

· 临床研究 ·

冠心病患者临床类型与细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达水平的关系

杨丽霞*, 田祥全, 郭瑞威, 叶金善, 齐 峰

(成都军区昆明总医院心血管内科, 昆明 650032)

【摘要】目的 研究冠心病临床类型与细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)的关系。**方法** 根据临床表现和冠状动脉造影结果, 179例患者分成稳定型心绞痛(SAP)35例, 不稳定型心绞痛(UAP)76例, 急性心肌梗死(AMI)68例, 健康对照组30例。流式细胞仪检测患者外周血单个核细胞(PBMCs)表面EMMPRIN的平均荧光强度(MFI); 免疫速率法检测血清高敏C反应蛋白(hs-CRP)浓度, 分析冠心病组患者EMMPRIN水平与冠状动脉造影Gensini评分的相关性。**结果** PBMCs表面EMMPRIN表达在冠心病临床分型中AMI组、UAP组、SAP组明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。病变血管累及支数越多, 其表达增加越明显, 三支病变 > 双支病变 > 单支病变 > 对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。相关性分析显示, PBMCs表面EMMPRIN(MFI)与血清hs-CRP浓度及冠状动脉病变Gensini评分呈正相关。**结论** EMMPRIN水平与冠心病临床分型相关。

【关键词】 冠心病; 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; C反应蛋白

【中图分类号】 R541.4

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2014.00058

Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart diseases and its clinical significance

YANG Li-Xia*, TIAN Xiang-Quan, GUO Rui-Wei, YE Jin-Shan, QI Feng

(Department of Cardiology, Kunming General Hospital, Chengdu Military Command, Kunming 650032, China)

【Abstract】Objective To investigate the relationship of clinical classification of coronary heart diseases (CHD) with the expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) in peripheral blood mononuclear cells of CHD patients. **Methods** A total of 179 CHD cases diagnosed by coronary angiography in our department from September 2012 to May 2013 were recruited in this study. They were divided into 3 groups according to the clinical types: stable angina pectoris group (SAP, $n = 35$), unstable angina pectoris group (UAP, $n = 76$), and acute myocardial infarction group (AMI, $n = 68$). Another 30 healthy individuals at the same period served as normal controls. Mean fluorescence intensity (MFI) of EMMPRIN in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were examined by flow cytometry. Serum level of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was measured with immune velocity assay. The correlation of the expression of EMMPRIN was analyzed with the Gensini scores by coronary angiography. **Results** The expression of EMMPRIN in PBMCs was significantly higher in AMI, UAP and SAP groups than in the controls ($P < 0.05$). The expression was also positively correlated with the number of involved vessels, which was increased gradually in normal controls, single-vessel, double-vessel, and triple-vessel disease groups sequentially ($P < 0.05$). The EMMPRIN MFI of the PBMCs had positive correlation with the serum level of hs-CRP and Gensini scores in coronary arterial lesion. **Conclusion** The expression of EMMPRIN is correlated with the clinical classification of CHD.

【Key words】 coronary disease; extracellular matrix metalloproteinase inducer; C-reactive protein

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81170250).

Corresponding author: YANG Li-Xia, E-mail: doctorylixia@Aliyun.com

冠心病是由多种危险因素共同作用所引起的疾病,其危险分层需要结合多种因素进行全面评估。细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix

metalloproteinase inducer, EMMPRIN)又名CD147,早期是从肺癌细胞系LX-1中被分离出来的一个免疫球蛋白超家族成员。近年来发现,EMMPRIN可通过

收稿日期: 2013-12-06; 修回日期: 2014-01-26

基金项目: 国家自然科学基金(81170250)

