

· 临床论著 ·

MMP-9 及其抑制剂 TIMP-1 与多发性硬化活动相关性研究

耿会娟 王雅杰 伊正君 康熙雄

【摘要】 目的 探讨血清和脑脊液中基质金属蛋白酶(MMP)-9及其抑制剂金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-1与多发性硬化发病及疾病活动的相关性。方法 本实验共分四组:多发性硬化组、神经系统炎性疾病(OIND)组、神经系统非炎性疾病(NIND)组和健康人群组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清MMP-9、血清和脑脊液中TIMP-1的表达水平;采用酶谱法检测脑脊液中MMP-9水平;以MRI检查为多发性硬化疾病活动性判断标准,分析比较多发性硬化活动组和非活动组MMP-9及TIMP-1水平。结果 多发性硬化组血清MMP-9水平显著高于NIND组($P < 0.05$)和健康人群组($P < 0.001$),血清TIMP-1水平显著低于OIND组($P < 0.001$)、NIND组($P < 0.001$)和健康人群组($P < 0.001$);多发性硬化组脑脊液中MMP-9水平高于NIND组($P < 0.05$),脑脊液中TIMP-1水平显著低于OIND组($P < 0.05$);多发性硬化活动期患者血清MMP-9水平、MMP-9/TIMP-1比值分别显著高于非活动期(P 均 < 0.05),活动期血清TIMP-1水平与非活动期无统计学差异。结论 检测血清和脑脊液中MMP-9及TIMP-1水平对多发性硬化疾病活动性的监测有一定参考价值。

【关键词】 多发性硬化; 基质金属蛋白酶9; 金属蛋白酶1组织抑制剂

Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 correlates with disease activity in multiple sclerosis GENG Hui-juan, WANG Ya-jie, YI Zheng-jun, KANG Xi-xiong. Department of Clinical Laboratory, Weifang Medical College Affiliated Hospital, Weifang 261031, China
Corresponding author: KANG Xi-xiong, Email: kangxx@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To assess serum and cerebrospinal fluid (CSF) levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 of multiple sclerosis (MS) patients, and explore the association with disease active stage. **Methods** Four groups of subjects were tested: MS, other inflammatory neurological disorders (OIND), non-inflammatory neurological disorders (NIND) and health control (HC). MMP-9 of serum and TIMP-1 of serum and CSF were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); The levels of MMP-9 of CSF were measured by gelatin-substrate zymography. **Results** Serum MMP-9 concentrations were higher in MS than in NIND and in HC ($P < 0.05$, < 0.001 , respectively), Serum TIMP-1 concentrations were lower in MS than in NIND, in OIND and in HC ($P < 0.001$, < 0.001 , < 0.001 , respectively). CSF mean levels of MMP-9 were more elevated in MS than in NIND ($P < 0.05$), CSF mean levels of TIMP-1 were lower in MS than in OIND ($P < 0.05$). Serum MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio mean levels were increased in MS patients with MRI disease activity compared to patients with non-active disease ($P < 0.05$, < 0.05 , respectively). The differences of serum mean concentrations of TIMP-1 between MS patients with MRI disease activity and patients with non-active disease did not reach statistical significance. **Conclusion** To investigate serum and CSF levels of MMP-9 and TIMP-1 is valuable in assessing disease activity of MS.

【Key words】 Multiple sclerosis; Matrix metalloproteinase 9; Tissue inhibitor of metalloproteinase -1

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.11.102

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才队伍建设专项经费(2011-3-038);首都医科大学基础临床科研合作基金(11JL07)

作者单位:261031 山东省潍坊医学院附属医院检验科(耿会娟、伊正君);首都医科大学附属北京天坛医院临床医学研究实验室(王雅杰),实验诊断中心(康熙雄)

