

• 论著 •

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

李章平 陈寿权 王姗姗 黄唯佳 程俊彦 王卫 王万铁 谭映霞

【摘要】目的 探讨心肺复苏早期脑组织基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 及基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)的 mRNA 表达变化。**方法** 用窒息法建立大鼠心肺复苏模型。80 只 SD 大鼠随机分为假手术对照组和复苏组,然后依据时间分为假手术或复苏自主循环恢复(ROSC)后即刻及 0.5、3、6 和 9 h 组。检测各组大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 的 mRNA 表达情况。**结果** 心肺复苏后 3 h 大鼠脑组织 MMP-9 及 TIMP-1 的 mRNA 表达水平开始上升,6 h 时显著增高,MMP-9/TIMP-1 比值也相应增大。MMP-2 mRNA 水平在心肺复苏后 9 h 内未见明显升高。**结论** 心肺复苏后早期就出现 MMP-9、TIMP-1 的 mRNA 表达增加及比例失衡,而 MMP-2 mRNA 水平在早期无明显变化。

【关键词】 心肺复苏术; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶组织抑制剂

Expression of mRNA of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase after cardiopulmonary resuscitation for asphyxial cardiac arrest in rat LI Zhang-ping*, CHEN Shou-quan, WANG Shan-shan, HUANG Wei-jia, CHENG Jun-yan, WANG Wei, WANG Wan-tie, TAN Ying-xia. * Department of Emergency, The First Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding Author: CHEN Shou-quan (Email: csq@hosp1.ac.cn)

【Abstract】Objective To study the change in mRNA expression of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in brain after cardiopulmonary resuscitation (CPR) for asphyxial cardiac arrest in rat. **Methods** The animal model of cardiac arrest was reproduced by clamping endotracheal tube at the expiration. Eighty male SD rats were randomly divided into two groups: control group and resuscitation group, and they were again divided into 0, 0.5, 3, 6, 9 hours subgroups ($n=8$). Evans blue content and mRNA expressions of MMPs and TIMP-1 in the brain after CPR were determined respectively. **Results** The mRNA expression of MMP-9 and TIMP-1 was up-regulated 3 hours after restoration of spontaneous circulation (ROSC). At 6 hours after ROSC, they were markedly high, and the ratio of MMP-9/TIMP-1 was higher too. The mRNA expression of MMP-2 showed no significant change at 9 hours after ROSC. **Conclusion** The mRNA expression of MMP-9 and TIMP-1 and MMP-9/TIMP-1 are increased at early stage after CPR, but the mRNA expression of MMP-2 shows no significant change.

【Key words】 cardiopulmonary resuscitation; matrix metalloproteinases; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)后脑损伤是一个复杂的病理生理过程,脑复苏的成败是决定复苏是否完全成功的关键。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组同源

基金项目:浙江省温州市科技计划重点资助项目(Y2004A002, S2002A020);浙江省中医药基金项目(2005Y018)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院急诊科(李章平,陈寿权,王姗姗,黄唯佳,程俊彦),医学科学研究所(谭映霞);温州医学院病理生理教研室(王卫,王万铁)

通讯作者:陈寿权,教授,硕士研究生导师(Email:csq@hosp1.ac.cn)

作者简介:李章平(1971-),男(汉族),浙江省人,医学硕士,副主任医师,主要从事心肺脑复苏的相关研究,曾经在奥地利进修学习,在中外杂志上发表论文 10 余篇。

的酶活性依赖 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的中性蛋白酶家族,能降解细胞外基质,影响微血管基底膜结构而破坏血管壁。基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)是 MMPs 的特异性组织抑制因子,能调节 MMPs 的活性^[1]。研究发现,MMPs 在促进局部缺血性脑损伤中具有重要作用^[2],但在 CPR 后脑损伤中的变化尚未见报道。本研究拟用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)半定量法观察 CPR 早期大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 以及 TIMP-1 mRNA 表达的变化及时间特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:雄性清洁级 SD 大鼠 80 只,体重 250~400 g;购自温州医学院动物实验中心,

动物许可证号医动字 22-03001。随机分为假手术对照组和复苏组,每组按时间又分为假手术或复苏自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC)后即刻及 0.5、3、6 和 9 h 组,每组 8 只动物。

