维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0352-03

高氧致肺损伤大鼠 TGF-β1 和 MMPs 基因表达的变化

党 润,许 峰,匡凤梧,卢仲毅,王兴勇

(重庆医科大学儿童医院 PICU,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨 TGF-β1 和 MMPs 的基因表达在高氧性肺损伤中的动态变化。方法:幼年 Wistar 大鼠 32 只随机分为空气对照组和高氧组(3 天组、7 天组、14 天组),每组 8 只,高氧组持续吸入高浓度氧(O_2>95%),用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcript polymerse chain reaction,RT-PCR)对不同高氧暴露时间大鼠肺组织中 TGF-β1、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达情况进行动态观察,并对支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量、肺通透系数,肺湿/干重比及肺组织病理变化进行检测。结果:高氧组 TGF-β1 的 mRNA 水平从第 3 天开始升高,随暴露时间延长逐渐上升,到第 14 天仍持续不降;MMP-2、MMP-9mRNA 水平从第 3 天也明显增加,第 7 天达高峰,但 14 天已开始下降。与之相应的肺组织病理改变为早期的急性肺泡炎和后期纤维化改变。结论:高氧致肺损伤后 TGF-β1/MMPs 的失衡可能是高氧性肺损伤肺纤维化发生的重要原因。

【关键词】转化生长因子 β;基质金属蛋白酶;高氧

【中国图书分类法分类号】R720.597 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-06-15

Expression change of TGF-β1 and MMPs in rats with hyperoxia-induced lung injury

DANG Run,et al

(*Depentment of PICU,Children's Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the dynamic gene expression of TGF-β1 and MMPsmRNA in pup rats with hyperoxia-induced lung injury.*Methods*:Thirty-two Wistar rats about two weeks were randomly divided into room-air group and hyperoxia groups(3-day group,7-day group and 14-day group),with 8 rats in each group.After continuous exposure to high concentration oxygen(O_2>95%),the dynamic expressions of TGF-β1,MMP-2 and MMP-9mRNA in lung for each hyperoxia group were measured by reverse transcript polymerse chain reaction (RT-PCR).The protein content in bronchoalveolar lavage fluid(BALF),permeability index,lung wet/dry weight ratio and pathological changes of lung tissues were all tested.*Results*:The level of TGF-β1mRNA in hyperoxia group increased from the 3rd day,and rose gradually until the 14th day.The expressions of MMP-2 and MMP-9 mRNA increased markedly from the 3rd day,rose to the peak at the 7th day,and decreased at the 14th day.The above changes accompanied with lung pathological manifestations,which included acute alveolitis during the earlier period and lung fibrosis during later period.*Conclusions*:The unbalance between TGF-β1 and MMPs may play an important role in the development of lung fibrosis caused by hyperoxia-induced lung injury.

【Key words】TGF-β1;MMPs;Hyperoxia

TGF-β1 作为重要的生长调节因子,在组织的发生、发育及损伤后修复的过程中扮演重要角色,它具有促进细胞外基质(ECM)聚集和成纤维细胞增生的作用[1];而基质金属蛋白酶(MMPs)作为一种 ECM 降解的主要介质,在纤维化疾病中的作用也不容忽视[2]。为了探讨 TGF-β1 和 MMPs 参与高氧性肺损伤的发病机制,本文采用高氧肺损伤幼鼠模型,对肺组织内 TGF-β1、MMP-2、MMP-9 的 mRNA 表达情况进行动态观察。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备

动物模型的制备按参考文献[3]介绍的方法进行并稍加改良,取二周大小的幼年 Wistar 大鼠 32 只(由重庆医科大学动物实验中心提供),随机分为空气对照组(8 只)和高氧暴露 3、7、14 天组(每组各 8 只)。高氧组置于有机玻璃氧仓中,持续输入氧气(2L/min),并连续行氧和二氧化碳浓度监测,保

作者介绍:党 润(1977-),女,硕士生,
主要研究方向:儿科急救。

基金项目:重庆市卫生局科研基金(基金号:渝卫教科 03-2-040)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

证氧浓度≥90%、CO_2 浓度≤5%(数字测氧仪 CY100 型,杭州立华仪器有限公司,西门子 700 型监测仪);空气对照组置于室内空气中(氧浓度=21%)。两组环境温度 21℃~25℃,湿度 60%~70%,并于每天上午 9 时开箱 10min,添加饲料及饮水。

