维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)06-0730-04

MMP-13 与 TIMP-1 表达变化及其在 COPD 大鼠肺结构改建中的作用

陈 涛,吴亚梅

(重庆医科大学临床学院肺科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察胶原酶 MMP-13 及其抑制因子 TIMP-1 在 COPD 大鼠模型肺的表达情况,探讨它们在 COPD 发病中的作用。方法:将 10 周龄 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组,通过气道内注入 LPS 接合烟熏 32 天的方法建立 COPD 大鼠模型,测定肺功能后,取肺组织石蜡切片 HE 染色观察肺组织病理改变,半定量 RT-PCR 检测肺组织 MMP-13 和 TIMP-1mRNA 的表达情况。结果:1、同对照组比较,模型组大鼠肺表现类似于人的 COPD 病理学改变和肺功能改变。2、半定量 RT-PCR 检测肺组织中 MMP-13、TIMP-1mRNA,发现模型组均较对照组升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。结论:COPD 大鼠支气管和肺组织表达 MMP-13 和 TIMP-1mRNA 增多,二者间表达不平衡,参与了 COPD 肺结构改变的过程。

【关键词】慢性阻塞性肺疾病;大鼠;胶原酶;TIMP-1;动物模型;重塑

【中国图书分类法分类号】R562.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-03-10

Study on the effct of MMP-13 and its tissue inhibitors, metalloproteinase-1 on the rat of COPD model

CHEN Tao, et al

(*Department of Pulmonary Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of the collagenases MMP-13 and its inhibitor, tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the rat lung of the experimental models of COPD. *Methods*: Male Wistar rats (10 weeks of age) were divided into two groups—model and control groups. The rat of model group were given intratracheal lipopolysaccharide (LPS), and then animals were exposed to cigarette smoke for 32 days. The lung function was measured, and pathological changes were also observed. Transcriptional levels of MMP-13 and TIMP-1 mRNA extracted from the lungs were assessed by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Results*: (1) In COPD model group, the pathological changes of bronchi and lung tissue, the changes of lung function were similar to those of the COPD patients. (2) The mRNA expression of MMP-13 and TIMP-1 in COPD model group were significantly increased compared with those in control group ($P<0.01$ or $P<0.001$). *Conclusion*: COPD is characterized by chronic obstruction of expiratory flow affection peripheral airways, associated with chronic bronchitis and emphysema, together with fibrosis and tissue damage, and inflammation of the small airways. MMP-13 and TIMP-1 might play important roles in chronic airway inflammation and remodeling of COPD. They may contribute to the process of pathogenesis, and development of COPD.

【Key words】Chronic obstructive pulmonary disease; Rat; Collagenases; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Remodel

关于慢性阻塞性肺疾病(COPD)的发病机制学说众多,现普遍认为蛋白酶—抗蛋白酶系统失衡在其中起重要作用。细胞外基质(Extral cellear memberma,ECM)是维持组织和器官结构的基础[1],肺内 ECM 的降解和沉积失衡是导致气道壁结构异常构建、肺实质破坏及间质增生的重要原因。ECM 在气道壁过度沉积是引起气道壁纤维化的主要原因之一,而 ECM 过度降解则致肺泡结构破坏,肺气肿形成[2]。90%肺实质胶原网络由Ⅰ、Ⅲ型胶原构成。胶原酶是降解 ECM 主要成分——Ⅰ、Ⅲ型胶原主要水解酶;体内抑制胶原酶活性的主要因子是组织金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)[3],在肺气道改建过程中 TIMP-1 和胶原酶的表达和活性改变,

作者介绍:陈 涛(1973-),女,住院医师,硕士,主要研究方向:慢性阻塞性肺疾病

维普资讯 http://www.cqvip.com

可能导致 ECM 的降解和沉积失衡,促进 COPD 的形成和发展。本实验通过检测 COPD 大鼠支气管肺组织中胶原酶-3(MMP-13)和 TIMP-1 的基因转录水平,以探讨 MMP-13 和 TIMP-1 是否参与 COPD 肺结构改建。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 10 周龄二级雄性 Wistar 大鼠体重 160±20g,重庆医科大学动物中心提供。脂多糖(Lipopolyscaacharide,LPS 0111-B4,Sigma 公司);山城牌过滤嘴香烟:每支含焦油 15mg,烟气烟碱 1.4mg(重庆卷烟厂出品);逆转录酶(MoMLV-RT):200U/μl(MBI);TRI_{ZOL}总 RNA 提取试剂(上海生工)。