1.2 动物模型制备及给药方法:用经典窒息模型^[3]并加以改进;实验参照 Utstein 模式^[4]。术前禁食 12 h,自由饮水。称重,戊巴比妥钠 35 mg/kg 腹腔注射诱导麻醉,继以 10 mg·kg⁻¹·h⁻¹补充麻醉。将动物仰卧固定于手术台上,皮下针接心电导联,进行心电监护。左颈动脉置管,接压力换能器,显示动脉波形,气管切开置管,接呼吸机。大鼠术后室温下稳定 10 min,于呼气末夹闭气管插管致呼吸停止。心脏停搏(CA)定义为心电图呈心室纤颤、停止或电-机械分离,颈动脉平均动脉压(MAP)<30 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)。待出现 CA 3 min[夹闭气管后(7±1)min]后开始行 CPR,快速经动脉推注肾上腺素 20 μg/kg 和质量分数为 5%的碳酸氢钠 1 mmol/kg;呼吸机辅助通气(体积分数为 100%的 O₂),通气频率 80 次/min,潮气量 6 ml/kg;同时快速人工胸外按压,按压频率为 160 次/min,按压深度为大鼠胸廓前后径的 1/3;连续监测并记录心电图、颈动脉 MAP。出现自主心率(HR)且 MAP>60 mm Hg并持续 10 min 为 ROSC 的标志。假手术对照组动物仅进行麻醉和气管插管、血管穿刺,不进行窒息及 CPR,相应时间点处死动物并取样。

1.3 脑组织伊文思蓝(Evans Blue,EB)含量测定:脑组织 EB 含量可用来反映血-脑屏障通透性^[2]。动物均于处死前 15 min 经舌下静脉注射 2%的 EB 2 ml/kg,深度麻醉,开胸,左心室插管至主动脉,剪开右心房,10 min 内经插管灌注生理盐水 150 ml,然后断头取部分脑组织,用电子天平精确称其湿重后,投入中号试管中,分别加入 3 ml 甲酰胺,加盖后于 37℃水浴箱孵育 48 h,轻轻摇匀,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,在 721 分光光度计 632 nm 处检测吸光度。以 0、0.138、0.275、0.550、1.100、2.200、4.400 和 8.800 mg/L 作为 EB 的标准浓度,求得回归方程 $y=0.144+16.864x$ (x 为吸光度, y 为浓度)。按下列公式计算脑组织 EB 含量:脑组织 EB 含量(μg/g)= $A \times$ 甲酰胺量(ml)÷脑湿重(g)。A 为根据标准曲线回归方程求得的样品 EB 含量(mg/L)。

1.4 脑组织 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达测定:处死大鼠后立即取 1/4 脑组织置液氮中,随后于-70℃下冰冻保存备用。按 Trizol 试

剂盒说明书要求提取总 RNA,逆转录体系 20 μl,随机引物 250 ng,莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶(M-MLV)200 U,总 RNA 2.5 μg。取 2 μl 逆转录体系的 cDNA,加 1 U Taq 聚合酶及相应缓冲液于 20 μl 体系内行 PCR 扩增,含引物 10 pmol。内参照为 β-肌动蛋白(β-actin)94℃变性,72℃延伸,退火温度、引物序列及产物长度见表 1。用质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后,经 Pharmacia 凝胶成像仪观察,并用 Imagemaster 分析仪分析条带峰面积,计算 MMP-2/β-actin、MMP-9/β-actin 和 TIMP-1/β-actin 的峰面积比值。

表 1 PCR 引物序列、退火温度和产物长度

Table 1 Primer sequence, annealing temperature, product length

基因	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
MMP-2	5'-CCC CAT TCT ACA CCT ACA CCA A-3'	61	243
	反义 5'-CAC TGT CCG CCA AAT AAA CC-3'		
MMP-9	5'-CCA GAT GAT GGG AGA GAA GC-3'	59	403
	反义 5'-AAA GGC GTG TGC CAG TAG AC-3'		
TIMP-1	5'-TCC CCA GAA ATC ATC GAG AC-3'	61	411
	反义 5'-ATC GCT CTG GTA GCC CTT CT-3'		
β-actin	5'-CAT TCG GCA ATG AGC GGT TC-3'	条件同上	743
	反义 5'-CTT AGG AGT TGG GGG TGG CT-3'		