1.2 检测方法

1.2.1 标本收集 空气组和高氧组动物经腹腔注射 10%乌拉坦 10ml/kg 麻醉,腹主动脉穿刺取血约 1ml 后,放血处死(血标本行血浆蛋白含量的测定)。开胸结扎右主支气管,取右上肺 4%甲醛固定,24h 后石蜡包埋,5μm 切片,HE 染色,光镜下检查肺组织病变;取右中肺置于-70℃冰箱保存待查;取右下肺,轻轻擦干表面,立即称重记肺湿重,然后置于 60℃烤箱内,48h 后称重记为肺干重,计算湿/干重比值(W/D);气管插管,向左肺注射 1.0ml 冷生理盐水至出现阻力,然后回抽,连续 3 次,80%~90%回收,将 3 次收集的肺泡灌洗液于 4000r/min 离心 10min,取上清液测蛋白(Lowry 法),计算肺通透系数(BALF 蛋白含量/血浆蛋白含量)。

1.2.2RT-PCR 检测 TGF-β1,MMP-2 和 MMP-9mRNA 的表达 取-70℃保存的肺组织,剪取 100mg 加 1mlRNA 提取液 Tripure 进行匀浆,氯仿沉淀 DNA 和蛋白质后取上清,加异丙醇沉淀 RNA,75%乙醇洗涤后加相应的 DEPC 水进行溶解。引物序列 TGF-β1:正义链 5-CTACTGCTTCAGCTCCACAG-3,反义链:5-AGCGCACGATCATGTTGGAC-3,产物长度 308bp;MMP-2 正义链:5-CACCATCGCCCAT CATCAAGT-3,反义链 5-TGGATTCGAGAAAAGCGCAGCGG-3,产物长度 400bp;MMP-9 正义链:5-GCAGGAGAGGAAGCTGAGTC-3,反义链 5-TCATGGTGAGAACCGAAGC-3,产物长度 540bp;GAPDH 正义链 5-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3,反义链 5-TCC-CACCACCCTGTTGC TGTA-3,产物长度 450bp(购自上海生物工程有限公司)。RT-PCR 所需试剂购自美国 Promega 公司。扩增条件为:94℃预变性 3min,然后 93℃ 40s,62℃ 40s,72℃ 1min,36 个循环后 72℃延伸 5min。扩增产物于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像分析系统下扫描分析,目的基因的相对含量用 TGF-β1 及 MMPS 与 GAPDH 吸光度×面积的比值表示。

1.3 统计学方法

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)、统计学处理采用 SPSS V10.0 统计软件包完成,$P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 肺损伤病理改变

见图 1。与空气组比较,高氧暴露组 3 天时肺泡上皮细胞肿胀,肺泡腔内大量渗出液,间质充血、水肿,炎性细胞明显增多,但肺泡结构尚完整;7 天时高氧组肺泡壁增厚,可见 2~3 层细胞,间质水肿更加明显;14 天时肺组织结构紊乱,间质成纤维细胞增生明显,表现为肺泡融合,数目减少。

2.2 W/D 、BALF 中蛋白含量和肺通透系数变化

与空气组相比,高氧组 3 天可见肺 W/D 增高,但无显著差异;7 天后,肺 W/D 明显增高($P<0.05$);14 天后,肺水肿稍减轻,但仍明显高于正常($P<0.05$)。BALF 中的蛋白含量、肺通透系数明显增加($P<0.05$),且随着氧暴露时间的延长,呈逐渐上升趋势(表 1)。

表 1 肺湿/干重(W/D)、BALF 蛋白含量和肺通透系数变化

组别	例数	肺 W/D	BALF 总蛋白(mg/ml)	肺通透系数
空气组	8	4.92 ± 0.38	0.18 ± 0.08	2.99 ± 1.27
高氧 3 天组	8	5.19 ± 0.19	0.45 ± 0.10*	6.61 ± 2.05*
高氧 7 天组	8	5.60 ± 0.25*#	0.66 ± 0.08*#	10.88 ± 1.54*#
高氧 14 天组	8	5.46 ± 0.30*#	0.79 ± 0.14*#	12.75 ± 2.20*#

注:*示与空气组相比,$P<0.05$;#示与 3 天组相比,$P<0.05$

1.3 肺组织 TGFβ1、MMP-2、MMP-9mRNA 表达的变化

与空气组比较,高氧组肺组织中 TGF-β1 从第 3 天就开始升高,并随暴露时间快速上升,到第 14 天仍持续不降。而高氧暴露肺组织中 MMP-2、MMP-9mRNA 的表达 3 天可见明显增加,7 天最为显著,14 天后开始下降(表 2)。

