论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0492-04

难治性颞叶癫痫患者颞叶皮层金属基质蛋白酶-9的表达

李 松,余思逊,贺教江,张春青,树海峰,阴金波,刘仕勇,安 宁,杨 辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心)

[摘要] **目的** 研究成人难治性颞叶癫痫患者颞叶皮层中金属基质蛋白酶-9(MMP-9)的表达,探讨其在难治性癫痫发病中的作用机制。**方法** 收集新桥医院神经外科手术切除的成人难治性颞叶癫痫颞叶皮层标本24例,与15例正常对照皮层比较,运用RT-PCR、明胶酶谱法和免疫组织化学方法检测MMP-9在致痫灶中的表达分布。**结果** 在难治性颞叶癫痫患者颞叶皮层中,MMP-9在mRNA、酶活性较对照组明显升高($P<0.05$)。免疫组化结果显示,在正常皮层中MMP-9弱至中等强度表达于神经元上,偶见胶质细胞表达,而在致痫灶中强表达于锥体神经元和星形胶质细胞上,免疫染色强度明显高于正常皮层[染色强度值:(2.13±0.56) *vs* (1.52±0.69);相对光密度值:(55.60±7.20) *vs* (37.10±8.70);$P<0.05$]。**结论** 难治性颞叶癫痫患者颞叶致痫皮层中MMP-9表达增高可能与癫痫发病密切相关,有可能成为新的难治性癫痫的药物靶点。

[关键词] 难治性颞叶癫痫;金属基质蛋白酶9;RT-PCR;明胶酶谱法;免疫组织化学
[中图法分类号] R749.17;R338.25;R345 [文献标志码] A

Expression of matrix metalloproteinase-9 in the epileptic cortex from adult patients with intractable temporal lobe epilepsy

Li Song, Yu Sixun, He Jiaojiang, Zhang Chunqing, Shu Haifeng, Yin Jinbo, Liu Shiyong, An Ning, Yang Hui (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the epileptic cortex from adult patients with intractable temporal lobe epilepsy (TLE) and to explore the potential role of MMP-9 in intractable epilepsy. **Methods** Twenty-four samples of temporal cortices from intractable TLE and fifteen cases of non-epileptic normal brain tissues were collected. The expression of MMP-9 in the samples was examined by RT-PCR, gelatin zymography and immunohistochemistry. **Results** The mRNA level and activity of MMP-9 were significantly higher in the epileptic cortices than in the control cortices (CTX) ($P<0.05$). The immunohistochemical results showed that MMP-9 was weakly or moderately expressed in neurons and occasionally expressed in glial cells in the CTX. However, strong expression of MMP-9 was observed in pyramidal neurons and astrocytes in the epileptic cortices. The intensity of immunostaining was significantly higher in the epileptic cortices than in the CTX (intensity score: 2.13±0.56 *vs* 1.52±0.69; ratio of mean optical density: 55.60±7.20 *vs* 37.10±8.70; $P<0.05$). **Conclusion** The increased expression of MMP-9 in temporal epileptic cortex might be closely involved in the pathogenesis of intractable epilepsy, suggesting that MMP-9 might be a new potential drug target for intractable epilepsy treatment.

[**Key words**] intractable temporal lobe epilepsy; matrix metalloproteinase-9; RT-PCR; gelatin zymography; immunohistochemistry

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071043). Corresponding author: Yang Hui, Tel: 86-23-68755610, E-mail: huiyang64@yahoo.com

颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy,TLE)是局灶性癫痫的主要类型之一,其病因未明,发病机制不清,是临床最常见的成人难治性癫痫综合征。既往对其癫痫发病机制的研究主要集中在与突触环路兴奋性抑制性相关的神经递质受体、离子通道的改变,近来研究发现细胞外基质分子可能在癫痫的发生、发展中起着重要的作用[1]。金属基质蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)是一个经典的细胞外蛋白酶,在中枢神经系统发育(如小脑皮质发育[2]、树突发育[3]等)、疾病病理生理过程(如脑缺血[4]、脑肿瘤[5-6]、感染[7]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071043)
[通信作者] 杨 辉,电话:(023)68755610,E-mail: huiyang64@yahoo.com

