

## 基质金属蛋白酶-2/9 及其组织抑制剂比例失衡在高氧所致急性肺损伤中的作用

张向峰 朱光发 刘双 Hussein D. Foda

**【摘要】目的** 探讨基质金属蛋白酶-2/9(MMP-2/9)及其组织抑制剂(TIMP-1/2)在高氧所致急性肺损伤(ALI)发病过程中的作用。**方法** 将 54 只小鼠置于含体积分数大于 98%氧气的密闭室中,以 18 只呼吸正常空气的小鼠作为对照组。分别于暴露 24、48 和 72 h 活杀各组小鼠,取肺组织标本,测定肺湿/干重(W/D)比值、支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量及胸腔积液,以评价肺损伤程度。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织 MMP-2/9 和 TIMP-1/2 的 mRNA 表达;用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 BALF 中 MMP-2/9 及 TIMP-1/2 的蛋白含量。**结果** 高氧能引起 ALI,各实验组的肺 W/D 比值、BALF 中蛋白浓度及胸腔积液均明显高于对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。RT-PCR 结果显示,高氧组肺组织 MMP-2/9 及 TIMP-1 的 mRNA 表达均较对照组明显增高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),TIMP-2 mRNA 表达无明显变化;MMP-2/TIMP-2 的 mRNA 比值在高氧组中均明显升高( $P$  均  $< 0.01$ )。ELISA 结果显示,高氧组 BALF 中 MMP-2/9 和 TIMP-1 蛋白含量较对照组明显升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而 TIMP-2 蛋白含量同样无明显变化;MMP-2/TIMP-2 的蛋白比值在高氧组中也明显升高( $P$  均  $< 0.01$ )。**结论** 高氧能引起 ALI 伴 MMP-2/9 和 TIMP-1 的表达增高,而 MMP-2/TIMP-2 平衡失调导致细胞外基质降解在其发生过程中起重要作用。

**【关键词】** 高浓度氧; 肺损伤,急性; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶组织抑制剂

**The role of disequilibrium of expression of matrix metalloproteinase-2/9 and their tissue inhibitors in pathogenesis of hyperoxia-induced acute lung injury in mice** ZHANG Xiang-feng\*, ZHU Guang-fa, LIU Shuang, Hussein D. Foda. \* Department of Pulmonary Medicine, Beijing Anzhen Hospital Affiliated by Capital Medical University, Beijing 100029, China

**【Abstract】Objective** To investigate the role of matrix metalloproteinase-2/9 (MMP-2/9) and their tissue inhibitors (TIMP-1/2) in pathogenesis of acute lung injury (ALI) induced by hyperoxia. **Methods** Seventy-two C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, hyperoxia for 24 hours group, hyperoxia for 48 hours group, and hyperoxia for 72 hours group, with 18 mice in each group. The mice in hyperoxia groups were exposed to >98% oxygen in sealed cages, and the normal control group were placed outside of the cage to breathe room air. At the end of the exposure time the animals were euthanized, the right lung was removed and phosphate buffer solution (PBS) was used to lavage the lung through the endotracheal catheter. The wet/dry weight ratio, broncho-alveolar lavage fluid (BALF) protein content and the volume of pleural fluid were measured, the severity of lung injury was assessed; the expression of MMP-2/9 and TIMP-1/2 mRNA in lung tissue at 24, 48 and 72 hours of hyperoxia were assessed by reverse transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR); the amount of MMP-2/9 and TIMP-1/2 protein in lung tissue were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Hyperoxia caused ALI as evidenced by the increase in lung wet/dry weight ratio, BALF protein content and the volume of pleural fluid as compared with the normal control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). RT-PCR study showed increased expression of MMP-2/9 and TIMP-1 mRNA in lung tissues ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and ELISA assay also demonstrated upregulation of MMP-2/9 and an increase in TIMP-1 amount in BALF compared with their normal control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The ratios of both MMP-2 mRNA/TIMP-2 mRNA and MMP-2 protein/TIMP-2 protein were all increased in hyperoxia groups as compared with their normal control group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Hyperoxia causes ALI in mice, and disturbance of MMP-2/TIMP-2 balance plays an important role in the development of hyperoxia-induced ALI in mice.

