

• 临床检验研究论著 •

脑梗死患者 MMP-9 和 TIMP-1 的动态变化

吕学海¹, 史延卿², 王志刚³, 段海丽¹, 李 炜¹, 刘新平¹

(河北省邯郸市中心医院:1. 神经内科;2. 院前急救科;3. 检验科 056001)

摘要:目的 探讨脑梗死患者血清基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及其抑制剂(TIMP-1)浓度的变化及与梗死面积的关系。方法 收集 90 例脑梗死患者的血清,按梗死面积分成小、中、大 3 组,用酶联免疫吸附(ELISA)法测这 90 例患者第 1、5、10 天的 MMP-9 和 TIMP-1 浓度。同时检测 30 例健康体检者血清 MMP-9 和 TIMP-1 浓度。结果 小、中、大 3 组之间 MMP-9 和 TIMP-1 的浓度差异均存在统计学意义($P < 0.01$),梗死面积越大, MMP-9 和 TIMP-1 的浓度越高。MMP-9 和 TIMP-1 的浓度在第 1、5、10 天均高于对照组($P < 0.01$)。结论 MMP-9 和 TIMP-1 参与了脑梗死的发生和发展,测定 MMP-9 和 TIMP-1 水平对于脑梗死患者病情的判断和治疗具有重要的意义。

关键词:脑梗死; 基质金属蛋白酶 9; 金属蛋白酶 1 组织抑制剂

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1660-02

The dynamic change of levels of serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 of Cerebral infarction patients

Lv Xuehai¹, Shi Yanqing², Wang Zhigang³, Duan Haili¹, Li Wei¹, Liu Xinping¹

(1. Department of Neurology; 2. Prehospital Emergency; 3. Department of Clinical Laboratory, Handan Municipal Central Hospital of Hebei, Handan, Hebei 056001, China)

Abstract: Objective To study the cerebral infarction patients serum serum matrix metalloproteinase-9(MMP-9) and its inhibitor(TIMP-1) concentration of change and the relationship between the area of infarction. **Methods** the data of 90 cases of cerebral infarction patients serum, according to the infarction area divided into small, middle and junior group, 90 patients day 1, 5 and 10 days of MMP-9 and TIMP-1 concentration was detected by ELISA. At the same time testing the healthy check-up 30 patients serum MMP-9 and TIMP-1 concentration. **Results** small, medium and junior group between MMP-9 and TIMP-1 concentration difference there were statistical significance($P < 0.01$), infarction area is larger, MMP-9 and TIMP-1 the higher concentration. MMP-9 and TIMP-1 in the concentration of 1, 5, 10 days are higher than the control group($P < 0.01$). **Conclusion** The MMP-9 and TIMP-1 involve in the occurrence and development of cerebral infarction, it is of great significance that the cerebral infarction patients are judged the illness and treatment according the level of MMP-9 and TIMP-1.

Key words: brain infarction; matrix metalloproteinase 9; tissue inhibitor of metalloproteinase-1

如何正确诊治急性脑梗死,并制定合适的策略干预梗死前缺血状态已经成为临床神经科医师普遍关注的问题。急性期脑梗死后,梗死灶内多种蛋白水解酶活性即可上升,其中 MMP-9 及 TIMP-1 是一对参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢的重要酶和酶抑制物,它们的调节失衡可导致细胞外基质发生变化直接影响血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的通透性,造成血管源性脑水肿。现就脑梗死患者血清 MMP-9 和 TIMP-1 的浓度变化进行讨论,以期对脑梗死患者康复提供些依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取既往无脑血管病病史;发病 24 h 内入院的急性期脑梗死患者 90 例,均经临床筛选、头颅计算机断层摄影(computerized tomography, CT)和/或磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检查证实其中男 53 例,女 37 例,年龄 46~78 岁,平均年龄(59.4±8.0)岁。排除标准:有明显的肝、肾或心功能衰竭;严重的全身感染或恶性疾病;近 4 周有外科手术或外伤史;有代谢免疫性疾病或接受免疫抑制剂治疗的患者。脑梗死的诊断遵循全国第四届脑血管病学术会议制定的诊断标准^[1]。对所有入选病例记录患者一般情况、既往史等资