表 2 正常及高氧暴露后肺组织 TGF-β、MMP-2、MMP-9mRNA 表达的动态变化

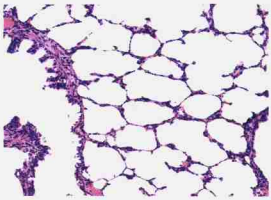
组别	例数	TGF-β1	MMP-2	MMP-9
空气组	8	0.577 ± 0.169	0.242 ± 0.064	0.283 ± 0.063
高氧 3 天组	8	0.776 ± 0.240*	0.553 ± 0.072*	0.523 ± 0.098*
高氧 7 天组	8	0.968 ± 0.272*#	0.789 ± 0.085*#	0.698 ± 0.104*#
高氧 14 天组	8	1.159 ± 0.114*#	0.719 ± 0.067*#	0.686 ± 0.084*#

注:*表示与空气组比较 $P<0.05$,#表示与 3 天组比较 $P<0.05$

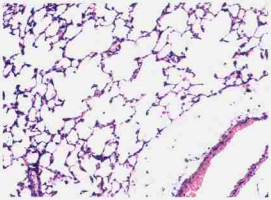
3 讨 论

细胞外基质(ECM)在维持正常组织结构与功能及细胞生长、分化过程中起着非常重要的作用,它处于不断的代谢更新和降解重塑的动态平衡中,一旦这种平衡被打破,ECM 在间质中聚集增多,就会引起组织纤维变性[4,5]。TGF-β1 是一种重要的生长调节因子,近年的研究发现它有促进 ECM 沉积和成纤维细胞增生的促纤维化作用[6,7]。基质金属蛋白酶(MMPs)是一类以 ECM 成分为水解底物的蛋白水解酶,在组织重建与修复、炎症反应、胚胎发育等过程中发挥重要作用。在博来霉素所致的肺纤维化模型中,MMPs 在早期炎症阶段增高,随着向纤维化进展,逐渐降低,至后期恢复接近基础水平,而

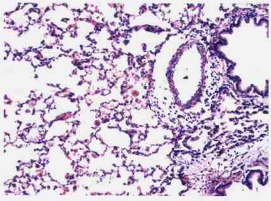
维普资讯 http://www.cqvip.com



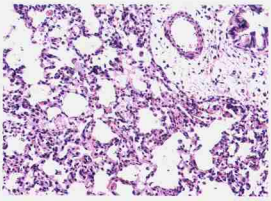
正常对照组



高氧 3 天组



高氧 7 天组



高氧 14 天组

图 1 肺损伤病理改变

TGF-β1 在整个过程中持续上升，到后期仍无下降趋势，TGF-β1/MMPs 的比例失衡导致 ECM 的代谢平衡向合成方向偏移，于是 ECM 的大量合成及沉积，促进了肺纤维化的发生[8]。

本研究显示，MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 在高氧暴露早期就开始明显升高，第 7 天达到高峰，第 14 天开始下降，它们的过度表达造成肺泡上皮细胞基底膜的破坏、炎性细胞入侵，加重早期的肺泡炎症反应，为后期的不恰当修复奠定基础；TGF-β1 的 mRNA 水平随高氧暴露时间的延长持续上升，至 14 天仍未下降，其作用主要表现在高氧暴露后期促进 ECM 的沉积和成纤维细胞的增生修复，对肺纤维化的发生起着积极的推动作用。TGF-β1 和 MMPs 在高氧性肺损伤中的动态变化表明两者的失衡是高氧肺损伤致肺纤维化发生的重要基础[9,10]。

（通讯作者：许 峰，xufeng9899@yahoo.com.cn）

参 考 文 献

[1] Oliver E, Andrens P, Rainer M, et al. Transforming growth factor-β1 induces Interleukin-6 expression via Activating protein-1 consisting of Jund homodimers in primary human lung fibroblast[J]. J Biol Chem, 1999; 274(18): 12933-12938.

[2] Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implication[J]. J Clin Oncol, 2000; 18(5): 1135-1149.

[3] F Xu, T F Fok, Yine J. Hyperoxia-induced lung injury in premature rat: description of a suitable model for the study of lung disease in newborns[J]. Chin Med J, 1998; 111: 619-624.

[4] Swiderski RE, Dencoff JE, Floechinger CS, et al. Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Pathol, 1998; 152(3): 821-828.

[5] Li YY, McTieman CF, Felsman AM, et al. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling[J]. Cardiovascular Res, 2000; 46(2): 214-224.