通讯作者:康熙雄,Email:kangxx@vip.sina.com

多发性硬化(multiple sclerosis)是一种以中枢神经系统(central nervous system)炎性脱髓鞘为特征的疾病。多发性硬化确切的病因及发病机制尚不清楚,但目前认为多发性硬化炎性病发生的关键是活化 $CD4^+$ T淋巴细胞穿过血脑屏障进入中枢神经系统^[1]。许多研究表明基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是引起多发性硬化血脑屏障破坏, T淋巴细胞浸润以及髓鞘降解的重要因素^[2], 目前MMPs尤其是MMP-9与其组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)-1二者免疫失衡在国外多发性硬化的发病研究中越来越受到重视。本研究检测多发性硬化患者血清和脑脊液中MMP-9与TIMP-1水平,并观察二者与多发性硬化发病及疾病活动的相关性。

资料与方法

一、研究对象和分组

1. 多发性硬化观察组:北京天坛医院神经内科住院上呼吸道诱发多发性硬化发病的患者,均符合McDonald等^[3]2001年提出的多发性硬化诊断标准。且在纳入此项研究前至少3个月未用激素、免疫抑制剂或免疫调节剂治疗,无全身性疾病。收集患者的血清及脑脊液各62份,其中男16例,女46例,平均年龄31.8岁(7~60岁),病程波动于7d至11年,平均27.02个月。以MRI静脉注射GD-DTPA后病灶是否出现强化为多发性硬化疾病活动性判断标准,把患者分为活动性36例,非活动性26例。

2. 对照组:总共3组。(1)其他神经系统炎症性疾病(OIND)组:80例,包括56例病毒性脑膜炎患者和24例细菌性脑膜炎患者;(2)神经系统非炎症性疾病(NIND)组:60例,包括24例癫痫、6例睡眠障碍、18例静脉血栓形成、12例头痛;(3)正常对照组:70例健康体检者,其中男20例,女50例,平均年龄34.1岁(10~63岁),此组未进行脑脊液检测。

二、研究方法

1. 标本采集:所有研究对象均签署知情同意后采肘静脉血4ml,同步行腰穿抽取多发性硬化患者及对照组脑脊液3ml, $1500 \times g$ 离心5min,取上清液分装于3个分离管内, -80°C 冻存待测。

2. MRI扫描检查:应用3.0T磁共振扫描仪(GE公司),62例多发性硬化患者均行静脉注射Gd-DTPA(0.1mmol/kg体重)增强扫描,其中36例多发性硬化患者呈现强化病灶,26例患者未见明显异常强化病灶。

3. 酶联免疫吸附试验(ELISA):(1)试剂:人MMP-9 ELISA试剂盒购自美国R&D公司;TIMP-1试剂盒购自美国GE公司。(2)仪器:Humareader酶标仪,

德国Human公司。(3)所有ELISA标本的检测完全按照试剂盒提供的操作方法和步骤完成。

4. 酶谱法(zymography):参照文献^[4],采用酶谱法检测脑脊液中明胶酶MMP-9的活性。

三、统计学分析

采用SPSS 11.5软件分析系统,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对多发性硬化患者、OIND组、NIND组和HC组的测量指标进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对多发性硬化患者行MRI强化检查分为活动组和非活动组的测量数值进行独立样本 t 检验。相关性分析采用直线相关分析。

结果

一、多发性硬化患者与对照组的血清和脑脊液中MMP-9及TIMP-1水平(表1)

多发性硬化组血清MMP-9水平显著高于NIND组($P < 0.05$)和正常对照组($P < 0.001$),血清TIMP-1水平显著低于OIND组($P < 0.001$)、NIND组($P < 0.001$)和正常对照组($P < 0.001$);多发性硬化组脑脊液中MMP-9水平高于NIND组($P < 0.05$),脑脊液中TIMP-1水平显著低于OIND组($P < 0.001$)。

二、依据MRI所示疾病活动性分组比较多发性硬化患者血清和脑脊液MMP-9及TIMP-1水平(表2)

