



急性肺损伤大鼠肺组织基质金属蛋白酶2及其抑制因子蛋白和 mRNA 的表达

阮琼¹, 苏中昊², 杨爱东², 李文雯², 汪东颖², 吴中华², 庞慧芳²

(1. 上海市第八人民医院急诊内科, 上海 200233; 2. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨内毒素致急性肺损伤 (ALI) 大鼠肺组织核转录因子- κ B (NF- κ B)、基质金属蛋白酶2 (MMP-2) 及其抑制因子 (TIMP-2) 蛋白和 mRNA 表达的变化。方法 20 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 2 组: 对照组、LPS 模型组, 每组再分为 4 h 和 8 h 两个亚组。尾静脉注射脂多糖 (LPS) (10 mg/kg) 建立大鼠急性肺损伤模型。检测血白细胞计数、支气管肺泡灌洗液 (BALF) 蛋白含量, 采用免疫组化 ABC 法和实时荧光定量 PCR 分别测定肺组织 NF- κ B、MMP-2、TIMP-2 蛋白及其 mRNA 的表达, 并观察肺组织病理变化。结果 与对照组相比, 模型组 4 h 和 8 h 时大鼠肺组织中的 NF- κ B、MMP-2 蛋白染色阳性面积率及其 mRNA 表达均显著增高 ($P < 0.01$)、TIMP-2 蛋白染色阳性面积率及其 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。病理学观察显示, 模型组大鼠肺组织出现出血及坏死。结论 内毒素致急性肺损伤的发病机制可能与 NF- κ B、MMP-2 蛋白及其 mRNA 表达升高、TIMP-2 蛋白及其 mRNA 表达降低有关。

【关键词】 脂多糖; 急性肺损伤; NF- κ B; MMP-2; TIMP-2

【中图分类号】 R563.9 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0039-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.010

Expression of the MMP-2 and TIMP-2 Protein and Its mRNA in Rats with Acute Lung Injury Caused by Lipopolysaccharide

RUAN Qiong¹, SU Zhong-hao², YANG Ai-dong², LI Wen-wen², WANG Dong-ying², WU Zhong-hua², PANG Hui-fang²

(1. Department of Emergency Medicine, Shanghai Eighth People's Hospital, Shanghai 200233, China;

2. The Basic Medicine College of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changes of NF- κ B, MMP-2 and TIMP-2 protein and its mRNA in the rats with acute lung injury (ALI) caused by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Twenty male Wistar rats were randomly divided into two groups: normal control group, LPS model group. Each group had two subgroups, 4 hours and 8 hours after LPS were injected. The ALI model was established by intravenous injection of LPS (10 mg/kg) through a tailvein. Then the white blood cell (WBC) in blood and the protein content in bronchial alveolar lavage fluid (BALF) were measured, the expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-2) protein in pulmonary tissues were measured by immunohistochemistry ABC, the expression of NF- κ B, MMP-2 and TIMP-2 mRNA were measured by real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR), while the histopathology of the lung injury was observed by light microscope. **Results** Compared with normal group, the expression of NF- κ B and MMP-2 protein dyeing positive rate of area and its mRNA in LPS model group were obviously increased at 4 hours and 8 hours ($P < 0.01$), and the expression of TIMP-2 protein dyeing positive rate of area and its mRNA at 4 hours and 8 hours were obviously decreased in LPS model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Light microscope observation indicated

[基金项目] 上海市教委高校高水平特色发展项目 (No. (2005) 81); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (P13908)。

[作者简介] 阮琼 (1969 -), 女, 主治医师, 主要从事急诊医学临床与实验研究。

[通讯作者] 杨爱东, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中医药防治急性肺损伤的分子机制研究。aidongy@126.com。

that there were pulmonary hemorrhage and necrosis in model group. **Conclusion** The increasing of expression NF- κ B and MMP-2 protein and its mRNA and the decreasing of expression TIMP-2 protein and its mRNA may be the mechanism of ALI caused by LPS.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Acute lung injury; NF- κ B; MMP-2; TIMP-2

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是心源性以外的各种肺内外致病因素导致的急性、进行性缺氧性呼吸衰竭, 以呼吸困难、难治性低氧血症和非心源性肺水肿为临床特征, 严重的 ALI 或 ALI 的最终严重阶段被定义为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1], 研究表明核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 及其抑制因子 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP-2) 在内毒素致急性肺损伤的发病中有重要作用。本实验通过建立内毒素致 ALI 模型, 观察大鼠肺组织 NF- κ B、MMP-2、TIMP-2 蛋白及其 mRNA 表达的变化, 为揭示急性肺损伤的发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 雄性大鼠 20 只, 体重 (220 \pm 20) g, 由上海中医药大学实验动物中心提供 [SCXK (沪) 2007-005]。专用标准颗粒饲料、水喂养。

