

MMP-9、VEGFR2因子在内痔患者组织中的表达及意义

秦蕾¹ 秦鑫^{2*}

(¹北京老年医院肛肠科, 北京 100095; ²山西医科大学第二医院内科, 太原 030001)

摘要 该文研究了基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)因子在内痔患者组织中的表达及意义。通过选取2018年12月~2019年12月在我院病理科保存的内痔组织切片110例, 男59例, 女51例, 另选同期在我院病理科保存的相对正常肛垫组织切片110例作为正常组(没有痔病史, 但因低位直肠癌接受手术切除病人的肛垫标本作为相对正常肛垫组)。其中I期25例, II期29例, III期28例, IV期28例; 轻度35例, 中度45例, 重度30例, 来检测MMP-9、VEGFR2表达。结果显示, 与正常肛垫组织相比, 内痔组织中MMP-9、VEGFR2的表达升高($P < 0.05$)。与I期、III期、III期相比, IV期MMP-9、VEGFR2表达水平升高($P < 0.05$)。大于61岁患者MMP-9、VEGFR2表达水平与小于75岁患者相比无统计学差异($P > 0.05$)。男患者MMP-9、VEGFR2表达水平与女患者相比无统计学差异($P > 0.05$)。与病程3年以下患者相比, 病程3年以上患者MMP-9、VEGFR2表达水平升高($P < 0.05$)。与轻度相比, 中度、重度MMP-9、VEGFR2表达水平升高($P < 0.05$); 与中度相比, 重度MMP-9、VEGFR2表达水平升高($P < 0.05$)。总之, MMP-9、VEGFR2在内痔患者中呈高表达水平, 在II期患者中的表达水平高于I期, 其水平与严重程度、病程、间质水肿程度有关, 参与内痔发展。

关键词 基质金属蛋白酶-9; 血管内皮生长因子受体2; 内痔

Expression and Significance of MMP-9 and VEGFR2 in Patients with Internal Hemorrhoids

QIN Lei¹, QIN Xin^{2*}

(¹Department of Anorectal, Beijing Geriatric Hospital, Beijing 100095, China; ²Department of Internal Medicine, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract This study aimed to study the expression and significance of MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) and VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) in the tissues of patients with internal hemorrhoids. From December 2018 to December 2019, 110 internal hemorrhoids tissue sections, 59 males and 51 females, which were preserved in the pathology department of our hospital, were selected as the normal group. Another 110 relatively normal anal pad tissue sections preserved in the pathology department of our hospital at the same time were selected as the normal group (there was no history of hemorrhoids, but the anal pad specimens of patients who underwent surgical resection for low rectal cancer were used as the relatively normal anal pad group). Among them, 25, 29, 28, 28 cases

收稿日期: 2020-04-16 接受日期: 2020-07-27

北京老年医院525人才培养项目(批准号: RC525-2018-D-06)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15910379372, E-mail: qinatp@163.com

Received: April 16, 2020 Accepted: July 27, 2020

This work was supported by Beijing Geriatric Hospital 525 Talent Training Project (Grant No. RC525-2018-D-06)

*Corresponding author. Tel: +86-15910379372, E-mail: qinatp@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5362>

were separately in stage I, stage II, stage III, stage IV; 35, 45, 30 cases were separately mild, moderate and severe. The expressions of MMP-9 and VEGFR2 were detected. The results showed that compared with the normal anal cushion tissue, the expressions of MMP-9 and VEGFR2 in internal hemorrhoids increased ($P<0.05$). Compared with stage I, III and III, the expression levels of MMP-9 and VEGFR2 in stage IV increased ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression levels of MMP-9 and VEGFR2 between patients over 61 years old and patients under 75 years old ($P>0.05$). There was no significant difference in the expression levels of MMP-9 and VEGFR2 between male patients and female patients ($P>0.05$). Compared with patients with course less than three years, the expression levels of MMP-9 and VEGFR2 increased in patients with course more than three years ($P<0.05$). Compared with mild, the expression levels of moderate and severe MMP-9 and VEGFR2 increased ($P<0.05$), while those of severe MMP-9 and VEGFR2 increased ($P<0.05$). In short, MMP-9 and VEGFR2 were highly expressed in patients with internal hemorrhoids. The expression levels of MMP-9 and VEGFR2 in patients in stage II were higher than those in patients in stage I. The level was related with the severity, course of disease and the degree of interstitial edema, and participated in the development of internal hemorrhoids.

