

综述 ·

基质金属蛋白酶与早产儿慢性肺疾病

刘雪雁 综述,薛辛东 审校

(中国医科大学第二临床学院儿科,辽宁 沈阳 110004)

[中图分类号] R722 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2004)06-0541-04

早产儿慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)或支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是婴儿时期最常见的慢性肺疾患。近10余年随着医学科学的发展,早产低体重儿的存活率增加,CLD的发生有逐渐上升趋势。因目前尚无理想的预防和治疗CLD的方法,已严重影响存活早产儿的生活质量,并给家庭和社会带来了负担。

CLD的病因和发病机制仍未完全阐明,现研究认为^[1],早产儿发育不成熟、氧中毒、高压或容量伤、感染等因素是CLD发生的重要因素。不成熟肺在遭受损伤的同时也发生修复,如果修复不当,最终致成纤维细胞增生、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积、肺组织纤维化^[2]。

肺内ECM成分主要包括胶原、弹性蛋白、蛋白多糖及粘连糖蛋白4种。胶原蛋白和弹性蛋白为纤维状结构,蛋白多糖及粘连糖蛋白为无定型物质,充填在纤维之间和细胞之间,促进它们的粘连。这些成分相互混合交织,使组织成为一个整体并具有一定的硬度和韧性,以完成相应的生理功能。ECM不仅是细胞的支架组织,而且影响细胞的粘附、迁移、增殖和分化。肺血管壁及肺泡壁成熟均依赖ECM的变化;ECM过度沉积、肺间质纤维化的形成也是CLD的最终结局。研究发现^[3~5],CLD患儿支气管肺泡灌洗液(BALF)中胶原、纤维粘连蛋白及透明质酸等ECM的含量明显增加,其水平与疾病的预后密切相关。尸检结果也表明,CLD肺组织病灶内胶原蛋白沉积水平与纤维化程度呈正相关。ECM过度破坏和积聚是其合成与降解失衡的结果。以前,人们对CLD中ECM合成机制方面研究很多,ECM降解机制的研究直到近几年才受到重视。ECM蛋白质成分的降解均依赖于ECM降解蛋白酶,其中基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases,

MMPs)在ECM的降解中占有重要地位。

1 MMPs的结构与功能

MMPs是一组结构与功能同源的锌离子依赖性蛋白酶超基因家族。目前已发现MMPs家族有20多个成员,分子量大小不同,具有共同的信号功能区、催化功能区,羧基端决定其底物特异性,根据其底物特异性不同,主要分为:胶原酶(MMP21, MMP28, MMP213)、型胶原/明胶酶(MMP22, MMP29)、基质裂解素(MMP23, MMP210, MMP211)、膜型2基质蛋白酶(MT2MMPs)及其他类型的MMPs,如MMP28是该家族中的最新成员。MMPs的主要功能是几乎能降解除多糖以外所有的ECM成分并使其它的MMPs激活,形成瀑布效应。除此之外,还能调整许多非基质蛋白;能够直接调节几种生长因子和趋化因子的活性^[6];MMPs介导蛋白水解而释放的基质蛋白片段也是远端细胞的化学趋化剂^[7]。因此,MMPs不只是催化基质的蛋白酶,也参与了细胞2细胞和细胞2基质的信号转导过程。

基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)是MMPs的特异性抑制剂,它是一类低分子量蛋白质(20~30 kDa),结构互不相似,仅有40%~50%的序列同源,是一组多基因家族的编码蛋白,目前认为至少有4个成员所组成,即TIMP21、TIMP22、TIMP23、TIMP24,均存在12个半胱氨酸残基,通过二硫键成对结合,形成高度紧密的三级结构,含两个不同的区域,N端功能区的半胱氨酸残基与MMPs的锌离子活性中心结合,C端功能区与MMPs的其他部位结合,以1:1的比例形成非共价性MMP2TIMP复合体,从而阻断MMPs与底物的结合,也可与MMPs酶原形式结合

阻止其活化。TIMPs对MMPs的抑制具有特异性。在ECM中,MMPs的净活性是其激活态与TIMPs之间平衡的结果,此平衡也是ECM保持完整的前提条件。此外,TIMPs还具有生长因子样特性、调控细胞增殖与细胞凋亡等功能^[8]。

2 MMPs的合成与调控

在生理条件下,MMPs的合成、分泌及其激活过程的各个环节都受到严密的调控。机体内MMPs活性除受内源性特异性抑制剂TIMPs及肝脏生成的非特异性抑制剂 α_2 巨球蛋白的调节外,还包括转录水平调节和潜酶活化两种形式。

