基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0689-03

红景天对肺纤维化大鼠 MMP-2 与 TIMP-1 表达关系的影响

王媛媛[1],王 庆[1],杨文海[2]
(1.辽宁医学院附属第一医院呼吸内科;2.辽宁医学院附属第三医院神经内科,锦州 121000)

【摘 要】目的:观察红景天干预肺纤维化形成的作用,初步探讨其作用机制。方法:SD 大鼠 45 只,随机分为 3 组,模型组和干预组气管内注射博莱霉素诱导肺纤维化,空白组在相同条件下给予生理盐水。第 2 d 起干预组均给予红景天灌胃,其余各组在相同条件下给予生理盐水。治疗第 7 d、第 14 d 和第 28 d,用免疫组织化学方法观察各组鼠肺组织中基质金属蛋白酶 -2(Matrix metallipro teinase-2,MMP-2)和金属蛋白酶组织抑制剂 -1(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)表达的变化。结果:对照组各视野仅见少量 MMP-2、TIMP-1 阳性细胞,模型组在 7 d、14 d、28 d 阳性细胞明显增多,治疗组与模型组对应时间点相比阳性细胞数均有减少($P<0.01$),但仍比对照组增多($P<0.01$),差异有统计学意义。结论:红景天能抑制博莱霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织的 MMP-2、TIMP-1 的合成及分泌,能在一定程度上调整 MMP-2 和 TIMP-1 的比值使其趋于平衡,可减轻博莱霉素所致大鼠的肺纤维化。

【关键词】红景天;肺纤维化;基质金属蛋白酶 -2;组织金属蛋白酶抑制剂 -1;细胞外基质
【中国图书分类法分类号】R563.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-24

Effect of integr ipetal rhodiola herb on the expression of MMP-2 and TIMP-1 in rats with pulmonary fibrosis

WANG Yuan-yuan, et al
(*Department of Respiratory, the First Affliated Hospital, Liaoning Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of IRH on pulmonary fibrosis and its intervention mechanism. *Methods*: 45 sprague-dawley rats were randomly divided into three groups. The model group and the intervention group were received endotracheal injection of bleomycln to induce pulmonary fibrosis, while the control group were received endotracheal injection of saline. From the second day the intervention group IRH were injected to the stomach, while the other two groups were injected saline instead. On the 7th day, 14th day and 28th day the lungs were isolated. The expression of MMP-2 and TIMP-1 was detected by immunohistochemical method respectively. *Results*: There was only a very weak expression of MMP-2 and TIMP-1 in the control group, there was significantly higher level in model group compared with control group on the 7th day, 14th day and 28th day. The IRH group was significantly lower than the model group with the same time points , though it was also obviously higher than the control group all over the period ($P<0.01$). the difference has statistical significance. *Conclusion*: IRH may inhibit the expression of MMP-2 and TIMP-1 in the lung tissue of rat with pulmonary fibrosis, contributed to the regulation of MMP-2 and TIMP-1 balance to some extent, could alleviate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.

【Key word】Integripetal rhodiola herb; Pulmonary fibrosis; Matrix metallipro teinase-2(MMP-2); Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1); Extracellular matrix(ECM)

肺纤维化是多种原因引起的弥慢性肺间质疾病共同的最终结局,也是肺组织对损伤的一种病理修复过程,其发病率在全球仍呈上升趋势。目前尚缺乏有效的治疗方法,常用糖皮质激素具有一定抗炎作用,但疗效有限,因而寻找新的抗纤维化药物显得尤为重要。有研究证明,红景天对治疗肺损伤[1]和防治器官纤维化均有一定作用[2],但对肺纤维化治疗方面的研究报道不多。本实验通过用博莱霉素建立肺纤维化模型,用免疫组化方法观察肺组织中基质金属蛋白酶 -2 (Martix metrallolroteinase-2,MMP-2)及其抑制剂(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)的变化,以了解红景天对肺纤维化的干预作用。