Keywords matrix metalloproteinase-9; vascular endothelial growth factor receptor 2; internal hemorrhoids

痔是良性肛门直肠疾病中较为常见的一种, 男女均有患病的可能, 其中痔发病的高峰期为45~65岁^[1]。痔病主要的发病原因是不良的生活习惯、腹腔压力增大、遗传及饮食习惯等, 而内痔最常见的症状为出血, 并可伴有轻度的大便失禁、肛周充满感、肛周皮肤刺激感以及黏液溢出^[2]。出血一般呈鲜红色, 通常与排便有关, 能够在卫生纸与粪便上找到, 几乎总是无痛的, 甚至排便时会出现喷射状^[3]。MMP-9可以降解基底膜的IV型胶原与层黏连蛋白, 主要由间质细胞分泌^[4]。VEGFR2是VEGF诱导的血管生成信号的主要介质, 作为II型跨膜TK受体由循环骨髓衍生的内皮祖细胞与内皮细胞表达^[5]。本文将研究MMP-9、VEGFR2因子在内痔患者组织中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

研究对象: 选取2018年12月~2019年12月在我院病理科保存的内痔组织切片110例, 男59例, 女51例, 年龄61~75岁, 平均年龄(68.1±4.6)岁; 病程0.5~5.0年, 平均病程(2.7±0.8)年。其中I期25例, II期29例, III期28例, IV期28例; 轻度35例, 中度45例, 重度30例。另选同期在我院病理科保存的相对正常肛垫组织切片110例作为正常组(没有痔病史, 但因低位直肠癌接受手术切除病人的肛垫标本作为相对正常肛垫组)。两组研究对象都符合医学伦理相关规定之内容, 其性别、年龄、病程等一般资料对比, 无

统计学差异($P>0.05$), 具有可比性。所有患者均签署了知情同意书, 相关研究经北京老年医院伦理委员会审查批准。

诊断标准: 临床变现为脱出与出血, 并可并发排便困难、嵌顿等; 根据严重程度能够分为I期: 无痔脱出, 排便时滴血、带血, 但便后能够自行停止; II期: 排便时有痔脱出, 常有带血, 但便后自行还纳; III期: 排便、劳累、咳嗽时有痔脱出, 可有便血, 需要手还纳; IV期: 痔持续脱出并且还纳后容易脱出, 可有便血。

排除标准: 合并伴有严重肝、肾及造血系统疾病的患者; 合并有传染性疾病患者; 过敏体质患者; 孕妇与哺乳期妇女。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色处理 将包埋好的石蜡切片放入二甲苯中进行脱蜡处理10 min, 然后移入无水乙醇中浸泡4 min, 水洗2 min, 蒸馏水洗2 min, PBC冲洗5 min。切片移入湿盒中加入3%的H₂O₂, 常温孵育5~10 min, 将内源性过氧化物酶的活性消除, PBS冲洗; 加入适量山羊血清封闭, 在室温环境下孵育10 min; 将封闭液用滤纸吸取, 加入适当比例稀释的一抗, 室温环境下孵育2 h, 采用PBC冲洗, 再加入二抗, 室温孵育30 min, PBS冲洗; 经过AEC显色处理10 min, 在显微镜下观察阳性反应, 之后再脱水并封片处理。

1.2.2 结果判定 所有病理切片均由2名以上经验较为丰富的医师进行确诊, MMP-9、VEGFR2主要在细胞膜中呈棕黄色为阳性; 阳性细胞数小于1%为

(-), 1%~10%为(+), 11%~50%为(++), 大于50%为(+++).

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行分析处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述, 多组间比较采用 F 值检验, 两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-9、VEGFR2在内痔患者组织中的表达

如表1和图1所示, 与正常肛垫组织相比, 内痔组织中MMP-9、VEGFR2的表达升高, 具有统计学差异($P<0.05$)。

2.2 不同临床分期MMP-9、VEGFR2表达水平比较

如表2所示, 与I期相比, II期、III期及IV期MMP-9、VEGFR2表达水平升高, 具有统计学差异($P<0.05$); 与II期相比, III期、IV期MMP-9、VEGFR2表达水平升高, 具有统计学差异($P<0.05$); 与III期相比, IV期MMP-9、VEGFR2表达水平升高, 具有统计学差异($P<0.05$)。

