

血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA 检测 与颅内动脉瘤破裂相关的临床应用研究*

巨涛, 宋波, 刘文刚, 岳新鹏, 李鲁, 刘增强
(延安大学咸阳医院神经外科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 探讨血清过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)mRNA、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)mRNA 检测在诊断颅内动脉瘤破裂中的临床应用价值。方法 通过 RT-PCR 技术检测 87 例颅内动脉瘤患者血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA 的表达, 其中破裂组 57 例, 未破裂组 30 例, 并设立对照组, 比较以上指标的变化。结果 破裂组、未破裂组和对照组血清 PPAR- γ mRNA 的表达量分别为 0.23 ± 0.03 , 0.59 ± 0.11 和 0.87 ± 0.15 ; 血清 MMP-9 mRNA 在三组中的表达量分别为 0.93 ± 0.17 , 0.63 ± 0.13 和 0.25 ± 0.05 。破裂组血清 PPAR- γ mRNA 表达量与对照组比较明显下调($t=23.79$, $P<0.01$), 而血清 MMP-9 mRNA 表达量则明显上调, 差异有统计学意义($t=25.63$, $P<0.01$); 血清 PPAR- γ mRNA 的表达在破裂组的表达量低于未破裂组, 而 MMP-9 mRNA 表达量高于未破裂组, 差异有统计学意义($t=15.32, 16.27$, $P<0.01$)。建立受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评价两标志物的临床意义, 以破裂组和未破裂组为因变量, 血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA 表达量的 AUC 分别为 $0.858(95\%CI: 0.775 \sim 0.940, P=0.000)$; $0.842(95\%CI: 0.756 \sim 0.929, P=0.000)$ 。以对照组和未破裂组为因变量, 血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA 表达量的 AUC 分别为 $0.827(95\%CI: 0.734 \sim 0.920, P=0.000)$; $0.818(95\%CI: 0.722 \sim 0.914, P=0.000)$ 。结论 血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA 的检测可应用于颅内动脉瘤发生及病程进展的评价, 并为颅内动脉瘤破裂的预测提供依据。

关键词: 颅内动脉瘤; 颅内动脉瘤破裂; 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ mRNA; 基质金属蛋白酶-9 mRNA

中图分类号: R743.9; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)05-083-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.022

Clinical Application of Detecting Serum PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA in the Diagnosis of Ruptured Intracranial Aneurysm

JU Tao, SONG Bo, LIU Wen-gang, YUE Xin-peng, LI Lu, LIU Zeng-qiang (Department of Neurosurgery, the Xianyang Hospital of Yan'an University, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical application of detecting serum PPAR- γ mRNA, MMP-9mRNA in the diagnosis of ruptured intracranial aneurysm. **Methods** The expression of serum PPAR- γ mRNA, MMP-9mRNA were detected for 87 cases of patients with intracranial aneurysm, including ruptured group and non-ruptured group, respectively, with 57 cases and 30 cases of patients. The control group should be established to compare the changes of the above indicators. **Results** The expression of serum PPAR- γ mRNA in the ruptured group, the non-ruptured and the controls group were 0.23 ± 0.03 , 0.59 ± 0.11 and 0.87 ± 0.15 , which of MMP-9mRNA were 0.93 ± 0.17 , 0.63 ± 0.13 and 0.25 ± 0.05 . Compared with those in the controls group, the expression of serum PPAR- γ mRNA in the ruptured group significantly lowered ($t=23.79$, $P<0.01$), which of MMP-9mRNA raised ($t=25.63$, $P<0.01$). There were statistically significant differences. The expression of PPAR- γ mRNA in the ruptured group were lower than those in the unruptured group, which of MMP-9 mRNA were higher ($t=15.32, 16.27$, $P<0.01$). To establishing the receiver-operating characteristic curve (ROC curve) in evaluating the clinical significances of the two markers to use the rupture group and non-ruptured group as the dependent variable, the AUC of the expression of serum PPAR- γ mRNA, MMP-9mRNA were $0.858(95\%CI: 0.775 \sim 0.940, P=0.000)$, $0.842(95\%CI: 0.756 \sim 0.929, P=0.000)$. As the dependent variable in the control group and unruptured group, the AUC of the expression of serum PPAR- γ mRNA, MMP-9mRNA were $0.827(95\%CI: 0.734 \sim 0.920, P=0.000)$; $0.818(95\%CI: 0.722 \sim 0.914, P=0.000)$. **Conclusion** Detection of serum PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA can be applied in assessment of occurrence and progression for the intracranial aneurysm, and to provide evidences for the early detection of ruptured intracranial aneurysm.