等)中发挥重要作用。同时,动物模型证实高表达 MMP-9 可改变神经环路的突触结构,与癫痫发生有着密切的关系[8-9]。然而,MMP-9 在成人难治性癫痫综合征中如何表达?与癫痫的发生有何关系?本研究采用 RT-PCR、明胶酶谱法和免疫组化方法检测 MMP-9 在难治性颞叶癫痫患者颞叶皮层的表达情况,探讨其在癫痫发生中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源及临床资料

收集新桥医院神经外科 2010 年 6 月至 2011 年 6 月明确诊断为药物难治性颞叶癫痫患者的手术切除标本 18 例。其中男性 8 例,女性 10 例;年龄 18 ~ 46(26.0 ± 4.6)岁,病程 5 ~ 20 年。所有手术患者均符合我们先前报道的手术适应证:①严重影响患者生活的难以控制的癫痫发作;②规律服用 2 种或 2 种以上一线抗癫痫药物,血药浓度监测在正常有效浓度范围内,发作仍控制不佳(至少 1 个月 1 次)1 年以上者;③头颅 CT 或 MRI 检查排除占位性病变以及其他神经系统疾病;④手术前 1 周经过视频脑电图检查或者放置硬膜下电极,术中用皮层电极进行检测,发现有明确和固定的癫痫放电部位,且能进行手术者;⑤患者及家属术前签署知情同意书。对照组正常脑组织(control cortex,CTX)来源于我科标本库中手术减压或清创患者及肿瘤开颅手术为扩大视野必须切除的相对正常颞叶组织,共 12 例。其中男性 8 例,女性 4 例,年龄 17 ~ 50(28.0 ± 6.2)岁,且符合以下条件:①无癫痫病史和家族性遗传病史;②由新桥医院病理科医师通过病理切片证实脑皮层结构无异常;③家属同意,并签署知情同意书。

实验经本院伦理委员会许可,获得使用人体组织的书面同意书,医疗记录仅用于研究目的。所有组织的获取与使用符合赫尔辛基(Helsinki)申明的要求。将收集的病理标本中出血、电灼的组织除去,等渗盐水冲洗干净后一部分用甲醛溶液固定,石蜡包埋,所有载玻片均经过多聚赖氨酸包被处理以防脱片,连续切取约 5.0 μm 的切片备用。另一部分组织液氮速冻后存入 -80 ℃冰箱,用于后续分子生物学实验及酶谱检测。

1.2 主要试剂及仪器

RT-PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成;MMP-9 酶谱检测试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司;兔抗人 MMP-9、小鼠抗人神经元核蛋白(NeuN)购自美国 Millipore 公司;Cy3 标记小鼠抗人神经胶质酸性蛋白(GFAP)购自美国 Sigma 公司;Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Invitrogen 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉公司;羊抗兔 SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司;DAPI 购自上海碧云天公司;MK3 酶标仪购自芬兰 Thermo 公司;凝胶成像系统购自美国柯达公司;Mini-Port 垂直电泳系统购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 RT-PCR 检测 MMP-9 mRNA 水平

Trizol 一步法提取 100 mg 组织总 RNA,并进行 RNA 样品的纯度和浓度鉴定,选取 $D(260)/D(280)$ 比值为 1.9 ~ 2.1 的样品进行下一步实验。选取 1 μg RNA 样品逆转录 cDNA,以 cDNA 产物为模板进行 RT-PCR。RT-PCR 引物序列、PCR 扩增产物大小见表 1。PCR(40 μl 体系)反应条件:预变性 94 ℃ 5 min、94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 60 s(30 个循环)、终末延伸 72 ℃ 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,加样量为 10 μl,电压 120 V,电泳完毕后在溴化乙锭(EB)中染色,在紫外灯下观察结果并照相。图像采用 Quantity One 软件测定各条带(MMP-9 与内参 β-actin)的灰度值,比较二者的比值。

表 1 RT-PCR 引物序列及 PCR 扩增产物大小

目的基因	引物序列	扩增产物大小
MMP-9	上游:5′-GCACCACCACAACATCACCTAT-3′	289 bp
	下游:5′-CAGGGACCACAACTCGTCATC-3′	
β-actin	上游:5′-GCACCACACCTTCTACAATGAGC-3′	163 bp
	下游:5′-TAGCACAGCCTGGATAGCAACG-3′	