料,同时对患者的联系方式等进行详细的记录。对照组:为本院同期门诊的健康体检者,共 30 例,男 18 例,女 12 例,年龄 45~76 岁,平均(57.8±6.9)岁。两组性别、年龄均差异无显著性意义。所有入选者均知情并同意,签署知情同意书。

1.2 治疗方法 脑梗死组患者在入院后完善相关检查后,给予动态监测及调控血压血糖、抗血小板聚集、他汀类调脂及稳定斑块、活血化瘀等对症治疗,大面积梗死时必要时应用脱水降颅压。

1.3 分型标准及结果 患者入院时均行头颅 CT 扫描,根据 Adams 方法^[2]进行梗死面积测量,即梗死灶面积小于 1.5 cm² 者 25 例为小梗死面积组,梗死灶面积在 1.5~3.0 cm² 且累积一个解剖学部位的小血管分支闭塞者 33 例为中梗死面积组,梗死灶面积大于 3 cm² 且累积两个以上解剖学部位的大血管主干供血区者 32 例为大梗死面积组。

1.4 标本收集与测定 入组脑梗死患者发病后 24 h、发病第 7 天、发病第 14 天采肘静脉血 2 mL;对照组采集清晨空腹血 1 次,2 mL。外周血标本用 EDTA 管在室温下以 4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,分装至 0.5 mL EP 管, -70 °C 冰箱保存待测。试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

MMP-9 酶联免疫试剂盒 (Human MMP-9 ELISA Kit), 产品编号是 EK0465, TIMP-1 试剂盒 (Human TIMP-1 ELISA Kit, 产品编号: EK0520)。采用 ELISA 法检测, 标本测定时严格按照试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理 所有数据均采用 Excel2003 建库, SPSS 13.0 for windows 软件包在计算机上完成; 正态分布或近似正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 正态分布或近似正态分布的计量资料多组比较做单因素方差分析, 两组比较做独立样本的 *t* 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异显著性检验界限。

2 结果

2.1 不同时间点脑梗死患者血清 MMP-9 及 TIMP-1 的动态变化特点 脑梗死组患者在发病后 1 d 血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 以发病后 5 d 的血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平最高, 随病情发展其水平逐渐下降, 10 d 时部分患者的血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平恢复正常, 但与对照组相比差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 见表 1~2。

表 1 各组血清 MMP-9 在不同时间点的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	1 d	5 d	10 d
对照组	30	143.25 ± 64.30	148.25 ± 73.20	142.25 ± 54.30
脑梗死组	90	368.71 ± 98.72	542.25 ± 102.30	249.25 ± 91.30
<i>t</i>		105.32	134.51	69.32
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.05

表 2 各组血清 TIMP-1 在不同时间点的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	1 d	5 d	10 d
对照组	30	137.45 ± 48.92	142.45 ± 68.24	136.85 ± 42.39
脑梗死组	90	308.72 ± 94.32	369.32 ± 99.24	209.25 ± 89.62
<i>t</i>		98.12	102.46	45.21
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.05

2.2 不同梗死面积的脑梗死患者血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平与对照组比较 小、中、大脑梗死面积组血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 3 个脑梗死面积组间的血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 不同梗死面积的脑梗死患者血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平与对照组比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MMP-9	TIMP-1
对照组	30	147.45 ± 69.92	142.15 ± 68.42
小梗死面积组	25	279.25 ± 101.92	207.32 ± 76.92
中梗死面积组	33	418.39 ± 143.72	262.45 ± 98.42
大梗死面积组	32	628.45 ± 128.76	316.12 ± 108.21
<i>F</i>		1 392.43	784.67
<i>P</i>		<0.01	<0.01

