

基质金属蛋白酶:一个缺血性脑卒中急性期的治疗靶点

顾悦华 尤晓欣 综述 裴建 审校

上海中医药大学附属龙华医院针灸科,上海市 200032

摘要:缺血性脑卒中后,基质金属蛋白酶(MMPs)可破坏血脑屏障,并形成一系列后续炎症级联反应,抑制其表达并与溶栓剂联合治疗延长溶栓时间窗,使MMPs治疗成为一个具有潜力的方法之一。但由于MMPs在缺血性脑卒中恢复期具有一定的保护及帮助恢复功效,故在治疗上需权衡利弊,选择适当的MMP抑制剂及治疗时间点,为临床治疗提供最安全有效的治疗方法。

关键词:缺血性脑卒中;基质金属蛋白酶;金属蛋白酶抑制剂;机制;治疗;时间窗

近几年,基质金属蛋白酶(MMPs)已被视为缺血性脑卒中急性期的标志物之一,更成为治疗脑卒中的新靶点^[1]。MMPs,尤其是MMP-2和MMP-9,在周围脑血管的基底层中起着重要作用^[2]。脑缺血损伤后,MMPs参与了一系列后续的级联反应,加快对血管基底层的降解,进而破坏血脑屏障(BBB),损害中枢神经系统中的神经组织,并引起大脑水肿及出血性转化^[2,3]。研究发现,MMP-9水平与脑卒中的梗死面积、疾病的严重程度、神经元的存活及脑卒中导致的运动功能障碍程度呈正相关性,且MMP-9水平可以预测使用丝氨酸蛋白酶组织型纤溶酶原激活剂(tPA)治疗的出血情况^[1]。

1 MMPs在缺血性脑卒中后产生的机制

正常情况下,MMP-2与TIMP-2、MT1-MMP形成的一个三分子的复合体(见图1)。脑缺血后,一个潜在结合位点暴露,激活MT1-MMP(MMP-14),破坏的复合体结构使MMP-2被释放出来,导致BBB形成第一个可逆性开口。缺血再灌注的3 h内,MMP-2开始降解BBB的紧密连接蛋白,24 h后消失^[4]。

神经细胞发生凋亡的同时释放活化的MMP-3,再灌注后的24~48 h内,MMP-3与自由基、血纤溶酶、蛋白酶、细胞因子等(见图2),参与MMP-9的激活,MMP-9被激活后导致了BBB的第二个开口出现,并降解毛细血管基底膜一些基质蛋白,导致血管完整性破坏,使水、电解质及大量蛋白质外流,致使细胞间隙内水分增多,最终形成血

管源性脑水肿,并造成缺血再灌注损伤并可使血管产生更大的损伤(见图3)^[5]。

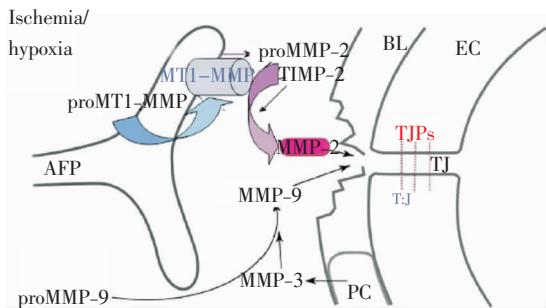


图1 三分子复合体结构破坏后致使MMP-2激活,MMP-2作用于BBB基底层。而缺血后释放的MMP-3作用于MMP-9前体,产生MMP-9,作用紧密连接蛋白。(来源:Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*, 2009, 158 (3): 983~994.)

