

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

Matrix-metalloproteinase 在寄生蟲感染引發腦膜炎中所扮演的角色

The role of Matrix-metalloproteinase in pathogenesis of parasitic meningitis

計畫類別：V 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2314-B-040-047-

執行期間：89年 10月 1日至 90年 7月 31日

計畫主持人：蔣思澈

共同主持人：李秀雄

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學寄生蟲學科

中 華 民 國 九 十 一 年 一 月 二 日

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteolytic enzymes that can degrade all the components of the extracellular matrix when they are activated. T-cells, macrophages, eosinophils, and neutrophils all produce and secrete MMPs with cell-specific patterns and functional roles in the mediation of immunity and inflammation. The present study examined the expression and activation of MMPs in meningoencephalitis induced by the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. The brain homogenate of the *A. c.* infected mice was subjected to examine by gelatin zymography. We find a protease band with estimated molecular weights of 94 kDa gradually increased to reach plateau at 14 days post-infection, when *A. c.* larvae migrated to brain and induced serious meningoencephalitis. However, this protease disappeared at 35 days post-infection, when infected mice recovered from meningoencephalitis. This protease is also absent in normal mice brain. In an attempt to characterize this protease, we employed protease inhibitor studies to identify it as matrix metalloproteinases. In addition, this protease was identified immunologically as MMP-9 by Western blot analysis. Immunohistochemical studies in infected mice brain demonstrated that the infiltrating macrophages in the meninges were the major immuno-reactive cells for MMP-9. The MMP-9 also deposited upon the basement membrane of blood vessels in the meninges. Our results suggest that parasitic meningoencephalitis could induce MMP-9 producing in infiltrated macrophages. The possible roles of the MMP-9 in the pathogenesis of meningoencephalitis induced by *A. c.* need to be further investigated.

摘要

Matrix metalloproteinases (MMPs)是一類可分解細胞外結締纖維的蛋白酵素，此類酵素由細胞先以酵素原型式製造並分泌至細胞外，經由它種蛋白酵素作用後才可活化；在免疫及發炎反應中，T細胞、巨嗜細胞、嗜酸性白血球、及嗜中性白血球皆會製造特定的MMPs以協助這些免疫細胞完成其特定生理功能。在本研究中，我們想要觀察在廣東住血線蟲感染所引發的腦膜炎中，是否也有特定的MMPs參與發炎反應；我們以gelatin zymography來分析感染鼠腦的均質液，結果發現一個分子量約為94 kDa的蛋白分解酵素出現在感染廣東住血線蟲後十四天的小鼠腦中，此時蟲體已移行至腦部引發腦膜炎；然而在小鼠感三十五天後，此蛋白分解酵素逐漸消失，此時蟲體已死亡而小鼠也漸恢復健康，而在健康小鼠腦中也無此蛋白分解酵素存在。為了進一步分析此蛋白分解酵素，我們首先以各類蛋白分解酵素抑制劑來分析其為何種型式的酵素，結果證實其確為MMPs，接著進一步以特定MMPs的抗體藉由Western blot法分析此MMPs，結果證實其為MMP-9。接著為了了解此MMP-9由何種細胞所製造及分泌，我們利用MMP-9的抗體藉由免疫組織染色法分析感染的鼠腦組織，結果發現MMP-9主要出現在浸潤魚腦膜下的巨噬細胞中，此外腦膜血管壁上也堆積了許多MMP-9，由此可知廣東住血線蟲感

染所引發的腦膜炎可刺激巨噬細胞製造分泌 MMP-9, 至於此 MMP-9 在其致病機轉上所扮演的角色, 則有待進一步分析。

計劃緣由與目的

廣東住血線蟲是一種寄生在大白鼠(Rat)肺動脈的線蟲, 可經意外感染於人類, 屬於人畜共通寄生蟲(zoonotic parasites)中的一種⁽¹⁾, 主要分佈於東南亞和南太平洋一帶, 台灣整個島嶼幾乎都有此寄生蟲的存在, 每年都有因飲食不當而感染廣東住血線蟲病例報告出現, 大部分發生於南部和東部山地部落等, 尤以屏東縣最多⁽²⁾。此寄生蟲病因吃蝸牛肉而感染, 主要侵犯人類中樞神經系統(CNS), 是引起嗜伊紅性腦膜炎(eosinophilic meningitis)或嗜伊紅性腦膜腦炎(eosinophilic meningoencephalitis)的主要原因⁽³⁻⁵⁾, 更是對人類性命造成嚴重威脅。引起的病理變化特徵是, 腦脊髓液(CSF)及末梢血液的嗜伊紅性白血球(Eosinophils)增加, 腦部嗜伊紅性白血球(Eosinophils)、及淋巴球浸潤等發炎反應, 血腦障壁(BBB)破壞, 神經細胞脫髓鞘(demyelination)及小腦(cerebellar)浦金氏細胞(purkinje cells)喪失、損傷、有空泡等⁽⁶⁾。常見症狀有頭痛、噁心、嘔吐、嗜睡及發燒等, 有時會出現頸部強直、視覺障礙及昏迷等神經症狀⁽⁷⁾。對此寄生蟲感染疾病的診斷上, 傳統物理診斷很困難且準確度不高, 目前以偵測病患血中特定抗體或抗原的免疫診斷法較可行^(8,9), 但其專一性與特異性仍偏低, 有待改進。而在治療上目前多使用 Albendazole 來殺死蟲體⁽¹⁰⁾, 但病患求診時往往已感染此寄生蟲兩週以上, 蟲體已進入腦部, 此時單純用 Albendazole 來殺死蟲體, 死亡的蟲體屍體仍會造成腦部病變, 所以此療法療效有限, 仍有待改進。

