

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01193

缺血再灌注损伤大鼠脑组织 MMP-2、MMP-9 动态变化与脑水肿改变

焦海霞^{1,2}, 王 萍¹, 马 腾¹, 薛一雪^{1*}

1. 中国医科大学基础医学院神经生物学教研室, 沈阳 110001

2. 福建医科大学基础医学院生理学与病理生理学系生理学教研室, 福州 350004

[摘要] **目的** 探讨发生脑缺血再灌注损伤时 MMP-2、MMP-9 表达和活性的变化规律及应用强力霉素后脑水肿的变化。**方法** 大脑中动脉线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型, 根据再灌注时间不同分为再灌注 3、6、12、24、72、120 h 组及假手术组。应用干湿重法测定强力霉素干预后缺血侧脑半球含水量的变化, 应用蛋白质印迹法检测缺血侧脑组织 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达变化, 应用明胶酶谱法检测缺血侧脑组织 MMP-2 和 MMP-9 活性变化。**结果** MMP-2 在脑缺血再灌注 3 h 和 120 h 表达和活性升高 ($P < 0.01$); MMP-9 在脑缺血再灌注 6 h 表达和活性开始升高 ($P < 0.01$), 到再灌注 24 h 达到峰值, 再灌注 120 h 降至正常水平 ($P > 0.05$); 脑缺血再灌注大鼠各时间点缺血侧脑半球含水量与假手术组相比皆升高, 并且随着再灌注时间延长持续升高; 应用强力霉素大鼠缺血侧脑半球含水量与同时点生理盐水组相比降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** MMP-2 和 MMP-9 降解细胞外基质引发血管源性脑水肿, MMP-2 和 MMP-9 的表达及其活性在脑缺血再灌注 120 h 内的交替变化可能会影响脑水肿的发展。

[关键词] 脑缺血; 再灌注损伤; 基质金属蛋白酶; 脑水肿; 强力霉素

[中图分类号] R 743 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1193-05

Changes of MMP-2, MMP-9 contents in cerebral tissues and cerebral edema in cerebral ischemia-reperfusion rats

JIAO Hai-xia^{1,2}, WANG Ping¹, MA Teng¹, XUE Yi-xue^{1*}

1. Department of Neurobiology, College of Basic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

2. Department of Physiology and Pathophysiology, College of Basic Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and activation of MMP-2, MMP-9 in cerebral tissues of cerebral ischemia-reperfusion rats and the effects of doxycycline on the cerebral edema. **Methods** Cerebral ischemia-reperfusion model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). The rats were randomly divided into a sham-operated and 6 reperfusion groups according to different reperfusion periods (3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 72 h, and 120 h groups). Dry weight method was used to evaluate hemispheric water content of the ischemic side after treatment with doxycycline. Western blotting analysis and Gelatin zymography were used to determine the expression and activity of MMP-2 and MMP-9 in the ischemic cerebral tissues. **Results** The protein expression and activity of MMP-2 were significantly increased in the ischemia tissue at 3 h and 120 h after reperfusion ($P < 0.01$); the protein expression and activity of MMP-9 began to increase at 6 h after reperfusion ($P < 0.01$), reached the peak at 24 h, and then returned to the basal levels at 120 h after reperfusion ($P > 0.05$). The hemispheric water content of the ischemic side gradually increased with reperfusion periods compared with the sham-operated group. Doxycycline significantly reduced the hemispheric water contents compared with the normal saline at the same time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** MMP-2, MMP-9 can induce vasogenic brain edema by degrading basal membrane of capillary vessel. The alteration of MMP-2, MMP-9 expression and activities are likely associated with brain edema during cerebral ischemia-reperfusion.

[收稿日期] 2010-07-15 **[接受日期]** 2010-09-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30872656, 30973079), 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20092104110015), 沈阳市科学技术计划项目(1091175-1-01, 1081266-9-00), 福建省自然科学基金(C0610022). Supported by National Natural Science Foundation of China(30872656, 30973079), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(20092104110015), Program of Science and Technology Program of Shenyang Municipality (1091175-1-01, 1081266-9-00), and Natural Science Foundation of Fujian Province (C0610022).

