

实验研究

清肺消炎丸对 COPD 大鼠肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响

刘恩顺 刘 伟 孙增涛 苏景深 关 鹏

(天津中医药大学第二附属医院呼吸科, 天津, 300150)

摘要 目的:观察清肺消炎丸对 COPD 大鼠肺组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)表达的影响。方法:将 30 只 Wistar 大鼠,随机分为 3 组,正常对照组、COPD 模型组和清肺消炎丸组,除正常对照组外,采用烟熏及内窥镜下气管滴入内毒素方法制作 COPD 模型,造模成功后分别治疗 7 d,观察各组肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 表达变化。结果:模型组大鼠肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 的表达与空白组相比明显增强($P < 0.05$),中药治疗组大鼠肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 水平比模型组减低($P < 0.05$)。结论:清肺消炎丸具有抑制 COPD 大鼠肺组织中 MMP-9 及 TIMP-1 的表达,改善 MMP-9/TIMP-1 比例失衡,从而防治该病气道重塑的作用。

关键词 清肺消炎丸;慢性阻塞性肺疾病;急性发作期;MMP-9;TIMP-1

Effect of Qingfei Xiaoyan Pills on the Expression of MMP-9 and TIMP-1 in the Lung Tissue of COPD Rats

Liu Enshun, Liu Wei, Sun Zengtao, Su Jingshen, Guan Peng

(The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Qingfei Xiaoyan Pills on the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the lung tissue of COPD Rats. **Methods:** Thirty Wistar rats were divided into 3 groups randomly, normal control group, COPD model group, Qingfei Xiaoyan Pills group. Except for the normal control group, we made the COPD model by smudging plus intratracheal instillation of LPS under endoscopy, and treated them separately for 7 days. Then we observed the change of MMP-9 and TIMP-1 expression in the lung tissue. **Results:** The MMP-9 and TIMP-1 expression in the lung of COPD model group were obviously increased than those of control group ($P < 0.05$), the MMP-9 and TIMP-1 of Qingfei Xiaoyan Pills group were lower than those of model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qingfei Xiaoyan Pills could inhibit the expression of MMP-9 and TIMP-1 in the lung in COPD rats, improve the MMP-9 / TIMP-1 imbalance, thus playing a role in preventing and treating airway remodeling in COPD.

Key Words Qingfei Xiaoyan Pills; COPD; Acute exacerbation; MMP-9; TIMP-1

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.06.021

慢性阻塞性肺部疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)的病理以肺泡壁进行性破坏,肺泡扩张为其特征性改变。大量实验研究证实,蛋白酶/抗蛋白酶的失衡是其主要原因之一。近年来基质金属蛋白酶(MMP-9)及基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)失衡渐渐受到重视。本实验拟通过观察清肺消炎丸治疗对 COPD 大鼠肺组织中 MMP-9、TIMP-1 表达的影响,探讨其干预 COPD 大鼠气道重构的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级健康 Wistar 大鼠 30 只,雄性,体重 250~300 g,天津中医药大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物 清肺消炎丸由天津中新药业达仁堂制

药厂生产。

1.1.3 试剂及仪器 内毒素(美国 Sigma 公司),大前门牌过滤嘴香烟(上海卷烟厂生产),兔抗鼠 MMP-9 和 TIMP-1 及 SABC 免疫染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(棕黄色),均为武汉博士德生物工程有限公司生产。OLYMPUS CX-31 显微镜为日本 OLYMPUS 光学仪器有限公司生产。JVC 数码相机为日本 JVC 公司生产。HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统由武汉千屏影像技术有限责任公司生产。