3 讨论

近年来, MMPs 与脑损伤的关系是当今医学界研究的热点, MMPs 是一类结构与氨基酸组成相似, 依赖锌离子的蛋白水解酶, 其主要功能是降解和再塑造细胞外基质, 维持细胞外基质的动态平衡。TIMP 是一组能抑制 MMP 活性的天然抑制物, 其中 TIMP-1 优先与 MMP-9 特异性结合形成可溶性非

共价复合物而发挥其抑制作用^[3]。正常情况下, MMP-9 与 TIMP-1 是以 1:1 的比例一起释放, 二者之间的平衡保持正常基质的稳定^[4-5]。

MMP-9 是有中性粒细胞、单核细胞等分泌的一种糖蛋白, 以无活性的酶原形式释放, 在体内经纤维蛋白酶水解而活化。在正常情况下, MMP-9 处于低表达状态, 当 MMP-9 酶原被激活后会迅速降解以防止其过度活化, 破坏血管基底膜^[6]。由于 MMP-9 可降解几乎所有细胞外基质, 他们表达的增高势必会使粥样斑块的胶原纤维和结缔组织降解增多, 使纤维帽处于不稳定状态, 易于脱落, 形成脑栓死^[7]。

通过本研究发现, 脑梗死组患者在发病后 1 d 血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平明显高于对照组, 以发病后 5 d 的血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平最高, 随病情发展其水平逐渐下降, 10 d 时部分患者的血清 MMP-9 及 TIMP-1 水平恢复正常, 但与对照组相比差异有统计学意义。同时发现 3 种梗死灶面积组的 MMP-9 及 TIMP-1 水平之间相比差异有统计学意义, 故脑梗死患者 MMP-9 升高水平与梗死灶面积的大小有关^[8,9]。说明 MMP-9 及 TIMP-1 参与了脑梗死的发生与发展, 这与罗小春等^[10]及朱焰等^[11]的研究是一致的, 这些说明 TIMP-1 在伴随着 MMP-9 的升高和降低, 对 MMP-9 的升高的起到一定的抑制作用, 脑梗死使 MMP-9 升高的可能的原因有 (1) 急性脑梗死局部炎症反应导致中性粒细胞、单核细胞等增高, 从而使梗死灶局部的 MMP-9 表达上调、活性增高。(2) 急性脑梗死也会导致全身炎症反应, 使血液中的中性粒细胞和单核细胞的分泌 MMP-9 的细胞升高, 从而使 MMP-9 分泌增多。

综上所述, MMP-9 和 TIMP-1 在脑梗死时显著升高, 升高的程度与梗死的面积有关。在脑梗死时通过对 MMP-9 和 TIMP-1 的测定能为梗死面积的判断提供一些依据, 并且对患者的病情判断和治疗具有重要的意义。另外, 动物实验中已成功地应用了 MMP-9 的抑制剂即 TIMP-1 来抑制脑水肿, 缩小梗死体积, 还可辅助溶栓治疗减少出血转化^[12], 这也为我们提供了一种治疗中风的新思路, 抑制 MMP-9 的表达, 降低其活性, 上调 TIMP-1 的表达, 或给予外源性的 TIMP-1, 调节血清 MMP-9/TIMP-1 的平衡, 有望成为一种治疗缺血性脑血管疾病的新手段。

参考文献

- [1] 全国第四届脑血管病学术会议. 各类脑血管病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 381-384.
- [2] Hallstrom B, Norring B, Lindgren A. Stroke in Lund-orup, Sweden; improved long-term survival among elderly stroke patients[J]. stroke, 2002, 33(6): 1624-1629.
- [3] 陈合成, 杨金升. 基质金属蛋白酶-9 在脑缺血中的作用[J]. 国际脑血管病杂志, 2007, 15(2): 144-147.
- [4] Cunningham LA, Wetzell M, Rosenberg GA. Multiple role for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia [J]. Glia, 2005, 50(4): 329-339.
- [5] Kim HS, Kim HJ, Park KG, et al. Alpha-lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF-kappa B transcriptional activity[J]. Exp Mol Med, 2007, 39(1): 106-113.
- [6] Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, et al. Immunohistochemistry of Matrix metalloproteinases in reperfusion, injury to rat brain; activation of MMP-9 lined to stromelysin-I and microglia in cell cultures[J]. Brain Res, 2001, 893(1): 104-112. (下转第 1663 页)