MRI示病情活动性的多发性硬化患者血清MMP-9水平[(796.84 \pm 266.09)ng/ml]显著高于非活动性多发性硬化患者[(479.44 \pm 122.86)ng/ml, $P < 0.05$],脑脊液中MMP-9水平高于非活动性多发性硬化患者,无统计学意义。血清和脑脊液TIMP-1水平病情活动性的多发性硬化患者较低,差异无统计学意义。另外, MRI示病情活动性的多发性硬化患者血清MMP-9/TIMP-1比值(6.31 \pm 2.97)显著高于非活动性多发性硬化患者(3.48 \pm 1.72, $P < 0.05$)。依据MRI所示疾

表1 多发性硬化患者、OIND、NIND和正常对照组的血清和脑脊液中MMP-9及TIMP-1水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MMP-9	TIMP-1
多发性硬化组	血清	62 636.84 \pm 269.38 ^{bd}	157.91 \pm 55.70 ^{acd}
	脑脊液	62 202.46 \pm 7.1 ^b	212.71 \pm 35.73 ^a
OIND组	血清	80 628.17 \pm 147.45	245.29 \pm 83.44
	脑脊液	80 201.08 \pm 7.9	374.97 \pm 83.49
NIND组	血清	60 442.49 \pm 173.38	242.29 \pm 55.18
	脑脊液	60 194.62 \pm 7.8	205.81 \pm 23.08
正常对照组	血清	70 345.72 \pm 72.52	208.31 \pm 30.69

注:脑脊液MMP-9水平单位为灰度值,其他单位为ng/ml;与OIND组比较,^a $P < 0.001$;与NIND组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.001$;与正常对照组比较,^d $P < 0.001$

表 2 活动性和非活动性多发性硬化患者组血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数		MMP-9	TIMP-1
Gd ⁺ 多发性硬化组	36	血清	796.84 ± 266.09	151.98 ± 55.70
		脑脊液	232.46 ± 9.1	182.61 ± 37.33
Gd ⁻ 多发性硬化组	26	血清	479.44 ± 122.86 ^a	159.29 ± 72.66
		脑脊液	189.09 ± 9.9	224.97 ± 84.41

注:脑脊液 MMP-9 水平单位为灰度值,其他单位为 ng/ml;与 Gd⁺ 多发性硬化组比较,^a $P < 0.05$

病活动性分组,Gd⁺ 表示 MRI 增强扫描呈现强化病灶组,Gd⁻ 表示未见明显强化病灶组。

三、多发性硬化患者血清和脑脊液中 MMP-9 及 TIMP-1 水平相关性分析

多发性硬化患者血清中 MMP-9 及 TIMP-1 水平相关性分析, $r = -0.632, P = 0.004 < 0.05$;脑脊液中 MMP-9 及 TIMP-1 水平相关性分析, $r = -0.582, P = 0.006 < 0.05$,均有统计学意义。

讨 论

多发性硬化是一种 T 细胞介导的慢性炎症性脱髓鞘性疾病,多发性硬化确切的病因及发病机制迄今尚不明确。目前研究认为 MMPs 与多发性硬化关系密切,可能 MMPs 降解血管基底膜 IV 型胶原使血脑屏障破坏,T 细胞穿过血脑屏障,进入中枢神经系统,参与炎症脱髓鞘反应。MMP-9 被认为在多发性硬化的血脑屏障的破坏和免疫学的病理过程中起着比较重要的作用^[2]。

本研究发现多发性硬化组血清和脑脊液中 MMP-9 水平较对照组升高,TIMP-1 水平较对照组降低,表明多发性硬化患者血清和脑脊液中 MMP-9、TIMP-1 水平及二者的免疫平衡发生了较大变化,这可能是多发性硬化患者 MMP-9 与其唯一的内源性组织抑制剂 TIMP-1 免疫失衡,导致 MMP-9 的表达增加^[5-6],从而引起 T 淋巴细胞等炎性细胞穿过受损的血脑屏障进入中枢神经系统,可能进一步引起髓鞘的降解^[7],导致多发性硬化的发病。

