P < 0.05$ )(表1)(图2)。

表1 实验组术后不同时段动脉外径的变化(mm,  $\bar{x} \pm s$ )

检测时间	检测部位	1d	7d	14d	28d
成瘤时	瘤体	$4.82 \pm 0.06$	$4.83 \pm 0.07$	$4.85 \pm 0.06$	$4.83 \pm 0.07$
	流入道	$3.48 \pm 0.08$	$3.47 \pm 0.15$	$3.48 \pm 0.08$	$3.47 \pm 0.08$
	流出道	$3.47 \pm 0.07$	$3.45 \pm 0.10$	$3.47 \pm 0.11$	$3.46 \pm 0.06$
取标本时	瘤体 <sup>1)</sup>	$4.87 \pm 0.07$	$4.92 \pm 0.08^{2)}$	$4.98 \pm 0.06^{3)}$	$5.06 \pm 0.06^{3)}$
	流入道 <sup>1)</sup>	$3.48 \pm 0.08$	$3.53 \pm 0.14^{2)}$	$3.65 \pm 0.06^{3)}$	$3.73 \pm 0.08^{3)}$
	流出道 <sup>1)</sup>	$3.48 \pm 0.08$	$3.55 \pm 0.15^{2)}$	$3.70 \pm 0.09^{3)}$	$3.77 \pm 0.08^{3)}$

注:1)各时段之间的比较, $P < 0.05$ ;2)与成瘤时相应部位相同时段比较, $P < 0.05$ ;3)与成瘤时相应部位相同时段比较, $P < 0.01$

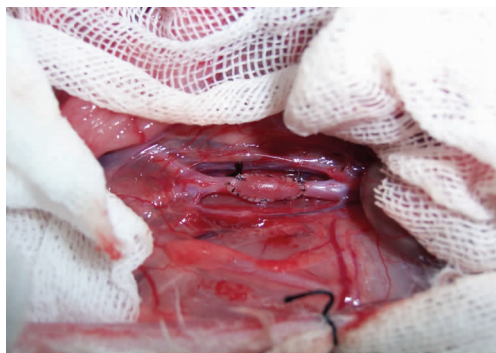


图1 术后1d腹主动脉成瘤效果

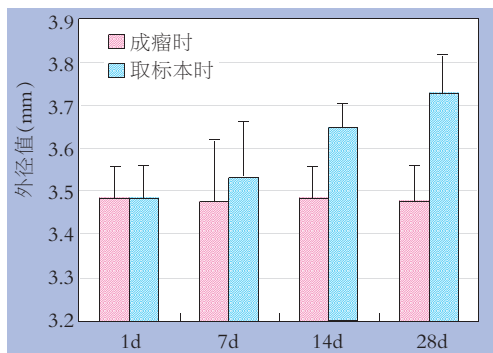


图2 流出道外径直方图

### 2.2 组织形态学改变

2.2.1 HE染色 (1)对照组各时段结构正常,内膜细胞排列整齐,平坦;中膜层次清楚,平滑肌细胞及纤维母细胞散在均匀分布(图3a)。(2)实验组术后1d未见内膜及中膜明显特殊改变,平滑肌细胞排列尚整齐。(3)实验组术后7d动脉壁内膜有大量炎性细胞浸润,内膜增厚;中膜结构欠清,有炎性细胞浸润,平滑肌细胞开始发生凋亡;外膜水肿,结构紊乱,炎性细胞浸润(图3b)。(4)而术后14d和28d实验组其炎性反应与7d相似,平滑肌细胞凋亡明显,整体结构更加紊乱。

2.2.2 VVG染色 (1)对照组显示正常兔肾动脉平面以下主动脉壁中膜弹力纤维纵横排列,可分为6~7层左右,结构层次分明(图4a)。

(2)实验组术后1,7,14,28d时段腹主动脉弹力纤维逐渐减少。术后1d未见明显改变,术后7,14d可见弹力纤维严重受损,失去正常动脉壁层次(图4b)。术后28d可观察到其部分弹力纤维完全融解。

