

溃疡性结肠炎患者外周血中 MMP-2、MMP-9 与肠黏膜通透性关系的临床研究

薛永举^{1,2} 梅 俏¹ 丁 浩¹ 胡 静¹ 刘晓昌¹ 许建明¹ 胡乃中¹

摘要 目的 探讨溃疡性结肠炎(UC)患者中基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9水平与肠黏膜通透性的临床关联,为UC的发病机制及治疗提供可靠的参考指标。方法 采用ELISA法检测38例UC患者(UC组)和30例正常对照者(正常对照组)外周血中MMP-2、MMP-9水平;采用高效液相色谱示差法检测UC组和正常对照组口服乳果糖(L)和甘露醇(M)测试液后尿液中L、M含量,计算L/M比值。结果 UC组外周血中MMP-2、MMP-9水平显著高于正常对照组($P < 0.05$)。UC组外周血中MMP-2、MMP-9水平与UC疾病严重程度及病变范围呈一定相关性;UC组患者尿中L/M比值显著高于正常对照组($P < 0.05$),UC患者外周血中MMP-2、MMP-9水平与肠黏膜通透性改变有良好的相关性。结论 活动期UC患者肠黏膜通透性增高,可能与外周血中MMP-2、MMP-9水平增高有关。

关键词 基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-9;肠黏膜通透性;溃疡性结肠炎

中图分类号 R 574.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0495-04

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是一种反复发作的慢性非特异性肠道炎症性疾病,近年有研究^[1]显示UC患者多存在不同程度的肠黏膜通透性增高的现象。且有研究^[2]表明,肠黏膜通透性的改变可发生在肠道出现明显的炎性改变之前。UC的主要病理损伤涉及细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的更新及结缔组织的重建。ECM是细胞附着的基本框架和代谢场所,其成分的降解与合成处于动态平衡状态,如平衡紊乱将导致器官的各种病理改变,如溃疡形成或器官纤维化^[3-4]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)裂解ECM成分,可通过降解内皮细胞间紧密连接引起血管内皮通透性增加,参与结肠黏膜损伤和并与结肠组织修

复有关^[5]。该研究通过检测UC患者外周血中MMP-2及MMP-9水平,并与UC患者的肠黏膜通透性及主要临床特征进行关联分析,以期为UC的发病机制及治疗提供可靠的参考指标。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2010年7月~2012年9月在安徽医科大学第一附属医院诊断为活动性UC患者38例(UC组),男20例,女18例,年龄21~70(34.7 ± 10.3)岁,其诊断标准参考2007年《对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》^[6],排除标准如下:①排除其他自身免疫性疾病;②排除感染性结肠炎:痢疾杆菌感染、沙门氏菌感染、阿米巴感染、血吸虫感染及肠结核等;③排除克罗恩病、大肠癌、肝炎等;④排除真菌性肠炎、出血坏死性肠炎、过敏性紫癜、胶原性结肠炎、结肠憩室、HIV感染合并的结肠炎等。正常对照组30例,其中男16例,女14例,年龄24~59(37.6 ± 8.9)岁。各组间在年龄、性别比较差异无统计学意义。

1.2 主要试剂 人MMP-2、MMP-9酶联免疫检测试剂盒均购自美国R&D公司;乳果糖及甘露醇标准品购自美国Sigma公司;乙腈(色谱纯):美国天地公司产品;乳果糖口服液:荷兰苏威公司;20%甘露醇溶液:安徽双鹤药业股份有限公司。

1.3 主要仪器 酶标仪RS-232:瑞士公司;Agilent1100系列高效液相色谱仪系列配置G1362A示差检测器(美国Agilent公司产品);SB3200超声波清洗器(上海必能信超声有限公司产品);Agilent色谱数据工作站:美国Agilent公司软件(2001-2008)。