通信作者: 杨丽霞, E-mail: doctorylixia@Aliyun.com

刺激冠状动脉斑块中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的表达, 增强其降解动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 斑块纤维帽的能力, 使纤维帽变薄破裂, 从而降低 AS 斑块的稳定性, 是导致急性冠脉事件发生的重要因素^[1], 我们前期研究发现在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块中 EMMPRIN 呈高表达^[2]。因此, EMMPRIN 与冠心病的关系日益引起人们的重视。我们通过检测不同类型冠心病患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 表面 EMMPRIN 的表达, 探讨冠心病临床类型与 EMMPRIN 的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2012 年 9 月至 2013 年 5 月成都军区昆明总医院心内科住院 179 例冠心病患者。根据美国心脏病学会 (American College of Cardiology, ACC) / 美国心脏联合会 (American Heart Association, AHA) 诊断标准诊断为稳定型心绞痛 (stable angina pectoris, SAP) 组 35 例, 男 26 例, 女 9 例; 不稳定型心绞痛 (unstable angina pectoris, UAP) 组 76 例, 男 48 例, 女 28 例; 急性心肌梗死组 (acute myocardial infarction, AMI) 68 例, 男 42 例, 女 26 例。另选取同期健康对照组 30 例, 男 20 例, 女 10 例。根据造影结果单支病变 58 例, 双支病变 75 例, 三支病变 46 例。排除标准: 原有心力衰竭、扩张性心肌病、病毒性心肌炎、风湿性心肌炎以及外周血管疾病; 合并肝肾功能不全、肿瘤、弥漫性血管内凝血、血液系统疾病和免疫疾病; 合并脑血管意外以及其他神经系统疾病。

1.2 冠状动脉造影

所有患者行冠状动脉造影检查, 采用 Judkin 技术, 根据造影结果, 由两位经验丰富的医师, 以目测法评估病变部位性质及狭窄程度。

1.2.1 冠心病诊断标准 主要冠状动脉 (左主干、左前降支、回旋支、右冠状动脉及主要分支如对角支、钝缘支) 直径有 $\geq 50\%$ 的狭窄即可诊断为冠心病。

1.2.2 冠状动脉病变支数 冠状动脉狭窄直径 $\geq 50\%$ 病变累及主要冠状动脉支数, 分为无病变、单支病变、双支病变和三支血管病变, 累及左主干时以同时累及左前降支和左回旋支计算。

1.2.3 Gensini 评分 依据以下方法对冠状动脉病变进行评分。狭窄程度用定量冠状动脉造影分析方法 (QCA 法分析)。狭窄计分 25%, 50%, 75%, 90%, 99%, 100% 分别计为 1, 2, 4, 8, 16, 32 分。冠状

动脉各段所占系数: 左主干 5 分, 左前降支近、中、远段分别记 2.5, 1.5, 1.0 分; 第一、二对角支分别记 1.0, 0.5 分; 回旋支近、远段分别记 2.5, 1.0 分, 钝缘支记 1.0 分; 右冠近、中、远段, 后降支、左室后支各记 1.0 分。将各段系数与之对应的狭窄程度的计分相乘, 然后将各狭窄段总积分相加即为该患者的冠状动脉狭窄程度的 Gensini 评分^[3]。

1.3 标本采集、制备及 EMMPRIN、hs-CRP 检测

所有患者于手术时抽取桡动脉血液 3ml, 其中 1ml 全血置于 1:9 枸橼酸钠抗凝管中立即行流式细胞术检测; 剩余 2ml 全血置于 1:9 枸橼酸钠抗凝管中在 30min 内 2000r/min 离心 20min, 分离血浆于 -80°C 冰箱保存待检。以 PE-CD14 (BD PharmingenTM), FITC-EMMPRIN、FITC-Ms IgG2ak (eBioscience) 阴性对照抗体孵育细胞沉渣, CD14 设门标记 PBMCs, 采用流式细胞仪 (Coulter Epics XL, Beckman) 测 PBMCs 表面 EMMPRIN 的表达。经检测, PBMCs 表面的 EMMPRIN 表达率为 96.6%~100.0%, 故以平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 反映其表达强弱。免疫速率法 (BD PharmingenTM) 测血清高敏 C 反应蛋白 (high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 质量浓度。

1.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件包进行统计学分析。计数资料比较采用 χ^2 检验。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用方差分析检验。相关性研究采用直线相关分析, 危险因素采用 logistic 回归方法分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床分型各组间 EMMPRIN 和 hs-CRP 水平比较