2.3 不同年龄患者MMP-9、VEGFR2表达水平比较

如表3所示, ≥ 61 岁患者MMP-9、VEGFR2表达水平与 < 75 岁患者相比, 无统计学差异($P>0.05$)。

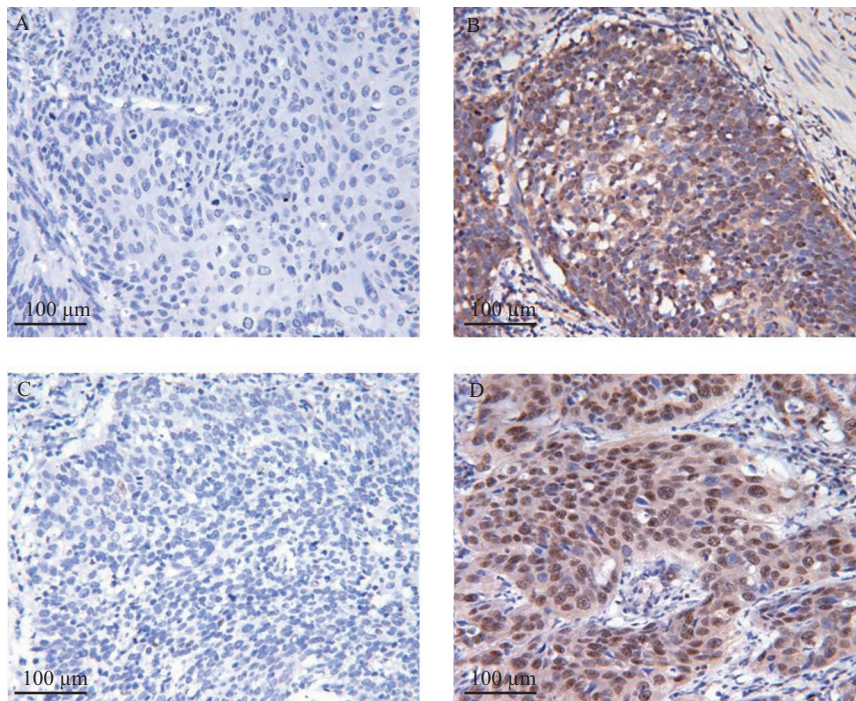
2.4 不同性别患者MMP-9、VEGFR2表达水平比较

如表4所示, 男患者MMP-9、VEGFR2表达水平

表1 MMP-9、VEGFR2在内痔患者组织中的表达

Table 1 Expression of MMP-9 and VEGFR2 in patients with internal hemorrhoids

组别 Group	例数 n	MMP-9	VEGFR2
Normal anal pad tissue	110	1.03±0.27	0.64±0.14
Internal hemorrhoid tissue	110	3.86±1.13	2.53±0.72
t		25.551	27.032
P		0.001	0.001



A: 正常肛垫组织MMP-9表达; B: 正常肛垫组织VEGFR2表达; C: 内痔组织MMP-9表达; D: 内痔组织VEGFR2表达。

A: the expression of MMP-9 in normal anal cushion tissue; B: the expression of VEGFR2 in normal anal cushion tissue; C: the expression of MMP-9 in internal hemorrhoid tissue; D: the expression of VEGFR2 in internal hemorrhoid tissue.

图1 MMP-9、VEGFR2在内痔组织中的表达

Fig.1 The expression of MMP-9 and VEGFR2 in the tissues of patients with internal hemorrhoids

表2 不同临床分期MMP-9、VEGFR2表达水平比较

Table 2 Comparison of expression levels of MMP-9 and VEGFR2 in different clinical stages

组别 Group	例数 <i>n</i>	MMP-9	VEGFR2
Stage I	25	2.15±0.62	0.92±0.22
Stage II	29	3.22±1.01*	1.63±0.43*
Stage III	28	4.03±1.22* [#]	2.46±0.72* [#]
Stage IV	28	5.32±1.32* [#] [○]	3.12±0.96* [#] [○]
<i>F</i>		16.452	16.782
<i>P</i>		0.001	0.001

* $P<0.05$, 与I期相比; [#] $P<0.05$, 与II期相比; [○] $P<0.05$, 与III期相比。* $P<0.05$ compared with stage I; [#] $P<0.05$ compared with stage II; [○] $P<0.05$ compared with stage III.