1.4 方法

1.4.1 ELISA法检测MMP-2、MMP-9水平 研究对象均于清晨空腹平静状态下抽取5ml肘静脉血,按试剂盒说明书采用双抗体夹心ELISA法检测血浆MMP-2、MMP-9的水平。

1.4.2 尿液标本收集 所有测试者前1d晚上22时起禁食水,次日清晨空腹排空尿液后,口服L和M测试液各50ml,此后禁水30min、禁食2h,收集口服L和M后6h内全部尿液,取其中20ml滴入2%硫柳汞2~4滴作防腐处理后,置-20℃保存待

2013-11-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:09020103010)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,安徽省消化病重点实验室,合肥 230001

²蚌埠医学院第一附属医院消化内科,蚌埠 233003

作者简介:薛永举,男,主治医师;

梅 俏,男,博士,副教授,副主任医师,责任作者,E-mail:

meiqiao@hotmail.com

测^[7] ,后将冰冻贮存样品常温溶化、摇匀、离心 10 min ,以去除沉淀物后加入相应试剂后上机检测。

1.4.3 尿液中 L 和 M 浓度测定方法 采用 HPLC 示差法检测尿液中 L 和 M 浓度并进行方法学评价^[7]。取所有研究对象 1 ml 尿液置于 EP 管中 ,予离心处理 ,离心时间 10 min; 吸取上清液 ,并加入 100 ml 乙腈沉淀蛋白 ,漩涡混合后再次离心、吸取上清液去离子处理后漩涡混合、离心、吸取上清液 ,最后使用水系滤膜过滤样品 ,色谱条件: Hypersil NH₂ 柱(4.6 mm × 250.0 mm 5 μm) ,柱温设置为 25 °C ,示差检测器: 内加热 32 °C ,进样检测乳果糖和甘露醇含量 ,乙腈、水(80 : 20 ,V/V) ,流速 1 ml/min^[8]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,经方差齐性检验后 ,采用 Pearson 等级相关检验行相关性分析。

2 结果

2.1 UC 组临床特征分析 UC 组患者中 ,按严重程度分类: 轻度 12 例(32%) ,中度 14 例(36%) ,重度 12 例(32%) ;按病变范围分类: 全结肠炎 12 例(32%) ,左半结肠炎 8 例(21%) ,直乙状结肠炎 9 例(23%) ,直肠炎 9 例(24%) 。

2.2 两组外周血 MMP-2、MMP-9 水平比较 UC 组外周血中 MMP-2 为(8.34 ± 2.54) pg/L ,MMP-9 为(8.56 ± 2.45) pg/L ,正常对照组 MMP-2 为(1.91 ± 0.30) pg/L ,MMP-9 为(2.14 ± 0.31) pg/L ,UC 组 MMP-2 水平和 MMP-9 水平高于正常对照组($t = 2.414$, $P < 0.05$; $t = 2.576$, $P < 0.05$) 。

2.3 UC 患者外周血 MMP-2、MMP-9 水平与主要临床特征的关联分析 UC 患者外周血中 MMP-2、MMP-9 水平与病变程度和病变范围均呈一定程度相关 ,差异有统计学意义($r = 0.692$, $P < 0.05$; $r = 0.661$, $P < 0.05$) ,见表 1。

2.4 两组 L/M 比值测定 UC 组的 L 和 M 排出的比值(0.057 ± 0.020) 与正常对照组的 L 和 M 排出比值(0.030 ± 0.005) 相比显著升高($P < 0.05$) ,表明 UC 患者肠黏膜通透性明显增高。

2.5 UC 患者的 L/M 测定与主要临床特征的关联分析 UC 患者 L/M 水平与病变程度和病变范围均呈一定程度相关 ,差异有统计学意义($r = 0.794$, $P < 0.05$; $r = 0.728$, $P < 0.05$) ,见表 2。

