

# MMP-9 及 TIMP-1 在支气管扩张症患者气道中的表达

金 前 张影清 李国平 许先荣 周 颖

**摘 要** **目的** 研究基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及其天然抑制因子金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)在支气管扩张症患者气道中的表达情况,并分析 TIMP-1/MMP-9 比值失衡情况与支气管扩张症发病及病情进展的关系。**方法** 本实验采用病例对照研究,分设支气管扩张症组、肺炎组及正常对照组,而支气管扩张症组又分为轻、中、重 3 个亚组。收集支气管肺泡灌洗液,ELISA 法检测其中 MMP-9 及 TIMP-1 的浓度,并计算 TIMP-1/MMP-9 比值,同时取气管内膜组织,免疫组化法检测其中 MMP-9 及 TIMP-1 的表达。**结果** MMP-9 在支气管扩张症组的支气管肺泡灌洗液中明显升高( $P=0.000$ ),但 TIMP-1 却无明显升高,TIMP-1/MMP-9 比值明显低于肺炎组及正常对照组(均为  $P=0.000$ );MMP-9 在支气管扩张症患者中随严重程度的增加其浓度亦升高,但 TIMP-1 却无同步上升,TIMP-1/MMP-9 比值重度组较轻度组有明显下降( $P=0.005$ )。**结论** BE 患者中存在 TIMP-1/MMP-9 比值失衡,且随着病情进展,该比值的失衡情况逐渐加重,提示 TIMP-1/MMP-9 比值失衡在 BE 的疾病发生及病情进展中有着重要作用。

**关键词** 支气管扩张症 基质金属蛋白酶-9 金属蛋白酶组织抑制因子-1

**Expression of MMP-9 and TIMP-1 in the Airway of Bronchiectasis Patients.** Jin Qian, Zhang Yingqing, Li Guoping, Xu Xianrong, Zhou Ying. Department of Respiratory Medicine, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310012, China

**Abstract Objective** To study the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the airway of bronchiectasis patients, and analysis the relationship of TIMP-1/MMP-9 ratio with the generation and progression of bronchiectasis. **Methods** We adopted the case-control study, and established the bronchiectasis group, the pneumonia group and the normal group. According to the severity of disease, the bronchiectasis group was divided into the mild group, the middle group and the severe group. We acquired the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of these subjects, and tested the concentration of MMP-9 and TIMP-1 with ELISA, then calculated the ratio of TIMP-1/MMP-9. Also, we acquired the tissue of bronchic endomembrane derived from biopsy and operation, and tested the expression of MMP-9 and TIMP-1 with immunohistochemical method. **Results** The concentration of MMP-9 in BALF of BE was much higher than that of other groups ( $P=0.000$ ), but the concentration of TIMP-1 was not so high in BALF of BE. TIMP-1/MMP-9 ratio of BE group was much lower than that of other groups (both  $P=0.000$ ). In the BE group, the concentration of MMP-9 increased as the severity increasing, but the concentration of TIMP-1 didn't increase as the severity increasing. TIMP-1/MMP-9 ratio was much lower in the severe group than that in the mild group ( $P=0.005$ ). **Conclusion** There is obviously unbalance of MMP-9 and TIMP-1 expression in BE patients. With the disease progressing, this unbalance also deteriorates, which indicates that the unbalance of MMP-9 and TIMP-1 expression has a important role in the generation and progression of BE.

