

DOI: 10.13376/j.cbls/2016018

文章编号: 1004-0374(2016)01-0129-06

基质金属蛋白酶检测技术的研究进展

马文青, 崔晓慧, 安利国, 尹苗*

(山东师范大学生命科学院山东省动物抗性重点实验室, 济南 2500141)

摘要: 基质金属蛋白酶是降解细胞外基质的重要酶类。在正常生理状态下, 基质金属蛋白酶参与新生血管的形成及伤口的愈合; 在病理状态下它参与组织重构、恶性肿瘤转移等病理进程。通过对基质金属蛋白酶检测, 可以深度了解其性质及致病机理, 并进一步了解病症的恶化程度, 从而进行及时检测治疗。现根据基质金属蛋白酶的功能及特性, 对基质金属蛋白酶活性和表达两大方面的检测技术进行了综述, 为研究人员选择合适的基质金属蛋白酶检测技术提供参考。

关键词: 基质金属蛋白酶; 检测技术; 研究进展

中图分类号: Q5-3; Q55 **文献标志码:** A

Research progress in matrix metalloproteinases detecting technology

MA Wen-Qing, CUI Xiao-Hui, AN Li-Guo, YIN Miao*

(The Key Laboratory of Animal Resistant Biology of Shandong, College of Life Science,
Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Matrix metalloproteinases (MMPs) are important enzymes, which can degrade extracellular matrix. MMPs participate in the formation of new blood vessels and the healing of wound under the normal physiological condition, and participate in the tissue reconstruction, malignant tumor metastasis and other pathological process. Researchers can understand the nature and the pathogenic mechanism deeply by means of MMPs detection, and get further known about the deteriorated condition, so as to detect and treat diseases in time. According to the functions and features of MMPs, the detecting technology from the two aspects of the MMPs activity and expression were summarized in this article. It will provide the reference for the researchers to choose the appropriate matrix metalloproteinases detecting technology.

Key words: matrix metalloproteinases; detecting technology; research progress

基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotease, MMPs) 是一类活性依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶, 其主要的生理作用是降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。MMPs 几乎能降解细胞外基质的所有成分, 如胶原、明胶、黏性蛋白、纤维黏连蛋白、蛋白多糖等。MMPs 主要由巨噬细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等产生。在多数细胞中, MMPs 不在细胞内储存, 当有外来特定信号刺激这些细胞时, MMPs 合成增加并立即分泌到 ECM 中去; 但在巨噬细胞和中性粒细胞中, MMPs 可以合成并储存于胞质中, 并通过调节型的外排途径完成胞外分泌。MMPs 是自然进化中高度保守的一类酶, 广

泛分布于植物、脊椎动物、无脊椎动物中。MMPs 在生理状态下参与胚胎形成、新生血管的形成及伤口的愈合^[1]。现已发现 26 种 MMPs (MMP-1~26), 称为 MMP 家族。根据作用底物以及片断同源性等特性, 将 MMPs 分为 6 类: 第一类为胶原酶, 包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13, 其作用底物主要为纤维类胶原, 即 I、II、III 型胶原, 不能降解明胶和 IV 型胶原; 第二类为明胶酶, 包括 MMP-2 和

收稿日期: 2015-06-26; 修回日期: 2015-07-28

基金项目: 山东省高等学校科技项目(J13LE05); 山东省中青年科学家科研奖励基金计划项目(BS2011SW049)