**【Key words】** hyperoxia; acute lung injury; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

基金项目:北京市 2005 年留学人员科技活动择优资助项目

作者单位:100029 北京,首都医科大学附属北京安贞医院呼吸科(张向峰,朱光发,刘双);纽约州立大学石溪分校医学院附属医院呼吸和重症监护科(Hussein D. Foda)

作者简介:张向峰(1971-),男(汉族),山西省人,副主任医师,2001—2003 年曾在美国康乃尔大学医学院作访问学者, Email:xfzh20008@yahoo.com.cn.

长时间暴露于高浓度氧可导致弥漫性肺泡损害和间质水肿,上皮细胞对保持肺泡毛细血管屏障的完整发挥关键性作用,屏障一旦受损会立即引起液体渗出。对高氧环境下大鼠形态学的研究显示,血管内皮系统首先受损,然后是上皮细胞,内皮细胞和肺泡上皮细胞的死亡是高氧所致肺损伤的一个重要特征<sup>[1-2]</sup>。基质金属蛋白酶(MMPs)是一组以降解细胞外基质(ECM)为主要功能的一组酶类,MMP-2 由包括气道上皮细胞及血管内皮细胞在内的许多细胞分泌,MMP-9 由中性粒细胞、肺泡巨噬细胞及激活的结缔组织细胞等炎性细胞所分泌,它们通过降解细胞基底膜的主要组分Ⅳ型胶原,从而在细胞外基底膜的转复中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。在体内 MMPs 与其组织抑制剂(TIMPs)保持平衡,并对维持 ECM 的结构完整及功能正常具有重要作用<sup>[3]</sup>。研究已证实 MMPs 在高氧所致急性肺损伤(ALI)的发病机制中发挥着重要作用<sup>[4-5]</sup>,Piedboeuf 等<sup>[6]</sup>的实验也证实 TIMP-1 在高氧环境下表达增高。本研究中通过观察高氧所致 ALI 与 MMP-2/9 和 TIMP-1 的关系,探讨其在 ALI 发病过程中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物分组及模型制备:**8~12 周龄、体重 15~20 g 的 C57BL/6 小鼠 72 只,雌雄不限,按随机数字表法分为对照组(N 组)、高氧 24 h 组(O1 组)、高氧 48 h 组(O2 组)、高氧 72 h 组(O3 组)4 组,每组 18 只。各吸氧实验组动物被置于 Plexiglas 氧气室,内置氧浓度仪持续监测室内氧浓度,保证室内氧气的体积分数大于 98%,动物自由进食及饮水;N 组动物被置于氧气室外正常呼吸空气。于暴露时间终末点以过量苯巴比妥处死动物后取材进行实验。

**1.2 肺损伤的评价:**肺损伤严重程度参照文献<sup>[7]</sup>标准判定。①测定肺湿/干重(W/D)比值:实验结束后立即摘除右肺称湿重,然后置于 70℃ 烤箱烘干后称干重。②支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白浓度测定:处死小鼠后立即行气管插管,用 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)行支气管肺泡灌洗,共 3 次,离心取上清液测定蛋白浓度。③收集胸腔积液:仔细打开胸腔,用毛细吸管吸取胸腔积液。

**1.3 组织切片制备:**用体积分数为 10%的中性甲醛水溶液灌注鼠肺,持续 20 min 后摘除并置于 10%中性甲醛水溶液中固定 12 h,常规脱水、石蜡包埋,制成 5 μm 厚的组织切片,苏木素-伊红(HE)染色,观察组织病理学改变。

