

# 基质金属蛋白酶在心肌缺血再灌注损伤中的作用

黄健男 张瑞岩<sup>△</sup>

(上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海 200025)

摘要 心肌缺血再灌注损伤是指缺血心肌组织在恢复血流供给后,其细胞代谢功能障碍及结构破坏反而加重的现象,主要表现在心肌收缩与舒张功能障碍、血管内皮功能障碍、微循环血流紊乱、细胞代谢失调、电解质平衡紊乱、细胞凋亡与坏死等,并伴随着氧自由基的大量产生和毒性损伤以及炎症反应的激活,是一个极其复杂的病理过程。基质金属蛋白酶(MMPs)及其组织抑制物(TIMPs)是心肌组织中多种细胞分泌的内源性细胞因子,其作用涵盖了细胞外基质降解、炎症反应激活、调节血管功能、影响细胞凋亡与存活等众多病理生理过程,而这些过程均在心肌缺血再灌注损伤中发挥着重要的作用。

关键词 基质金属蛋白酶 缺血再灌注 心肌损伤

中图分类号 R543.5 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)13-2584-03

## Role of Matrix Metalloproteinases in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

HUANG Jian-nan, ZHANG Rui-yan<sup>△</sup>

(Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

ABSTRACT: Myocardial ischemia-reperfusion injury is syndrome that after blood supply restored in ischemic myocardium, cell dysfunction and structural damage actually get worsen. It is very complicated and registers as myocardial systolic and diastolic dysfunction, vascular endothelial dysfunction, microcirculation disorder, electrolyte balance disorder, cellular apoptosis and necrosis, followed with generation of oxygen radicals and activation of inflammation. Matrix metalloproteinases and its tissue inhibitors are a group of endogenous mediators expressed in heart tissues. They play an important role in many physiological processes, such as extracellular matrix degradation, activation of inflammation, regulation of vascular function, cellular apoptosis and necrosis. All these processes have a great relationship with myocardial ischemia-reperfusion injury.

Key words: Matrix metalloproteinases; Ischemia-reperfusion; Myocardial injury

Chinese Library Classification(CLC): R543.5 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)13-2584-03

### 1 前言

心肌梗死是指冠状动脉血栓形成后冠脉血流量下降,心肌组织缺血缺氧,引起心肌损伤,持续的营养缺乏最终导致心肌组织坏死。目前临床治疗心肌梗死的最根本原则是力求尽快恢复阻塞区域的血流供应从而拯救尽可能多的缺血心肌组织,也就是所谓的血运重建或称再灌注治疗。由于不可逆的心肌损伤发生于冠脉堵塞后约20分钟,并在6小时左右完成,因此再灌注治疗必须尽早进行<sup>[1]</sup>。然而再灌注治疗,不论是通过溶栓的方法还是介入的手段,并不能保证缺血心肌的存活,近几十年的大量研究已经明确表明,尽管血运重建是避免缺血心肌最终不可逆死亡的唯一有效途径,但是再灌注本身也会加重心肌损伤<sup>[2]</sup>。缺血心肌组织经过再灌注治疗后可能会表现为:①心肌收缩与舒张功能障碍,②血管内皮细胞功能障碍,③微循环血流紊乱,④细胞代谢失调,⑤电解质平衡紊乱,⑥细胞坏死与凋亡等<sup>[3]</sup>,以上统称为“再灌注损伤”。可以说在再灌注治疗的同时,能否寻找到一种方法来减轻甚至避免再灌注损伤,将直接影响到心