1.2 方法

1.2.1 COPD 模型的建立 采用烟熏及内窥镜下气管滴入内毒素造模法制造 COPD 大鼠模型^[1]。除正常对照组呼吸正常空气外,其他各组大鼠每天上午在自制的密闭箱内熏大前门牌香烟 0.5 h。在实验开始第

1 d 和第 14 d 时,各组大鼠均用乙醚麻醉,除正常对照组在硬式鼻腔镜引导下经声门缓慢滴入 200 μ L 生理盐水外,200 μ L 内毒素水溶液(1 mg/mL),当日不予被动吸烟。连续熏烟 4 周后,造成慢性阻塞性肺疾病模型。

1.2.2 实验分组及给药 将 Wistar 大鼠随机分为 3 组,每组 10 只。(1 正常对照组:灌服生理盐水 1 mL/100g,1 次/d,灌服 7 d;(2 模型对照组:灌服生理盐水 1 mL/100 g,1 次/d,灌服 7 d;(3 清肺消炎丸组:每天灌服量 1 mL/100 g,以含清肺消炎丸量为:1.56 g/kg,1 次/d,灌服 7 d。3 组均在停止烟熏的第 2 d 开始灌药。

1.2.3 石蜡切片与免疫组化 灌药结束后的第 2 d,10% 水合氯醛腹腔麻醉后,取出肺组织并置于福尔马林溶液中常规固定后,各大鼠肺组织行常规石蜡切片,片厚 5 μ m。各切片脱蜡至水,采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶法(武汉博士德公司,SP 即用型试剂盒)在石蜡切片上测 MMP-9 和 TIMP-1 的免疫组化表达,一抗为 1:100 MMP-9 和 TIMP-1 多克隆抗体,二抗为生物素山羊抗兔 IgG,阴性对照标本除以 PBS 代替一抗外,其他步骤与被测标本相同,DAB 室温显色,阳性反应为胞质中出现棕黄色颗粒。

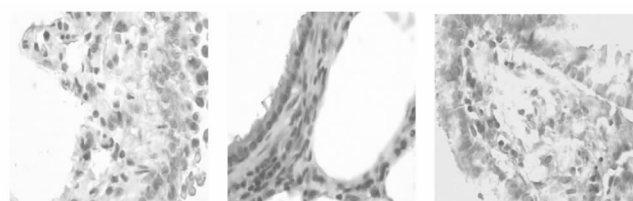
1.2.4 照相及图像分析 每只大鼠的免疫组化标本随机选取 5 个视野;400 倍光镜下进行观察。用 JVC 数码相机在 400 倍下照相,用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统对各切片在 400 倍下进行图像分析,每张切片的周围随机选择 5 个计算机视野,测定各组有 MMP-9 和 TIMP-1 阳性反应物质的光密度,结果以均数 $\pm$ 标准差表示。平均光密度反应某物质吸收光的程度,被测结构颜色越深,平均光密度值则越大。

1.2.5 统计学分析 全部数据用 SPSS 13.0 统计软件处理,组间比较用方差分析,两两比较用 LSD 检验。

2 结果

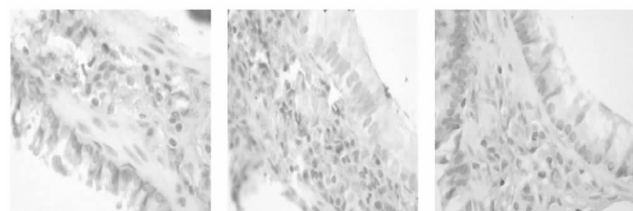
2.1 大鼠肺组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的检测结果 MMP-9 在正常对照组,肺组织中仅见微量的表达,在模型组肺组织中可见到强阳性表达。模型组肺组织中的表达明显强于正常对照组,但清肺消炎丸组明显弱于模型组,见图 1。

2.2 大鼠肺组织金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)检测结果 TIMP-1 在正常对照组肺组织中仅见微量的表达,在模型组的肺组织中可见到强阳性表达。模型组肺组织中的表达明显强于正常对照组,但清肺消炎丸组明显弱于模型组,见图 2。