**Key words** Bronchiectasis; Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

支气管扩张症(bronchiectasis, BE),是以慢性咳嗽、咳大量脓痰和反复咯血为主要临床表现的一种慢性疾病,其并发症的治疗耗费了巨大的医疗资源,该病的 10 年病死率亦高达 30%<sup>[1]</sup>。目前针对 BE 发病

机制的研究较少,从而使该病在预防和阻遏进展方面的措施极其欠缺。BE 在病理上以支气管基质破坏为基础,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)能降解细胞外基质成分。BE 主要为中性粒细胞浸润,该细胞产生基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9),MMP-9 可对支气管基质产生一定的破坏<sup>[2]</sup>。金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)为 MMP-9 的天然抑制剂,能抑制 MMP-9 活性,减少

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2008B033)

作者单位:310012 杭州,浙江省立同德医院呼吸科(金前、李国平、许先荣、周颖);314000 嘉兴市第一医院呼吸科(张影清)

通讯作者:周颖,电子信箱:13396559897@189.cn;金前,电子信箱:jinqian0504@hotmail.com

MMP-9 对基质的破坏降解。故本实验对 MMP-9 及 TIMP-1 在支气管扩张症患者气道中的表达进行研究,并分析 TIMP-1/MMP-9 比值失衡情况,从发病机制着手,在该病的预防和阻遏进展方面寻找新的思路。

材料与方法

1. 研究对象:本实验采用病例对照研究,分设 BE 组、肺炎组及正常对照组,而 BE 组又分为轻度组、中度组及重度组 3 个亚组。收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 所需的研究对象选自浙江省立同德医院及嘉兴市第一医院 2008 年 7 月~2010 年 8 月的就诊人群, BE 组、肺炎组及正常对照组各 30 例 (其中 BE 组的每个亚组各 10 例), 收集支气管内膜组织所需的研究对象则选自上述两家医院 2006 年 1 月~2010 年 8 月的就诊人群, BE 组、肺炎组及正常对照组各 30 例 (其中 BE 组的每个亚组各 10 例)。部分支气管内膜组织取自支气管镜下支气管内膜活检组织, 部分则取自手术切除的肺组织。各组样本在年龄及性别构成方面无显著统计学差异。所有研究对象均在抗生素使用之前取 BALF 标本及支气管内膜标本。BE 的纳入标准:根据病史及高分辨率计算机体层 X 线摄影术 (high resolution computerized tomography, HRCT) 确诊为 BE; 无哮喘、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等其他呼吸道疾病。肺炎的纳入标准:根据 HRCT 及临床资料确诊为肺炎; 无哮喘、COPD、BE 等其他呼吸道疾病。正常健康人纳入标准:因肺部异常阴影而行支气管镜检查, 术后证实无任何肺部疾患, 且其他实验室检查无异常的正常健康人。BE 分级标准:重度:频发肺部感染及咳黏液脓性痰 (每年 3~6 次), 双侧多节段支气管膨大变形, 变形支气管周边肺组织有不同程度的纤维化; 中度:每年发作 2~3 次的肺部感染及咳脓痰, 单侧支气管柱状及膨大变形; 轻度:每年极少发作肺部感染且几乎无咳痰的患者, 包括施行手术治疗的患者。

2. 试剂:人 MMP-9、TIMP-1 酶联免疫测定试剂盒、人 MMP-9、TIMP-1 免疫组化试剂盒均购自上海蓝基生物科技有限公司。

3. BALF 及支气管内膜组织的收集:BE 组、肺炎组及正常对照组分别于病变最严重肺段、肺炎最严重肺段、右肺下叶基底段行支气管肺泡灌洗 (注入 20ml 生理盐水 5 次并回收), 并经支气管镜在上述部位夹取支气管内膜活检组织 3 块 (病情不允许者不行支气管内膜活检术)。而手术切除的支气管肺组织标本则取病变最严重部位的支气管内膜组织 3 块。BALF 予以离心, 上清液保存于 -20℃ 冰箱备用, 活检及手术切除组织甲醛浸泡后石蜡包埋切片备用。

