

基质金属蛋白酶在疾病诊断中的应用及其检测方法

吴玉冰, 尹莉芳, 秦超*

(中国药科大学药学院药剂系, 南京 211198)

摘要 近年来,随着对基质金属蛋白酶与疾病关系的研究逐渐深入,越来越多的研究发现基质金属蛋白酶与多种疾病的严重程度、诊断和预后等密切相关。因此基质金属蛋白酶作为一种非常有潜力的生物标志物得到了越来越多的关注。本文总结了基质金属蛋白酶在肿瘤、心血管疾病、炎症性疾病和神经退行性疾病等疾病诊断中的应用,并对基于RNA水平、蛋白质水平和MMPs的水解酶活性的3类检测方法进行了介绍,以期为基质金属蛋白酶检测的临床应用提供理论参考。

关键词 基质金属蛋白酶;生物标志物;疾病诊断;检测技术

中图分类号 R966;Q71 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)05-0614-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200514

引用本文 吴玉冰,尹莉芳,秦超.基质金属蛋白酶在疾病诊断中的应用及其检测方法[J].中国药科大学学报,2020,51(5):614-621.

Cite this article as: WU Yubing, YIN Lifang, QIN Chao. Clinical application and detection of matrix metalloproteinases in diagnosis[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(5): 614 - 621.

Clinical application and detection of matrix metalloproteinases in diagnosis

WU Yubing, YIN Lifang, QIN Chao*

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Recently, an increasing number of studies have found that matrix metalloproteinase (MMPs) are closely related to the severity, diagnosis and prognosis of a variety of diseases. MMPs have therefore also gained increasing attention as a potential biomarker. In this paper, the application of MMPs in the diagnosis of tumors, cardiovascular diseases, inflammatory diseases and neurodegenerative diseases was summarized, and three types of detection methods based on RNA level, protein level and hydrolase activity of MMPs were introduced, which aims to provide some theoretical reference for the study of clinical application of MMPs detection.

Key words matrix metalloproteinases; biomarker; disease diagnosis; detection technology

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871477)

细胞外基质(ECM)是组织的细胞外组分,能够起到为细胞提供支持、储存生长因子、调节细胞运动、细胞间相互作用和细胞间通讯的作用。ECM由多种基质大分子组成,这些基质大分子的具体组成和结构因组织而异。ECM的主要成分包括胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、糖蛋白、蛋白聚糖和糖胺聚糖等^[1]。在涉及维持组织稳态和再生的生物过程(例如伤口愈合和纤维化)

中,ECM的形成和降解是其中的关键^[2],控制这一关键生理过程的酶被称为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)。MMPs是锌依赖型内切酶,能够共同切割ECM的所有成分。

目前,在脊椎动物中共鉴定出24种已知的MMPs,其中23种被发现在人体内有表达。MMPs使用数字进行编号,从MMP-1到MMP-28。但是由于有不同团队同时发现同一种MMP的情况出现,

收稿日期 2019-11-27 *通信作者 Tel:025-83271018 E-mail:nada77@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81871477)

所以 MMPs 的编号中不包括 MMP-4、MMP-5、MMP-6 和 MMP-22^[3]。基于在体外的底物特异性,可以将 MMPs 分为 7 类^[1,4]:(1)胶原酶(collagenases),包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13 和 MMP-18,能够切割 I、II、III 型间质胶原蛋白;(2)明胶酶(gelatinases),包括 MMP-2 和 MMP-9,能够切割变性的胶原蛋白(明胶)和基底膜蛋白;(3)基质溶解素(stromelysins),包括 MMP-3、MMP-10 和 MMP-11,能够切割层粘连蛋白和其他基底膜蛋白;(4)间质溶素(matrilysins),包括 MMP-7 和 MMP-26,缺乏羧基末端结构域,能够切割蛋白多糖、层粘连蛋白、弹性蛋白和 IV 型胶原蛋白等;(5)膜型 MMPs(MT-MMPs),在细胞表面表达并通过糖磷脂酰肌醇锚(MMP-17 和 MMP-25)或跨膜结构域(MMP-14、MMP-15、MMP-16 和 MMP-24)与质膜连接;(6)金属弹性蛋白酶(metalloelastase),包括 MMP-12,切割弹性蛋白和一些基底膜蛋白;(7)其他 MMPs,包括 MMP-19、MMP-20、MMP-23 和 MMP-28。

大多数 MMPs 不是组成型表达的,并且大多数细胞需要被激活以表达 MMPs。MMPs 的活性在转录和翻译后水平以及细胞定位中受到严格调节^[4]。MMPs 与其抑制剂之间的平衡相互作用受到影响后会引发各种疾病,例如炎症、关节炎、牙周病、血管疾病、糖尿病、纤维化、肿瘤、恶性血液病以及神经系统疾病等。由于它们在许多疾病中的重要作用,MMPs 已经成为许多疾病治疗的靶点以及疾病诊断和预测的生物标志物。

