

D-半乳糖对大鼠肺组织 MMP-2 表达水平及 HA、LN 和 COL3 含量的影响及相关性分析

杨松昊, 朱光荣, 丁宁, 杨安宁, 蒋袁絮, 田珏, 姜怡邓, 杨晓玲

(宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川市 750004)

[关键词] D-半乳糖; 基质金属蛋白酶 2; 透明质酸; 层粘连蛋白; III 型胶原

[摘要] **目的** 探讨 D-半乳糖诱导大鼠衰老过程中对大鼠肺纤维化、肺组织基质金属蛋白酶 2(MMP-2) 表达水平及透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)和 III 型胶原(COL3)含量的影响, 并分析 MMP-2 与 HA、LN 和 COL3 的相关性。**方法** 将健康成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组和 D-半乳糖组。采用 HE 染色法观察两组大鼠肺组织形态学变化; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 法分别检测两组大鼠肺组织 MMP-2 mRNA 和蛋白表达水平的改变; 免疫组织化学法分析肺组织 MMP2 蛋白的表达水平; ELISA 法检测大鼠肺组织中 HA、LN 和 COL3 的含量, 并分析相关性。**结果** HE 染色结果发现 D-半乳糖组大鼠肺组织发生明显的纤维化改变; qRT-PCR 结果显示肺组织中 MMP-2 mRNA 表达水平高于对照组($P<0.05$); 免疫组织化学法和 Western blot 结果显示肺组织中 MMP-2 蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.05$); COL3 和 LN 含量高于对照组, 而 HA 含量低于对照组($P<0.05$)。相关性分析结果显示, 大鼠肺组织中 MMP-2 表达水平与 COL3、LN 呈正相关($r=0.2741, P<0.05$; $r=0.2841, P<0.05$), 而与 HA 呈负相关($r=-0.1782, P<0.05$)。**结论** D-半乳糖诱导大鼠衰老过程中可以引起肺组织发生纤维化改变, 同时增加大鼠肺组织 MMP-2 表达及 COL3 和 LN 含量, 降低 HA 的含量, 且 MMP-2 与 COL3、LN 和 HA 之间具有相关性, 可能为肺纤维化的早期诊断提供实验依据。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The D-galactose induced the expression of MMP-2 and the content of HA, LN, COL3 changes and correlation analysis in lung tissue of rats

YANG Song-Hao, ZHU Guang-Rong, DING Ning, YANG An-Ning, JIANG Yuan-Xu, TIAN Jue, JIANG Yi-Deng, YANG Xiao-Ling

(College of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] D-galactose; Matrix metalloproteinase-2; Hyaluronic acid; Laminin; Collagen type III

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of D-galactose on rat pulmonary fibrosis and matrix metalloproteinases (MMP-2) expression and the contents of the hyaluronic acid (HA), Laminin (LN), Collagen type III (COL3) in the lung tissue of rat, and to analyze the correlation between MMP-2 and HA, LN, COL3. **Methods** The SD rats were randomly divided into two groups: normal group and D-galactose group. Morphological changes of lung tissue were observed by HE staining in two groups of rats. The mRNA expression of MMP-2 in the lung tissue in each group was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The immunohistochemistry (IHC) and Western blot method were used to detect MMP-2 protein expression in lung tissue. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of HA, LN and COL3 in rat lung tissue, and the correlation between them was analysed. **Results** HE staining showed that the lung tissue of D-galactose group had obvious fibrosis changes. The mRNA and protein expression levels of MMP-2 in D-galactose induced group were higher than normal group ($P<0.05$), and the contents of COL3 and laminin (LN) were higher than normal rats, but the content of hyaluronic acid (HA) was lower than the normal groups ($P<0.05$). Correlation analysis results showed that the expression level of MMP-2 in the rats lung tissue was positively

[收稿日期] 2016-11-30

[修回日期] 2017-06-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81560242, 81360063); 宁夏教育厅项目(NGY2015092)

[作者简介] 杨松昊, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病理生理研究, E-mail 为 15035897854@163.com。通讯作者杨晓玲, 博士, 副教授, 研究方向为心血管病理生理研究, E-mail 为 yangwj04@126.com。

correlated with COL3 and LN, but negatively correlated with HA ($P<0.05$). **Conclusion** D-galactose can cause lung fibrosis changes in aged rats, and could increase the expression level of MMP-2 and the content of COL3 and LN, and decrease the content of HA in the rats lung tissue, and there is a correlation between MMP-2 and COL3, LN, and HA which may provide other diagnostic basis for the detection of pulmonary fibrosis.