*通信作者: E-mail: yinmiao@sdu.edu.cn

MMP-9, 主要水解变性胶原及基膜的主要成分 IV 型胶原; 第三类为基质降解素, 包括 MMP-3、MMP-7、MMP-10, 其中 MMP-3 和 MMP-10 能作用于蛋白聚糖、层黏连蛋白、纤维黏连蛋白、III 型和 IV 型胶原及明胶。MMP-7 能作用于明胶和层黏连蛋白; 第四类为膜型基质金属蛋白酶, 包括 MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-24、MMP-25, 膜型基质金属蛋白酶定位在肿瘤细胞及其基质成纤维细胞的细胞膜上, 可降解 I、II、III 型胶原和纤维黏连蛋白。膜型基质金属蛋白酶的表达受刀豆蛋白、癌基因等调节; 第五类为基质溶解酶, 包括基质溶解因子 1 (MMP-7) 和基质溶解因子 2 (MMP-26), 其中 MMP-7 可以降解 IV 型胶原、纤维黏连蛋白和明胶等; 第六类是 furin 活化的 MMP 和其他分泌型 MMP^[2-3]。在正常生理状态下, 组织中 MMPs 表达量极少。而在涉及人体多种生理和病理过程中, 如炎症、胚胎发生、血管形成及肿瘤侵袭转移时, 组织中的 MMPs 的表达量上升, 如在肿瘤侵袭转移过程中, 主要是通过 MMPs 破坏基质的降解平衡, 从而促进肿瘤细胞突破基底膜和细胞外基质构成的组织屏障, 进而侵袭周围组织。鉴于 MMPs 在生理和病理进程中起着关键性的作用, 对于基质金属蛋白酶检测技术的研究开发是十分必要的。因此, 本文根据基质金属蛋白酶的功能及特性, 对基质金属蛋白酶的检测技术进行了综述。

1 基质金属蛋白酶活性的检测方法

在某些病理状态下, 如肿瘤转移过程中, MMPs, 尤其是 MMP-2 和 MMP-9 等胞外分泌型酶类的活性升高, 可以通过降解胞外基质中的 IV 型胶原蛋白起到易于肿瘤细胞转移的作用。因此, 对 MMPs 活性的检测有助于了解肿瘤细胞的恶化程度, 便于肿瘤的检测和治疗。目前常见的酶活检测方法有: 荧光明胶酶检测法、明胶酶谱法、DQ 明胶原位酶谱分析、高效液相色谱法、肽链修饰的荧光探针技术以及荧光分子断层成像技术。

1.1 荧光明胶酶检测法

荧光明胶酶检测法是由 Molecular Probes 公司于 2001 年推出的方法, 是用荧光胶体偶联物代替普通明胶而建立起来的一种方法。主要是针对于具有明胶酶活性的 MMP-2 和 MMP-9 的检测, 其主要检测要点是: (1) 获得含明胶酶的样本; (2) 含胶原酶的样本与荧光胶体偶联物 DQ-明胶共孵育, 样本中的明胶酶分解荧光明胶, 释放荧光肽, 荧光的增加量

与样本中明胶酶的活性成正比, 利用荧光光度计结合标准曲线即可定量确定明胶酶的量。Liu 等^[4]用荧光明胶降解法证明了胞外分泌复合物对于基质金属蛋白酶的分泌是十分必要的, 胞外分泌复合物的组分 Exo70 可促进 MMPs 的分泌。该方法将明胶酶的活性与化学发光技术巧妙结合, 具有高敏快速方便和直观等优点, 适合多种形式样本的分析, 特别是适合明胶酶活性抑制剂的高通量筛选, 但缺点在于试剂盒费用高, 且操作过程中仍然需要组织匀浆或血清分离等过程, 还无法进行组织定位观察。

1.2 明胶酶谱法

明胶酶谱法是一种基于非还原 SDS-PAGE 电泳和反相凝胶染色的 MMPs 检测方法^[5]。主要原理是: (1) 含明胶酶的样本首先上样进行非还原 SDS-PAGE 电泳, 利用 MMPs 与阴离子去垢剂 SDS 结合, 形成蛋白质-SDS 复合物, 使待测蛋白质带上相同的负电荷, 其量大大超过蛋白质分子原有的电荷量, 因而掩盖了不同种类蛋白质间原有的电荷差别, 此时蛋白质分子在凝胶中的迁移率取决于其相对分子质量大小 (小相对分子质量的蛋白质在凝胶中的迁移率要大于大相对分子质量的蛋白质)。(2) 非还原 SDS-PAGE 电泳后, 将相对分子质量不同的 MMPs 及与 MMPs 结合的组织抑制剂同时分离, 再利用含非离子型表面活性剂 (Triton X-100) 的洗脱液洗脱去除 SDS, 在这一过程中引发了明胶酶酶原蛋白的体外活化。由于显影缓冲液内含有对氨基苯汞乙酸盐 (paminophenylmercuric acetate, PAMA), PAMA 可以除掉酶原中的一个相对分子质量约为 10^4 的小肽, 将无活性的前体酶转变为有活性的酶, 从而降解凝胶中相应部位的明胶^[6]。(3) 然后经过短暂漂洗后将凝胶放入孵育液中进行孵育, 这时明胶酶分解凝胶中的底物明胶。(4) 最后进行显色脱色后可见蓝色背景下的白色条带。明胶酶谱法可用于检测血浆细胞培养上清液及组织中的 MMP-2 和 MMP-9 的活性, 但传统的检测方法存在一定的缺陷, 实验周期长、孵育液含剧毒药品。李炳蔚等^[7]对明胶酶谱法进行了优化, 结果显示, 凝胶孵育时间由 42 h 缩短为 17 h 不影响酶谱法检测结果。将漂洗步骤省略并且所配洗脱液仅使用 2.5% Triton X-100, 孵育液中 NaN₃ 及 NaCl 去除, 电泳步骤中把去离子水更换为蒸馏水, 联合改变以上三个条件不影响实验结果。血浆样品反复冻融多达 6 次也不影响酶谱法检测结果。孵育液 pH 值在 7.2~8.8 范围内均可用于酶谱法。