**1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织**

MMP-2/9、TIMP-1/2 的 mRNA 表达:取 50 mg 肺组织,TRIzol 提取总 RNA,逆转录为相应 cDNA。MMP-2 引物序列:上游引物 5'-CACCATCGCC CATCATCAAGT-3',下游引物 5'-TGGATTCGA GAAAAGCGCAGCGG-3',产物片段大小 399 bp;MMP-9 引物序列:上游引物 5'-GCTTTCGGCT GCAGCTCTGCTG-3',下游引物 5'-GAGGCCTT TGAAGTTTGAAT-3',产物片段大小 305 bp。TIMP-1 引物序列:上游引物 5'-GCTAAAAGGA TTCAAGGCTGTGGG-3',下游引物 5'-AAAGCT CTTTGTGAGCAGGGC-3',产物片段大小 210 bp;TIMP-2 引物序列:上游引物 5'-TGCGGGTCT CGCTGGACGTT-3',下游引物 5'-CGGTTGGC CTTAGGGTTCAGGGGG-3',产物片段大小 150 bp。β-肌动蛋白(β-actin)引物序列:上游引物 5'-GTGGCCGCTCTAGGCACCA-3',下游引物 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGG G-3',产物片段大小 244 bp。PCR 反应体系为 25 μl,循环参数:35 个循环,96℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,最后 72℃ 10 min。取 10 μl PCR 产物于质量分数为 1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统(Alpha Image)进行密度扫描分析,测定扩增条带的积分吸光度(A)值,用内参照 β-actin 修正比较各组表达水平的差异。

**1.5 BALF 中 MMP-2/9、TIMP1/2 的蛋白含量测定:**用酶联免疫吸附法(ELISA),操作按试剂盒说明书进行,根据 A 值及标准曲线求出 MMP-2/9 和 TIMP-1/2 的含量。

**1.6 统计学处理:**数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 GB-STAT V 8.0 统计软件进行单因素方差分析和 *q* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 长时间吸入高浓度氧引起 ALI:**随高氧暴露时间延长,各实验组肺 W/D 比值均较 N 组显著升高;O2 组和 O3 组 BALF 中蛋白含量均显著高于 N 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。N 组小鼠几乎无胸腔积液;各实验组小鼠于高氧暴露后胸腔积液量均显著增加( $P$  均  $< 0.01$ ,表 1)。光镜下观察,高氧暴露 48 h 及 72 h 肺组织呈现严重的结构毁损,肺泡塌陷及肺间质水肿(彩色插页图 1)。

**2.2 肺组织 MMP-2/9、TIMP-1/2 的 mRNA 表达(图 2;表 2):**RT-PCR 结果显示,MMP-2 mRNA 表达在高氧暴露 24 h 后明显增加,48 h 和 72 h 持续在高水平( $P$  均  $< 0.01$ );而 MMP-9 mRNA 表达直

至高氧暴露 72 h 后才较 N 组明显增加 ( $P < 0.05$ )。TIMP-1 mRNA 表达在高氧暴露 48 h 和 72 h 明显增加 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )；各组 TIMP-2 mRNA 表达差异无统计学意义。

表 1 高氧暴露对小鼠肺 W/D 比值、BALF 中蛋白含量和胸腔积液的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	肺 W/D 比值	BALF 蛋白 (mg/L)	胸腔积液 ( $\mu$ l)
N 组	18	3.32 ± 0.34	22.51 ± 5.62	2.15 ± 0.32
O1 组	18	4.42 ± 0.65*	25.64 ± 6.37	6.35 ± 1.22 <sup>b</sup>
O2 组	18	4.93 ± 1.09*	163.45 ± 25.36 <sup>b</sup>	22.75 ± 4.63 <sup>b</sup>
O3 组	18	5.31 ± 0.92 <sup>b</sup>	505.41 ± 112.64 <sup>b</sup>	20.11 ± 3.54 <sup>b</sup>