1.4 酶谱法检测 MMP-9 活性

冰面上提取 100 mg 组织总蛋白,不加热变性,BCA 法检测蛋白浓度。制备含 2% 明胶的 8% SDS-PAGE 凝胶。取阳性对照和待测样品分别 1∶1稀释于不含还原剂的上样缓冲液,混合后直接上样。每孔上样蛋白 10 μg。恒压电泳(90 mV 30 min,120 mV 50 min),溴酚蓝跑出凝胶前沿时结束电泳。去除浓缩胶,将分离胶放入容器中,先用适量蒸馏水冲洗凝胶,然后加入 10 ml Buffer A,室温漂洗凝胶 2 次,每次 15 min。倒掉 Buffer A,加入 10 ml Buffer B,室温孵育 4 h。倒掉 Buffer。加入 SDS-PAGE 凝胶蛋白质考马斯亮蓝染色液水平摇床上染色 120 min 后,再采用脱色液(甲醇浓度为 25%,乙酸浓度为 10%)进行脱色 60 min。将凝胶放在扫描仪上扫描。用非透射光扫描,显示调整为灰度。并分析条带累积光密度(integrated optical density,IOD)值。

1.5 免疫组化检测 MMP-9 表达分布

石蜡切片常规脱蜡至水,3% 双氧水封闭内源性过氧化物酶,微波抗原修复 20 min。自然冷却后正常山羊血清(含 0.3% Triton X-100)37 ℃封闭 30 min,加入抗体(MMP-9,1∶100)4 ℃过夜。室温复温 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,山羊抗兔二抗,37 ℃孵育 1 h,漂洗 3 次,加入 SABC 试剂,37 ℃孵育 1 h。显色试剂为高敏感二氨基联苯胺(DAB)。苏木精复染细胞核,脱水透明封片,显微镜下观察。阴性对照取相同量的一抗稀释液代替 MMP-9 抗体,其余步骤同上。

兔抗 MMP-9 抗体(1∶100)分别与小鼠抗 GFAP(1∶500)、小鼠抗 NeuN(1∶100)混合后加入切片,4 ℃冰箱孵育过夜。室温复温 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次。Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠(1∶500)与 FITC 标记山羊抗兔 IgG(1∶500)混合后加入,37 ℃孵育 1 h。使用 DAPI 复染细胞核,避光晾干后使用抗荧光淬灭封片剂封片。使用激光共聚焦显微镜(Leica TCS-TIV,德国)扫描并拍照。

1.6 免疫组化染色评估分析

每个标本随机选取 5 张切片,在 ×200 视野下,于皮质逐层分别随机选取 10 个非重复区域,通过半定量“3 分”模式计算染色强度,即:-,阴性(0 分);+,弱阳性(1 分);++,中等(2 分);+++,强阳性(3 分);在选定的区域计算染色强度值(intensity score,IR)。此外,利用吸光密度测量法(optical density measurement)定量评估免疫组化结果。使用装备了数码照相机的光学显微镜(Leica,德国)获取 ×100 视野下 10 个连续但不

重叠区域,通过 Image Pro-Plus 图像分析软件,分别测量阳性结果光密度平均值与阴性背景光密度平均值,计算二者比值即相对光密度值(ratio of mean optical density,ODR)。

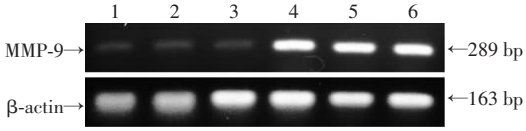
1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.10 软件对重复测量数据的独立样本进行 t 检验。

2 结果

2.1 正常对照组与病灶组 MMP-9 mRNA 的表达

如图 1 所示,在所有实验组都可以观察到预期的扩增条带。灰度分析结果显示,TLE 组 MMP-9 的相对灰度值显著高于 CTX 组(0.22 ± 0.04 *vs* 0.10 ± 0.02,P = 0.006)。提示 MMP-9 mRNA 在 TLE 皮质致痫灶中的表达上调。