作者介绍:王媛媛(1980-),女,硕士,
研究方向:肺纤维化。
通讯作者:王 庆,男,教授,E-mail:wangyuanyuan803@163.com。

1　材料与方法

1.1　实验材料

健康 SD 大鼠 45 只（由辽宁医学院实验动物中心提供，雌雄各半，体重 250～300 g）随机分为 3 组：空白对照组 15 只；BLM 模型组 15 只；红景天干预组 15 只。经乙醚麻醉后，固定于手术台上，无菌操作下切开大鼠颈前皮肤，钝性分离气管，模型组和干预组经气管一次性灌入博莱霉素 5 mg/kg（日本化药株式会社），对照组大鼠经气管内一次性灌入同等体积的生理盐水，立即将大鼠直立并左右旋转使药物均匀灌入双肺，缝合皮肤。造模后各组大鼠分笼饲养，正常喂食，自由饮水。造模第 2 d 始干预组给予红景天（西藏诺迪康药业股份有限公司）0.21 g/kg 灌胃，空白组和模型组用同等体积生理盐水灌胃，用药第 7 d、第 14 d、第 28 d 分批将大鼠做相应处理后，检测各项相关指标。

1.2　标本采集

大鼠放血处死后打开胸腔取出肺脏，结扎右侧主支气管，向气管内灌注 4%多聚甲醛，直至左肺膨胀边缘变锐，胸膜展平，结扎左侧主支气管，立即置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h，取左侧肺常规石蜡包埋、5 μm 连续切片（日本产 LKB-V 超薄切片机），制作光镜标本及免疫组化染色。

1.3　HE 染色具体步骤

将切片置于二甲苯Ⅰ、Ⅱ，各浸泡 15 min 脱蜡，100%无水酒精Ⅰ浸泡 15 min，100%无水酒精Ⅱ浸泡 15 min，95%酒精浸泡 10 min，90%酒精浸泡 10 min，80%酒精浸泡 5 min，70%酒精浸泡 5 min，自来水冲洗 3 次，每次 5 min，苏木精染色 5 min，自来水冲洗片刻，盐酸酒精分化 5 s，自来水冲洗片刻，伊红染色 2 min，自来水冲洗片刻，酒精梯度脱水：70%酒精 30 s，80%酒精 1 min，90%酒精 5 min，95%酒精 10 min，100%无水酒精Ⅰ、Ⅱ各浸泡 20 min，切片置二甲苯Ⅰ、Ⅱ中各浸泡 20 min 透明，中性树胶封片，晾干。观察肺组织病理学改变。

1.4　免疫组织化学染色

按照 SAC 试剂盒（武汉博士德）说明操作，其中第一抗体分别为鼠抗鼠 MMP-2 单克隆抗体（效价 1:80，NEO Markers 公司）和兔抗鼠 TIMP-1 多克隆抗体（效价 1:50，武汉博士德公司），加入辣根过氧化酶一链霉素蛋白后，用二氨基联苯胺（DAB）/H_2O_2 显色；常规脱水、透明、中性树脂封固。同时以 PBS 代替第一抗体，设立阴性对照实验。阳性表达为胞质内呈棕黄色颗粒改变。结果分析：切片用 CIAS-1000 型图像分析仪分析，检测不同观察时段各组肺组织 MMP-2、TIMP-1 表达的变化。

1.5　统计学处理

统计资料采用 SPSS15.0 统计软件单因素方差分析，实验数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，$P \leqslant 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　大体观察

对照组双肺外观无异常，表面光滑、饱满、呈粉红色，弹性良好。模型组早期可见肺水肿明显，体积增大，双肺呈暗红色，满布散在出血点或出血灶；后期双肺呈灰白色泽，肺体积缩小，肺表面略有不平，偶有大小不等的灰白色结节，硬度增加，弹性降低。红景天治疗组早期只有少数肺叶呈暗红色，边缘偶有点状出血点；后期部分肺叶体积缩小，硬度略有增加，弹性降低，但较模型组减轻。

2.2　光镜观察

对照组大鼠各观察点均无明显病变，支气管、肺泡及肺泡间隔组织结构正常，无充血、水肿及急慢性炎症等改变。模型组早期可见肺野内多量炎性细胞，以淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞为主，可见少量成纤维细胞，肺组织细胞水肿明显；后期时肺泡腔明显缩小，肺部炎性细胞浸润情况较前有所减轻，双肺广泛纤维化。治疗组早期可见炎症细胞浸润，但肺泡炎程度同模型组比较有明显的减轻，肺组织细胞水肿不明显；后期纤维化病理改变也较模型组明显减轻，但同空白组比较仍较严重。