1.1.2 PCR 引物 由上海博雅生物技术公司合成引物。TIMP-1:5'-GCC ATG GAG AGC CTC TGT GG-3',5'-GCA CGC AGG CAA AGT GAT CG-3',扩增片段长度 270bp;MMP-13:5'-TAC CTA CAC TGG CAA AAG CC-3',5'-ATG TCA TAC CCA TTC AGG GCC-3',扩增片段长度 334bp;内参照 GAPDH:5'-GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG C-3,5'-TGT CAT TGA GAG CAA TGC CAG C-3',扩增片段 188bp。

1.1.3 仪器 热循环 PCR 仪(PTC-200),水平电泳槽、凝胶成像系统 Quantity-one 分析软件(BIO-RAD,美国);DYY-Ⅲ10 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 建立 COPD 大鼠模型 实验动物随机分为正常对照组,模型组。参照宋一平等人的方法[4],取模型组大鼠,分别于第 1、15 天给予 10% 乌拉坦(10ml/kg)腹腔内注入麻醉后,暴露喉头,以静脉穿刺针带针芯(长 7cm,内径 0.1cm)替代气管插管行气管插管,向气道内注入生理盐水溶解的 LPS(200μg/100μl/只),其余时间每天两次,间隔 6h 将大鼠置于 30cm×40cm×60cm(72L)密闭玻璃染毒箱中,注入 5% 左右浓度烟雾使大鼠被动吸烟,持续 30min 后将大鼠移出,其余时间正常喂养,共 32 天。

1.2.2 肺功能测定 测前称体重,10% 乌拉坦 10ml/kg 腹腔内注射麻醉后,行气管 V 形切口、插入气管导管(以静脉穿刺针替代,插入后立即拔出针芯),应用小动物肺功能检测分析系统,记录大鼠 8 个自主呼吸周期,获得气道压力 P,容积变化 V,相应计算得到呼吸相气道阻力 Re、吸气相气道阻力 Ri。快速向大鼠气道内注入 6ml 空气造成大鼠被动深呼吸,即刻测定 FVC,$FEV_{0.3}$(相应于人的 FEV_1)。测定肺功能后,腹腔静脉放血处死后,立即开胸,留取右中肺约 100mg,-70℃ 保存备用。右下肺横贯取材放入 10% 的甲醛溶液中固定,脱水,二甲苯透明,石腊包埋 5μm 切片。

1.2.3 病理学检查 光镜检查和形态学定量分析:右下肺组织石腊包埋切片,HE 染色。将 HE 染色病理切片置于图像分析仪显微镜下,在放大 100 倍的条件下,进行图像冻结、存盘并用图象分析软件进行分析。支气管上皮层面积、管壁平滑肌层面积测量:测量标本中所有的支气管,为排除斜切的支气管,凡长径与短径比大于 2 者舍去不测;肺泡测量:每张切片分别随机选取无折叠的区域,100 倍光镜下取 3 个视野,测定肺泡面积,计数肺泡个数。

1.2.4 RT-PCR 取 100mg 左右 -70℃ 保存的右中叶肺组织,TRI_{ZOL}试剂提取总 mRNA,电泳;模板 cDNA 的合成:应用逆转录的方法,按 MBI 公司逆转录试剂盒说明操作;反应体系(20μl):RNA 3μl,$Oligo(dt)_{18}$(0.5μg/μl)1μl,5×逆转录缓冲液 4μl,dNTP(10mmol/L)2μl,RNA 抑制酶 0.5μl,$M_0MLV-RT$(200U/μl)1μl,ddH_2O8.5μl;逆转录条件:70℃ 反应 5min,37℃ 5min,42℃ 60min,70℃ 10min,1 个循环,冰上瞬时冷却,-20℃ 保存 cDNA。