[6] Jardine H, MacNee W, Donaldson K. Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1[J]. J Biol Chem, 2002; 277(24): 21158-21166.

（下转第 383 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5 DiaSys 法和 Fast Read 法尿沉渣检查的结果比较

方法	高				中				低			
	n	x(个 μl)	t	P	n	x(个 μl)	t	P	n	x(个 μl)	t	P
DiaSys	50	5515	0.68	>0.05	50	299	1.36	>0.05	50	43.2	0.30	>0.05
Fast Read	50	5499	-	-	50	292	-	-	50	43.0	-	-

3 讨 论

尿沉渣显微镜检查是直接鉴别尿中有形成分的不可缺少的检查方法[4]。优质的尿沉渣镜检结果来自规范化操作。DiaSys(R/S 2003)尿沉渣定量分析工作站具有操作规范，计数结果以细胞数/μl 形式定量报告，还可把尿液干化学检查结果、镜检结果(包括数字和图象)贮存于计算机内，便于查询并打印出完整的尿液分析报告等特点，其[1]符合卫生部"尿液沉渣检查标准化的建议"的要求。

通过对 DiaSys(R/S 2003)尿沉渣定量分析工作站法的细胞沉淀时间观察得知，尿液中的白细胞、红细胞需在静置 4min 后才能完全沉淀，此时计数对实验结果基本无影响。DiaSys(R/S 2003)尿沉渣定量工作站法的计数范围分析实验表明：在尿液标本细胞含量低于 30 个/μl 时，必须扩大计数范围才能得到较准确的检测结果；对高、中细胞浓度的尿液标本计数 1 个小格即可得到较准确的结果，在对尿液标本进行标准化的常规检测的同时也缩短了计数时间，提高了尿沉渣镜检的质量。

DiaSys(R/S 2003)尿沉渣定量分析仪的流动计数室厚度为 0.178mm，高度为 0.127mm，其计数格精密度高(共 100 个小格，容积为 1μl)。该仪器可通过微电脑控制，每次定量吸取尿沉渣 200μl，尿沉渣分布均匀，故具有标准定量的特点；该仪器流动计数室内光洁平整，使得细胞分布均匀，由重复性实验的结果可看出，具有较好的精密度(CV<4%)；该仪器进样、冲洗的自动操作是在全封闭的环境下进行，避免了尿样可能对操作人员和显微镜工作台的污染，提供了安全洁净的工作环境。故 DiaSys(R/S 2003)尿沉渣定量分析工作站是尿沉渣标准化检查较为理想的仪器[5]。

通过对 DiaSys(R/S 2003)尿沉渣定量分析工作站的使用，发现了它的一些不足：①前期操作仍然较为复杂、耗时，不适于大量临床标本的检查。②当尿液标本中细胞含量较多时需用仪器进行自动稀释，但多次稀释会引入误差，造成计数不准确。但总体上说，我们认为 DiaSys(R/S 2003)尿沉渣定量分析工作站能比较满意地完成尿沉渣分析。

参 考 文 献

[1] 李小龙，郭仁勇，陈晓东. Diasys(R/S 2003)尿沉渣测定方法的参考值确定[J].临床检验杂志，2003；21(1)：46-47.

[2] 叶应妩，王毓三，主编. 全国临床检验操作规程[M].第 2 版，南京：东南大学出版社，1997.133-135.

[3] 程大林，蒋拥军，包建芳.Fast Read$_{102}$ 板法实验条件探讨[J].陕西医学检验，1999；14(2)：51-52.

[4] 顾可梁.尿沉渣检查的新进展[J].临床检验杂志，2004；22(5)：395.

[5] 许建邦.尿液分析标准化[J].医学检验进修杂志，2001；8(1)：9-12.

(上接第 354 页)

[7] Eickelberg O,Pansky A,Koehler E,et al.Molecular mechanisms of TGF-(beta)antagonism by interferon(gamma) and cyclosporine A in lung fibroblasts[J].FASEB-J,2001；15(3)：797-806.

[8] Collier IE,Wilhem SM,Eisen AZ.H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading membrane collagen [J].J Biol Chem, 1988；263：6579-6587.

[9] Eickelberg O,Kohler E,Reichenberger F.Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3[J].Am J Physiol,1999；276(5pt1)：814-824.

[10] Toti P,Buonocore G,Tanganelli P.Bronchopulmonary dysplasia of the premature baby:an immunohistochemical study [J].Pediatr Pulmonol,1997；24(1)：22-28.