D-半乳糖是动物体内一种普通的代谢产物,当机体细胞内大量半乳糖堆积,不能通过醛糖还原酶通路及时代谢时,在半乳糖氧化酶作用下,生成醛类并在反应过程中产生超氧阴离子,这些物质不能被细胞进一步代谢,细胞中脂质、蛋白和核酸产生的氧化应激、自由基损伤、非酶糖基化作用等导致细胞肿胀和功能障碍,引起全身各器官受损、系统功能衰退等一系列病理变化,最终促成衰老发生,D-半乳糖是目前常用的诱导动物衰老的药物^[1-3]。有研究报道老年人肺组织纤维化程度升高^[4],但D-半乳糖在诱导大鼠衰老过程中是否对肺组织纤维化有影响目前尚不清楚。近年研究表明,肺组织基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)是一种锌、钙离子依赖性的内肽酶,在肺纤维化过程中发挥重要作用^[5-6]。因此,本研究观察大鼠肺组织纤维化的变化和MMP-2表达水平的改变,为以D-半乳糖制备大鼠衰老肺纤维化模型提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

MMP-2 兔单克隆抗体(Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒(Takara 公司),总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);大鼠透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)和Ⅲ型胶原(collagen type Ⅲ, COL3)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(美国TSZ公司);HE染色试剂盒和超敏二步法免疫组织化学法检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)等。

1.2 大鼠分组和模型制作

由宁夏医科大学动物实验中心提供的20只SPF级健康成年(6月龄)雄性SD大鼠,体重240~260 g,随机分为对照组($n=10$)和D-半乳糖组($n=10$)。参照文献[7]造模方法,经皮下连续注射D-半乳糖(500 mg/kg) 45天,注射量10 mL/kg,建立衰老模型。使用3%戊巴比妥钠腹腔注射,麻醉数分钟后进行固定,打开并充分暴露胸腔,用镊子分

别夹取大鼠的左、右肺下叶1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm大小组织,右肺立即放入液氮备用。左肺于4%甲醛溶液中固定,1周后进行石蜡包埋与切片,每片厚度为5 μ m,组织切片分别平铺在载玻片上,然后放入37℃温箱中干燥24 h,之后放入4℃冰箱中保存备用。

1.3 实时荧光定量PCR检测MMP-2 mRNA表达变化

按照RNA提取试剂盒说明书提取肺组织总RNA,琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。按逆转录试剂盒说明书逆转录合成cDNA;在NCBI GenBank数据库中查询MMP-2,采用Primer5.0软件设计引物,MMP-2引物序列为:5'-AGA AGG CTG TGT TCT TCG CA-3'(上游)和5'-AAA GGC AGC GTC TAC TTG CT-3'(下游);内参选择GAPDH(购自上海生物工程有限公司);PCR条件:94℃预变性10 min;94℃变性30 s、58℃退火30 s、72℃延长30 s,扩增40个循环。待反应结束后,结合扩增曲线及溶解曲线,选择符合要求的qRT-PCR原始数据,结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析。

1.4 Western blot检测MMP-2蛋白表达变化

细胞裂解法提取肺组织总蛋白,BCA定量后,取总蛋白30 μ g,经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,80 V 30 min,120 V 60 min,15 V恒压转膜10 min,经一抗4℃过夜,二抗室温孵育2 h后,加入显色底物,以 β -actin为内参,凝胶成像分析仪上成像分析,计算灰度值的比值进行分析。

