

MMP-9 及 MCP-1 在单纯疱疹病毒性脑炎患者 脑脊液中的表达及意义*

周瑜¹ 曾艳平¹ 罗瑛¹ 翁超¹ 卢祖能¹

[摘要] **目的:**观察单纯疱疹病毒性脑炎(HSE)患者脑脊液中 MMP-9 与 MCP-1 的浓度变化并探讨其意义。**方法:**选择 HSE 患者 30 例(HSE 组),非 HSE 患者 28 例为对照组,应用 ELISA 法检测血清和脑脊液中 MMP-9 与 MCP-1 浓度。患者脑脊液以及加入 MMP-9 抑制剂 SB-3CT(10 μmol/L)的脑脊液分别作用于海马脑片后,TUNEL 染色检测神经细胞凋亡。**结果:**HSE 组脑脊液中 MMP-9 和 MCP-1 含量均显著高于对照组($P < 0.01$)。并且 MMP-9 与 MCP-1 的表达水平与脑脊液中白细胞及蛋白含量均呈正相关。抑制脑脊液中 MMP-9 表达可以减少神经细胞的凋亡。**结论:**脑脊液中 MMP-9 与 MCP-1 参与了 HSE 的病理生理过程,可以作为 HSE 的临床诊断与干预指标。

[关键词] 单纯疱疹病毒性脑炎;脑脊液;基质金属蛋白酶 9;单核细胞趋化蛋白-1

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2020.03.002

[中图分类号] R512.3 **[文献标志码]** A

Expression of MMP-9 and MCP-1 in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis

ZHOU Yu ZENG Yanping LUO Ying WENG Chao LU Zuneng

(Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430060, China)

Corresponding author: ZHOU Yu, E-mail: zhouyu99131@126.com

Abstract Objective: To investigate MMP-9 and MCP-1 levels in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis, and to explore the clinical relationship. **Method:** Serum and cerebrospinal fluid MMP-9 and MCP-1 concentrations in serum and cerebrospinal fluid were detected by enzyme-linked immunosorbent assay in 30 cases with herpes simplex encephalitis(HSE group), and were compared to those in 28 cases with no HSE for control. After the patients' cerebrospinal fluid and those added with MMP-9 inhibitor SB-3CT(10 μmol/L) were applied to the hippocampal slices. The apoptosis of neurons was detected by TUNEL staining. **Result:** The CSF levels of MMP-9 and MCP-1 in HSE patients were obviously higher than those in the control group($P < 0.01$), and both of the expressions of MMP-9 and MCP-1 were positively correlated with the cell and protein levels in CSF ($P < 0.01$). Inhibition of MMP-9 expression can reduce neuronal apoptosis. **Conclusion:** MMP-9 and MCP-1 in cerebrospinal fluid participated in the pathophysiological process of HSE, and may be used as potential markers for clinical diagnosis of HSE.

Key words herpes simplex encephalitis; cerebrospinal fluid; MMP-9; MCP-1

单纯疱疹病毒性脑炎(herpes simplex encephalitis, HSE)是临床上常见的散发、致死性神经系统感染性疾病,主要由 1 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus 1, HSV-1)侵入颅内引起。其病变最常累及颞叶、额叶与边缘系统脑组织,导致脑细胞水肿和出血性坏死,表现为精神行为异常、肢体瘫痪或癫痫发作。目前 HSE 患者临床病死率仍较高,并且常遗留严重的神经功能障碍,然而 HSV-1 导致脑组织损伤的具体病理机制尚未阐明^[1-3]。本

文旨在观察 30 例 HSE 患者脑脊液中基质金属蛋白酶 9(MMP-9)及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达的变化,并探讨其在 HSE 发病中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院神经内科 2014-08—2019-06 期间收治的 30 例 HSE 病例。患者均符合《实用神经病学》第四版提出的 HSE 诊断标准。本组 30 例患者中,男 16 例,女 14 例;年龄 20~65 岁,平均 34.6 岁;其中 24 例急性起病,6 例患者为亚急性起病。临床症状以发热、颅内压增高症状(头痛、呕吐)、脑膜刺激征及脑实质损害症状(如精神行为异常、意

*基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No: 81701196)

¹武汉大学人民医院神经内科(武汉,430060)