1.2 主要试剂

LPS: 购自美国 Sigma 公司 (LPS: O₁₁₁: B4, 批号 L-2630); NF- κ Bp65 (NLS): sc-114 购自美国 Santa Cruz 生物技术公司; 大鼠 MMP-2 和 TIMP-2 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 大鼠 NF- κ B、MMP-2、TIMP-2 和 GAPDH 引物和探针序列由广州达辉生物技术有限公司合成, 序列分别为: NF- κ B: 上游引物: 5'-CTACACCGAAGCAATTGAAGTGA-3', 下游引物: 5'-CAGCGAGTGGCCTGAGA-3', 探针序列: 5'-AGGCAGCCTCCAGCCCAGTGA-3', 5'端 FAM 修饰; 3'端 Tamra 修饰; MMP-2: 上游引物: 5'-CCC ATG AAG CCT TGT TTA CCA-3', 下游引物: 5'-TGG AAG CGG AAC GGA AAC T-3', 探针序列: 5'-TGGAATGCTGATGGACAGCC-3', 5'端 FAM 修饰, 3'端 Tamra 修饰; TIMP-2: 上游引物: 5'-CTC ATC GCG GGC CGT TTA AG-3', 下游引物: 5'-GAA GGC TTC GGG TCA TCG AG-3', 探针序列: 5'-CATGGAGAGCCTCTGTGGAT-3', 5'端 FAM 修饰, 3'端 Tamra 修饰; GAPDH: 上游引物: 5'-CCG AGG

GCC CAC TAA AGG-3', 下游引物: 5'-GCT GTT GAA GTC ACA GGA GAC AA-3', 探针序列: 5'-CATCCTGGGCTACACTGAGGACCA-3', 5'端 FAM 修饰, 3'端 Tamra 修饰。Trizol 总 RNA 提取试剂、反转录和 PCR 扩增所需的酶及其他试剂均购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 动物模型与分组

按随机数字表将大鼠随机分为对照组、模型组, 再随机分为 4 h、8 h 两个亚组 (每组 5 只)。模型组经尾静脉注射 LPS (10 mg/kg) 复制急性肺损伤大鼠模型^[2,3], 正常组注入等容积生理盐水。

1.4 动物标本制备

所有动物均于设定的相应时相点 (造模后 4 h 和 8 h), 用乌拉坦 1.0 g/kg 腹腔麻醉, 分离大鼠腹主动脉, 取一次性 5 mL 注射器从大鼠下腔静脉抽取静脉血约 1 mL 注入肝素钠抗凝管中, 混匀后进行白细胞计数检测。取血后解剖大鼠颈部, 暴露气管, 抽取生理盐水灌洗支气管, 取离心后的支气管肺泡灌洗液 (bronchial alveolar lavage fluid, BALF), 用考马斯亮兰法测定蛋白浓度; 开胸分离右肺上叶用 10% 甲醛溶液固定, 用于病理检测及肺组织 NF- κ B、MMP-2 和 TIMP-2 蛋白免疫组化检测; 右肺下叶置于液氮罐中作 NF- κ B mRNA、MMP-2 mRNA 和 TIMP-2 mRNA 表达检测。

1.5 免疫组织法检测肺组织 NF- κ Bp65、MMP-2 及 TIMP-2 蛋白含量

采用 IMS 细胞图像分析系统医学图像分析软件, 对免疫组织化学结果进行图像采集和定量分析。每张切片在高倍镜下随机选择不相重叠的 3 个视野, 细胞核为蓝色, NF- κ Bp65、MMP-2 及 TIMP-2 阳性细胞为棕黄色。计算出每例样本的蛋白染色阳性面积率 (蛋白染色阳性面积率 = 阳性细胞面积 / 总面积) 作为比较参数。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 NF- κ B mRNA、MMP-2 mRNA 及 TIMP-2 mRNA 的表达

按 Trizol 法提取总 RNA 后, 逆转录合成 cDNA, 在 20 μ L 的反应体系中分别加入样本 RNA 2 μ g 全文统一 RT buffer (5 \times) 4 μ L, 10 mmol/L NTPs 1 μ L, N9 随机引物 1 μ L, 逆转录酶 MMLV 1 μ L, RNA 酶抑制剂

1 μL β. 1 mol/LDTT2 μL, 加 DEPC 处理水到 20 μL, 混匀后于下列温度反应: 37℃ 1 h; 95℃ 5 min, 灭活 MMLV, 产物即为 cDNA。PCR 扩增: 在 50 μL 反应体系中加入 cDNA 5 μL, ddH₂O 水 32 μL, PCR buffer (5 ×) 10 μL, 荧光探针 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 1 μL, dNTPs 0.5 μL, TNF-α 上下游引物各 0.5 μL, 扩增条件: (1) 93℃ 2 min (2) 93℃ 45 s 55℃ 1 min, 10 cycle (3) 93℃ 30 s 55℃ 45 s 30 cycle。

