

乌司他丁对矽肺大鼠肺组织病理状态与水通道蛋白1及基质金属蛋白酶表达的影响

卢乙众^{1*}, 李合华², 卢奕帆¹(1.新乡医学院第一附属医院药学部, 河南 卫辉 453100; 2.新乡医学院第一附属医院神经内科, 河南 卫辉 453100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1350-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.14

摘要 目的:研究乌司他丁对矽肺大鼠肺组织病理状态与水通道蛋白1(AQP-1)及基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9表达的影响。方法:取Wistar大鼠分为正常对照组、模型组和乌司他丁高、中、低剂量组(50×10^4 、 10×10^4 、 2×10^4 u/kg),每组20只。除正常对照组外,其余各组大鼠采用非暴露式气管内注入法灌注40 mg/mL的SiO₂混悬液1 mL建立矽肺模型;建模给药前1 h ip相应剂量的乌司他丁,连续给药3 d。采用苏木精-伊红染色观察各组大鼠肺组织矽结节病理情况;免疫荧光法检测肺组织中AQP-1的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应法检测肺组织中MMP-2、MMP-9 mRNA的表达;Western blot法检测肺组织中MMP-2、MMP-9蛋白的表达。结果:模型组大鼠肺组织可见明显矽结节出现,肺组织结构破坏严重;乌司他丁各剂量组大鼠可见含尘巨噬细胞灶,但肺纤维化程度较模型组明显减轻。与正常对照组比较,其余各组大鼠肺组织中AQP-1表达均降低,MMP-2、MMP-9 mRNA及蛋白表达均增强($P < 0.05$);与模型组比较,乌司他丁各剂量组大鼠肺组织中AQP-1表达均增加,MMP-2、MMP-9 mRNA及蛋白表达均减弱($P < 0.05$),其中高、中剂量组改善效果较低剂量组明显($P < 0.05$)。结论:乌司他丁能缓解矽肺模型大鼠病理状态,可上调肺组织中AQP-1表达和下调MMP-2、MMP-9表达。

关键词 乌司他丁;矽肺;大鼠;水通道蛋白1;基质金属蛋白酶

Effects of Ulinastatin on Pathological State of Lung Tissue and Aquaporin 1 and Matrix Metalloproteinase Expressions in Silicosis Rats

LU Yizhong¹, LI Hehua², LU Yifan¹(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Weihui 453100, China; 2.Dept. of Neurology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Weihui 453100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of ulinastatin on pathological state of lung tissue and aquaporin 1 (AQP-1) and matrix metalloproteinases (MMP-2), MMP-9 expressions in silicosis rats. METHODS: Wistar rats were divided into normal control group, model group, ulinastatin high-dose, medium-dose, low-dose groups (50×10^4 , 10×10^4 , 2×10^4 u/kg), 20 in each group. Except for normal control group, rats in other groups were given 40 mg/mL SiO₂ suspension 1 mL by non-exposed endotracheal perfusion to induce silicosis model; 1 h before modeling administration, corresponding doses of ulinastatin were intraperitoneally injected, for 3 d. Hematoxylin-eosin staining was used to observe silicon nodules in lung tissue of rats in each group; immunofluorescence method was used to detect AQP-1 expression in lung tissue; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method was used to detect MMP-2, MMP-9 mRNA expressions in lung tissue; Western blot method was used to detect MMP-2, MMP-9 protein expressions in lung tissue. RESULTS: There were obvious silicon nodules and serious structural damage in lung tissue in model group, ulinastatin groups showed macrophage foci visible dust, but pulmonary fibrosis was obviously reduced. Compared with normal control group, AQP-1 expression in lung tissue in other groups were reduced, MMP-2, MMP-9 mRNA and protein expressions were enhanced ($P < 0.05$). Compared with model group, AQP-1 expression in lung tissue in ulinastatin groups were increased, MMP-2, MMP-9 mRNA and protein expressions were decreased ($P < 0.05$), in which improvement effects in high-dose, medium-dose groups were superior to low-dose group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Ulinastatin can reduce the pathological state of silicosis rats, increase AQP-1 expression and decrease MMP-2, MMP-9 expressions.

