

注射用丹参多酚酸对多发性硬化急性期疗效及血清基质金属蛋白酶9水平的影响

王秉卿¹, 赵浪芳¹, 段瑞芬¹, 张美妮²

1. 山西医科大学, 山西 太原 030001

2. 山西医科大学第一医院, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 通过观察注射用丹参多酚酸对复发缓解型多发性硬化(RRMS)的疗效, 检测血清基质金属蛋白酶9(MMP-9)用药前后含量变化, 分析MMP-9与扩展功能障碍状态量表(EDSS)评分、日常生活能力量表(ADL)评分的相关性, 评估注射用丹参多酚酸对RRMS急性期患者疗效。**方法** 随机将40例RRMS患者分为两组, 各20例。对照组采用糖皮质激素与神经营养药物, 观察组在此基础上加用注射用丹参多酚酸, 每日1次。两组均治疗14 d。观察两组治疗前、用药14 d后血清MMP-9水平及治疗前、治疗14、28 d后EDSS及ADL评分。**结果** 两组患者治疗14 d后血清MMP-9水平均增高, 观察组患者MMP-9水平增高幅度明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组患者治疗14 d后及治疗后28 d EDSS评分均明显下降, 同组治疗前后比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 且观察组EDSS评分降低的程度大于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组患者治疗14 d后及治疗后28 d ADL评分均较治疗前升高, 同组治疗前后比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 且观察组ADL评分高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 注射用丹参多酚酸可以降低RRMS患者MMP-9水平, 改善临床症状, 提高生存质量, 用药后安全有效, 无严重不良反应。

关键词: 注射用丹参多酚酸; 多发性硬化; MMP-9; EDSS; ADL

中图分类号: R969 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2019)02-0278-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.02.011

Effect of Salvianolic Acids for Injection on acute multiple sclerosis and serum matrix metalloproteinase-9 level

WANG Bingqing¹, ZHAO Langfang¹, DUAN Ruifen¹, ZHANG Meini²

1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. Shanxi Medical University First Hospital, Taiyuan 030001, China

Abstract: **Objective** Clinical observe the curative effect on multiple sclerosis by Salvianolic Acids for Injection, by detecting the content of MMP-9 in the serum before and after taking the medicine, analyzing the correlation between MMP-9 and EDSS/ADL grade, assess the curative effect on patients with acute phase of RRMS that injected with Salvianolic Acids for Injection. **Method** (1) Case collect: randomly divide the 40 MS into observation group and control group, 20 cases in each group. (2) Test index: test serum MMP-9 before the first treatment, and after 14 days of initial treatment, review serum MMP-9, testing company test serum MMP-9. (3) Assess EDSS grade and ADL grade before treatment, 14 days after treatment and 28 days after treatment. (4) Dosage regimen: the control group using glucocorticoid and neurotrophic drugs, the observation group on above basis, give Salvianolic Acids for Injection as treatment, once a day. Both groups were treated for 14 days. **Results** The levels of serum MMP-9 in both groups increased 14 days after treatment. The increase of serum MMP-9 in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The EDSS scores of the two groups decreased significantly after 14 days of treatment and 28 days of treatment, and there was a significant difference between the two groups before and after treatment ($P < 0.05$), and the EDSS scores of the observation group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). The ADL scores of the two groups after 14 days of treatment and 28 days of treatment were higher than those before treatment, and the difference between the two groups before and after treatment was statistically significant ($P < 0.05$); and the ADL scores of the observation group were higher than

收稿日期: 2018-09-13

第一作者: 王秉卿(1982—), 研究生, 主治医师, 研究方向为脱髓鞘病。Tel: 13935121523 E-mail: 36525376@qq.com

those of the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Salvianolic Acids for Injection can reduce the MMP-9 levels in multiple sclerosis patients, improve clinical symptoms, improve life quality of patients, the medication is safe and effective, no serious adverse reactions.

