

MMP-9 和 TIMP-1 在新生大鼠持续高氧暴露后肺组织中的动态表达

刘雪雁, 赵诗萌, 薛辛东[△]

(中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的:探讨基质金属蛋白酶9(MMP-9)和金属蛋白酶组织抑制剂1(TIMP-1)在高氧致慢性肺疾病(CLD)新生大鼠肺组织中的动态变化和意义。方法:足月新生大鼠生后12h分别持续吸入0.90~0.95的高氧和空气,于1,3,7,14,21d应用免疫组化和RT-PCR方法分别检测肺组织MMP-9和TIMP-1蛋白及mRNA表达。结果:MMP-9在高氧3d时蛋白和mRNA表达均较空气组增强($P < 0.05$, $P < 0.01$);TIMP-1蛋白在高氧组表达高于空气组,3d和7d比较 $P < 0.05$,14d和21d比较 $P < 0.01$;TIMP-1 mRNA水平高氧组高于空气组,3d和7d比较 $P < 0.05$,和14d比较 $P < 0.01$,和21d比较无差异。结论:高氧暴露后MMP-9和TIMP-1的表达在不同阶段的变化不一致,MMP-9/TIMP-1平衡状态遭到破坏,可能是高氧后胶原异常沉积以及正常肺泡化过程受阻的重要因素。

[关键词] 新生大鼠;高氧;肺损伤;基质金属蛋白酶9;金属蛋白酶组织抑制剂1

[中图分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)05-0502-03

Dynamic expressions of MMP-9 and TIMP-1 protein and mRNA in the lung tissue of neonatal rats after lasting hyperoxia

LIU Xue-yan, ZHAO Shi-meng, XUE Xin-dong[△]

(Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the dynamic expressions of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the lung tissue of neonatal rats with hyperoxia-induced chronic lung disease (CLD). **Methods:** Full-term newborn rats were continuously exposed to oxygen (0.90-0.95) or room air within 12 hours after birth. The changes in MMP-9 and TIMP-1 protein and mRNA expressions were measured by immunohistochemical method and reverse transcription polymerase chain reaction on days 1, 3, 7, 14, and 21. **Results:** The expressions of MMP-9 protein and mRNA on day 3 were significantly higher in hyperoxia group than in room air group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but no between-group difference was found at other time points. The expression of TIMP-1 protein on days 3 and 7 was higher in hyperoxia group than in room air group, and on days 14 and 21 it was significantly higher in hyperoxia group than in room air group. The expression of TIMP-1 mRNA on days 3 and 7 was higher in hyperoxia group than in room air group, and on days 14 it was significantly higher in hyperoxia group than in room air group. No between-group difference in the expression of TIMP-1 mRNA was found on day 21. **Conclusion:** With the prolongation of hyperoxia, the expressions of MMP-9 and TIMP-1 change inconsistently. The balance between MMP-9 and TIMP-1 is disturbed, which may play an important role in the collagen deposition in lung interstitium and the inhibition of alveolar development in CLD.

[Key words] neonatal rat; hyperoxia; lung injury; matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinase-1

长时间吸入高浓度氧会导致不同程度的肺损伤,早产儿慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)是早产儿由高氧等多因素引起的肺部远期并发症,以肺发育受阻和肺间质纤维化为主要病理改变,胶原等细胞外基质在这些病理过程中具有重要作用^[1]。本研究利用高氧致新生大鼠CLD模型,应用免疫组化、RT-PCR方法检测基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和金属蛋白酶组织抑制剂1(tissue inhibitor of MP-1, TIMP-1)蛋白和mRNA在肺组织中的表达,探讨MMP-9/TIMP-1降解系统

在高氧致新生大鼠CLD中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物 体质量约250g左右Wistar大鼠,由我院实验动物部提供。大鼠雌雄交配(4:1),以孕21~23d自然分娩的新生鼠为研究对象。

1.2 动物模型的制备^[2] 在生后12h内,每窝鼠仔依据吸入氧浓度的不同随机分组(0d):空气对照组和高氧实验组。高氧组置于氧箱(有机玻璃箱)中,持续输入氧气,氧浓度维持在0.90~0.95,每日用数字式测氧仪监测(美国OM-25ME型),用钙石灰吸收CO₂,使其浓度□0.5%,温度25~26℃,湿度60%~70%,每天开箱15min,喂水及饲料,更换垫料,与

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30440056)

[作者简介] 刘雪雁(1973-),女,副教授,博士。

[△]Corresponding Author's E-mail: xdxue@163.com

空气组互换母鼠以避免母鼠因氧中毒而致护理能力降低,高氧暴露持续 21 d;空气组置于同一室内空气(氧浓度 0.21),饲养条件与高氧组相同。

1.3 标本采集 于实验后 1,3,7,14,21 d 分别从两组中抽取 5 只,取下左肺,常规制备 4 μm 组织切片用于免疫组织化学染色;分离右肺,用冷生理盐水洗净残血,吸干水分,-80℃冷冻保存待 RT-PCR 检测。