1.5 统计学方法:数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 12.0 统计软件进行分析。采用单因素方差分析,方差齐性用 Levene 检验,方差齐时多组间均数比较用 LSD 检验,方差不齐时用 Tamhane's t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

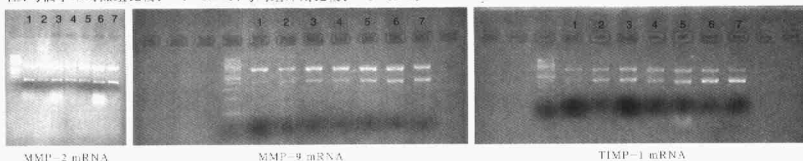
2 结果

2.1 CPR 期间大鼠 HR、MAP 的变化:正常大鼠 MAP 为(141.8±14.1)mm Hg。大鼠窒息开始至 CA 时间为(294±44)s。所有大鼠在 CA 时表现为心尖区心脏搏动消失,皮肤黏膜明显发绀,心电图表现大多为电-机械分离,窒息 7 min 左右心脏已完全停搏,HR 0,MAP 接近 0。经 CPR 后 ROSC 为 100%,ROSC 大鼠平均 CPR 时间为(175±104)s;ROSC 时 MAP 均>60 mm Hg,可触摸到明显的心尖搏动,动物皮肤、黏膜发绀明显减轻。实验结束时大鼠处死前存活反应良好。

2.2 CPR 早期大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 的 mRNA 表达结果(表 2,图 1):假手术对照组各时间点之间脑组织 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 的 mRNA 表达水平差异均无显著性(P 均>0.05)。复苏组在 CPR 后 9 h 内 MMP-2 mRNA 表达未见明显升高,与 CPR 即刻及假手术对照组同时间点相比差异无显著性(P 均>0.05)。复

表 2 CPR 早期大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 表达及 MMP-9/TIMP-1 比值变化($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 mRNA and MMP-9/TIMP-1 rate at different time points after CPR ($\bar{x} \pm s, n=8$)

指标	组别	即刻	术后 0.5 h	术后 3 h	术后 6 h	术后 9 h
MMP-2 mRNA	假手术对照组	0.641 ± 0.191	0.681 ± 0.263	0.644 ± 0.138	0.726 ± 0.164	0.719 ± 0.174
	复苏组	0.605 ± 0.180	0.568 ± 0.185	0.606 ± 0.126	0.693 ± 0.195	0.753 ± 0.109
MMP-9 mRNA	假手术对照组	0.268 ± 0.062	0.251 ± 0.077	0.267 ± 0.058	0.272 ± 0.058	0.259 ± 0.054
	复苏组	0.227 ± 0.090	0.297 ± 0.070	0.474 ± 0.072 ^{**▲}	0.835 ± 0.086 ^{**▲}	0.848 ± 0.087 ^{**▲}
TIMP-1 mRNA	假手术对照组	0.586 ± 0.097	0.598 ± 0.117	0.590 ± 0.120	0.602 ± 0.101	0.597 ± 0.095
	复苏组	0.592 ± 0.218	0.569 ± 0.293	0.937 ± 0.137 ^{**▲}	1.259 ± 0.203 ^{**▲}	1.304 ± 0.297 ^{**▲}
MMP-9/TIMP-1	假手术对照组	0.454 ± 0.080	0.430 ± 0.137	0.458 ± 0.073	0.452 ± 0.066	0.434 ± 0.059
	复苏组	0.430 ± 0.237	0.545 ± 0.194	0.511 ± 0.089	0.675 ± 0.104 ^{**▲}	0.685 ± 0.196 ^{**▲}

注:与假手术对照组比较;^{*} $P < 0.01$;与同组即刻比较;[▲] $P < 0.01$ 

1:假手术对照组 6 h;2:假手术对照组 9 h;3:复苏组即刻;4:复苏组 0.5 h;5:复苏组 3 h;6:复苏组 6 h;7:复苏组 9 h

图 1 CPR 早期大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 表达变化

Figure 1 Expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 mRNA at different time points after CPR