### 2.3 免疫组化结果

对照组各时段腹主动脉壁MMP-2呈阴性或弱阳性,而实验组术后各时段均为阳性和强阳性改变,且主要表达于腹主动脉壁中膜(表2)(图5a-b)。用IPP图像分析处理软件对免疫组化图像资料进行统计分析,结果显示实验组的MMP-2阳性表达区的相对面积,较对照组显著增高( $P < 0.01$ )(表3)。经光密度计算,得出MMP-2阳性表达相对于固定大小视野图像光密度值百分比,实验组较对照组显著增高( $P < 0.01$ )(表4)。

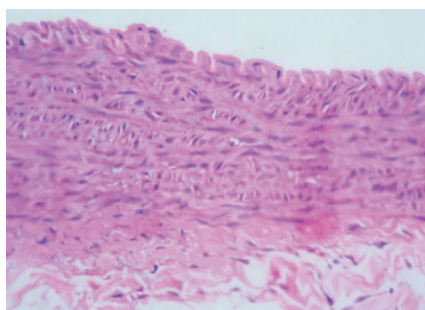


图3a 对照组动脉壁 HE 染色(100倍)

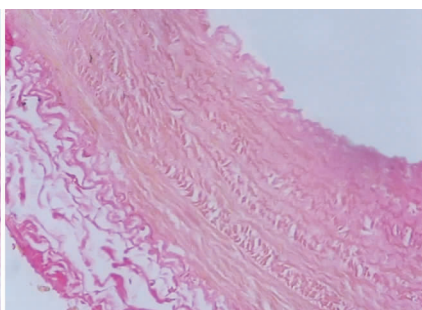


图4a 对照组 VVG 染色(100倍)

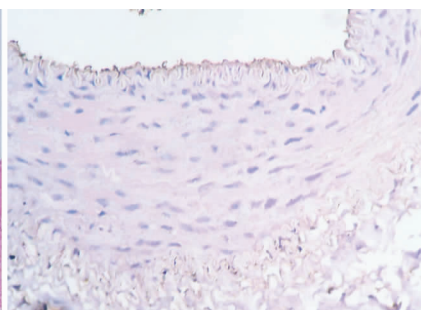


图5a MMP-2免疫组化染色阴性(100倍)

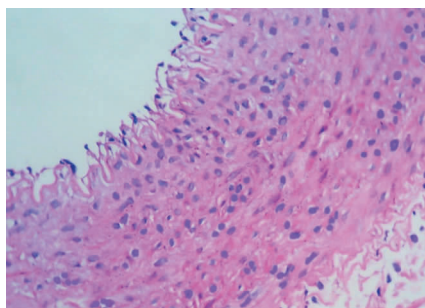


图3b 实验组7d动脉壁大量炎性细胞浸润

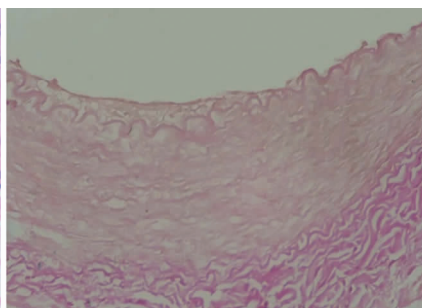


图4b 实验组7dVVG染色(100倍)

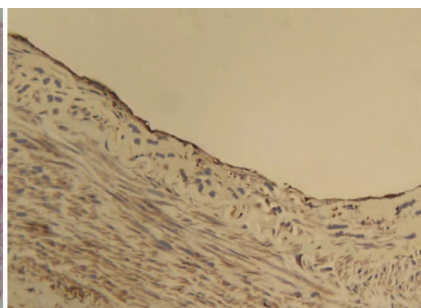


图5b MMP-2免疫组化强阳性(100倍)