1.5 HE染色

将大鼠肺组织取出后,用生理盐水冲洗,将所取得的肺组织进行常规固定、脱水、包埋、切片,并进行苏木素-伊红染色(HE染色),显微镜下观察两组大鼠肺组织形态学变化。

1.6 免疫组化染色

切片经常规脱蜡,脱水,PBS洗3次,每次5 min,抗原处理后滴加一抗(MMP-2兔单克隆抗体),切片置于30℃恒温箱孵育60 min。再次经PBS洗脱后,滴加二抗(抗兔IgG),置于30℃15 min。PBS液洗后进行DAB显色5~10 min。染色后的切片经蒸馏水冲洗,滴加甲基绿复染细胞核。切片37℃烤箱脱水,二甲苯透明后用中性树脂

封固,镜下观察。

1.7 ELISA 法检测 HA、LN 和 COL3 含量改变

ELISA 试剂盒室温平衡 15 min,分别设空白孔、待测样品孔,空白孔加样品稀释液 100 μ L,余孔分别加标准品或待测样品 100 μ L(待测样品蛋白上样浓度统一为 21 g/L),37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,洗板 5 次,各 1 min,拍干。每孔加酶标液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,洗板 5 次,各 1 min,拍干。加显色试剂底物 A 和底物 B,37 $^{\circ}$ C 显色 15 min,加终止液,15 min 内,酶标仪上读取各孔 A₄₅₀ 值。

1.8 统计学处理

采用 Prism 6.0 统计软件对实验数据进行分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠肺组织病理变化

为明确 D-半乳糖诱导大鼠衰老过程中对大鼠肺纤维化的影响,使用 D-半乳糖皮下注射给药 45 天,诱导大鼠衰老模型,同时观察肺组织纤维化的变化。两组大鼠肺组织 HE 染色结果显示:对照组肺泡结构清晰,肺间质厚薄均匀,各结构完整(图 1);D-半乳糖组肺组织成纤维细胞增殖及大量细胞外基质聚集、组织结构破坏,HE 染色加深,发生肺纤维化(图 1)。

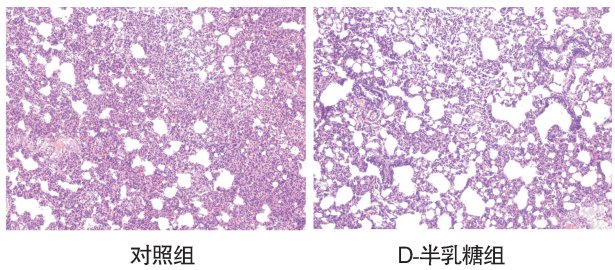


图 1. HE 染色观察大鼠肺组织形态学变化(100 \times)
Figure 1. The morphological changes of rats lung tissue were observed by HE staining(100 \times)

2.2 大鼠肺组织 MMP-2 mRNA 和蛋白表达改变

实时荧光定量 PCR 检测发现,D-半乳糖组大鼠肺组织中 MMP-2 mRNA 表达水平是对照组 1.4 倍;Western blot 检测发现,D-半乳糖组大鼠肺组织中 MMP-2 的蛋白表达水平是对照组大鼠 1.9 倍(*P*<0.05),提示 D-半乳糖诱导大鼠衰老过程中可以引起肺组织 MMP-2 改变(图 2)。

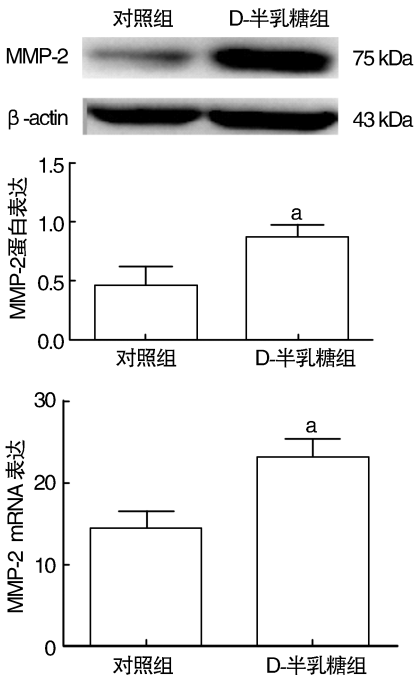


图 2. D-半乳糖对大鼠肺组织中 MMP-2 蛋白和 mRNA 表达的影响 a 为 *P*<0.05,与对照组比较。
Figure 2. Effects of D- galactose on the expression of MMP-2 protein and mRNA in lung tissue of rats