本文主要总结 MMPs 作为生物标志物在各种疾病诊断中的应用以及检测方法,以期对 MMPs 的临床应用的进一步发展提供参考。

1 基质金属蛋白酶在疾病诊断中的应用

MMPs 参与到人体许多生理功能中,例如细胞增殖、分化、凋亡、免疫功能、组织愈合以及血管生成等。并且 MMPs 的活性在转录、翻译、酶促激活和调节蛋白的抑制等方面都受到严密的调控。MMPs 也参与到许多病理过程中^[5],例如组织破坏(如肿瘤侵袭和转移、关节炎、溃疡、炎症性疾病等),纤维化(如肝硬化、多发性硬化、动脉粥样硬化等),基质降解(如心肌病、主动脉瘤)以及各种骨关节疾病等。因此 MMPs 及其抑制剂 TIMP 被认为是许多疾病的潜在生物标志物,可以应用于疾

病诊断,预后和监测中。

1.1 肿瘤

ECM 是肿瘤微环境基质的非细胞成分,在肿瘤中形成支架,主要负责促进肿瘤恶性表型^[6]。肿瘤组织中的 ECM 主要由肿瘤相关成纤维细胞(CAF)产生,作为一种大分子复杂网络,具有独特的物理、生化、生物力学性质,并随着肿瘤的发展经历广泛的重塑^[7]。人体内的 MMPs 家族由 23 种内肽酶组成,这些酶在肿瘤侵袭、转移^[8]和血管生成^[9]中具有重要作用。它们还对细胞行为产生显著影响,如转移性肿瘤细胞的生长和上皮细胞运动性的增加。MMPs 在 ECM 重塑中起到了关键作用,并且参与各种形式的肿瘤进展,因此,MMPs 作为肿瘤进展和转移性侵袭的生物标志物,已经逐渐成为临床监测多种肿瘤的重要工具。

2017 年,Peisker 等^[10]研究发现,原发口腔鳞状细胞癌患者与对照组相比,唾液中的 MMP-9 水平明显升高,通过检测唾液中 MMP-9 的变化有助于临床口腔鳞状细胞癌的早期检测。Eissa 等^[11]的研究结果也表明,尿液中 MMP-9/TIMP-2 和 MMP-2/TIMP-2 的比值可以作为膀胱癌的新型标志物。相比于单个蛋白的生物指标,MMP-9/TIMP-2 和 MMP-2/TIMP-2 的比值的敏感性和特异性都有显著增加,并且提高了在浅表和低度恶性肿瘤中的敏感性。

另外,MMPs 在实体瘤中呈现特异性的时空分布,针对过表达 MMPs 设计荧光探针可以对肿瘤进行生物成像,有助于肿瘤的精确诊断和治疗。Cheng 等^[12]设计了以荧光共振能量转移(FRET)为原理,同时对 MMP-2 和 Caspase-3 进行生物成像的荧光探针。这种荧光探针可以对 MMP-2 和 Caspase-3 分别独立进行时间和空间定位,有望应用于简化精确肿瘤诊断和成像过程。

1.2 心血管疾病

正常心肌拥有许多种 ECM 蛋白,包括胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白和低水平的基质细胞蛋白。这些蛋白都在心脏的生理功能中发挥作用,其中最丰富的是胶原蛋白,它能够形成一个复杂的网络,为心肌提供三维结构和拉伸强度^[13]。在心血管疾病中,胶原网络的破坏需要可以切割胶原蛋白的 MMPs 参与。MMPs 在血管重塑和血管生成^[14-15],侧支动脉形成^[16]和血栓形成与消退^[17]等多

个过程中起重要作用,并且与动脉粥样硬化、主动脉瘤、缺血性卒中等多种血管疾病的发病机制相关^[18]。因此,多种 MMPs,包括 MMP-1、MMP-2、MMP-7、MMP-8 和 MMP-9 等,经研究发现可以用作心血管疾病的诊断和监测工具。

Kormi 等^[19]对 7 928 名受试者进行调查和随访,发现 MMP-8 的血清浓度与冠状动脉疾病、心肌梗死、脑卒中等多种心血管疾病风险相关。MMP-8 与 TIMP-1 的比值与心肌梗死的风险存在显著相关性。将 MMP-8 和 TIMP-1 作为生物标志物有助于预测心血管疾病和死亡风险。2017 年,Zhong 等^[20]对来自中国急性缺血性卒中抗高血压试验(CATIS)的 3 186 名参与者的血清 MMP-9 进行了测量,发现血清 MMP-9 水平升高与死亡和严重残疾风险增加有关,血清 MMP-9 可能是缺血性卒中的重要预后因素。因此将血清 MMP-9 加入常规危险因素进行监测可能改善对死亡或严重残疾结果的风险预测。