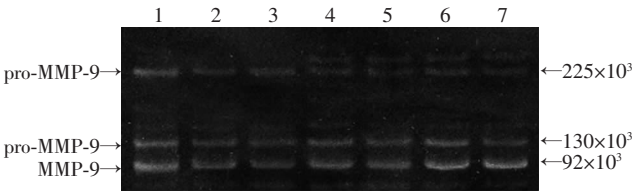


1 ~ 3:CTX 组;4 ~ 6:TLE 组

图 1 RT-PCR 检测 MMP-29 mRNA 表达

2.2 正常对照组与病灶组 MMP-9 酶活性水平检测

如图 2 所示,CTX 与 TLE 皮层均能观察到 MMP-9 活性水解底物的条带。累积光密度结果显示,TLE 皮层内 MMP-9(92×10^3)和 pro-MMP-9(130×10^3,225×10^3)活性水平显著高于 CTX 组(13 503 ± 1 529 *vs* 8 698 ± 1 017,P = 0.015)。提示 MMP-9 活性在 TLE 皮质致痫灶中显著增高。



1:阳性对照;2 ~ 4:CTX;5 ~ 7:TLE

图 2 酶谱法检测 MMP-9 在正常组和病灶组的表达

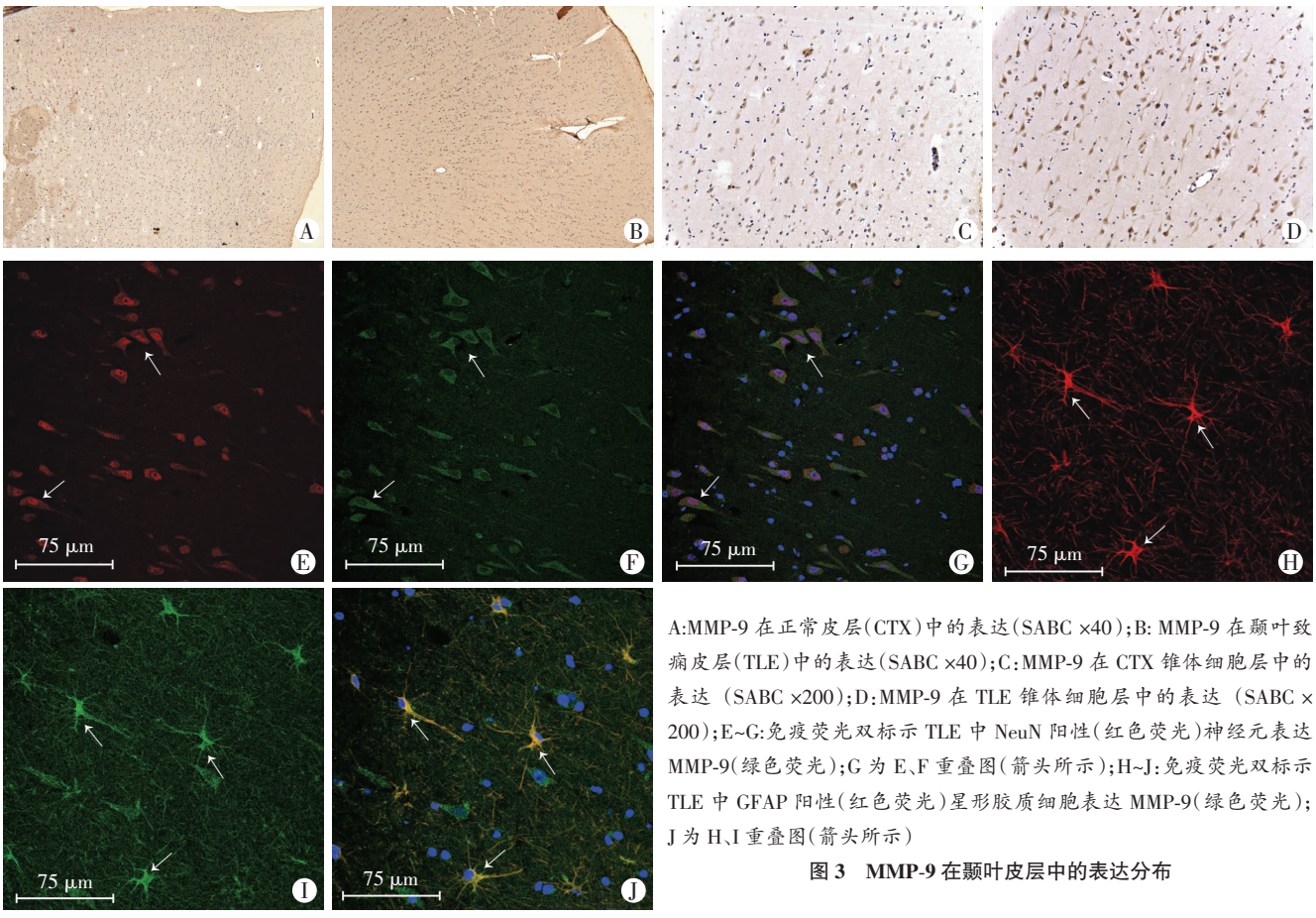
2.3 免疫组织化学观察 MMP-9 的表达

低倍镜下,正常大脑皮质中 MMP-9 广泛表达皮层Ⅰ ~ Ⅵ层(图 3A)。然而,在 TLE 病理切片上,我们发现 MMP-9 高表达于病灶皮质Ⅰ ~ Ⅵ层中(图 3B)。高倍镜下,在 CTX 中,MMP-9 主要呈中等强度表达于神经元胞体和突起上,偶见胶质细胞表达(图 3C)。在 TLE 病灶中,MMP-9 在锥体神经元上呈强阳性表达,胶质细胞表达强度也较 CTX 明显增高(图 3D)。免疫组化染色评估分析提示,染色强度值(IR)和相对光密度值(ODR)均明显高于 CTX 皮质(P < 0.05)(表 2)。进一步的免疫荧光双标结果显示,TLE 病灶中 NeuN 阳性神经元和 GFAP 阳性星形胶质细胞强表达 MMP-9(图 3E ~ J)。

表 2 MMP-9 免疫反应强度评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	染色强度值(IR)	相对光密度值(ODR)
CTX 组	12	1.52 ± 0.69	37.10 ± 8.70