1.4 肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的蛋白表达 应用免疫组化 SABC 法。以细胞浆中有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。MMP-9 和 TIMP-1 的兔抗大鼠 IgG、即用型 SABC 及 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物制品公司。蛋白的半定量测定:每个时间点各组选取切片 5 张,每张切片随机选取 5 个视野,固定窗口面积,利用美国 Universal Imaging Porporation 图像分析系统,应用 Meta Morph 软件测定其平均灰度值,平均灰度值越低,蛋白表达信号越强。

1.5 肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达 采用 RT-PCR 技术。(1)按 TRIZOL 总 RNA 提取试剂(美国 Promega)说明书操作。用 RNA 提取液(TRI-ZOL Reagent)从肺组织中提取总 RNA。(2)逆转录合成互补 DNA(cDNA)第一链。(3)PCR 扩增。MMP-9 引物:长度 246 bp,上游:5'-CAG GGG GAA GAT

GCT GCT GT-3', 下游:5'-CCT CAG GGC AAT GCA GGA TG-3';TIMP-1 引物:长度 285 bp,上游:5'-CTT TCC ACA GGT CCC ACAA-3', 下游:5'-CAG CCC TGG CTC CCG AGG-3'。MMP-9 扩增条件:94℃ 3 min,94℃ 45 s,60.5℃ 1 min,72℃ 1 min,28 个循环后 72℃ 7 min;TIMP-1 扩增条件:94℃ 3 min,94℃ 30 s,63℃ 1 min,72℃ 1.5 min,30 个循环后 72℃ 7 min。(4)产物分析:扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,用 Kodak 1D 型凝胶成像系统及分析系统进行电泳条带分析。目标产物 mRNA 表达水平以他们与 β-actin 的相对表达量来计算。

1.6 统计分析 所有数值均用 SPSS 10.0 统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达的动态变化

MMP-9 在空气组肺组织中的表达主要在上皮细胞胞浆中,高氧 3 d 时表达较空气组增强 ($P < 0.05$);空气组 TIMP-1 的表达主要在上皮细胞,高氧暴露后,表达在上皮细胞、间质细胞和巨噬细胞胞浆,表达强度在高氧,3 d 和 7 d 时 $P < 0.05$,14 d 和 21 d 时 $P < 0.01$ 。见表 1。

表 1 肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 平均灰度值的动态比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.1 Dynamic comparison of the average gray values of MMP-9 and TIMP-1 in lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

吸氧时间(d)	MMP-9 蛋白		TIMP-1 蛋白	
	空气组	高氧组	空气组	高氧组
1	133.70 ± 4.74	132.01 ± 5.30	128.96 ± 5.54	129.16 ± 4.38
3	130.38 ± 7.36	126.23 ± 6.95 ¹⁾	129.49 ± 4.75	126.22 ± 6.49 ¹⁾
7	124.07 ± 4.40	122.86 ± 6.77	124.99 ± 6.83	119.70 ± 7.33 ¹⁾
14	122.17 ± 5.38	120.88 ± 4.23	120.08 ± 7.77	112.35 ± 10.29 ²⁾
21	121.36 ± 4.59	119.94 ± 8.06	118.22 ± 6.32	109.19 ± 10.56 ²⁾

注:与空气组比较 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

2.2 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 表达的动态变化

MMP-9 mRNA 在 3 d 时高氧组表达明显增加($P < 0.01$),7 d 后两组无明显差异;TIMP-1 mRNA 表达

在高氧 3 d 开始增加,持续至 7 d(P 均 < 0.05)和 14 d($P < 0.01$),21 d 无差异,见表 2。

表 2 肺组织 MMP-9 和 TIMP-1mRNA 表达水平的动态比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.1 Dynamic comparison of the mRNA expressions of MMP-9 and TIMP-1 in lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

吸氧时间(d)	MMP-9 mRNA		TIMP-1 mRNA	
	空气组	高氧组	空气组	高氧组
1	0.70 ± 0.04	0.67 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.94 ± 0.03
3	0.97 ± 0.03	1.36 ± 0.01 ²⁾	0.93 ± 0.02	0.96 ± 0.02 ¹⁾
7	1.37 ± 0.03	1.34 ± 0.04	0.98 ± 0.01	1.18 ± 0.10 ¹⁾
14	1.38 ± 0.02	1.34 ± 0.04	1.17 ± 0.10	1.61 ± 0.19 ²⁾
21	1.43 ± 0.06	1.55 ± 0.10	0.96 ± 0.02	0.97 ± 0.01

注:与空气组比较 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

3 讨论

近年来,胶原等 ECM 重塑在肺纤维化形成中的作用已成为当今的研究热点。MMPs 是一组锌、钙离子依赖性的蛋白水解酶家族,主要功能是在正常的重塑和修复过程中降解基底膜和间质胶原等细胞外基质成分,其活性主要受其特异性抑制剂 TIMPs 的调节。MMPs 及 TIMPs 所调节的细胞外基质降解减少可能是肺纤维化发生的重要因素^[3]。

