

多种基质金属蛋白酶在高氧所致急性肺损伤中的表达

张向峰 丁少芳 高元明 梁瑛 Foda H D

【摘要】 目的 探讨基质金属蛋白酶(MMPs)和细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)在高氧所致急性肺损伤(ALI)发病中的作用。**方法** 72只小鼠按随机数字表法分为正常对照组和高氧24、48、72h组,每组18只。高氧组小鼠置于密闭的氧气室,暴露于体积分数>98%的高氧;正常对照组小鼠呼吸室内空气作为对照组。分别于24、48和72h活杀高氧组小鼠,取肺评价肺损伤程度;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组化法测定肺组织MMP-2、MMP-9及EMMPRIN的mRNA和蛋白表达及组织分布。**结果** 高氧能引起ALI。RT-PCR结果显示,高氧组动物肺组织MMP-2、MMP-9及EMMPRIN的mRNA表达均增高;免疫组化研究显示,MMP-2和MMP-9蛋白主要表达于气道上皮细胞、血管平滑肌细胞和炎性细胞的胞浆中,EMMPRIN蛋白则主要表达于上述细胞胞浆和细胞膜上;它们在气道上皮细胞中的表达在高氧环境下明显升高。**结论** 高氧能引起ALI,伴MMP-2、MMP-9和EMMPRIN的表达增高,MMPs通过降解细胞外基质从而在高氧所致ALI过程中发挥重要作用。

【关键词】 高氧; 肺损伤,急性; 基质金属蛋白酶

Expression of various matrix metalloproteinases in mice with hyperoxia-induced acute lung injury ZHANG Xiang-feng*, DING Shao-fang, GAO Yuan-ming, LIANG Ying, Foda H D. * Department of Pulmonary Medicine, Beijing Anzhen Hospital, Beijing 100029, China

【Abstract】 Objective To investigate the role of matrix metalloproteinases (MMPs) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) in the pathogenesis of acute lung injury induced by hyperoxia. **Methods** Fifty-four mice were exposed in sealed cages to >98% oxygen (for 24-72 hours), and another 18 mice to room air. The severity of lung injury was assessed, and the expression of mRNA and protein of MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN in lung tissue, after exposure for 24, 48 and 72 hours of hyperoxia were studied by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry. **Results**

Hyperoxia caused acute lung injury; this was accompanied by increased expression of an upregulation of MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN mRNA and protein in lung tissues. **Conclusion** Hyperoxia causes acute lung injury in mice; increases in MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN may play an important role in the development of hyperoxia-induced lung injury in mice.

【Key words】 hyperoxia; acute lung injury; matrix metalloproteinase

目前,吸入高浓度氧在临床上已被广泛用于治疗呼吸衰竭以纠正低氧血症。然而,长时间吸入高浓度氧可引起全身组织、脏器的损害,其中在肺脏的作用最直接、最广泛、中毒最重,可造成急性肺损伤(ALI)。高氧引起的ALI在病理上以弥漫性肺泡损害为特征^[1]。在ALI的发病过程中,细胞外基质(ECM)的降解是一个关键问题,许多蛋白酶参与了这一过程。基质金属蛋白酶(MMPs)是由许多主要降解ECM各种组分的酶构成的一个大家族,有研究报道,MMP-2和MMP-9通过降解基底膜的主要组分IV型胶原,从而在细胞周围基底膜转变及重

塑过程中起重要作用^[2]。

目前国外研究已经探索了MMP-2、MMP-9和细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)在呼吸机所致ALI发病过程中的作用^[2],然而它们在高氧所致ALI发病过程中的作用机制还不甚明了。本研究旨在研究它们在高氧所致ALI发病过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物实验:72只8~12周龄、体重15~20g的C57BL/6小鼠,雌雄不限,按随机数字表法分为正常对照组和高氧24、48、72h组,每组18只。实验组动物被置于Plexiglas氧气室,内置氧浓度仪持续监测室内氧浓度,保证O₂的体积分数>98%,动物可自由进食及饮水。正常对照组动物被置于氧气室外呼吸正常空气。于暴露时间终末时间点取出动物,将实验组动物与正常对照组动物同时以过量苯巴比妥麻醉后处死,并进行以下实验。