TLE 组	18	2.13 ± 0.56[a]	55.60 ± 7.20[a]

a: P < 0.05,与 CTX 组比较



A:MMP-9 在正常皮层(CTX)中的表达(SABC ×40);B: MMP-9 在颞叶致痫皮层(TLE)中的表达(SABC ×40);C:MMP-9 在 CTX 锥体细胞层中的表达 (SABC ×200);D:MMP-9 在 TLE 锥体细胞层中的表达 (SABC × 200);E~G:免疫荧光双标示 TLE 中 NeuN 阳性(红色荧光)神经元表达 MMP-9(绿色荧光);G 为 E、F 重叠图(箭头所示);H~J:免疫荧光双标示 TLE 中 GFAP 阳性(红色荧光)星形胶质细胞表达 MMP-9(绿色荧光);J 为 H、I 重叠图(箭头所示)

图 3 MMP-9 在颞叶皮层中的表达分布

3 讨论

以复杂部分性发作为主要表现的颞叶癫痫是常见的成人难治性癫痫,对现有的抗痫药物多不敏感,常需手术治疗[10]。癫痫的发生、发展过程中常伴随着显著的神经环路重构、突触重塑等病理改变,这些改变跟细胞外基质变化密切相关。近年来,国内外的研究发现细胞外基质分子在癫痫的发生、发展中起着重要的作用[1]。

金属基质蛋白酶家族是一类细胞外蛋白酶,在各种病理生理过程中发挥着重要的作用。作为最被大家熟知和认识的一员——MMP-9,动物模型证实其跟颞叶癫痫关系十分密切。Wilczynski 等[8]在戊四氮点燃的颞叶癫痫模型中发现,MMP-9 敲除小鼠较野生型小鼠具有更高的癫痫发作阈值,即癫痫发作易感性降低。进一步对其机制的研究发现,神经元来源的 MMP-9 可以通过促进海马苔藓纤维发芽,在海马齿状回形成异常的兴奋性突触环路,最终导致难治性癫痫的发生。同时,来自临床的证据也支持 MMP-9 可能是癫痫发生的一个高危因素。在脑膜炎患者,脑脊液中 MMP-9 含量较高者相对含量较低者往往遗留更多的神经系统并发症,包括癫痫发作[11]。我们利用 RT-PCR 和明胶酶谱法发现 MMP-9 在转录水平及蛋白酶活性水平都较正常对照皮层显著升高,提示 MMP-9 表达上调可能是难治性颞叶癫痫的发生机制之一。