AMI 组、UAP 组、SAP 组、对照组 EMMPRIN 水平差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 组间两两比较, AMI 组、UAP 组、SAP 组较对照组 EMMPRIN 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AMI 组、UAP 组较 SAP 组 EMMPRIN 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AMI 组与 UAP 组间 EMMPRIN 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。AMI 组、UAP 组、SAP 组、对照组 hs-CRP 水平差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 组间两两比较, AMI 组、UAP 组、SAP 组较对照组 hs-CRP 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AMI 组、UAP 组较 SAP 组 hs-CRP 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AMI 组较 UAP 组 hs-CRP 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 1)。

表1 各组EMMPRIN和hs-CRP水平比较
Table 1 Comparison of EMMPRIN and hs-CRP levels between different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	EMMPRIN(MFI)	hs-CRP($\mu\text{g/L}$)
Control	30	5.36 $\pm$ 1.17	55.48 $\pm$ 27.54
SAP	35	9.47 $\pm$ 1.21*	105.63 $\pm$ 79.47*
UAP	76	11.32 $\pm$ 1.45*#	184.78 $\pm$ 82.32*#
AMI	68	11.89 $\pm$ 0.68*#	227.84 $\pm$ 83.68*# Δ

EMMPRIN: extracellular matrix metalloproteinase inducer; hs-CRP: high sensitivity C-reactive protein; MFI: mean fluorescence intensity; SAP: stable angina pectoris; UAP: unstable angina pectoris; AMI: acute myocardial infarction. Compared with control group, * $P < 0.05$; compared with SAP group, # $P < 0.05$; compared with UAP group, $\Delta P < 0.05$

2.2 不同冠状动脉病变血管支数各组EMMPRIN和hs-CRP水平比较

各组EMMPRIN水平差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)；组间两两比较，三支病变组 $>$ 双支病变组 $>$ 单支病变组 $>$ 对照组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组hs-CRP水平差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)；组间两两比较，三支病变组 $>$ 双支病变组 $>$ 单支病变组 $>$ 对照组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ ；表2)。

表2 各组EMMPRIN和hs-CRP水平比较
Table 2 Comparison of EMMPRIN and hs-CRP levels between patients with different types of coronary lesion ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	EMMPRIN(MFI)	hs-CRP($\mu\text{g/L}$)
Control	30	5.36 $\pm$ 1.17	55.48 $\pm$ 27.54
Single-vessel lesion	58	8.62 $\pm$ 0.81*	89.62 $\pm$ 46.69*
Double-vessel lesion	75	9.45 $\pm$ 1.24*#	115.49 $\pm$ 67.48*#
Triple-vessel lesion	46	10.59 $\pm$ 0.93*# Δ	124.54 $\pm$ 71.36*# Δ

EMMPRIN: extracellular matrix metalloproteinase inducer; hs-CRP: high sensitivity C-reactive protein; MFI: mean fluorescence intensity; Compared with control group, * $P < 0.05$; compared with single-vessel lesion group, # $P < 0.05$; compared with double-vessel lesion group, $\Delta P < 0.05$

2.3 冠心病患者各组EMMPRIN和hs-CRP水平相关性分析

冠心病患者EMMPRIN与hs-CRP呈正相关 (AMI组, $r = 0.314$, $P < 0.01$; UAP组, $r = 0.447$, $P < 0.01$; SAP组, $r = 0.195$, $P < 0.05$)。

2.4 EMMPRIN水平与冠状动脉病变的相关性

以Gensini总积分评价冠状动脉病变，发现冠心病组患者随着单核细胞EMMPRIN水平的升高，患者病情逐渐加重，冠状动脉Gensini总积分增加，呈正相关 ($r = 0.716$, $P < 0.01$)；剔除其他因素后进行logistic回归分析显示：EMMPRIN与冠状动脉Gensini总积分仍呈正向相关 ($r = 0.753$, $P < 0.01$)。