KEYWORDS Ulinastatin; Silicosis; Rats; Aquaporin 1; Matrix metalloproteinases

矽肺是因长期吸入二氧化硅(SiO₂)粉尘所引起的以肺组织弥漫性纤维化为主要特征的全身性疾病,其发病机制尚未明确。目前我国接触矽尘的人数、新增矽肺患者数及现患矽肺病例数均居世界第一,已严重危害到

人们的生命健康,成为我国最严重的职业病之一^[1-2]。临床治疗经验表明,矽肺病变特点主要为肺内矽结节形成及肺间质的广泛纤维化。在这复杂的病变形成过程中,一些细胞因子或蛋白,如水通道蛋白1(AQP-1)及基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9在矽肺纤维化的发生发展中发挥了关键作用,MMP-2及MMP-9基因与蛋白的

* 副主任药师。研究方向:药事管理、临床药学。电话:0373-4402847。E-mail:luyizhongxb@126.com

表达变化可能与矽肺纤维化密切相关^[3-4]。本文旨在研究乌司他丁对矽肺模型大鼠肺组织 AQP-1 及 MMP-2、MMP-9 表达的影响及意义,探讨乌司他丁对矽肺的治疗作用。

1 材料

1.1 仪器

XP-202E 电子显微镜(上海美轩生物科技有限公司);DM6000M 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 药品与试剂

乌司他丁注射液(广东天普生化医药股份有限公司产,批号:H19990133,规格:每支 10^5 U);水合氯醛(郑州优然食品配料有限公司);SiO₂(上海晟浦信息科技发展有限公司);胎牛血清(FBS,美国 Couler 公司);25%胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);DMEM/F12(美国 Sigma 公司);实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)、蛋白免疫印迹(Western blot)试剂盒(美国 Hyclone 公司);兔抗人 AQP-1、MMP-2、MMP-9 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);生物素化抗兔免疫球蛋白 G(IgG)、Cy2 标记链霉亲和素(上海钰森生物技术有限公司);羊抗兔 IgG 抗体(上海研生实业有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,上海鲁汶生物科技有限公司);苏木精-伊红(HE,上海锐赛开展生物技术有限公司)。

1.3 动物

Wistar 大鼠,1 月龄,♂,体质量为 212~230 g,采购于河南医科大学动物实验室,动物许可证号为 SCXK(豫)2010-1-0002。实验中对大鼠的处置方法符合动物伦理学要求。

2 方法

2.1 大鼠矽肺模型的建立

取大鼠,用 3.5% 的水合氯醛麻醉后固定,采用非暴露式气管内注入法将 SiO₂ 混悬液 1 mL(以生理盐水制成 40 mg/mL 的混悬液,灭菌后加青霉素 2 000 u/mL,以防止肺部感染)缓慢注入气管。于灌注后第 14 天处死 3 只大鼠,取大鼠右肺,肉眼观察和手指触摸有异常的肺组织,用 10% 中性缓冲福尔马林液固定,脱水后常规石蜡包埋。

2.2 分组与给药

实验分为正常对照组、模型组和乌司他丁高、中、低剂量组(50×10^4 、 10×10^4 、 2×10^4 u/kg)^[5-6],每组 20 只。正常对照组大鼠注入等量的灭菌生理盐水(临用前加青霉素 2 000 u/mL);其余各组大鼠灌注 SiO₂ 混悬液 1 mL,乌司他丁各剂量组大鼠于灌注 SiO₂ 混悬液后,ip 相应剂量的乌司他丁,均连续给药 3 d。

2.3 HE 染色观察肺组织病理学变化

末次给药后处死大鼠,固定,取右肺组织,置于 10% 中性福尔马林中固定 24 h 后依次进行常规梯度乙醇(100%乙醇-95%乙醇-80%乙醇)脱水,自来水冲洗;苏木精染色 5~10 min,自来水冲洗;在 0.5% 的盐酸乙醇溶

液中分化 1~2 s,温水浸泡冲洗;置于伊红中染色 30 s,自来水冲洗;分别在 95%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、100%乙醇中依次脱水,透明,切片烘干,封片,置于光镜下观察肺组织病理学变化。

2.4 免疫荧光法检测肺组织中 AQP-1 表达

将大鼠肺组织切片放入兔抗人 AQP-1 多克隆抗体(稀释比例 1:500)中,4 ℃下孵育过夜后,放入生物素化抗兔 IgG、Cy2 标记链霉亲和素混合液中,室温孵育 1 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 遍,固定,以 DAPI 对细胞核进行染色。DAPI 本身呈蓝色,DAPI 阳性表达(即 AQP-1 表达)呈绿色。采用倒置荧光显微镜进行观察,并计算 DAPI 阳性率(阳性率=DAPI 阳性细胞数/全部细胞数 $\times 100\%$)。