MMP-9 作为一个蛋白水解酶,可通过水解其酶底物发挥作用。在正常生理情况下,大脑皮质内的 MMP-9 主要来源于神经元,其中胶质细胞少量分泌。然而,在我们的免疫组化结果中,致痫灶中的神经元和星形胶质细胞都不同程度的高表达 MMP-9,提示他们可能通过分泌 MMP-9 影响病灶微环境中神经环路的兴奋性。既往的研究发现,血脑屏障破坏在 TLE 的发病中起着重要作用[12],而构成血脑屏障的各种细胞外基质胶原恰恰是 MMP-9 的底物,提示 MMP-9 可能通过破坏血脑屏障促进 TLE 发生。最新的研究发现,在颞叶癫痫的动物模型上,神经元和星形胶质细胞来源的 MMP-9 可将脑源性神经营养因子前体形式(pro-BDNF)水解成成熟形式(mature BDNF),BDNF 进一步作用于酪氨酸蛋白激酶受体促进癫痫发生[13]。

需要注意的是,在本研究中我们运用的对照来源于手术减压或清创患者及肿瘤开颅手术为扩大视野必须切除的相对正常颞叶组织,且病例证实无异常。鉴于相关研究报道创伤和肿瘤病灶均有 MMP-9 的异常表达,因此我们选取的是离病灶较远的相对正常组织,并且取材时间是在患者伤后 6 h 内,在此期间病灶周围组织的 MMP-9 表达量并无显著性变化[14]。尽管这样,该对照组织可能会导致实验结果产生潜在性的偏倚,也是需要考虑的。

综上,本研究结果发现 MMP-9 异常高表达于难治性颞叶致痫灶中,免疫组化结果表明神经元和星形胶质细胞是其主要来源,提示 MMP-9 与颞叶癫痫的发生有着密切关系。但 MMP-9 的具体作用机制以及其可否成为难治性癫痫的药物治疗靶点,还有待进一步的实验证实。

参考文献:

[1] Dityatev A. Remodeling of extracellular matrix and epileptogenesis[J]. Epilepsia, 2010, 51 Suppl 3: 61 – 65.
[2] Ayoub A E, Cai T Q, Kaplan R A, *et al*. Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex[J]. J Comp Neurol, 2005, 481(4): 403 – 415.
[3] Wang X B, Bozdagi O, Nikitczuk J S, *et al*. Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(49): 19520 – 19525.
[4] Zhao B Q, Wang S, Kim H Y, *et al*. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke[J]. Nat Med, 2006, 12(4): 441 – 445.
[5] Yong V W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(12): 931 – 944.
[6] Das G, Shiras A, Shanmuganandam K, *et al*. Rictor regulates MMP-9 activity and invasion through Raf-1-MEK-ERK signaling pathway in glioma cells[J]. Mol Carcinog, 2011, 50(6): 412 – 423.
[7] Ichiyama T, Morishima T, Kajimoto M, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in influenza-associated encephalopathy[J]. Pediatr Infect Dis J, 2007, 26(6): 542 – 544.
[8] Wilczynski G M, Konopacki F A, Wilczek E, *et al*. Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis[J]. J Cell Biol, 2008, 180(5): 1021 – 1035.
[9] Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory[J]. J Neurosci, 2006, 26(7): 1923 – 1934.
[10] 杨华, 杨柳, 付刘霞, 等. 磁共振波谱分析在颞叶癫痫的临床应用价值[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(20): 1883 – 1885.
[11] Suenaga N, Ichiyama T, Kubota M, *et al*. Roles of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures[J]. J Neurol Sci, 2008, 266(1/2): 126 – 130.
[12] van-Vliet E A, da-Costa-Araujo S, Redeker S, *et al*. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy[J]. Brain, 2007, 130(Pt 2): 521 – 534.
[13] Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus[J]. J Neurosci, 2011, 31(36): 12963 – 12971.
[14] Hayashi T, Kaneko Y, Yu S, *et al*. Quantitative analyses of matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in adult rats[J]. Brain Res, 2009, 1280: 172 – 177.

(**收稿**:2011-11-21;**修回**:2011-12-16)
(编辑 王 红)