Key words: Salvianolic Acids for Injection; multiple sclerosis; MMP-9; EDSS; ADL

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统炎性脱髓鞘为主要病理特点的自身免疫性疾病,其特征是免疫调节紊乱和中枢神经系统神经变性^[1]。病因和发病机制尚不明确,目前认为CD4⁺T细胞过度活跃,是导致该病的直接原因^[2]。研究表明致病性T细胞迁移到中枢神经系统必须通过血脑屏障(BBB),所以BBB完整性破坏已经成为MS和实验性自身免疫性脑脊髓炎发病机制的先决条件和重要环节^[3]。基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是MMPs中的一类锌离子依赖的蛋白酶,具有破坏BBB,降解细胞外基质、髓鞘碱性蛋白的作用,可以导致血管内皮细胞通透性增高,进而导致T淋巴细胞等炎症细胞及炎症因子穿透血管基底膜进入中枢神经系统。丹参多酚酸在临床上主要应用于脑梗死急性期的治疗,其作用机制可能通过抗炎抗免疫维护血脑屏障完整性而发挥神经保护作用^[4]。因此,本研究的主要目的旨在观察注射用丹参多酚酸在急性期MS患者中的疗效及MMP9在血清中的动态变化,并探讨注射用丹参多酚酸的抗炎抗免疫机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究对象均来源于山医科大学附属第一医院神经内科多发性硬化复发的患者40例,发病后行头颅与脊髓核磁共振检查证实有新发病灶,可明确诊断为复发缓解型多发性硬化(RRMS),采用随机对照的方法分为对照组、观察组各20例。所有患者中男性为12例,女性为28例,患者的年龄范围在18~60岁,平均为(40.2±7.1)岁。纳入标准:(1)所有患者均符合2010年McDonald诊断标准;(2)18~60岁,不是首次发病,既往脑脊液检测提示寡克隆区带(OLB)阳性;(3)通过头颅及脊髓MRI明确有新发病灶,并除外其他脑血管疾病;(4)入院时测评扩展残疾状态量表(EDSS)评分,评分大于(等于)4分,小于(等于)7.5分;(5)所有患者均签署知情同意书,本研究获得医院伦理委员会批准。排除标准:(1)严重肝肾疾病、心脑血管疾病、精神病史患者;妊娠期及哺乳期妇女;有颅内肿瘤及其他恶性肿瘤患者;不能耐受药物治疗或合并其他免疫系统疾病患者

等禁止入组;(2)对造影剂过敏及其他不能行MRI检查者;使用过利妥昔单抗、丙种球蛋白、免疫制剂等患者;(3)合并其他神经系统疾病影响EDSS评分的病例;(4)依从性差,不能完成随访者。中止标准:(1)未按本研究方案要求进行观察和治疗的患者;(2)治疗期间出现不明原因的严重不良事件者。

1.2 研究方法

收集符合纳入标准的40例患者,按照随机对照的方法,将患者分为观察组和对照组各20例患者。对照组采用糖皮质激素(甲强龙1 000 mg)溶于0.9%氯化钠注射液500 mL中缓慢静点,1次/d,配合神经营养药物(维生素B1、B6、B12)治疗,激素使用5 d直接停药,神经营养药物使用14 d停药。观察组在对照组基础上加用注射用丹参多酚酸(天津天士力之骄药业有限公司,国药准字Z20110011,批号20160501)0.13 g,加入0.9%氯化钠注射液250 mL稀释后缓慢静滴,1次/d,用药期间加强护理观察,需严格控制滴速,不高于2 mL/min。两组患者的14 d疗程结束以后,分别记录用药前、用药14 d后EDSS评分及日常生活活动(ADL)评分,测量用药前及用药14 d后血清MMP-9水平。出院后对两组患者分别进行门诊访视,以用药后28 d为界限,门诊进行EDSS评分及ADL评分。