表3 不同年龄患者MMP-9、VEGFR2表达水平比较

Table 3 Comparison of expression levels of MMP-9 and VEGFR2 in patients of different ages

组别 Group	例数 <i>n</i>	MMP-9	VEGFR2
≥61 years old	42	3.65±0.93	2.54±0.61
<75 years old	68	3.72±0.97	2.61±0.64
<i>t</i>		0.374	0.567
<i>P</i>		0.711	0.572

表4 不同性别患者MMP-9、VEGFR2表达水平比较

Table 4 Comparison of expression levels of MMP-9 and VEGFR2 in patients of different genders

组别 Group	例数 <i>n</i>	MMP-9	VEGFR2
Man	59	3.89±1.14	2.81±0.75
Women	51	3.78±1.05	2.95±0.81
<i>t</i>		0.523	0.941
<i>P</i>		0.602	0.349

表5 不同病程中MMP-9、VEGFR2表达水平比较

Table 5 Comparison of expression levels of MMP-9 and VEGFR2 in different course of disease

组别 Group	例数 <i>n</i>	MMP-9	VEGFR2
< three years	62	3.46±1.11	2.75±0.82
≥three years	48	4.13±1.25	3.11±0.98
<i>t</i>		2.971	2.096
<i>P</i>		0.004	0.038

与女患者相比, 无统计学差异($P>0.05$)。

2.5 不同病程中MMP-9、VEGFR2表达水平比较

如表5所示, 与病程<3年患者相比, 病程≥3年患者MMP-9、VEGFR2表达水平升高, 具有统计学差异($P<0.05$)。

2.6 不同间质水肿程度MMP-9、VEGFR2表达水平比较

如表6所示, 与轻度相比, 中度、重度MMP-9、

VEGFR2表达水平升高, 具有统计学差异($P<0.05$); 与中度相比, 重度MMP-9、VEGFR2表达水平升高, 具有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨论

痔是平滑肌、结缔组织以及血管组织的集群, 在正常个体中, 作为上、中、下直肠静脉与上直肠动脉之间吻合的垫子, 位于肛管左侧、右侧与右后

表6 不同间质水肿程度MMP-9、VEGFR2表达水平比较

组别 Group	例数 <i>n</i>	MMP-9	VEGFR2
Mild	35	2.64±0.43	1.34±0.31
Moderate	45	3.78±1.11*	2.63±0.75*
Severe	30	4.95±1.54*#	3.52±1.12*#
<i>F</i>		12.759	16.568
<i>P</i>		0.001	0.001

* $P < 0.05$, 与轻度相比; # $P < 0.05$, 与中度相比。

* $P < 0.05$ compared with mild; # $P < 0.05$ compared with moderate.

位^[6]。痔对于患者的生活质量影响较大,能够通过手术与非手术方式治疗,非手术治疗方式包括内服药物、外用药物治疗^[7]。而痔核切除术是直接切除痔核组织,所以患者的疼痛感较明显,创伤性比较大,愈合的时间较长,术后出血较多,甚至肛门会出现功能受损^[8-9]。肛门齿线以上为内痔,是肛门直肠病中常见的疾病,柔软静脉团是由直肠末端黏膜下的痔内静脉丛充血与扩大曲张所形成^[10-11]。痔的组织中重要的病理变化是动脉吻合管壁结构的退行性变化以及完整性的破坏,痔的组织中动静脉吻合的管壁可见局部破裂,血管结构发育不良,胶原纤维增多,弹力板可见破裂、断裂及变形等改变,平滑肌可见断裂、缺如以及玻璃样病变,而血管外可见较多红细胞,管腔内可见血栓形成^[12-13]。

MMP-9在痔的组织中高表达,肛垫支持结构的降解是其活性增加导致的,而肛垫的弹性下降是由于固有层结缔组织疏松,痔的组织的水肿形成加重,是因血管的通透性增加,导致痔出血的风险增加^[14-15]。受体的自身交互磷酸化与二聚化,主要因为VEGF释放后和血管内皮细胞上的VEGFR2结合,并激活下游的信号通路,使得信号传递到细胞核内,导致微血管增生过度^[16]。本文结果显示,与正常肛垫组织相比,内痔组织中MMP-9、VEGFR2的表达升高。说明MMP-9、VEGFR2在内痔组织中呈高表达趋势。相关研究提到,痔的组织中磷酸化增强,在刺激黏膜的情况下,使VEGFR2的表达量增加,增加痔的肛垫下移,并导致微血管的过度增生,本研究与BASAGIANNIS等^[17]研究保持一致。肛垫组织支持结构疏松、弹性下降、血管通透性增加,是由于MMP-9的活性增强所导致的肛垫组织中结缔组织、胶原与弹性纤维的降解^[18]。本文中,与I期、II期、