4. BALF 标本的处理: BALF 上清液置 37℃ 恒温箱孵育, 用 ELISA 法检测 MMP-9、TIMP-1 的浓度, 并计算 TIMP-1/MMP-9 比值。MMP-9 及 TIMP-1 酶联免疫测定试剂盒按照说明书使用。

5. 组织标本的处理:支气管内膜组织甲醛固定后石蜡包

埋, 连续切片, 常规脱蜡水化后用免疫组织化学 SP 法检测支气管内膜组织中 MMP-9、TIMP-1 的表达。结果判断采用半定量积分法, 根据每张切片的着色细胞比例及着色深浅计分, 着色细胞比例  $\leq 1/3$  为 1 分;  $1/3 \sim 2/3$  为 2 分;  $\geq 2/3$  为 3 分<sup>[3]</sup>。着色深度:无着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。然后根据二者乘积判断阳性等级:0 分为阴性 (-); 1~2 分为弱阳性 (+); 2~4 分为阳性 (++) ; >4 分为强阳性 (+++)。最后取 3 块活检组织的平均分。

6. 统计学方法:采用 Stata 11.00 统计软件, BALF 中 MMP-9 浓度、TIMP-1 浓度及 TIMP-1/MMP-9 比值情况采用两个独立样本均数的 *t* 检验, 而组织标本的免疫组化结果采用 Cochran-Mantel-Haenszel 方法通过计算行平均分检验进行统计分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. BALF 中 TIMP-1、MMP-9 的浓度及其比值: BE 组 BALF 中 MMP-9 浓度较肺炎组明显升高 ( $P = 0.000$ ), 而肺炎组该项指标又较正常对照组明显升高 ( $P = 0.000$ ); 肺炎组 BALF 中 TIMP-1 浓度较 BE 组明显升高 ( $P = 0.000$ ), 肺炎组又较正常对照明显升高 ( $P = 0.000$ ), 而正常对照组与 BE 组相比, BALF 中 TIMP-1 浓度却无统计学差异 ( $P = 0.405$ ); TIMP-1/MMP-9 比值肺炎组较 BE 组和正常对照组均明显升高 (分别为  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ), 而该比值在正常对照组亦较 BE 组高 ( $P = 0.000$ ), 详见表 1。

表 1 BE 组、肺炎组及正常对照组 BALF 的 TIMP-1、MMP-9 的浓度及其比值情况 ( $n = 30$ )

| 组别    | TIMP-1<br>(pg/ml)   | MMP-9<br>(ng/ml)   | TIMP-1/MMP-9<br>( $\times 10^{-3}$ ) |
|-------|---------------------|--------------------|--------------------------------------|
| BE 组  | 567.11 $\pm$ 153.58 | 210.22 $\pm$ 34.61 | 2.69 $\pm$ 0.54                      |
| 肺炎组   | 901.31 $\pm$ 173.45 | 146.57 $\pm$ 29.69 | 6.06 $\pm$ 0.60                      |
| 正常对照组 | 601.64 $\pm$ 165.17 | 111.17 $\pm$ 23.98 | 5.38 $\pm$ 0.13                      |

2. BE 患者轻、中、重 3 组 BALF 中 TIMP-1、MMP-9 的浓度及其比值: 重度组和中度组之间 BALF 中 MMP-9 浓度无统计学差异 ( $P = 0.133$ ), 而中度组较轻度组 MMP-9 浓度明显升高, 有统计学意义 ( $P = 0.035$ ); TIMP-1 浓度在中度组和重度组之间比较无统计学差异 ( $P = 0.151$ ), 轻度和中度组之间比较亦无统计学差异 ( $P = 0.975$ ); TIMP-1/MMP-9 比值在轻度组与中度组之间比较无明显差异 ( $P = 0.234$ ), 重度组与中度组比较亦无明显差异 ( $P = 0.063$ ), 而重度组该比值较轻度组有明显下降 ( $P = 0.005$ ), 详见表 2。