[作者简介] 焦海霞, 硕士, 讲师. E-mail: haixiaj@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 024-23256666, E-mail: xueyixue888@yahoo.com.cn

[Key words] brain ischemia; reperfusion injury; matrix metalloproteinases; brain edema; doxycycline

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11): 1193-1197]

缺血性脑血管病发生后,迅速进行溶栓是治疗成功的前提和基础^[1]。但溶栓治疗容易引起脑水肿,对脑组织造成继发性损伤,即脑缺血再灌注损伤^[2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组 Zn^{2+} 依赖性蛋白水解酶家族,研究表明脑缺血再灌注伴有 MMP-2(明胶酶 A, 72 000)和 MMP-9(明胶酶 B, 92 000)活性表达变化^[3],两者降解脑血管基底膜Ⅳ胶原蛋白、层粘连蛋白和纤连蛋白等,与脑微血管通透性增加、炎性细胞侵入和脑水肿发生密切相关^[4]。但研究认为两者在再灌注的不同时期分别发挥各自作用,并且关于两者的表达活性变化时间,各研究结果并不一致^[5-6]。因此,本研究利用局灶性脑缺血再灌注模型,同时检测再灌注 120 h 内 MMP-2 和 MMP-9 表达及其活性,探讨发生脑缺血再灌注损伤时 MMP-2 和 MMP-9 的动态变化规律及其与脑水肿之间的关系。同时,本研究观察给予大鼠 MMPs 广谱抑制剂强力霉素后脑水肿变化情况,进一步阐述 MMP-2 和 MMP-9 对脑水肿的影响。

1 材料和方法

1.1 制备局灶性脑缺血再灌注大鼠模型 SD 成年大鼠由中国医科大学实验动物中心提供,雄性,清洁级,体质量 280~320 g。参照 Longa 大鼠中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制备局灶性脑缺血再灌注大鼠模型^[7],栓塞成功后固定尼龙线,2 h 后拔出尼龙线进行再灌注。大鼠清醒后观察神经行为学改变,参考 Zea Longa 评分法^[7]: 0 分为无明显神经功能缺失症状;1 分为不能完全伸展对侧前爪;2 分为爬行时向对侧转圈;3 分为行走时身体向偏瘫侧倾倒;4 分为不能自发行走,意识障碍;5 分为死亡。大鼠手术清醒后用单盲法进行评分,选用神经功能评分为 1、2、3 分的大鼠,其余大鼠剔除。

1.2 实验分组 根据局灶性脑缺血再灌注持续时间,大鼠被随机分成 7 组,分别为再灌注 3 h 组、6 h 组、12 h 组、24 h 组、72 h 组、120 h 组和假手术组,假手术组手术操作与模型制备相同,但不插入尼龙线。每组大鼠 18 只,其中 6 只检测 MMP-2 和 MMP-9 的表达及其活性变化;另外 12 只进一步分为生理盐水组和强力霉素组,检测脑含水量变化。

强力霉素组大鼠腹腔注射强力霉素(45 mg/kg),于再灌注前 12 h 开始,每 12 h 注射一次直至处死;生理盐水组腹腔注射同剂量生理盐水。

1.3 蛋白质印迹法检测 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平变化 大鼠过量麻醉致死,迅速断头,冰浴中取脑。提取缺血侧脑额顶叶组织蛋白,匀浆离心、测定蛋白浓度;蛋白分离采用 10% SDS-PAGE,转印到硝酸纤维素膜上;MMP-2(1:500 稀释, Santa Cruz 公司)、MMP-9(1:500 稀释, Santa Cruz 公司)、 β -actin 抗体(1:5 000 稀释, Santa Cruz 公司)4℃ 孵育过夜;相应二抗室温孵育 2 h;ECL 发光,采用 Chemi Imager 5500 V 2.03 软件扫描胶片, Fluor Chem 2.0 图像分析仪对条带积分光密度进行定量分析。

