

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00778

金属蛋白酶 9 在隐球菌性脑膜炎小鼠模型脑组织中的表达

徐赤宇^{1,2}, 温 海^{1*}, 朱红梅¹

- 1. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003
- 2. 解放军第 210 医院皮肤科, 大连 116021

[摘要] 目的: 观察基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在鼠脑组织中的表达并探讨其意义。方法: 雌性 C₅₇BL/6 小鼠行股静脉插管后实验各组分别注入新生隐球菌菌悬液以及菌悬液加抑肽酶, 8 h 后应用免疫组织化学技术检测 MMP-9 在小鼠脑组织中的表达情况; 同时观测小鼠脑组织匀浆后菌落计数(CFU), 并与免疫组织化学结果进行对照分析。结果: 注入新生隐球菌菌悬液小鼠脑组织中的 MMP-9 显著升高, 与正常对照组比较, 有显著统计学差异($P < 0.01$); 菌悬液加抑肽酶小鼠脑组织中 MMP-9 与正常对照组比较无明显统计学差异($P > 0.05$); MMP-9 的染色强度与小鼠脑组织中的菌体负荷量正相关。结论: 隐球菌性脑膜炎小鼠脑组织中存在 MMP-9 过表达, MMP-9 可能导致血脑屏障开放程度提高。

[关键词] 隐球菌性脑膜炎; 基质金属蛋白酶-9; 抑肽酶; 免疫组织化学

[中图分类号] R 37-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0778-03

Expression of MMP-9 in brain tissue of mouse cryptococcal meningitis model

XU Chi-yu^{1,2}, WEN Hai^{1*}, ZHU Hong-mei¹

- 1. Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
- 2. Department of Dermatology, No. 210 Hospital of PLA, Dalian 116021

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the expression of MMP-9 in mouse brain tissue and its significance. **Methods:** *Cryptococcus suspension* alone (fungal suspension group) or combined with aprotinin (aprotinin group) was injected in to female C₅₇BL/6 mice via femoral vein cannulation. The expression of MMP-9 was examined immunohistochemically 8 h later. Meanwhile, the mouse brain tissue homogenate colony count (CFU) was observed and the results were compared with that of the immunohistochemical examination. **Results:** The expression of MMP-9 was markedly increased in the fungal suspension group compared with the normal control group ($P < 0.01$); the expression in the aprotinin group was not significantly different from that of the normal control group ($P > 0.05$). The amount of cryptococcosis in the brain tissue was positively correlated with expression of MMP-9. **Conclusion:** MMP-9 is overexpressed in the brain of mice with *Cryptococcal meningitis*; MMP-9 might lead to increased permeability of blood brain barrier.

[KEY WORDS] *Cryptococcal meningitis*; matrix metalloproteinase-9; aprotinin; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 778-780]

金属蛋白酶(MMPs)被认为在中枢神经系统炎症反应过程中是增加血脑屏障(BBB)开放的重要因素。目前研究表明机体产生的血清丝氨酸蛋白酶能够诱导激活血管内皮细胞中 MMP 导致基底膜的降解^[1]。新生隐球菌如何穿越 BBB 引起中枢神经系统致病的机制一直不甚清楚。笔者前期实验已证实, 新生隐球菌在培养过程中分泌物胞外蛋白水解

酶也含有丝氨酸蛋白酶成分, 而且与菌株的毒力相关^[2-4]。本研究探究在隐球菌脑膜炎小鼠模型中 MMP-9 的表达情况, 及胞外蛋白水解酶和(或)丝氨酸蛋白酶等对 BBB 通透性的影响作用。

1 材料和方法

1.1 材料 血清型为 B 型新生隐球菌标准菌株,

[收稿日期] 2007-12-07 **[接受日期]** 2008-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30471566, 30500441); 大连市科研技术项目[大卫科发(2007)73 号]. Supported by National Natural Science Foundation of China(30471566, 30500441), Technique Project of Dalian(Health Project 2007-73).

[作者简介] 徐赤宇, 博士, 主治医师. E-mail: dr_xuchiyu@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73431, E-mail: wenhai98@sohu.com

CZBLS49系前期实验^[2-3]已证实丝氨酸蛋白酶表达最高的菌株(比利时热带病研究所赠送),菌悬液浓度至 1×10^7 CFU/ml。

1.2 动物 购买C₅₇BL/6小鼠,6~8周龄78只,雌性,体质量18~22 g(中国科学院实验动物中心提供,SPF级)。

1.3 仪器和试剂 倒置相差显微镜(日本OLYMPUS公司)、Leica2035切片机(德国)、酶联免疫检测仪(Bio-Rad公司)、CM1900恒温冰冻切片机(德国Leitz)、抑肽酶(Aprotinin, Sigma公司)、基质金属蛋白酶-9抗体(rabbit anti-rat MMP-9, Peprotech公司)。

