

·论著·

肝素对急性肺损伤大鼠基质金属蛋白酶 2 和 9 活性的影响

李旭 郑振 马晓春

【摘要】 目的 探讨肝素对急性肺损伤(ALI)大鼠体内基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9)蛋白及 mRNA 表达的影响。**方法** 18 只雄性 Wistar 大鼠,按随机数字表法分成 3 组,每组 6 只。经尾静脉注射脂多糖(LPS) 6 mg/kg 复制 ALI 大鼠模型;肝素组在注射 LPS 前 15 min 经尾静脉注射普通肝素 100 U/kg,对照组注射等量生理盐水。分别于制模后 1、3、6 h 取股静脉血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达;制模后 6 h 处死动物,取左肺,应用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肺组织中 MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较,ALI 组血清 MMP-2($\mu\text{g/L}$)、MMP-9($\mu\text{g/L}$)蛋白表达增高,6 h 达到高峰(MMP-2: 2.86 ± 0.40 比 1.21 ± 0.24 , MMP-9: 2.54 ± 0.29 比 1.15 ± 0.34 , 均 $P < 0.01$);应用肝素后在 6 h 时 MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显降低 (MMP-2: 1.92 ± 0.31 比 2.86 ± 0.40 , MMP-9: 1.82 ± 0.26 比 2.54 ± 0.29 , 均 $P < 0.05$)。制模后 6 h,ALI 组肺组织 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 表达明显高于对照组 (MMP-2 mRNA: 1.88 ± 0.09 比 1.00 ± 0.10 , MMP-9 mRNA: 3.15 ± 0.47 比 1.00 ± 0.17 , 均 $P < 0.01$);肝素组 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 表达较 ALI 组明显降低 (MMP-2 mRNA: 1.26 ± 0.14 比 1.88 ± 0.09 , $P < 0.01$; MMP-9 mRNA: 2.06 ± 0.68 比 3.15 ± 0.47 , $P < 0.05$),但仍高于对照组 (均 $P < 0.05$)。**结论** ALI 大鼠体内 MMP-2、MMP-9 表达增加,肝素能够减少血清及肺组织中 MMP-2、MMP-9 的表达,从而减轻肺损伤。

【关键词】 急性肺损伤; 普通肝素; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9

Effects of unfractionated heparin on expression of metalloproteinase-2 and -9 in acute lung injury rats LI Xu, ZHENG Zhen, MA Xiao-chun. Department of Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China
Corresponding author: MA Xiao-chun, Email: xcma2972@sina.com

【Abstract】 Objective To determine the activation of matrix metalloproteinase (MMP-2, MMP-9) in rats with acute lung injury (ALI) and the effects of unfractionated heparin (UFH) on the levels. **Methods** Eighteen male Wistar rats were divided into control group, ALI group and UFH group, with 6 rats in each group by means of random number table. ALI was induced by administering a bolus injection of lipopolysaccharide (LPS) via the caudal vein at a dose of 6 mg/kg. In UFH group the rats were treated intravenously with 100 U/kg of UFH 15 minutes before the injection of LPS. In control group, the rats were treated with the same volume of normal saline. Serum levels of MMP-2 and MMP-9 were measured by onzymelinked immunosorbent assay (ELISA) at 1, 3, 6 hours via femoral vein. Six hours after the injection of reagents, the rats were sacrificed and lung tissue samples were collected for mRNA analysis of the MMP-2 and MMP-9 by real-time fluorescence quantitate reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** Compared with control group, the content of MMP-2 ($\mu\text{g/L}$) and MMP-9 ($\mu\text{g/L}$) in serum of ALI group were increased, and reached the peak at 6 hours (MMP-2: 2.86 ± 0.40 vs. 1.21 ± 0.24 , MMP-9: 2.54 ± 0.29 vs. 1.15 ± 0.34 , both $P < 0.01$); they were down-regulated in UFH group at 6 hours (MMP-2: 1.92 ± 0.31 vs. 2.86 ± 0.40 , MMP-9: 1.82 ± 0.26 vs. 2.54 ± 0.29 , both $P < 0.05$). Compared with control group, the mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 in the lung tissue of ALI group were increased at 6 hours (MMP-2 mRNA: 1.88 ± 0.09 vs. 1.00 ± 0.10 , MMP-9 mRNA: 3.15 ± 0.47 vs. 1.00 ± 0.17 , both $P < 0.01$); they were down-regulated in UFH group (MMP-2 mRNA: 1.26 ± 0.14 vs. 1.88 ± 0.09 , $P < 0.01$; MMP-9 mRNA: 2.06 ± 0.68 vs. 3.15 ± 0.47 , $P < 0.05$), but still above the control group (both $P < 0.05$). **Conclusions** The present study demonstrated that the level of MMP-2 and MMP-9 increased in rats with ALI. UFH could exert protective effects by inhibiting expression of MMP-2 and MMP-9 in serum and lung tissue, in both mRNA and protein expression.