2.1 转录水平调节

大多数MMPs在正常成人组织中低水平表达,但多种炎症细胞因子(如IL21,IL26,TNF α 等)、激素、生长因子(如TGF β 1,EGF,PDGF,bFGF等)及CD40等均能调节MMPs的合成;其他因子如皮质类固醇、视黄酸及IL24已证实可抑制MMPs基因的表达。目前对调控MMPs表达和功能的信号通路还不太清楚,已有证据表明蛋白激酶C(PKC)参与了MMPs基因转录的诱导。Ag,ET21,TNF α 及儿茶酚胺类可引起受体介导的PKC增加,与MMPs的增加有关。不同的MMPs在其启动子区域有不同的调控序列,可与不同的转录因子结合,诱导不同的基因表达。

2.2 潜酶活化

MMPs主要以潜酶的形式分泌到细胞外,须经过蛋白酶的水解才能活化。已发现MMPs有3种不同的激活方式:第1种方式是在细胞外由血清蛋白酶(包括纤溶酶,胰蛋白酶,糜蛋白酶,弹性蛋白酶或激肽释放酶)所介导。其中纤溶酶被认为是MMPs体内最强有力的生理性激活物,攻击MMPs前肽链中的蛋白酶敏感区域,引起前肽链构型发生改变,使MMPs的活性位点易受另一种蛋白酶、通常是其他的MMPs的切割。第2种方式是在原生质膜上由膜型MMPs(MT2MMPs)所介导。目前已有5种MT2MMPs得到克隆,并证实MT2MMPs能激活其他的MMPs。第3种方式是细胞内激活,但其精确机制和对细胞外MMPs活性的作用,目前仍不清楚。

3 MMPs/TIMPs与早产儿RDS和CLD的关系

肺间质内主要是Ⅲ型胶原,由成纤维细胞分

泌。Ⅲ型胶原由内皮细胞及上皮细胞制造,分布于基底膜和肺间质。因而,胶原酶(MMP21、MMP28)及明胶酶(MMP22、MMP29)在RDS及CLD的发生中已引起关注。RDS是一种在生后前3d内开始逐渐消失的急性炎性肺损伤;而以后患CLD的婴儿则有更强的炎性反应,在生后第1周的肺灌洗液中趋化活性更强、细胞因子浓度更高。Cederqvist等^[2]观察RDS早产儿生后5d内的支气管灌洗液中MMP22、MMP28、MMP29和TIMP22的变化,发现MMP28/TIMP22参与了RDS的急性炎性损伤过程,也可能对以后CLD的发生起一定的作用。Sweet等^[9]检测早产儿生后前6dBALF中MMP28的浓度,发现以后发生严重CLD的患儿BALF中MMP28的浓度较对照增高10倍,在用多元回归的方法评估影响早产儿CLD发生可能性的诸多因素中,发现其中只有胎龄、出生体重、log MMP28可单独预测CLD的发生。Danan等^[10]动态检测了新生儿生后6h、3d和5d的支气管提取液(TAF)中明胶酶的变化,发现MMP29、TIMP21总量逐渐增加,但此与CLD的预后无关,并且MMP29的增加与呼吸道炎性细胞数目增加相关;相反,出生时MMP22总活性逐渐降低,与CLD的发生密切相关。上述资料表明,MMPs/TIMPs可能参与了RDS和CLD的发生、发展过程,但在不同阶段,MMPs/TIMPs有着不同的变化,在同一阶段,不同类型MMPs之间也有着不同的表现。目前确切的关系尚未明确。

4 MMPs/TIMPs在早产儿CLD发生中的作用

MMPs作为一种蛋白酶,在形态发育、组织重建、炎症、血管生成、伤口愈合和细胞迁移等正常生理过程中起到关键作用。CLD发生的特征是早期的炎症致肺微血管通透性增加,广泛的肺组织重建和最终的纤维化。因此MMPs/TIMPs可能在CLD的病理过程中具有重要作用。

4.1 MMPs/TIMPs介导的肺损伤

传统观点认为CLD主要是由氧化和机械通气介导的损伤所致,而近来炎症在CLD发生机制中的作用倍受关注^[11]。细胞水平上的炎症过程逐渐被认为在加重原始肺损伤和肺实质重建中占有重要地位,亦被称为CLD发生的标志。早期的炎症反应可由产前感染、机械通气、或氧毒性等因素触发,内皮和上皮细胞受损后可引起一系列炎性细胞聚集而进入肺泡,以巨噬细胞和中性粒细胞为主^[12],这些细胞释放细胞因子、生长因子及其它递质等,影响