通信作者:周瑜, E-mail: zhouyu99131@126.com

识障碍、癫痫、肢体偏瘫等)为主要表现。脑脊液检查表现为脑脊液压力增高、白细胞增多(以淋巴细胞为主)以及蛋白增高,脑脊液病原学检测均为HSV-1阳性。对照组28例,男15例,女13例;年龄18~70岁,平均36.5岁,临床表现类似脑膜炎(主要为发热、头痛或情绪障碍),其中上呼吸道感染10例,紧张性头痛10例,偏头痛8例,行脑脊液常规、生化检查无异常,脑电图检查正常,病原学检测均为HSV-1阴性。两组病例间一般资料的差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 血和脑脊液中MMP-9、MCP-1检测

所有病例均于入院后24h内行腰椎穿刺检查,取脑脊液约15mL,一部分行常规、生化以及病原学检测,剩余部分于室温下、3000 r/min离心15 min,收集上清液,−70℃保存备用。同时抽取静脉血4 mL,室温下静置2 h后,4℃、2000 r/min离心20 min后取上清,置−70℃冰箱中保存待测。应用MMP-9、MCP-1定量ELISA检测试剂盒,根据梯度标准品定值和吸光度值绘制标准曲线,根据每孔最后所得吸光度值通过标准曲线计算出每份标本MMP-9与MCP-1的浓度。

1.3 海马脑片制备与分组

将出生6~10 d的C57BL/6乳鼠用75%乙醇浸泡消毒后,断头取脑组织,迅速置于预冷的解剖缓冲液中,分离出完整的海马,然后将海马置于振动切片机的载物平台上,在解剖缓冲液中连续切片,厚度300 μm。将漂洗过的海马脑片置于6孔培养板内的膜插件上,于37℃、5% CO₂的标准培养箱内孵育,隔日换培养液。将培养2周的海马脑片分为3组:对照组脑脊液作用组,HSE脑脊液作用组以及MMP-9抑制剂SB-3CT干预组。作用24 h后TUNEL法检测神经细胞凋亡。

1.4 海马脑片TUNEL染色

海马脑片经4%的多聚甲醛固定,4℃过夜,置入30%蔗糖溶液中,4℃沉糖后,以片厚20 μm冷冻连续切片。TUNEL试剂盒检测神经细胞凋亡。切片浸入乙醇:乙酸(2:1)溶液中,−20℃作用5 min,3% H₂O₂封闭10 min,蛋白酶K作用后滴加地高辛标记的dUTP与末端转移酶,作用120 min,再加亲和素过氧化酶SABC,作用30 min,最后DAB显色。

1.5 统计学方法

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0统计软件分析数据,两组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用直线相关分析法研究血和脑脊液中MMP-9和MCP-1浓度与脑脊

液中细胞数及蛋白含量的相关性。

2 结果

2.1 血清和脑脊液中MMP-9含量

ELISA检测HSE患者脑脊液中MMP-9含量明显高于对照组($P<0.01$),血清中MMP-9水平测定在两组病例中无明显变化,见表1。

表1 患者血清和脑脊液中MMP-9含量

组别	例数	ng/mL	
		血清	脑脊液
HSE组	30	10.46±3.52	116.48±25.83 ¹⁾
对照组	28	9.58±2.87	4.92±1.05

与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

2.2 血清和脑脊液中MCP-1含量

ELISA检测HSE患者脑脊液中MCP-1表达明显高于对照组($P<0.01$),两组患者血清中MCP-1含量无明显变化,见表2。

表2 患者血清和脑脊液中MCP-1含量

组别	例数	pg/mL	
		血清	脑脊液
HSE组	30	81.34±8.45	163.76±18.52 ¹⁾
对照组	28	78.62±7.92	32.54±8.69

与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

2.3 脑脊液中MMP-9和MCP-1与脑脊液白细胞、蛋白含量的相关性

相关性分析表明,HSE患者脑脊液中MMP-9浓度与脑脊液中白细胞及蛋白含量均呈正相关($r=0.819、0.931,P<0.01$),MCP-1表达亦与脑脊液白细胞及蛋白含量呈正相关($r=0.842、0.779,P<0.01$),见图1。

