

二尖瓣退行性变瓣膜组织中 Sox9 表达的研究

刘 良 刘晓红 徐志云

【摘要】 目的:探讨 Sox9 在二尖瓣退行性变(DMVD)与正常二尖瓣瓣膜组织中的表达差异。 方法:收集 11 例 DMVD 患者(DMVD 组)二尖瓣瓣膜与 3 例因其他疾病死亡患者(对照组)的正常二尖瓣瓣膜,行免疫组织化学染色,根据 Sox9 阳性细胞比例及阳性细胞染色强度,采用二次记分法判读,0~3 分为 Sox9 低表达,4~9 分为 Sox9 高表达,对两组 Sox9 表达情况进行统计学分析。 结果:Sox9 表达定位于细胞核,在对照组二尖瓣瓣膜内皮细胞、海绵层间质细胞内散在表达;Sox9 在 DMVD 组二尖瓣瓣膜主要表达于间质细胞,各层均有分布,在海绵层呈团簇状分布。对照组二尖瓣瓣膜 Sox9 阳性细胞比例及染色强度均较低,其中 Sox9 低表达 3 例,高表达 0 例,综合评分 1~3 分;DMVD 组二尖瓣瓣膜内 Sox9 低表达 2 例,高表达 9 例,综合评分 3~9 分;Sox9 在 DMVD 组和对照组二尖瓣瓣膜中的表达差异有统计学意义($P=0.027$)。 结论:Sox9 在 DMVD 二尖瓣瓣膜中高表达,可能参与二尖瓣瓣膜退行性变病变过程。

【关键词】 二尖瓣退行性变;Sox9;免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.02.016

The study of Sox9 expression in degenerative mitral valve disease LIU Liang, LIU Xiaohong, XU Zhiyun. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of Sox9 in mitral valves of degenerative mitral valve disease (DMVD) and normal mitral valves. **Methods:** Mitral valves from 11 DMVD patients (DMVD group) and 3 patients who died from other diseases (control group) were collected and stained by immunohistochemistry. According to the proportion of Sox9 positive cells and the staining intensity of positive cells, two scoring systems were used. The scores from 0 to 3 were regarded as Sox9 low expression, while 4 to 9 regarded as Sox9 high expression. Then statistical analysis was done according to the expression results of two groups. **Results:** Sox9 expressed in the nucleus, which had scattered expression in endothelial cells and spongiosa interstitial cells of normal valves in control group. While in the lesion valves of DMVD group, Sox9 mainly expressed in the interstitial cells of each layer, and was cluster-like distribution in the spongiosa. The proportion of Sox9 positive cells and the intensity of staining were lower in control group, including 3 cases with Sox9 low expression and 0 cases with high expression, whose overall scores were between 1 to 3; while Sox9 was higher expressed in DMVD group, with low expression in 2 cases and high expression in 9 cases, whose overall scores were between 3 to 9. Sox9 expression was significantly different between DMVD group and control group ($P=0.027$). **Conclusion:** Sox9 is highly expressed in the mitral valves of patients with DMVD and may be involved in the process of mitral degeneration.

【Key words】 Degenerative mitral valve disease; SRY-related high mobility group-box gene 9; Immunohistochemistry

二尖瓣退行性变 (degenerative mitral valve disease, DMVD) 又称二尖瓣黏液变性, 在西方发达国家 DMVD 占二尖瓣关闭不全病因的 45% ~ 65%; 在犬的心脏疾病中, DMVD 占 40% ~ 70%^[1-4]。DMVD 主要病理改变包括间质细胞表型转化^[5-6], 蛋白多糖、黏多糖过度沉积^[7], 弹性蛋白破碎, 胶原蛋白破坏中断^[8]。这些变化导致瓣叶增厚、瓣膜组件结构脆弱, 引起瓣叶膨出、脱垂或松弛, 腱索断裂, 二尖瓣反流。随着研究的深入, 调节 DMVD 病理变化的特殊效应蛋白已被证实, 包括蛋白多糖如核心蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、二聚糖^[7], 基质分解酶如基质金属蛋白酶、胶原酶、弹性蛋白酶, 激活的间质细胞表型标志物如 α -平滑肌肌动蛋白、非肌肉型肌球蛋白重链^[5, 8]。然而, 对黏液变性效应蛋白表达的启动机制及调控机制仍不明确。

