

大鼠实验性脑出血后基质金属蛋白酶 2 和 9 的表达

田 力¹, 刘海峰², 滕伟禹³

(1. 中国医科大学附属第二医院干诊科, 辽宁省沈阳市 110003; 2. 温州医学院附属第一医院急诊科, 浙江省温州市 325000; 3. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 脑出血后基质金属蛋白酶 2 和 9 的表达; 酶谱分析法; 脑出血; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9; 脑水肿

[摘要] 目的 探讨大鼠脑出血后基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达及其意义。方法 采用未抗凝新鲜自体股动脉血注入大鼠尾状核建立脑出血动物模型。用酶谱分析法测定脑出血后 6 h、12 h、24 h、3 天、6 天、10 天和 15 天时基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达。结果 基质金属蛋白酶 2 在脑出血后 24 h 开始表达 ($P < 0.05$), 第 6 天时达高峰 ($P < 0.01$), 到第 10 天仍维持高水平表达 ($P < 0.05$); 而基质金属蛋白酶 9 在脑出血后 6 h 开始表达 ($P < 0.05$), 24 h~3 天最明显 ($P < 0.01$), 此后活性逐渐降低, 第 10 天时的活性仍高于对照组 ($P > 0.05$), 15 天时不再表达。结论 脑出血后 6 h~3 天出血灶周围脑组织中基质金属蛋白酶 9 的活性增高, 可能与急性期脑水肿的形成有关, 而基质金属蛋白酶 2 的迟表达可能参与了脑组织的修复过程。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

The Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 in Rats After Intracerebral Hemorrhage

TIAN Li¹, LIU Hai-Feng², and TENG Wei-Yu³

(1. Ward of Cadre, the Second Clinical College, China Medical University, Shenyang 110003; 2. Emergency Department, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000; 3. Department of Neurology, the First Clinical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Intracerebral Hemorrhage; Matrix Metalloproteinase-2; Matrix Metalloproteinase-9; Zymogram Analysis; Brain Edema; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in rats following intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** ICH model was produced by stereotactically infusing 75 μ L autologous fresh blood taken from rat femoral artery into the left caudate nucleus. The expression of MMP-2 and MMP-9 was detected by zymogram analysis over a time course ranging from 6 hours to 15 days. **Results** The expression of MMP-2 and MMP-9 in the hemorrhage site increased progressively over time after ICH. After 6 hours, significant ($P < 0.05$) MMP-9 activity reached maximum levels by 24 hours ($P < 0.01$), then persisted for 3 days at this level and returned based level (zero) by 15 days. MMP-2 was significantly ($P < 0.05$) increased by 24 hours and was maximum after 5 days following ICH.

Conclusions These results demonstrated that early increased MMP-9 expression was a significant responses to ICH; MMP-2 may contribute to brain tissue repairing.

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 后病理损伤推测为多因素共同作用的结果, 我们已经对此作了一系列的动物及临床实验, 并取得了预期的结果^[1]。本实验仍然采用大鼠制作脑出血动物模型, 通过酶谱分析法对基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在实验性脑出血后的变

化规律进行观察和分析, 从而了解这两个因子在脑出血后的一系列损伤中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组

健康雄性 Wistar 大鼠 48 只, 体重 300~350 g, 由中国医科大学基础医学院实验动物中心提供 (符合国家二级动物标准)。随机分为假手术对照组和 6 h、12 h、24 h、3 天、6 天、10 天和 15 天等实验组共 8 组, 每组 6 只大鼠。

1.2 动物模型的制备

参照 Yang^[2] 方法并作改进。大鼠以 10% 水合

[收稿日期] 2005-05-16 [修回日期] 2006-01-13

[作者简介] 田力, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生的机制, 联系电话为 024-83956386, E-mail 为 Tianlicmu2@126.com。刘海峰, 硕士, 研究方向为脑出血后脑水肿发生的机制, 联系电话为 13857795927, E-mail 为 Haifengcmu@126.com。滕伟禹, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生的机制, E-mail 为 tengweiyucmu@126.com。

氯醛(330 mg/kg)腹腔麻醉后,用微量注射器从左侧股动脉抽取 75 μ L 鲜血,在立体定向仪引导下缓慢注入左侧尾状核(前凶前 0.2 mm,左侧旁开中线 3 mm 处),进针 6 mm,留针 10 min 后退针。实验前后,各组动物均可自由进食水。对照组大鼠脑内注入等量生理盐水,其余操作同实验组。经预实验证实模型成功的判定标准为:术后沿针道冠状面切开脑组织可见血肿形成。