2 MMPs作为靶点的治疗方法

2.1 抑制MMPs的表达

在生理条件下,调控转录后,被激活的内源性抑制剂可以控制MMPs的活性,并维持着一定的生理平衡。然而脑缺血后这种平衡被打破,MMPs的过度表达对大脑造成了损害,所以很多针对脑缺血的治疗是通过使用MMPs抑制剂(MMPI),起到抑制脑水肿及出血的作用。除了天然的MMPI,可以

基金项目:上海市卫生局科研重点项目(20100003);上海市卫生局海派中医流派传承研究基地项目(ZYSNxD-CC-HPGG-JD-004);国家中医药管理局重点学科建设项目资助

收稿日期:2013-01-14;修回日期:2013-05-07

作者简介:顾悦华(1986-),女,住院医师,硕士研究生,从事脑神经疾病临床及科研工作。

通讯作者:裴建,主任医师,教授,博士生导师。Email:jianpei99@yahoo.com

使用 MMP 抗体、干预 MMP 的基因水平、或使用人工合成的 MMPI、抑制 MMP 表达的药物,如 Rho 激酶抑制剂 (ROCK)、血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI)、抗氧化剂及中医药治疗等药物及方法均可通过下调 MMP 表达,降低局部缺血损伤。

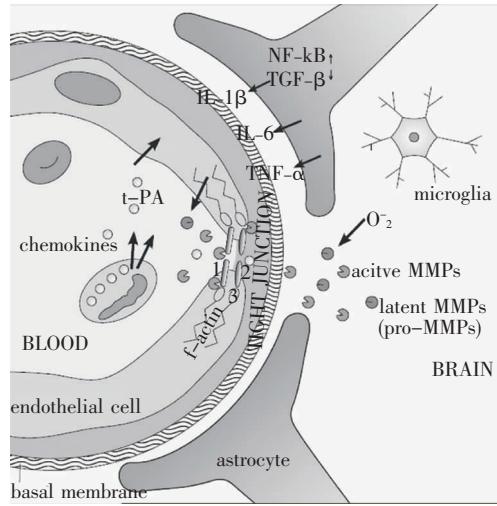


图 2 炎症过程期间, MMPs 破坏 BBB。包括血纤维蛋白溶解的一系列级联反应,氧化应激,嗜中性粒细胞浸润和活化的免疫细胞。所有参与的细胞,随着刺激血管内皮细胞释放细胞因子、趋化因子、MMP。激活的 MMPs 引起紧密连接蛋白和基底层分解,从而使炎症侵入大脑。活化的 tPA 也在其中起到上调 MMPs 的作用。(来源:Florczak-Rzepka M, Grond-Ginsbach C, Montaner J, et al. Matrix metalloproteinases in human spontaneous intracerebral hemorrhage: an update. *Cerebrovasc Dis*, 2012, 34(4): 249-262.)

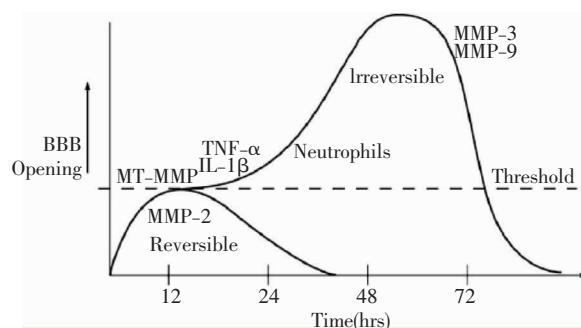


图 3 随着时间的推移,发病后的出现的再灌注损伤。发病早期因 MMP-2 的激活,出现可逆的开口持续数个小时。在 24~72 h 后,炎症反应导致诱导的 MMP-3 和 MMP-9,从而诱发更激烈的和不可逆的损坏血管。

2.2 以 MMPs 为基础的联合治疗

缺血性脑卒中是急性动脉闭塞形成血栓,导致神经功能损伤。溶栓治疗仍是目前唯一有效的治疗方法。tPA 是至今唯一经 FDA 批准的缺血性脑卒中溶栓剂。但溶栓过程中,tPA 可触发 MMP 的表达上调,进而破坏 BBB 的完整性,增加溶栓的风险。tPA 在脑卒中后只有 3 h 治疗时间窗,给溶栓治疗带来了极大不便^[6-8]。但研究发现,当 MMP-3 基因缺损或者联合使用 MMPI 治疗时,不仅可以减少 tPA 溶栓时诱导的自发性出血风险,同时也可以延长溶栓治疗的时间窗,使其更具有临床治疗潜力^[9, 10]。