Sox9 (SRY-related high mobility group-box gene 9) 是 Y 染色体性别决定基因相关高移动框转录因子, 已有研究证实, 在犬和人的退行性二尖瓣中, Sox9、软骨聚集蛋白聚糖及软骨特异性 II 型胶原蛋白存在局灶共表达^[9], 但与正常二尖瓣相比 Sox9 表达是否增加尚不清楚^[10]。本研究探讨 Sox9 在 DMVD 与正常二尖瓣瓣膜组织中的表达情况并分析其分布特点。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取我院胸心外科 2013 年 2 月至 2014 年 4 月切除病变二尖瓣行瓣膜置换术的 11 例 DMVD 患者 (DMVD 组), 其中男性 8 例, 女性 3 例, 平均年龄 (43.6 ± 13.9) 岁。对照组为 3 例因其他疾病死亡患者, 行尸检, 其中男性 1 例, 女性 2 例, 平均年龄 (39.7 ± 17.0) 岁, 二尖瓣瓣膜由我院病理科提供, 瓣膜正常, 无病理改变。本研究经医院伦理委员会批准, 并征得所有患者或家属知情同意。

1.2 染色方法

收集的二尖瓣瓣膜组织经 10% 福尔马林固定 24 h, 按照常规程序进行脱水、浸蜡、包埋。包埋好的标本于 -20℃ 放置 30 min, 5 μ m 连续切片, 贴附于防脱片载玻片上, 70℃ 烤片 2 h, 室温保存, 行免疫组织化学 SP 法染色。切片常规脱蜡至水, 柠檬酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 值 6.0) 高温高压抗原修复, 内源性过氧化物酶阻断剂室温封闭 30 min, 10% 山羊血清室温封闭 30 min, 兔抗人 Sox9 多克隆抗体 (1:100, 美国 Santa Cruz 公司, sc-20095) 4℃ 孵

育过夜, 室温复温 1 h, 生物素标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 30 min, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶室温孵育 30 min, 二氨基联苯胺 (DAB) 液显色后显微镜下观察染色程度, 自来水适时冲洗以终止染色, 苏木素复染 20 s, 稀盐酸分化 1~2 s, 碳酸锂溶液返蓝 5 s, 脱水、封片, 显微镜下观察拍照。

病变瓣膜同时行苏木精-伊红 (HE) 及维多利亚蓝-苦味酸酸性复红 (VG) 染色。HE 染色步骤: 石蜡切片脱蜡至水, 苏木精染液染色 5 min, 水洗, 稀盐酸分化约 2 s, 水洗, 碳酸锂溶液返蓝, 0.5% 伊红染液染色 2 min, 常规脱水封片。VG 染色步骤: 石蜡切片脱蜡至水, 70% 乙醇洗 2 min, 维多利亚蓝染液染色 2 h, 95% 乙醇分化数秒, 水洗 2 min, Van Gieson 氏液染色 3 min, 常规脱水封片。

1.3 染色结果判定

免疫组织化学染色时, 阳性细胞着色主要定位于细胞核, 偶有细胞浆着色。根据 Sox9 阳性细胞比例及阳性细胞染色强度, 采用二次记分法评判^[11]。按阳性细胞比例: <5% 为 0 分, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分。按染色强度: 不着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 深黄色或棕黄色为 2 分, 棕褐色颗粒着色为 3 分。阳性细胞比例和染色强度的分值相乘为最后的综合评分, 0~1 分为阴性 (-), 2~3 分为弱阳性 (+), 4~5 分为阳性 (++) , ≥ 6 分为强阳性 (+++)。用已知阳性的直肠腺癌切片作为阳性对照, 用染色时 PBS 代替一抗的切片作为阴性对照。

HE 染色时, 细胞质及非细胞成分染成淡红色, 细胞核染成蓝色; VG 染色时, 胶原纤维呈红色, 弹力纤维呈蓝绿色。

1.4 统计学分析

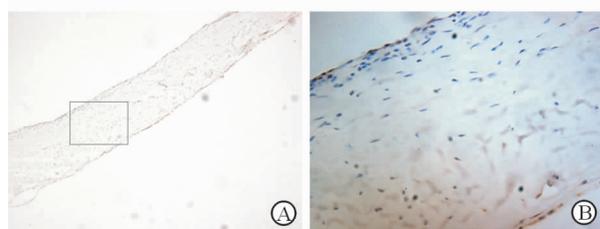
采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计数资料用例数和百分数表示, 组间比较采用四格表资料 Fisher 确切概率法, α 取双侧 0.05, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