基金项目:卫生部卫生局留学人员资助项目(2004-局-019)

作者单位:100029 首都医科大学附属北京安贞医院呼吸科(张向峰,丁少芳,高元明,梁瑛);纽约州立大学石溪分校医学院附属医院呼吸和重症监护科(Foda H D,博士)

作者简介:张向峰(1971-),男(汉族),山西沁水人,医学硕士,主治医师,2001—2003年在美国康奈尔大学和纽约州立大学做访问学者(Email:xfzh119@hotmail.com)。

1.2 肺损伤的评价:肺损伤根据以下指标来判断:

①肺湿/干重(W/D)比值:这是判定肺水肿的主要指标。实验结束后立即摘除右肺称重(湿重),然后置 70℃烤箱称肺干重,计算肺 W/D 比值。②支气管肺泡灌洗液(BALF)蛋白浓度:处死小鼠后立即行气管插管,用 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)行支气管肺泡灌洗,共 3 次,离心 BALF 并测定上清液蛋白浓度。③收集胸腔积液:仔细打开胸膜腔,用毛细吸管吸取胸腔积液。

1.3 肺组织切片制备:通过气管插管,用体积分数为 10%的中性甲醛以 1.96 kPa(20 cm H₂O)压力灌注鼠肺,持续 20 min 后摘除鼠肺,置于 10%中性甲醛中固定 12 h,常规脱水、石蜡包埋,制成 5 μm 组织切片,苏木素-伊红(HE)染色。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织 MMP-2、MMP-9 和 EMMPRIN 的 mRNA 表达:取 50 mg 小鼠肺组织,用 Trizol(Gibco)提取总 RNA,逆转录为相应 cDNA。MMP-2 引物序列:上游引物 5'-CACCATCGCCATCATCAAGT-3';下游引物 5'-TGGATTGAGAAAAGCGCAGCGG-3';产物为 399 bp 的 cDNA 片段。MMP-9 引物序列:上游引物 5'-GCTTTCGGCTGCAGCTCTGCTG-3',下游引物 5'-GAGGCCTTTGAAGGTTTGAAT-3';产物为 305 bp 的 cDNA 片段。EMMPRIN 引物序列:上游引物 5'-TCCTGCATCTTCCTTCCTGAGCC-3',下游引物 5'-ATGCCAGGAAGGGCCAGAGGGC-3';产物为 397 bp 的 cDNA 片段;β-actin 引物序列:上游引物 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3',下游引物 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3';产物为 244 bp 的 cDNA 片段。

PCR 反应体系为 25 μl,其中包括 5 μl 逆转录产物,2.5 μl 10×PCR 反应缓冲液(Mg²⁺终浓度为 1.5 mmol/L),0.5 U Tfl DNA 聚合酶,1 mmol/L 的引物。循环参数为:96℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环,最后 72℃ 10 min。取 10 μl PCR 产物于质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,并用凝胶成像分析系统(Alpha Image)进行密度扫描分析,测定扩增条带的积分吸光度值(OA 值),用内参照 β-actin 修正,比较各组表达水平的差异。

1.5 链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化法检测肺组织 MMP-2、MMP-9 和 EMMPRIN 的蛋白表达:兔抗 MMP-2 多克隆抗体(多抗)由美国的 Zuker 博士赠送,工作液浓度为