Keywords: intracranial aneurysm; ruptured intracranial aneurysm; PPAR- γ mRNA; MMP-9mRNA

* 作者简介: 巨涛(1981—), 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 脑出血的诊断与治疗, E-mail: 3248089878@qq.com。
通讯作者: 刘增强(1976—), 男, 本科学历, 副主任医师, 研究方向: 脑出血的诊断与治疗, E-mail: 3395807407@qq.com。

颅内动脉瘤是一种危害严重的脑血管疾病,其主要临床表现为破裂出血,是蛛网膜下腔出血的主要发病原因。并在发生破裂前预兆不明显,且发病急、症状重,具有较高的致残率和死亡率。既往研究表明,炎性反应介导的血管重构是血管狭窄和动脉瘤形成的重要机制,炎性细胞介导的动脉壁破坏和重构过程可能参与动脉瘤的进展和破裂^[1]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 通过炎性反应参与多种病理生理学过程^[1,2]。本研究通过检测血清 PPAR- γ mRNA 和 MMP-9 mRNA 表达旨在探讨颅内动脉瘤患者血液是否存在显著性差异的基因,并通过其表达差异来发现颅内动脉瘤发生、发展以及破裂的机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2014 年 3 月~2016 年 3 月在本院神经外科住院治疗的颅内动脉瘤患者 87 例和非脑血管病患者 52 例(对照组)。根据是否发生颅内动脉瘤破裂,将动脉瘤患者进一步分为破裂组(57 例)和未破裂组(30 例),颅内动脉瘤患者中,男性 38 例,女性 49 例;年龄 30~73 岁,平均年龄 51.2 ± 9.7 岁。多发动脉瘤 8 例,其中 6 例患者为 2 个瘤,2 例为 3 个瘤;后循环动脉瘤中,基底动脉瘤 3 例(2 例破裂),大脑后动脉瘤 2 例(1 例破裂),椎动脉瘤 1 例(未破裂)。颅内动脉瘤患者均通过全脑血管造影(双侧椎动脉、双侧颈内动脉、双侧颈外动脉)确诊为颅内囊性动脉瘤;破裂引起的蛛网膜下腔出血经颅脑 CT 或腰椎穿刺证实,破裂组患者均为初发蛛网膜下腔出血。破裂组患者动脉瘤位置分布与未破裂组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);破裂组患者动脉瘤瘤径 ≥ 7 mm,所占比例显著高于未破裂组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。排除既往有严重头部外伤、脑梗死、自身免疫性脑髓炎或神经胶质瘤病史的患者。另选取同期体检健康者 52 例作为对照组,其中男性 24 例,女性 28 例,年龄 29~70 岁,平均年龄 49.7 ± 10.3 岁,均经磁共振血管造影、螺旋 CT 血管成像或 DSA 检查排除颅内动脉瘤;无脑卒中病史;无动脉瘤及蛛网膜下腔出血家族史;彼此无亲缘关系。本研究经本院伦理委员会批准,所有研究对象已签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 RNA 提取采用美国 Invitrogen 公司产品。PCR 采用上海起福生物科技有限公司提供的试剂盒。lightCycler 荧光 PCR 仪采用德国 Roche 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 标本采集:所有受试对象采集静脉血,采集的血液在 2 h 内作如下处理:4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,4℃ 3 000 r/min 进一步离心 10 min,将所得的血清标本分装于无 RNA 酶的冻存管中,-80℃ 保存。

1.3.2 采用 Trizol 法提取血清中的总 RNA,采用 RT-PCR 技术研究患者血清 PPAR- γ mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表达。