【Key words】 Acute lung injury; Unfractionated heparin; Matrix metalloproteinase-2; Matrix metalloproteinase-9

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.10.010

基金项目:国家自然科学基金资助(81101411);辽宁省科技厅药物源头创新研究课题(20071027-7);辽宁省医学高峰建设工程项目(2010-1067);辽宁省沈阳市科技计划项目(F10-205-1-01)

作者单位:110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院 ICU

通信作者:马晓春,Email:xcma2972@sina.com

基质金属蛋白酶(MMPs)是一组生物活性依赖于锌离子的蛋白水解酶,可由多种细胞分泌,参与对细胞外基质(ECM)的降解,对维持 ECM 的稳定性有重要作用^[1]。已有大量研究证实,MMPs 在基质重构中发挥着关键作用,而近年研究表明,MMPs 除降解 ECM 外,在调控炎症等诸多方面也有重要作用,如在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者的肺泡上皮细胞和血管内皮细胞基底膜大量破坏,肺组织通透性增强,发生肺水肿,从而导致呼吸衰竭(呼衰),其机制可能与其中直接导致 ARDS 的两种关键酶明胶酶 A(即 MMP-2)和明胶酶 B(即 MMP-9)活性明显升高有关^[2]。肝素在临床应用中,对脓毒症患者有积极作用^[3],但具体机制并不清楚,ARDS 与脓毒症有相似的病理生理过程,肝素可能发挥有效作用。因此,本研究旨在探讨急性肺损伤(ALI)大鼠体内 MMP-2 及 MMP-9 的动态表达,并观察肝素对其水平的影响,从而为肝素在临床中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 18 只,体重 250 ~ 300 g,由中国医科大学实验动物部提供,动物合格证号:SCXK(辽)2008-0005。按随机数字表法将大鼠分成对照组、ALI 组、肝素组,每组 6 只。鼠尾静脉注射脂多糖(LPS)6 mg/kg 复制 ALI 模型^[4],肝素组在注射 LPS 前 15 min 经鼠尾静脉注射普通肝素 100 U/kg,对照组经鼠尾静脉注射等量生理盐水。

本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 标本收集及处理:在注射 LPS 后 1、3、6 h 经股静脉采血,离心后取上清, -80 °C 保存备检。于 LPS 后 6 h 处死动物,留取左肺组织,按 TRIzol 一步法提取肺组织总 RNA,存于 -80 °C 下备检。

1.3 组织病理学观察:取大鼠左肺组织,4%多聚甲

醛固定,常规石蜡包埋,行 5 μm 厚连续切片,常规脱蜡,苏木素-伊红(HE)染色,每组动物随机抽取 6 张切片,光镜下(×200)每张切片随机选取 4 个视野,评价肺组织病理变化。

1.4 血清 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达检测:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定,试剂盒购自上海锐聪科技发展有限公司,操作严格按照试剂盒说明书进行,每组检测 3 个复孔。

1.5 肺组织 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达测定:应用 TRIzol 提取肺组织总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度;采用逆转录试剂盒进行逆转录,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)测定 MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA。反应总体积 25 μl。加入 cDNA 2 μl;MMP-2 上游引物 5'-CCC AAG AAT AGA TGC TGA CTG TAC TC-3' 1 μl,下游引物 5'-GAG GGT TGG TGG GAT TGG A-3' 1 μl,反应条件:95 °C 30 s,95 °C 5 s,58 °C 30 s,35 个扩增循环;MMP-9 上游引物 5'-GGA CGA TGC CTG CAA CGT-3' 1 μl,下游引物 5'-CAA ATA CAG CTG GTT CCC AAT CT-3' 1 μl,反应条件:95 °C 30 s,95 °C 5 s,62 °C 30 s,35 个扩增循环。选取 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照,MMP-2 及 MMP-9 的相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 计算。