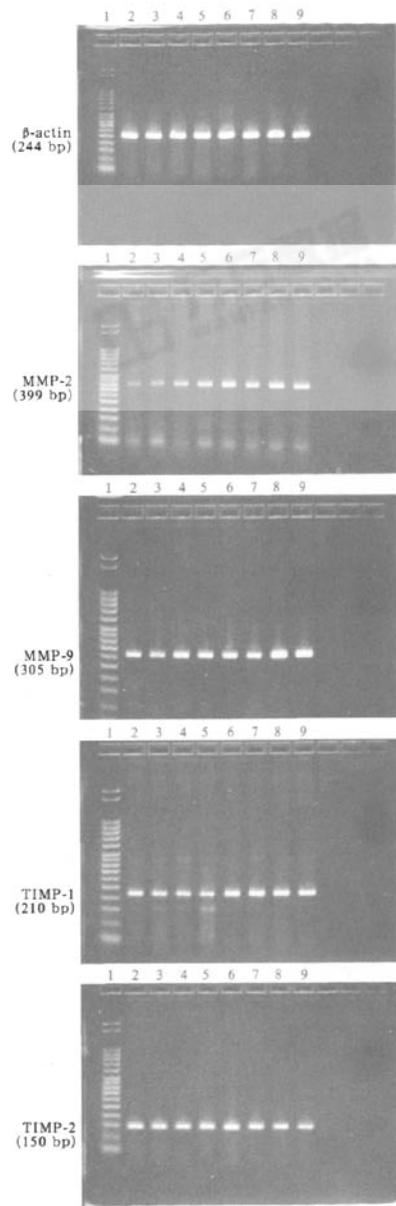
注：与 N 组比较，\* $P < 0.05$ ，<sup>b</sup> $P < 0.01$

2.3 肺组织 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 的 mRNA 比值变化 (表 2)：MMP-2/TIMP-2 的 mRNA 比值在高氧暴露 24 h 后明显增加，持续至 72 h，与 N 组比较差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ )；而 MMP-9/TIMP-1 的 mRNA 比值在高氧暴露后无明显变化。

2.4 BALF 中 MMP-2/9、TIMP-1/2 的蛋白含量及其比值变化 (表 3)：自高氧暴露 24 h 后 MMP-2 蛋白含量均明显增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )；而 MMP-9 蛋白含量直至高氧暴露 72 h 才较 N 组明显增加 ( $P < 0.05$ )。TIMP-1 蛋白含量在高氧暴露 48 h 和 72 h 明显增加 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )；而 TIMP-2 蛋白含量在高氧暴露后无明显变化。MMP-2/TIMP-2 蛋白比值在高氧暴露 48 h 和 72 h 明显增加 ( $P$  均  $< 0.01$ )；而 MMP-9/TIMP-1 蛋白比值在高氧暴露后无明显变化。

3 讨论

高氧可以导致 ALI，早期无肺组织形态学破坏，但随后进入炎症期，出现形态学改变的同时伴有大量炎性细胞渗出，其中主要为中性粒细胞，当它们激活后，可以释放包括 MMPs 在内的许多炎症介质。实验证实，蛋白溶解酶类，尤其是那些参与 ECM 破坏及重建的酶类，是 ALI 中导致细胞和间质病理改变的重要致病因子，MMP-2 和 MMP-9 是降解细胞



1:Marker;2,3:N 组;4,5,O1 组;6,7,O2 组;8,9,O3 组

图 2 RT-PCR 检测各组小鼠肺组织 MMP-2/9、TIMP-1/2 的 mRNA 表达

表 2 各组小鼠肺组织 MMPs 和 TIMPs 的 mRNA 表达及其比值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	MMP-2 mRNA (A 值)	MMP-9 mRNA (A 值)	TIMP-1 mRNA (A 值)	TIMP-2 mRNA (A 值)	MMP-2/TIMP-2 mRNA 比值	MMP-9/TIMP-1 mRNA 比值
N 组	18	0.32 ± 0.07	0.37 ± 0.11	0.54 ± 0.14	0.97 ± 0.08	0.29 ± 0.08	0.68 ± 0.15
O1 组	18	0.88 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.10	0.74 ± 0.15	1.09 ± 0.17	0.81 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.08
O2 组	18	0.92 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.18	0.90 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.23	0.87 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.12
O3 组	18	0.80 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.13	0.84 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.16