1.3 炎症性疾病

MMPs 可以在各种水平上协调炎症功能。它们可以调节炎症细胞从脉管系统向组织中炎症部位的迁移,还通过加工 ECM 成分、生长因子、细胞因子和趋化因子来调节炎症细胞的募集和向炎症部位的流入^[21],在生理和病理学上都积极参与到炎症反应中,是炎症标志物之一。MMPs 作为炎症标志物可以帮助诊断和治疗某些炎症性疾病,包括类风湿关节炎^[22-23],牙科炎症^[24]和羊膜内炎症导致的早产^[25-26]等。

Zhou 等^[27]对 151 名类风湿关节炎患者进行血清 MMP-3 水平的测试和关节超声评分,发现血清 MMP-3 水平与关节超声评分结果密切相关,可以有效反映中重度类风湿关节炎患者的疾病活动,并且可以灵敏且稳定地监测中重度类风湿关节炎患者的治疗反应。血清 MMP-3 和关节超声评分的联合使用可以作为临床监测类风湿关节炎疾病活动和治疗功效的简单且准确的评估方法。Aleksandrowicz 等^[28]曾报道种植体周围龈沟液中的 MMP-8 水平与黏膜炎或种植体周围炎相关。通过监测种植体周围龈沟液中的 MMP-8 水平,有助于在表现出临床症状之前对黏膜炎或种植体周围炎进行早期诊断并迅速进行治疗。

1.4 神经退行性疾病

神经退行性疾病,包括阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化、肌萎缩性脊髓侧索硬化症和亨廷顿舞蹈病等,是一种以神经元结构和功能逐渐丧失为特征的神经系统疾病。中枢神经系统(CNS)中的 ECM 主要由蛋白多糖组成,对神经细胞的发育、存活和活动至关重要。MMPs 主要通过以下方式参与调节神经系统病变常见的神经炎症过程^[29]:(1)ECM 蛋白水解;(2)细胞增殖、分化和迁移;(3)炎症介质的激活和失活;(4)血-脑脊液屏障的通透性。因此,MMPs 的水平变化可能作为神经退行性疾病早期诊断和疾病监测的潜在生物标志物。

Valado 等^[30]对葡萄牙人群中多发性硬化症患者 MMP-9 血清浓度进行了研究,发现多发性硬化症患者的血清 MMP-9 显著高于健康人,并且 MMP-9 有作为 IFN- β 治疗患者预后效果的标志物的潜力。2016 年,Gerwien 等^[31]曾报道使用一种荧光和放射性标记的 MMP 抑制剂观察自身免疫性脑脊髓炎(一种多发性硬化症)动物模型脑中的 MMP 活性,并使用放射性 MMP 配体进行 MMP 活性的正电子发射断层扫描(PET)成像。通过追踪 MMP 活性,检测到多发性硬化症早期的病变和持续白细胞浸润,作为一种非侵入手段,监测多发性硬化症病变的形成和进展。

1.5 其他疾病

由于 MMPs 对人体许多病理过程的广泛参与,还有其他许多疾病也可以利用 MMPs 作为诊断或预后的检测指标。Zhou 等^[32]研究发现,不同肾病患者的尿液中 MMP-7 水平显著高于正常受试者,并且尿液中 MMP-7 水平与肾纤维化评分密切相关。MMP-7 可以作为肾脏纤维化病变的非侵入性生物标志物,并且还是纤维化的重要致病介质。Sigal 等^[33]对 70 种潜在生物标志物与结核病的相关性进行了筛选,MMP-8 是最终被确认与疾病严重程度和治疗反应相关的 7 种生物标志物之一。通过测量血液中 MMP-8,可以确定疾病严重性并在治疗期间对疾病进行监测。Lertudomphonwanit 等^[34]曾报道 MMP-7 可以作为胆道闭锁的诊断生物标志物,并且当 MMP-7 与胆汁淤积的标志物 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)组合时,诊断性能能够达到 95%。

2 基质金属蛋白酶的检测

在 MMPs 的表达过程中, MMPs 先通过转录、翻译的过程以酶原的形式产生, 随后通过蛋白水解或化学激活, 才能够最终生成具有活性的 MMPs。根据在这一过程中检测目标物的不同, 可以将 MMPs 的检测方法分为 3 类: (1) 基于 RNA 水平的检测; (2) 基于蛋白水平的检测; (3) 基于 MMPs 的水解酶活性的检测。