3 讨论

EMMPRIN又名CD147，早期从肺癌细胞系LX-1中被分离出来，属于一个免疫球蛋白超家族成员，生理状态下EMMPRIN能够维持正常的神经功能、生殖系统的发育、造血细胞的迁移等，在病理条件下其可与多种蛋白如亲环素A (cyclophilin A, CypA) 相结合^[4]，发挥各种促AS的作用，并且EMMPRIN的表达率与CypA浓度有明显的依赖关系^[5]。已有研究表明，MMP在急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 发生、发展过程中起着重要作用^[6]，而EMMPRIN作为基质金属蛋白酶的上游调控因子，首次在肿瘤细胞表面发现，并在其表面呈高表达，可以促进成纤维细胞分泌MMP，降解基底部的胶原成分，参与肿瘤的侵袭和转移过程^[7]。

近年来发现EMMPRIN与不稳定斑块的形成及ACS的发生有着密切联系^[8]。Schmidt等^[9]对冠心病患者颈动脉粥样硬化斑块做病理切片发现，EMMPRIN与MMP-9在AS斑块纤维帽MMP的活性区域等均高表达，且两者集中分布区域和巨噬细胞一致，并且在巨噬细胞中EMMPRIN以不同的糖基化形式调节了不同MMP的表达。在体外实验发现，当巨噬细胞EMMPRIN被过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) α 和 γ 抑制后，MMP-9的表达水平明显降低^[10]。后期在感染肺炎衣原体的动脉粥样斑块中发现，EMMPRIN及其诱导的MMP-2含量显著增高^[11]，用基因沉默方法抑制EMMPRIN表达几乎可以完全阻断肺炎衣原体诱导的MT1-MMP和MMP-2表达。除上述机制外，EMMPRIN通过参与巨噬细胞分化^[12]，同时在炎症反应过程中，EMMPRIN可以激发核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)，调节炎症反应因子，比如白细胞介素-6等，通过介导细胞增殖反应过程，参与AS的形成^[13]。最新国外研究也发现，EMMPRIN的配体CypA能够加剧AS进展但机制未明^[14]。上述研究结果说明，在AS斑块中由于EMMPRIN的上调，促进了MMP表达，并通过参与动脉壁的炎症反应，降解纤维帽的细胞外基质，使其变薄，强度变小，从而使斑块纤维帽易破裂。虽然EMMPRIN可在多种细胞中通过诱导MMP的表达并对其活性进行调节，但其具体机制仍未明确。脂质核心的大小与ACS发生的关系同样非常密切，当脂质核心扩大时，斑块的稳定性下降。EMMPRIN通过对膜型MMP-1进行调节，使单核细胞迁移入内皮下，并分化成巨噬细胞，而巨噬细胞是泡沫细胞的主要来源。通过临床检测发现，在急性心肌梗死后巨噬细胞上EMMPRIN的表达与膜型MMP-1的表达趋势一致^[9]，

因此EMMPRIN可能通过调节泡沫细胞的迁移影响着脂质核心的大小,从而影响着ACS的发生。最近的研究发现,EMMPRIN在血小板上同样有表达,并参与血小板的活化过程,当血小板和单核细胞共孵育可诱导单核细胞EMMPRIN介导的NF- κ B途径激活,导致MMP-9及其他炎症因子的分泌增加,从而影响AS斑块的稳定性^[1,15],因此设想如果抑制单核/巨噬细胞中EMMPRIN表达的同时能够抑制血小板的活化,则有可能更好地防止AS。