1.2.5 目的基因的扩增(PCR) 以 GAPDH 为内参照。PCR 反应体系(25μl):cDNA4.0μl,10×缓冲液 2.5μl,引物(5μmol/L):正义链 2.5μl、反义链 2.5μl,$MgCl_2$(25mmol/L)1.5ul,Taq^{TM}(2.5u/μl)0.5μl,dNTP(25mmol/L)0.5μl,ddH_2O11.0μl。反应条件:MMP-13、TIMP-1:95℃ 预变性 4min,94℃ 变性 50s,57℃(TIMP-1 为 59℃)退火 50s,72℃ 延伸 50s,35 个循环;GAPDH:95℃ 预变性 4min,94℃ 变性 50s,56℃ 退火 40s,72℃ 延伸 30s,30 个循环

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳及图象分析 2% 琼脂糖凝胶电泳紫外光透射下观察,扫胶仪上扫胶摄像,进行图象分析,以相应的 GAPDH 为内参照物,表达强度用二者的平均灰度面积比值表示。

1.3 统计学处理

所有数据均 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两组间比较 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学显著性标准,应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。

2 结 果

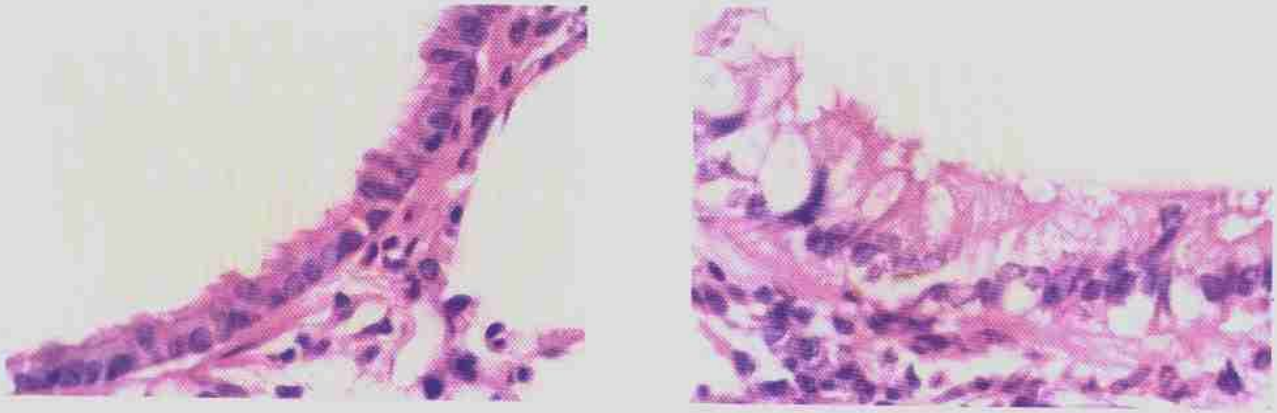
2.1 实验大鼠的肺功能检测

从表中可见模型组 $FEV_{0.3}$/FVC% 较对照组显著下降($P<0.001$),Re 和 Ri 较对照组显著增加(P 分别 <0.05,<0.001)。

2.2 病理学观察

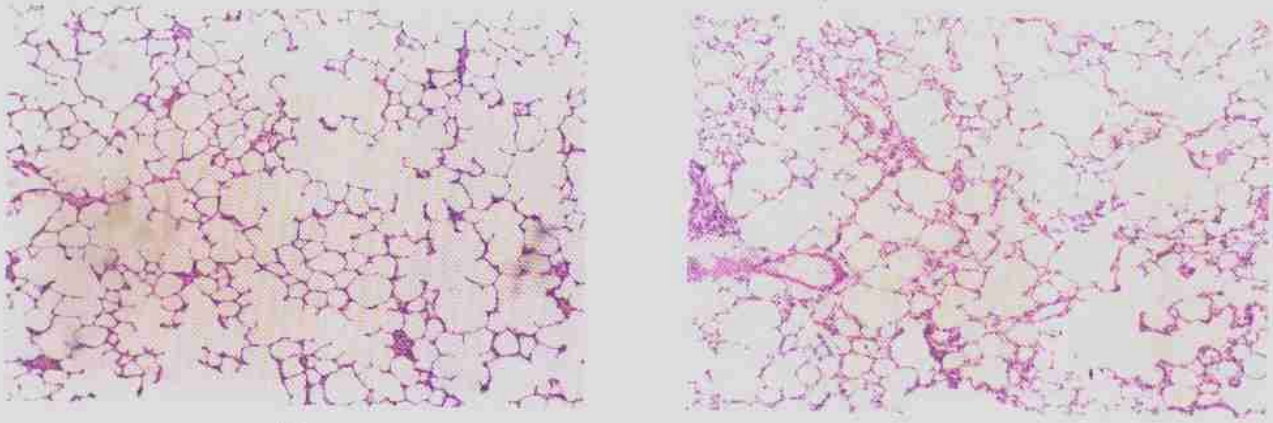
2.2.1 光镜下病理学观察 HE 切片发现对照组大鼠肺细支气管及肺泡结构、分布正常。模型组大鼠支气管粘膜增厚、脱落,基底细胞排列紊乱,上皮层、平滑肌层增厚,肺泡结构紊乱,肺泡管、肺泡囊及肺泡扩大,肺泡壁断裂,可见部分肺泡融合成肺大泡,

