

病毒性心肌炎小鼠心肌基质金属蛋白酶-9的动态变化及意义

杨敏¹ 陈淳媛¹ 蔡姿丽¹ 陈柏林² 成亮¹ 李辉¹

(1. 中南大学湘雅三医院儿科, 湖南 长沙 410013;
2. 中南大学湘雅医院消化内科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在病毒性心肌炎(VMC)小鼠发病过程中的动态变化及意义。方法 以柯萨奇病毒 B3 感染 BALB/C 小鼠建立 VMC 模型,腹腔注射 0.1 mL 不含病毒的培养液的小鼠作为对照组。造模后 7 d、14 d、21 d、28 d 取心肌组织作石蜡切片,行苏木精-伊红和 Masson 染色观察病理改变,免疫组化(SABC 法)检测心肌 MMP-9 及 I、Ⅲ型胶原表达。结果 模型组 MMP-9 于 7 d 可见表达,14 d 达高峰($P<0.05$),各时间点 MMP-9 表达均高于对照组($P<0.05$);I 型胶原于 21 d 表达上调,28 d 表达最高($P<0.05$),21 d 和 28 d 表达高于对照组($P<0.05$);Ⅲ型胶原于 28 d 表达上调并高于对照组($P<0.05$);MMP-9 与心肌病理积分呈正相关($r=0.832, P<0.05$),与 I 型胶原呈负相关($r=-0.791, P<0.05$)。结论 VMC 小鼠心肌 MMP-9 在早期即表达增高;MMP-9 可能通过介导 I 型胶原的降解代谢而参与 VMC 的病理过程,是导致 VMC 胶原重构和心肌纤维化的重要因素之一。 [中国当代儿科杂志,2011,13(8):669-673]

[关键词] 病毒性心肌炎;基质金属蛋白酶-9;I 型胶原;Ⅲ型胶原;小鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)08-0669-05

Expression of matrix metalloproteinase-9 in myocardium of mice with viral myocarditis

YANG Min, CHEN Chun-Yuan, CAI Zi-Li, CHEN Bo-Lin, CHENG Liang, LI Hui. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China (Chen C-Y, Email: ccyzd@126.com)

Abstract: Objective To investigate the dynamic changes of expression of matrix metalloproteinases-9 in myocardium of mice with viral myocarditis (VMC) and its significance in the pathogenesis of viral myocarditis. **Methods** VMC model was prepared by an injection of CVB3 in BALB/C mice. The mice receiving an injection of culture solution without virus were used as the control group. Cardiac tissues were obtained 7, 14, 21 and 28 days after injection and made into paraffin sections. Myocardial histopathologic changes were observed by hematoxylin-eosin staining and Masson staining. The expression of MMP-9, type I collagen and type III collagen in cardiac tissues were quantified by SABC immunohistochemical method. **Results** The expression of MMP-9 in the VMC model group was observed on the 7th day, reached a peak on the 14th day, and was significantly higher than that in the control group at all time points ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression of type I collagen in the VMC model group was up-regulated on the 21st day and reached a peak on the 28th day ($P<0.05$). The expression of type III collagen in the VMC model group was significantly higher than that in the control group on the 28th day ($P<0.05$). The expression of MMP-9 was positively correlated with myocardial histopathologic scores ($r=0.832, P<0.05$) and negatively correlated with type I collagen expression ($r=-0.791, P<0.05$). **Conclusions** MMP-9 is over-expressed at the early stage in VMC mice, and participates in the pathological process of VMC through mediating the degradation metabolism of type I collagen. It may be an important factor that leads to myocardial collagen remodeling and myocardial fibrosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (8):669-673]

Key words: Viral myocarditis; Matrix metalloproteinases-9; Type I collagen; Type III collagen; Mice

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)由嗜心 急性期可导致心律失常、充血性心衰及心脏性猝死,肌性病毒感染引起,可造成心肌组织实质性损伤,在 且部分 VMC 有慢性化并向扩张型心肌病(dilated