2.1 RNA 水平

MMPs 的合成需要经过 mRNA 的转录。通过检测 mRNA 的水平, 就能够研究 MMPs 的转录表达情况。常用的检测 mRNA 的方法主要包括反转录-聚合酶链式反应、核酸探针和 Northern 印迹杂交。

2.1.1 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) RT-PCR 是先将 RNA 反转录成为互补 DNA (cDNA) 后, 再以 cDNA 作为模板通过 PCR 进行扩增的一种 PCR 技术。通过使用荧光监测扩增反应可以将实时荧光定量 PCR 与 RT-PCR 结合, 对特定 RNA 序列进行快速灵敏的定量检测, 该技术被广泛用于研究和临床环境中的基因表达分析和病毒 RNA 定量。Lee 等^[35]为了研究缺氧和促炎刺激对类风湿炎症关节中的 MMP-1 和 MMP-13 表达情况, 在缺氧和常氧条件下, 使用实时半定量 RT-PCR 检测了 IL-1 β 刺激下滑膜成纤维细胞的 VEGF、MMP-1 和 MMP-13 的分泌水平。

2.1.2 核酸探针 核酸探针是指将已知碱基序列的核酸在体内或体外进行标记, 使其可以通过碱基互补配对特异性检测组织或细胞中目标 DNA 或 RNA, 直接、简便地研究目的基因表达和定位的一种技术。根据核酸探针的来源和性质可以将其分为 cDNA 探针、基因组 DNA 探针、寡核苷酸探针、RNA 探针等。Shiozawa 等^[36]曾使用与人 MMP-1 mRNA 片段互补的寡核苷酸探针进行原位杂交来检测 MMP-1 mRNA, 从而研究 MMP-1 在人大肠癌中起到的作用。探针在 3' 尾端用洋地黄毒苷进行标记。

2.1.3 Northern 印迹杂交 Northern 印迹杂交是通过电泳分离不同相对分子质量的 RNA 后将其转印到印迹膜上, 并使用与部分或全部靶序列互补的杂交探针进行检测的技术。Northern 印迹检测的优势包括可以检测 RNA 大小, 观察剪接产物等,

并且转印完成的印迹膜可以进行长期储存和重复检测。与 RT-PCR 相比, Northern 印迹法灵敏度较低, 但特异性高, 可以减少检测中的假阳性结果。Li 等^[37]为了确定结膜松弛症是否与 MMPs 的表达与活性高于 TIMPs 相关, 使用 Northern 杂交对正常人和患者结膜成纤维细胞中的 MMPs、TIMPs 和尿激酶纤溶酶原激活剂 (uPA) 的 mRNA 水平进行了检测。发现患者结膜成纤维细胞中 MMP-1 和 MMP-3 的转录表达显著增加。

2.2 蛋白质水平

基于蛋白质水平的检测即利用免疫手段对 MMPs 进行检测, 是通过抗原抗体的特异性结合对 MMPs 进行识别。这些方法需要使用到价格较为昂贵的抗 MMPs 抗体, 可以识别酶原形式的 MMPs 和活性 MMPs。

2.2.1 Western 印迹杂交 Western 印迹杂交是分子生物学及生物化学等多种学科中广泛使用的分析技术, 用于定性和半定量检测单个蛋白质和蛋白修饰, 特异性强、灵敏度高, 但操作繁琐, 成本较高。2019 年, Ando 等^[38]的研究中, 将 Western 印迹杂交作为乳腺癌患者尿液外泌体中 MMP-1 蛋白水平的检测手段, 发现 MMP-1 有可能成为乳腺癌筛查的生物标志物。

2.2.2 酶联免疫吸附测定(ELISA) ELISA 是一种固相酶免疫测定 (EIA), 在各行业中都被广泛使用。通常形式的 ELISA 测定是将具有未知抗原量的样品特异性或非特异性地固定在固体支持物表面, 然后添加检测抗体与抗原形成复合物。检测抗体可以使用与酶连接的二抗进行检测或直接使用酶标记的抗体作为检测抗体。最后添加酶促底物产生可见信号, 通常使用呈色反应进行检测。Farkas 等^[39]曾通过使用 ELISA 测定炎性肠病患者粪便中的 MMP-9 水平, 发现粪便 MMP-9 对检测内镜下活跃的溃疡性结肠炎和囊袋炎具有很高的灵敏度, 可以作为评估肠道炎症的非侵入性方法。

2.2.3 免疫组织化学(IHC) 免疫组化是利用特异性抗体选择识别组织切片细胞中抗原的一种免疫染色技术。抗体通常与酶或荧光基团连接进行可视化检测。免疫组化技术已经被广泛应用于诊断异常细胞以及对特定分子标志物的检测。通过使用这一检测方法, 可以了解生物标志物和差异表达蛋白在生物组织不同部位的分布和定位。