1.6 统计学处理:采用 SPSS 18.0 统计软件,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,方差不齐时采用非参数的秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织病理改变:对照组肺组织结构完整,肺泡壁无水肿,肺泡腔无明显炎性渗出,大部分肺间质中无明显炎性细胞浸润(图 1a)。ALI 组见大量炎性细胞浸润,肺泡壁明显水肿、增宽,肺泡腔中渗出增多(图 1b),提示 ALI 模型构建成功。肝素组

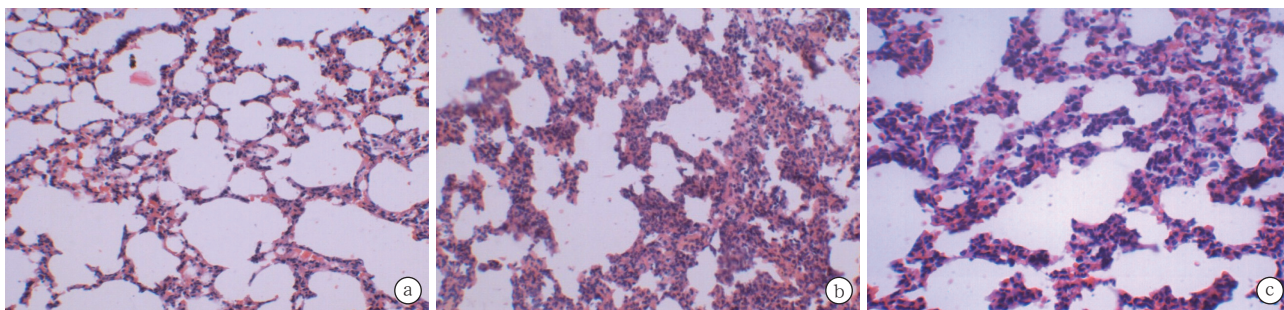


图 1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理改变 对照组(a)肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡间隔无水肿、炎症等改变;急性肺损伤(ALI)组(b)肺泡腔狭窄,肺泡间隔增宽,肺组织有明显渗出、水肿、出血,肺泡腔可见大量炎性细胞浸润;肝素组(c)肺组织渗出、水肿及出血程度减轻,肺泡腔内炎性细胞浸润减少 HE 高倍放大

表 1 肝素对 ALI 大鼠伤后不同时间点血清 MMP-2、MMP-9 蛋白表达及伤后 6 h 肺组织

MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)									
组别	动物数	血清 MMP-2 蛋白($\mu\text{g/L}$)			血清 MMP-9 蛋白($\mu\text{g/L}$)			肺组织 mRNA($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	
		1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	MMP-2	MMP-9
对照组	6	1.28 $\pm$ 0.24	1.16 $\pm$ 0.28	1.21 $\pm$ 0.24	1.21 $\pm$ 0.32	1.14 $\pm$ 0.24	1.15 $\pm$ 0.34	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.17
ALI 组	6	0.95 $\pm$ 0.09	1.98 $\pm$ 0.38 ^a	2.86 $\pm$ 0.40 ^b	1.05 $\pm$ 0.25	1.39 $\pm$ 0.14	2.54 $\pm$ 0.29 ^b	1.88 $\pm$ 0.09 ^b	3.15 $\pm$ 0.47 ^b
肝素组	6	1.16 $\pm$ 0.20	1.41 $\pm$ 0.07 ^c	1.92 $\pm$ 0.31 ^{ac}	1.12 $\pm$ 0.30	1.26 $\pm$ 0.18	1.82 $\pm$ 0.26 ^{ac}	1.26 $\pm$ 0.14 ^{ad}	2.06 $\pm$ 0.68 ^{ac}

注:ALI:急性肺损伤,MMP-2 和 MMP-9:基质金属蛋白酶 2 和 9;与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 ALI 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

肺脏结构改变减少,炎性细胞浸润减轻(图 1c)。

2.2 肝素对大鼠血清 MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响(表 1):LPS 注射后初期 MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达较对照组有轻度下降,随着时间推移逐渐上调,在 6 h 达到高峰(均 $P<0.01$)。与 ALI 组相比,肝素组血清 MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显降低(均 $P<0.05$)。

2.3 肝素对大鼠肺组织 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达的影响(表 1):ALI 组 MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA 表达均较对照组显著增加(均 $P<0.01$);肝素组 MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA 表达较 ALI 组明显下降($P<0.01$ 和 $P<0.05$),但仍高于对照组(均 $P<0.05$)。