[收稿日期]2010-09-21;[修回日期]2011-02-13
[基金项目]湖南省卫生厅科研基金(B2008-019);湖南省自然科学基金(09JJ5025)。
[作者简介]杨敏,女,硕士。
[通信作者]陈淳媛,主任医师。

cardiomyopathy, DCM) 转化的趋势^[1-3]。既往研究表明 VMC 患者及动物研究中均可见心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF) 发生, 认为心肌纤维化是 VMC 的重要病理改变^[4-5]。所谓心肌纤维化是指心肌间质中细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 尤其是 I、Ⅲ 型胶原(占心肌胶原总量 85% 以上) 的代谢紊乱及排列分布异常, 而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 作为降解基质的主要酶类参与了多种心脏病胶原间质的病理改变^[6]。MMP-9 属于 MMPs 中的明胶酶类, 能水解变性胶原及 I 型胶原等^[7], 其在心肌炎急性期即被炎症因子激活, 并伴随心肌坏死持续上调^[8], 是与心肌损害密切相关的一种酶类, 但在 VMC 的发病过程中 MMP-9 是否参与了心肌胶原重构以及其与 I、Ⅲ 型胶原的关系如何, 目前尚未见文献报道。本研究以 VMC 小鼠为模型, 通过免疫组化法检测 VMC 小鼠心肌中 MMP-9、I、Ⅲ 型胶原的表达情况, 以期进一步了解 VMC 心肌纤维化的发生机制, 并为早期阻断或逆转心肌纤维化寻找新的切入点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及病毒

4 周龄 BALB/C 健康纯种雄性小鼠 84 只, 体重 12 ~ 16 g, 由中南大学湘雅医学院动物学部提供, 饲养于 SPF 环境中。嗜心性柯萨奇病毒 B3 Nancy 株(myocarditic coxsackievirus B3, CVB3) 由上海第二医科大学微生物教研室惠赠, 储存于 -80℃。

1.2 主要试剂

兔抗小鼠 MMP-9、I 型胶原、Ⅲ 型胶原一抗均购自美国 Abcam 公司; 抗兔二抗、ABC 试剂盒、DAB 试剂盒均购自美国 Vector 公司。

1.3 动物分组

84 只 BALB/C 小鼠随机分为正常组(32 只) 和模型组(52 只)。模型组小鼠腹腔注射 0.1 mL 100 半数组织培养感染剂量(TCID₅₀) 的 CVB3 病毒悬液建立 VMC 模型, 正常组腹腔注射 0.1 mL 不含病毒的 Eagle's 培养液作对照。全部小鼠常规饲养, 全程观察记录各组小鼠一般情况。

1.4 标本采集

病毒接种日定义为 0 d, 正常组和模型组均于造模后 7 d、14 d、21 d、28 d 各随机挑选 8 只小鼠断颈处死, 开胸摘取心脏并沿左室长轴切开, 置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后再以 0.01 mol/L PBS 溶液清洗, 常规脱水、浸蜡、包埋、切片。

1.5 病理学检查及半定量分析

常规苏木精-伊红(HE) 染色, 光镜下观察心肌病理改变, 并参照 Rezkalla 等^[9] 方法半定量计算心肌病理组织学积分, 即每张切片随机取 5 个高倍视野, 计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野面积之比, 无病变计 0 分, 病变面积 <25% 计 1 分, 25% ~ 计 2 分, 50% ~ 75% 计 3 分, >75% 计 4 分。