对照组正常瓣膜各层细胞排列均匀, Sox9 少量表达, 主要在内皮细胞、海绵层间质细胞内散在表达, Sox9 阳性细胞比例及染色强度均较低 (见图 1); DMVD 组病变瓣膜 HE 及 VG 染色可见纤维层紊乱, 海绵层增厚, 胶原断裂, 形成漩涡状结构, 符合二尖瓣瓣膜黏液变性改变 (见图 2); Sox9 在 DMVD 组病变瓣膜间质细胞内高表达, 定位于细胞

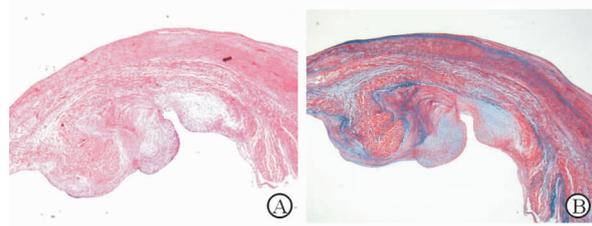
核,各层均有分布,在海绵层呈团簇状分布,黏液变性部位 Sox9 阳性细胞比例及染色强度均较高(见图3)。

根据免疫组织化学染色综合评分结果,对照组2例患者为 Sox9(-),1例患者为 Sox9(+),综合评分1~3分;DMVD组2例患者为 Sox9(+),3例患者为 Sox9(++),6例患者为 Sox9(+++),综合评分3~9分。考虑到 Sox9 在正常和病变组织中均有表达,本研究将 Sox9(++)和 Sox9(+++)者归为 Sox9 高表达组,Sox9(-)和 Sox9(+)归为 Sox9 低表达组,Sox9 在 DMVD 组和对照组二尖瓣瓣膜中的表达有统计学差异($P = 0.027$),Sox9 在 DMVD 组病变瓣膜中高表达,见表1。



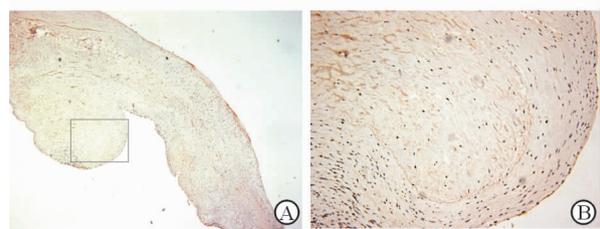
注:A×40;B×400

图1 正常二尖瓣瓣膜免疫组织化学染色结果



注:A为 HE 染色,×40;B为 VG 染色,×40

图2 二尖瓣退行性变瓣膜 HE 及 VG 染色结果



注:A×40;B×200

图3 二尖瓣退行性变瓣膜免疫组织化学染色结果

表1 Sox9 在二尖瓣瓣膜组织中的表达/n(%)

| 组别 | n | Sox9 低表达组 | Sox9 高表达组 |
|-------|----|-----------|-----------|
| 对照组 | 3 | 3(100.0) | 0(0.0) |
| DMVD组 | 11 | 2(18.2) | 9(81.8) |

3 讨论

脊椎动物心脏瓣膜结构高度保守,成人二尖瓣分3层,内层(心房层)、海绵层及纤维层。各层细胞

外基质的组成反映了瓣膜对生物机械应力的功能^[12]。纤维层主要由环向的胶原蛋白纤维束组成;海绵层主要成分是蛋白多糖,可以吸收水分,使海绵层膨胀,以缓冲瓣叶运动时产生的冲击力,起到缓冲作用;内层富含径向弹性蛋白,以应对瓣膜开放时的血流剪切力,并使瓣叶能重复开闭。瓣膜细胞主要由内皮细胞、平滑肌细胞和间质细胞组成。内皮细胞覆盖瓣叶表面,功能与血管内皮细胞相似;间质细胞通过持续合成和降解效应蛋白来维持细胞外基质成分,而细胞外基质在维持瓣膜功能以及应对瓣膜所承受的生物力学加载起到关键作用^[6]。研究证实,体外于胶原凝胶中培养猪二尖瓣间质细胞,反复交替拉伸、放松数天后,糖胺聚糖合成增加,核心蛋白聚糖表达改变^[13];体内实验也证实二尖瓣附近的湍流可诱发黏液变性^[14]。我们认为,黏液变性的初期改变是符合生理性的,是对应力改变的弹性变化,是可逆的,但是一旦达到病变阈值,可导致调节失衡,使蛋白多糖过度沉积,引起瓣叶增厚、反流,所致的血流动力学改变进一步增加瓣膜海绵层蛋白多糖的沉积。作为 DMVD 的高危因素,高血压可能是因为增加了瓣膜所受张力,马凡综合征则是因为瓣膜基础结构薄弱而降低了病变阈值。了解二尖瓣黏液变性病变过程中的调节机制,有利于寻找新的治疗靶点,改变目前仅有外科手术治疗的现状,延缓发病及二次手术时间。