1.3 脑组织样本的采取

在预定时间点,给大鼠过量麻醉剂,快速断头取出脑组织,立即在深度冰箱保存(-75°C)。在注血点及海马位置分别作冠状切面,然后在左侧尾状核区 L1、左侧海马区 L2 取样少量用于酶的活性测定,并在对侧半球相应位置 R1、R2 取样作为对照。假手术对照组动物在术后 24 h 处死,脑组织取样过程同实验组。

1.4 蛋白提取物的制备

各时间点的样本全部备齐后,以上用于酶活性测定的脑组织均分别称重,冰浴匀浆,并用磷酸盐缓冲液配制成浓度为 500 g/L 的标准化液。然后在 4°C 12 000 r/min 条件下离心 1 h,取上清, -20°C 保存用于酶谱分析。

1.5 酶谱分析

先配制浓缩胶和分离胶(含 10 g/L 明胶,即 MMP-2 和 MMP-9 的降解底物),然后将提取出的蛋白样品用样品缓冲液($5\times$, 0.5 mmol/L Tris/HCl, pH 6.8, 10% SDS 1 mL, 甘油 1.5 mL, 0.05% 溴酚蓝少许)稀释,加样于浓缩胶、分离胶,150 V 电泳 2 h 后取出分离胶,用含 2% Triton X-100 的液体浸泡 2 h,再转入孵育液(50 mmol/L Tris/HCl, pH 8.0, 5 mmol CaCl_2 , 100 mmol NaCl), 37°C 孵育 25 h,考马斯亮兰 R-250 染色 2 h,然后脱色(250 mL/L 甲醇, 700 mL/L 醋酸),可见凝胶普遍蓝染,而底物被水解处呈清晰透明带。晾胶,显影条带经数码成像系统输入计算机,用美国 OLYMPUS 公司提供的 MetaMorph/DP10/B51 图像分析仪进行光密度测定。

1.6 统计学处理

各测定值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.0 统计软件作单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为有统计学意义,并对样本作两两比较。

2 结果

2.1 脑出血大鼠模型大体标本观察

在注血点沿针道冠状面切开脑组织,可见大鼠

尾状核内有明显类圆周形的血肿形成(图 1, 箭头所示),假手术对照组仅可见轻微针道损伤而无血肿形成。



图 1. 脑出血大鼠模型的大体标本 箭头所示为血肿形成。

2.2 大鼠脑出血后基质金属蛋白酶 2 和 9 的变化

L1 区 MMP-9 水平在脑出血后 6 h 开始升高($P < 0.05$), 12 h 时明显增加, 3 天时活性最大($P < 0.01$), 此后渐减, 但 10 天时仍有一定活性($P < 0.05$), 第 15 天时不再表达。而 MMP-2 在脑出血后 24 h 表达($P < 0.05$), 第 6 天达高峰($P < 0.01$), 15 天时仍有表达(图 2)。R1、R2 和 L2 区未出现透明带, 对照组也未出现透明带。

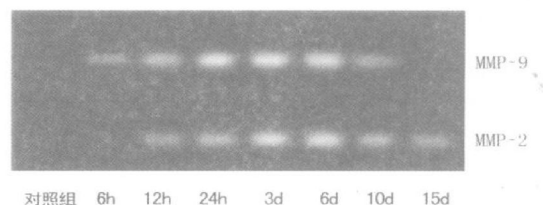


图 2. 大鼠脑出血后 6 h~15 天血肿周围脑组织基质金属蛋白酶 2 和 9 的酶谱分析

表 1. 各组大鼠脑出血后血肿周围组织基质金属蛋白酶 2 和 9 的光密度值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	MMP-9	MMP-2
对照组	0	0
6 h 组	39.42 ± 4.34^a	0
12 h 组	59.00 ± 7.61^a	46.76 ± 4.24
24 h 组	180.25 ± 13.91^b	77.59 ± 5.90^a
3 天组	191.51 ± 11.78^b	111.97 ± 9.11^a
6 天组	67.25 ± 6.45^a	184.68 ± 12.56^b
10 天组	59.13 ± 5.33^a	69.19 ± 5.72^a
15 天组	0	52.68 ± 4.31

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

基质金属蛋白酶(MMP) 2 和 MMP-9 是基质金属蛋白酶基因家族中的 2 个成员,它们在脑血管疾病中的作用已经引起国内外研究人员的注意。目前资料认为: MMP-2 和 MMP-9 属于含锌的中性蛋白酶,可由血管内皮细胞、星状细胞及小胶质细胞分泌,在入侵的中性粒细胞和 T 细胞内也有储存^[3]。二者在体内均以无活性的前体形式存在,位于活性中心的 Zn^{2+} 对酶原的稳定起重要作用,脑卒中所引发纤溶酶瀑布反应正是通过对锌位点的干扰而引起酶原的自我裂解、活化^[2, 4]。活化后的 MMP-2 和 MMP-9 可选择性水解毛细血管壁基底膜的主要蛋白成分(如Ⅲ型胶原、层粘蛋白、纤维结合素及弹性蛋白等),从而使血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的完整性遭到破坏,引起脑水肿和炎性细胞浸润等一系列病理过程。