2.4 MMP-9对神经细胞凋亡的影响

我们进一步研究脑脊液中MMP-9对神经细胞的影响。HSE患者脑脊液作用于海马脑片后,可见大量TUNEL阳性细胞,加入MMP-9抑制剂SB-3CT(10 μmol/L)组海马脑片中TUNEL阳性表达细胞明显减少(图2)。

3 讨论

目前研究表明,在HSE病理过程中HSV-1主要通过2种途径损伤神经组织:①病毒自身复制增殖直接破坏神经元以及神经胶质细胞;②病毒激活了宿主的免疫炎症反应并不断级联扩大,引起脑组织继发的免疫损伤,包括脑水肿、脑出血和颅内压

增高^[4-5]。在众多导致脑损伤的病理因子中,基质金属蛋白酶(MMPs)的作用受到越来越多的关注。MMPs 是一组降解细胞外基质成分的重要蛋白分解酶,由神经元-胶质细胞-脑血管内皮细胞构成的

神经血管单元中富含多种细胞外基质成分如纤粘连蛋白、IV型胶原、蛋白聚糖等,在维护血脑屏障结构完整性的过程中发挥重要作用。

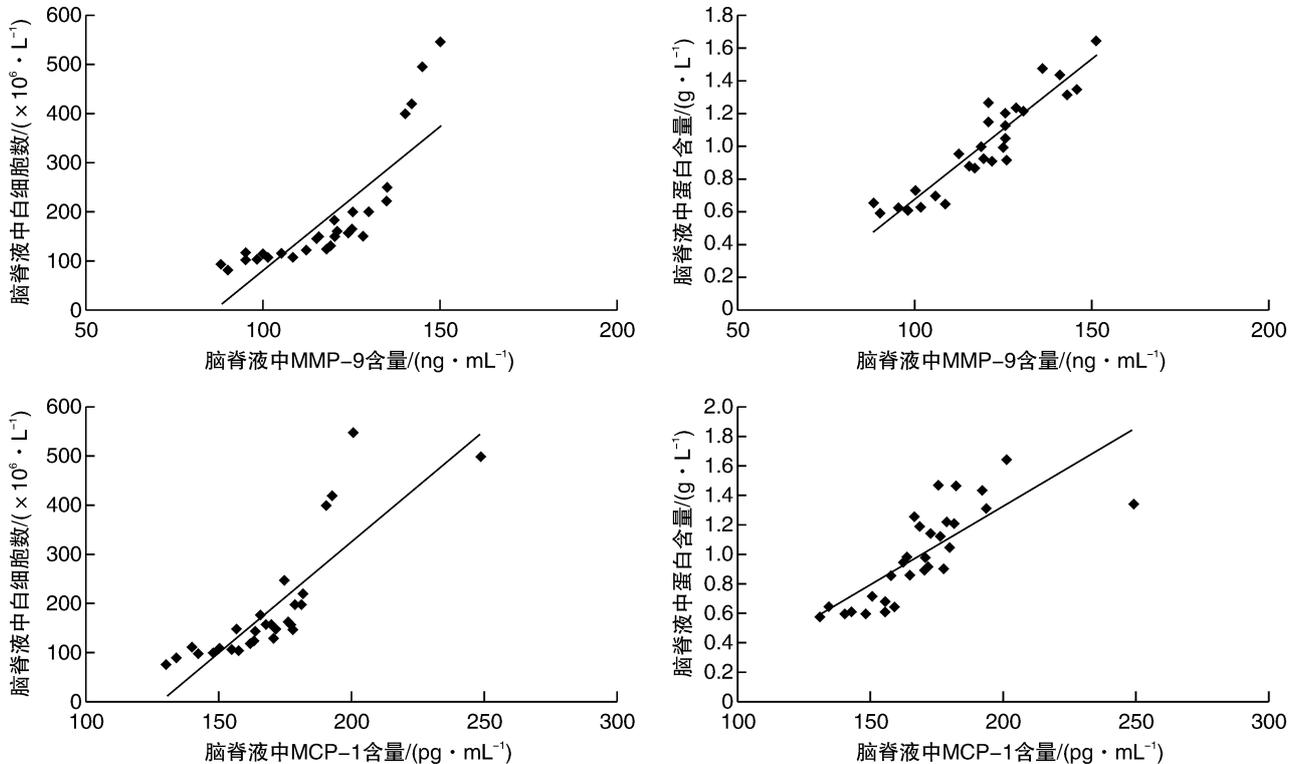


图 1 脑脊液 MMP-9 和 MCP-1 与白细胞、蛋白含量的相关性分析

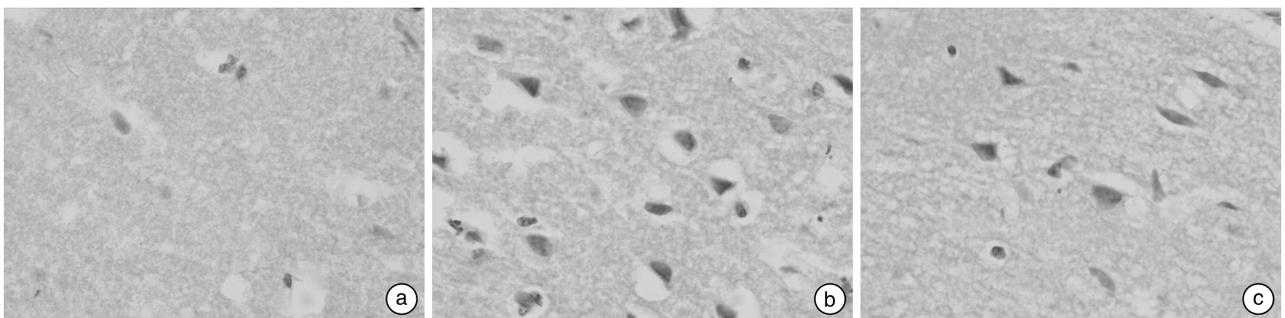


图 2 海马脑片 TUNEL 染色对照组脑脊液作用于脑片后可见少许 TUNEL 阳性细胞(a),HSE 患者脑脊液作用后可见大量 TUNEL 阳性细胞(b),SB-3CT 组 TUNEL 阳性细胞明显减少(c)(×400)