1.6 Masson 三色染色

切片脱蜡至水, 双蒸水中 10 min, Bouin's fluid 56℃ 1 h, Weigert 苏木素工作液(A:B=1:1) 20 min, 流水冲洗 20 min, 加丽春红酸性品红液 5 min, 双蒸水洗 1 min, 加磷钼酸液 8 min 后倾去, 95% 酒精洗 1 ~ 2 s, 加苯胺蓝液 4 ~ 8 min, 加 1% 冰醋酸洗 1 min, DDW 中快速过 1 次后自然晾干, 无水酒精脱水 2 次, 每次 5 min, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光镜下观察心肌胶原纤维染成蓝色, 细胞质、心肌纤维染成红色, 细胞核染成蓝褐色。采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统计算胶原容积积分(collagen volume fraction, CVF), CVF= 胶原面积/全视野面积×100。

1.7 免疫组化(ABC 法) 检测 MMP-9、I、Ⅲ 型胶原表达

石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复液 80℃ 孵育 20 min, 3% H₂O₂ 静置 5 min, 羊血清封闭 1 h, 滴加相应一抗 4℃ 过夜, 滴加二抗室温孵育 2 h, 滴加 ABC 室温孵育 2 h, DAB 显色, 封片。每张切片随机选取 5 个高倍视野, 采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统分别检测每个视野内 MMP-9、I、Ⅲ 型胶原阳性面积表达率。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 相关分析采用直线相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

模型组小鼠于感染后第 3 天发病, 表现为毛色晦暗、皮温下降、耸毛、拱背、精神萎靡、活动减少, 对刺激反应淡漠或易激惹, 拒食, 全身痉挛; 第 5 天开始死亡, 第 7 天死亡数量达高峰(6 只); 之后症状逐渐减轻, 22 d 后无小鼠死亡; 模型组共死亡小鼠 20 只, 最后纳入实验研究的小鼠为 32 只。正常组(32 只)

无发病及死亡,全部纳入实验研究。

2.2 心肌组织病理学改变

HE 染色显示:模型组小鼠感染后 7 d 心肌细胞开始出现混浊肿胀和溶解坏死,炎性细胞呈灶状浸润;14 d 心肌组织坏死加重,炎性细胞广泛浸润,间质内胶原纤维排列紊乱;21 d 部分炎性细胞开始吸收,心肌纤维排列紊乱;28 d 炎性细胞将近消失,心肌间质及血管周围心肌纤维化明显;正常组心肌细

胞结构完整,未见炎性细胞浸润。见图 1A, B。Masson 染色显示:正常组和模型组 7 d、14 d 心肌组织及血管周围可见少量染成蓝色的纤维;模型组 21 d 纤维组织明显增多;模型组 28 d 可见大量排列紊乱的胶原纤维。见图 1C, D。模型组小鼠各时间点病理积分(正常组小鼠各时间点病理积分均为 0)及各组小鼠各时间点胶原容积积分(CVF)比较见图 2。