注：与 N 组比较，\* $P < 0.05$ ，<sup>b</sup> $P < 0.01$

表 3 各组小鼠 BALF 中 MMPs 和 TIMPs 的蛋白表达及其比值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	MMP-2 蛋白 (ng/L)	MMP-9 蛋白 (ng/L)	TIMP-1 蛋白 (ng/L)	TIMP-2 蛋白 (ng/L)	MMP-2/TIMP-2 蛋白比值	MMP-9/TIMP-1 蛋白比值
N 组	18	188.32±15.07	196.37±18.11	203.54±21.08	211.97±32.08	0.89±0.16	0.97±0.18
O1 组	18	362.88±23.21 <sup>a</sup>	209.40±16.10	235.74±31.15	224.09±20.17	1.15±0.23	0.69±0.09
O2 组	18	438.92±36.19 <sup>b</sup>	235.37±18.18	392.90±27.16 <sup>a</sup>	232.05±25.23	1.89±0.25 <sup>b</sup>	0.60±0.11
O3 组	18	526.80±42.25 <sup>b</sup>	383.72±28.21 <sup>a</sup>	424.10±38.13 <sup>b</sup>	218.99±14.13	2.41±0.17 <sup>b</sup>	0.90±0.22

注:与 N 组比较,<sup>a</sup>P<0.05,<sup>b</sup>P<0.01

基底膜的主要组分 IV 型胶原的重要酶类<sup>[4,7]</sup>。

本研究证实,持续吸入大于 98% 的氧可导致明显增加的肺 W/D 比值、BALF 中总蛋白浓度及出现大量胸腔积液为特征的肺损伤;组织学研究亦发现,肺组织呈现严重的结构毁损、肺泡塌陷及间质水肿。肺损伤在高氧暴露 24 h 后开始出现,并随暴露时间延长而逐渐加重;同时肺组织 MMP-2/9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达及 BALF 中 MMP-2/9 和 TIMP-1 的蛋白含量在高氧暴露后均明显增加,表现为高氧组肺组织 MMP-2 mRNA 水平及 BALF 中 MMP-2 蛋白含量明显升高, TIMP-2 升高不明显,因而 MMP-2/TIMP-2 的 mRNA 及蛋白比值均明显升高;高氧组肺组织 MMP-9、TIMP-1 mRNA 水平及 BALF 中 MMP-9、TIMP-1 蛋白含量均明显增加,但无论是肺组织 MMP-9/TIMP-1 mRNA 比值,还是 BALF 中 MMP-9/TIMP-1 蛋白比值与 N 组比较差异均无统计学意义。因此,高氧暴露后肺组织和 BALF 中 MMP-2/TIMP-2 mRNA 比值及 BALF 中 MMP-2/TIMP-2 蛋白比值增加及二者的比例失衡在氧化剂所致肺损伤中可能是导致肺组织结构毁损、上皮通透性增加及肺间质水肿的重要

致病因素。

参考文献

- [1] Deneke SM, Fanburg BL. Normobaric oxygen toxicity of the lung[J]. N Engl J Med, 1980, 303(2):76-86.
- [2] 张金秋, 李银平, 黎植实. 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素急性肺损伤[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(6):382-384.
- [3] Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinase; a review[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1993, 4(2):197-250.
- [4] 张向峰, 丁少芳, 高元明, 等. 多种基质金属蛋白酶在高氧所致急性肺损伤中的表达[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(8):449-451.
- [5] Pardo A, Selman M, Ridge K, et al. Increased expression of gelatinases and collagenase in rat lungs exposed to 100% oxygen[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(4 Pt 1):1067-1075.
- [6] Piedboeuf B, Johnston CJ, Watkins RH, et al. Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) and metallothionein in murine lungs after hyperoxic exposure[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 10(2):123-132.
- [7] Foda HD, Rollo EE, Drews M, et al. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN; attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340)[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25(6):717-724.