Roy 等^[40]为了研究胰腺恶性肿瘤能否使用尿液 MMPs 或 TIMPs 作为疾病预测因子,使用免疫组化技术分析肿瘤和正常胰腺组织中的生物标志物表达,并与尿液检测结果进行对照,发现 MMP-2 和 TIMP-1 可能在胰腺恶性肿瘤的检测中具有诊断价值。

2.2.4 免疫荧光 免疫荧光通过抗原抗体特异性结合来对细胞内特定生物分子靶标进行定位的免疫染色技术。免疫荧光可以观察到目标分子或结构在样品中的分布,并进行半定量分析。通过与具有不同功能的显微镜结合,可以达到超高分辨率成像、实时跟踪、分层扫描等效果。Zhou 等^[41]在研究 MMP-1 在大鼠脊髓损伤模型中的表达时,使用了免疫荧光染色对 MMP-1 进行了免疫反应性和共定位研究。

2.2.5 电化学磁免疫传感器 磁分离酶联免疫测定(magnetic affinity immunoassay, MAIA)是一种使用磁珠代替传统的固相载体对样品中抗原进行分离的免疫测定方法。通过使用抗体标记的磁珠与目标抗原结合,利用磁力分离代测样品中的目标抗原。MAIA 的方法和原理与 ELISA 和 Western blot 非常相似,但可以在液体介质中进行检测,具有高灵敏度、高特异性、操作简便、样品用量少等特点。将 MAIA 与电化学检测技术相结合可以用来开发电化学磁免疫传感器(electrochemical magneto-immunosensors),大幅度提高检测灵敏度和通量,简化检测步骤。2018年,Ruiz-Vega 等^[42]使用辣根过氧化物酶聚合共轭物(Poly-HRP)作为信号放大器,开发了单步仅需 5 min 的 MMP-9 磁免疫测定法,并生产了一种简单便宜的磁性固定器用于多重电化学检测。该检测法可以使用现成的商用底物溶液,并且足够简便快速,可以应用于现场护理或由非专业人员进行检测。

2.3 MMPs 的水解酶活性

MMPs 是一种锌依赖型的内切酶。根据酶对底物的特异性,可以使用 MMPs 的底物(通常是明胶)或特定的氨基酸序列对 MMPs 进行识别,并使用不同方式产生可检测的信号。这些方法可以只检测具有活性的 MMPs 的水平,直接反应样品中 MMPs 的活性变化。

2.3.1 明胶酶谱 明胶酶谱法是以明胶作为底物,对明胶敏感的 MMPs(MMP-2 和 MMP-9)进行测

定的一种酶谱检测。根据检测部位不同可以分为凝胶酶谱、原位酶谱和体内酶谱。由于 MMP-2 和 MMP-9 对明胶的特异性,明胶酶谱法作为一种高灵敏度、低成本的检测方法被广泛应用于 MMP-2 和 MMP-9 的检测中。Fietz 等^[43]使用明胶酶谱法对马关节中的 MMP-2 和 MMP-9 进行检测,发现疾病关节中 MMP-2 和 MMP-9 的活性均有所升高。

2.3.2 敏感肽 使用可以被 MMPs 特异性切割的敏感肽与不同检测基团结合可以制备 MMPs 特异性探针。由于 MMPs 敏感肽连接方便、特异性高,可以作为一种通用的 MMPs 识别方式与多种不同的信号检测方式进行组合,得到广泛应用。

(1) 荧光成像 MMPs 敏感肽最常见的应用方式是各种荧光基团连接,利用荧光成像进行检测和定位。例如在荧光探针中,可以通过荧光共振能量转移(Förster resonance energy transfer, FRET)使荧光基团淬灭。当敏感肽被 MMPs 特异性切割时,荧光基团释放恢复荧光,产生可检测的荧光信号。

Li 等^[44]使用从量子点(供体)到有机染料(受体)的荧光共振能量转移,结合 MMP-2 特异性肽底物制备 MMP-2 特异性荧光探针。当探针暴露于 MMP-2 时,多肽的选择性切割导致量子点荧光恢复。该探针可以应用于肿瘤部位 MMP-2 的监测中。2016年,Han 等^[45]报道了一种基于聚二甲基硅氧烷(PDMS)的微流体装置,其中固定了水凝胶构架的纳米纤维基质。FITC 荧光标记的 MMP-9 特异性肽被固定到纳米纤维基质上。当敏感肽在反应室中与含 MMP-9 的溶液反应时,FITC 被释放,在检测区产生荧光流。该检测方式相应快速,检测限低,并且微流体系统可以重复使用。