1.3 DQ明胶原位酶谱分析

以上几种明胶酶的检测方法, 不能实现既检测酶的活性又能对其进行定位。而 DQ 明胶原位酶谱分析的方法可以兼顾这两个方面。DQ 原位酶谱法是采用 DQ 明胶作为底物固化于组织切片上, 这种 DQ 明胶带有异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记, 两分子的荧光载体通过酰胺键结合, 使荧光集团淬灭, 不能发出荧光, 当明胶被降解时, 荧光载体之间的结合被打断, 暴露出荧光集团, 发出绿色荧光, 从而使明胶酶在组织原位显示, 可以显示明胶酶活性的分布。DQ 明胶原位酶谱分析法的应用可以在组织中明确真正发挥作用的明胶酶的存在部位。

1.4 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是在经典液相色谱法 (柱层析、薄层层析或纸层析) 的基础上, 引入了气相色谱法的理论和技术, 以高压输送流动相, 采用高效固定相及较高灵敏度检测器发展而成的现代液相色谱分析方法。HPLC 在多个领域是作为物质分离的重要工具, 也适用于 MMPs 活性的检测。Ma 等^[8]利用 HPLC 进行 MMP-9 活性的测定, 其基本原理是: 以荧光基团和荧光淬灭基团标记的多肽作为底物, MMP-9 可以将底物催化水解, 水解的产物一个有强荧光活性, 一个没有荧光活性, 经 HPLC 分离后, 用荧光检测器测定荧光强度, 如果 MMPs 没有水解多肽链, 则检测出的荧光活性微弱。最后用外标法定量求得样品中 MMP-9 的活性, 也可以用紫外基团标记的多肽作为底物, 经 HPLC 分离后采用紫外检测器进行检测, 如果能够设计一种内标物, 建立以内标法测定酶活性 HPLC 检测方法, 那么就有望实现生物体内 MMP-9 活性的测定。

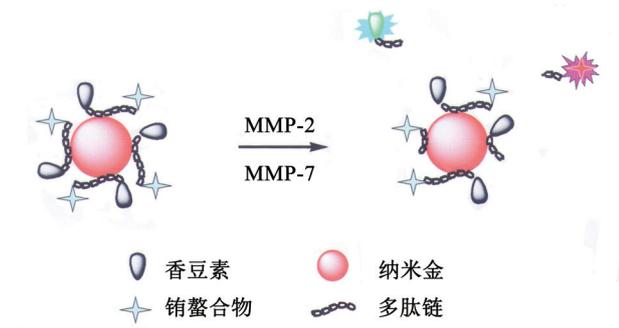
1.5 肽链修饰的荧光探针技术

肽链修饰的荧光探针技术一般适用于一种蛋白酶的检测, 在本文中综述了一种可以同时检测两种蛋白酶的新方法, 该方法有望用于评价细胞癌变程度。明胶酶谱法及酵素免疫分析法广泛应用于 MMP 活性的测定^[9], 但是难以实现活细胞中 MMP 活性的实时监测及原位成像分析。肽链修饰的荧光探针技术将荧光法和激光扫描共聚焦显微镜技术结合起来, 能够实现活细胞和组织内活性物质“实时、可视、定量”的高灵敏度检测, 不仅可作原位实时动态检测, 具有实验过程快速, 样品处理简便, 数据全面等优点, 还能显示单个细胞的荧光强度变化,