3 讨论

约 30%的脓毒症患者会发生器官功能障碍,其中肺脏是最早也是最容易受累的器官,可发生 ALI 或 ARDS^[5]。ALI/ARDS 的发病机制十分复杂,宿主防御反应失控,导致炎症反应、内皮细胞受损、凝血系统活化、纤溶抑制以及纤维化的发生均是影响 ALI/ARDS 的发生发展^[6]。但目前公认的观点是炎症反应学说,然而,对 ALI/ARDS 的抗炎治疗并未取得良好效果。过去 10 年的研究表明,炎症和凝血之间存在密不可分的联系,交叉对话形成恶性循环^[7]。且近年来越来越多的动物研究表明,抗凝剂及促进纤溶的物质可能改善肺功能及氧合^[8]。因此提示,抗凝治疗可能是 ALI/ARDS 治疗的一个新亮点。

2001 年一项评估重组人活化蛋白 C(rhAPC)治疗严重脓毒症的 3 期临床试验(PROWESS 研究)结果表明,rhAPC 使脓毒症患者病死率下降 6.1%,是迄今唯一证实重症感染患者应用抗凝剂可提高生存率的国际性研究^[9]。近年对活化蛋白 C(APC)在脓毒症中应用的研究提示,其同时具有抗炎和抗凝作用可能是改善患者预后的原因^[9]。肝素作为一种抗凝剂,还具有抗炎作用,如抑制促炎因子的产生和释放^[10-11]、改善内皮功能和血管反应性^[12]、调节白细胞的黏附、迁移和活化^[13]等,同时还具有抗凋亡的作

用^[14],因此可能发挥类似 APC 的作用。ALI/ARDS 作为全身炎症反应的一部分同样存在炎症和凝血功能紊乱,越来越多的证据表明,应用抗凝剂和促纤溶制剂可能有益于 ALI/ARDS 的治疗,并且近年来对多个动物模型的研究以及临床研究结果均表明,应用肝素可以不同程度地改善肺氧合^[7,15-20]。但是肝素是否会在 ECM 破坏中起作用,国内外相关报道仍较少。

MMPs 是一组依赖于锌的蛋白酶家族,是降解 ECM 的主要酶类,由炎性细胞(T 细胞、巨噬细胞、嗜酸粒细胞、中性粒细胞)及血管内皮细胞等合成。目前发现的 MMPs 达 24 种之多,通常按其作用底物分为胶原酶、IV 型胶原酶/明胶酶、基质溶解酶、膜型基质金属蛋白酶、弹性蛋白酶 5 类^[21]。MMP-2 和 MMP-9 参与多个炎症过程,包括炎性细胞聚集,损伤组织的修复和塑形。当肺组织发生炎症时,在正常情况下不表达 MMPs 的细胞也开始表达 MMPs,明胶酶活性增强,分解 IV 型胶原,破坏基底膜,导致肺泡-毛细血管膜通透性增强,基底膜完整性受到破坏,有利于各种损伤因子进一步损害肺间质和肺实质,最终出现肺功能障碍,产生 ALI,严重者可导致 ARDS^[22]。近年来研究发现 MMP-2 与 ALI 密切相关^[23]。MMP-2 在所有 MMPs 中分布最广,正常上皮细胞和内皮细胞均有表达,可降解基底膜的多种成分,参与基底膜的转换^[24],当细胞损伤时,常有 MMP-2 升高。MMP-9 是 MMPs 家族中分子质量最大的酶,由多种细胞分泌,MMP-9 基因的正常表达具有调控和维持正常组织功能的特点。MMP-9 被认为是 MMPs 家族中的终末因子之一,在炎症反应中起重要作用。有研究表明,MMP-9 的水平标志着 ECM 的损伤和破坏程度^[25],选择性地敲除 MMP-9 基因可以降低内毒素血症的死亡率^[26]。本研究结果显示,ALI 大鼠表达 MMP-2 及 MMP-9 的蛋白和 mRNA 水平均增高,肝素能降低其水平,提示肝素可能通过调节 MMP-2 及 MMP-9 的表达发挥对 ALI 的保护作用。

