

多西环素对大鼠体外循环后肺内 MMP-9 和 TIMP 活性和基因表达的影响

王常田,程晓峰,张雷,吴海卫,许颢,李德闽

(南京军区南京总医院心胸外科,江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:探讨多西环素对大鼠体外循环后肺内基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和组织基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)活性和基因表达的影响。方法:健康雄性 SD 大鼠 36 只随机分为对照组、体外循环组(CPB 组)和治疗组,分别于手术结束时(T1)和手术结束后 6 h(T2)收集支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织标本。Western blot 法测定 BALF 中 MMP-9 和 TIMP-1 的蛋白活性,RT-PCR 法测定肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达。结果:治疗组大鼠肺组织水肿减轻,BALF 的中性粒细胞减少;CPB 组 BALF 中 MMP-9 活性明显升高,CPB 后 6 h 表达最强,治疗组 MMP-9 活性较 CPB 组有明显下降,TIMP-1 的活性在 CPB 组和治疗组于 CPB 结束后呈较弱的增强趋势,两组间相同时间点的表达差异不明显;CPB 组和治疗组 MMP-9mRNA 表达增强,但治疗组 MMP-9 mRNA 的表达在相应时间点较治疗组下降;TIMP-1 mRNA 在治疗组表达增强,且 T2 时间点显著增强;MMP-9/TIMP-1 mRNA 在 CPB 组和治疗组均有显著增大,但治疗组中 T2 时间点 MMP-9/TIMP-1 mRNA 比值较 CPB 组明显下降。结论:CPB 可以引起大鼠术后肺内 MMP-9 的活性和基因表达增强,导致术后早期肺内 MMP-9/TIMP-1 mRNA 表达失衡,多西环素可以抑制 CPB 后大鼠肺组织内 MMP-9 蛋白水平和 mRNA 的表达,还可能上调 TIMP-1 的表达而间接抑制 MMP-9 mRNA 表达,改善 MMP-9/TIMP-1 的比例失衡。

[关键词] 基质金属蛋白酶-9;组织基质金属蛋白酶抑制剂-1;多西环素;体外循环

[中图分类号] R654.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-027-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140106

Effects of doxycycline on MMP-9 and TIMP-1 activity and mRNA expression in lung after cardiopulmonary bypass in rats

Wang Changtian, Cheng Xiaofeng, Zhang Lei, Wu Haiwei, Xu Biao, Li Demin

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** This study was aimed to investigate the effects of doxycycline on the activity and mRNA expression of MMP-9 and TIMP-1 in CPB in a rat model. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n = 12$, respectively): the sham group, the CPB group, and the CPB+Dox group. The rats were executed at the termination of CPB (T1), 6h after termination of CPB (T2), respectively. BALF and lung tissues were harvested at T1 and T2. The activity of MMP-9 and TIMP-1 was detected by Western-blot analysis. The expression of MMP-9 and TIMP-1 in lung tissue was detected by RT-PCR. **Results:** The edema of lung tissue was significantly reduced in the CPB+Dox group, and neutrophils were decreased in the CPB group. The activity of MMP-9 in the CPB+Dox group decreased significantly compared with that in the CPB group and the highest expression occurred after 6 h. The activity of TIMP-1 had a weaker increasing trend in the CPB and the CPB+Dox group after the ending of CPB, and the expression difference was not obvious in the response time of the two groups. The expression of MMP-9 mRNA was significantly increased after CPB in the CPB and the CPB+Dox group, but significantly decreased at T2 time point in the CPB+Dox group. The ratio of MMP-9/TIMP-1 was significantly increased in the CPB and CPB+Dox group, but the ratio in CPB+Dox group was significantly lower than that of CPB group at T2 time. **Conclusion:** CPB could induce the increasing of the activity and mRNA of MMP-9 of lung, causing the ratio of MMP-9/TIMP-1 imbalanced severely at the early postoperative. Doxycycline could inhibit the expression of MMP-9 activity and mRNA in rat lung tissue after CPB, and may increase the expression of TIMP-1 in rats after CPB, and inhibit the expression of MMP-9 mRNA indirectly, which could improve the ratio of MMP-9/TIMP-1 imbalance.