将检测提高到单细胞水平。肽链修饰的荧光探针主要可以分为 3 类: 酶活性荧光成像探针、靶向探针和交联成像探针^[10]。酶活性荧光成像探针在初始时为荧光淬灭状态, 当酶催化水解后会发出较强荧光, 因此, 可通过荧光强度反映酶活的高低。此类探针主要包括基于多肽的荧光探针、荧光团修饰的肽探针、可降解的聚合物蛋白酶探针以及具有分支的聚合物蛋白酶探针等类型^[11-12]。其中基于多肽的荧光探针是研究最广的酶活性成像探针, 已广泛应用于 Caspase 系列和 MMPs 系列蛋白酶的检测^[13], 如 Cy5 与 NIR820 所组成的供受体对 MMP-7 的检测^[14]。此类成像探针的底物是基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的原理设计。所谓 FRET 是指当两种不同的荧光生色团离得较近 (1~10 nm), 且其中一种生色团 (供体, donor) 的发射谱与另一种生色团 (受体, acceptor) 的激发谱有相当程度的重叠, 当供体被激发时, 受体会因供体激发能的转移而被激发^[15]。FRET 作为一种方便、快捷、灵敏的光学手段广泛应用于化学分析、生物结构研究等领域, 特别是应用于蛋白质水解酶活性的测定效果显著^[16]。当供体发射的荧光与受体淬灭剂的吸收光谱重叠, 并且供受体对在几个原子直径范围以内时, FRET 现象发生。当酶切肽链使得供受体对远离, 供体荧光恢复, 由此实现实时检测酶切情况及酶的活性^[17-20]。利用 FRET 原理设计合成肽链荧光探针是设计蛋白酶成像探针的主要方法, 一般适用于一种蛋白酶的检测。而刘媛媛^[21]提出了一种可以同时检测两种蛋白酶的新方法, 即基于 FRET 原理, 建立纳米金-肽-钼螯合物-香豆素复合体系检测 MMP-2 和 MMP-7 酶活性。纳米金具有高消光系数, 在纳米金-肽-钼螯合物-香豆素构成的双 FRET 供受体对中起到荧光淬灭作用。基质金属蛋白酶水解肽链使其断裂导致 FRET 现象消失, 纳米金淬灭钼螯合物的荧光和香豆素的荧光随之得到恢复, 据此实现两种基质金属蛋白酶的测定。MMP-7 的底物为 Gly-Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Thr-Met-Gly, MMP-2 的底物为 Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly。所设计探针的肽链为 Gly-Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Thr-Met-Gly-Cys-Gly-Gly-Cys-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly。探针的工作原理如图 1 所示。这种新型荧光探针具有高灵敏度、高特异性, 实时反映细胞内基质金属蛋白酶活性表达及原位成像。

1.6 荧光分子断层成像技术

荧光分子断层成像 (fluorescence molecular tomo-



肽链一端通过C基与香豆素连接，肽链的另一端通过N基与钬螯合物标记。利用肽链中间半胱氨酸提供的巯基与纳米金连接，形成双FRET体系，香豆素和钬螯合物的荧光分别被纳米金淬灭。当MMP-2和MMP-7出现时，分别将肽链中的Gly-Val和Ser-Leu水解，释放出Val-Arg-Gly-香豆素和钬螯合物-Gly-Val-Pro-Leu-Ser，香豆素和钬螯合物的荧光恢复，据此实现MMP-2和MMP-7的检测。

图1 纳米金-肽-钬螯合物-香豆素的化学结构及其基于FRET机制的工作原理示意图

graphy, FMT) 利用已在生物学和医学研究中大量使用的、具有特异性的荧光分子探针来标记特定分子或细胞，以这些分子或细胞作为成像源，在体内观测生物体内细胞与分子水平的变化，通过图像重建提供目标物在生物体内的分布等信息。它具有灵敏度较高、快捷简便、费用低、相对高通量等诸多优点。近几年来，荧光分子断层成像发展迅速，在生物学领域得以关注，成为研究 MMPs 活性的新技术。荧光分子断层成像技术对于 MMPs 检测的范围包括：MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-12 和 MMP-13。Rawashdeh 等^[22] 通过利用荧光分子断层成像技术检测裸鼠体内 MMPs 的活性影像，研究皮肤鳞状细胞癌异种移植的侵袭行为以及植入体新血管形成的状况。