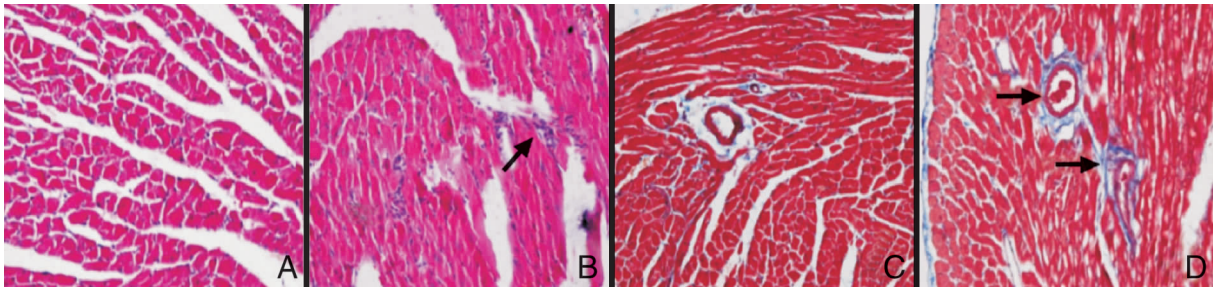


图1 两组小鼠心肌组织病理学检查 A(HE, ×20):正常组小鼠心肌组织,形态结构正常,未见炎性细胞;B(HE, ×20):模型组 14 d 小鼠心肌组织,广泛变性坏死、崩解,心肌纤维断裂,心肌层内炎性细胞(由单核细胞和淋巴细胞为主)广泛浸润,间质内胶原纤维排列紊乱,箭头所指为心肌间质浸润的炎症细胞;C(Masson, ×20):正常组小鼠心肌组织,心肌血管周围可见极少量染成蓝色的纤维,心肌间质无明显纤维组织;D(Masson, ×20):模型组 28 d 小鼠心肌病理改变,可见心肌组织内大量、成束被染成蓝色的纤维,排列紊乱,箭头所指为血管周围及心肌间质堆积的胶原纤维。

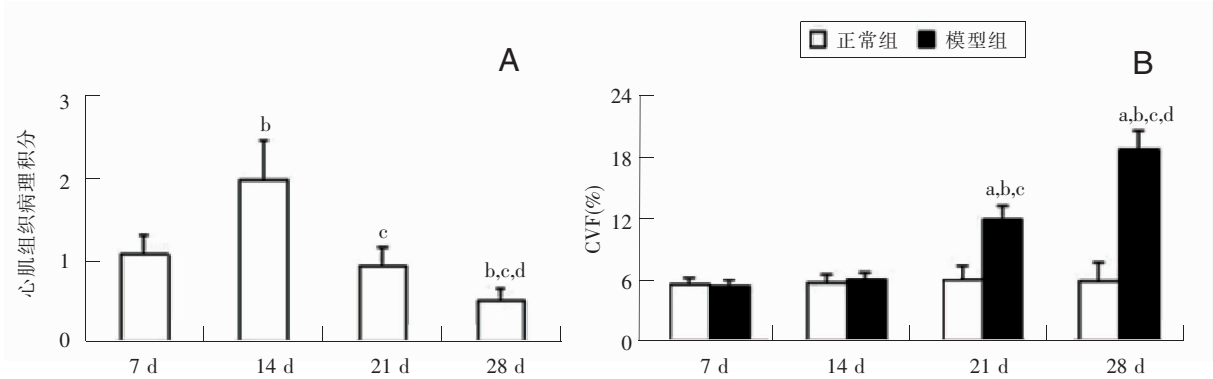


图2 小鼠各时间点心肌组织病理积分和 CVF A:模型组小鼠心肌不同时间点病理积分比较;B:两组小鼠心肌各时间点 CVF 比较。a: 与同时时间点正常组比较, $P<0.05$;b: 与同组 7 d 比较, $P<0.05$;c: 与同组 14 d 比较, $P<0.05$;d:与同组 21 d 比较, $P<0.05$ 。

2.3 心肌组织 MMP-9、I 型胶原和Ⅲ型胶原表达

显微镜下观察到 MMP-9 表达为棕黄色细颗粒,正常组小鼠心肌可见少量 MMP-9 表达,模型组小鼠心肌各时间点均可见 MMP-9 表达,以 14 d 最明显($F=16.359, P<0.01$);显微镜下观察到 I 型和Ⅲ型胶原为棕黄色细颗粒,正常组小鼠心肌间质内可见少量 I 型和Ⅲ型胶原表达,模型组小鼠心肌 I 型和Ⅲ型胶原主要定位在心肌间质,以 21 d、

28 d 表达明显,28 d 最高(I 型胶原: $F=101.165, P<0.01$;Ⅲ型胶原: $F=83.049, P<0.01$)。见图 3~4。

2.4 MMP-9 与心肌病理积分及 I、Ⅲ型胶原的相关性分析

直线相关分析显示 VMC 小鼠心肌 MMP-9 表达与心肌病理积分呈正相关($r=0.832, P<0.05$),与 I 型胶原表达呈负相关($r=-0.791, P<0.05$),与Ⅲ型胶原表达无相关性($r=-0.062, P>0.05$)。