III期相比,IV期MMP-9、VEGFR2表达水平升高。说明严重程度越高的患者MMP-9、VEGFR2表达水平越高。本文指出,<45岁患者MMP-9、VEGFR2表达水平与≥45岁患者相比,无统计学差异。男患者MMP-9、VEGFR2表达水平与女患者相比,无统计学差异。说明MMP-9、VEGFR2表达水平与性别、年龄无关。

本研究结果显示,与病程<3年患者相比,病程≥3年患者MMP-9、VEGFR2表达水平升高。说明MMP-9、VEGFR2表达水平与病程相关,MMP-9、VEGFR2表达水平越高病程越长。在创伤发生后,多形核白细胞、炎性细胞都会产生MMP-9,而MMP-9降解细胞外基质就会激活炎性细胞的损伤作用,本研究与毛绩伟等^[19]研究保持一致。痔的组织中由于黏膜层较薄,更容易受到损伤,炎症反应的促进与激活与MMP-9表达相关^[20]。本文研究发现,与轻度相比,中度、重度MMP-9、VEGFR2表达水平升高;与中度相比,重度MMP-9、VEGFR2表达水平升高。说明MMP-9、VEGFR2表达水平与间质水肿程度相关,间质水肿程度越重MMP-9、VEGFR2表达水平越高。

综上所述,MMP-9、VEGFR2在内痔患者中呈现较高的表达水平,在II期患者中的表达水平高于I期,其表达水平与内痔的严重程度、病程的发展、间质水肿的程度呈正相关关系,积极参与内痔的发展进程。因此,MMP-9、VEGFR2在内痔的发病机制中具有重要的生物学研究价值,其靶点性的表达在临床工作中也有很重要的指导价值。本研究通过观察各个临床分期内痔黏膜组织中MMP-9、VEGFR2的表达水平,进而阐述内痔发生及发展的分子机制,为内痔的防治提供更加充分的理论依据及临床方向。

参考文献 (References)