1.4 新生隐球菌感染小鼠模型的建立 C₅₇BL/6小鼠随机分成3组,正常对照组6只,实验组和抑制剂对照组均36只。实验组用乙醚麻醉后,将小鼠固定,切开右下肢内侧皮肤,行右股静脉插管,连于加入肝素的生理盐水注射器防止血液凝固,然后经右股静脉缓慢推 5×10^6 /ml菌悬液0.2 ml;抑制剂组经右股静脉缓慢推加入0.8 mU抑肽酶的 5×10^6 /ml菌悬液0.2 ml;正常对照组经右股静脉缓慢推生理盐水1 ml。

1.5 检测方法 MMP-9的检测采用免疫组化SP法。按过氧化物酶标记的链霉素亲和素(SP)染色试剂盒步骤进行。正常组的50%分别做免疫组化和细菌培养和计数,其他组随机各取10只在8 h后用100 ml 0.9%氯化钠灌注取全脑,制备全脑组织恒温冰冻箱连续切片,用免疫组织化学技术检测MMP-9在各组脑组织中分布情况。

1.6 结果判定 参照文献^[5]MMP-9以胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。染色强度按染色弱但明显强于阴性对照者为1分,染色清晰者为2分,染色强者为3分;阳性细胞占总细胞数的10%~50%者为2分,51%~80%者为3分,>80%者为4分。上述两项评分相加,不管其染色强度,只要阳性细胞数<10%者为(-),弱阳性表达(+)为3分,阳性表达(++)为4~5分,强阳性表达(+++)为6~7分。

1.7 菌落形成单位的观察 其余的52只小鼠分别在0.5、1、3、6 h时用500 ml 0.9%氯化钠整体灌注取全脑,分别取各组小鼠的脑组织0.5 g置组织研磨器中,加入1 ml生理盐水匀浆,倾入并均匀涂布于沙堡培养基(SDA)中培养,4 d后计数菌落形成单位(CFU)。观察MMP-9的染色强度与小鼠脑组织中的菌体负荷量是否相关。

1.8 统计学处理 应用SPSS 11.0统计学软件进行 χ^2 检验和Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 MMP-9在各组脑组织和正常脑组织中的表达 正常对照C₅₇BL/6小鼠脑组织未见任何阳性信号。实验组表达增强,阳性信号主要分布于脑组织锥体细胞和小胶质细胞质,呈现棕黄色颗粒或块状,围绕胞核分布,局限胞质内;微血管壁周围,呈现棕黄色颗粒或块状(图1A)。抑制剂对照组表达减弱,阳性信号主要分布于脑组织中微血管壁,少量见于脑组织内,呈现棕黄色颗粒或块状(图1B);实验组阳性表达率及阳性表达强度与对照组比较差异均有统计学意义($\chi^2=51.32, P<0.01$)。

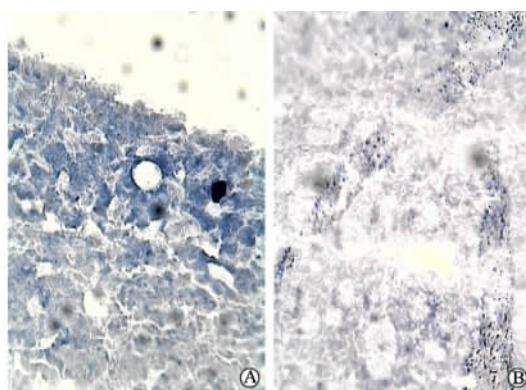


图1 实验组(A)和对照组(B)MMP-9高表达
Fig 1 High expression of MMP-9 in experimental group(A) and control group(B)
immunohistochemistry staining, DAB

A: The staining is strong and diffused; B: The staining is moderate and diffused. Original magnification: $\times 100$

2.2 不同时相点CFU结果 无论实验组和对照组,小鼠脑组织匀浆后培养都产生了CFU。但是实验组各个时间点的CFU明显比对照组多(表1)。

2.3 脑组织中MMP-9表达和CFU的相关分析 经Spearman等级相关分析发现,只有实验组脑组织中MMP-9与小鼠脑组织匀浆后培养产生的CFU呈正相关($r=0.9827, P<0.01$)。

3 讨论

研究表明MMPs参与中枢神经系统炎症反应过程中的BBB和血-神经屏障(blood-nerve barrier, BNB)的开放^[6]。MMP是一组含 Zn^{2+} 、几乎能降解除多糖以外的全部细胞外基质(ECM)的蛋白酶,至今共发现16种MMP,构成MMPs超家族。一种MMP激活后可使别的MMPs激活,形成瀑布效应,其中MMP-9与BBB通透性关系最密切。因为