**表2** 免疫组化MMP-2不同表达程度各组例数比较(例)

分组	术后时段(d)	合计	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
对照组 <sup>†</sup>	1	6	4	2	0	0
	7	6	4	2	0	0
	14	6	5	1	0	0
	28	6	3	3	0	0
实验组 <sup>†</sup>	1	6	0	0	1	5
	7	6	0	0	1	5
	14	6	0	0	2	4
	28	6	0	0	2	4

注:† 两组术后各相应时段MMP-2表达差异有显著性( $P < 0.01$ )

**表3** 两组术后各时段MMP-2阳性表达区域相对面积比(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	1d	7d	14d	28d
对照组	2.77 ± 0.54	2.86 ± 0.61	2.95 ± 0.59	2.84 ± 0.73
实验组 <sup>2)</sup>	19.05 ± 2.99 <sup>1)</sup>	20.04 ± 3.04 <sup>1)</sup>	18.98 ± 3.12 <sup>1)</sup>	18.58 ± 2.89 <sup>1)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.01$ ;2)实验组四个时段的各时段之间的比较, $P > 0.05$

**表4** 两组术后各时段MMP-2阳性表达区相对光密度比(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	1d	7d	14d	28d
对照组	4.25 ± 1.01	4.31 ± 0.93	4.49 ± 0.81	4.36 ± 0.78
实验组 <sup>2)</sup>	25.51 ± 3.50 <sup>1)</sup>	26.81 ± 3.09 <sup>1)</sup>	23.70 ± 3.27 <sup>1)</sup>	24.79 ± 4.23 <sup>1)</sup>

注:1)与对照组各相应时段比较, $P < 0.01$ ;2)同组四个时段的各时段之间的比较, $P > 0.05$

### 3 讨论

目前国内外对于模型瘤体形成后,其血流动力学及瘤壁剪切力的改变尚无统一观点。相对于正常腹主动脉中的血流而言,灌注到动脉瘤中形成的血流是随机而紊乱的<sup>[1]</sup>。当瘤体增大到一定程度或体位等因素发生改变时,血流将立即形成湍流<sup>[2]</sup>。这不仅会导致血流速度的改变,而且还会引起血流方向的变化<sup>[3]</sup>。此时,瘤壁的剪切力是分布不均的。局部剪切力将迅速增大,而另外的部位亦有可能下降。有研究<sup>[4]</sup>表明,当瘤体内血流紊乱时,瘤体远心端剪切力明显增高;实验还发现,血管内皮细胞和平滑肌细胞对于剪切力的改变反应灵敏。在高剪切力下,内皮细胞将分泌一氧化氮(NO)以启动血管的自我重建,从而引起一系列反应,包括生长因子表达的上调,MMPs的激活等。当剪切力降低时,血流流速下降将会导致局部血栓形成,刺激炎症反应以及发生相关的生化改变。这些反应最终都将导致血管的重建<sup>[5]</sup>。

从本研究两组各时段再次测量的结果看,实验组术后瘤体、流入道、流出道随观察时间的延长,其外径越大。这表明:动脉补片后,不仅会发

生动脉瘤,而且瘤体会随时间增大,不断向两端发展。这种变化是持续性的,且时间越长,瘤体近远端受累程度越重。研究<sup>[6]</sup>表明:血管壁剪切力急剧改变时,其管壁变薄;而当血管壁剪切力呈持续缓慢变化时,其管壁增厚。本实验应属于第一种情况,所以外径的增加应排除管壁增厚的因素,而系实际管径的增加。

从两组各时段HE染色切片中发现,术后动脉壁各层均有大量炎性细胞浸润,动脉壁结构受损。这些改变在术后第1d尚不明显。多项研究<sup>[7]</sup>证明:大量炎性介质的释放能与MMPs的表达发生关联,可以诱导MMPs的表达。同时MMPs也能参与炎性反应,并导致动脉壁的进一步损害<sup>[8]</sup>。