1.3.3 逆转录过程:①在冰上融化血清后,吸取 100 μ l,加入等体积的变性液,再涡旋混匀,在冰上孵育 5 min;②再加入等体积的氯仿,涡旋混匀 1 min,冷冻离心 5 min,重复以上步骤三次,再加入 1.25 倍体积的无水乙醇,充分混合,过柱,洗柱 2 次,并将所得的 RNA 用缓冲液稀释;③在 4℃ 沉淀过夜,弃去上清,将沉淀置于空气中干燥 2~3 min,用无 RNA 酶水 1 μ l 溶解,相当于 100 μ l 的血清。根据上海起福生物科技有限公司提供的试剂盒操作说明书进行 RT-PCR。每个样品取 3 μ l 逆转录,PCR 反应体系如下:10 μ l 2 \times Taqman 通用的 PCR 预混物,1 μ l 20 \times mRNA 特异性引物,1.33 μ l cDNA,7.67 μ l 水;95℃ 变性 10 min,60℃ 1 min,50 个循环(每个样品重复 3 次)。

1.3.4 mRNA 表达量测定:将扩增的目的片段进行凝胶电泳,通过紫外凝胶成像系统进行扫描并记录,mRNA 表达量用 C_t 变化值(ΔC_t)表示。 $\Delta C_t = C_t(R) - C_t(X_n)$, $C_t(R)$ 是内参照的 C_t 值, $C_t(X_n)$ 表示每个受试对象的 C_t 值。由 $2^{-\Delta C_t}$ 得出相应 mRNA 的相对表达量。

1.4 统计学分析 应用 SPSS21 统计软件进行数据分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料比较采用 t 检验,血清 PPAR- γ mRNA 和 MMP-9 mRNA 相对表达量以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评价血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA 的临床意义,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心血管危险因素结果比较 见表 1。颅内动脉瘤破裂组高血压、糖尿病、高血脂和有吸烟史病例数分别与未破裂组和对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),而大量饮酒组之间比较差异则有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。

2.2 各组血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9 mRNA 表达比较 见表 2。破裂组血清 PPAR- γ mRNA 表达与未破裂组和对照组比较明显下调,而 MMP-9 mRNA 表达则明显上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 各组心血管危险因素结果比较[n(%)]

项 目	对照组(n=52)	未破裂组(n=57)	破裂组(n=30)	χ^2		P值	
				a vs c	b vs c	a vs c	b vs c
高血压	6(11.5)	8(14.0)	5(16.7)	0.431	0.107	0.420	0.749
高血脂	4(7.7)	5(8.8)	3(10.0)	0.130	0.036	0.703	1.000
糖尿病	5(9.6)	6(10.5)	4(13.3)	0.269	0.152	0.718	0.732
吸烟	12(23.1)	14(24.6)	8(26.7)	0.133	0.046	0.792	1.000
大量饮酒	3(5.8)	12(21.1)	13(43.3)	17.09	4.765	0.000	0.045

注:对照组(a),未破裂组(b),破裂组(c)。

表2 各组血清PPAR- γ mRNA,MMP-9mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组(a)	未破裂组(b)	破裂组(c)	χ^2		P值	
				a vs c	b vs c	a vs c	b vs c
PPAR- γ mRNA	0.87 \pm 0.15	0.59 \pm 0.11	0.23 \pm 0.03	23.79	15.32	0.000	0.000
MMP-9 mRNA	0.25 \pm 0.05	0.63 \pm 0.13	0.93 \pm 0.17	25.63	16.27	0.000	0.000

2.3 ROC曲线分析 以破裂组和未破裂组为因变量,血清PPAR- γ mRNA,MMP-9mRNA表达量的AUC分别为0.858(95%CI:0.775~0.940, $P=0.000$);0.842(95%CI:0.756~0.929, $P=0.000$)。以对照组和未破裂组为因变量,血清PPAR- γ mRNA,MMP-9mRNA表达量的AUC分别为0.827(95%CI:0.734~0.920, $P=0.000$);0.818(95%CI:0.722~0.914, $P=0.000$)。根据

SPSS统计结果计算出PPAR- γ mRNA,MMP-9mRNA在最佳临界值处诊断颅内动脉瘤发生及破裂的敏感度和特异度分别为96.9%和95.3%,90.6%和95.3%。以上提示血清PPAR- γ mRNA,MMP-9mRNA对鉴别颅内动脉瘤的发生及破裂有诊断意义。血清PPAR- γ mRNA和MMP-9mRNA的ROC曲线见图1~2。