2.3 大鼠肺组织 MMP-2 蛋白表达定位

如图 3 所示,正常对照组无 MMP-2 蛋白表达,其肺脏组织呈均匀淡紫色,而 D-半乳糖组中其 MMP-2 阳性表达的胞浆呈深浅不一的棕褐色,提示 MMP-2 可能在 D-半乳糖诱导大鼠衰老过程中参与肺纤维化改变。

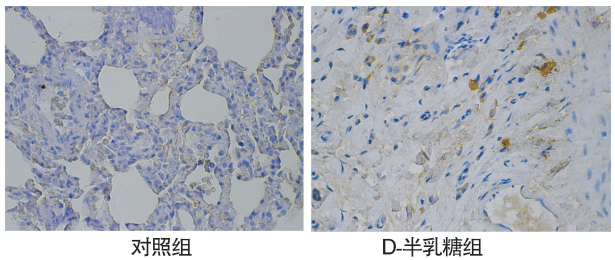


图 3. 免疫组织化学法分析大鼠肺组织中 MMP-2 蛋白表达(400 \times)
Figure 3. MMP-2 protein expression by immunohistochemical method in lung tissue of rats(400 \times)

2.4 大鼠肺组织 HA、LN 和 COL3 含量的改变

经 ELISA 法检测两组大鼠肺组织中透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)和Ⅲ型胶原(COL3)含量的改变,结果显示,D-半乳糖大鼠肺组织中 COL3 和 LN 含量高于对照组,而 HA 含量低于对照组大鼠(*P*<0.05)(图 4)。提示 D-半乳糖诱导大鼠衰老过程中可以引起肺组织纤维化改变。

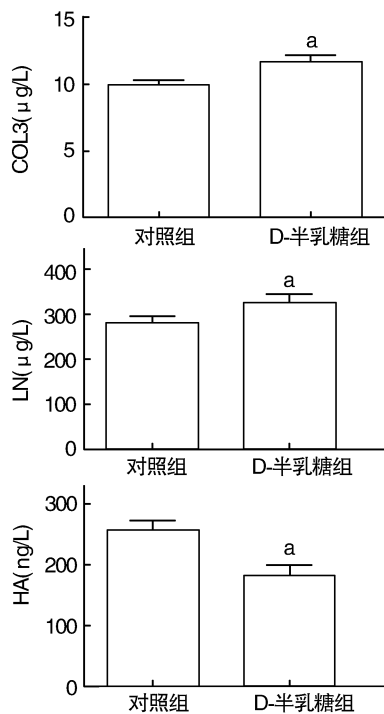


图 4. D-半乳糖对大鼠肺组织中 COL3、LN 和 HA 含量的影响 a 为 $P<0.05$, 与对照组相比较。

Figure 4. Effects of D- galactose on the contents of COL3, LN and HA in lung tissue of rats

2.5 肺组织 MMP-2 mRNA 表达与 COL3、LN 和 HA 含量的相关性分析

对两组大鼠肺组织中 MMP-2 mRNA 水平与 COL3、LN 和 HA 含量进行相关性分析,发现 MMP-2 水平与 COL3、LN 呈正相关($r=0.2741, P<0.05$; $r=0.2841, P<0.05$),而 MMP-2 水平与 HA 呈负相关($r=-0.1782, P<0.05$)(图 5)。