1:200;羊抗 MMP-9、EMMPRIN 多抗工作液浓度分别为 1:80 和 1:120,均购自美国 Santa Cruz 公司。滴加一抗后 4℃过夜,同时用 PBS 代替一抗(其他条件均相同)作为阴性对照,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染、封片。结果按 Barbera 等^[3]确定的标准判定,阳性染色为胞浆或胞核中的棕褐色颗粒并按颜色强度分为 4 级:无棕色染色为阴性,定为 0 分;浅棕色为弱阳性,定为 1 分;棕黄色为较强阳性,定为 2 分;深棕色为强阳性,定为 3 分。每张片子共计数 20 个支气管,分别给予评分,然后得出该样本的总评分。

1.6 统计学处理:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 GB-STAT V 8.0 统计软件进行单因素方差分析和 *q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高氧致肺损伤作用(表 1):各高氧组肺 W/D 比值、BALF 蛋白浓度和胸腔积液均较正常对照组明显增加(*P*<0.05 或 *P*<0.01);高氧 48 h 和 72 h 组 BALF 蛋白浓度和胸腔积液均较 24 h 组升高。

表 1 高氧致肺损伤的作用($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 1 Effect of hyperoxia on lung injury($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	肺 W/D 比值	BALF 蛋白浓度(mg/L)	胸腔积液(μl)
正常对照组	3.32±0.34	22.51±5.62	2.15±0.32
高氧 24 h 组	4.42±0.65*	46.43±6.24*	6.35±1.22**
高氧 48 h 组	4.93±1.09*	163.45±25.36**	22.75±4.63**
高氧 72 h 组	5.31±0.92**	505.41±112.64**	20.11±3.54**

注:与正常对照组比较:**P*<0.05,***P*<0.01

2.2 不同时间高氧对肺组织 MMP-2、MMP-9 和 EMMPRIN mRNA 表达(表 2,彩色插页图 1A,图 2):RT-PCR 结果显示,MMP-2 mRNA 和 EMMPRIN mRNA 表达在高氧 24 h 后即较正常对照组明显增加(*P*<0.05 或 *P*<0.01),并在 48 h 和 72 h 持续在高水平(*P*均<0.01);MMP-9 mRNA 表达达到高氧 72 h 组才有较明显增加(*P*<0.05)。

表 2 高氧对肺组织 MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA 和 EMMPRIN mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 2 Effect of hyperoxia on the expression of MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN mRNA in mice lung tissue ($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	MMP-2 mRNA(OA 值)	MMP-9 mRNA(OA 值)	EMMPRIN mRNA(OA 值)
正常对照组	0.30±0.07	0.37±0.11	0.43±0.14
高氧 24 h 组	0.88±0.21**	0.42±0.13	0.75±0.19*
高氧 48 h 组	0.94±0.19**	0.46±0.09	0.94±0.11**
高氧 72 h 组	0.80±0.25**	0.73±0.21*	0.87±0.18**

注:与正常对照组比较:**P*<0.05,***P*<0.01

2.3 不同时间高氧对肺组织 MMP-2、MMP-9 和 EMMPRIN 的蛋白表达(表 3, 彩色插页图 1B, 图 3):免疫组化结果显示, MMP-2 蛋白表达于气道上皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞胞浆中; MMP-9 蛋白表达于气道上皮细胞、Ⅱ型肺泡上皮细胞、血管平滑肌细胞和炎症细胞(包括巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞)胞浆中; EMMPRIN 蛋白表达于气道上皮细胞、Ⅱ型肺泡上皮细胞、血管平滑肌细胞和肺泡巨噬细胞的胞浆和细胞膜。高氧 24 h 组肺组织 MMP-2、MMP-9 和 EMMPRIN 的蛋白表达最高(P 均 <0.01), 以后表达逐渐降低, 但与正常对照组比较差异亦均有显著性(P 均 <0.05)。

表 3 高氧对气道上皮细胞 MMP-2 蛋白、MMP-9 蛋白和 EMMPRIN 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 3 Effect of hyperoxia on the expression of MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN protein in mice trachea epithelium ($\bar{x} \pm s, n=18$) 分