肌梗死治疗的预后,具有重要的科研价值和临床价值。本文旨在对心肌缺血再灌注损伤的机制以及MMPs和TIMPs在这一过程中的作用进行综述。

### 2 心肌缺血再灌注损伤的机制

#### 2.1 氧自由基与心肌缺血再灌注损伤

氧自由基是指一类氧原子的外层电子轨道含有不配对电子的化合物,是机体需氧代谢的正常中间产物,主要是氧气生成水的过程中所产生的超氧阴离子( $\cdot O_2^-$ ),大约5%的需氧代谢中包含此反应。相应的机体有一套清除氧自由基的机制,包括抗氧化酶类如过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧化蛋白还原酶和超氧化物歧化酶,以及非酶类抗氧化剂如辅酶Q、硫氧化蛋白、一些维生素、矿物质和 $\Omega 3$ 脂肪酸<sup>[4,5]</sup>。氧自由基产生与清除的动态平衡保证了正常机体免受氧自由基的毒性损伤。在心肌缺血与再灌注的过程中,氧自由基的过量产生和氧自由基清除剂含量的下降均可导致氧自由基的蓄积,从而产生毒性作用。氧自由基的过量产生可能有多种机制。例如黄嘌呤氧化酶催化次黄嘌呤生成尿酸的过程中会产生大量的超氧阴离子,在正常心肌中这一反应主要由黄嘌呤脱氢酶催化不产生氧自由基,而在缺血心肌中,细胞内高浓度的钙离子促使黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶<sup>[6]</sup>,从而导致氧自由基的过量产生。另外在缺血再灌注过程中,微循环内中性粒细胞的浸润可能是氧

作者简介 黄健男,男,硕士,电话:13472470323, E-mail:picapiggy@hotmail.com

<sup>△</sup>通讯作者 张瑞岩 E-mail:zhangruiyan@263.net

(收稿日期:2011-02-10 接受日期:2011-03-02)

自由基的另一重要来源。中性粒细胞能够产生多种氧自由基并储藏于胞质中,心肌缺血导致的炎症级联反应会诱导其释放出来。还有一些其他的病理过程,如 NADPH 氧化酶、NO 合成酶、线粒体细胞色素等<sup>[7]</sup>,通过作用于细胞外基质、血管内皮细胞或心肌细胞,导致氧自由基产生增加。氧自由基的生物活性主要体现在氧原子外层的不配对电子上,由于不配对电子的高度不稳定性及反应活性,使其很容易与细胞脂质及蛋白质反应,导致过氧化,从而产生细胞毒性作用。

## 2.2 电解质平衡紊乱与心肌缺血再灌注损伤

心肌缺血再灌注过程中,钙离子内流增加、肌质网重摄取钙离子减少,最终引起细胞内钙离子浓度的升高。钙离子内流增加的原因是多方面的。心肌缺血时,细胞能量代谢由有氧代谢向无氧代谢转换,导致胞内氢离子的累积和 ATP 的快速减少。氢离子累积激活钠氢交换体 1 的活性,后者将一个氢离子运出胞外的同时运入一个钠离子,继而导致胞内钠离子的净累积(即钠超载),与此同时 ATP 缺乏导致细胞膜  $Na^+-K^+-ATP$  酶活性抑制,从而加重了胞内钠超载。钠超载继而通过肌膜钠钙交换体的作用,以细胞钙内流交换钠外流,最终引起胞内钙离子的累积(即钙超载)。钙超载可以诱导线粒体通透性转换孔(Mitochondrial Permeability Transition Pore, mPTP)的开放。mPTP 是位于线粒体内、外膜上的由多种蛋白组成的非选择性、高导电性复合孔道,主要由外膜的电压依赖性阴离子通道、内膜的腺苷酸转移酶以及基质的亲环蛋白 D 等组成,对于维持线粒体正常的通透性至关重要<sup>[8]</sup>。心肌缺血再灌注过程中, mPTP 的开放改变了线粒体膜的通透特性,导致水和正常情况下不通透的肽类物质内流,引起线粒体水肿、质子梯度破坏和氧化磷酸化解偶联,继而抑制线粒体的能量代谢,加剧 ATP 的缺乏,ATP 缺乏反过来进一步加剧了胞内钙超载,形成恶性循环,最终导致细胞损伤甚至坏死。