1.3 观察指标

RRMS患者入组后,两组患者在急性初期(治疗前)、治疗14 d分别留取外周血标本,并对治疗前、后进行EDSS评分及ADL评分;判断MS患者神经功能恢复情况。外周血置EDTA管中并迅速离心(3 000 r/min),吸取上清液,分装至EP管,置-80℃冰箱冻存,待标本收集齐后行ELISA检测(上海西唐生物科技有限公司),观察用药前后血清MMP-9水平。

1.4 统计学方法

采用SPSS22.00软件进行统计分析;所有变量均进行正态性检验,服从正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,不服从正态分布的资料用中位数和四分位数间距描述;服从正态分布的资料组间比较采用两独立样本 t 检验,不服从正态分布的资料采用Wilcoxon秩和检验进行组间比较;重复测量数据采

用重复测量方差分析比较不同时点间差异,并进一步用 Bonferroni 法进行多重比较;本次研究设定检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组用药前后 MMP-9 对比

结果表明对照组血 MMP-9 升高值指标服从正态分布,观察组血 MMP-9 值指标不服从正态分布。采用两独立样本 t 检验,比较两组用药前后血 MMP-9 值的组间差异,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,结果表明 MMP-9 值在用药前后差别无统计学意义,即尚不能认为两组 MMP-9 值在用药前后存在差异。但对照组用药前后的血 MMP-9 的升高程度大于观察组,两组的 MMP-9 的升高程度差别有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组用药前后的 MMP-9 值比较
Table 1 Comparison on MMP-9 before and after treatment between two groups

组别	n/例	MMP-9		
		用药前	用药 14 d	升高程度 M(P25-P75)
对照	20	1.50±0.74	2.30±0.55	0.4(0.28, 1.28)
观察	20	1.90±0.63	1.90±0.63	0.04(-0.01, 0.20)*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

2.2 EDSS 评分对比

对照组及观察组用药前和用药后的 EDSS 评分值均服从正态分布。根据球形检验的结果 ($\chi^2=1.842, P=0.398$), 以 $\alpha=0.05$ 的检验水准, 认为满足“球对称”假设;通过对组内因素时间(即不同时间点)分析,以 $\alpha=0.05$ 的检验水准,认为不同时间点的 EDSS 评分间存在差异 ($F=46.945, P<0.001$);进一步采用 Bonferroni 法进行多重比较,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,结果表明 3 时点间差异均有统计学意义,用药前 EDSS 评分最高,用药 14 d 后次之,用药后 28 d 最低。观察组得分降低的程度较对照组高。通过对组间因素分析,以 $\alpha=0.05$ 的检验水准,认为对照组与观察组的 EDSS 评分间存在差异 ($F=81.341, P<0.001$);通过对分组×时间的交互效应分析,以 $\alpha=0.05$ 的检验水准,认为时间与分组间不存在交互效应 ($F=0.691, P=0.515$),即两组 EDSS 评分随时间的变化趋势相同。见表 2。

2.3 ADL 评分对比

结果表明对照组及观察组用药前和用药后的

表 2 两组各时点 EDSS 评分的比较

Table 2 Comparison on EDSS scores at different time points between two groups

组别	n/例	EDSS 评分		
		用药前	用药 14 d	用药后 28 d
对照	20	5.30±1.48	3.90±1.88*	3.40±1.78*
观察	20	5.50±1.12	4.30±1.30**	3.30±1.60**

与同组治疗前比较: * $P<0.05$; 与对照组治疗后同时点比较: ** $P<0.05$

* $P<0.05$ vs same group before treatment; ** $P<0.05$ vs control group after treatment at same time

ADL 评分值均服从正态分布。根据球形检验的结果 ($\chi^2=1.237, P=0.539$), 以 $\alpha=0.05$ 的检验水准, 认为该例满足“球对称”假设;通过对组内因素时间(即不同时间点)分析,以 $\alpha=0.05$ 的检验水准,认为不同时间点的 ADL 评分间存在差异 ($F=94.737, P<0.001$);进一步采用 Bonferroni 法进行多重比较,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,结果表明用药 14 d 后与用药后 28 d 的 ADL 评分间差异无统计学意义;用药 14 d 后、用药后 28 d 与用药前 ADL 评分相比差异有统计学意义,用药前的得分低。观察组得分升高的程度较对照组高。通过对组内因素分析,以 $\alpha=0.05$ 的检验水准,认为对照组与观察组的 EDSS 评分间存在差异 ($F=81.341, P<0.001$);通过对分组×时间的交互效应分析,以 $\alpha=0.05$ 的检验水准,认为时间与分组间不存在交互效应 ($F=0.691, P=0.515$),即两组 ADL 随时间的变化趋势相同。见表 3。