3 讨 论

衰老被认为是机体各部分组织器官功能逐渐减退的过程。然而长期给动物注射 D-半乳糖可导致细胞内渗透压的改变,细胞肿胀、代谢紊乱,从而造成机体衰老^[8]。文献^[9]指出大鼠连续给药 45 天能够表现出与 24~26 月龄老鼠相似的衰老表现,并且多项研究表明,D-半乳糖诱导衰老动物模型是比较成熟的刺激动物衰老的模型。然而,在 D-半乳糖运用于衰老模型复制过程中,是否对机体肺脏产生影响目前尚不清楚。因此,本次实验选用大鼠连续注射给药 D-半乳糖 45 天,观察 D-半乳糖对大鼠肺组织纤维化相关评价指标的影响。

肺纤维化的发生与细胞外基质(ECM)的沉积

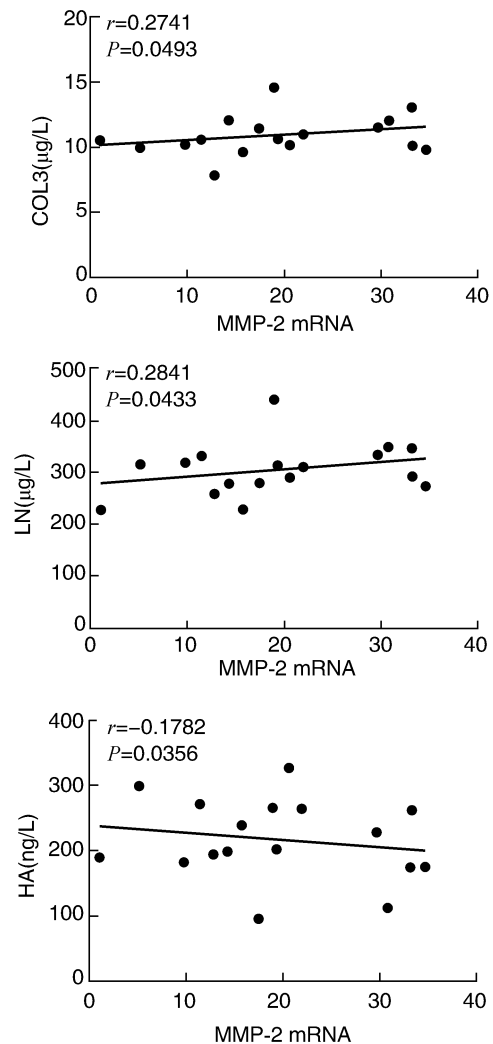


图 5. 大鼠肺组织 MMP-2 mRNA 表达水平与 COL3、LN 和 HA 含量的相关性分析

Figure 5. Correlation analysis between the expression level of MMP-2 mRNA and content of COL3, LN and HA in lung tissue of rats

有关^[10]。MMPs 是细胞外基质的主要降解酶,在肺脏炎症损伤与纤维化形成过程中有重要作用。研究发现,在博来霉素诱导的肺纤维化模型中发现,其可以增加肺组织中 MMPs 的含量^[11]。而在矽肺模型大鼠肺间质成纤维细胞中也发现 MMP-2 和 MMP-9 的表达上调^[12]。本实验结果显示,D-半乳糖处理的 SD 大鼠,肺组织中 MMP-2 mRNA 和蛋白表达均显著增加,免疫组织化学染色也得到了相似的结果,提示 D-半乳糖可以诱导大鼠肺组织 MMP-2 表达增加。