MMPs的合成与活化。MMPs等增加活化后进一步破坏基底膜及ECM,这样除了能够引起更多的炎性细胞的聚集和活化而加重肺损伤外,还干扰了受损

型肺泡上皮细胞的正常替换,并促进成纤维细胞的迁移及间质胶原在肺泡腔的沉积,而后两者均是纤维化发生的重要步骤。有研究表明:在以后发生CLD的早产儿,生后前6d BALF中MMP29的水平明显高于不患CLD的早产儿;在以后发生CLD的RDS婴儿的BALF中,型胶原在3,7d时明显高于RDS对照组,提示这些CLD婴儿BALF中型胶原的增高可能反映了肺基底膜的损伤,并用BALF中型胶原的增加来预测CLD的发生^[3]。最新一项研究显示孕期合并绒毛膜炎的婴儿BALF中MMP29水平增高,而这些婴儿的CLD发生率更高,推测型胶原降解酶MMP29的激活可能是绒毛膜炎致CLD发生的机制之一^[13]。更为直接的研究显示诱导MMP29、3基因缺陷的小鼠所致的肺损伤较对照组明显减轻^[14]。这些临床和动物实验均直接或间接地证明了MMPs参与了肺损伤的发生和发展。

4.2 MMPs/ TIMPs介导的肺发育阻滞

近年来提出的“新CLD”是指极低出生体重儿CLD的病理改变以肺发育受阻为主,表现为肺泡隔形成受阻和肺泡化降低,而气道损伤和间质纤维化较轻^[15]。妊娠28周前分娩的早产儿刚开始进行肺毛细血管床的发育及远端囊泡的肺泡化过程,并且延长至生后2年。众所周知,作为调节ECM重建的MMPs和TIMPs在胎儿各个器官的形态发生中均很重要。在胎肺和生后肺发育中,MMPs的合理表达和激活也起了重要作用。MMP21, MMP22, MMP29和MT12MMP可能对兔的肺发育中分枝形态的发生起到一定作用,其中MMP22和MT12MMP在肺泡上皮细胞中的明显增加,提示他们也可能参与了肺泡上皮基底膜的变薄并有利于大面积呼吸膜的形成^[16];在肺发育期实质的胶原总量迅速增加,将有利于微血管发育、细胞生长和肺泡形成^[17]。在此呼吸道重塑的关键时期发生肺损伤、ECM过度破坏也可以导致肺发育阻滞。高氧致新生鼠型胶原蛋白表达减少可能也有MMPs表达上调、胶原蛋白降解增加的参与;而维甲酸使高氧暴露新生鼠型胶原蛋白含量增加,可能也是通过纠正MMPs/ TIMPs基因表达的失衡、调控型胶原而增加肺胶原总量^[17]。此外,MMPs也能引起生长因子和细胞因子的释放而影响肺内靶细胞的生长和分化^[6],如转化生长因子(TGF β)是正常肺发育所

必需的,它可以被MMPs激活,又可以直接或间接激活明胶酶(MMP22和MMP29)。在肺发育中,肺泡分隔的正常信号尚不清,MMPs和TIMPs的调节和相互作用机制错综复杂,因而MMPs/ TIMPs在早产儿CLD肺发育阻滞中的详细机制仍有待于进一步研究。

4.3 MMPs/ TIMPs介导的肺纤维化

组织损伤的同时,机体抗损伤性修复也正在进行,其结果表现为基质重建。CLD最终结局是ECM过度沉积所致的肺组织纤维化的形成,是ECM合成与降解动态平衡过程被打破的结果。在重建阶段MMPs的主要来源可能发生变化,不是早期的炎性细胞,而是成纤维细胞为主的基质细胞。成纤维细胞除产生胶原为主的ECM外,还产生MMPs和TIMPs,另外,上调MMPs的细胞因子等也可上调TIMPs。结果引起二者比例失调、基质降解活性下降、胶原沉积、肺纤维化的发生和发展。因此有学者认为MMP29/ TIMP21在ARDS病程进展中有重要意义:如MMP29/ TIMP21 > 1,则预示通过降解ECM成分而阻止损伤后向纤维化方向发展;如MMP29/ TIMP21 < 1,则ARDS进展为纤维增生,然而比例的逆转,可致病情的迅速恢复^[18]。最近有学者回顾了早产儿CLD的临床资料,描述了关于MMP21、TIMP21和TIMP22在CLD不同阶段的定位和表达。通过免疫反应的半定量分析发现CLD发生过程的4个阶段中在型肺泡细胞中MMP21和TIMP22的染色强度无差别,但在慢性期TIMP21强度却较以前各期有明显增加,这种TIMP21/ MMP21的相对增高预示着在CLD慢性期型肺泡细胞的胶原降解活性的降低。还发现在慢性期纤维灶中有MMP21、TIMP21和TIMP22免疫活性的成纤维细胞,可能成纤维细胞亦通过增加TIMPs/ MMP21比例、降低胶原分解活性而对慢性期的纤维化起到一定的作用^[19]。MMPs除了通过降解机制影响重建,还可对促纤维化合成的细胞因子和生长因子如TGF β , TNF α , IGF等引起释放和激活,从而间接介导ECM合成增加。因此,有人认为MMPs对于肺纤维化的起始和进展是必不可少的^[6]。