(2) 化学交换饱和转移 化学交换饱和转移(chemical exchange saturation transfer, CEST)是一种核磁共振成像新方法。它是通过使用特定脉冲对特定物质(比如蛋白质、葡萄糖、黏多糖等生物大分子)中的氢质子进行饱和,饱和氢质子通过化学交换,影响水分子信号的变化,通过检测水的信号,可以间接反应目标物质的含量。使用镧系金属螯合物可以制成顺磁性 CEST 对比剂,以加强 CEST 效应。2017年,Ferrauto 等^[46]报道了一种脂质体 CEST 检测剂,使用 MMP-2 敏感肽在脂质体表面连接生物素和亲和素分子。通过 MMP-2 切割后

脂质体内水共振的化学位移来定量检测 MMP-2 的水平。

(3) 电化学生物传感器 使用电化学传感器检测 MMPs 除了使用特异性抗体修饰的免疫传感器,还可以使用可被酶降解的天然或合成底物包被在电极表面,制成活性传感器。通过电极将目标分子的浓度信息转换成电势、电流、电阻或电容等可测量的响应信号,从而进行定性或定量检测,该方法具有灵敏度高、易微型化等特点。Biela 等^[47]使用氧化葡聚糖包被电极,并与含有 MMP-9 特定切割位点的肽交联来生产生物传感器。薄膜暴露于酶后导致薄膜降解,可以通过测量阻抗来进行检测。传感器响应迅速,在添加 MMP-9 后 5 min 内即可观察到明显的阻抗变化。

2.3.3 基于活性位点的荧光探针 由于 MMPs 是锌依赖型的内切酶,通过检测 MMPs 催化活性区的锌离子,可以检测活性 MMPs。Li 等^[48]报道了一种针对 MMP 活性位点中的 Zn^{2+} 的 DNA 探针, MMPs 的金属位点可以在紫外光下暴露,通过次氨基三乙酸(NTA)修饰的核酸探针可以与其结合,再通过 FITC 和 BHQ1 修饰的分子信标进行荧光成像,实现对活性 MMP-9 的特异性检测。

3 结 语

随着对 MMPs 作为生物标志物的进一步研究,其检测技术也得到了快速发展。传统的实验室方法繁琐耗时,已经不能满足临床疾病诊断和跟踪评估的要求,人们对更加快速、灵敏、简单、高通量检测方法的需求日益增加。近年来,随着电化学检测技术、测流色谱技术^[49]、生物芯片技术^[50]等新型检测技术的快速发展,已经有人尝试将这些检测技术与传统的 MMP-2 检测方法相结合,以开发可以满足临床检测需求的检测系统。可以期待特异性高、反应灵敏的快速检测方法成功完成开发并且进行产业化生产,从而为相关疾病的预防、诊断和治疗提供一种经济快速的辅助检测方案,并为相关药物的研发提供支持。

参 考 文 献

- [1] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **97**:4–27.
- [2] Galliera E, Tacchini L, Corsi Romanelli MM. Matrix metalloproteinases as biomarkers of disease: updates and new insights[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2015, **53**(3):349–355.
- [3] Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, **31**(suppl 1):177–183.
- [4] Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, et al. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, **53**(5):585–600.
- [5] Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions[J]. *Revue Roumaine De Morphol Et Embryol*, 2010, **51**(2):215–228.
- [6] Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers[J]. *J Cell Biochem*, 2019, **120**(3):2782–2790.
- [7] Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **97**:41–55.
- [8] Shay G, Lynch CC, Fingleton B. Moving targets: emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis[J]. *Matrix Biol*, 2015, **44/45/46**:200–206.
- [9] Deryugina EI, Quigley JP. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculation[J]. *Matrix Biol*, 2015, **44/45/46**:94–112.
- [10] Peisker A, Raschke GF, Fahmy MD, et al. Salivary MMP-9 in the detection of oral squamous cell carcinoma[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2017, **22**(3):e270–e275.
- [11] Eissa S, Ali-Labib R, Swellam M, et al. Noninvasive diagnosis of bladder cancer by detection of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-2) in urine[J]. *Eur Urol*, 2007, **52**(5):1388–1396.
- [12] Cheng H, Li SY, Zheng HR, et al. Multi-förster resonance energy transfer-based fluorescent probe for spatiotemporal matrix metalloproteinase-2 and caspase-3 imaging[J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(8):4349–4354.
- [13] Yabluchanskiy A, Ma YG, Iyer RP, et al. Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2013, **28**(6):391–403.
- [14] Chen QS, Jin M, Yang F, et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, **2013**:928315.
- [15] Myasoedova VA, Chistiakov DA, Grechko AV, et al. Matrix metalloproteinases in pro-atherosclerotic arterial remodeling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, **123**:159–167.
- [16] Dodd T, Wiggins L, Hutcheson R, et al. Impaired coronary collateral growth in the metabolic syndrome is in part mediated by matrix metalloproteinase 12-dependent production of endostatin and angiostatin[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, **33**(6):1339–1349.
- [17] Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in