3 MMPs 抑制剂

3.1 广谱的 MMPI

四环素及非抗生素衍生物能通过与 Ca^{2+} 或 Zn^{2+} 在活性位点结合广泛的抑制 MMPs 表达(见图 4),同时能抑制转录,间接调节 MMPs 的表达。四环素类衍生物具有低毒性,持久的高血药浓度的特点,且能穿越 BBB。此外,四环素衍生物可下调促炎细胞因子的表达起到抗炎作用。

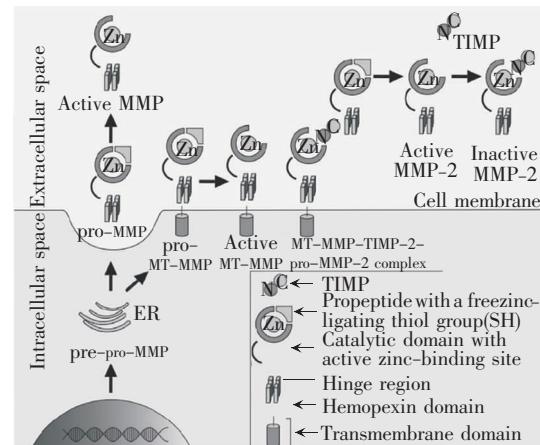


图 4 MMP 激活及被抑制途径。前-原-基质金属蛋白酶表达,并通过内质网 (ER) 运输到细胞表面。大多数 MMPs 的分泌和激活发生在细胞外空间。TIMP 与 MMP 的 Zn^{2+} 结合位点结合,从而抑制 MMP 的活性。(来源:Florczak-Rzepka M, Grond-Ginsbach C, Montaner J, et al. Matrix metalloproteinases in human spontaneous intracerebral hemorrhage: an update. *Cerebrovasc Dis*, 2012, 34(4): 249-262.)

米诺环素是目前研究较多的一种四环素类广谱 MMPI。Nagel 等^[11]给缺血再灌注大鼠使用米诺环素,结果减少脑梗死面积和 BBB 崩溃的信号强度,降低脑水肿和轻微的神经功能障碍。Murata

等^[12]用 tPA 治疗缺血再灌注大鼠时加用米诺环素,结果梗死面积比单用 tPA 减少了约 25%,且使 tPA 治疗时间延长至病发后 6 h。

另一项广谱 MMPI 治疗脑缺血小鼠的研究表明, BB-94 可降低缺血性病变的大小,减少海马回神经元死亡^[13]。然而 MMP 诱导自发性脑出血后 72 h 后, BB-94 会增多细胞凋亡和出血面积^[14]。不过 GM6001 可以在抑制 MMP 的同时, GM6001 在大鼠缺血缺氧时提供长期神经保护作用^[15]。

3.2 选择性 MMPI

广谱 MMPI 可最大限度地抑制细胞外基质降解,可能具有一定的治疗潜力。然而,四环素衍生物的药理抑制存在着严重的不良反应,如引起牙釉质发育不良及龋齿、胃肠反应,大剂量使用可致肝毒性、肾毒性,还会对周围血象产生影响。且四环素衍生物还具有低特异性和高毒性^[16]。目前多个使用广谱 MMPI 改善脑缺血后脑损伤的临床试验,均以失败告终^[17]。这时,具有高选择性的 MMPI,可以提高抑制 MMPs 疗效及使用 MMPI 的安全问题,成为更适当的治疗方法^[18]。

选择性 MMPI 是通过使广谱 MMPI 中的 Zn^{2+} 结合基团缺失实现特异性。目前所有开发的这类抑制剂首先抑制的是 MMP-13^[19]。在一项使用 SB-3 CT 治疗动物缺血再灌注研究中,结果发现它能保护层粘连蛋白、防止外膜细胞收缩,保护内皮细胞层粘连蛋白,高效的降低缺血造成脑损伤,并能延长干预治疗后 1~6 h 的治疗时间窗^[19, 20]。且使用选择性 MMPI 显著减少了对肝脏损伤^[21]。这种 MMPI 因具有高度特异性和不良反应较少,日渐成为开发目标^[22],但产生的大分子蛋白对肠胃外给药带来了一定的难度,限制了其临床应用^[23]。