2.5 RT-PCR 检测肺组织中 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达

分离肺泡壁单个核细胞后在 4 ℃下 2 000 $\times g$ 离心 20 min,弃上清液,PBS 冲洗 3 次,通过 Trizol 法提取总 RNA。根据 PCR 试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。引物由 Gene Bank 基因公司合成,序列设计:MMP-2 上游引物为 5'-GGTGAGAGGTCTAGTTCCCGA-3',下游引物为 5'-CCATGAACCTTTCTGCTCTTC-3',扩增片段为 327 bp;MMP-9 上游引物为 5'-TGTATG-GTCGTGGCTCAA-3',下游引物为 5'-TTGGCTTCCT-CCGTGATT-3',扩增片段为 329 bp;内参 β -actin 上游引物为 5'-GTCCCTCACCTCCCAAAAG-3',下游引物为 5'-GCTGCCTCAACACCTCAACCC-3',扩增片段为 185 bp。PCR 反应条件:95 ℃变性 3 min,94 ℃变性 10 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 40 周期,72 ℃延伸 7 min。产物于 4 ℃保存,试验重复 3 次。取 5 mL 的 PCR 产物进行电泳,以 β -actin 为内参,采用 Image-Pro Plus 8.0 软件分析条带灰度值,以目标条带与内参条带的灰度值的比值作为目标基因的相对表达量。

2.6 Western blot 检测肺组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达

将“2.5”项下提取残留物通过 1 500 r/min(离心半径 10 cm)离心 30 min,取上清为粗体蛋白,总蛋白质浓度通过考马斯亮兰法(Bradford 法)测定。将膜浸没在 Western blot 封闭液 II(TBST 溶解的 5% 脱脂奶粉,pH 7.5)中,在室温下轻摇 30 min。用 Western blot 封闭液 II 稀释兔抗人 MMP-2、MMP-9 多克隆抗体(稀释比例 1:2 000),室温下孵育 1 h,TBST 洗膜 10 min $\times 3$ 次,加入羊抗兔 IgG 抗体(稀释比例 1:2 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min $\times 3$ 次。膜用 1 mL 增强化学发光(ECL)试剂反应 3 min,曝光 1 min,显影 2 min,定影。用 Quantity One 图像分析 MMP-2、MMP-9 与相应内参 β -actin 条带吸光度的比值,作为目标蛋白的相对表达量。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均采用 SPSS 13.0 软件进行处理,

多组间比较采用 q 检测及单因素方差分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肺组织病理学变化

与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织可见明显砂结节出现,砂结节内有碳末沉积,周边部纤维母细胞增生,肺组织层状纤维化伴透明样变化;乌司他丁高、中、低剂量组大鼠可见含尘巨噬细胞灶。与模型组比较,乌司他丁高、中、低剂量组大鼠的肺纤维化程度明显减轻,其中乌司他丁高、中剂量组减轻程度较乌司他丁低剂量组明显。各组大鼠肺组织的病理学变化图见图1。

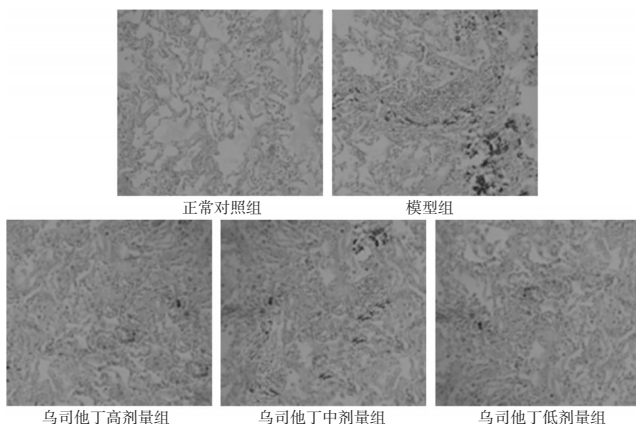


图1 各组大鼠肺组织的病理学变化图(HE, $\times 400$)

Fig 1 Pathological changes in lung tissue of rats in each group (HE, $\times 400$)

3.2 大鼠肺组织中AQP-1表达

正常对照组、模型组和乌司他丁高、中、低剂量组大鼠肺组织中AQP-1的表达量分别为 4.64 ± 0.16 、 1.63 ± 0.10 、 3.47 ± 0.14 、 3.39 ± 0.12 、 2.15 ± 0.13 。与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织中AQP-1表达降低($P<0.05$)。与模型组比较,乌司他丁高、中、低剂量组大鼠肺组织中AQP-1表达增强($P<0.05$),其中乌司他丁高、中剂量组减轻程度较乌司他丁低剂量组明显($P<0.05$)。各组大鼠肺组织中AQP-1表达的荧光图见图2。