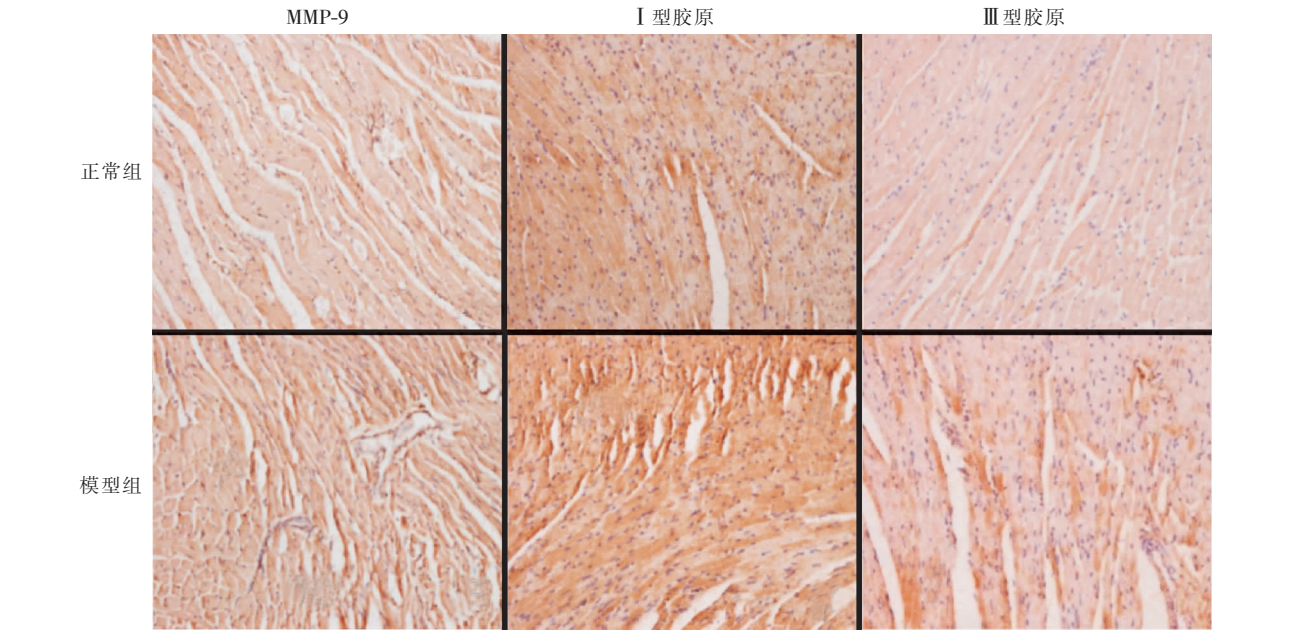


图3 两组小鼠心肌28 d MMP-9、I 型胶原和 III 型胶原表达(免疫组化, ×20) 正常组小鼠心肌细胞和血管内皮细胞内可见少量 MMP-9 表达;模型组小鼠心肌炎性细胞、心肌细胞及血管内皮细胞胞质内可见大量 MMP-9 表达;正常组小鼠心肌间质内可见少量 I 型胶原;模型组小鼠心肌间质内可见大量、成束的 I 型胶原,排列紊乱;正常组小鼠心肌间质内可见极少量 III 型胶原;模型组小鼠心肌间质内可见大量 III 型胶原,排列紊乱。棕黄色颗粒为阳性表达。