2.6 UC 组患者外周血 MMP-2、MMP-9 水平与 L/M 比值关联分析 UC 组患者外周血 MMP-2、MMP-9 水平与其 L/M 比值呈一定程度相关 ,差异有统计学意义($r = 0.844$, $P < 0.05$; $r = 0.861$, $P < 0.05$) 。

表 1 UC 组患者血 MMP-2、MMP-9 水平与临床特征分析($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	MMP-2(pg/L)	P 值	F 值	MMP-9(pg/L)	P 值	F 值
严重程度			0.005	147.9		0.007	199.49
轻度	12	4.07 ± 0.70			5.39 ± 0.51		
中度	14	6.12 ± 0.43			8.25 ± 0.54		
重度	12	10.66 ± 1.5			11.47 ± 1.08		
病变范围			0.013	226.28		0.019	208.35
全结肠炎	12	12.37 ± 1.12			13.11 ± 1.07		
左半结肠炎	8	9.56 ± 0.54			9.41 ± 0.53		
直乙状结肠炎	9	6.31 ± 0.61			7.28 ± 0.28		
直肠炎	9	4.14 ± 0.41			5.51 ± 0.64		

表 2 活动期 UC 患者 L/M 比值与临床特征分析($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	L/M 比值	P 值
严重程度			<0.05
轻度	12	0.032 ± 0.008	
中度	14	0.049 ± 0.011	
重度	12	0.067 ± 0.014	
病变范围			<0.05
全结肠炎	12	0.070 ± 0.009	
左半结肠炎	8	0.062 ± 0.006	
直乙状结肠炎	9	0.043 ± 0.009	
直肠炎	9	0.031 ± 0.005	

3 讨论

MMPs 是降解 ECM 成分的蛋白水解酶 ,MMPs 的活性增加可能会导致结肠的上皮损伤 ,在与炎症有关的组织破坏和重构中发挥了重要作用^[9]。近年来有研究^[10]显示 ,MMPs 在 UC 的病理生理过程中发挥重要作用。MMP-2 和 MMP-9 在 UC 中主要降解 IV 型胶原 ,IV 型胶原是基底膜主要成分 ,作为屏障起到阻止炎症扩散作用^[11]。Garg et al^[12]发现在炎症性肠病(IBD) 中 MMP-9 通过调节杯状细胞减弱黏膜防御引起结肠炎症。Meijer et al^[13]检测 122 例克隆恩病(Crohn's disease ,CD) 患者、20 例 UC 患者及 62 例正常人回结肠标本 MMPs 及 TIMPs 水平 ,发现 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 及 TIMP-1、TIMP-2 水平在 CD 和 UC 患者中均有明显增高 ,且 MMPs 水平与结肠中髓过氧化物酶水平呈正相关。国内研究^[14]表明 ,MMP-2 在 UC 患者病变组织中呈高表达。Von Lampe et al^[15]检测 21 例 UC 患者和 21 例 CD 患者结肠活检标本中 MMPs 及 TIMPs mRNA 表达 ,发现 UC 和 CD 中 MMP-2、MMP-1、MMP-4 及 TIMP-1 mRNAs 表达显著增加 ,表明 MMPs 在 IBD 的结肠组织破坏和重构中发挥重要作用。

本研究结果表明 UC 患者外周血中 MMP-2、MMP-9 水平明显高于正常对照组 ,提示 MMP-2、

MMP-9 可能参与 UC 的病理生理机制。通过 UC 患者外周血中 MMP-2、MMP-9 水平与 UC 主要临床特征的关联分析,发现重度活动期 UC 患者外周血中 MMP-2、MMP-9 水平明显高于中度患者,同时不同病变范围的活动期 IBD 患者间 MMP-2、MMP-9 水平存在一定差别,表明活动期 UC 患者外周血中 MMP-2、MMP-9 水平与疾病严重程度、病变范围呈相关性。同时,外周血中 MMP-2、MMP-9 水平与肠黏膜通透性有良好相关性。