参考文献

- [1] Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 207-214.
- [2] Lanchou J, Corbel M, Tanguy M, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*, 2003, 31: 536-542.
- [3] 马晓春, 李旭. 肝素在脓毒症治疗中的应用前景. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 566-569.
- [4] Liu D, Zeng BX, Zhang SH, et al. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Crit Care Med*, 2005, 33: 2309-2316.
- [5] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1546-1554.
- [6] Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*, 2006, 27: 337-349.
- [7] Laterre PF, Wittebole X, Dhainaut JF. Anticoagulant therapy in acute lung injury. *Crit Care Med*, 2003, 31: S329-336.
- [8] Czabanka M, Peter C, Martin E, et al. Microcirculatory endothelial dysfunction during endotoxemia—insights into pathophysiology, pathologic mechanisms and clinical relevance. *Curr Vasc Pharmacol*, 2007, 5: 266-275.
- [9] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 2001, 344: 699-709.
- [10] 陈松, 马晓春. 肝素对脓毒症大鼠静脉血白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 和血管紧张素 II 表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 555-558.
- [11] Tyrell DJ, Kilfeather S, Page CP. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16: 198-204.
- [12] Morrison AM, Wang P, Chaudry IH. A novel nonanticoagulant heparin prevents vascular endothelial cell dysfunction during hyperdynamic sepsis. *Shock*, 1996, 6: 46-51.
- [13] Freischlag JA, Colburn MD, Quiñones-Baldrich WJ, et al. Alteration of neutrophil (PMN) function by heparin, dexamethasone, and enalapril. *J Surg Res*, 1992, 52: 523-529.
- [14] Yagmurdu MC, Turk E, Moray G, et al. Effects of heparin on bacterial translocation and gut epithelial apoptosis after burn injury in the rat: dose-dependent inhibition of the complement cascade. *Burns*, 2005, 31: 603-609.
- [15] Abubakar K, Schmidt B, Monkman S, et al. Heparin improves gas exchange during experimental acute lung injury in newborn piglets. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158: 1620-1625.
- [16] Cepkova M, Matthay MA. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care Med*, 2006, 21: 119-143.
- [17] 栾正刚, 娜拉·普鲁, 章志丹, 等. 低分子肝素和阿司匹林对急性肺损伤的治疗作用. *中国危重病急救医学*, 2006, 18: 456-458.
- [18] 汪宗昱, 杨拔贤, 朱曦, 等. 普通肝素雾化吸入对内毒素性肺损伤大鼠肺泡局部凝血及炎症反应的影响. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 239-242.
- [19] 赵聪, 章志丹, 张晓娟, 等. 小剂量肝素治疗脓毒症的临床分析. *中华内科杂志*, 2009, 48: 566-569.
- [20] 韩旭东, 黄晓英, 葛志华, 等. 持续小剂量肝素治疗脓毒症患者急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的临床研究. *临床肺科杂志*, 2010, 15: 1730-1732.
- [21] Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 1997, 378: 151-160.
- [22] Carden D, Xiao F, Moak C, et al. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol*, 1998, 275: H385-392.
- [23] Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, et al. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162: 1949-1956.
- [24] Foda HD, Rollo EE, Drews M, et al. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340). *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25: 717-724.
- [25] Volman TJ, Goris RJ, Lomme RM, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases in the murine zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome. *J Pathol*, 2004, 203: 968-975.
- [26] Dubois B, Starckx S, Pagenstecher A, et al. Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. *Eur J Immunol*, 2002, 32: 2163-2171.

(收稿日期: 2012-08-04) (本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

免疫球蛋白治疗脓毒症引起的多器官功能障碍综合征的回顾性分析

目前应用富含 IgM 抗体免疫球蛋白脓毒症引起的多器官功能障碍综合征 (MODS) 的生存率和肾脏功能的效果尚不清楚。为此, 研究人员进行了一系列免疫球蛋白治疗脓毒症的回顾性研究。研究对象为 118 例重症监护病房 (ICU) 患者, 按治疗方法分为标准的抗菌药物加支持治疗 (对照组, 62 例) 和静脉注射富含 IgM 抗体的免疫球蛋白控制治疗组 (IVIG 组, 56 例)。主要监测指标为: 总病死率和 28 d 病死率, 急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分, 治疗 1 d、4 d 肾功能指标。结果显示, 两组患者治疗 4 d APACHE II 评分较 1 d 显著下降, 但对肾功能影响很小。IVIG 组长期住院总病死率和 28 d 病死率较对照组显著降低。因此, 研究人员得出结论, 应用富含 IgM 抗体免疫球蛋白治疗可改善 MODS 临床症状, 并显著降低 APACHE II 评分、总病死率和 28 d 病死率, 但对肾功能的影响是微不足道的。

林志龙, 编译自《J Int Med Res》, 2012, 40: 1166-1174; 胡森, 审校