## 2.3 炎症反应与心肌缺血再灌注损伤

中性粒细胞在再灌注开始时便被心肌细胞释放的炎症因子,如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、血小板激活因子、补体、LTB4 等募集到再灌注的心肌<sup>[9]</sup>。中性粒细胞的募集反应首先表现为中性粒细胞沿血管内皮表面滚动,这一过程是由内皮细胞表面的 P-选择素与中性粒细胞表面的粘附分子相互作用介导的<sup>[10]</sup>。紧接着中性粒细胞表面的 CD11/CD18 复合物与内皮细胞表面的 ICAM-1 相互作用介导两者间紧密粘附的形成。在再灌注开始 2-4h 后,微循环内的小血小板激活因子和 LTB4 上调中性粒细胞表面 CD11/CD18 的表达,IL-1 和 TNF- $\alpha$  上调内皮细胞表面 ICAM-1 的表达,继而促进两者的稳定黏附,这在心肌细胞坏死和凋亡以及微血管损伤过程中起着重要作用。中性粒细胞的募集和缺血再灌注损伤的进程有重要的联系。中性粒细胞是氧自由基的重要来源,在再灌注最初的几分钟内便被细胞因子、血小板激活因子和补体等激活,通过呼吸爆发产生大量氧自由基。另外中性粒细胞黏附于血管内皮表面,会导致内皮细胞水肿和功能障碍、中性粒细胞栓子的形成继而导致血管腔堵塞,引起再灌注区域的“无复流”现象,从而影响再灌注心肌功能的恢复。

## 2.4 细胞凋亡坏死与心肌缺血再灌注损伤

再灌注最初被认为可以有效的挽救缺血心肌细胞,避免其进一步损伤甚至坏死,但进一步的研究却发现再灌注时随着氧气与血流的重新供给,部分缺血心肌损伤反而加重,甚至最终

导致细胞死亡。细胞死亡伴随着细胞膜的破裂和细胞内容物的释放,主要是细胞内酶的释放,表现为特征性的收缩带坏死,镜下显示个别心肌的显著缩短以及肌节结构完全分裂,超微结构改变表现为肌浆破裂、线粒体水肿、大量钙离子沉积在线粒体基质以及肌纤维的缩短和分裂<sup>[11]</sup>。细胞内容物的释放会诱发炎症级联反应,募集并激活中性粒细胞,释放组织蛋白酶 G 和弹性蛋白酶等水解酶类,继而破坏心肌细胞膜的完整性,导致更严重的心肌损伤。中性粒细胞在心肌细胞凋亡坏死的过程中起着重要作用<sup>[12]</sup>。另外再灌注初期氧自由基的大量产生和细胞内钙超载会引起线粒体 mPTP 的开放,继而改变了线粒体膜的通透特性,线粒体内的凋亡前物质如细胞色素 C 释放入胞质内,继而激活胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,最终诱导细胞凋亡。可以说线粒体 mPTP 的开放是细胞损伤由可逆向不可逆转的关键因子<sup>[13]</sup>。

## 2.5 血管内皮功能障碍与心肌缺血再灌注损伤

在正常生理条件下,血管内皮细胞可以通过释放血管收缩和舒张物质保证血管正常的收缩与舒张功能,并通过产生 NO 抑制血小板聚集和白细胞粘附而对血小板和白细胞功能起到重要的调控作用。但是在缺血再灌注过程中,微循环内的氧自由基、中性粒细胞以及众多炎症因子和补体等,会损伤血管内皮细胞,导致内皮细胞功能障碍,表现为:①内皮细胞生成 NO 减少;②氧自由基产生增加。大量实验证实氧自由基清除剂和 NO 生成剂能明显改善缺血再灌注损伤后血管内皮细胞功能障碍<sup>[14]</sup>。NO 是一种强烈的血管舒张剂,并能够抑制血小板聚集和白细胞粘附,NO 产生减少会增加冠状动脉血管痉挛的风险,并加剧炎症级联反应,还会增加微循环内白细胞栓子和血小板栓子形成的危险。总之,再灌注时大量产生的氧自由基会损伤血管内皮细胞膜,引起内皮细胞水肿、损伤及功能障碍,继而导致 NO 生成减少,内皮缩血管肽产生增加,细胞表面粘附分子表达上调,从而失去了对中性粒细胞募集的抑制作用;中性粒细胞的大量募集会反过来增加氧自由基的产生,并释放蛋白水解酶类及趋化因子等物质,最终加重微循环损伤;另外内皮细胞水肿、血管痉挛以及微循环血栓的形成,均可阻塞微循环,继而影响再灌注区域的血流供给,影响受损心肌功能的恢复。