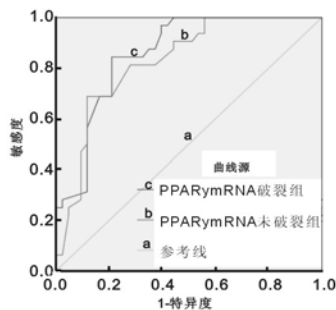


图1 检测PPAR- γ mRNA在诊断颅内动脉瘤中的ROC曲线

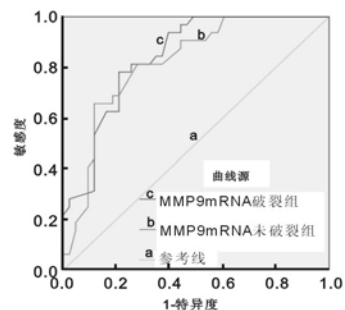


图2 检测MMP-9mRNA在诊断颅内动脉瘤中的ROC曲线

3 讨论 颅内动脉瘤破裂是引起蛛网膜下腔出血最主要的原因,目前对颅内动脉瘤的发生和破裂机制尚无一种学说能解释。Diehl等^[3]对腹主动脉瘤患者的研究发现,炎性细胞浸润导致了血管弹性纤维的损伤。Marbacher等^[4]对动脉瘤患者的研究认为炎症反应的发生,引起动脉瘤壁细胞的损伤,使瘤壁细胞发生严重的变性,最终导致动脉瘤破裂。以上提示动脉瘤的病理过程可能伴随炎症反应的发生。PPAR- γ 是类固醇家族的一个核受体和转录因子,其具有调节血压、血脂稳态,调节免疫,抗炎抗凋亡的潜力,目前的研究证实PPAR- γ 与细胞的迁移、转化和促进血管生成等有关。在内皮细胞和血管平滑肌细胞中均可发现PPAR- γ 的表达^[5]。Shimada等^[2]的报道认为PPAR- γ 被吡

格列酮激活后抑制炎症反应的发生,参与颅内动脉瘤的病理生理过程。他们建立小鼠颅内动脉瘤模型,研究PPAR- γ 的表达与动脉瘤破裂的关系,结果发现给予吡格列酮治疗的小鼠发生动脉瘤破裂的比率显著降低。他们采用RT-PCR技术的研究显示动脉瘤外膜组织存在较高表达的PPAR- γ 水平,并且在动脉瘤外膜层又发现丰富的巨噬细胞。David等^[6]的研究也证实了PPAR- γ 通过调节炎症反应影响动脉瘤的破裂。

他们采用相似的实验发现给予吡格列酮治疗的小鼠动脉瘤破裂的发生率显著降低。本研究采用RT-PCR技术研究显示破裂组血清PPAR- γ mRNA表达显著低于对照组($P<0.01$)。推测该基因可能参与了颅内动脉瘤的发生和发展,而破裂

组的表达低于未破裂组($P<0.01$),显示破裂组动脉瘤患者存在强烈的炎症反应。因此通过检测血清 PPAR- γ mRNA 的表达水平可评价颅内动脉瘤破裂的发生。

基质金属蛋白酶(MMP)依赖锌和钙发挥生物学作用,其在体内主要作用为降解胶原纤维,参与结缔组织的降解、炎症反应和缺血缺氧损伤等病理过程。目前已发现 20 多种 MMP,包括明胶酶 A(MMP-2)和明胶酶 B(MMP-9),是迄今为止认为与颅内动脉瘤发生发展最为密切的 MMPs^[7,8]。刘小飞等^[1]的研究也认为 MMP-9 能降解胶原蛋白等血管壁结构,破坏血管壁完整性。他们进一步的研究认为 MMP-9 在颅内破裂囊状动脉瘤壁组织中的表达显著上调,其主要存在于瘤壁组织的内膜层和中膜层的巨噬细胞和淋巴细胞的细胞质内,提示存在炎症反应,推测 MMP-9 降解瘤壁细胞基质可能是导致动脉瘤破裂的关键因素。Peng 等^[9]的研究认为颅内动脉瘤破裂与未破裂组患者组织 MMP-9 表达高于对照组,其中破裂组显著增高。本研究采用 RT-PCR 技术研究血清 MMP-9mRNA 的表达显示,破裂组 MMP-9mRNA 表达显著高于未破裂组和对照组($P<0.01$)。提示该基因参与颅内动脉瘤的病理过程,推测动脉瘤的破裂可能与 MMP-9 相关。