[Key words] matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinases-1; doxycycline; cardiopulmonary bypass

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01): 027-031]

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)可以导致全身炎性反应,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是主要并发症之一^[1],基底膜的损伤和修复在 ALI 发生发展过程中发挥重要作用^[2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是参与细胞外基质降解的主要酶类, MMP-9 主要来源于炎性细胞,其作用底物主要是 IV、V 型胶原,与 ALI 有关^[3]。组织基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是内源性 MMPs 抑制剂,在 pmol 水平对 MMPs 就有很好的亲和性,是一种理想的抑制剂。近年来在 ALI 过程中 MMPs/TIMPs 的失衡逐步受到研究者的重视^[4],但在 CPB 所致 ALI 过程中的研究较少。本实验通过建立大鼠体外循环动物模型,从支气管肺泡灌洗液蛋白活性、肺组织 mRNA 等不同水平观察 MMP-9 和 TIMP-1 在体外循环术后肺内的表达,探讨 MMP-9 和 TIMP-1 在 CPB 所致 ALI 中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级健康纯种成年雄性 SD 大鼠,体重 500~600 g,月龄 5~6 个月,由南京军区南京总医院比较医学科提供,实验动物许可证号:SYXK(军)2007-029。

1.2 方法

1.2.1 大鼠体外循环建立

雄性 SD 大鼠 36 只,在 SPF 级动物屏障环境下饲养。温度 22℃,相对湿度 50%~60%,分笼饲养,予以标准饲料,自由取水。术前 24 h 禁食,自由饮水。2%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射麻醉。麻醉成功后仰卧、固定于操作台,四肢接心电图导联,股动脉穿刺动态监测血压,尾动脉穿刺连接动脉泵管,右侧颈内静脉置带网状侧孔的 16G 导管作静脉引流并接储血槽。所有管路妥善固定于体表。预充液按晶胶比 1:4 配制,胶体选用羟乙基淀粉 200,预充量 10 ml^[5]。

1.2.2 动物分组处理

36 只大鼠随机分为 3 组,每组 12 只。对照组(A 组, sham):麻醉后仅进行股动脉、尾动脉和颈静脉插管及肝素化等处理,不进行体外循环;体外循环组(B 组, CPB):麻醉、动静脉插管及肝素化后进行体外循环。体外循环时间 60 min,术中维持收缩压在 75~120 mmHg,体外循环过程中不降温、不给地塞米松及乌司他丁等药物;体外循环 + 药物组(C 组, CPB + Dox):术前 1 周开始予以多西环素(Dox)30 mg/kg 进行灌胃治疗,每天 1 次,7 d 后接受 CPB。分

别于手术结束时(T1)和手术结束后 6 h(T2)处死大鼠,收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和肺组织标本,对照组分别在相应时间点取材。

1.2.3 标本的收集和保存

按预定时间点处死各组大鼠,打开胸腔完整取出心肺,取右上肺置于-75℃冰箱冻存,用于测定 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达。左肺组织先称湿重,然后用 4℃生理盐水行支气管肺泡灌洗,每次灌洗量为 2 ml,共 4 次,收集灌洗液并记录回收量, BALF 以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液保存于-75℃冻存待用;离心后沉淀用 1 ml 生理盐水稀释,进行中性粒细胞计数。左肺灌洗结束后,置于烤箱中 60℃干燥至恒重,称取干重。

1.2.4 Western blot 法测定 BALF 中 MMP-9 及 TIMP-1 的蛋白活性

提取 BALF 中总蛋白;将 30 μg 蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离;电转法转移至聚偏乙烯氟化物膜,然后与 1:1 000—抗溶液反应(羊抗鼠 MMP-9 和 TIMP-1 多克隆抗体);漂洗后再与 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的二抗(兔抗羊 IgG)孵育 2 h;与 NEN 化学发光试剂反应 3~5 min,暗盒中使 X 线片曝光 10~30 s,经显影定影后,凝胶扫描成像系统分析目的条带。Image J 分析程序软件进行电脑推算法测定与内参 β-actin 灰度比值,重复 3 次取平均值。