综上所述,活动期 UC 患者外周血中 MMP-2、MMP-9 水平明显增高,与 UC 严重程度和病变范围呈一定相关,提示 MMP-2、MMP-9 可能是肠黏膜通透性改变的关键分子,但参与 UC 发病及肠黏膜通透性改变还有很多其他重要的因素,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Mankelz J, Schulzke J D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications [J]. *Curr Opin Gastroenterol* 2007 23(4): 379-83.
- [2] Salim S Y, Soderholm J D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2011 17: 362-81.
- [3] Von L B, Barthel B, Coup land S E, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease [J]. *Gut* 2000 47: 63-73.
- [4] Manfredi M A, Zurakowski D, Rufo P A, et al. Increased incidence of urinary matrix metalloproteinases as predictors of disease in pediatric patients with inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2008 14(8): 1091-6.
- [5] Gao Q, Meijer M J, Kubben F J, et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases [J]. *Dig Liver Dis* 2005 37(8): 584-92.
- [6] 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议 [J]. *中华消化杂志* 2007 27(8): 545-50.
- [7] Hu Q G, Zheng Q C. The influence of enteral nutrition in postoperative patients with poor liver function [J]. *World J Gastroenterol* 2003 9(4): 843-6.
- [8] 刘晓昌, 梅 俏, 许建明, 等. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜通透性的改变 [J]. *安徽医科大学学报* 2010 45(4): 545-7.
- [9] Lakatos G, Hritz I, Varga M Z, et al. The impact of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflammatory bowel diseases [J]. *Dig Dis* 2012 30(3): 289-95.
- [10] Hayden D M, Forsyth C, Keshavarzian A. The role of matrix metalloproteinases in intestinal epithelial wound healing during normal and inflammatory states [J]. *J Surg Res* 2011 168(2): 315-24.
- [11] Brinckerhoff C E, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 3(3): 207-14.
- [12] Garg P, Ravi A, Patel N R, et al. Matrix metalloproteinase-9 regulates MUC-2 expression through its effect on goblet cell differentiation [J]. *Gastroenterology* 2007 132(5): 1877-89.
- [13] Meijer M J, Mieremet O M A, van der Zon A M, et al. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype [J]. *Dig Liver Dis* 2007 39(8): 733-9.
- [14] 缪应雷, 欧阳钦, 段丽平, 等. 基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 3 在溃疡性结肠炎患者肠黏膜的表达 [J]. *临床内科杂志* 2005 22(10): 682-4.
- [15] Von Lampe B, Barthel B, Coupland S E, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel diseases [J]. *Gut* 2000 47(1): 63-73.

The relationship between the expression of matrix metalloproteinases and intestinal mucosal permeability in patients with ulcerative colitis

Xue Yongju^{1,2}, Mei Qiao¹, Ding Hao, et al

(¹Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, The Key Laboratory for Digestive Diseases of Anhui Province, Hefei 230022;

²Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233003)

Abstract Objective To investigate the relationship between the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and intestinal mucosal permeability in patients with ulcerative colitis. **Methods** 38 UC patients and 30 healthy controls were enrolled in this study, the levels of MMP-2 and MMP-9 in the serum were assessed by ELISA method. Detected the lactulose and mannitol in urine of 38 UC patients and 30 healthy people after they took orally the lactulose and mannitol test solution by HPLC-RI method and calculated the ratio of them. **Results** The serum levels of MMP-2 and MMP-9 in UC patients were significantly higher than that in healthy controls, which were correlated with the severity and extent of disease ($P < 0.05$). The lactulose/mannitol ratio in 38 UC patients was signifi-