利用 ROC 曲线评价 PPAR- γ mRNA, MMP-9mRNA 的结果显示,两标志物表达在诊断颅内动脉瘤的发生及破裂中有临床意义($P<0.01$)。提示两标志物可能参与颅内动脉瘤破裂的病理过程,并与其发病机制密切相关。

以上结果提示炎症反应的损伤可能最终导致颅内动脉瘤的发生及破裂。目前尚不能确定动脉粥样硬化在颅内动脉瘤的发生、发展过程中的作用,PPAR- γ mRNA, MMP-9mRNA 与动脉粥样硬化的关系,需要进一步研究。本研究显示高血压、糖尿病、高血脂及吸烟与颅内动脉瘤的病理过程没有统计学意义,而大量酗酒则为颅内动脉瘤的发生及破裂的危险因素。酗酒可能通过引起患者血压变化而引起颅内动脉瘤的破裂,而酒精本身则与颅内动脉瘤的形成及发展无明显关系^[10]。希望本研究为颅内动脉瘤的发生、发展以及破裂机制的研究提供一定的信息,同时也为确定易感基因,筛选易感人群提供一定的帮助。综上所述,血清 PPAR- γ mRNA, MMP-9mRNA 的检测可应用于颅内动脉瘤发生及病程进展的评价,并为颅内动脉瘤破裂的早期诊断提供依据。

参考文献:

[1] 刘小飞,段永红,廖勇仕,等.破裂颅内动脉瘤患者动

脉瘤壁 AIF-1, MMP-9 和 COX-2 表达上调[J]. 国际脑血管病杂志,2016,24(9):833-838.

- Liu XF, Duan YH, Liao YS, et al. Upregulation of anemysm wall AIF-1 and COX-2 expression in patients with ruptured intracranial aneurysm[J]. International Journal of Cerebrovascular Diseases, 2016, 24(9):833-838.
- [2] Shimada K, Furukawa H, Wada K, et al. Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in the development of intracranial aneurysm rupture[J]. Stroke, 2015, 46(6):1664-1672.
- [3] Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(4):633-644. 10.1093/cvr/cvs007. Pub Med Central Cross Ref Pub Med.
- [4] Marbacher S, Marjamaa J, Bradacova K, et al. Loss of mural cells leads to wall degeneration, aneurysm growth, and eventual rupture in a rat aneurysm model[J]. Stroke, 2014, 45(1):248-254.
- [5] 晏平,侯婧瑛,郑韶欣,等.过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 促进外源性骨髓间充质干细胞表达 Cx43 的作用及机制[J].中国组织工程研究,2016,20(23):3357-3365.
- Yan P, Hou JY, Zheng SX, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes exogenous mesenchymal stem cells to express connexin 43: its role and mechanism[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2016, 20(23):3357-3365.
- [6] Hasan DM, Starke RM, Gu H, et al. Smooth muscle PPAR γ plays a critical role in formation and rupture of cerebral aneurysms in mice in vivo[J]. Hypertension, 2015, 66(1):211-220.
- [7] 党宝齐,陈罡,王中.基质金属蛋白酶-9 与颅内动脉瘤[J].临床神经外科杂志,2012,9(5):318-319.
- Dang BQ, Chen G, Wang Z. Matrix metalloproteinases 9 with intracranial aneurysms[J]. Journal of Clinical Neurosurgery, 2012, 9(5):318-319.
- [8] 欧水连,潘志锋,徐灼均,等.基质金属蛋白酶-9 在类风湿性关节炎中的诊断价值研究[J].现代检验医学杂志,2016,31(3):81-83.
- Ou SL, Pan ZF, Xu ZJ, et al. Assessing the role of matrix metalloproteinase-9 in rheumatoid arthritis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(3):81-83.
- [9] Peng YT, Shi XE, Li ZQ, et al. Particularly interesting Cys-His-rich protein is highly expressed in human intracranial aneurysms and resists aneurysmal rupture[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6):3905-3912.
- [10] 唐海涛,赵江,付振宇,等.老年颅内动脉瘤破裂致蛛网膜下腔出血患者死亡的危险因素[J].中国老年学杂志,2014,34(4):912-913.
- Tang HT, Zhao J, Fu ZY, et al. Exploring the risk factors of death on subarachnoid hemorrhage caused by ruptured intracranial aneurysm in elderly patients[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2014, 34(4):912-913.

收稿日期:2017-06-17

修回日期:2017-07-22