多发性硬化活动性病灶于 MRI 增强扫描呈现强化,其机制与多发性硬化急性期病变血管周围炎性改变,血脑屏障破坏,血管通透性升高,引起造影剂外渗有关。有报道认为,MRI 对比增强程度主要与巨噬细胞浸润程度有关,而巨噬细胞浸润程度则与 MMPs(主要是 MMP-9)水平升高、血脑屏障破坏有关。我们本次研究以 MRI 静脉注射 GD-DTPA 后病灶是否出现强化为判断多发性硬化疾病活动性的标准,多发性硬化活动期患者血清 MMP-9 水平显著高于非活动期($P <$

0.05),而且活动期患者较非活动期患者 TIMP-1 水平略低,说明多发性硬化急性发作期血清 MMP-9 水平、TIMP-1 水平与患者的疾病活动性有关^[8],与国外研究结果相一致。而且血清 MMP-9 与 TIMP-1 水平呈负相关($r = -0.632, P = 0.004 < 0.05$)。活动期多发性硬化患者与非活动期相比,脑脊液中 MMP-9 水平略高,TIMP-1 水平较低,差异无统计学意义,原因可能是脑脊液样本量少,但结果仍提示多发性硬化患者脑脊液中 MMP-9 与 TIMP-1 水平亦呈负相关($r = -0.582, P = 0.006 < 0.05$),脑脊液中 MMP-9 水平升高且与多发性硬化新病灶的形成有关。

我们的研究结果中,更让我们感兴趣的是,多发性硬化患者血清 MMP-9/TIMP-1 比值显著高于非活动期($P < 0.05$),这说明多发性硬化患者体内 MMP-9、TIMP-1 水平是一个可受内外因素调节的动态变化过程^[9],随着病情变化其水平也在动态变化,而且血清 TIMP-1 水平的下降可能加强了血清 MMP-9 对血脑屏障的破坏,促使活化 T 淋巴细胞穿过受损的血脑屏障进入中枢神经系统并破坏髓鞘^[10]。临床上外周血较脑脊液更容易采集,因此血清 MMP-9/TIMP-1 比值可能是反映的多发性硬化疾病活动性的更适合的候选免疫学指标之一。

本研究结果提示了多发性硬化发病时,患者体内 MMP-9、TIMP-1 参与了多发性硬化的发病且与病情活动性关系密切。同时,本研究结果还需国内更多的研究予以证实,所提供的资料可作为进一步开展多发性硬化病程中 MMP-9、TIMP-1 的演变规律研究或临床治疗效果以及预后的评估试验设计的依据,对临床工作有一定参考价值。

参 考 文 献

- [1] Martino GV, Adorini L, Rieckmann P, et al. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol*, 2002, 1: 499-509.
- [2] Opdenakker G, Nelissen I, Van Damme J. Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2003, 2: 747-756.
- [3] McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2001, 50: 121-127.
- [4] Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N Jr, et al. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology*, 1996, 46: 1626-1632.
- [5] Boz C, Ozmenoglu M, Velioglu S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta. *Clin Neurol Neurosurg*, 2006, 108: 124-128.
- [6] 刘喷颺, 张星虎, 刘伟, 等. 多发性硬化患者病情演变与血浆和脑脊液基质金属蛋白酶-9 水平的相关性. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2010, 17: 327-330.
- [7] Sato W, Tomita A, Ichikawa D, et al. CCR2(+) CCR5(+) T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogene-

- sis of multiple sclerosis. *J Immunol*, 2012, 189:5057-5065.
- [8] Benesová Y, Vasku A, Novotná H, et al. Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2009, 15:316-322.
- [9] Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo MI, de las Heras V, et al. Neutralizing antibodies, MxA expression and MMP-9/TIMP-1 ratio as markers of bioavailability of interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients: a two-year follow-up study. *Eur J Neurol*, 2010, 17:470-478.
- [10] Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2006, 12:294-301.

(收稿日期:2013-03-15)

(本文编辑:戚红丹)

耿会娟,王雅杰,伊正君,等. MMP-9及其抑制剂 TIMP-1与多发性硬化活动相关性研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(11):4816-4819.