4 可抑制 MMPs 表达的药物

4.1 ROCK

Ishiguro 等^[24]给脑缺血小鼠使用 tPA 治疗的同时予以法舒地尔,评估再灌注后治疗结果,结果 tPA 联合法舒地尔治疗,通过抑制 MMP-9 的表达,防止脑血管内皮细胞受损,预防了自发出血性转化的发展,但并没有见到梗死体积的减少。

4.2 血管紧张素转换酶抑制剂

结果显示,血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和 AT1 受体阻滞剂可降低 MMP-9 的表达、改善局灶性缺血再灌注损伤。Liebetrau 等^[25]的一项研究显示,用雷米普利治疗易卒中自发性高血压大鼠 6

个月,结果大鼠基底神经节的 MMP-9 表达显著下降了 37%,在皮质下降了 25%。另有研究也发现,替莫普利可以抑制 MMP-2 的活性^[26]。

4.3 高压氧及抗氧化剂

高压氧在脑卒中的早期阶段,减少破坏的 BBB 再灌注损伤^[27]。增加的氧作用于细胞的半暗带。氧气与 tPA 同时使用时,可能保护了 BBB 从而减少 tPA 出血并发症。

超氧化物歧化酶可以清除氧自由基,降低缺血引起的 BBB 损伤和血管性水肿,超氧化物歧化酶同时也活化了活性氧,从而降低了 MMP-9 表达。褪黑激素具有直接、间接抗氧化作用,最近研究发现,在局灶性脑缺血损伤后使用褪黑激素治疗,可通过对 MMP-9 活性的抑制,减少对 BBB 的破坏^[28]。

4.4 磷酸二酯酶 III 抑制剂

Ishiguro 等^[29]使用 tPA 联合磷酸二酯酶 III 抑制剂西洛他唑治疗脑缺血性小鼠,结果减少了 MMP-9 的活性,防止血管内皮损伤,降抑制血-脑屏障开放,从而预防了使用 tPA 治疗小鼠局灶性脑缺血引起的出血性转化。

4.5 中药提取物

中医传统中药中,也有不少药物可以调控对 MMP 的表达。研究发现,来自黄芩的黄芩甙,不仅可以保护神经组织损伤,也抑制海马回 MMP-9 的活性,降低短暂性缺血海马神经元损伤^[30]。芳香类药物具有较强的走窜功效,能通诸窍之不利,开经络之壅遏。最近研究也发现,使用芳香开窍的药物对缺血再灌注大鼠的 BBB 具有保护作用,而使用麝香,可对缺血侧脑组织中 VEGF、MMP-9 有所抑制^[31]。

5 MMPs 也具有保护作用

缺血性脑损伤后不久,开始了一连串修复损伤的活动。已有实验证实, MMPs 可以通过调节亲和抗血管生成因子之间的平衡,介导血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白活化,促使神经血管重塑^[32]。然而, MMP-9 促血管生成的作用也是双重的。在最初脑梗死后抑制 MMP-9 的表达会刺激血管生成,但在脑卒中后 7~14 d, MMP-9 与神经血管重塑的标志物一起表达在梗死的皮质周边,抑制 MMP 表达同时也抑制了神经血管的重塑^[33, 34]。

缺血性脑卒中后 MMP-13 上调较早,密切相关的是聚集蛋白聚糖, MMP-13 的基质参与神经元的可塑性和再生,所以 MMP-13 可能在脑缺血后神经元重组起着重要作用^[35]。