血脑屏障结构受到破坏导致通透性增加是中枢神经系统病理损伤发生发展的重要环节,MMPs 尤其是 MMP-9 在破坏神经血管单元结构以及其后形成继发性脑水肿等过程中起着关键作用。此外,随着血脑屏障通透性的增加,外周炎性细胞侵入中枢神经组织,分泌大量促炎症因子,从而进一步加重脑细胞的损害^[6]。在小鼠脑缺血模型中研究者观察到脑组织中 MMP-9 表达增加引起血脑屏障早期破坏,基因敲除降低 MMP-9 水平可以显著减轻血脑屏障的通透性及炎症反应,保护小鼠神

经功能损害^[7]。

Sellner 等^[8] 和我们的研究^[9] 均发现 MMP-9 的早期升高在小鼠 HSE 的病理损伤过程中起关键作用,脑组织中 MMP-9 表达水平及活性在 HSE 小鼠发病第 3 天即显著升高,降解血脑屏障细胞外基质的主要成分 IV 型胶原,从而导致脑水肿等一系列病理损伤的发生,脑炎后脑水肿以及颅内高压形成等并发症将直接影响到患者神经功能的康复与生存率。本研究发现 HSE 患者脑脊液中 MMP-9 浓度较对照组显著增高,MMP-9 抑制剂 SB-3CT

处理可明显减少海马脑片中神经细胞的凋亡,进一步说明 MMP-9 在 HSE 病理过程中除了影响血脑屏障的完整性,还可以直接作用于脑组织并影响神经细胞的存活,其相关分子机制尚有待进一步研究。

MCP-1 是 C-C 趋化因子家族的重要分子,具有多种生物学功能包括募集、激活单核细胞,并且在启动及维持炎症反应的过程中起着重要作用。研究发现中枢神经系统中神经元、星形胶质细胞、内皮细胞及活化的巨噬细胞/小胶质细胞为脑组织中 MCP-1 主要细胞来源,正常情况下中枢神经系统的免疫细胞多处于静止状态,不表达 MCP-1,而当病原体入侵中枢神经系统时,多种神经激活以及免疫细胞被激活,从而分泌产生 MCP-1^[10]。