## 3 MMPs 和 TIMPs 与心肌缺血再灌注损伤

### 3.1 MMPs 和 TIMPs 的生物学特性

MMPs 是一组依赖锌离子的内切蛋白水解酶家族,结构具有同源性<sup>[15]</sup>,包含 3 个主要的结构域:氨基端为前导序列,主要起信号肽的作用;中间是起催化作用的结构域,含有结合  $Zn^{2+}$  的位点;羧基端是血红素结合蛋白结构域,此结构域可能与 MMPs 的底物特异性有关<sup>[16]</sup>。心肌组织中的多种细胞,包括成纤维细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和心肌细胞等,均可表达一种或多种类型的 MMP<sup>[17,18]</sup>。MMPs 以酶原形式分泌,只有氨基端前导序列被水解酶降解后,使其催化结构域中  $Zn^{2+}$  结合位点暴露出来,才能成为有活性的酶,这一反应称为“半胱氨酸转换”<sup>[19]</sup>。TIMPs 是内源性的拮抗 MMPs 活性的生物分子,现发现 4 种,即 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4。TIMPs 通过与 MMPs 活性位点 1:1 结合,继而阻止 MMPs 与胞外底物结合发挥生物学作用<sup>[20]</sup>。

### 3.2 MMPs 和 TIMPs 在心肌缺血再灌注损伤中的作用

MMPs 是心肌细胞外基质降解的关键酶,催化胶原降解过程中的多步反应,除此之外,MMPs 还参与到细胞外基质生长因子的释放,细胞表面生长因子受体的清除,细胞粘附分子的脱落等众多病理生理过程。Matsumura 等<sup>[21]</sup> 在研究中报道,MMP-2 基因敲除能减弱小鼠心肌梗死后的炎症反应、心室扩张并降低心脏破裂的发生率,而 Lindsey 等<sup>[22]</sup>和 Heymans 等<sup>[23]</sup>也证实,MMP-9 基因敲除能减弱小鼠心肌缺血后的炎症反应和胶原沉积,增强血管再生,对抗心室扩张,改善心肌肥厚并保护心脏功能,Lindsey 等<sup>[24]</sup>研究证实,MMP-7 基因敲除能降低小鼠心肌梗死后 connexin-43 的表达,并降低心率失常的发生率,提高存活率。MMPs 表达增多会增加纤维胶原的降解,加剧炎症反应并加重细胞外基质的重构,继而导致进行性的心室扩张和心脏功能障碍。总之,MMPs/TIMPs 系统平衡的破坏参与到多种心血管疾病的病理过程,包括心肌梗死<sup>[25]</sup>、扩张型心肌病<sup>[26]</sup>和压力负荷过重导致的心衰<sup>[27]</sup>。另外 TIMPs 除了已知的通过单纯拮抗 MMPs 活性发挥生物学作用外,越来越多的研究发现其本身也可能具有类似细胞因子的活性,参与到一些重要的生理过程,如调节细胞凋亡,影响细胞存活、生长、迁移、分化,血管发生,炎症反应,细胞外基质重塑等,这些作用才刚刚开始被全面认识。