本实验观察了脑出血后 MMP-2 和 MMP-9 的活性变化规律,发现脑出血后 6 h 即有 MMP-9 表达, 24 h 达高峰($P < 0.01$),此后渐减,直到第 10 天仍有活性($P < 0.05$),但 15 天时不再表达。而 MMP-2 在脑出血后 24 h 开始表达($P < 0.05$),到第 6 天仍维持在较高水平($P < 0.01$),直到 15 天时仍有活性($P < 0.05$)。由此可以看出这两个因子表达的时间不同, MMP-9 的表达早于 MMP-2,即它们在脑出血后病理过程中发挥作用的时间不同。目前大量的动物实验已经证实:大鼠脑出血后 6 h 即发生脑水肿, 24~ 72 h 达高峰,6 天时基本恢复正常。Rosenberg 等^[4]采用胶原酶诱导大鼠脑出血实验表明:脑出血后 24~ 48 h,血肿周围脑组织含水量和 MMP-9 的含量均显著增加, MMP-9 的抑制剂 BB1101 可明显减轻脑含水量及含钠量。Romanic 等^[5]对经过大脑中动脉永久性结扎(permanent middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠研究也发现: MMP-9 在 MCAO 后 12 h 即明显表达于缺血灶周围的内皮细胞和中性粒细胞;而 MMP-2 的表达较晚,主要出现于缺血灶周围的巨噬细胞;且 MMP-9 的中和单克隆抗体可以明显减少梗死面积(约 30%)。由此可以推测, MMP-9 主要与急性期脑水肿的形成有关,而 MMP-2 与脑水肿后的

炎性反应关系更为密切。

脑出血也引发了炎症反应,出血区周围组织中趋化的白细胞分泌金属蛋白酶并向损伤区转移^[6, 7]。首先血管内皮细胞和中性粒细胞大量分泌 MMP-9,随后巨噬细胞在向出血区组织趋化的过程中主要分泌 MMP-2;另外,大鼠脑出血后血液中的某些成份^[8, 9]激活纤溶酶,而活化的纤溶酶可以水解上述基质金属蛋白酶活性中心内半胱氨酸左侧的肽,影响了半胱氨酸与 Zn^{2+} 结合的稳定性,从而引起酶原的自我裂解,最终活化并通过对血脑屏障基底膜成份的选择性蛋白水解而起作用。

综上所述: MMP-9 早期在内皮细胞和中性粒细胞的表达对增加血管的通透性、BBB 的完整性遭到破坏、白细胞浸润起重要作用;而 MMP-2 和 MMP-9 在吞噬细胞的迟表达,可能不仅有助于其侵入破坏灶,同时也促进卒中后创伤组织的修复及细胞碎片的清除。另外,从作用时程上也可以看出: MMP-9 的活化与脑水肿的形成相关,而 MMP-9 参与脑水肿后细胞的破坏及修复过程。可以考虑通过对这两个因子进行干预从而为脑出血的治疗增加新的途径。

[参考文献]

- [1] 田力, 滕伟禹, 何平. 大鼠脑出血后 MMP-9 的表达与脑含水量变化的关系[J]. 中国医科大学学报, 2005, 34 (3): 126
- [2] Yang CY. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats[J]. *J Neurosurg*, 1994, 8 (11): 81-93
- [3] Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation[J]. *Glia*, 2002, 8 (39): 279-283
- [4] Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12 (23): 833-842
- [5] Romanic AM, White RF, Arketh AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression after cerebral focal ischemia in rats inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size[J]. *Stroke*, 1998, 8 (29): 1 020-030
- [6] Iijima T, Minami Y, Nakamura N, Onizuka M, Morishita Y, Inadome Y, et al. MMP-2 activation and stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma: analysis of MMP-2 and MMP-9 with gelatin zymography[J]. *Pathol Int*, 2004, 54 (5): 295-301
- [7] Gary A, Rosenberg MD, Milo Navratil. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat[J]. *Neurology*, 1997, 11 (48): 921-926
- [8] Asahi M, Sumii T, Fini ME, Itohara S, Lo EH. Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia[J]. *Neuroreport*, 2001, 12 (13): 3 003-007
- [9] Guohua XI, Richard F, Julian TH. 脑出血后脑水肿的形成机制[J]. 脑血管疾病杂志, 2001, 1 (2): 99-106

(此文编辑 朱雯霞)