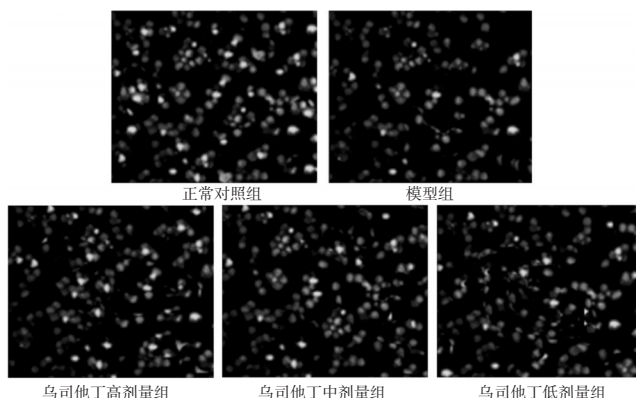


图2 各组大鼠肺组织中AQP-1表达的荧光图($\times 400$)

Fig 2 Fluorescence diagram of AQP-1 expression in lung tissue of rats in each group ($\times 400$)

3.3 大鼠肺组织中MMP-2、MMP-9 mRNA与蛋白表达

与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织中MMP-2、MMP-9 mRNA与蛋白表达均增强($P<0.05$)。与模型组比较,乌司他丁高、中、低剂量组大鼠肺组织中MMP-2、MMP-9 mRNA与蛋白表达均减弱($P<0.05$),其中乌司他丁高、中剂量组表达减弱程度较乌司他丁低剂量组明显($P<0.05$)。各组大鼠肺组织中MMP-2、MMP-9 mRNA表达的电泳图见图3,蛋白表达电泳图见图4,测定结果见表1。

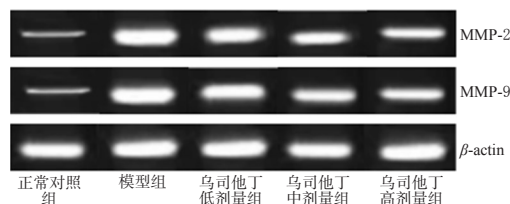


图3 各组大鼠肺组织中MMP-2、MMP-9 mRNA表达的电泳图

Fig 3 Electrophoresis chart of MMP-2, MMP-9 mRNA expressions in lung tissue of rats in each group

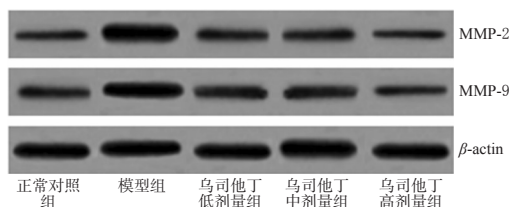


图4 各组大鼠肺组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoresis chart of MMP-2, MMP-9 protein expressions in lung tissue of rats in each group

表1 各组大鼠肺组织中MMP-2、MMP-9 mRNA及蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab 1 Determination results of MMP-2, MMP-9 mRNA and protein expressions in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=20$)

| 组别 | MMP-2 | | MMP-9 | |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | mRNA | 蛋白 | mRNA | 蛋白 |
| 正常对照组 | 0.34 ± 0.07 | 0.53 ± 0.14 | 0.61 ± 0.13 | 0.72 ± 0.10 |
| 模型组 | $1.47 \pm 0.10^*$ | $1.91 \pm 0.12^*$ | $1.63 \pm 0.12^*$ | $2.05 \pm 0.11^*$ |
| 乌司他丁高剂量组 | $0.54 \pm 0.11^{*A}$ | $0.92 \pm 0.12^{*A}$ | $0.64 \pm 0.14^{*A}$ | $1.01 \pm 0.12^{*A}$ |
| 乌司他丁中剂量组 | $0.56 \pm 0.12^{*A}$ | $0.95 \pm 0.13^{*A}$ | $0.65 \pm 0.10^{*A}$ | $1.04 \pm 0.13^{*A}$ |
| 乌司他丁低剂量组 | $0.72 \pm 0.10^{\#}$ | $1.34 \pm 0.11^{\#}$ | $0.96 \pm 0.12^{\#}$ | $1.42 \pm 0.14^{\#}$ |

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$;与乌司他丁低剂量组比较, $^{\Delta}P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$; vs. model group, $^{\#}P<0.05$; vs. ulinastatin low-dose group, $^{\Delta}P<0.05$

4 讨论

他汀类药物是一种广谱蛋白酶抑制剂,主要用于控制血液中胆固醇的含量以及预防心血管疾病。乌司他丁是羟甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂,分子量为67 000 D的糖蛋白,可抑制胰蛋白酶、透明质酸酶等的活性,能