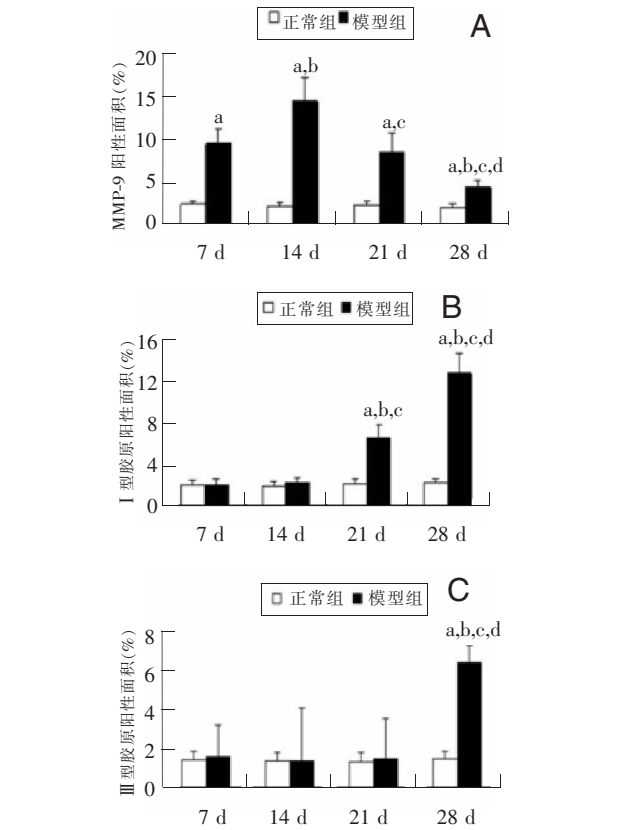


图4 两组小鼠各时间点心肌 MMP-9(图 A)、I 型胶原(图 B)和 III 型胶原(图 C)阳性面积表达率(%)比较
a:与同时时间点正常组比较, $P < 0.05$;b:与同组7 d比较, $P < 0.05$;
c:与同组14 d比较, $P < 0.05$;d:与同组21 d比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

MMPs 是一组能特异性降解 ECM 成分的锌钙依赖性蛋白水解酶家族,其正常表达对于维持心肌间质胶原合成与降解代谢的动态平衡具有重要的作用^[10]。MMP-9 属于其中的明胶酶类,主要作用底物为明胶和蛋白聚糖,以及 I、IV、V、VII 型胶原和纤维连接蛋白、弹性蛋白。Meng 等^[11]的研究显示 VMC 小鼠早期心肌 MMP-9 活性较正常组明显升高,认为其参与了心肌炎的病理过程,可能是导致心功能异常和心肌胶原重构的因素之一。心肌间质胶原主要是 I 型和 III 型胶原,其中 I 型胶原约占 75%,III 型胶原约占 11%,因此心肌纤维化主要是 I、III 型胶原代谢紊乱、堆积异常和比例失衡的过程。

本研究显示,在 VMC 小鼠造模后 7 d 即可见 MMP-9 表达,14 d 达高峰,且与心脏病理积分成正相关,随着炎症加剧而增高,这与有关文献报道的炎症因子是 MMPs 的激活剂相符^[12]。I、III 型胶原同样在 VMC 小鼠感染早期即可见表达,但两者的表达高峰均出现在感染后 28 d,较 MMP-9 有一定的滞后,其原因可能是过度激活的 MMP-9 使得胶原的降解代谢增强,从而推迟了其表达高峰。

VMC 急性期,病毒直接溶解、损伤心肌细胞,并刺激心肌成纤维细胞增殖,导致大量 I 型胶原合成

并填补心肌细胞缺失所留下的空隙,以维持心肌壁的完整性,这即是修复性纤维化过程;但是另一方面,炎症坏死刺激大量细胞因子如 IL-1 β 、IL-4、TNF- α 、TGF- β 1 等的产生^[13-15],同时由于 VMC 小鼠肾素-血管紧张素系统处于高浓度水平,心肌血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 的产生显著增加^[16],炎症因子及 Ang II 均可在转录水平上调 MMP-9 使其表达量增加,胶原降解增强,两方面作用的最终结果就是胶原的合成和降解均处于高水平的动态变化之中。MMP-9 的表达在早期的过度活跃也可导致未发生病变的正常心肌胶原过度降解并被缺乏连接结构的纤维取代,造成胶原网络破坏和间质成分改变,而随后的 I 型胶原表达增强则更有可能是对早期过度降解的一种代偿性反应,随着 MMP-9 表达和活性下降,抑制 I 型胶原合成的作用减弱而刺激其增生的因素却仍然存在,心肌重构开始朝着胶原堆积的方向发展,使得整个 VMC 病理进程都处于胶原代谢紊乱之中。同时本研究也观察到 MMP-9 的表达与 I 型胶原的表达呈显著负相关,而与 III 型胶原的表达无相关性,说明 MMP-9 在心肌胶原重构的作用主要是通过介导 I 型胶原降解代谢来实现的,III 型胶原的代谢则可能受其他因素影响。