苏组在 CPR 后 3 h MMP-9 mRNA 表达水平增高, 6 h 显著上升, 9 h 仍升高但增幅不大, 和 CPR 即刻及假手术对照组相同时间点比较差异均有显著性 ($P < 0.01$)。复苏组 TIMP-1 mRNA 表达水平和 MMP-9 mRNA 变化相平行, 3 h 已增高, 6 h 和 9 h 显著增高, 与 CPR 即刻及假手术对照组相同时间点比较差异均有显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 CPR 早期大鼠脑组织 MMP-9/TIMP-1 比值变化(表 2): 假手术对照组各时间点脑组织 MMP-9/TIMP-1 差异无显著性 ($P > 0.05$)。复苏组 CPR 后 0.5 h 脑组织 MMP-9/TIMP-1 开始上升, 6 h 和 9 h 呈明显升高趋势, 与 CPR 即刻及假手术对照组同时点间比较, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。

3 讨论

MMPs 是降解细胞外基质的主要蛋白酶, 其中 IV 型胶原酶包括 MMP-2 和 MMP-9, 可降解血管基底膜的主要成分, 如 N 型胶原、黏蛋白及层黏素, 从而造成血管壁和组织的损伤。Gasche 和 Asachi 等^[2,5]分别在大鼠和小鼠的局部脑缺血-再灌注模型中发现, 缺血早期 MMP-9 在脑内转录与表达均明显增高, 并能促使脑组织进一步损伤。本研究发现, CPR 后 3 h MMP-9 mRNA 表达开始上升, 6 h 和 9 h 时显著升高, 与上述两实验结果相近, 并和李培杰等^[6]临床观察到血浆内 MMP-9 浓度变化规律

相符, 提示 CPR 后 MMP-9 mRNA 在脑组织中大量表达活化。本实验中还发现, MMP-2 mRNA 表达水平在 CPR 后 9 h 已有升高, 但差异无显著性, 推测可能和 MMP-2 mRNA 表达晚于 MMP-9 mRNA 增高有关^[7], 有待进一步观察。

TIMPs 是体内重要的抑制 MMPs 活性因子。TIMP-1 能抑制多数 MMPs 活性, 包括 MMP-9。动物实验表明, 永久性脑缺血 12 h TIMP-1 表达增加 3 倍, 2 d 增加 7 倍, 达到峰值^[8]。本研究结果显示, CPR 后 TIMP-1 mRNA 的表达时程变化与 MMP-9 基本一致, 这可能是机体的一种保护性反应, 起到了抑制或减弱 MMP-9 活性的作用。尽管如此, 但是 MMP-9/TIMP-1 仍然增大, 表明 MMP-9 净含量增加, MMPs 和 TIMPs 的动态平衡被破坏, 导致细胞外基质异常降解。

综上所述, CPR 后早期脑组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达增加, 并出现比例失衡, 在 CPR 6 h 后改变明显, 可能是造成脑损伤的环节和干预研究靶点之一, 但 MMP-2 mRNA 表达水平在早期无明显改变。

参考文献:

- 1 刘成军, 许峰, 匡凤娟, 等. 地塞米松对高氧肺损伤大鼠肺组织基质金属蛋白酶及其组织抑制剂表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 618-621.
- 2 Gasche Y, Fujimura M, Morita T, 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.

- tion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19: 1020 - 1028.
- 3 Hendrickx H H L, Rao G R, Safar P, et al. Asphyxia cardiac arrest and resuscitation in rats [J]. Resuscitation, 1984, 12: 97 - 116.
 - 4 Idris A H, Becker L B, Ornato J P, et al. Utstein - style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research [J]. Circulation, 1996, 94: 2324 - 2336.
 - 5 Asachi M, Wang X, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase - 9 gene knock - out on the proteolysis of blood - brain barrier and white matter components after cerebral ischemia [J]. J Neurosci, 2001, 21: 7724 - 7732.
 - 6 李培杰, 杨小华, 张立平, 等. 心肺复苏后血浆可溶性选择素及基质金属蛋白酶-9 测定的临床意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 137 - 141.
 - 7 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: 1020 - 1030.
 - 8 Wang X K, Barone F K, White R F, et al. Subtractive cloning identifies Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase - 1 (TIMP - 1) increased gene expression following focal stroke [J]. Stroke, 1998, 29: 516 - 520.
- (收稿日期: 2005 - 06 - 02 修回日期: 2005 - 07 - 23)
(本文编辑: 李银平)