1.4 明胶酶谱法分析 MMP-2 和 MMP-9 的活性变化 大鼠过量麻醉致死,迅速断头,冰浴中取脑。PBS 裂解缺血侧脑额顶叶组织蛋白,匀浆离心、测定蛋白浓度;10% SDS-PAGE(1.0 mg/ml 明胶)分离蛋白,凝胶经洗脱、漂洗、孵育、染色、脱色,采用 Chemi Imager 5500 V 2.03 软件扫描胶片, Fluor Chem 2.0 图像分析仪读取光密度。

1.5 脑含水量测定 大鼠过量麻醉致死,迅速断头,冰浴中取脑,去除嗅球及低位脑干,清除软脑膜,用预冷的生理盐水冲洗脑表面,滤纸吸干水分,沿脑矢状缝分离缺血侧脑半球,电子天平记录其湿质量。称质量后迅速将其放入 100℃ 恒温烤箱中,烘烤 48 h 后称取干质量,计算脑组织含水量。脑组织含水量(%)=(半脑湿质量-半脑干质量)/半脑湿质量×100%。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用 *t* 检验,多组间采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 脑缺血再灌注不同时间点神经功能评分结果 假手术组大鼠无神经功能缺失表现,神经功能评分为 0 分;脑缺血再灌注各组大鼠均表现不同程度的神经功能缺失,再灌注 3 h 时神经功能缺失最明显($2.78 \pm 0.42, P < 0.01$),之后 6、12、24、72、120 h 神经功能评分随再灌注时间延长平行下降($2.72 \pm$

0.46、2.61±0.50、2.56±0.51、2.39±0.61、2.28±0.57), 但再灌注各时间点间比较无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 脑缺血再灌注不同时间点 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达变化 结果见图 1, MMP-2 在假手术组大鼠脑组织有一定程度表达, 再灌注 3 h 后表达升高($P<0.01$)。但再灌注 6 h 后 MMP-2 表达下降, 直到再灌注 120 h 表达再次升高, 与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。MMP-9 在假手术组大鼠脑组织有低表达, 再灌注 6 h 后表达开始升高($P<0.01$), 到再灌注 24 h 达到峰值, 之后表达下降, 到再灌注 120 h 降至正常水平。