扩增产物分析: 数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 分析。NF-κB mRNA、MMP-2 mRNA 及 TIMP-2 mRNA 表达水平以它们与 GAPDH 的相对表达量来计算。

1.7 肺组织病理学观察

制备肺组织标本, 常规苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察肺组织病理改变。

1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包分析统计, 所有数据均采用均数 ± 标准差 (± s) 表示, 多组均数采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血白细胞计数及支气管肺泡灌洗液蛋白含量比较

与对照组相比, 模型组 4 h 和 8 h 时白细胞计数明显降低 (P < 0.05 或 P < 0.01), 肺泡灌洗液的蛋白含量明显升高 (P < 0.01)。(见表 1)

表 1 两组大鼠血白细胞计数及支气管肺泡灌洗液蛋白含量比较 (n = 5)

Tab.1 Comparison of blood white blood cell count and protein content in BALF between the two groups (n = 5)

组别 Group	白细胞计数 (×10 ⁹) White blood cell count (×10 ⁹)		肺泡气管灌洗液 蛋白含量 (g/L) Protein content in BALF (g/L)	
	4 h	8 h	4 h	8 h
对照组 Normal control group	5.22 ± 0.84	5.58 ± 1.89	0.53 ± 0.12	0.53 ± 0.12
模型组 LPS model group	1.26 ± 0.65 ^{△△}	1.68 ± 0.91 [△]	1.16 ± 0.12 ^{△△}	0.91 ± 0.19 ^{△△}

注: 与对照组相比, [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01

Note: Compared with the control, [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01

2.2 大鼠肺组织 NF-κB、MMP-2 及 TIMP-2 蛋白染色阳性面积率的比较

与对照组相比, 模型组 4 h 和 8 h 时 NF-κB P65、MMP-2 蛋白染色阳性面积率均明显升高 (P < 0.01); TIMP-2 蛋白染色阳性面积率明显降低 (P < 0.01) (见表 2)。

表 2 两组大鼠肺组织 NF-κB、MMP-2 及 TIMP-2 蛋白染色阳性面积率的比较 (n = 5)

Tab.2 Comparison of expression of NF-κB, MMP-2 and TIMP-2 protein dyeing positive rate of area in lung tissues between the two groups (n = 5)

组别 Group	NF-κB 蛋白染色阳性面积率 (%) NF-κB protein dyeing positive rate of area (%)		MMP-2 蛋白染色阳性面积率 (%) MMP-2 protein dyeing positive rate of area (%)		TIMP-2 蛋白染色阳性面积率 (%) TIMP-2 protein dyeing positive rate of area (%)	
	4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h
	对照组 Normal control group	2.79 ± 0.79	2.79 ± 0.79	2.64 ± 0.32	2.64 ± 0.32	5.61 ± 1.21
模型组 LPS model group	4.28 ± 0.55 ^{△△}	4.20 ± 0.62 ^{△△}	4.44 ± 0.99 ^{△△}	5.24 ± 1.45 ^{△△}	2.73 ± 0.35 ^{△△}	3.15 ± 0.78 ^{△△}

注: 与对照组相比, [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01

Note: Compared with the control, [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01

2.3 大鼠肺组织 NF-κB、MMP-2 及 TIMP-2 mRNA 表达的比较

与对照组相比, 模型组 4 h 和 8 h 时 NF-κB、MMP-2 mRNA 表达均显著增高 (P < 0.01), TIMP-2 mRNA 表达均明显降低 (P < 0.05)。(见表 3)

2.4 大鼠肺组织病理学改变

光镜观察: 对照组大鼠肺表面呈淡红色, 结构完整, 肺泡隔均匀一致, 组织小叶结构清晰, 纤维结缔组织无增生, 肺泡腔清晰可见, 肺泡壁无增厚, 支

气管粘膜上皮完整, 肺泡腔细支气管腔未见明显炎细胞及渗出物。模型组 4 h 与 8 h 时大鼠肺泡腔内充满炎性渗出物和出血, 肺泡壁毛细血管扩张充血, 细支气管粘膜上损伤部分脱落, 管壁上大量淋巴细胞浸润, 管壁增厚, 可见肺不张, 肺气肿 (彩插 3 见图 1)。

3 讨论

MMP-2 属于明胶酶的一种, 亦称明胶酶 A,

表 3 两组大鼠肺组织 NF- κ B、MMP-2 及 TIMP-2 mRNA 表达的比较 ($n=4$)Tab. 3 Comparison of expression of NF- κ B, MMP-2 and TIMP-2 mRNA in lung tissues between the two groups ($n=4$)