目前為止, 相關文獻對於其引起腦部傷害及神經細胞損傷, 脫髓鞘(demyelination)等主要的致病機轉尚不清楚。而這些病理變化都與細胞外基質的破壞或蛋白質成份的分解有關, 而細胞外基質的破壞或蛋白質成份的分解, 則須靠蛋白分解酵素的作用來達成; 蛋白分解酵素是指可分解 peptide bonds 的酵素, 其可出現在小到病毒大至人類的物種中, 若以其作用部位的化學基來分類可將其分為四大類蛋白分解酵素, 分別是-serine, metallo, thiol 及 aspartyl; 蛋白分解酵素可催化許多重要的生物反應, 包括荷爾蒙原的代謝過程, 血液凝結與血纖分解, 蛋白代謝, 免疫反應, 及組織復原, 因此不難想像蛋白分解酵素在寄生蟲感染疾病中, 可扮演很重要的角色, 如協助寄生蟲侵入宿主組織⁽¹¹⁻¹⁵⁾, 消化宿主蛋白⁽¹⁶⁾, 分解黏附在蟲體表面的免疫球蛋白及補體等, 以躲避宿主免疫系統攻擊^(17,18), 及防止血液凝結⁽¹⁹⁾, 所以這類蛋白分解酵素方面的研究, 對於瞭解寄生蟲感染症的致病機轉上, 意義重大, 本研究就是針對廣東住血線蟲感染是否也有這類蛋白分解酵素的參與作分析, 進而了解蛋白分解酵素對寄生蟲感染症的致病過程中所扮演的角色, 若真能發現某些重要的酵素, 進一步便能研發特定的蛋白分解酵素抑制劑, 或許對治療上也有幫助。

結果與討論

我們首先以 gelatin 作受質利用 zymography 分析感染廣東住血線蟲兩週後的小鼠

腦部均質液,結果發現一個分子量約為 94Kda 的蛋白分解酵素,但是在正常老鼠之腦中並無此一酵素,而且其濃度與感染蟲數成正比,感染六十隻廣東住血線蟲的鼠腦中此酵素濃度高於只感染三十隻廣東住血線蟲的兩倍以上,我們進一步分析此蛋白分解酵素是在感染約幾週才出現的.結果發現在感染一週後,此酵素便已出現.此結果與蟲體移行至腦部的時間一致,兩週時出現最高值,一直維持至四週,等五週後才降低,此時腦中蟲體多已死亡,且腦膜發炎反應也漸趨緩,由於此酵素出現的時間與蟲體移行至腦部及腦膜發炎程度之間似乎有很好的關聯性.為進一步了解此蛋白酵素為何種,我們以各種不同的蛋白酵素抑制劑來測試其是否可以抑制此 94Kda 的蛋白酵素,結果發現 PMSF、aprotinin、leupeptin 皆無法抑制其活性,只有 EDTA 可抑制其活性,其他如加上其可分解 gelatin, 由此可推測其可能為 matrix-metalloproteinase 的成員之一; matrix-metalloproteinase 為一種可分解結締組織的蛋白分解酵素家族,可分為許多種型式.為進一步分析此 94Kda 的蛋白分解酵素為何種,我們以其分子量推測其可能為 MMP9.故取感染小鼠腦部的均質液,利用 MMP-9 之抗體,以 Western blot 分析.結果證實其的確為 MMP-9. 為進一步釐清此 MMP-9 是由蟲體製造抑或是由老鼠製造.我們收集鼠腦中的蟲體均質化後,以 zymography 分析,結果並未發現此 MMP-9 之出現. 由此可知此 MMP-9 是因感染 A.C. 的小鼠腦部細胞所製造.既然已知 MMP-9 為小鼠製造,那到底是何種細胞所製造的呢?為進一步了解此一問題,我們利用 MMP-9 之抗體,以免疫組織染色法分析感染 A.C. 之腦組織,結果發現此 MMP-9 主要由浸潤於腦膜下之巨噬細胞所製造,此外腦血管壁上也有許多此 MMP-9 的堆積,故推測此蛋白酵素可能會分解血管壁加速發炎細胞之移行進入腦中,同時也造成腦膜下膜出血的病變,至於其真正的功能是否是如此,我們進一步以 matrix-metalloproteinases 的抑制劑 N-acetylcystein 投與廣東住血線蟲感染的小鼠,觀察此藥物是否可因抑制 MMP-9 進而減緩腦膜炎的病變,結果發現此藥並無療效,推測應是此要屬水溶性,無法穿過血腦障壁,故無法發揮應有藥效,進來陸續有一些專一性極高的 matrix-metalloproteinase 的抑制劑被發表,且是脂溶性的,如 GM6001,未來應可再用這類藥物來分析 MMP-9 是否真的在廣東住血線蟲感染症的致病過程中扮演很重要的角色。