表 2 BE 患者轻、中、重 3 组 BALF 的 TIMP - 1、MMP - 9 的浓度及其比值情况 (  $n = 10$  )

| 组别  | TIMP - 1            | MMP - 9            | TIMP - 1/MMP - 9     |
|-----|---------------------|--------------------|----------------------|
|     | ( ng/ml )           | ( ng/ml )          | ( $\times 10^{-3}$ ) |
| 轻度组 | 599.63 $\pm$ 149.19 | 183.72 $\pm$ 29.66 | 3.32 $\pm$ 0.29      |
| 中度组 | 601.81 $\pm$ 162.14 | 213.56 $\pm$ 29.19 | 2.84 $\pm$ 0.26      |
| 重度组 | 499.89 $\pm$ 141.1  | 233.37 $\pm$ 27.20 | 2.16 $\pm$ 0.22      |

3. 支气管内膜组织中 MMP - 9 及 TIMP - 1 的表达: MMP - 9 的表达从正常对照组至 BE 组逐渐升高, 且均有统计学意义 ( 分别为  $P = 0.003, P = 0.000$  ); TIMP - 1 的表达在肺炎组较 BE 组及正常对照组均明显升高 ( 分别为  $P = 0.014, P = 0.004$  ), 而 BE 组与正常对照组相比却无明显差异 (  $P = 0.639$  ), 详见表 3。

表 3 BE 组、肺炎组及正常对照组支气管内膜组织中 MMP - 9 及 TIMP - 1 表达情况 (  $n = 30$  )

| 组别    | MMP - 9 ( $n$ ) |    |    |     | TIMP - 1 ( $n$ ) |    |    |     |
|-------|-----------------|----|----|-----|------------------|----|----|-----|
|       | -               | +  | ++ | +++ | -                | +  | ++ | +++ |
| BE 组  | 0               | 7  | 14 | 9   | 7                | 15 | 6  | 2   |
| 肺炎组   | 6               | 8  | 14 | 2   | 3                | 9  | 13 | 5   |
| 正常对照组 | 18              | 10 | 2  | 0   | 8                | 16 | 4  | 2   |

4. BE 患者轻、中、重 3 组支气管内膜组织中 MMP - 9 及 TIMP - 1 的表达: MMP - 9 及 TIMP - 1 在 3 组中的表达均无明显差异 (  $P$  均  $> 0.05$  ), 详见表 4。

表 4 BE 患者轻、中、重 3 组支气管内膜组织中 MMP - 9 及 TIMP - 1 表达情况 (  $n = 10$  )

| 组别  | MMP - 9 ( $n$ ) |   |    |     | TIMP - 1 ( $n$ ) |   |    |     |
|-----|-----------------|---|----|-----|------------------|---|----|-----|
|     | -               | + | ++ | +++ | -                | + | ++ | +++ |
| 轻度组 | 0               | 4 | 4  | 2   | 2                | 5 | 3  | 0   |
| 中度组 | 0               | 2 | 5  | 3   | 2                | 6 | 1  | 1   |
| 重度组 | 0               | 1 | 5  | 4   | 3                | 4 | 2  | 1   |

5. MMP - 9 及 TIMP - 1 在 BE 组及肺炎组中的表达: BE 患者支气管黏膜固有层、黏膜下层及透明软骨周围均有较多 MMP - 9 表达 ( 图 1 ), 重度 BE 患者小气道内膜可见较多 MMP - 9 表达, 且管壁变形明显者 MMP - 9 表达相对较多 ( 见于手术切除标本 ), 详见图 2; 肺炎患者的支气管内膜组织中可见较多的 TIMP - 1 表达, 且主要分布在黏膜层及黏膜下层 ( 图 3 ), 轻度 BE 患者结构尚完整的小气管内膜可见 TIMP - 1 表达 ( 见于手术切除标本 ), 详见图 4。