VVG染色的结果也提示动脉壁弹力纤维的病变与各项指标变化的一致性。弹力纤维破坏是动脉瘤最重要的病理改变之一<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>表明:弹力纤维约占正常动脉壁干重的35%,而动脉瘤组织中仅占10%左右。此外,与胶原纤维不同,弹力纤维不能在动脉壁持续的合成<sup>[11]</sup>。实验组弹力纤维随术后时间的延长发生了不可逆的损害。这可能是与弹力纤维降解有关的MMPs的表达上调以及不断引起动脉壁病变的结果。

从相对面积和相对光密度的结果看,术后1d即是一个MMP-2表达的高峰,其两项指标在实验组与对照组间均有统计学差异( $P < 0.01$ ),而术后7d虽然两项指标均略高于术后1d,但需要排除阳性表达以及光密度的累积作用,并且两组阳性结果比较不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。所以,术后1d,MMP-2的表达即进入高峰,并在随后的病程发展中呈持续性高表达。

综上所述,无论是各项大体病理结果还是MMP-2分子生物学的检测结果均表明其变化是一致的。这为术后动脉壁越来越“薄弱”,并趋向于成瘤提供了证据。说明成瘤术后,由于血流动力学以及动脉壁剪切力的改变,瘤体每天都会朝增大的方向发展。

### 4 结论

动脉壁剪切力的改变可使局部血管直径增加,可促使管壁MMP-2表达上调,并在剪切力突增后1d内达高峰。瘤体直径的增大与MMP-2的持续表达有密切关系;MMP-2可能在动脉壁剪切力改变与动脉瘤形成之间起到一定作用。

#### 参考文献:

[1] Peattie RA, Asbury CL, Bluth EI, et al. Steady flow in

- models of abdominal aortic aneurysms. Part II: Wall stresses and their implication for in vivo thrombosis and rupture [J]. *J Ultrasound Med*, 1996, 15(10):689-696.
- [2] Leung J, Wright A, Cheshire N, *et al.* Flow patterns and wall shear stresses in patient-specific models of the abdominal aortic aneurysm [J]. *Stud Health Technol Inform*, 2004, 103( ):235-242.
- [3] Kumar BV, Naidu KB. Hemodynamics in aneurysm [J]. *Comput Biomed Res*, 1996, 29(2):119-139.
- [4] Lehoux S, Tronc F, Tedgui A. Mechanisms of blood flow-induced vascular enlargement [J]. *Biorheology*, 2002, 39(3-4):319-324.
- [5] Budwig R, Elger D, Hooper H, *et al.* Steady flow in abdominal aortic aneurysm models [J]. *J Biomech Eng*, 1993, 115(4A):418-423.
- [6] Taylor TW, Yamaguchi T. Three-dimensional simulation of blood flow in an abdominal aortic aneurysm - steady and unsteady flow cases [J]. *J Biomech Eng*, 1994, 116(1):89-97.
- [7] Mach F, Schonbeck V, Fabunmi RP, *et al.* Tlymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40 L-dependent mechanism: Implication for tubule formation [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(1):229-237.
- [8] Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 contributes to is chemia-reperfusion injury in the heart [J]. *Circulation*, 2000, 101(15):1833-1839.
- [9] He E, Joan A, Keiser. Hepatosyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells [J]. *Bioch Biophy Res Commun*, 2000, 272(3):900-905.
- [10] Baxter BT, Davis VA, Minion DJ, *et al.* Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments [J]. *J Vasc Surg*, 1994, 19(5):797-803.
- [11] Holmes DR, Liao S, Parks WC, *et al.* Medial neovascularizat in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurismal degeneration with pathophysiologic implications [J]. *J Vasc Surg*, 1995, 21(5):761-772.