表 1 在不同干预因素下脑组织带菌量比较

Tab 1 Colony count in brain tissues of different groups

(n=120, $\bar{x} \pm s, \times 10^3$ CFU)

Group	0.5 h	1 h	3 h	6 h
Experiment	227.07±196.89	261.73±225.82	468.93±243.14* [*] △△	430.07±238.04* [*] △
Control	174.93±154.22	246.33±217.27	360.07±215.55	405.07±225.64

* P<0.05, ** P<0.01 vs 0.5 h experiment group; △P<0.05, △△P<0.01 vs 1 h experiment group

MMP-9 是明胶酶的代表酶,主要底物包括明胶,胶原 IV、V、Ⅶ、X、XI,弹性蛋白,微纤维蛋白,层粘连蛋白,骨连蛋白。脑微血管基底膜的主要成分为胶原 IV 型、层粘连蛋白、微纤维蛋白,因此 MMP-9 的激活可导致基底膜的降解^[1]。Leib 等^[6]通过大鼠细菌性脑膜炎模型的研究发现 MMPs 参与了神经系统感染。当注入脑膜炎球菌后 20 h 编码 MMP-3、7、8、9 的 mRNA 表达较对照组明显升高,而 MMP-2 的表达下调。Leppert 等^[7]通过细菌性脑膜炎的临床研究认为 CSF 中有较高水平 MMP-9 的患者都出现了听力损害和继发性癫痫等神经功能缺失。研究表明机体产生的血清丝氨酸蛋白酶能够诱导激活血管内皮细胞中 MMP 导致基底膜的降解^[1]。推测丝氨酸蛋白酶上调了主要 MMP 的表达,导致构成 BBB 成分降解,从而提高了 BBB 的通透性。

实验中观察到当通过股静脉插管注入新生隐球菌悬液 8 h 后,C₅₇BL/6 小鼠脑组织冰冻切片证实 MMP-9 蛋白在脑组织中表达明显增高;加入抑制剂组的 MMP-9 蛋白表达降低减弱。同时根据脑组织匀浆后培养发现真菌的 CFU 在不同组有明显的差异,在相同时间段 MMP-9 的染色强度与小鼠脑组织中的菌体负荷量密切正相关。根据实验结果推测出可能新生隐球菌通过激活 MMP-9 蛋白等金属蛋白酶,引起构成 BBB 的基底膜成分的降解和破坏,进而引起 BBB 通透性的增加。

因此,我们推论新生隐球菌可能通过自身分泌的胞外蛋白酶类和(或)丝氨酸蛋白酶来激活 MMP-9,形成瀑布效应,其他相应的金属蛋白酶也被激活,进而迅速降解脑组织中构成 BBB 的脑微血管内皮细胞的细胞外基质,脑组织中存在 MMP-9 的阳性表达与 BBB 开放程度有密切关系。抑制 MMPs 已

经被选择作为治疗各种肺部感染性疾病的方法^[8]。因此针对新生隐球菌性脑膜炎的致病机制和今后展望性治疗措施,能否通过抑制隐球菌胞外蛋白水解酶和(或)丝氨酸蛋白酶的分泌,调控金属蛋白酶的表达来治疗隐球菌性脑膜炎,尚待进一步研究。

[参考文献]

[1] Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C A, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke[J]. Stroke, 2001, 32: 2762-2767.
 [2] 徐赤字, 温海, 王溪涛, 朱红梅, 顾菊林, 徐红. 新生隐球菌胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶活性检测[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 125-128.
 [3] 徐赤字, 温海, 王溪涛, 朱红梅, 顾菊林, 徐红. 细胞芯片检测新生隐球菌菌株丝氨酸蛋白酶的表达[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 129-132.
 [4] 徐赤字, 温海, 王溪涛, 朱红梅, 顾菊林, 徐红. 抑肽酶对新生隐球菌毒力的影响[J]. 临床皮肤科杂志, 2006, 35: 137-139.
 [5] Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenacker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical[J]. Cancer Res, 2000, 60: 4693-4696.
 [6] Leib S L, Leppert D, Clements J, Täuber M G. Matrix metalloproteinase contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis[J]. Infect Immun, 2002, 68: 615-620.
 [7] Leppert D, Hughes P, Huber S, Erne B, Grygar C, Said G, et al. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy[J]. Neurology, 1999, 53: 62.
 [8] Greenlee K J, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted[J]. Physiol Rev, 2007, 87: 69-98.

[本文编辑] 尹茶