1.2.5 RT-PCR 法测定肺组织 MMP-9/TIMP-1 mRNA 的表达

TRIzol 法提取 RNA,具体方法按其说明进行。采用 NCBI/Primer-BLAST 设计 PCR 引物。取 5 μg RNA、Oligo dT(18)1.5 μl 和无核酸酶的双蒸水加入 0.2 ml 灭菌无核酸酶 PCR 管至总体积 10 μl 在 70℃保温 10 min,然后加入 RNase 抑制剂(40 U/μl)0.5 μl、10 × AMV Reaction Buffer 2.5 μl、dNTPs (10 mmol/L)1 μl、DTT (1 mol/L)1.5 μl、逆转录酶(AMV)1 μl、无核酸酶的双蒸水 8.5 μl,混匀后 2 000 r/min 离心 20 s;42℃保温 45 min,然后 72℃保温 10 min,即进行反转录,反应体系为 2×的 RTmix 10 μl、模板(cDNA 稀释 10 倍)1 μl、引物 F 和 R(5 pmol/μl)混合物 2 μl、无核酸酶的双蒸水 7 μl,总共 20 μl。放置样品于循环仪并启动热循环,进行 40 个循环的扩增(DA7600),每个热循环包括 95℃ 25 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s,最后 72℃保温 10 min,PCR 反应完成后,采用 2.0%的琼脂糖凝胶电泳进行分析,大鼠的 MMP-9 和 TIMP-1 基因表达采用 MMP-9 和

TIMP-1 与 β -actin 的光密度比值表示。

1.3 统计学方法

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理,组间均数比较采用方差分析法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠手术后肺的 W/D 值和 BALF 中性粒细胞数

三组大鼠术后肺的湿/干重比值 (W/D) 和 BALF 中性粒细胞数见表 1。各组之间差异明显,在 T2 时间点,B 组的 W/D 值明显高于 A 组和 C 组 ($P <$

0.01)。而 C 组则介于 A 组和 B 组之间,明显低于 B 组而高于 A 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中性粒细胞变化趋势与 W/D 值一致。

2.2 BALF 中 MMP-9 和 TIMP-1 活性测定

Western blot 法测定 3 组大鼠 BALF 中的 MMP-9 和 TIMP-1 活性 (图 1),结果显示 B 组中 MMP-9 的活性在两个时间点均明显高于 A 组和 C 组 ($T1$ 1.04 ± 0.06 vs 1.19 ± 0.09 , 1.09 ± 0.04 , $P < 0.01$; $T2$ 0.86 ± 0.01 vs 1.14 ± 0.04 , 1.11 ± 0.11 , $P < 0.01$)。而 A 组和 C 组之间无显著差异。TIMP-1 的活性改变类似于 MMP-9, B 组的 TIMP-1 活性高于 A 组和 C 组。

表 1 肺的 W/D 值和 BALF 中性粒细胞数

Table 1 The ratio of lung W/D and neutrophils counts in BALF

($\bar{x} \pm s$)

检测指标	A 组		B 组		C 组	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
W/D	3.6 ± 0.4	4.0 ± 0.3	$6.7 \pm 0.8^{**}$	$8.9 \pm 0.9^{**}$	$4.5 \pm 0.7^{\Delta}$	$5.6 \pm 0.8^{\Delta}$
中性粒细胞数($\times 10^9/L$)	4.5 ± 0.3	4.7 ± 0.5	$10.7 \pm 1.2^{**}$	$13.9 \pm 1.9^{**}$	$8.6 \pm 0.9^{\Delta}$	10.9 ± 1.1

与 A 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 B 组相比, $^{\Delta}P < 0.01$ ($n = 6$)。