MMP-9 能够降解分布于基底膜和肺间质的 IV 型胶原,TIMP-1 是 MMP-9 的特异性抑制剂。DANAN 等动态检测新生儿生后 6 h、3 d 和 5 d 支气管提取液,发现 MMP-9、TIMP-1 总量增加,但与 CLD 的预后无关^[4];SWEET 等证实以后发生 CLD 的早产儿中,生后前 6 d BALF 中 MMP-9 的水平明显高于将来不患 CLD 的早产儿^[5]。我们利用动物实验发现高氧暴露早期(3 d 时),蛋白表达均开始增加,但 MMP-9 的增加幅度高于 TIMP-1,MMP-9/TIMP-1 蛋白表达增加,7 d 后降低。MMP-9 mRNA 的变化趋势与其蛋白的表达基本一致,提示 MMP-9 mRNA 决定了其蛋白的变化,而 TIMP-1 mRNA 与蛋白的表达在 21 d 时不同,提示高氧引起的 TIMP-1 转录后调节在此时起主要作用。可见,MMP-9 在高氧致 CLD 各阶段具有不同的降解能力:3 d 时 MMP-9 净含量的增加可能进一步破坏基底膜,引起更多炎性细胞的聚集和活化而加重炎性肺损伤。另外,还干扰了受损 I 型肺泡上皮细胞的正常替换,并促进成纤维细胞的迁移及间质胶原的沉积,而后两者均是纤维化发生的重要步骤^[6]。MMP-9/TIMP-1 在高氧暴露中晚期(7 d 后)的表达失衡(降低),肺组织中 IV 型胶原的降解障碍,导致其异常沉积,这可能是导致高氧 CLD 最终肺组织中胶原等细胞外基质沉积的原因之一。

MMP-9 和 TIMP-1 在正常肺泡发育过程中有许多潜在的功能^[7]。新生兔暴露 >95% O₂ 96 h 后引起 TIMP-1 mRNA 表达增加^[8],新生大鼠暴露 >95%

O₂,高氧可增加 TIMP-1 蛋白表达而致正常肺泡发育受阻^[9]。本实验中 TIMP-1 表达与以前的研究趋势相似,与肺泡分隔减少、肺泡数量减少、终末气腔扩张、肺泡壁增厚等肺发育障碍的病理特征^[2]相平行。从而推测 MMP-9 和 TIMP-1 与高氧致 CLD 肺发育障碍的发生可能也有一定关系。

综上所述,MMP-9/TIMP-1 表达失衡可能是导致细胞外基质重建紊乱从而促使肺纤维化和肺发育受阻的重要因素。

参考文献:

[1] JOBE AH, BANCALARI E. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4): 1723-1729.

[2] 刘雪雁,张慧,吴捷,等.高氧吸入后新生鼠肺组织一氧化氮及氧自由基的动态变化[J].中国现代医学杂志,2005,15(5): 680-686.

[3] 牛海艳,曾庆富.基质金属蛋白酶及其抑制剂在器官纤维化中的研究新进展[J].国外医学·生理、病理科学与临床分册,2002,22(6): 278-281.

[4] DANAN C, JARREAU PH, FRANCO ML, et al. Gelatinase activities in the airways of premature infants and development of bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(4): L1086- L 1093.

[5] SWEET DG, PIZZOTI J, WILBOURN M, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the airways of infants at risk of development chronic lung disease (CLD) [J]. Eur Respir J, 1999, 14(suppl 30): 248s.

[6] UHAL BD, JOSHI I, MUNDLE S, et al. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro [J]. Am J Physiol, 1995, 269(1): L819- L828.

[7] VU TH, WERB Z. Matrix metalloproteinase: effectors of development and normal physiology[J]. Genes Dev, 2000, 14(2): 2123-2133.

[8] HOROWITZ S, SHAPIRO DL, FINKELSTEIN JN, et al. Changes in gene expression in hyperoxia-induced neonatal lung injury [J]. Am J Physiol, 1990, 258(2 Pt 1): L107-L111.

[9] HOSFORD GE, FANG X, OLSON DM. Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization[J]. Pediatr Res, 2004, 56(1): 26-34.

[收稿日期] 2006-12-29

(上接第 501 页)

seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotropic factors in the brain of pilocarpine-treated mice [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 139(2): 258-266.

[4] FALK A, FRISEN J. Amphiregulin is a mitogen for adult neural stem cells [J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6): 757-762.

[5] NORMANNO N, BIANCO C, DE LUCA A et al. The role of EGF-related peptides in tumor growth [J]. Front Biosci, 2001, 6(1): 685-707.

[6] JIN K, MAO XO, SUN Y, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo [J]. J Neurosci, 2002, 22(13): 5365-5373.

[7] KORNBLUM HI, ZURCHER SD, WERB Z, et al. Multiple trophic actions of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in the central nervous system [J]. Eur J Neurosci, 1999, 11(9): 3236-3246.

[收稿日期] 2007-04-03