(收稿日期:2008-05-09 修回日期:2008-06-14)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

《麻醉相关并发症处理手册》出版

《麻醉相关并发症处理手册》为大 32 开本,定价 38 元,由《中国医药科技》出版社出版发行。

本书由广州军区广州总医院全军临床麻醉中心屠伟峰教授,南方医科大学附属珠江医院麻醉科徐世元教授共同主编,南京军区南京总医院全军普通外科研究所黎介寿院士和南京军区南京总医院麻醉科李德馨教授作序言。《麻醉相关并发症处理手册》一书已由《中国医药科技》出版社于 2008 年 4 月正式出版发行了。

《麻醉相关并发症处理手册》以围麻醉期经常遇到或很少遇到但危害很严重的并发症为主,并包括外科因素和病人因素所致且需麻醉医生直接介入处理的并发症,结合在临床实践中遇到的病例和积累的经验,撰写成书。主要内容包括重要脏器、麻醉相关操作和监护、内稳态、容量治疗、术后镇痛等并发症,以及麻醉相关药物不良反应的预防和处理。部分章节附有操作流程图,力求紧贴临床、内容新颖、简明扼要、条理分明,以取得一册在手,并发症查找快速方便、处置直观的效果。

其特点是以实用为主,叙述简明扼要,以手册的形式编写。其内容丰富,不但叙述麻醉引起的并发症,同时也涵盖了一些与手术有关的并发症,有着围手术处理学的内容。因此,这本书不但可供麻醉医师阅读,有关手术科室的医师也值得一读,对减少有关的手术并发症甚有帮助。也适合医学院校临床医学系、麻醉医学系师生或从事麻醉或相关学科的医务工作者参考和使用。希望这本书能发挥它的作用,有利于减少麻醉与相关的手术并发症,促进手术患者的康复。

本书全国新华书店、医药书店有售,也可与中国医药科技出版社读者服务部(北京市海淀区文慧园北路甲 22 号,邮编:100082)联系邮购,电话:010-62236938;也可与广州军区广州总医院麻醉科屠伟峰教授(广州市流花路 111 号,邮编:510010)联系邮购,电话:020-36653504。

(屠伟峰 孙丰年供稿)

## 基质金属蛋白酶-2/9及其组织抑制剂比例失衡在高氧所致急性肺损伤中的作用

(正文见597页)

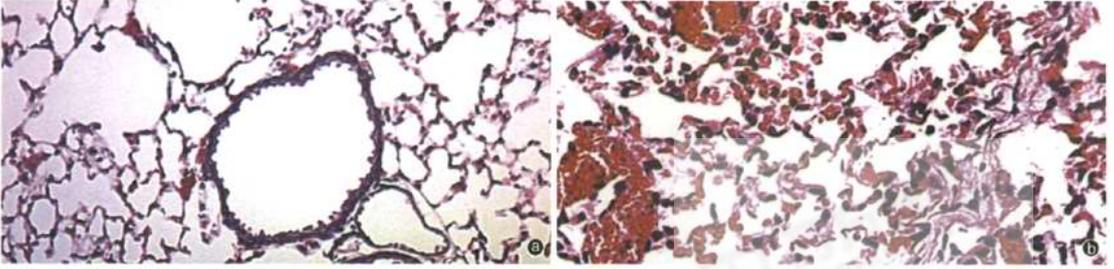
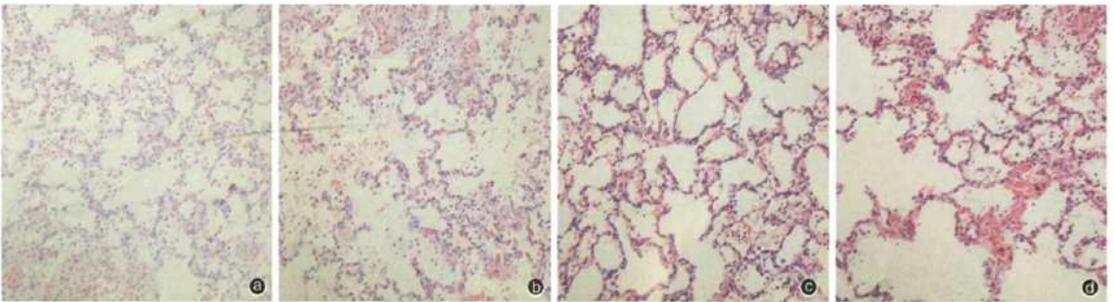