组别 Group	NF- κ B mRNA ($\times 10^{-4}$)		MMP-2 mRNA ($\times 10^{-4}$)		TIMP-2 mRNA ($\times 10^{-4}$)	
	4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h
对照组 Normal control group	4.26 \pm 2.76	4.26 \pm 2.76	1.18 \pm 0.66	1.18 \pm 0.66	30.39 \pm 22.39	30.39 \pm 22.39
模型组 LPS model group	44.82 \pm 9.27 $^{\Delta\Delta}$	26.07 \pm 3.81 $^{\Delta\Delta}$	8.52 \pm 0.36 $^{\Delta\Delta}$	8.08 \pm 2.03 $^{\Delta\Delta}$	3.71 \pm 2.28 $^{\Delta}$	3.79 \pm 0.79 $^{\Delta}$

注:与对照组相比, $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$

Note: Compared with the control, $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$

MMP-2 以无活性酶原的形式由多种细胞分泌,如成纤维细胞、巨噬细胞、内皮细胞等,在激活剂的作用下转变为成熟的酶,其作用底物为 IV、V 型胶原。MMP-2 激活与表达后,能降解基底膜的主要成分 IV 胶原,使基底膜变薄甚至断裂,引起血管通透性增加、炎症细胞浸润,蛋白外渗,肺泡内液体增多、肺间质和肺泡水肿形成,甚至出现肺出血等。MMP-2 是所有 MMPs 中分布最广的,当细胞恶变或损伤时,常有 MMP-2 的升高^[4]。研究表明,正常肺组织中 MMP-2 呈弱表达,而脂多糖(LPS)和前炎症细胞因子(如 TNF- α)能促进 MMP-2 的表达^[5]。本实验显示,正常对照组 MMP-2 mRNA 表达很低,静脉注射内毒素后,MMP-2 在转录水平的表达增高,此实验结果与先前研究结果一致。

TIMPs 是一组内源性特异性抑制 MMPs 活性的糖蛋白,其与 MMPs 形成 1:1 复合体而抑制其活性^[6]。TIMP-2 是 MMP-2 的特异性抑制蛋白,特异性抑制 MMP-2 的活性。在正常肺组织中,细胞外基质的合成和降解保持动态平衡,这对于保证正常肺功能非常重要^[7]。MMPs 和 TIMPs 的平衡被破坏时,肺泡上皮基底膜被破坏之后可导致肺泡上皮细胞受损,富含蛋白和蛋白酶的水肿液充满肺泡,使表面活性物质灭亡。此外,基底膜完整性受到破坏后,各种损伤因子易于进入肺间质和肺泡腔,加重肺间质和实质损伤,进而引起肺功能障碍,导致肺泡萎陷和顽固性低氧血症^[8]。

研究表明,转录因子 NF- κ B 在某些 MMP、TIMP 基因启动子上有某些特异性结合位点,当细胞外信号激活这些转录因子后即可诱导 MMP、TIMP 表达。NF- κ B 可跨膜激活 P53,间接诱导 MMP-2 的转录;激活的 NF- κ B 又可反馈上调 IL-6, TNF- α 等促炎因子进一步影响 MMPs 表达^[9,10]。

本实验结果表明,模型组大鼠肺组织出现出血及坏死,提示造模成功。与对照组相比,模型组大鼠肺组织中的 NF- κ B、MMP-2 蛋白及其 mRNA 表达均显著增高($P<0.01$)、TIMP-2 蛋白及其 mRNA 表

达均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示内毒素致急性肺损伤的发病机制可能与 NF- κ B、MMP-2 蛋白及其 mRNA 表达升高、TIMP-2 蛋白及其 mRNA 表达降低有关。

参考文献:

- [1] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European An Consensus Conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [J]. Crit Care Med, 1994, 149(1): 818-824.
- [2] Kao SJ, Wang D, Lin HI, et al. N-acetylcysteine abrogates acute lung injury induced by endotoxin [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(1-2): 33-40.
- [3] 林英,朱曦,和宇,等. 颈脊髓切断对内毒素血症大鼠急性肺损伤的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(10): 621-624.
- [4] Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease [J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995, 376(6): 345-355.
- [5] Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, et al. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression [J]. J Trauma, 2006, 60(1): 115-125.
- [6] Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, et al. MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma-a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization [J]. Gynecol Oncol, 1999, 73(3): 372-382.
- [7] Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases [J]. Curr Protein Pept Sci, 2002, 3(4): 409-421.
- [8] Ricou B, Nicod L, Lacraz S, et al. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(2 Pt 1): 346-352.
- [9] Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, et al. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappaB [J]. FEBS Lett, 1998, 435(1): 29-34.
- [10] Han YP, Tuan TL, Hughes M, et al. Transforming growth factor-beta- and tumor necrosis factor-alpha-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin [J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22341-22350.

修回日期)2010-08-26