表 3 两组组各时点 ADL 评分的比较

Table 3 Comparison on ADL scores at different time points between two groups

组别	n/例	ADL 评分		
		用药前	用药 14 d	用药后 28 d
对照	20	51.00±16.73	62.00±14.83*	67.00±12.04*
观察	20	51.00±16.73	64.00±16.36**	65.00±16.96**

与同组治疗前比较: * $P<0.05$; 与对照组治疗后同时点比较: ** $P<0.05$

* $P<0.05$ vs same group before treatment; ** $P<0.05$ vs control group after treatment at same time

3 讨论

MMP 是多功能的内肽酶,在健康者和患病者中具有许多不同的功能。在脑内,基质金属蛋白酶对组织形成,神经网络重塑和血脑屏障完整性至关重要。MMP 通过 4 种机制促进神经炎症: (1) MMPs 激活神经炎症和/或神经调节部分; (2) 作为

信号分子本身;(3)有助于神经毒性被神经炎症介导;(4)损害血管完整性,导致血脑屏障渗漏^[5]。目前,已有24种人类MMP同系物,分为6个亚科,其中明胶酶A/MMP-2和明胶酶B/MMP-9在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的神经炎症中起着至关重要的诱导作用,MS在没有这些酶的情况下,疾病不会发展^[6]。MMP-9具有降解和重塑细胞外基质动态平衡的功能^[7]。MS患者CSF中检测到有活性的MMP-9^[8]。实验证实MS患者CSF中MMP-9水平是升高的,直接在小鼠脑中注射MMP-9导致BBB基膜受损,有利于活化的T淋巴细胞进入CNS^[9]。MMP-9降解后的基质片段对炎症细胞具有明显的趋化作用,可促使多种炎症细胞穿透BBB基底膜进入CNS,进而对神经轴突产生损伤作用^[10]。

MMP-9促进T细胞向中枢神经系统迁移,而组织抑制剂基质金属蛋白酶-1(TIMP-1)对MMP-9起抑制作用。根据Waubant教授^[11]的实验证实,在复发-缓解型MS患者血清中,MMP-9水平增加,但TIMP-1没有增加。然而,Karabudak等^[12]表明,与MMP-9不同,TIMP-1在治疗前显著升高。Yushchenko等^[13]报道,在原发进展性MS中,MMP-9增加,但TIMP-1在预处理期间没有改变,而Boz等^[14]报道MS患者(治疗前)MMP-9/TIMP-1比例高于对照组。虽然结果在不同的研究中有所不同,但研究结果均表明MS患者中MMP-9/TIMP-1比例均高于正常人。Nazdik等^[15]于2016年使用MMP-9和TIMP-1 RNA水平的基因表达数据而不是蛋白质水平的研究也揭示了复发缓解型多发性硬化症(RRMS)患者中的MMP-9/TIMP-1 RNA比率高于正常个体,确定了MMP-9/TIMP-1 RNA在治疗MS中可以作为评价疗效的可靠标志。由此可体现出MMP-9的重要性。

目前针对于MS急性期我国最常用的一线治疗方案为激素冲击治疗。已经获批的MS疾病修饰治疗药物有β干扰素、醋酸格拉替雷、芬戈莫德、特立氟胺等,但因各种原因上述药物在我国未广范使用。丹参多酚酸在临床上主要应用于脑梗死急性期的治疗,现有的基础研究表明,脑梗死急性期使用注射用丹参多酚可以改善神经功能缺损,下调梗死后脑组织MMP-9的表达,推测其作用机制是否通过抗炎免疫维护BBB完整性而发挥的神经保护作用^[4]。本研究中将RRMS患者分为两组,实验结果显示,两组病人在发病急性期内血清中MMP-9水平均增高,使用激素联合丹参多酚酸组血清MMP-9