GCC CAA TTG AC-3'。扩增及检测条件:92 ℃ 30 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,37 个循环。PCR 反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,6 V/cm,1 000 bp DNA Ladder 作参照。

1.3.2 MLST 分型 7 个基因分别是:abcZ、adk、aroE、fumC、gdh、pdhC 及 pgm,参照 PubMLST(www. pubmlst. org)公布的 N. meningitis 标准方案进行,循环条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 45 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,29 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 产物委托华大基因有限公司进行测序。7 个基因测序结果与 PubMLST 数据库进行比对,获得各基因位点的等位基因数值,并形成相应的等位基因谱,判断其序列型(ST)。

1.3.3 药敏检测 根据 2011 年 1 月美国临床实验室标准化协会(CLSI)制定的 Nm 药敏标准 M02 及 M07 对菌株进行体外药敏试验。选取的抗菌药物为头孢噻肟、头孢曲松、美罗培南、阿奇霉素、咪诺霉素、环丙沙星、萘啶酸、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、氯霉素、利福平、青霉素和氨苄西林。对青霉素和氨苄西林采用 E-test 法测定最低抑菌浓度(MIC),对余抗菌素采用纸片法测定。

2 结 果

2.1 分离培养与鉴定结果 首例病例从血液标本培养出脑膜炎奈瑟菌,第 3 例病例从脑脊液培养出脑膜炎奈瑟菌各 1 株,经常规鉴定,均为 C 群脑膜炎奈瑟菌。第 2 例及 17 例密切接触者咽拭子标本均未检出脑膜炎奈瑟菌。第 2 例、第 3 例病例脑脊液标本,乳胶凝集试验 C 群呈强阳性。首例病例的培养菌株送广东省疾病预防控制中心微检所作进一步确认和分型。

2.2 PCR 检测结果 首例病例分离株 DNA 提取物经 PCR 检测,Nm 属特异性 crgA 基因及 C 群 siaD 基因均为阳性。第 2 例、第 3 例病例脑脊液标本 DNA 提取物 PCR 检测 C 群 siaD 基因均阳性。

2.3 MLST 分析结果 首例病例分离株成功扩增出流脑 7 个看家基因 abcZ、adk、aroE、fumC、gdh、pdhC 及 pgm。7 个看家基因测序结果与 PubMLST 数据库进行比对,获得各看家基因位点的等位基因数值分别为 222、3、58、275、30、5 及 255,为 ST-4821 型,属于 ST-4821 COMPLEX 克隆系。

2.4 药敏检测结果 根据 2011 年美国 CLSI 抗微生物药物敏感性试验的 Nm 抑菌环直径解释标准和相对应 MIC 折点值进行判断,两株病人分离株对头孢噻肟、头孢曲松、美罗培南、阿奇霉素、咪诺霉素、氯霉素、利福平、青霉素、氨苄西林敏感。E-test 法测定,两株菌青霉素的 MIC 均为 0.023 μg/mL,氨苄西林的 MIC 均为 0.023 μg/mL。但两株菌对环丙沙星、萘啶酸、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑均耐药。

3 讨 论

本次疫情在 1 周内同一学校里共发生 3 例病例,从第 1 例

病例血液、第 3 例病例脑脊液标本中分别分离出 C 群 Nm;第 2 例患者未分离到菌株,但脑脊液 DNA 提取物 PCR 检测,C 群 siaD 基因也为阳性。根据流行病学调查及实验室检测结果,确认为近年梅州市首次报告的 C 群流脑聚集性疫情。

菌株 MLST 分型结果显示,梅州市报告的首例 C 群 Nm 为 ST-4821 型,与安徽省的流行菌株一致^[2]。随着 2005 年 ST-4821 克隆系在安徽出现暴发,全国多个省市陆续出现发病情况^[3],因此在今后的流脑防控工作中,应引起高度重视。