图1 对照组(a)和高氧72 h组(b)小鼠肺组织病理学变化(HE, ×200)

## 俯卧位通气联合呼气末正压治疗急性呼吸窘迫综合征家猪的疗效研究

(正文见615页)

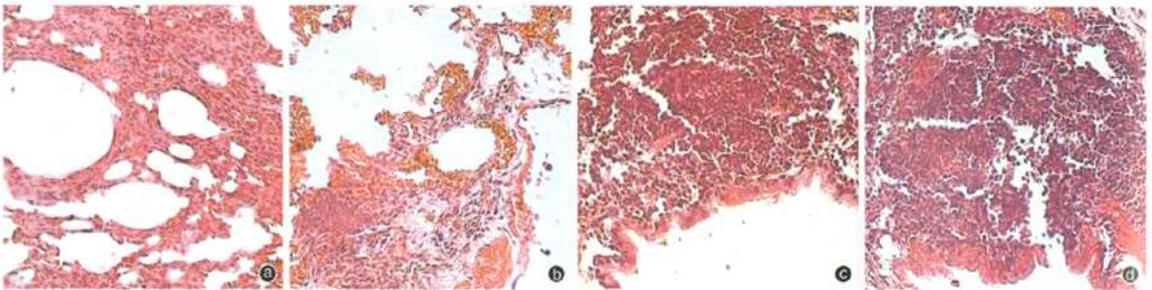


①: 俯卧位组腹侧肺组织, ②: 俯卧位组背侧肺组织, ③: 仰卧位组背侧肺组织, ④: 仰卧位组腹侧肺组织

图1 不同体位时ARDS家猪肺组织病理学改变(HE, ×400)

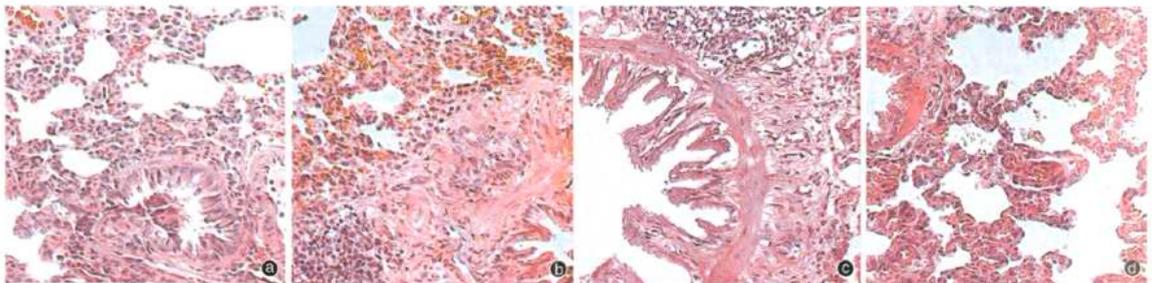
## 颈脊髓切断对内毒素血症大鼠急性肺损伤的影响

(正文见621页)



③: 3 h, ④: 6 h, ⑤: 12 h, ⑥: 48 h

图3 内毒素血症(ET)组大鼠制模后不同时间点肺组织病理学改变(HE, ×40)



③: 3 h, ④: 6 h, ⑤: 12 h, ⑥: 48 h

图4 内毒素血症+颈脊髓切断(TCSC)组大鼠制模后不同时间点肺组织病理学改变(HE, ×40)