#### 4 展望

综上所述,心肌缺血再灌注损伤机制十分复杂,包含氧自由基的毒性作用,电解质平衡的紊乱,炎症级联反应的激活,血管内皮功能障碍以及众多炎症因子、细胞酶类的释放,并最终导致心肌收缩与舒张功能障碍,微循环血流紊乱以及细胞凋亡坏死。MMPs 和 TIMPs 作为心肌组织中内源性的细胞因子,参与到细胞外基质降解、介导炎症反应、调节血管功能、影响细胞凋亡与存活等众多病理生理过程,这些过程均在心肌缺血再灌注损伤中发挥着重要作用。尽管 MMPs 和 TIMPs 在心肌缺血再灌注损伤监测和治疗中的研究还仅仅停留在动物实验阶段,但相信随着缺血再灌注损伤机制的进一步明确,以及 MMPs 和 TIMPs 作用机理的更深入研究,MMPs 和 TIMPs 很可能会成为治疗心肌缺血再灌注损伤的重要靶点,为心肌梗死治疗策略的制定提供新的途径。

#### 参考文献(References)

[1] James M, Downey, Amanda M, et al. Signaling pathways in ischemic preconditioning [J]. Heart Fail Rev, 2007, 12:181-188

[2] Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61:365-371

[3] Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury, a clinical view on a complex pathophysiological process [J]. Int J Cardiol, 2005, 100:179-190

[4] Donzelli S, Switzer CH, Thomas DD, et al. The activation of metabolites of nitric oxide synthase by metals is both redox and oxygen dependent: a new feature of nitrogen oxide signaling [J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8:1363-1371

[5] Ago T, Sadoshima J. Thioredoxin1 as a negative regulator of cardiac hypertrophy [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9:679-687

[6] Goldhaber JJ, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities [J]. Hypertension, 1992, 20:118-127

[7] Claudia P, Daniele M, Raffaella R, et al. Cardioprotection: A radical

view Free radicals in pre and postconditioning [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1787:781-793

[8] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion: a target for cardioprotection [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61:372-385

[9] Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993, 33:71-90

[10] Mcever RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment [J]. J Clin Invest, 1997, 100:485-492

[11] Marisol RM, David GD. Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury: New Therapeutic Options for Acute Myocardial Infarction [J]. Rev Esp Cardiol, 2009, 62:199-209

[12] Jakob VJ, Rong J, James G, et al. Inflammation, Proinflammatory Mediators and Myocardial Ischemia reperfusion Injury [J]. Hematol Oncol Clin N Am, 2007, 21:123-145

[13] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death [J]. Biochem J, 1999, 341:233-249

[14] Laude K, Thuillez C, Richard V. Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion: a new therapeutic target? [J]. Braz J Med Biol Res, 2001, 34:1-7

[15] Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function [J]. Physiol Rev, 2007, 87:1285-1342

[16] Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, et al. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69:604-613

[17] Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69:614-624

[18] Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling [J]. Pharmacol Ther, 2009, 123:255-278

[19] Davy V, Stephane H. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family' [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010, 48:445-453

[20] Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1477:267-283

[21] Matsumura S, Iwanaga S, Mochizuki S, et al. Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice [J]. J Clin Invest, 2005, 115:599-609

[22] Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction [J]. Am J Physiol, 2006, 290:H232-239

[23] Heymans S, Lupu F, Terclavers S, et al. Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice [J]. Am J Pathol, 2005, 166:15-25

[24] Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, et al. Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction [J]. Circulation, 2006, 113:2919-2928

[25] Tian H, Cimini M, Fedak PW, et al. TIMP-3 deficiency accelerates cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43:733-743

[26] Fedak PW, Smookler DS, Kassiri Z, et al. TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy [J]. Circulation, 2004, 110:2401-2409

[27] Kassiri Z, Oudit GY, Sanchez O, et al. Combination of tumor necrosis factor-alpha ablation and matrix metalloproteinase inhibition prevents heart failure after pressure overload in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knock-out mice [J]. Circ Res, 2005, 97:380-390