正常对照组 模型组 清肺消炎丸组

图 1 3 组大鼠肺组织中 MMP-9 表达情况



正常对照组 模型组 清肺消炎丸组

图 2 3 组大鼠肺组织中 TIMP-1 表达情况

2.3 3 组大鼠肺组织 MMP-9、TIMP-1 阳性细胞的平均吸光度值比较,见图 3。

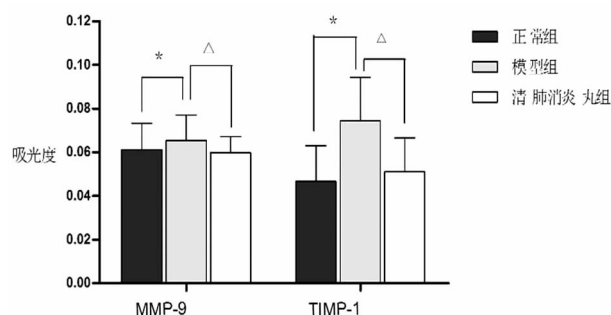


图 3 大鼠肺组织 MMP-9、TIMP-1 阳性细胞均吸光度值
(注:与正常对照组比,* $P < 0.05$;与模型组比, $\Delta P < 0.05$)

3 讨论

由于遗传因素或炎症细胞和递质的作用,肺内源性蛋白酶和抗蛋白酶失衡,构成肺泡壁的细胞外基质(ECM)受损是肺气肿性破坏的主要机制^[2-4]。正常情况下构成肺泡壁的细胞外基质(ECM)处于合成与降解的动态平衡,蛋白酶分泌增加和/或抗蛋白酶合成减少均可致细胞外基质受损。MMP-9 和 TIMP-1 的动态平衡,目前被认为是反映气道组织破坏与修复动态平衡的标志^[5-7]。COPD 患者由于炎症刺激促使的炎症细胞的增加,产生蛋白酶增加,活性增强,当超过抗蛋白酶的数量及活性时,引起弹性纤维的破坏,促使了肺气肿的形成^[8]。

基质金属蛋白酶类(MMPs)是一组由钙离子激活的含锌离子的内肽酶家族,几乎能降解细胞外基质的所有成份,其主要由巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞等合成与分泌。在炎症、创口愈合、肿瘤浸润等疾病过程中有重要作用^[9-12]。MMP-9 即明胶酶 B,其主要作用为降解弹力纤维、明胶、及 IV、V 型胶原。其参与

COPD 的发病机制主要是通过破坏肺泡基质成分,使肺泡结构破坏,形成肺气肿及参与气道重塑而导致气流阻塞^[13]。Kang 等^[14]报道,肺实质 MMP-9 的表达与吸烟有明显的相关性,并且其表达水平与 FEV1 呈负相关。本实验发现 COPD 模型组大鼠肺组织中 MMP-9 的表达明显增强,证实了其参与了 COPD 的发生和发展。

TIMPs 是 MMPs 的内源性天然抑制因子,广泛分布于组织和体液中,其主要作用为促进细胞外基质(ECM)沉积和抑制其降解,并类似生长因子可促进平滑肌细胞、表皮细胞等增生。TIMP-1 是所有亚类中活性最强的,其特异性抑制 MMP-9 活性,能被多种细胞因子诱导产生^[14-15]。Vegnot 等^[16]在患者痰中发现 MMP-9 和 TIMP-1 含量显著高于健康人,MMP-9/TIMP-1 则低于正常人,且这一比值与第 1 秒用力呼气容积呈正相关,表明 MMP-9/TIMP-1 失衡是引起 COPD 的一个重要机制之一。本实验结果显示 COPD 模型组大鼠肺组织中 TIMP-1 的蛋白表达也明显增强,其可能是由于病理因素刺激下 MMP-9 增多,使降解细胞外基质增多,从而做出的反馈的应答,以避免组织破坏过度。