[参 考 文 献]

[1] Maisch B, Alter P, Karatolius K, Ruppert V, Pankuweit S. The heart in cases of viral, bacterial and parasitic infections[J]. Internist (Berl), 2007, 48(3): 255-267.

[2] Jeserich M, Konstantinides S, Pavlik G, Bode C, Geibel A. Non-invasive imaging in the diagnosis of acute viral myocarditis[J]. Clin Res Cardiol, 2009, 98(12): 753-763.

[3] 蔡小芳,麦根荣,徐之良. 小儿扩张型心肌病与病毒性心肌炎的临床研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(4): 325-327.

[4] Szalay G, Sauter M, Haberland M, Zuegel U, Steinmeyer A, Kandolf R, et al. Osteopontin: a fibrosis-related marker molecule in cardiac remodeling of enterovirus myocarditis in the susceptible host[J]. Circ Res, 2009, 104(7): 851-859.

[5] Leipner C, Grün K, Müller A, Buchdunger E, Borsi L, Kosmehl H, et al. Imatinib mesylate attenuates fibrosis in coxsackievirus b3-induced chronic myocarditis[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(1): 118-126.

[6] Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, et al. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis[J]. Circulation, 2006, 114(6): 565-573.

[7] Nelissen I, Martens E, Van den Steen PE, Proost P, Ronsse I, Opdenakker G. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon-beta and is a target for immunotherapy[J]. Brain, 2003, 126(Pt 6): 1371-1381.

[8] Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, et al. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction[J]. Cardiovas Res, 2002, 56(2): 235-247.

[9] Rezkalla S, Kloner RA, Khatib G, Smith FE, Khatib R. Effect of metoprolol on the acute phase of coxsackievirus B3 murine myocarditis[J]. J Am Coll Cardiol, 1988, 12(2): 412-414.

[10] 孟晓慧,汪翼. 基质金属蛋白酶与小儿心血管疾病的关 系[J]. 国外医学儿科学分册, 2003, 30(3): 144-146.

[11] Meng XH, Wang Y, Zhuang JX, Han XZ, Chen Y, Jin YP, et al. Dynamic changes in myocardial matrix metalloproteinase activity in mice with viral myocarditis[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(8): 1195-1199.

[12] Schönbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing[J]. J Immunol, 1998, 161(7): 3340-3346.

[13] Higuchi H, Hara M, Yamamoto K, Miyamoto T, Kinoshita M, Yamada T, et al. Mast cells play a critical role in the pathogenesis of viral myocarditis[J]. Circulation, 2008, 118(4): 363-372.

[14] Kim JY, Kim WJ, Kim H, Suk K, Lee WH. The stimulation of CD147 induces MMP-9 expression through ERK and NF-kappaB in macrophages: implication for atherosclerosis[J]. Immune Netw, 2009, 9(3): 90-97.

[15] 张小佛,于小华,郭富强,李双杰. 病毒性心肌炎患儿血清巨噬细胞移动抑制因子、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 表达及其意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(1): 35-36.

[16] 孟晓慧,汪翼,于永慧,陈瑶,马沛然. 病毒性心肌炎小鼠血管紧张素的改变与心肌胶原的关系[J]. 医学临床研究, 2004, 21(4): 340-344.

(本文编辑:王 霞)