計劃成果自評

本研究的确發現感染廣東住血線蟲的小鼠腦中出現 MMP-9,此酵素在正常腦中並不存在,進一步分析發現此酵素乃是小鼠腦中的發炎細胞所分泌,如此的發現證實廣東住血線蟲感染所引發的腦部病變的確與 MMP-9 有關,與計劃預期相符,進一步以酵素抑制劑來治療此感染症的研究中,受限於經費不足,只能先以較差的藥物 N-acetylcysteine 來試驗,結果並不成功,計劃在下年度再以專一性極高的 matrix-metalloproteinase 的抑制劑 GM6001 來測試,應可了解此 MMP-9 再感染過程中所變演的角色為何,此研究對於廣東住血線蟲感染的治病積轉及治療方法上提供了另一條路徑。

參考文獻

1. Alicata JE. (1965) Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*

- and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. In: Advances in parasitology. (Dawes, B. et al), Academic press, London and New York: 223-248.
2. Chen ER. (1979) Angiostrongyliasis and eosinophilic meningitis on Taiwan: a review. In: J. H. Cross (Ed.) , Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia. Taipei, Taiwan, U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, NAMRU-2-SP-44, 57-73.
 3. Hsu WT, Chen JY, Chien CT, Chi CS, and Han NT. (1990) Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. Pediatric. Infections Disease Journal; 9: 443-445.
 4. Ismail Y and Arsura EL. (1993) Eosinophilic meningitis. Western Journal Medicine;159: 623.
 5. Gardiner CH, Well S, Gutter AE, Fitzgerald L, Anderson DC, Harris RK, and Nichols DK. (1990) Eosinophili meningocephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. Am. J. Trop. Med. Hyg.;42: 70-74.
 6. Hwang KP, Hwang AL, Hsieh HC, Liu KM, and Chen SC. (1993) Urtrastructural findings of micebrain infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Scientific Program and Abstracts of the Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology ; December 3-4: 37.
 7. Hung TP, and Chen ER. (1988) Angiostrongyliasis (*Angiostrongylus cantonensis*):. Handbook of Clinical Neurology ; 8: (52): Microbial Disease 545-562. A. A. Harris, Ed. Elsevier SciencePublishers B. V.
 8. Chye SM, Chang JH, and Yen CM. (2000) Immunodiagnosis of human eosinophilic meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L5 with molecular weight 204 kD. Acta Tropica. 75:9-17.
 9. Chang JH. Yen CM. Chen ER. Chung LY. Wang JJ. Chye SM. and Wang LC. (1995) Detection of antibodies to surface antigens of *Angiostrongylus cantonensis* by ELISA. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 89:569-72.
 10. Hwang KP and Chen ER.(1988) Larvicidal effect of albendazole against *Angiostrongylus cantonensis* in mice. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. 39:191-5.
 11. Aldape K, Huizinga H, Bouvier J, and McKerrow J. (1994) *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. Experimental Parasitology. 78:230-41.
 12. Robertson BD, Bianco AT, McKerrow JH, and Maizels RM.(1989) *Toxocara canis*: proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro. Experimental Parasitology. 69:30-6.
 13. Hotez PJ, Trang NL, McKerrow JH, and Cerami A. (1985) Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. Journal of Biological Chemistry. 260:7343-8.
 14. Sakanari JA and McKerrow JH. (1990) Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex*. Journal of Parasitology. 76:625-30.
 15. . Morris SR and Sakanari JA. (1994) Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. Journal of

Biological Chemistry. 269:27650-6.

16. Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP, Day SR, Wong JY, Smythe ML, and McManus DP. (1997) Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 89:1-9.
17. Auriault C, Ouaiissi MA, Torpier G, Eisen H, and Capron A. (1981) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni schistosomula*. *Parasite Immunology*. 3:33-44.
18. Leid RW, Suquet CM, and Tanigoshi L. (1987) Parasite defense mechanisms for evasion of host attack; a review. *Veterinary Parasitology*. 25:147-62.
19. Hotez PJ, Trang NL, McKerrow JH, and Cerami A. (1985) Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *Journal of Biological Chemistry*. 260:7343-8.