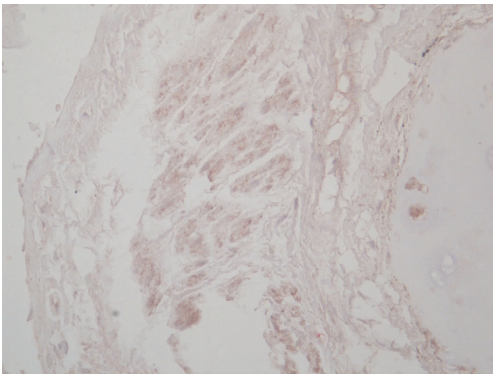


图 1 BE 患者支气管内膜 MMP - 9 的表达  
BE 患者支气管黏膜固有层、黏膜下层及透明软骨周围均可见黄褐色及棕褐色的染色颗粒, MMP - 9 表达为强阳性

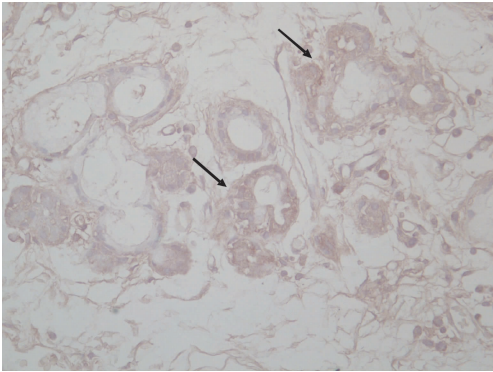


图 2 重度 BE 患者手术切除的标本中小气道内膜 MMP - 9 的表达情况  
重度 BE 患者手术切除的标本中, 小气道内膜可见较多 MMP - 9 表达, 箭头所指的小气道管壁破坏变形较明显, 其 MMP - 9 的表达相对于管壁较完整者亦多

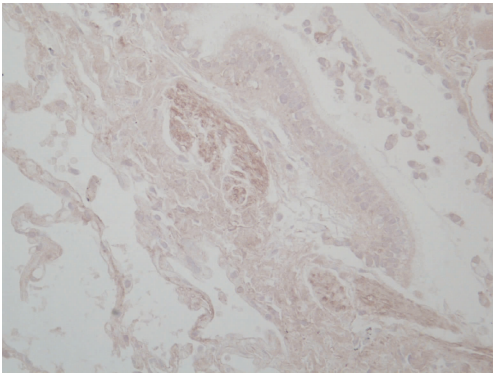


图 3 肺炎患者支气管内膜 TIMP - 1 的表达  
肺炎患者气管镜下于病变最严重处行黏膜活检, 可见支气管黏膜、黏膜下层黄褐色及棕褐色的染色颗粒, TIMP - 1 表达呈强阳性

讨 论

BE 主要病因包括感染、原发性纤毛运动障碍、免

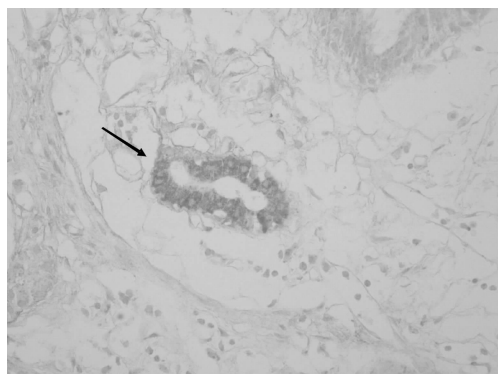


图 4 轻度 BE 患者手术切除的标本  
中小气道内膜 TIMP-1 的表达

轻度 BE 患者手术切除的标本中,箭头所指的结构尚完整的小气道内膜可见 TIMP-1 表达,其周边组织未见明显 TIMP-1 表达

疫缺陷、类风湿性关节炎及炎症性肠病等。不论何种病因,所导致病理改变均是支气管基质的破坏。MMP-9 在支气管壁表达较多,对基质的降解能力亦较强,TIMP-1 为 MMP-9 的天然抑制剂,能特异性地与 MMP-9 催化中心的锌离子结合,从而封闭 MMP-9 的催化活性。TIMP-1 和 MMP-9 在体内维持一定的动态平衡,一旦该平衡被打破,即 TIMP-1/MMP-9 比值发生变化,使 MMP-9 相对过多,将产生一系列病理变化<sup>[4]</sup>。故单纯的 MMP-9 升高并不能说明问题,TIMP-1/MMP-9 比值的变化才是关键所在。