维普资讯 http://www.cqvip.com



对照组　　模型组

图 1　两组支气管结构(H.E×1000)



对照组　　模型组

图 2　两组肺组织结构(H.E×200)

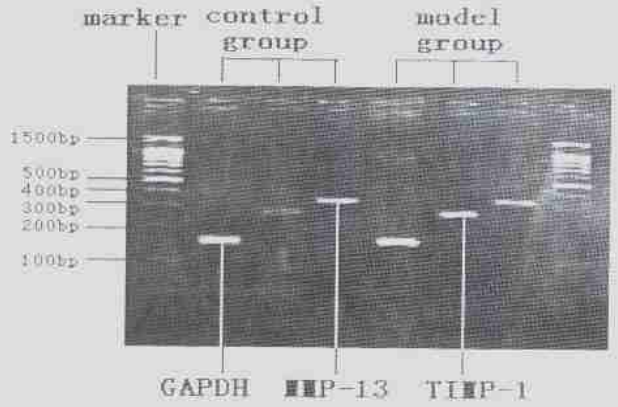


图 3　两组大鼠肺组织 MMP-13 和 TIMP-1mRNA 的表达

呈现小叶中央型肺气肿形成，肺间质增生，炎性细胞浸润，主要为中性粒细胞和淋巴细胞。

2.2.2　单位面积肺泡数和平均肺泡面积　从表中可见与对照组比较，模型组大鼠平均肺泡面积增加，同一面积下肺泡个数减少。两组支气管管径比较无差异，说明具有可比性；在直径小于 2mm 的外周小气道，模型组较对照组上皮层面积和平滑肌层面积增加。

2.3　RT-PCR 检测

与对照组比较，模型组支气管肺组织 MMP-13 和 TIMP-1mRNA 表达增加。

表 1　各组大鼠肺功能($\bar{x}\pm s$)

组别	$FEV_{0.3}/FVC$(%)	Ri(kPa·s/L)	Re(kPa·s/L)
对照组	84.22±9.51	27.220±1.372	30.300±4.937
COPD 组	70.68±4.64*	36.391±6.274**	36.283±5.804*

注：*：$P<0.05$；**：$P<0.001$。

表 2　单位面积肺泡数和平均肺泡面积($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	单位面积肺泡数(个/视野)	平均肺泡面积(μm^2)
对照组	10	60.57±12.99	3291.82±845.59
模型组	10	47.10±11.83*	4423.94±1125.69*

表 3　支气管管内面积、上皮层面积、平滑肌层面积($\bar{x}\pm s$)

组别	支气管数	支气管管径(μm)	上皮层面积(μm^2)	平滑肌层面积(μm^2)
对照组	20	152.50±48.73	6700.15±2101.00	6164.70±1791.91
模型组	25	144.34±44.56	9317.00±2503.10**	8493.16±3049.91*

注：测定支气管直径在 101μm～270μm之间。*：$P<0.05$；**：$P<0.001$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4 肺 MMP-13, TIMP-1mRNA 表达
(灰度面积比值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MMP-13	TIMP-1
对照组	10	0.497±0.150	0.301±0.093
模型组	10	0.761±0.189	0.950±0.158