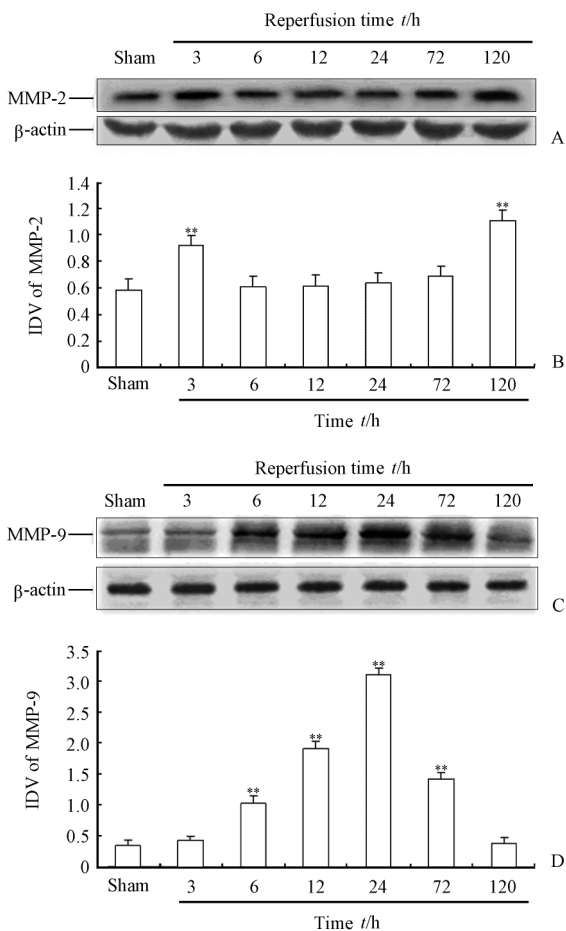


图 1 脑缺血再灌注不同时间点 MMP-2(A,B)、MMP-9(C,D) 蛋白表达比较

Fig 1 Protein expressions of MMP-2, MMP-9 at different reperfusion time points

IDV: Integrated density value. ** $P<0.01$ vs sham-operated group. $n=6, \bar{x}\pm s$

2.3 脑缺血再灌注不同时间点 MMP-2 和 MMP-9 活性的比较 明胶酶谱法检测结果与蛋白质印迹蛋白表达变化一致, 见图 2。

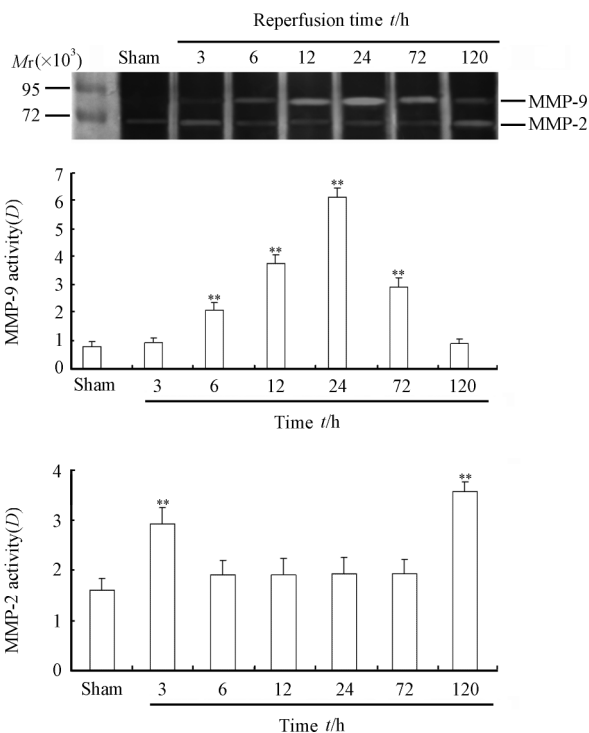


图 2 脑缺血再灌注不同时间点 MMP-2、MMP-9 活性比较
Fig 2 Activities of MMP-2, MMP-9 at different reperfusion time points

** $P<0.01$ vs sham-operated group. $n=6, \bar{x}\pm s$

2.4 脑缺血再灌注不同时间点脑组织含水量变化与强力霉素对其影响 脑缺血再灌注大鼠各时间点缺血侧脑半球含水量与假手术组相比升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并且随着再灌注时间延长含水量逐渐升高, 在再灌注 120 h 达到峰值, 强力霉素组大鼠缺血侧脑半球含水量与同时间点生理盐水组相比降低(图 3)。

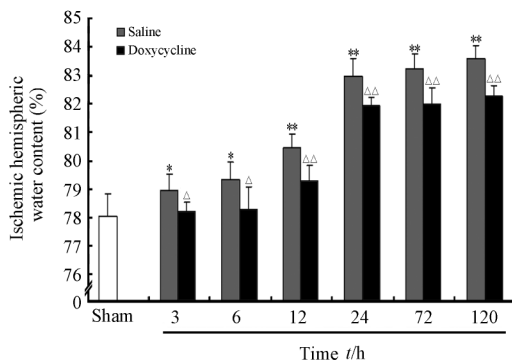


图 3 强力霉素对再灌注不同时间点脑组织含水量的影响
Fig 3 Comparison of hemispheric water content in ischemic side after treatment with doxycycline at different reperfusion time points

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs sham-operated group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs saline group at the same time points. $n=6, \bar{x}\pm s$