- atherothrombosis [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, **52**(5): 410–428.
- [18] Tokito A, Jougasaki M. Matrix metalloproteinases in non-neoplastic disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(7): E1178.
- [19] Kormi I, Nieminen MT, Havulinna AS, et al. Matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 predict incident cardiovascular disease events and all-cause mortality in a population-based cohort [J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2017, **24**(11): 1136–1144.
- [20] Zhong CK, Yang JY, Xu T, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 levels and prognosis of acute ischemic stroke [J]. *Neurology*, 2017, **89**(8): 805–812.
- [21] Nissinen L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in inflammation [J]. *BBA-Gen Subjects*, 2014, **1840**(8): 2571–2580.
- [22] Withrow J, Murphy C, Liu YT, et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, **18**(1): 286.
- [23] Li H, Wang D, Yuan YJ, et al. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, **19**(1): 248.
- [24] Rathnayake N, Gieselmann DR, Heikkinen AM, et al. Salivary Diagnostics-Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2017, **7**(1): E7.
- [25] Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour [J]. *BJOG: Int J Obstet Gynaecol*, 2005, **112**: 19–22.
- [26] Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, et al. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, **195**(4): 1025–1030.
- [27] Zhou L, Wang G, Liu X, et al. Matrix metalloproteinase-3 and the 7-joint ultrasound score in the assessment of disease activity and therapeutic efficacy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, **19**(1): 250.
- [28] Aleksandrowicz P, Zelechowska P, Agier J, et al. Evaluation of metalloproteinase-8 levels in crevicular fluid of patients with healthy implants or periodontitis [J]. *Mediat Inflamm*, 2017, **2017**: 1–7.
- [29] Rivera S, García-González L, Khrestchatisky M, et al. Metalloproteinases and their tissue inhibitors in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, **76**(16): 3167–3191.
- [30] Valado A, Leitão MJ, Martinho A, et al. Multiple sclerosis: association of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with risk and clinical course the disease [J]. *Mult Scler Relat Disord*, 2017, **11**: 71–76.
- [31] Gerwien H, Hermann S, Zhang XL, et al. Imaging matrix metalloproteinase activity in multiple sclerosis as a specific marker of leukocyte penetration of the blood-brain barrier [J]. *Sci Transl Med*, 2016, **8**(364): 364ra152.
- [32] Zhou D, Tian Y, Sun L, et al. Matrix metalloproteinase-7 is a urinary biomarker and pathogenic mediator of kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, **28**(2): 598–611.
- [33] Sigal GB, Segal MR, Mathew A, et al. Biomarkers of tuberculosis severity and treatment effect: a directed screen of 70 host markers in a randomized clinical trial [J]. *EBioMedicine*, 2017, **25**: 112–121.
- [34] Lertudomphonwanit C, Mourya R, Fei L, et al. Large-scale proteomics identifies MMP-7 as a sentinel of epithelial injury and of biliary atresia [J]. *Sci Transl Med*, 2017, **9**(417): eaa8462.
- [35] Lee YA, Choi HM, Lee SH, et al. Hypoxia differentially affects IL-1 β -stimulated MMP-1 and MMP-13 expression of fibroblast-like synoviocytes in an HIF-1 α -dependent manner [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, **51**(3): 443–450.
- [36] Shiozawa J, Ito M, Nakayama T, et al. Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2000, **13**(9): 925–933.
- [37] Li DQ, Meller D, Liu Y, et al. Overexpression of MMP-1 and MMP-3 by cultured conjunctivochalasis fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, **41**(2): 404–410.
- [38] Ando W, Kikuchi K, Uematsu T, et al. Novel breast cancer screening: combined expression of miR-21 and MMP-1 in urinary exosomes detects 95% of breast cancer without metastasis [J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 13595.
- [39] Farkas K, Saródi Z, Bálint A, et al. The diagnostic value of a new fecal marker, matrix metalloproteinase-9, in different types of inflammatory bowel diseases [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, **9**(3): 231–237.
- [40] Roy R, Zurakowski D, Wischhusen J, et al. Urinary TIMP-1 and MMP-2 levels detect the presence of pancreatic malignancies [J]. *Br J Cancer*, 2014, **111**(9): 1772–1779.
- [41] Zhou Y, Cui ZM, Xia XP, et al. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression in rat spinal cord injury model [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, **34**(8): 1151–1163.
- [42] Ruiz-Vega G, García-Robaina A, Ben Ismail M, et al. Detection of plasma MMP-9 within minutes. Unveiling some of the clues to develop fast and simple electrochemical magneto-immunosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, **115**: 45–52.
- [43] Fietz S, Einspanier R, Hoppner S, et al. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays [J]. *Equine Vet J*, 2008, **40**(3): 266–271.
- [44] Li X, Deng DW, Xue JP, et al. Quantum dots based molecular beacons for *in vitro* and *in vivo* detection of MMP-2 on tumor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, **61**: 512–518.
- [45] Han SW, Koh WG. Hydrogel-framed nanofiber matrix integrated with a microfluidic device for fluorescence detection of matrix metalloproteinases-9 [J]. *Anal Chem*, 2016, **88**(12): 6247–6253.