2,4,6-三硝基苯磺酸和葡聚糖硫酸钠诱导的大鼠肠炎模型比较

曾健梅^{1*}, 黄敏聪¹, 李杨玲², 张博², 林能明^{1,2#} (1. 浙江中医药大学附属杭州市第一人民医院临床药理学研究室, 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学附属杭州市第一人民医院转化医学研究中心临床药理学研究室, 杭州 310006)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1353-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.15

摘要 目的:比较2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)和葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的两种肠炎大鼠模型。方法:SD大鼠随机分为正常对照组、TNBS模型组和DSS模型组,每组10只。TNBS模型组大鼠采用TNBS 50%乙醇溶液以100 mg/kg一次性灌肠法建立肠炎模型,DSS模型组大鼠采用4% DSS水溶液连续7 d自由饮用建立肠炎模型。观察各组大鼠一般情况,检测血清总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)含量、结肠长度及质量、结肠组织中髓过氧化物酶(MPO)活性,肉眼观察结肠大体外观形态,苏木精-伊红染色观察结肠病理学变化。结果:与正常对照组比较,TNBS模型组大鼠体质量明显减轻,结肠长度明显缩短、单位长度质量明显增加,粪便性状评分、血清TG含量、MPO活性、结肠大体外观评分和病理学评分均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);DSS模型组大鼠体质量明显减轻,结肠长度明显缩短,粪便性状和结肠病理学评分均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与DSS模型组比较,TNBS模型组大鼠结肠长度明显缩短、单位长度质量明显增加,血清TC、TG含量和结肠大体外观评分、病理学评分明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),组织病理学检查可见明显肠道溃疡与粘连。结论:DSS诱导肠炎模型大鼠粪便评分较TNBS诱导模型低,TNBS诱导肠炎模型大鼠在肠道组织损伤方面较DSS诱导模型更严重、恢复更慢。

关键词 2,4,6-三硝基苯磺酸;葡聚糖硫酸钠;结肠炎;大鼠;5-氨基水杨酸

通过阻止炎症细胞聚集、抑制炎症介质的过度释放、清除氧自由基,起到减轻创伤、休克、多器官功能不全时器官组织的进一步损害及改善微循环和组织灌注等药理作用。已有多项研究表明乌司他丁在肺纤维化发病过程中发挥着重要的作用^[7-8]。

AQP-1是与水通透性有关的细胞膜转运蛋白,广泛分布于哺乳动物和植物细胞膜上。AQP-1在多种器官的生理和病理中发挥着重要作用,其主要功能是介导自由水被动跨生物膜转运,对保持细胞内外环境的稳态平衡起重要作用。研究发现,肺组织AQP-1表达下降可能造成肺泡内水分清除下降、肺部水代谢失衡,导致炎症水肿的进一步发生、发展^[9]。

本研究结果表明,乌司他丁可缓解矽肺大鼠肺组织病理状态,上调肺组织中AQP-1表达和下调MMP-2、MMP-9表达。

参考文献

[1] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection[J]. *Biol Pharm*

* 硕士研究生。研究方向:肿瘤药理学。电话:0571-56007809。E-mail:1429880171@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:肿瘤药理学。电话:0571-56007809。E-mail:lnm1013@163.com

Bull, 2012, 35(10):1752-1760.

- [2] Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(1):1-15.
- [3] 薛洋,周清华,张尚福,等. MMP-2、MMP-9在肺癌中的表达及其与肺癌转移和预后关系的研究[J]. *华西医学*, 2008, 23(2):225-226.
- [4] 石晓明,吴胜春,唐雷,等. 结肠癌组织AQP1与MMP-2、MMP-9、TIMP-1表达的关系及意义[J]. *河北医药*, 2013, 35(5):653-654.
- [5] 周从阳,谢姝,罗雅娟,等. 百草枯中毒大鼠肺组织中的4-羟基壬烯醛表达和乌司他丁的影响[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2012, 30(6):457-459.
- [6] 王刚,陈安宝,胡强,等. 乌司他丁对急性百草枯中毒大鼠的影响[J]. *广东医学*, 2013, 34(5):687-690.
- [7] 毛刚,吴清安,刘磊. 乌司他丁的药理作用机制及临床应用进展[J]. *山东医药*, 2015, 55(30):94-96.
- [8] 凌成亮. 乌司他丁临床研究进展[J]. *现代临床医学*, 2013, 39(4):243-244.
- [9] 张静,马宏博,司国民,等. 加味清营颗粒对急性肺损伤大鼠肺组织AQP-1表达的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2014, 9(12):1289-1295.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-22)

(编辑:邹丽娟)