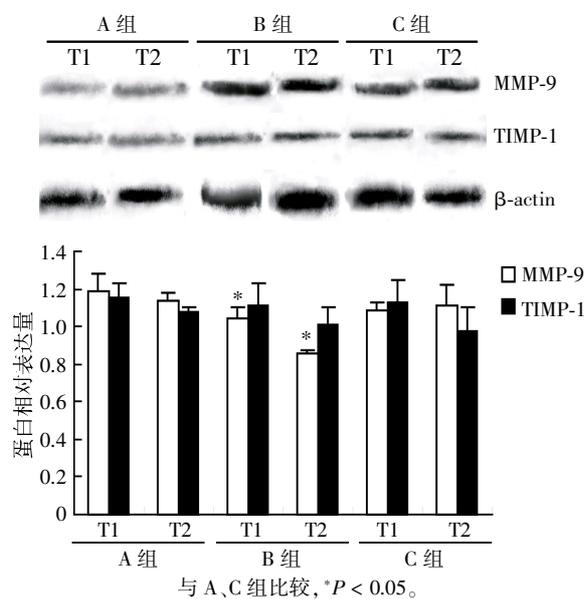


图 1 Western blot 法测定大鼠 BALF 中的 MMP-9 和 TIMP-1 活性

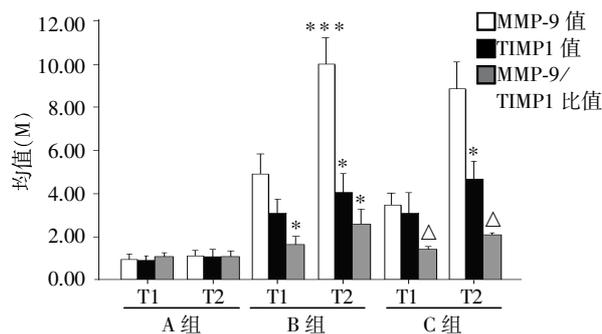
Figure 1 The activity of MMP-9 and TIMP-1 in BALF by Western blot analysis

2.3 肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的测定

对肺组织内 MMP-9、TIMP-1 mRNA 进行 RT-PCR 测定 (图 2)。其中 B 组中 MMP-9 mRNA 的表达在 T2 时间点与其他两组相比达到峰值 ($P < 0.001$)。B 组和 C 组的 TIMP-1 mRNA 在两个时间点均明显增强,与 A 组相比有显著差异 ($P < 0.05$),但

两组之间无显著差异。

MMP-9/TIMP-1 mRNA 表达的比值 B 组明显高于其他两组,有意义的是 C 组较 B 组在两个时间点均明显下降,表明在 C 组中 MMP-9 的增强得到了抑制,增长的幅度不及 TIMP-1 的增长,所以比值出现下降趋势。



与 A 组比较, $^*P < 0.05$; 与 B 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图 2 RT-PCR 测定肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达
Figure 2 MMP-9 and TIMP-1 gene expression by using RT-PCR

3 讨论

体外循环下心内直视手术开展以来,术后肺功能障碍一直受心外科、体外循环及重症监护医师的共同关注,并积极探索其发生发展的机制以及防治

方法以抑制或减轻其反应程度。目前国内外学者对其基本病理改变较为一致的认识是体外循环过程激活了各种炎症因子继而损伤肺泡毛细血管基底膜,从而引起肺泡内液体增多,肺内分流增加,影响气体交换^[6]。在本研究中,大鼠经 CPB 后肺水增加,支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞明显增多,存在不同程度的急性肺损伤。

肺泡基底膜的成分包括有 IV 型胶原、纤维连接蛋白等,致其损害必须有蛋白水解酶的参与,因此 MMPs 作为具有降解基底膜功能的酶类在各种原因所致急性肺损害中的作用越来越受人们的关注。本研究中 CPB 后大鼠 BALF 中 MMP-9 的活性明显增加,肺内 MMP-9 mRNA 的表达亦明显增强。表明 CPB 通过各种途径激活了 MMP-9 的表达并促进中性粒细胞肺内迁移和肺泡毛细血管通透性增加^[7]。