结合MMPs/ TIMPs在CLD发生、发展不同阶段中的变化,在炎症、损伤阶段,抑制MMPs的过度表达;在纤维化阶段抑制TIMPs的产生、促进MMPs表达,将是阻止CLD发生的重要途径之一,有望为其治疗提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(7): 1723 - 1729.
- [2] Cederqvist K, Sorsa T, Tervahartiala T, Maisi P, Reunanen K, Lassus P, et al. Matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 and TIMP2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress [J]. *Pediatrics*, 2001, 108(3): 686 - 692.
- [3] Ohki Y, Kato M, Kimura H, Nako Y, Tokuyama K, Morikawa A. Elevated type IV collagen in bronchoalveolar lavage fluid from infants with bronchopulmonary dysplasia [J]. *Biol Neonate*, 2001, 79(1): 34 - 38.
- [4] Sinkin RA, Roberts M, LoMonaco MB, Sanders RJ, Metlay LA. Fibronectin expression in bronchopulmonary dysplasia [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 1998, 1(6): 494 - 502.
- [5] Cherukupalli K, Larson JE, Rotschild A, Thurlbeck WM. Biochemical, clinical, and morphologic studies on lungs of infants with bronchopulmonary dysplasia [J]. *Pediatr Pulmonol*, 1996, 22(4): 215 - 229.
- [6] Winkler MK, Fowlkes JL. Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis? [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(1): L1 - L11.
- [7] William CP, Steven DS. Matrix metalloproteinases in lung biology [J]. *Respir Res*, 2001, 2(1): 10 - 19.
- [8] Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, et al. TIMP1, 2, 3, and 4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(9): L562 - L574.
- [9] Sweet DG, McMahon KJ, Curley AE, O'Connor CM, Halliday HL. Type collagenases in bronchoalveolar lavage fluid from preterm babies at risk of developing chronic lung disease [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2001, 84(3): F168 - F171.
- [10] Danan C, Jarreau PH, Franco ML, Dassieu G, Grillon C, Abd Alsamad I, et al. Gelatinase activities in the airways of premature infants and development of bronchopulmonary dysplasia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(5): L1086 - L1093.
- [11] Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants [J]. *Biol Neonate*, 2001, 79(3-4): 205 - 209.
- [12] 曹蕾, Schmidt B, Speer CP. 应用分子生物学技术探讨慢性肺疾病和呼吸窘迫综合征的炎症反应机制 [J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(11): 672 - 674.
- [13] Curley AE, Sweet DG, Thornton CM, O'hara MD, Chesshyre E, Pizzotti J, et al. Chorioamnionitis and increased neonatal lung lavage fluid matrix metalloproteinase 9 levels: Implications for antenatal origins of chronic lung disease [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(4): 871 - 875.
- [14] Warner RL, Beltran L, Younkin EM, Lewis CS, Weiss SJ, Varani J, et al. Role of stromelysin and gelatinase B in experimental acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(5): 537 - 544.
- [15] Jobe AH. 肺发育和肺损伤2新型支气管肺发育不良 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2001, 3(4): 345 - 347.
- [16] Fukuda R, Ishizaki M, Okada Y, Seiki M, Yamanaka N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in fetal rabbit lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(3): L555 - L561.
- [17] Veness-Meehan KA, Bottone FG Jr, Stiles AD. Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats [J]. *Pediatr Res*, 2000, 48(4): 434 - 444.
- [18] Lanchou J, Corbel M, Tanguy M, Germain N, Boichot E, Theret N, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) in acute respiratory distress syndrome patients [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(2): 536 - 542.
- [19] Dik WA, De Krijger RR, Bonekamp L, Naber BA, Zimmermann LJ, Versnel MA. Localization and potential role of matrix metalloproteinase 21 and tissue inhibitors of metalloproteinase 21 and 22 in different phases of bronchopulmonary dysplasia [J]. *Pediatr Res*, 2001, 50(6): 761 - 766.

(本文编辑:吉耕中)