Sox9 是软骨形成的关键转录因子,其活化可介导软骨聚集和软骨特异性结构基因包括聚集蛋白聚糖、II型胶原蛋白、软骨连接蛋白和 N-钙粘蛋白的表达^[15-16]。鉴于 Sox9 在心内膜垫的发育及瓣膜分层时海绵层的重构中发挥重要作用^[17],且软骨和黏液变性瓣膜病理形态高度相似^[18],Sox9 可能是调控二尖瓣黏液变性效应蛋白的重要因素。在软骨发育中已证实 Sox9 是聚集蛋白聚糖的关键上游转录因子^[19]。在成人瓣膜,聚集蛋白聚糖是海绵层的重要成分,其过度沉积是 DMVD 的主要病理特征之一。本研究发现,在 DMVD 瓣膜组织中 Sox9 高表达,且主要分布于病变部位间质细胞,与正常瓣膜表达情况比较具有统计学差异,证明 Sox9 参与黏液变性病变过程。Sox9 在正常瓣膜也有表达,提示其参与调节瓣膜结构的稳态。瓣膜间质细胞中 Sox9 是否通过调节聚集蛋白聚糖的表达来控制瓣膜黏液变性进程,有待进一步研究。

本研究通过免疫组织化学方法揭示了 DMVD

中 Sox9 的表达异常,为进一步体外实验及动物实验提供了理论依据。不足的是,由于样本获取困难,数量较少,未能根据病变程度进行分析,无法观察到病变不同时期 Sox9 的表达变化。

参 考 文 献

- [1] Lung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(3):162-172.
- [2] Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease[J]. *J Vet Intern Med*, 2009, 23(6):1142-1150.
- [3] Freed LA, Levy D, Levine RA, et al. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(1):1-7.
- [4] Buchanan JW. Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs[J]. *Adv Vet Sci Comp Med*, 1977, 21:75-106.
- [5] Disatian S, Ehrhart EJ 3rd, Zimmerman S, et al. Interstitial cells from dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease undergo phenotype transformation[J]. *J Heart Valve Dis*, 2008, 17(4):402-412.
- [6] Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, et al. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves[J]. *J Heart Valve Dis*, 2004, 13(5):841-847.
- [7] Gupta V, Barzilla JE, Mendez JS, et al. Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2009, 18(4):191-197.
- [8] Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, et al. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves [J]. *Circulation*, 2001, 104(21):2525-2532.
- [9] Lacerda CM, Maclea HB, Kisiday JD, et al. Static and cyclic tensile strain induce myxomatous effector proteins and serotonin in canine mitral valves[J]. *J Vet Cardiol*, 2012, 14(1):223-230.
- [10] Caira FC, Stock SR, Gleason TG, et al. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(8):1707-1712.
- [11] Leake R, Barnes D, Pinder S, et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. UK Receptor Group, UK NEQAS, The Scottish Breast Cancer Pathology Group, and The Receptor and Biomarker Study Group of the EORTC[J]. *J Clin Pathol*, 2000, 53(8):634-635.
- [12] Blevins TL, Peterson SB, Lee EL, et al. Mitral valvular interstitial cells demonstrate regional, adhesional, and synthetic heterogeneity[J]. *Cells Tissues Organs*, 2008, 187(2):113-122.
- [13] Gupta V, Werdenberg JA, Lawrence BD, et al. Reversible secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans by cyclically stretched valvular cells in 3D culture [J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36(7):1092-1103.
- [14] Stephens EH, Nguyen TC, Itoh A, et al. The effects of mitral regurgitation alone are sufficient for leaflet remodeling [J]. *Circulation*, 2008, 118(14 Suppl):S243-249.
- [15] Tuan RS. Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-A(Suppl 2):137-141.
- [16] Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93(1):93-103.
- [17] Lincoln J, Kist R, Scherer G, et al. Sox9 is required for precursor cell expansion and extracellular matrix organization during mouse heart valve development[J]. *Dev Biol*, 2007, 305(1):120-132.
- [18] Fox PR. Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog[J]. *J Vet Cardiol*, 2012, 14(1):103-126.
- [19] Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9[J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 18(3):213-219.

(收稿:2016-10-10 修回:2017-01-25)

(本文编辑:胡晓静)