2 基质金属蛋白酶表达的定性、定量分析

在基质金属蛋白酶表达的定性、定量分析中最常用的检测技术包括：实时荧光定量 PCR 技术、免疫印迹分析法、免疫组化技术、酶联免疫吸附技术、组织芯片技术。除了这些传统的检测技术外，于 2014 年，又出现了初步应用于 MMPs 检测的乳胶凝集法这一新型检测技术。

2.1 实时荧光定量PCR技术

实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qPCR) 作为检测基质金属蛋白酶最常用的方法之一，其优点在于操作简便、快速高效，而且具有很

高的敏感性和特异性。由于是在封闭的体系中完成扩增并进行实时测定，大大降低了污染的可能性且无需在扩增后进行操作，而且 PCR 扩增过程中能实时监控 PCR 扩增情况，可以及时调整反应参数；但是 qPCR 只能定量 mRNA 水平，而由于转录后有许多调节因素，mRNA 水平不能确切反应出细胞中产生的蛋白质水平。所以，要想准确而全面地了解机体的表达水平，除了分析 mRNA 的水平外，还需要免疫组织化学和生物化学实验的数据。

2.2 免疫印迹分析法

免疫印迹 (Western blot) 具有 SDS-PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性，现已成为蛋白质分析的一种常规技术。Western blot 分析法常用于鉴定某种蛋白质，并能对蛋白质进行定性和半定量分析。结合化学发光检测，可以同时比较多个样品中同种蛋白质表达量的差异^[23-25]。Western blot 分析法，特异性强，灵敏度高，选择合适内参可以准确定量，结果可靠，但是成本较高，需要购买 MMPs 抗体、内参抗体以及二抗，同时，检测费时费力，且一次检测的通量有限。

2.3 免疫组化技术

免疫组化是指带显色剂标记的特异性抗体，在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应，对相应抗原进行定性、定位、定量测定的一项实验技术，包括荧光抗体技术、免疫酶染法和胶体金技术。免疫组化分析是迄今原位检测组织蛋白最直观应用最广的方法，在检测基质金属蛋白酶的试验中，它不仅可以提供各种肿瘤间、各种因子间半定量的比较数据，更重要的是能像 DQ 明胶原位酶谱法一样做到组织定位，从而能够从形态学上反映 MMPs 的表达规律。Jia 等^[26] 和田赬等^[27] 均利用免疫组化技术实现了在转染后的血管平滑肌细胞中、涎腺肿瘤中 MMP-2 和 MMP-9 表达定位的检测。由于在实验过程中主观因素干扰较多导致实验稳定性较差，因此，不能准确定量比较，从而限制了该项技术的普遍应用。

2.4 酶联免疫吸附技术

酶联免疫吸附技术 (ELISA) 是将酶标记在抗体 / 抗原分子上，形成酶标抗体 / 酶标抗原，称为酶结合物。在抗原与抗体反应形成复合物之后，该酶结合物作用于加入的底物使之呈色，根据颜色的有无和深浅，定位或定量抗体 / 抗原。ELISA 分析法综合了 Western blot 分析法特异性强、灵敏度高和可定量的优点，同时兼有操作简单，获得结果快，检

测成本低等特点, 使测定达到很高的灵敏度和稳定性, 尤其适合大批量样本中 MMPs 的检测, 以及靶向明胶酶的药物抑制剂的高通量筛选, 为免疫测试中常用的手段, 也适用于检测荧光标记后的生物分子是否在免疫反应中仍保持其原有的生物活性。顾少菊等^[28]采用 ELISA 的方法检测眼镜蛇毒 C 组分对白血病细胞中 MMP-2 和 MMP-9 表达活性的影响, 结果显示: 经过蛇毒 C 组分处理后的白血病细胞中的 MMP-2 和 MMP-9 的表达均下降, 并且随着处理时间的加长, MMP-2 和 MMP-9 表达活性明显下降。