3 讨论

在临床上,脑缺血再灌注后脑水肿的形成加大了病死率,是脑梗死溶栓治疗后病情恶化的主要原因。脑缺血再灌注损伤引起脑水肿发生,主要有两方面原因:(1)细胞源性水肿,由于能量代谢障碍引起神经细胞发生肿胀形生脑水肿;(2)血管源性水肿,由于脑微血管通透性增加,细胞间隙内水分增多,形成脑水肿。其中血管源性水肿是脑缺血再灌注后脑水肿持续发生的主要因素。

脑微血管内皮细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元等都能分泌 MMP-2 和 MMP-9 无活性的前体,该前体分泌后被蛋白酶切割而激活产生生物活性^[8],降解脑微血管细胞外基质(extracellular matrix, ECM),包括血管基底膜的胶原、层粘连蛋白和纤维连接蛋白等,导致脑微血管通透性增高,血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)完整性破坏,脑毛细血管内的水分及血浆蛋白外渗,脑体积增加,引发血管源性脑水肿。一些研究表明 MMP-2 或 MMP-9 参与脑梗死血管源性水肿的发生^[9-10],但少有报道同时检测脑缺血再灌注大鼠 MMP-2 和 MMP-9 的动态变化规律。本研究从蛋白表达和酶活性两方面证实脑缺血再灌注 120 h 内 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达和活性交替升高,而这一期间脑组织含水量持续升高,该结果提示 MMP-2 和 MMP-9 参与脑缺血再灌注后脑水肿的发生。

同时,本研究应用 MMPs 广谱抑制剂强力霉素检测其对脑组织含水量的影响,结果表明强力霉素组大鼠与同时间点生理盐水组相比脑组织含水量显著降低,该结果进一步证明 MMP-2 和 MMP-9 与脑缺血再灌注后脑水肿的发生具有相关性。强力霉素为脂溶性物质,能通过 BBB 到达受损部位脑组织,抑制神经系统炎症反应^[11]。作为广谱的 MMPs 抑制剂,强力霉素从转录水平和酶原活化等方面抑制 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达及其活性上调,发挥对脑缺血再灌注受损组织的保护作用^[12]。

MMP-2 与丝氨酸蛋白酶纤溶酶原活化因子相似,在血管再生中是控制蛋白水解的关键因子,临床发现有卒中病史的患者血浆 MMP-2 水平升高,脑内存在大量表达 MMP-2 的巨噬细胞^[13]。本研究中也发现 MMP-2 在脑缺血再灌注 120 h 蛋白表达和活性显著升高,该结果表明 MMP-2 参与再灌注损伤后组织修复和血管再生等过程。同时,在本研究中发

现再灌注 3 h 出现 MMP-2 蛋白表达活性增高,提示 MMP-2 在脑组织损伤早期即可被激活,与先前研究认为 MMP-2 只参与脑梗死后期的组织修复存在一定差异。而 Rosenberg 等^[10]在研究脑缺血再灌注损伤 BBB 通透性的变化时发现, MMP-2 参与再灌注早期 BBB 通透性的增高,该结果与本研究检测结果类似。以上结果提示 MMP-2 的表达激活不仅参与脑损伤后期神经再生过程,在脑损伤早期也有可能加重脑组织损伤。本研究发现再灌注 3 h 和 120 h 脑组织含水量显著高于假手术组,该结果提示这两个时间点 MMP-2 的表达激活与脑水肿发生可能存在相关性。