注: $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.001$

3 讨 论

COPD 是指具有气流阻塞特征的慢性支气管炎或肺气肿。气流阻塞呈进行性发展，部分有可逆性[5]。肺功能检测中，一秒钟用力呼吸容积(FEV_1)与用力肺活量(FVC)比值是检测有无气流阻塞的敏感指标，如有下降即可诊断有气流阻塞。Re 反映小气道阻力。本实验采用 LPS 造成气道损伤，随即迫使大鼠被动吸烟后，发现 COPD 组大鼠细支气管有慢性增生性炎症特征，全层细支气管炎降低了气道的顺应性，气道上皮下纤维化和平滑肌增厚的结构改变影响气道收缩，致不可逆性气流阻塞、气道阻力增加；同时肺气肿形成致肺弹性回缩力下降，使得肺通气功能下降[6]。与对照组比较，模型组 $FEV_{0.3}$/FVC 比值下降有显著性差异，说明存在阻塞性通气功能障碍，气道阻力尤其是 Re 显著性增加，提示小气道阻力明显升高。因此在结构改变和功能学改变两方面表明 COPD 疾病模型复制成功，可用于 COPD 的相关研究。

现已公认即使在稳定期，COPD 患者肺内仍有炎性细胞活化，炎症因子及蛋白酶分泌，长期反复的炎症持续损伤支气管和肺泡结构，引起 ECM 反复破坏、修复和改建，ECM 合成与降解失衡导致气道重塑和肺气肿的形成[2]。胶原降解是疾病进程中组织不可逆性破坏的关键步骤。胶原酶是分解构成组织网状结构的基础的Ⅰ、Ⅲ型胶原的主要蛋白酶类，其中 MMP-13 首先自人乳腺癌细胞中克隆出来，在巨噬细胞、浆细胞、关节炎软骨细胞等也有表达[7]，在噬齿类动物体内作用类似于人的间质胶原酶 MMP-1，主要水解Ⅲ型间质胶原、基底膜成分和明胶。本实验发现在 COPD 组大鼠中 MMP-13mRNA 水平增加，这同 Raulo SM 等人发现在患有 COPD 的马的气道上皮细胞培养上清液及 BALF 中，MMP-13 的含量和活性增加相符；同时他们还发现 MMP-13 酶活性同Ⅰ型胶原降解量成正相关[8]。但有研究检测 COPD 患者肺组织，胶原酶 MMP-1、MMP-8 蛋白表达增加，而 MMP-13 无显著增加[9]。在 COPD 组大鼠 MMP-13mRNA 增加，提示胶原酶-3 在 COPD 发病中可能参予肺组织的破坏。

TIMPs 是内源性抑制 MMPs 活性的一组多功能因子家族，主要通过以 1:1 的摩尔比和 MMPs 结合形成 MMP-TIMP 复合体，以阻断 MMPs 和底物结合，形成调节 MMPs 的内生性系统。MMPs 和 TIMPs 间的平衡状态是维持 ECM 正常状态所必须的，一旦平衡被打破，则导致病理状态出现：MMPs/TIMPs 比值增加将促进组织破坏，反之则致组织纤维化[10]。其中 TIMP-1 不但可和几乎所有的 MMPs 家族成员形成复合物以抑制 MMPs 活化，并可灭活活性酶，TIMP-1 表达失常将致基质成分合成和降解失衡，引起组织结构重新构建。实验结果显示伴随 MMP-13 转录增强，COPD 组大鼠支气管肺组织 TIMP-1mRNA 水平也增高，提示烟雾中的有害物质刺激激活 MMPs 的同时，TIMP-1 反馈性增多。国内对 COPD 患者行病理学检查发现肺间质中Ⅰ、Ⅲ型胶原增多，以Ⅰ型胶原增加为主[11]；有研究表明 TIMP-1 可促进成纤维细胞、平滑肌细胞等多种实质细胞增生[12]，因此推测 TIMP-1 可能和局部肺间质增生、平滑肌的增殖有关，从而致平滑肌层增厚，间质增生。本实验结果提示在 COPD 大鼠支气管肺组织中 MMP-13/TIMP-1 可能存在失衡，从而参与了支气管和肺组织结构重建。

参 考 文 献

[1] Woessner JF Jr. MMPs and TIMPs—an historical perspective[J]. Mol Biotechnol, 2002; 22(1): 33-49.

[2] Marina s, Grazcellu t, piero M, et al. Cellular and structural bases of chronic obstructure pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001; 163: 1304-1309.

[3] Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, et al. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema[J]. Lab Invest, 1998; 78(9): 1077-1087.