2.5 组织芯片技术

组织芯片是将数十至上千个小组织整齐地排放在同一张载玻片上的微缩组织切片, 1998 年由 Kononen 等^[29]提出, 是近年来基因芯片技术的发展和延伸, 属于一种特殊芯片技术。它是将数十个, 甚至数千个不同个体的临床组织标本按照预先设计的顺序集成在一张固相载体所形成的组织微阵列。组织芯片技术与 DNA、RNA、蛋白质、抗体等技术相结合, 与传统的病理学技术、组织化学及免疫组化技术相结合, 在基因、基因转录和相关表达产物生物学功能 3 个水平上进行研究。组织芯片可用于组织中的 DNA、RNA 和蛋白质的定位分析和检测^[30]。检测 MMPs 的传统方法包括酶联免疫吸附法、放射免疫分析法、荧光免疫测定法等, 这些方法操作繁杂、费时, 并可能有核素污染。组织芯片在同一张玻片上进行, 实验条件在最大程度上保持一致, 实验误差减小, 可比性强, 准确性高; 一次实验可以获得大量结果, 还具有并行性、高通量、微型化和自动化等优点。李洪涛等^[31]通过进行组织芯片免疫组化染色与传统免疫组化染色乳腺癌细胞中 MMPs 阳性率的比较, 结果表明: 组织芯片免疫组化在乳腺癌相关指标检测中与传统免疫组化无明显区别, 具有与传统方法同样的敏感性和准确性, 组织芯片免疫组化的方法在乳腺癌相关指标检测中可一次对多个样本进行多指标检测, 大大节省了人力、物力和财力, 值得进一步推广使用。组织芯片技术不仅仅可用于乳腺癌中 MMPs 的检测, 也可广泛应用于针对宫颈癌、胃癌、非小细胞肺癌、大肠癌、胆囊癌、肺癌以及骨性关节炎患者关节液和血清中基质金属蛋白酶的检测也主要应用于组织中 MMP-2、MMP-9 及 MMP-13 的检测。

2.6 乳胶凝集法

乳胶凝集法是以乳胶颗粒作为载体的一种间接

凝集试验, 即吸附可溶性抗原于其表面, 特异性抗体与之结合后, 可产生凝集反应。乳胶是聚苯乙烯聚合的高分子乳状液, 对蛋白质、核酸等高分子物质具有良好吸附性能, 可用作载体吸附某些抗原(抗体)来测定相应的抗体(或抗原)。本法具有快速简便、保存方便、比较准确等优点, 但在基质金属蛋白酶的检测中却没有得到推广应用。博米乐等^[32]利用乳胶凝集法检测 MMP-3 申请了专利, 通过将负载有单克隆抗体 14B1 的乳胶粒子和负载有单克隆抗体 3D3 的乳胶粒子与血液待测样品接触产生凝集作为信号检测血液待测样品中的人 MMP-3。乳胶凝集法相比 ELISA 法检测 MMPs 更为迅速。

3 结论与展望

基质金属蛋白酶检测技术的研究开发对于病理进程研究具有重要的意义。随着科学技术的发展, 基质金属蛋白酶的检测方法也将不断地更新, 现在最常用的这几种检测方法也各有优劣, 有时多种技术的综合应用能够更加准确地进行基质金属蛋白酶的检测, 也可以根据检测的目的、实验室条件选择检测方法。目前人们更是期待研究开发出快捷、精确、高通量的基质金属蛋白酶检测技术, 从而了解疾病的恶化程度, 做到对相关疾病的预防、诊断和治疗, 也为治疗相关疾病药物的研发提供了方向。

[参 考 文 献]

- [1] Vandooren J, Geurts N, Martens E, et al. Gelatin degradation assay reveals MMP-9 inhibitors and function of O-glycosylated domain. *World J Biol Chem*, 2011, 2: 14-24
- [2] Visse R, Hideaki N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003, 92: 827-39
- [3] Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, et al. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 3751-68
- [4] Liu JG, Artym VV, Wei G, et al. The role of the exocyst in matrix metalloproteinase secretion and actin dynamics during tumor cell invadopodia formation. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 3763-71
- [5] Lisboa RA, Andrade MV, Cunha-Melo JR. Zymography is an effective method for detection of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity in cultured human fibroblasts. *Acta Cir Bras*, 2013, 28: 216-20
- [6] Hu X, Beeton C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *J Vis Exp*, 2010: 2245
- [7] 李炳蔚, 苑晓晨, 王冰, 等. 优化明胶酶谱法检测自发性高血压大鼠血浆 MMP-2 和 MMP-9 活性. *基础医学与临床*, 2013, 33: 845-8
- [8] Ma XA, Chun E, Chan Y. On-line chromatographic screening of matrix metalloproteinase inhibitors using