文章编号:1005-6947(2007)06-0569-01

## · 病案报告 ·

# 胃癌乳腺转移 1 例

叶春梅, 薛明兴, 陈波, 黄自明, 曾凡华

(湖北省妇幼保健院 乳腺外科, 湖北 武汉 430070)

**关键词:** 乳腺肿瘤/继发性; 胃肿瘤; 肿瘤转移; 病例报告

**中图分类号:**R737.9

**文献标识码:**D

**患者** 女, 26岁, 已婚。因发现右乳肿块3个月于2006年2月入院。产后1年。5年前在外院行胃癌根治术, 病理报告为低分化腺癌, 病灶局限于黏膜及黏膜下层, 淋巴结情况不详, 术后未行辅助治疗。体查: 右乳外上象限距乳头缘约5cm处扪及3个直径约1.0cm类圆形硬结, 呈弧形紧密排列, 较表浅, 与皮肤无粘连, 表面皮肤光滑, 无结节, 无凹陷, 其中2个肿块质地中等, 另1个肿块质地稍硬, 肿块边界较清楚, 有一定活动度, 区域淋巴结无肿大。入院检查胸片、左乳钼靶、腹腔盆腔CT均无异常。纤维胃镜检查残胃及吻合口正常。入院后在局麻下行右乳肿块切除术, 术中发现3个肿

块彼此相连, 无明显分界, 病变累及腺体全层, 呈小范围内弥漫性病变, 部分区域质地坚硬。术后病理报告: (右乳) 印戒细胞癌, ER(-), PR(-), CEA(+), GCDFP15(-), CK(-), CD(-), 结合病史诊断: 胃癌乳腺转移。确诊后予以左乳癌改良根治术, 术后标本病检未发现其他病灶及转移的淋巴结。术后转入肿瘤内科按晚期胃癌予以奥沙利铂+CF+5-FU化疗4个疗程。出院后随访14个月无复发转移。

**讨论** 胃癌转移至乳腺非常罕见<sup>[1]</sup>。查阅国内文献资料报道2例, 均为单侧发病, 病理诊断均为印戒细胞癌, 确诊后均采用了乳腺根治术, 术后1例存活半年, 另1例存活4年。该病可表现为单侧或双侧乳腺内较孤立性肿块, 如本例患者; 也可表现为类似炎性乳腺癌而无明确肿块<sup>[1]</sup>, 并可伴腋下及锁骨区淋巴结转移<sup>[2]</sup>, 在临床与影像学方面的表现无特异性, 需依靠病理确诊。本病在病理组织学上易误诊为浸润性小叶癌, 结合

患者的胃癌病史及免疫组化的结果可鉴别诊断。如果胃癌与乳腺癌两者同时发现则还需排除晚期乳腺癌胃肠道转移。本例患者年轻, 起初隐瞒了胃癌病史, 后来通过追问病史证实5年前为胃癌, 而不是良性疾病, 结合病理诊断胃癌乳腺转移成立。确诊后, 根据患者的一般情况和病变范围采取积极合理的治疗, 仍可获得较长时间的生存。本例患者胃癌术后5年乳腺转移, 未发现其他复发转移灶, 治疗上予以乳腺癌改良根治术处理乳腺病灶, 术后再按晚期胃癌进行综合性治疗, 可取得较好的治疗效果。

## 参考文献

- [1] Susanne Briest. Lars-Christian Horn. Metastasizing signet ring cell carcinoma of the stomach-mimicking bilateral inflammatory breast cancer [J]. *Gynecologic Oncology*, 1999, (74):491-494.
- [2] 李东方, 梁晓玲, 戚红艳, 等. 胃癌乳腺转移1例 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2001, 8(4):374.

**收稿日期:**2007-01-18。

**作者简介:** 叶春梅, 女, 湖北武汉人, 湖北省妇幼保健院副主任医师, 主要从事乳腺疾病方面的研究。

**通讯作者:** 叶春梅 E-mail: ewei327

@sina.com