水平增高幅度较对照组明显下降($P<0.05$)。两组患者治疗14 d后EDSS评分均明显下降,治疗组评分低于对照组($P<0.05$)。治疗28 d后EDSS评分均略下降,治疗组低于对照组($P<0.05$)。两组患者治疗14 d后ADL评分均升高,治疗组评分高于对照组($P<0.05$)。治疗28 d后ADL评分均略上升($P<0.05$),治疗组高于对照组。这些发现表明,注射用丹参多酚酸可以降低RRMS患者MMP-9水平,改善患者临床症状,提高患者的生存质量。

总之,MMP-9在MS患者急性期表达增强,注射用丹参多酚酸可降低其上升的幅度,降低其表达,促进急性期症状的缓解,减少临床残留症状,在不久的将来或许可成为协助糖皮质激素治疗MS急性期可靠的治疗新药物。

参考文献

- [1] Massacesi L. Compartmentalization of the immune response in the central nervous system and natural history of multiple sclerosis. Implications for therapy [J]. Clin Neurosurg, 2002, 104: 177-181.
- [2] Jager A, Dardalhon V, Sobel R A, et al. Th1, Th7, and Th9 effector cell induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes [J]. Immunol, 2009, 183: 7169-7177.
- [3] Guo M F, Ji N, Ma C G. Immunologic pathogenesis of multiple sclerosis [J]. Neurosci Bull, 2008, 24(6): 381-386.
- [4] 祝杏园. 注射用丹参多酚酸对急性局灶性脑梗死小鼠血脑屏障的保护作用及机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学. 2015.
- [5] Muffat J, Li Y, Jaenisch R. CNS disease models with human pluripotent stem cells in the CRISPR age [J]. Curr Opin Cell Biol, 2016, 43: 96-103.
- [6] Kanesaka T, Mori M, Hattori T, et al. Serum matrix metalloproteinase-3 levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006, 77: 185-188.
- [7] Abdul-Muneer P M, Schuetz H, Wang F, et al. Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in an animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast [J]. Free Rad Biol Med, 2013, 60: 282-291.
- [8] Buhler L A, Samara R, Guzman E, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates immune access to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. BMC Neurosci, 2009, 10(1): 1.
- [9] Rosenberg G A, Dencoff J E, Correa N, et al. Effect of

- steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis Relation to blood-brain barrier injury [J]. *Neurology*, 1996, 46(6): 1626-1632.
- [10] Ma C G, Fan H C, Yu J Z. Triptolide inhibits EAE through downregulation of MMP-9 / IFN- γ and upregulation of IL-10 [J]. *J Neuro Sci*, 2009, 285(SI): S200-201.
- [11] Waubant E, Goodkin D E, Gee L, et al. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis [J]. *Neurology*, 1999, 53(7): 1397.
- [12] Karabudak R, Kurne A, Guc D, et al. Effect of interferon β -1a on serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in relapsing remitting multiple sclerosis patients [J]. *J Neurol*, 2004, 251(3): 279-283.
- [13] Yushchenko M, Mäder M, Elitok E, et al. Interferon- β -1 b decreased matrix metalloproteinase-9 serum levels in primary progressive multiple sclerosis [J]. *J Neurol*, 2003, 250(10): 1224-1228.
- [14] Boz C, Ozmenoglu M, Velioglu S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta [J]. *Clini Neurol Neurosurg*, 2006, 108(2): 124-128.
- [15] Nazdik M K, Taheri M, Sajjadi E, et al. Increased expression ratio of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) RNA levels in Iranian multiple sclerosis patients [J]. *Human Antib*, 2016, 24(3-4): 65-70.