MMP-9 作为促炎症反应蛋白酶,通过细胞因子和即早基因刺激参与神经炎症反应应答,启动子区包含转录因子活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1)和核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)。细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症介质都能够促进 MMP-9 表达上调^[14]。研究证明脑缺血后 MMP-9 基因敲除小鼠的神经元损伤显著降低^[9],脑缺血后 24~48 h 脑水肿达到高峰,与脑内 MMP-9 活性增高时间一致^[15]。临床发现脑卒中患者 MMP-9 的活性与梗死面积成正比, MMP-9 的峰值出现在发病后 24 h 内^[13],以上结果与本研究 MMP-9 蛋白表达和活性在再灌注 24 h 达到峰值相一致。但大多数研究认为作为神经炎症反应的关键因子 MMP-9 是参与再灌注损伤脑水肿发生的重要因素,而本研究发现 MMP-9 表达激活在再灌注 6 h 开始升高明显迟于 MMP-2;再灌注 120 h MMP-9 表达激活恢复至正常,此时 MMP-2 水平再次升高,以上结果提示 MMP-9 和 MMP-2 的交替变化共同参与脑缺血再灌注损伤以及脑水肿的发生, MMP-9 并非引起再灌注损伤的唯一因素。

综上所述,本研究应用脑缺血再灌注大鼠,从蛋白表达和酶活性变化两方面检测再灌注 120 h 内 MMP-2、MMP-9 动态变化,探讨脑缺血再灌注损伤以及脑水肿的发生机制,而应用 MMPs 广谱抑制剂强力霉素能够降低脑水肿的发生,有望成为治疗缺血性脑血管疾病的新途径。

[参 考 文 献]

- [1] Strbian D, Durukan A, Pitkonen M, Marinkovic I, Tatlisumak E, Pedrono E, et al. The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2008, 153: 175-181.
- [2] Strbian D, Karjalainen-Lindsberg M L, Kovanen P T, Tatlisumak T, Lindsberg P J. Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke[J]. *Circulation*, 2007, 116: 411-418.
- [3] Wang X, Lee S R, Arai K, Lee S R, Tsuji K, Rebeck G W, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 1313-1317.
- [4] Hamann G F, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo G J. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Stroke*, 1995, 26: 2120-2126.
- [5] Yang Y, Estrada E Y, Thompson J F, Liu W, Rosenberg G A. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27: 697-709.
- [6] Nagel S, Su Y, Horstmann S, Heiland S, Gardner H, Koziol J, et al. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase[J]. *Brain Res*, 2008, 1188: 198-206.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [8] del Zoppo G J, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Berg GI, et al. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2007, 38: 646-651.
- [9] Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung J C, Moskowitz M A, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia [J]. *J Neurosci*, 2001, 21: 7724-7732.
- [10] Rosenberg G A, Estrada E Y, Dencoff J E. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain [J]. *Stroke*, 1998, 29: 2189-2195.
- [11] Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, Hamann G F. Doxycycline inhibits MMPs *via* modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25: 506-513.
- [12] Chen W, Hartman R, Ayer R, Marcantonio S, Kamper J, Tang J, et al. Matrix metalloproteinases inhibition provides neuroprotection against hypoxia-ischemia in the developing brain [J]. *J Neurochem*, 2009, 111: 726-736.
- [13] Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment [J]. *Stroke*, 2001, 32: 1759-1766.
- [14] Gidday J M, Gasche Y G, Copin J C, Shah A R, Perez R S, Shapiro S D, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289: H558-H568.
- [15] Rosenberg G A, Estrada E Y, Mobashery S. Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier opening in rodents: differences in response based on strains and solvents[J]. *Brain Res*, 2007, 1133: 186-192.

[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《医学科研设计与统计分析》已出版

本书由贺佳主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0084-3,16开,定价:39.00元。

科研设计是医学科研的第一步。正确、合理、高效地进行设计,获得可靠的数据,解决医学科研问题,报告科研结果是医学工作者应该具备的基本科研素质。

本书从医学科研实例出发,针对常见的研究问题,详细介绍了如何进行设计、分析、报告结果和陈述结论的全过程。注重实际应用,对每个实例均给出相应的SAS软件实现过程,附有详细的语句说明;结合国际常见的医学论文报告规范对医学论文的撰写进行了详细介绍。本书思路清晰,语言通俗,易于理解、操作。

本书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>