我们在多年的临床实践中发现 COPD 急性发作期患者,以“痰热郁肺”之证多见,故拟用“清肺宣肺平喘”法,以达到“清痰热、宣肺气、平气喘”的作用。清肺消炎丸由《伤寒论》中的麻杏石甘汤为基础化裁而来,主要药物包括:麻黄,石膏,杏仁,地龙,牛蒡子,葶苈子,牛黄,羚羊角等。方中麻黄宣肺平喘,被誉为“治喘圣药”;石膏,牛黄,羚羊角清热化痰,其中石膏配麻黄,清宣肺中郁热而起到平喘之功效;杏仁,牛蒡子宣降肺气,协同麻黄以治咳喘;地龙平喘通络,诸药合用,功效将至。

基于本实验的结果我们认为:在慢性阻塞性肺部疾病急性发作期,以 TIMP-1 相对增高而导致 MMP-9/TIMP-1 失衡为特征,进而引起以反馈性的细胞外基质沉积和气道重塑为主的病理变化可能是该病发展过程中的重要阶段,也是影响疾病转归的重要因素之一。在清肺宣肺平喘法指导下运用清肺消炎丸进行干预,发现清肺消炎丸治疗后大鼠 MMP-9 和 TIMP-1 的表达均明显下降,且以抑制 TIMP-1 的表达更为显著。提示通过对 MMP-9 和 TIMP-1 的抑制,从而使肺脏基质的降解减少,同时可以防止肺泡外基质过度增生,减轻气道重塑,可能是该治法指导下用药干预 COPD 的作用机制之一。

参考文献

- [1] 宋一平,崔德健,茅培英,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(5):283-287.
- [2] Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease[J]. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. Am J Respir Crit Care Med, 2001,163(5):1256-1276.
- [3] 赵伟,郝青林. 蛋白酶与抗蛋白酶失衡在 COPD 中的研究进展[J]. 临床肺科杂志,2011,13(3):437-440.
- [4] 曹登瑞,潘灵敏,丁翠敏. 慢性阻塞性肺病患者诱导痰基质金属蛋白酶及其抑制剂与气道炎症及气道重塑[J]. 临床肺科杂志,2009,14(2):184-185.
- [5] Beeh KM, Beier J, Kornmann O, et al. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and their ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects[J]. Resir Med, 2003,97(6):634-639.
- [6] Matsmoto H, Niimi A, Takemura M, et al. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. Thorax, 2005,60(4):277-281.
- [7] Avils B, Belda J, Margarit G, et al. Markers of airway remodeling in induced sputum from healthy smokers[J]. Arch Bronconeumol 2006,42(5):235-40.
- [8] Surpas P. Pulmonary rehabilitation in COPD[J]. Rev Pra, 2011,61(2):817-818.
- [9] 林静,徐尚华,熊尚全. 血脂康对急性冠状动脉综合征患者炎症因子和 MMP 的影响[J]. 世界中医药,2009,4(2):71-73.
- [10] Sheen, O' Kane C M, Chaudhary K, et al. High MMP-9 activity characterises pleural tuberculosis correlating with granuloma formation[J]. European Respiratory Journal, 2009,33(1):134-141.
- [11] 柴欣楼,王伟,王绿娅,等. 葛根素对血管平滑肌细胞迁移的影响[J]. 世界中医药,2010,5(3):217-219.
- [12] Aureli L, Gioia M, Cerbara I, et al. Structural bases for substrate and inhibitor recognition by matrix metalloproteinases[J]. Curr Med Chem, 2008,15(22):2192-2222.
- [13] Lagente V, Manoury B, Nenan S, et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling[J]. Braz J Med Biol Res, 2005,38(11):1521-1530.
- [14] Kang MJ, Oh YM, Lee JC, et al. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstruction of airflow. J Korean Med Sci, 2003,18(6):821-827.
- [15] Manoury B, Nnan S, Gunon I, et al. Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomycin-induced lung fibrosis[J]. Int Immunopharmacol, 2007,7(7):900-911.
- [16] Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998,158:1945-1950.

(2013-01-03 收稿)