• 研究报告 •

多层螺旋 CT 冠状动脉成像和超敏 C 反应蛋白与急性冠状动脉综合征的相关性研究

王瑛 付强 齐景伟 孙阳 李淑荣 侯凤霞 刘少岩

【关键词】 多层螺旋 CT 冠状动脉成像; 超敏 C 反应蛋白; 急性冠状动脉综合征; 冠状动脉病变

通过对急性冠状动脉综合征(ACS)患者进行多层螺旋 CT(MSCT)冠状动脉(冠脉)成像检查以及超敏 C 反应蛋白(sCRP)检测,进一步探讨 sCRP 与冠脉病变程度及稳定性的关系,以及二者联合应用对冠脉病变稳定程度的敏感性和准确度,以利于 ACS 的诊断、治疗及预后评价。

1 资料与方法

1.1 研究对象: 2004 年 1 月—2004 年 10 月期间收治 ACS 患者 40 例,均符合 WHO 缺血性心脏病的诊断标准。其中男 28 例,女 12 例;年龄 44~75 岁,平均为(61.3±12.5)岁。不稳定型心绞痛 22 例,急性 Q 波性心肌梗死(心梗) 8 例,急性非 Q 波性心梗 4 例,陈旧性心梗 6 例;合并糖尿病 18 例。除外感染、肿瘤、严重电解质紊乱、低血压休克及严重心脏瓣膜病。

1.2 方法: 采用免疫比浊法测定患者入院次日的空腹 sCRP,试剂由英国九强公司提供。按 sCRP 水平将患者分成两组:sCRP<1 mg/L 为正常组,>1 mg/L

基金项目:吉林省科委科研基金资助项目(20030419-02)

作者单位:130051 吉林省长春市中心医院

作者简介:王瑛(1958-),女(汉族),吉林省吉林市人,教授,硕士研究生导师,主任医师。

表 1 MSCT 冠脉成像与 sCRP 水平关系 例(%)

组别	例数(例)	轻度狭窄	中度狭窄	重度狭窄	单支病变	多支病变	软斑块
正常组	10	6(60)	3(30)	1(10)	9(90)	1(10)	2(20)
升高组	30	2(7)	21(70)*	7(23)	12(40)	18(60)**	22(73)**

注:与正常组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$ 为升高组。两组患者在 1 周内行 MSCT 冠脉成像检测。冠脉狭窄<50%为轻度,50%~90%为中度,>90%为重度。两组 sCRP 水平结合 MSCT 冠脉成像结果进行分析。

1.3 统计学方法:应用 SPSS11.5 软件包进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示:sCRP 升高组的 ACS 患者,MSCT 冠脉成像中软斑块的发生率均显著高于正常组。sCRP 的升高可以反映粥样斑块的不稳定性,并与冠脉成像的阳性率呈正相关。

3 讨论

目前众多研究表明,局部及全身的炎症反应在动脉硬化的发生、发展及并发症发生中起重要作用^(1,2)。CRP 作为机体非特异性反应指标在临床中已得到广泛应用。sCRP 与 CRP 相比,其灵敏度更高,能够更好地预测心血管事件的危险度⁽³⁾。

本研究从 MSCT 冠脉成像的角度,分析 ACS 患者中 sCRP 与斑块稳定性及冠脉病变程度的关系,结果显示,

sCRP 升高 ACS 患者的 MSCT 冠脉成像软斑块发生率(73%)显著高于 sCRP 正常组,sCRP 的升高可以反映粥样斑块的稳定性,并与冠脉成像的阳性率呈正相关。进一步验证了炎症是 ACS 和不稳定斑块的重要发病机制。

总之,在临床中对 ACS 患者联合检测 MSCT 冠脉成像与 sCRP,不但对冠脉不稳定病变的敏感性较高,而且可以有效提高对冠脉病变稳定性综合评价的准确度,并优于有创的导管法冠脉造影。

参考文献:

- 1 Maseri A. Inflammation, atherosclerosis and ischemic events exploring the hidden side of the moon [J]. N Engl J Med, 1997, 336: 1014.
- 2 Yamashita H, Shimada K, Seki E, et al. Concentrations of interleukins, interferon and C - reactive protein in stable and unstable angina pectoris [J]. Am J Cardiol, 2003, 91: 133 - 136.
- 3 沈彬, 吴宗贵. 不稳定型心绞痛患者超敏 C 反应蛋白的测定及临床意义 [J]. 上海医学, 2004, 27: 234 - 236.

(收稿日期: 2005 - 01 - 06)

(本文编辑: 李银平)