2.3　MMP-2 检测

正常肺组织中，血管内皮细胞、部分支气管上皮细胞胞质内 MMP-2 呈极弱阳性，博莱霉素作用后第 7 d 病灶处上述各种细胞阳性着色均较空白组强，其中以肺间质内间质细胞及肺泡间隔和肺泡腔内的巨嗜细胞阳性表达尤为明显，第 14 d 时上述细胞阳性表达较 7 d 时略高，第 28 d 时，各种阳性表达仍较高，但已较第 7 d 逐渐减弱。红景天干预的大鼠肺组织第 7 d、第 14 d 及第 28 d 细胞阳性表达均较空白组高，但与模型组相比，着色减弱，尤以第 14 d 减弱较明显（表 1）。

2.4　TIMP-1 检测

正常肺组织 TIMP-1 在肺泡及间质巨噬细胞、肺泡上皮、支气管上皮细胞、成纤维细胞及胶原染色均较浅。博莱霉素作用第 7 d 后，上述部位细胞染色有所增强，第 14 d 和第 28 d 时增强较第 7 d 更为显著。红景天干预组各个时段的表达均较空白组增高，但均较模型组低（表 2）。

表 1　红景天对肺间质纤维化大鼠 MMP-2 表达的影响（n=5，$\bar{x} \pm s$）

组别	7 d	14 d	28 d
空白组	6.38 ± 1.07	6.09 ± 1.11	6.33 ± 1.06
模型组	46.65 ± 1.19△	52.72 ± 2.31△	31.98 ± 1.32△
干预组	33.02 ± 2.30*	31.72 ± 2.18*	24.05 ± 2.10*

注：与空白组比较，△P<0.01；与模型组比较，*P<0.01

表 2 红景天对肺间质纤维化大鼠 TIMP-1 表达的影响(n=5,$\bar{x} \pm s$)

组 别	7 d	14 d	28 d
空白组	4.24 ± 0.76	4.06 ± 0.74	4.22 ± 0.71
模型组	29.02 ± 1.68$^{\triangle}$	30.98 ± 1.24$^{\triangle}$	31.98 ± 2.32$^{\triangle}$
干预组	23.02 ± 2.30$^{\triangle *}$	22.72 ± 2.18$^{\triangle *}$	21..05 ± 2.10$^{\triangle *}$

注:与空白组比较,$^{\triangle}P$<0.01;与模型组比较,$^{*}P$<0.05

3 讨 论

本实验模型大体观察及病理学改变均与文献报道[3]早期时以肺泡炎症为主、后期 4 周左右时主要表现为纤维化相一致,说明本实验模型制作成功。

肺纤维化是由多种病因引起的肺泡间质性炎症和以成纤维细胞增殖及大量细胞外基质(Extracella lar matrix,ECM)聚集为特征的疾病。其病理特点是长期慢性肺部炎症及肺泡持续性损伤,是 ECM 反复破坏、修复、重构和胶原过度沉积的动态病理过程[4],其中 ECM 代谢失衡在肺纤维化的发生中具有重要作用[5]。而在中医学角度将本病归为"肺痿"、"喘症"等范畴,认为虚、痰、瘀为其主要病机特点,其中肺阴不足、痰阻肺络、瘀血阻滞、内闭喘脱又为临床多见的病变类型。

MMPs 是一组结构与功能同源的锌离子依赖性蛋白酶超基因家族,能特异性地降解 ECM,并可以被 TIMPs 特异性抑制。生理状态下,ECM 处于不断产生和不断降解的动态平衡中,MMPs/TIMPs 是影响 ECM 降解的最主要的一组酶系[4]。研究证实,MMP-2 与 TIMP-1 的比例失衡是肺纤维化发生及发展的关键。在博莱霉素诱导的肺纤维化过程中,MMPs 家族中表达增强最早的就是 MMP-2,用药后 24 h,其表达即提高 2 ~ 3 倍[6],王海涛等[7]在试验中证实肺纤维化早期 MMP-2 表达增强,而后期表达逐渐下降。谭善忠等[8]也发现博莱霉素诱导的肺纤维化炎症期,MMP-2 的活性增高,TIMP-1 表达缓慢增加,MMP-2/TIMP-1 比例增加,ECM 降解作用增强,造成肺组织的损伤,触发肺纤维化。在后期即纤维化阶段 MMP-2/TIMP-1 比例下降,其降解作用减弱,基质沉积增加,形成肺纤维化。