作为 MMPs 的内源性抑制剂,TIMPs 最初被认为主要调节 MMPs 活性,抑制细胞外基质更新,而目前研究发现其具有多重功能,可以直接通过细胞表面受体或间接通过调节蛋白酶活性而起作用,如 TIMP-2 结合于整合素 $\alpha 3\beta 1$ 是 TIMP 家族成员首次作用于细胞表面受体的描述;TIMP-1 则结合于 CD63 而抑制细胞生长和凋亡^[8]。采用多西环素作为外源性 MMPs 抑制进行干预,发现治疗组支气管肺泡灌洗液 MMP-9 活性及肺组织内 MMP-9 基因表达受到抑制,说明多西环素可以抑制 CPB 后肺组织内 MMP-9 蛋白水平和 mRNA 的表达。肺组织内 TIMP-1 mRNA 的表达在 CPB 组内两时间点未见显著差异,但在治疗组内可见 CPB 结束后 6 h 较 CPB 结束时明显增强,两者间有显著差异,说明多西环素可能促进大鼠肺内 TIMP-1 mRNA 的表达,提高 CPB 后肺内 TIMP-1 的含量,从而间接抑制 MMP-9 的活性和表达。通过对 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 比值的进一步分析,CPB 组和治疗组较对照组 MMP-9/TIMP-1 均显著增大,表明 CPB 后肺内 MMP-9 mRNA 表达的增长幅度明显大于 TIMP-1 mRNA 的增长,造成 MMP-9 和 TIMP-1 表达的比例严重失衡。CPB 组和治疗组在 CPB 结束时 MMP-9/TIMP-1 差异不明显,而在 CPB 结束后 6 h 治疗组的 MMP-9/TIMP-1 较 CPB 组显著下降,说明治疗组在 CPB 结束以后肺内 MMP-9 表达受到抑制,而同时 TIMP-1 表达反而上调,MMP-9/TIMP-1 比值的下降说明 MMP-9/TIMP-1 的比例严重失衡得到有效控制或逆转。

本研究证实了多西环素在大鼠 CPB 过程中对 MMP-9 具有明显的抑制作用,结合文献^[9-12]分析其

可能机制:①通过对 MMP-9 的金属离子的络合作用直接抑制 MMP-9 活性;②减少中性粒细胞肺内滞留,减少 MMP-9 的释放;③可能通过上调内源性抑制剂如 TIMP-1 的水平而抑制 MMP-9 活性及表达;④通过抑制细胞因子的转录,间接抑制 MMP-9 的转录、活化、激活;⑤可能通过上调肺内其他蛋白或细胞因子水平而抑制 MMP-9。

众多研究已经证实,多西环素对 MMP-9 的抑制可能并非通过单一途径进行,而是多种途径的综合作用。具体机制尚需进一步深入研究,尤其要充分认识 MMPs 前体的激活和锚合等机制,也许能够提供一种方法来抑制潜在而有害的 MMPs 激活相关过程而保留其有益功能。

[参考文献]

- [1] Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(2): S715-720
- [2] Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000, 33(7): 749-754
- [3] Sochor M, Richter S, Schmidt A, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 with doxycycline reduces pancreatitis-associated lung injury[J]. *Digestion*, 2009, 80(2): 65-73
- [4] Chirco R, Liu XW, Jung KK, et al. Novel functions of TIMPs in cell signaling [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(1): 99-113
- [5] Dong GH, Wang CT, Li Y, et al. Cardiopulmonary bypass induced microcirculatory injury of the small bowel in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(25): 3166-3172
- [6] González-López A, Albaiceta GM. Repair after acute lung injury: molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Crit Care*, 2012, 16(2): 209-215
- [7] 王常田, 申翼. 心肺转流对大鼠血浆和肺内基质金属蛋白酶-9 的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2011, 24(3): 242-245
- [8] Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities[J]. *Sci Signal*, 2008, 8(1): re6
- [9] Doroszko A, Hurst TS, Polewicz D, et al. Effects of MMP-9 inhibition by doxycycline on proteome of lungs in high tidal volume mechanical ventilation-induced acute lung injury [J]. *Proteome Sci*, 2010, 8(1): 3-16
- [10] Shapira L, Soskolne WA, Houry Y, et al. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide 2 induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(3): 825-

828

- [11] Waldow T, Witt W, Buzin A, et al. Prevention of ischemia/reperfusion-induced accumulation of matrix metalloproteinases in rat lung by preconditioning with nitric oxide[J]. J Surg Res, 2009, 152(2): 198-208

- [12] Sochor M, Richter S, Schmidt A, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 with doxycycline reduces pancreatitis-associated lung injury[J]. Digestion, 2009, 80(2): 65-73

[收稿日期] 2013-07-02

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。

2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。

3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定,建议采用顺序编码制。

4. 顺序编码制的要求如下:

(1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张xx[1] 研究发现……”,“李xx等[2]认为……”,“模型构建参考文献[3]”。

(2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:

主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者, 出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径

(3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。

(本刊编辑:接雅俐)