Livin 与 Caspase-3 在口腔鳞状细胞癌中的表达及相关性研究

解传斌 颜雨春

摘要 目的 探讨凋亡抑制蛋白(IAP) Livin 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达及其相关性,为对患者诊断及监测、评估术后复发、转移的风险程度提供参考。方法 采用 RT-PCR 法对 45 例 OS-CC 组织及 11 例正常口腔组织(NOT)中的 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 的表达进行检测。结果 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 45 例 OS-CC 组织及 11 例 NOT 组织均有不同程度的表达; Livin mRNA 在 OS-CC 组织中的表达高于 NOT 组织($P < 0.05$),在有淋巴结转移组的表达高于无淋巴结转移组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两者在 OS-CC 组织中的相对含量均与患者的性别和年龄无关,但与肿瘤的病理分期、分化程度有关,相关分析显示 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 在 OS-CC 组织中的表达呈相关关系,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 Livin 与 Caspase-3 基因的异常表达与 OS-CC 的病理生物学行为密切相关,联合检测 Livin 与 Caspase-3 可为评价 OS-CC 的浸润、转移及患者预后提供临床参考,为研究 OS-CC 发病机制提供新的思路。

关键词 口腔鳞状细胞癌; 凋亡抑制蛋白 Livin; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; RT-PCR

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0498-04

在头颈部恶性肿瘤中,口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OS-CC)较常见,因其恶性程度较高,且具有较强的浸润性,易发生淋巴结及远处脏器转移,严重危害患者的生命安全。我国口腔颌面部的恶性肿瘤 80% 以上为鳞状细胞癌,5 年生存率约为 60%,且发病率呈逐渐上升趋势^[1]。目前针对 OS-CC 的研究较多集中于细胞凋亡和增殖的平衡

机制方面,已证实凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP) Livin 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在上述过程中发挥重要作用。在乳腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、脑星形细胞瘤等多种恶性肿瘤组织中均发现 Livin 的表达^[2-5]; Caspase-3 作为半胱氨酸蛋白酶家族中的一员,在细胞凋亡过程中发挥重要作用,而拮抗或抑制 Caspase-3 的活性可抑制细胞凋亡发生^[6]。但二者在 OS-CC 及正常口腔组织(NOT)中表达情况则少有报道,该实验采用 RT-PCR 技术检测分析 OS-CC 及 NOT 中 Livin mRNA 与 Caspase-3 mRNA 的表达程度,探讨两者在 OS-CC 发生、发展中的作用及相互关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2011 年 10 月~2013 年 2 月在安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科就诊,并均经组织病理检查确诊为 OS-CC 患者新鲜组织标本 45 例,另选 11 例患者为阴性对照组(NOT 组)。所有 OS-CC 组患者均为首次确诊,术前均未行放、化疗或其他抗肿瘤治疗,均无远端脏器的转移,无其他恶性肿瘤史,无家族肿瘤史。所有切取的 45 例 OS-CC 组织中男 28 例,女 17 例;年龄 43~79(43.21 ± 16.73)岁;依国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)(2002)口腔癌 TNM 分类分期: I~II 期 30 例, III~IV 期 15 例;参照 1997 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)病理学标准分级:高分化 29 例,中低分化 16 例;伴有颈部淋巴结转移 18 例,无淋巴结转移者 27 例。另 11 例 NOT 组织标本中 7 例取自阻生齿拔除患者,4 例取自牙槽嵴修整患者。所有标本均于术中取材后立即置于液氮中,然后移至 -80 °C 超低温冰箱中贮存备用。

1.2 主要试剂及仪器 PCR 试剂、逆转录试剂盒、

2013-12-05 接收

基金项目:安徽省卫生厅科研项目(编号:2010-B-15)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院口腔科,合肥 230022

作者简介:解传斌,男,硕士研究生;

颜雨春,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 99yyc@sina.cn

cantly higher than that in 30 control people. The serum levels of MMP-2 and MMP-9 in UC patients were correlated with the the change of intestinal mucosal permeability. **Conclusion** The serum levels of MMP-2 and MMP-9 in UC patients are significantly increased, which is correlated with the change of intestinal mucosal permeability.

Key words MMP-2; MMP-9; ulcerative colitis; intestinal mucosal permeability