- [46] Ferrauto G, Di Gregorio E, Ruzza M, *et al.* Enzyme-responsive LipoCEST agents: assessment of MMP-2 activity by measuring the intra-liposomal water ^1H NMR shift[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(40): 12170–12173.
- [47] Biela, Watkinson M, Meier UC, *et al.* Disposable MMP-9 sensor based on the degradation of peptide cross-linked hydrogel films using electrochemical impedance spectroscopy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, **68**: 660–667.
- [48] Li N, Yi LL, He ZY, *et al.* A DNA-directed covalent conjugation fluorescence probe for *in vitro* detection of functional matrix metalloproteinases[J]. *Analyst*, 2017, **142**(4): 634–640.
- [49] Johnson N, Ebersole JL, Kryscio RJ, *et al.* Rapid assessment of salivary MMP-8 and periodontal disease using lateral flow immunoassay[J]. *Oral Dis*, 2016, **22**(7): 681–687.
- [50] Hwang SY, Seo IJ, Lee SY, *et al.* Microfluidic multiplex biochip based on a point-of-care electrochemical detection system for matrix metalloproteinases [J]. *J Electroanal Chem*, 2015, **756**: 118–123.

· 校园信息 ·

“创新药物发现与成药性评价研讨会”在中国药科大学召开

9月8日上午,2020年中国药学会第四分会场“创新药物发现与成药性评价研讨会”在中国药科大学玄武门校区召开。此次研讨会由中国药学会药物化学专业委员会和中国药学会应用药理专业委员会共同主办,中国药科大学承办,采用了现场研讨与线上直播相结合的形式。中国科学院院士陈凯先教授、中国工程院院士王广基教授和中国药科大学副校长郝海平教授分别代表中国药学会药物化学专业委员会、中国药学会应用药理专业委员会和中国药科大学致辞。会议由中国药科大学尚靖教授和徐云根教授主持。

本次会议围绕“发扬抗击新冠肺炎精神,推动药学事业高质量发展”的主题,邀请了中国药科大学郝海平教授、浙江中医药大学陈忠教授、云南大学罗晓东教授、华东理工大学李洪林教授以及中山大学附属肿瘤医院李苏教授等专家进行了精彩的报告。

郝海平教授的报告题目是“MASH药物的研究与思考”,他对脂肪肝的发病机制、研究进展、相关靶点的发现以及治疗对策进行了深入的解析,为抗脂肪肝药物的研发提出了新的思路。李洪林教授的报告题目是“抗RNA病毒候选药物的发现”,他分享了利用自行建立的药物靶标识别及药物发现方法及软件,发现了高效的抗新冠病毒(2019-nCoV)候选药物,并推向临床试验,部分研究成果获得了国际同行的高度关注和好评。陈忠教授的报告题目是“癫痫发病机制解析与治疗药物新靶点”,他针对癫痫的发病机制开展了大量扎实的基础研究工作,揭示了癫痫成因的一些新机制,并针对发病新机制和新靶标,开展创新药物研究,取得了阶段性成果。罗晓东教授的报告题目是“天然吡啶生物碱新药创制”,他领导的课题组通过对灯台叶总生物碱新药的长期研究,从药材质量控制、活性成分制备纯化及活性筛选,直至推向IIa期临床研究,基于该药物对肺炎和支气管炎的良好预后,被推荐用于新冠肺炎的治疗。李苏教授报告的题目为“精准医学、靶向时代、免疫热潮——化疗药物的发展与应用”。一个上午的时间虽然短暂,但专家的报告为与会代表奉上了一道精彩纷呈的学术大餐。

本次会议除了60余位代表参加线下会议外,还吸引了来自全国各地共计1913位代表观看了线上直播。会议的成功召开,对于促进学科交叉融合、拓宽创新药物研究思路等方面起到积极的推动作用。

(药学院、药物科学研究院)