- immobilized MMP-9 enzyme reactor. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 1777-83
- [9] Patel BP, Shah PM, Rawal UM, et al. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*, 2005, 90: 81-8
- [10] Tung CH. Fluorescent peptide probes for *in vivo* diagnostic imaging. *Biopolymers*, 2004, 76: 391-403
- [11] Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, et al. Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*, 2003, 4: 544-58
- [12] Pham W, Weissleder R, Tung CH. An azulene simer as a near-infrared quencher. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41: 3659-62
- [13] Pham W, Choi YD, Weissleder R, et al. Developing a peptide-based near-infrared molecular probe for protease sensing. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15: 1403-7
- [14] Hossain MA. Novel peptides bearing pyrene and coumarin units with or without β -cyclodextrin in their side chains exhibit intramolecular fluorescence resonance energy transfer. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 11178-9
- [15] Yang J, Zhang ZH, Lin JQ. Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 400-7
- [16] Brumbaugh J, Schleifenbaum A, Gasch A, et al. A dual parameter FRET probe for measuring PKC and PKA activity in living cells. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 24-5
- [17] Lee S, Cha EJ, Park K, et al. A near-infrared fluorescence quenched gold-nanoparticle imaging probe for *in vivo* drug screening and protease activity determination. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 120: 2846-9
- [18] Bullok KE, Maxwell D, Kesarwala AH, et al. Synthesis and characterization of a small, membrane-permeant, caspase-activatable far-red fluorescent peptide for imaging apoptosis. *J Med Chem*, 2005, 48: 5404-7
- [19] Shi LF, De Paoli V, Rosenzweig N, et al. Synthesis and application of quantum dots FRET-based protease sensors. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 10378-9
- [20] Messerli SM, Prabhakar S, Tang Y, et al. A novel method for imaging apoptosis using a caspase-1 near-infrared fluorescent probe. *Neoplasia*, 2004, 6: 95-105
- [21] 刘媛媛. 肽链修饰的荧光探针测定活性生物分子的研究及应用[D]. 济南: 山东师范大学生命科学学院, 2012: 1-64
- [22] Rawashdeh WA, Arns S, Gremse F, et al. Optical tomography of MMP activity allows a sensitive noninvasive characterization of the invasiveness and angiogenesis of SCC xenografts. *Neoplasia*, 2014, 16: 235-46
- [23] Zhong HM, Ding QH, Chen WP, et al. Vorinostat, a HDAC inhibitor, showed anti-osteoarthritic activities through inhibition of iNOS and MMP expression, p38 and ERK phosphorylation and blocking NF- κ B nuclear translocation. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17: 329-35
- [24] Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology*, 2012, 55: 1965-75
- [25] Miyashita K, Oyama T, Sakuta T, et al. Anandamide induces matrix metalloproteinase-2 production through cannabinoid-1 receptor and transient receptor potential vanilloid-1 in human dental pulp cells in culture. *J Endod*, 2012, 38: 786-90
- [26] Jia ZB, Tian H, Kang K, et al. Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 by transplanted VSMCs modifies heart structure and function after myocardial infarction. *Transplant Immunol*, 2014, 30: 149-58
- [27] 田鲲, 彭敏, 陈宇, 等. 免疫组化、明胶酶、Western Blot 检测涎腺肿瘤中基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9表达的比较与评价. *实用医院临床杂志*, 2010, 7: 17-21
- [28] 顾少菊, 覃媛, 黄劭, 等. 眼镜蛇毒C组分对白血病细胞中基质金属蛋白酶-2、9表达的影响. *广东医学*, 2014, 35: 645-7
- [29] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998, 4: 844-7
- [30] Kallioniemi OP, Kononen J, Sauter G. Introducing tissue microarrays to molecular pathology. *Clin Chem*, 2012, 58: 1717-8
- [31] 李洪涛, 宁连胜, 张斌. 组织芯片技术在乳腺癌相关指标检测中的应用. *河北北方学院学报: 医学版*, 2006, 23: 12-4
- [32] 博米乐. 根据乳胶凝集法检测基质金属蛋白酶-3的方法: 中国, 103874925[P]. 103874925[P]. 2014-6-18