本次的分离菌株对环丙沙星、奈啶酸、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑产生不同程度耐药,与浙江省报道的相一致^[4],但对头孢噻肟、头孢曲松、美罗培南、阿奇霉素、咪诺霉素、氯霉素、利福平、青霉素、氨苄西林敏感。流脑病人菌株、健康携带者菌株可表现出不同的耐药性特征,在选择抗菌药物进行流脑病人治疗以及流脑流行季节人群预防性服药时,应分别对流脑病人、健康人群菌株进行药物敏感性监测,以提高药物治疗、预防性服药的敏感性和针对性^[5]。

研究显示,广东省流脑患者及健康人群携带菌株中,C 群、B 群流脑菌株的比例呈上升趋势,流脑流行菌群正在发生从 A 群到 C 群、B 群的变化^[6]。鉴于人群对 C 群 Nm 普遍易感,存在 C 群流脑流行或暴发的可能,应加强对 C 群 Nm 的监测,密切关注 C 群流脑的发病及流行趋势,及早采取 A+C 群流脑疫苗接种为主的综合措施加以预防^[7]。

参考文献

[1] 李军宏,王晓军,梁晓峰.我国流行性脑脊髓膜炎的流行概况与预防控制[J]. 疾病监测,2005,20(4):169-170.
 [2] Shao Z J, Li W, Ren J, et al. Identification of a new Neisseria meningitis serogroup C clone from Anhui province, China[J]. Lancet, 2006,367(9508):419-423.
 [3] 邓小玲,管大伟,黎薇,等. MLST 分型技术应用于脑膜炎奈瑟菌的分子流行病学研究[J]. 华南预防医学,2008,34(3):10-14.
 [4] 朱水荣,徐宝祥,张政,等. 浙江省 2005~2007 年流行性脑脊髓膜炎病原学监测及分子分型研究[J]. 中国疫苗和免疫,2008,14(6):489-493.
 [5] 徐丽,邵祝军,李马超,等. 脑膜炎奈瑟菌对 12 种抗菌药物体外敏感性检测[J]. 中国计划免疫,2006,12(1):53-55.
 [6] 刘美真,柯昌文,张万里,等. 广东省流行性脑脊髓膜炎流行菌群变化趋势分析[J]. 国际医药卫生导报,2012,18(8):1057-1060.
 [7] 李漫时,宋立志,肖作奎,等. 山东省首例 C 群流行性脑脊髓膜炎死亡病例病原学分析[J]. 中国疫苗和免疫,2008,14(6):499-500.

(收稿日期:2012-12-01)

(上接第 1661 页)

[7] Lofrus JM, Naylor AR, Goodalls, et al. Increase Matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques: A potential role in acute plaque disruption[J]. stroke,2000,31(1):40-47.
 [8] 吕连智,韩春华,杨文东. 急性脑梗死患者血清 MMP-9、NSE 和 S-100B 蛋白水平变化及临床价值的研究分析[J]. 实用心脑血管病杂志,2012,20(6):977-978.
 [9] 朱卫香,刘彦敏,韩亚军,等. 缺血性脑卒中患者血清 MMP-9、Hs-CRP 与脑梗死体积及神经功能缺损的关系[J]. 神经内分泌与免疫,2012,04:341-343.

[10] 罗小春,万梅珍,韦国强,等. 脑梗死患者血清中 MMP-9 表达的临床意义[J]. 浙江临床医学,2009,11(11):1157-1159.
 [11] 朱焰,裴红霞,戴金洪. MMP-9、TIMP-1 水平与急性脑梗死关系的研究[J]. 实用预防医学,2009,16(6):1892-1894.
 [12] Mnotaner J, Aivare Z, Sabin J, et al. Matirx metlaloperteinase expression is related to hemorrhagic transfomation after cardioembolic stroke[J]. Stroke,2001,32(12):2762-2766.

(收稿日期:2012-12-08)