6 小结

MMPs 参与缺血性脑卒中后 BBB 的破坏和脑水肿的形成,抑制这些蛋白酶可能成为一种缺血性脑卒中急性期新的治疗目标。但由于 MMPs 在脑卒中恢复期发挥至关重要的作用,所以在此阶段抑制 MMPs 表达可能是有害的^[36]。因此在脑缺血脑卒中的初期阶段,需仔细权衡利弊,不能一味的抑制 MMPs 表达。

同时,需进一步研究 MMPs 不同作用的具体时间范围,找到一个适当的抑制 MMP 的时间节点,从而确定 MMPI 治疗缺血再灌注的时间窗。

我们也需更深入的研究能抑制 MMP 表达的药物,预测可能产生的不良反应,为临床提供更精确的靶向治疗药物。

参 考 文 献

- [1] Ramos-Fernandez M , Bellolio MF , Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* , 2011 , 20 (1) : 47-54.
- [2] del Zoppo GJ. The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. *Ann N Y Acad Sci* , 2010 , 1207 : 46-49.
- [3] Sumii T , Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* , 2002 , 33 (3) : 831-836.
- [4] Yang Y , Estrada EY , Thompson JF , et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2007 , 27 (4) : 697-709.
- [5] Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* , 2008 , 57 : 178-201.
- [6] Tsuji K , Aoki T , Tejima E , et al. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* , 2005 , 36 (9) : 1954-1959.
- [7] Wahlgren N , Ahmed N , Dávalos A , et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST) : an observational study. *Lancet* , 2007 , 369 (9558) : 275-282.
- [8] Bluhmki E , Chamorro A , Dávalos A , et al. Stroke treatment with alteplase given 3.0-4.5 h after onset of acute ischaemic stroke (ECASS III) : additional outcomes and subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* , 2009 , 8 (12) : 1095-1102.
- [9] Sumii T , Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* , 2002 , 33 (3) : 831-836.
- [10] Suzuki Y , Nagai N , Umemura K , et al. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* , 2007 , 5 (8) : 1732-1739.
- [11] Nagel S , Su Y , Horstmann S , 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. *Brain Res* , 2008 , 1188 : 198-206.
- [12] Murata Y , Rosell A , Scannevin RH , et al. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke* , 2008 , 39 (12) : 3372-3377.
- [13] Walker EJ , Rosenberg GA. TIMP-3 and MMP-3 contribute to delayed inflammation and hippocampal neuronal death following global ischemia. *Exp Neurol* , 2009 , 216 (1) : 122-131.
- [14] Mishiro K , Ishiguro M , Suzuki Y , et al. A broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor prevents hemorrhagic complications induced by tissue plasminogen activator in mice. *Neuroscience* , 2012 , 205 : 39-48.
- [15] Chen W , Hartman R , Ayer R , et al. Matrix metalloproteinases inhibition provides neuroprotection against hypoxia-ischemia in the developing brain. *J Neurochem* , 2009 , 111 (3) : 726-736.
- [16] Coussens L , Fingleton B , Matrisian L. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* , 2002 , 295 (5564) : 2387-2392.
- [17] Fingleton B. MMPs as therapeutic targets—still a viable option? *Semin Cell Dev Biol* , 2008 , 19 (1) : 61-68.
- [18] Dormán G , Cseh S , Hajdú I , et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. *Drugs* , 2010 , 70 (8) : 949-964.
- [19] Cui J , Chen S , Zhang C , et al. Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia. *Mol Neurodegener* , 2012 , 7 : 21.
- [20] Gu Z , Cui J , Brown S , et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* , 2005 , 25 (27) : 6401-6408.
- [21] Hamada T , Fondevila C , Busuttil RW , et al. Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* , 2008 , 47 (1) : 186-198.
- [22] Martens E , Leyssen A , Van Aelst I , et al. A monoclonal antibody inhibits gelatinase B/MMP-9 by selective binding to part of the catalytic domain and not to the fibronectin or zinc binding domains. *Biochim Biophys Acta* , 2007 , 1770 (2) : 178-186.
- [23] Hu J , Van den Steen PE , Houde M , et al. Inhibitors of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 activity comparison of a peptidomimetic and polyhistidine with single-chain derivatives