中药红景天属于景天科植物,具有清热利尿、凉血活血、固本扶正的功用,在藏族高原地区用于胸闷、气短和乏力的治疗。红景天主要含有红景天甙、酪醇和多种黄酮等成分,能增加清除体内自由基,减轻血管内皮损伤,改善血粘度。已有研究证明,红景天对防治器官纤维化有一定作用[2]。但目前,红景天多用于治疗高原低氧性疾病、心肌缺血等,对肺纤维化方面的基础及临床研究很少。

本实验显示,大鼠 MMP-2 免疫组化发现:对照组 7 d 时阳性表达仅为 6.38 ± 1.07,而模型组却高达 46.65 ± 1.19,14 天时为 52.72 ± 2.31,28 d 时为 31.98 ± 1.32,这一变化表明 MMP-2 在 BLM 致纤维化模型的过程中早期表达明显增高,到后期则呈逐渐下降的趋势,说明 7 d 时 MMP-2 对 ECM 的降解作用已显著增强。但由于此时 TIMP-1 的表达也由对照组的 4.24 ± 0.76 增高到 29.02 ± 1.68,故 MMP-2/TIMP-1 的值相对失衡较小,所以在此时期,肺组织表现为炎症的损伤,而没有表现出 ECM 的积聚,这一结果又与本实验的病理所见相一致。而后期 TIMP-1 的表达则呈缓慢上升趋势,故在模型组的后期,MMP-2/TIMP-1 的比例下降,导致代谢失衡,致使 ECM 过度沉积,形成纤维化。本实验结果与文献报道相一致[9]。而红景天组在这几个时期均较模型组有所减轻,且均有统计学意义。实验结果表明,红景天药物干预的早期抑制了 MMP-2 的合成与活化,而后期则主要抑制 TIMP-1 在肺内的异常高表达,直接减轻了 TIMP-1 对 MMPs 的抑制,相对提高 MMPs 的活性,使纤维化期 MMPs/TIMPs 的失衡得以恢复,间接起到促进沉积的 ECM 降解作用。

本实验结果表明,红景天对博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化具有一定的干预作用,其干预机制可能是通过调整MMP-2 和 TIMP-1 比值使其趋于平衡,延缓甚至抑制纤维化的进程,对于红景天能否对人肺纤维化起到有效的治疗作用,还需要进一步的研究探讨。

参 考 文 献

[1] 张智猷,茹永新,郭德安.红景天对博莱霉素致大鼠肺损伤治疗作用的研究[J].中国中西医结合影像学杂志,2006,4(2):88-91.

[2] 吴晓玲,曾维政,蒋明德,等.红景天甙对肝纤维化大鼠 Samds 基因表达的影响[J].第四军医大学学报,2005,26(10): 64-67.

[3] Taooka Y,Maeda A,Hiyama K,et al.Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J].Am J Respir Crit Care Med,1997,156(1):260-265.

[4] 陈 萍,王小君,杨 方.基质金属蛋白酶及其抑制剂与肺纤维化[J].中国煤炭工业医学杂志,2007,10(10):1131- 1132.

[5] Cook D N,Brass D ,Schwartz D A.A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis[J].Am J Respir Cell Mol Boil,2002,27(2):122-124.

[6] 张 农,卢韶华,张秀荣,等.大鼠肺纤维化模型间质成纤维细胞和肺泡巨噬细胞基质金属蛋白酶 2 及膜型基质金属蛋白酶 mRNA 的表达[J].中华结核与呼吸杂志,2005,24(9):527.

[7] 王海涛,阚 泉,高俊玲,等.矽肺纤维化模型大鼠肺组织基质金属蛋白酶 -2 和基质金属蛋白酶 -9 的动态表达[J].华北煤炭医学院学报,2005,7(6):693.

[8] 谭善忠,刘成海,张 炜,等.MMP-2/9 活性与 TIMP-1/2 蛋白表达在大鼠肺纤维化形成中的变化特点[J].中西医结合学报,2006,4(4):402.

[9] 彭 清,辛建保,苏良平,等.黄芪对肺纤维化大鼠 MMP-2 和 TIMP-1 表达的影响[J].华中科技大学学报,2007,36(1):35-37.

(责任编辑:冉明会)