我们的研究发现,冠心病患者AMI组、UAP组、SAP组EMMPRIN水平平均高于对照组,而AMI组、UAP组又明显高于SAP组,且差异有统计学意义。结果说明,随着冠心病患者病情的加重,EMMPRIN水平有同向增高趋势;在多支病变中,3支病变组高于双支病变及单支病变组,说明随着冠心病患者病变范围的增加,EMMPRIN表达明显增加。冠状动脉病变越严重,Gensini评分越高,EMMPRIN与其保持线性关系。由此我们认为EMMPRIN为冠心病的危险因子,其水平可以作为冠心病患者病情严重的预测因子。同时冠心病患者hs-CRP的表达水平和EMMPRIN的表达特点有着一致趋势,相关性分析发现,冠心病患者EMMPRIN的表达强弱与hs-CRP质量浓度呈正相关,提示EMMPRIN对hs-CRP有调节作用,EMMPRIN可能通过对hs-CRP的调节在冠心病发病过程中起作用,上述结果说明EMMPRIN/hs-CRP调节系统参与了冠状动脉粥样硬化性心脏病形成以及发展过程。因此联合EMMPRIN和hs-CRP水平检测,能够提高对冠心病患者病情判断的准确率。本研究由于时间限制,入选的样本例数较少,在后续研究中可以进一步扩大样本量,以量化EMMPRIN与冠状动脉病变的关系,更好地指导临床。

【参考文献】

- [1] Schmidt R, Bultmann A, Fischel S, *et al.* Extracellular matrix metalloproteinase inducer(CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes[J]. *Circ Res*, 2008, 102(3): 302-309.
- [2] Liang X, Yang LX, Guo RW, *et al.* Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and urokinase-type plasminogen activator in aortic atherosclerotic plaques of ApoE knockout mice[J]. *Chin J Arterioscler*, 2012, 20(8): 673-677. [梁 星, 杨丽霞, 郭瑞威, 等. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子和尿激酶型纤溶酶原激活物在载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(8): 673-677.]
- [3] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. *Am J Cardiol*, 1983, 51(3): 606.
- [4] Yuan W, Ge H, He B. Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(2): 415-421.
- [5] Zhang TT, Wei D, Wang HW, *et al.* Matrix metalloproteinase inducer expressed by Jurkat T cells promotes the chemotaxis of monocytes[J]. *Chin J Arterioscler*, 2013, 21(2): 673-677. [张田田, 魏 冬, 王汉伟, 等. Jurkat T细胞基质金属蛋白酶诱导因子的表达促进单核细胞趋化性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(2): 120-124.]
- [6] Perez-Hernandez N, Ibanes-Gutierrez C, Vargas-Alarcon G, *et al.* Involvement of matrix metalloproteinases in acute coronary syndrome(ACS)[J]. *Gac Med Mex*, 2013, 149(6): 655-667.
- [7] Feng LL, Zhu SJ, Zhang Y, *et al.* Expression and clinical significance of HAB18G/CD147 in malignant tumors[J]. *J Cell Mol Immunol*, 2013, 29(9): 958-961. [封兰兰, 朱少君, 张 阳, 等. HAB18G/CD147在多种恶性肿瘤中的表达及其临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(9): 958-961.]
- [8] Yang LX, Yang ZH, Guo RW, *et al.* Angiotensin II induces extracellular matrix metalloproteinase inducer expression via an AT1R dependent pathway in aortic atherosclerotic plaque in apolipoprotein E knockout mice[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2012, 13(1): 67-75.
- [9] Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, *et al.* Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 834-841.
- [10] Zhang J, Ge H, Wang C, *et al.* Inhibitory effect of PPAR on the expression of EMMPRIN in macrophages and foam cells[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 117(3): 373-380.
- [11] Xie S, Nie R, Wang J. Inhibiting extracellular matrix metalloproteinase inducer may be beneficial for diminishing the atherosclerotic plaque instability[J]. *J Postgrad Med*, 2009, 55(4): 284-286.
- [12] Yang Y, Lu N, Zhou J, *et al.* Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(9): 1299-1310.
- [13] Yang LX, Liu H, Guo RW, *et al.* Angiotensin II induces EMMPRIN expression in THP-1 macrophages via the NF-kappa B pathway[J]. *Regul Pept*, 2010, 163(1-3): 88-95.
- [14] Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, *et al.* Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(1): 53-66.
- [15] Pennings GJ, Yong AS, Kritharides L. Expression of EMMPRIN (CD147) on circulating platelets *in vivo*[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(3): 472-481.

(编辑:周宇红)