在本研究中,BE 患者及肺炎患者的 BALF 中 MMP-9 均有明显升高,但 BE 患者 BALF 中 TIMP-1 却未能达到同步升高,导致肺炎组的 TIMP-1/MMP-9 比值明显高于 BE 组,甚至在正常人群中该比值也高于 BE 组。可见,BE 患者除了 MMP-9 分泌较多外,还存在 TIMP-1 分泌未同步上升的问题,故在本实验中 TIMP-1/MMP-9 比值下降是 BE 组区别于其他组的主要特征。

在 BE 患者轻、中、重 3 组中,中、重度组中 MMP-9 分泌较多,但 TIMP-1 在 3 组中的分泌无明显差异,TIMP-1/MMP-9 比值虽然仅轻度组与重度组该比值比较有统计学意义,但这可能与样本量不大有关,该比值在 3 组中呈阶梯式下降,提示该比值失衡与 BE 的严重程度亦存在一定的关系。

同样地,在支气管内膜组织中,MMP-9 的表达 BE 组较肺炎组高,肺炎组较正常对照组高,3 组呈阶

梯式上升;TIMP-1 的表达却是肺炎组最高,BE 组及正常对照组表达相近,同样也说明了 TIMP-1 的表达在 BE 组中未能同步上升,故 TIMP-1 与 MMP-9 表达失衡是 BE 患者的一个重要特征。

BE 患者轻、中、重 3 组支气管内膜组织中 MMP-9 及 TIMP-1 的表达无明显差异,但通过 Cochran-Mantel-Haenszel 方法计算行平均分,发现 MMP-9 的行平均分在轻、中、重 3 组中逐渐升高,而 TIMP-1 的行平均分在轻、中、重 3 组中却是相同的。MMP-9 在轻、中、重 3 组中的表达情况虽无统计学意义,但这可能仍与样本量不足有关。这一现象也同样提示 TIMP-1 在重度 BE 患者中未能同步上升,故进一步表明了 TIMP-1 与 MMP-9 表达失衡在 BE 病情严重程度上的作用。

综上所述,BE 患者中存在 TIMP-1/MMP-9 比值失衡,且随着病情进展,该比值的失衡情况逐渐加重,提示 TIMP-1/MMP-9 比值失衡在 BE 的发生及病情进展中有着重要作用。若能使 TIMP-1 在 BE 患者中同步上升,则可在理论上遏制病情的进展;同样地,若能在各种易并发 BE 的疾病(如肺结核)中使 TIMP-1 水平提升,亦可在源头上阻止 BE 的发生。而目前尚无促进 TIMP-1 合成分泌的有效药物,但基因重组 MMPs 抑制剂已被普遍开发研究,有一部分已应用于临床,且通过 FDA 认证并上市,故我们可进一步评估重组 MMPs 抑制剂在 BE 预防及治疗中的价值,可望开发出 BE 预防和治疗的新药<sup>[5]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Frey JG. Bronchiectasis: a reemerging disease[J]. Rev Med Suisse, 2007, 3(99): 477-478, 480-483
- 2 Heissig B, Nishida C, Tashiro Y, et al. Role of neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 in tissue regeneration[J]. Histo Histochem, 2010, 25(6): 765-770
- 3 Choi HJ, Park KJ, Shin JS, et al. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma[J]. Int J Colorectal Dis, 2007, 22(8): 863-868
- 4 Amălinei C, Cărunțu ID, Giuscă SE, et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions[J]. Rom J Morphol Embryol, 2010, 51(2): 215-228
- 5 Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(3): 677-687 (收稿:2011-05-30)  
(修回:2011-06-09)