透明质酸(HA)是细胞外基质的重要组成部分,通过对透明质酸的检测,可以间接反映肺纤维化的发生^[13]。王佑娟等^[14]用放射免疫法测定肺纤

维化患者和正常人血清 HA 含量时发现,肺纤维化患者血清 HA 含量明显高于正常人,且其增高程度与肺功能损害程度密切相关。LN 是正常肺间质中的糖蛋白成分,主要分布于基底膜,与肺细胞的再生和支气管的发生密切相关^[15]。LN 能够诱导细胞黏着、生长与分化等,并能吸引、黏附肺上皮细胞、成纤维细胞及炎性细胞,刺激 T 淋巴细胞和巨噬细胞分泌而促进成纤维细胞和上皮细胞合成胶原,这就决定了 LN 在肺纤维化中的多重作用^[16]。本次结果显示,给大鼠注射 D-半乳糖后,肺组织 HA 在含量较对照组低,LN 含量明显高于对照组。胶原作为肺内 ECM 中最丰富的成分,主要有 I 型和 III 型胶原。研究表明在活动性纤维化早期主要以 III 型胶原(COL3)增加为主^[17],并出现不可逆的肺纤维化。本文结果同样显示,注射 D-半乳糖后,大鼠肺组织 COL3 含量明显高于对照组大鼠。进一步分析 MMP-2 与 HA、LN 和 COL3 的相关性,发现 MMP-2 的表达水平与 COL3、LN 含量呈正相关,与 HA 含量呈负相关,表明 D-半乳糖能够促进肺脏纤维化进程。

综上所述,D-半乳糖作为诱导动物衰老模型的主要药物,促进大鼠衰老的同时可以引起肺纤维化程度改变。本研究结果证实 D-半乳糖大鼠衰老过程中,大鼠肺组织中 MMP-2 mRNA 和蛋白表达均显著增加,且 MMP-2 的表达水平与 COL3、LN 与 HA 含量具有相关性。这为早期诊断和预防肺纤维化提供了新的途径,也为进一步研究 D-半乳糖诱导的衰老和肺纤维改变提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] 高莉,彭晓明,霍仕霞,等.毛蕊花糖苷改善 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用[J].中草药,2014,45(1):81-85.
- [2] 乔伟丽,杨文学,刘磊,等.外源性硫化氢减轻 D-半乳糖诱导的亚急性衰老大鼠血管老化[J].生理学报,2014,66(3):276-282.
- [3] 鞠文博,于春艳,陈建光. D-半乳糖致衰老小鼠模型的实验研究[J].北华大学学报,2015,16(2):199-202.
- [4] Jo HE, Randhawa S, Corte TJ, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and the elderly: diagnosis and management considerations[J]. Drugs Aging, 2016, 33(5): 321-334.
- [5] Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, et al. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5[J]. Science, 1997, 277(5323): 225-228.
- [6] 谢宝松,姚秀娟,郑冠英.特发性肺纤维化患者血清基质金属蛋白酶的检测及其临床意义[J].中华老年病杂志,2015,34(6):648-650.
- [7] 朱亚珍,朱虹光. D-半乳糖致衰老动物模型的建立及其检测方法[J].复旦学报:医学版,2007,34(4):617-619.
- [8] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model[J]. Mech Age Dev, 1999, 108(3): 239-251.
- [9] 李明伟,路军章.衰老机制与中药抗衰老研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(9):215-218.
- [10] Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, et al. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias[J]. Am J Res Criti Care Med, 2000, 162(5): 1 949-956.
- [11] Jin XG, Dai HP, Ding K, et al. Rapamycin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats and the expression of metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in lung tissue[J]. Chinese Medical J, 2014, 127(7): 1 304-309.
- [12] 王海涛,刘昊,颜京霞,等.矽肺模型大鼠肺间质成纤维细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达[J].医学争鸣,2005,26(19):1 751-753.
- [13] 孙达,苗淼,张玮. HA 与 IPF 发病机制关系的研究进展[J].中国医药导报,2008,18(5):28-29.
- [14] 王佑娟,曾莉,吴琴琴,等.特发性肺纤维化患者血中细胞外基质成分的变化及与肺功能指标的关系[J].实用医学杂志,2008,24(21):3 699-700.
- [15] Prez-Arellano JL, Pedraz MJ, Fuertes A, et al. Laminin fragment P1 is increased in the lower respiratory tract patients with diffuse interstitial lung diseases[J]. Chest, 1993, 104(4): 1 163-169.
- [16] Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis, ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis[J]. Am J Pathol, 1991, 138(5): 1 257-265.
- [17] 冷萍,付义,王一帆.中医药对特发性肺间质纤维化诊治的研究进展[J].中华中医药学刊,2016,34(4):801-803.

(此文编辑 朱雯霞)