[4] 宋一平，崔德健，茅培英. COPD 大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000; 39: 556-557.

[5] 慢性阻塞性肺疾病(COPD)诊治规范(草案)[J]. 中华结核呼吸杂志, 1997; 20: 199-203.

(下转第 744 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

白(Fibronectin,FN)、层粘连蛋白(Laminin,LN)和Ⅳ型胶原(Type Ⅳ Collagen)上[4]。MUC1 是一种Ⅰ型跨膜糖蛋白,主要分布在乳腺、卵巢等器官的腺上皮细胞的管腔或腺腔面,呈顶端表达,极性分布[5]。肿瘤细胞膜上的 MUC1 通过表达增多而干预整合素、钙粘连素的表达,影响Ⅳ型胶原酶的分泌,MUC1 亦可通过在细胞表面的过度表达减少细胞—细胞、细胞—细胞外基质的粘附使肿瘤细胞易于从原发位脱离[6],从而更利于肿瘤细胞的转移。

苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺是抗细胞跨膜糖蛋白 MUC1 糖基化的药物,一种糖基化抑制剂[7]。免疫细胞化学结果证明苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺降低 MDA-MB-231 细胞表面蛋白 MUC1 的表达。本实验选择 Matrigel 作为粘附基质,粘附实验结果表明,苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺对高转移的细胞株 MDA-MB-231 表现了明显的粘附抑制作用,从而可以使肿瘤细胞与继发灶的细胞外基质的粘附能力降低,而瘤细胞的粘附性与转移过程密切相关。苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺可使乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的粘附性降低,其作用机制与抑制 MUC1 蛋白的表达相关。苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺可能通过降低 MUC1 的表达水平,调节肿瘤细胞与基质细胞及血管内皮细胞之间的相互作用,从而抑制肿瘤细胞的粘附侵袭转移过程。

综上所述,苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺可能通过抑制 MUC1 表达影响转移级联反应的粘附和侵袭转移过程,证实糖基化程度与肿瘤侵袭转移能力密切相关,这为肿瘤转移机制的研究提供了思路。

参 考 文 献

[1] 李乔海,郭亚军.肿瘤分子生物学研究进展[M].北京:军事医学科学出版社,1996:117-1280.

[2] Pereda MP, Hopfner U, Pagotto U, et al. Retinoic acid stimulates meningioma cell adhesion to the extracellular matrix and inhibits invasion[J]. Br J Cancer, 1999;81(3):381-386.

[3] Aznavoorian S, Syetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis[J]. Cancer, 1993;71:1368.

[4] Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, et al. Transgenic MUC1 interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and correlates with Mitogen-activated Protein Kinase activation in the mouse mammary gland[J]. Biol Chem, 2001;276(16):13057-13064.

[5] 张立新,李春海.MUC1 粘蛋白的免疫生物学作用及其在肿瘤生物治疗中的应用[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2000;7(3):165-170.

[6] Schwqrtz B, Robert S. The role of mucin in colon-cancer metastasis[J]. Cancer, 1992;52(1):60-65.

(上接第 733 页)

[6] M. G Cosoc piqueras. Disease of the airways in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 2001;18(supply 34):41s-49s.

[7] Coker ML, Zellner JL, Crumbley AJ, et al. Defects in matrix metalloproteinase inhibitory stoichiometry and selective MMP induction in patients with nonisehemic or ischemic dilated cardiomyopathy[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999;878:559-562.

[8] Raulo SM, Sorsa TA, Kiili MT, et al. Evaluation of collagenase activity, matrix metalloproteinase-8, and matrix metalloproteinase-13 in horses with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Vet Res, 2001;62(7):1142-1148.

[9] Lourdes S, Annie P, Miguel G, et al. Upregulation of Gelatinases A and B, Collagenases 1 and 2, and Increased Parenchymal Cell Death in COPD[J]. Chest, 2000;117:684-694.

[10] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions[J]. Eur J Cell Biol, 1997;74(1):111-122.

[11] 车东媛,黄侠君.慢性阻塞性肺疾病与肺构形重建[J].中华结核和呼吸杂志,1999;22(8):472-474.

[12] Hayakawa. T. K, Yamashita. K, Tanazawa. E, et al. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP-1) for a wide range of cells[J]. FEBS Lett, 1992;298:29-32.