- [1] 孙燕, 李刚, 程海鹤, 等. TST联合聚桂醇注射液治疗 II、III 期内痔及混合痔的临床观察[J]. 山东医药(SUN Y, LI G, CHENG H H, et al. Clinical observation of TST combined with polyglycol injection in the treatment of stage II and III internal hemorrhoids and mixed hemorrhoids [J]. Shandong Medicine), 2018, 58(29): 78-80.
- [2] 荆剑, 白旭明, 顾星石, 等. 超选择动脉栓塞治疗内痔11例临床效果[J]. 介入放射学杂志(JING J, BAI X M, GU X S, et al. Clinical effect of superselective arterial embolization in the treatment of internal hemorrhoids in 11 cases [J]. Journal of Interventional Radiology), 2018, 27(8): 732-4.
- [3] CRASHAW B P, RUSS A J, ERLICH B O, et al. Prospective case series of a novel minimally invasive bipolar coagulation system in the treatment of grade I and II internal hemorrhoids [J]. Surge Inonu, 2016, 23(6): 581-5.
- [4] 袁晓冬, 邓建松, 刘志高. 血脂康联合普罗布考对高血压颈动脉粥样硬化患者MMP-9、CD105和TIMP-1的影响[J]. 中国老年学杂志(YUAN X D, DENG J S, LIU Z G. Effect of Xuezhikang combined with probucol on MMP-9, CD105 and TIMP-1 in patients with hypertension and carotid atherosclerosis [J]. Chinese Journal of Gerontology), 2019, 39(14): 3359-61.
- [5] HUANG X, ZHOU G, WU W, et al. Editing VEGFR2 blocks VEGF-induced activation of act and tube formation [J]. Invest Ophthalmology Vis Sci, 2017, 58(2): 1228-36.
- [6] 白金权, 李柏文. 吻合器痔上黏膜环切术治疗老年中重度内痔的临床效果[J]. 中国老年学杂志(BAI J Q, LI B W. The clinical effect of hemorrhoidectomy with stapler in the treatment of senile moderate and severe internal hemorrhoids [J]. Chinese Journal of Gerontology), 2017, 37(23): 5904-5.
- [7] ZAKHARCHENKO A, KAITOUKOV Y, VINNIE Y, et al. Safety and efficacy of superior rectal artery embolization with particles and metallic coils for the treatment of hemorrhoids (Hemorrhoid technique) [J]. Diana Interval Imaging, 2016, 97(11): 1079-84.
- [8] 彭云花, 杨巍, 王业皇, 等. 小麦纤维颗粒改善内痔疗效的多中心随机对照临床试验[J]. 中华胃肠外科杂志(PENG Y H, YANG W, WANG Y H, et al. Multicenter randomized controlled clinical trial of wheat fiber granule in improving internal hemorrhoids [J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery), 2017, 20(7): 792-7.
- [9] VAN ISRAEL J J, FORAMINA JUNKER'S H A, VERHEIJEN P M, et al. High-grade hemorrhoids requiring surgical treatment are common after laparoscopic ventral mesh rectopexy [J]. Tech Colorectal, 2016, 20(4): 235-42.
- [10] VIDAL V, SAPOVAL M, SIELEZNEFF Y, et al. Hemorrhoid: a new concept for the treatment of hemorrhoids with arterial embolization: the first 14 cases [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2015, 38(1): 72-8.
- [11] 谭嗣伟, 李东冰, 张立军, 等. 痔上黏膜非环切吻合术治疗内痔[J]. 中华普通外科杂志(TAN S W, LI D B, ZHANG L J, et al. The treatment of internal hemorrhoids by non circular hemorrhoidectomy [J]. Chinese Journal of General Surgery), 2016, 31(8): 670-2.
- [12] 江能, 姚玉柱, 吴城. 围术期管理在吻合器痔上黏膜环切术治疗老年痔疮患者中的应用效果[J]. 中华老年医学杂志(JIANG N, YAO Y Z, WU C. The effect of perioperative management in the treatment of elderly patients with hemorrhoids by stapler hemorrhoidectomy [J]. Chinese Journal of Geriatric Medicine), 2019, 38(5): 578-81.
- [13] IIDA Y, SAITO H, TAKASHIMA Y, et al. Procedure for prolapse and hemorrhoids (PPH) with low rectal anastomosis using a PPH 03 stapler: low rate of recurrence and postoperative complications [J]. Into J Colorectal Dis, 2017, 32(12): 1687-92.
- [14] 蔡姝萍, 刘美香, 马丽丽. 急性脑梗死患者合并OSAHS的严重程度与血清MMP-9、PLGF水平的相关性[J]. 中国老年学杂志(CAI S P, LIU M X, MA L L. Correlation between severity of OSAHS and serum MMP-9, PLGF levels in patients with acute cerebral infarction [J]. Chinese Journal of Gerontology), 2019, 39(17): 4150-2.
- [15] FALCONER L, SALAMIS R, TRAVAILS S, et al. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hyper methylation of MMP9 gene in melanoma [J]. Aging (Albany NY), 2016, 8(5): 933-44.
- [16] 张欢, 阎锋, 王红, 等. VEGFR2靶向超声造影诊断乳腺癌研究进展[J]. 中国医学影像技术(ZHANG H, YAN F, WANG H, et al. Research progress of VEGFR2 targeted ultrasound in the diagnosis of breast cancer [J]. Chinese Medical Imaging Technology), 2019, 35(3): 463-6.
- [17] BASAGIANNIS D, CHRISTOFORIDIS S. Constitutive endocytosis of VEGFR2 protects the receptor against shedding [J]. J Boils Chem, 2016, 291(32): 16892-903.
- [18] LIU Y, ZHAO Y, LU C, et al. Signatures of positive selection at hemopexin (PEX) domain of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene [J]. J Biosocial, 2015, 40(5): 885-90.
- [19] 毛绩伟, 王喆, 王漂, 等. VEGFR2/STAT3/MMP-9介导阿帕替尼抑制辐射后鼻咽癌细胞迁移[J]. 中华放射医学与防护杂志(MAO J W, WANG Z, WANG P, et al. Inhibition of migration of NPC cells by apatinib mediated by VEGFR2/STAT3/MMP-9 [J]. Chinese Journal of Radiation Medicine and Protection), 2019, 39(7): 481-6.
- [20] LI P B, TANG W J, WANG K, et al. Expressions of IL-1 α and MMP-9 in degenerated lumbar disc tissues and their clinical significance [J]. Euro Rev Med Pharmacologic Sci, 2017, 21(18): 4007-13.