MCP-1 通过与 CC 类趋化因子受体 CCR2、CCR9 相结合发挥生物学作用,而 CCR2 是 MCP-1 主要的高亲和性受体。MCP-1 与细胞表面 CCR2 结合后,通过受体变构及 GTP-蛋白偶联的磷脂酰肌醇信号通路,激活双信使系统,发挥多种生物学效应,可调控机体免疫反应、影响内环境的稳定以及损伤修复进程。C57BL/6 小鼠中枢神经系统的星型胶质细胞、小胶质细胞中均存在丰富的 CCR2 受体表达,提示 MCP-1-CCR2 信号途径可能参与了脑组织免疫炎症反应的发生。此外中枢神经系统中增高的 MCP-1 的水平可以趋化外周血液中的单核-巨噬细胞通过受损的血脑屏障迁移、聚集到脑组织病变部位,进一步发挥重要的免疫损伤效应^[11-12]。本实验中,我们观察到 HSE 患者脑脊液中 MCP-1 浓度较对照组显著增高,并且 HSE 患者血清中表达水平明显低于脑脊液中浓度,说明脑脊液中 MCP-1 主要在中枢神经系统内合成。实验中我们还发现脑脊液中 MCP-1 水平与脑脊液中白细胞及蛋白含量均呈正相关,可能与 HSE 患者长期持续存在免疫激活反应以及严重后遗症密切相关。

目前临床上治疗 HSE 的手段有限且效果欠佳,我们的研究发现 HSV-1 可能通过激活脑组织巨噬细胞/小胶质细胞产生过量的 MMP-9 与 MCP-1 造成神经组织的病理损害,通过检测脑脊液中 MMP-9 及 MCP-1 浓度可以进一步指导 HSE 的临床诊断与治疗,如果在合适的时机适度地抑制 MMP-9 及 MCP-1 的表达与激活,可能有助于改善 HSE 患者的临床转归。另外,本研究尚存在一定的局限性,在其他病原体(如肠道病毒)所致脑炎患者脑脊液中是否同样存在 MMP-9 及 MCP-1 的变化尚不清楚,我们将进一步予以探讨以期达到精准化治疗的目的。

参考文献

- [1] Rabinstein AA. Herpes Virus Encephalitis in Adults: Current Knowledge and Old Myths[J]. *Neurol Clin*, 2017,35(4):695-705.
- [2] Modi S, Mahajan A, Dharaiya D, et al. Burden of herpes simplex virus encephalitis in the United States [J]. *J Neurol*, 2017,264(6):1204-1208.
- [3] Koyanagi N, Imai T, Shindo K, et al. Herpes simplex virus-1 evasion of CD8+ T cell accumulation contributes to viral encephalitis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10):3784-3795.
- [4] Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management [J]. *Neurotherapeutics*, 2016,13(3):493-508.
- [5] Zhou Y, Zeng YP, Zhou Q, et al. The effect of cyclin-dependent kinases inhibitor treatment on experimental herpes simplex encephalitis mice [J]. *Neurosci Lett*, 2016,627:71-76.
- [6] Brilha S, Ong CWM, Weksler B, et al. Matrix metalloproteinase-9 activity and a downregulated Hedgehog pathway impair blood-brain barrier function in an in vitro model of CNS tuberculosis [J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):16031.
- [7] Chaturvedi M, Kaczmarek L. Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2014,49(1):563-573.
- [8] Sellner J, Simon F, Meyding-Lamade U, et al. Herpes-simplex virus encephalitis is characterized by an early MMP-9 increase and collagen type IV degradation [J]. *Brain Res*, 2006,1125(1):155-162.
- [9] Zhou Y, Zeng YP, Zhou Q, et al. The effect of captopril on the expression of MMP-9 and the prognosis of neurological function in herpes simplex encephalitis mice [J]. *Neurol Res*, 2016,38(8):733-739.
- [10] Kirkley KS, Popichak KA, Afzali MF, et al. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1):99.
- [11] Al-Obaidi MMJ, Desa MNM. Mechanisms of Blood Brain Barrier Disruption by Different Types of Bacteria, and Bacterial-Host Interactions Facilitate the Bacterial Pathogen Invading the Brain [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018,38(7):1349-1368.
- [12] Uyangaa E, Choi JY, Patil AM, et al. Dual TLR2/9 Recognition of Herpes Simplex Virus Infection Is Required for Recruitment and Activation of Monocytes and NK Cells and Restriction of Viral Dissemination to the Central Nervous System [J]. *Front Immunol*, 2018,9:905.