- of a neutralizing monoclonal antibody. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67 (5): 1001-1009.
- [24] Ishiguro M, Kawasaki K, Suzuki Y, et al. A Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil, prevents matrix metalloproteinase-9-related hemorrhagic transformation in mice treated with tissue plasminogen activator. *Neuroscience*, 2012, 220: 302-312.
- [25] Liebetrau M, Burggraf D, Wunderlich N, et al. ACE inhibition reduces activity of the plasminogen/plasmin and MMP systems in the brain of spontaneous hypertensive stroke-prone rats. *Neurosci Lett*, 2005, 376 (3): 205-209.
- [26] Yamamoto D, Takai S, Akimoto T, et al. Matrix metalloproteinase-2 inhibition by temocapril and its important role in peritoneal transport. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39 (10): 864-868.
- [27] Kim HY, Singhal AB, Lo EH. Normobaric hyperoxia extends the reperfusion window in focal cerebral ischemia. *Ann Neurol*, 2005, 57 (4): 571-575.
- [28] Jang JW, Lee JK, Lee MC, et al. Melatonin reduced the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a rat photothrombotic stroke model. *J Neurol Sci*, 2012, 323 (1-2): 221-227.
- [29] Ishiguro M, Mishiro K, Fujiwara Y, et al. Phosphodiesterase-III inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tPA. *PLoS One*, 2010, 5 (12): e15178.
- [30] Lee JH, Lee SR. The effect of baicalein on hippocampal neuronal damage and metalloproteinase activity following transient global cerebral ischaemia. *Phytother Res*, 2012, 26 (11): 1614-1619.
- [31] Ni C, Zeng N, Xu F, et al. Effects of aromatic resuscitation drugs on blood brain barrier in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2011, 36 (18): 2562-2566.
- [32] van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*, 2008, 78 (2): 203-212.
- [33] Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290 (1): H232-H239.
- [34] Zhao BQ, Wang S, Kim HY, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med*, 2006, 12 (4): 441-445.
- [35] Nagel S, Sandy JD, Meyding-Lamade U, et al. Focal cerebral ischemia induces changes in both MMP-13 and aggrecan around individual neurons. *Brain Res*, 2005, 1056 (1): 43-50.
- [36] Sood RR, Taheri S, Candelario-Jalil E, et al. Early beneficial effect of matrix metalloproteinase inhibition on blood-brain barrier permeability as measured by magnetic resonance imaging countered by impaired long-term recovery after stroke in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28 (2): 431-438.

细胞凋亡线粒体途径相关蛋白 Bad 和 Bcl-xL 参与缺血性脑卒中的研究进展

杨文 综述 朱榆红 审校

昆明医科大学第二附属医院神经内科, 云南省昆明市 650101

摘要:近年研究发现,Bcl-2家族的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白通过竞争性相互作用来共同调控细胞凋亡。Bad是Bcl-2家族中和Bcl-xL相关的促凋亡基因。Bad和Bcl-xL在多种细胞中表达,两者可通过细胞信号转导通路参与细胞凋亡的全过程。其在脑缺血损伤方面的研究受到重视。

关键词:脑缺血;细胞凋亡;Bad;Bcl-xL;细胞信号转导;神经细胞;损伤机制

脑卒中(stroke)是一组突发性的脑血液循环障碍,并以局灶性神经功能缺失为共同特征的疾病,

有较高的发病率、致残率和死亡率。随着医学发展,卒中后存活率显著增高,但幸存者75%以上均

基金资助:国家自然科学基金(81060102);2011云南省教育厅高校创新团队基金项目支持;云南省卫生厅内设机构资助项目(2011WS0083)

收稿日期:2012-11-20;修回日期:2013-01-18

作者简介:杨文(1986-),女,在读硕士研究生,主要从事脑血管病的研究。

通讯作者:朱榆红,女,教授,主要从事脑血管病的研究。E-mail: yuhong_lilin@yahoo.com.cn。