组别	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白	EMMPRIN 蛋白
正常对照组	11.80±1.54	16.60±5.00	16.44±5.03
高氧 24 h 组	26.60±2.41**	37.20±4.20**	29.64±7.50**
高氧 48 h 组	24.40±2.07*	31.42±6.24*	22.32±4.43*
高氧 72 h 组	14.40±2.41*	21.54±4.67*	19.86±6.54*

注:与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.4 组织病理学观察:光镜下正常对照组肺组织结构正常,高氧 48 h 及 72 h 组肺组织呈现结构毁损严重,肺泡塌陷,肺间质水肿,出血,炎症细胞浸润(彩色插页图 4A,4B)。

3 讨论

ALI 是由环境及内源性毒素引起的以严重损害气体交换屏障——肺泡毛细血管结构为特征的一种疾病,可导致肺组织、细胞发生一系列复杂变化^[1,4]。迄今肺损伤发展过程中许多生化事件及分子机制还不甚明了。我们推测蛋白溶解酶类,尤其是那些参与 ECM 破坏及重建的酶类,是 ALI 中导致细胞和肺间质病理改变的重要致病因子。MMPs 能特异性降解变性胶原、基底膜Ⅳ型胶原及弹性蛋白,它们通过破坏基底膜、促进炎症过程中有关细胞的迁移以及 ECM 重建,在 ALI 的发病过程中发挥重要作用。临床上在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者肺组织中同样发现了严重的基底膜破损^[5],因而 MMPs 的过度产生及活化使肺泡毛细血管屏障的通透性明显增加,从而引起肺水肿及严重的炎症反应。

MMP-2 和 MMP-9 是降解细胞基底膜的主要组分Ⅳ型胶原的重要酶类,它们的分泌和激活可导致气道上皮和血管内皮通透性增加,严重时可导

致其结构破坏;而 EMMPRIN 广泛分布于气道上皮、血管内皮、成纤维细胞、平滑肌组织和炎症细胞的胞浆、细胞表面和细胞外液中,在各种炎症介质和细胞因子的刺激下,不仅自身表达及活性增加,而且能诱导包括 MMP-2 和 MMP-9 在内多种 MMPs 的分泌及激活^[6]。

为证实 MMPs 参与 ALI 过程的推测,我们采用持续吸入高浓度氧($>98\%$)制备小鼠 ALI 模型,证实持续吸入高浓度氧可导致以肺 W/D 比值、BALF 总蛋白浓度明显增加及胸腔积液大量出现为特征的肺损伤。组织学研究亦发现肺组织呈现严重的结构毁损、肺泡塌陷及间质水肿。肺损伤在暴露于高氧 24 h 后开始出现,并随暴露时间的延长而逐渐加重。同时我们发现,在高氧引起的 ALI 中,肺组织多种 MMPs 表达均明显增加,其表达升高在氧化剂所致的肺损伤中可能是导致肺组织结构毁损、上皮通透性增加以及肺间质水肿的重要致病因素,同时炎症细胞、尤其肺泡巨噬细胞和中性粒细胞亦通过表达 MMPs 和其他介质,在肺损伤和修复过程中发挥重要作用^[7,8]。

参考文献:

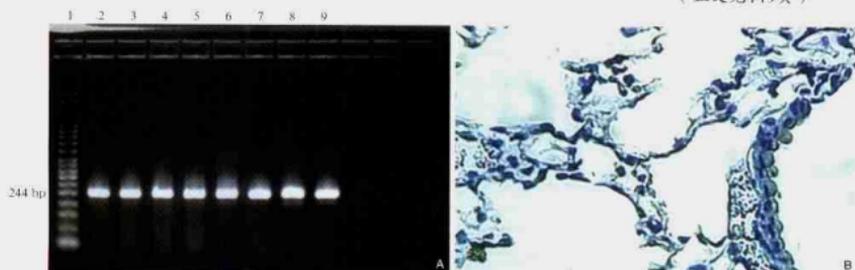
- 1 Deneke S M, Fanburg B L. Normobaric oxygen toxicity of the lung[J]. N Engl J Med, 1980, 303:76-86.
- 2 Foda H D, Rollo E E, Drews M, et al. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340)[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25:717-724.
- 3 Barbera J A, Peinado V I, Santos S, et al. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164:709-713.
- 4 张金秋, 李银平, 黎檀实. 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素急性肺损伤[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17:382-384.
- 5 Torii K, Iida K, Miyazaki Y, et al. Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155:43-46.
- 6 Pardo A, Selman M, Ridge K, et al. Increased expression of gelatinases and collagenase in rat lungs exposed to 100% oxygen [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(4 Pt 1):1067-1075.
- 7 Piedboeuf B, Johnston C J, Watkins R H, et al. Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) and metallothionein in murine lungs after hyperoxic exposure [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 10:123-132.
- 8 Raghu G, Striker L J, Hudson L D, et al. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs[J]. Am Rev Respir Dis, 1985, 131:281-289.

(收稿日期:2005-12-28 修回日期:2006-03-10)

(本文编辑:李银平)

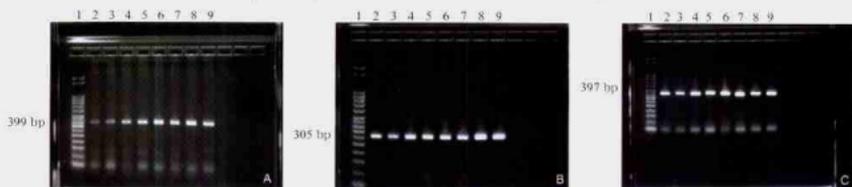
多种基质金属蛋白酶在高氧所致急性肺损伤中的表达

(正文见449页)



A: PCR扩增对照基因 β -actin分子质量为244 bp; 1为244 bp分子质量标记, 2,3为正常对照组, 4,5为高氧24 h组, 6,7为高氧48 h组, 8,9为高氧72 h组; B:高氧组小鼠肺组织免疫组化染色阴性对照(SABC, $\times 200$)

图1 RT-PCR和免疫组化方法的阴性对照
Figure 1 Negative control of RT-PCR and immunohistochemistry



A: MMP-2分子质量为399 bp; B: MMP-9分子质量为305 bp; C: EMMPRIN分子质量为397 bp, 1为50 bp分子质量标记, 2, 3为正常对照组, 4, 5为高氧24 h组, 6, 7为高氧48 h组, 8, 9为高氧72 h组

图2 RT-PCR分析MMP-2、MMP-9和EMMPRIN的mRNA在肺组织中的表达

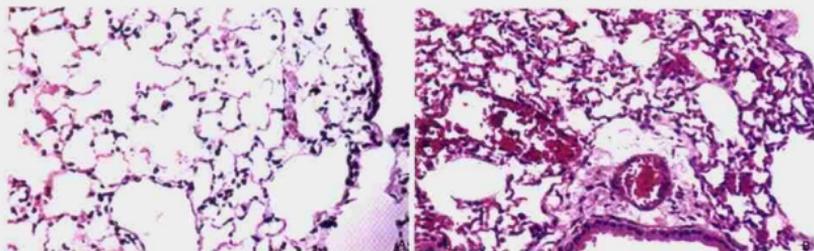
Figure 2 Expression of mRNA of MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN in lung tissue by RT-PCR



A:高氧24 h组肺组织MMP-2; B:高氧48 h组MMP-9; C:高氧24 h组肺组织EMMPRIN

图3 高氧组肺组织MMP-2、MMP-9和EMMPRIN的蛋白表达(SABC, $\times 200$)

Figure 3 Expression of protein of MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN in lung tissue in hypoxia groups (SABC, $\times 200$)



A:正常对照组; B:高氧72 h组

图4 正常对照组和高氧72 h组肺组织病理学变化(HE, $\times 100$)

Figure 4 Pathological changes of lung tissue in normal control and hypoxia 72 hours groups (HE, $\times 100$)