

·论著·

肺高压肺血管重建大鼠基质金属蛋白酶1基因表达

秦玉明,周爱卿,贲晓明,沈捷,梁瑛,李奋

(上海第二医科大学附属新华医院儿科医学研究所,上海 200092)

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶1(MMP-1)基因表达与肺高压形成的关系。方法 利用野百合碱(monocrotaline MCT)诱导的大鼠肺高压动物模型,经导管介入测定大鼠肺动脉平均压力,逆转录定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测不同时间点大鼠肺组织 MMP-1 mRNA 相对表达水平。结果 实验第3周肺动脉压力已明显升高,以第4周为最高,而大鼠肺组织 MMP-1 mRNA 表达水平以实验第2周最为明显,第3、4周表达水平下调,但仍高于第1周。结论 MMP-1 早期基因表达升高参与细胞外基质屏障的降解,对肺血管重建可能起了触发作用,实验后期表达水平下调可能是导致细胞外基质积聚的重要原因之一。

[关键词] 肺高压;基质金属蛋白酶1;基因表达;大鼠

[中图分类号] R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2001)01-0032-03

Gene Expression of MMP-1 of Pulmonary Vascular Remodeling
in Rats with Pulmonary Hypertension

QIN Yu-Ming, ZHOU Ai-Qing, BEN Xiao-Ming, et al.

Pediatrics Reseach Institute, Xinhua Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Abstract : **Objective** To explore the etiology of pulmonary hypertension with relation to the pulmonary expression of matrix metalloprotease1 (MMP-1). **Methods** The pulmonary hypertension animal models were induced by monocrotaline (MCT), the pulmonary arterial pressure was measured by cathetrization, and the pulmonary MMP-1 mRNA expression was studied by RT-PCR. **Results** The pulmonary arterial pressure increased significantly in the 3rd week after the induction of MCT and reached the peak in the 4th weak; the pulmonary MMP-1 mRNA expression increased significantly in the 2nd week and then decreased greatly in the 3rd week, and still it was higher than that in the 1st weak. **Conclusions** Changed MMP-1 expression might play a part in the development of pulmonary hypertension. MMP-1 overexpression might play the role of target during the earlier stage of pulmonary arterial remodeling.

Key words : Pulmonary hypertension; MMP-1; Gene expression; Rat

肺动脉高压(简称肺高压)是小儿先天性心脏病常见并发症,严重影响患儿的预后和治疗,其发病机制目前尚未完全阐明。细胞外基质重建是肺高压形成过程中一个重要环节,它与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMPs)的关系越来越受到人们的重视。本研究以野百合碱(monocrotaline, MCT)诱导大鼠肺高压为模型,探讨 MMP-1 基因表达与肺高压的关系,为先天性心脏病并发肺高压的临床防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 48 只,出生 6 周左右,体重 120 ~ 130 g,由中国科学院上海实验动物所提供。

1.2 试剂及仪器

野百合碱为 Sigma 公司产品。总 RNA 提取试剂盒(Total RNA Isolation System)、olig (dt) 15

[收稿日期] 2000-05-15; [修回日期] 2000-08-12
[作者简介] 秦玉明(1964-),男,医学博士,主治医师。

pimers, Taq 酶、PCR Markers, 琼脂糖等均为 Sangon 产品。逆转录试剂盒是 Bioneer 产品。主要仪器包括心电监护仪、自制肺动脉压力测定导管、PCR 仪 (PERKIN ELMER gengAmp PCRsystem 2400)、凝胶成像系统 (BioRAD Fluor-STM Multilmager)。

1.3 大鼠肺高压模型的建立及肺动脉压力测定

参照 Arcot 等^[1]的方法建立肺高压模型,48 只大鼠随机分为模型组和对照组,模型组 24 只于背部皮下一次性注射 MCT 60 mg/kg。对照组 24 只同样于背部皮下一次性注射等量生理盐水。大鼠接受注射后第 1,2,3,4 周,即第 7,14,21,28 d 等 4 个不同时间点,分别从两组大鼠中随机选择 6 只,大鼠称重后,用 5% 苯巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射,后将大鼠固定在手术台上,局部消毒,做右侧颈部纵切口长约 0.5 cm,分离右颈外静脉,在其上剪一小口,插入充满含肝素生理盐水的导管,导管的另一端通过三通管连接压力转换器,压力转换器与心电监护仪相连。当导管经右心房进入右心室,压力会突然升高,再向前送入导管少许,出现典型的肺动脉压力波形,待波形稳定后立刻记取肺动脉平均压力,撤出导管,结扎颈外静脉,超大剂量苯巴比妥钠处死动物,迅速开胸,取右肺上叶组织约 50 mg,经 1% DEPC 水处理后迅速投入液氮,后转入 -80℃ 冰箱保存。

1.4 肺组织总 RNA 提取及 cDNA 合成

用柱式总 RNA 抽提试剂盒 (Watson) 提取肺组织总 RNA。采用 20 μl 逆转录反应体系,含待测 RNA 1 μg,oligo (dT) 0.1 μg,57℃ 变性 10 min,42℃ cDNA 合成 60 min,95℃ 灭活逆转录酶 5 min。

1.5 共扩增定量 PCR 及扩增产物定量分析

MMP-1 引物设计参照 Genebank 资料,引物序列如下:MMP-1,5' primer (sense) 5'-GGTG-GCCAGAATA GCTGAATG-3';3' primer (anti-sense) 5'-GCGTTTTTGATATGCC 3',PCR 反应体系为 25 μl,内含 cDNA 2 μl,10×缓冲液 2.5 μl,4×dNTP (2 mmol) 1 μl,MMP-1 和内参照 GAPDH 上、下游引物 (mmol/L) 各 1 μl,Taq 酶 2 U,用去离子水补至 25 μl。PCR 反应在 0.2 ml 薄壁管中进行,反应参数为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,61℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环后 72℃ 延伸 3 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,MMP-1 和 GAPDH 的扩增产物分别为 251 bp 和 349 bp,并用凝胶成像系统进行定量分析,用 MMP-1/GAPDH 的辉度比值表示 MMP-1 的相对表达水平。

1.6 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),行 F , q 检验及 t 检验, $P < 0.05$ 有意义,统计过程全部由 SAS 软件完成。

2 结果

2.1 两组大鼠肺动脉平均压力

对照组大鼠于 4 个不同时间点之间无显著性差异。模型组大鼠于第 1 周和第 2 周肺动脉平均压无明显升高,与对照组相比 $P > 0.05$,而第 3 周压力已明显升高,与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。第 4 周压力继续升高,与对照组相比 $P < 0.01$ 。模型组于 4 个不同时间点之间比较有显著性差异 $P < 0.01$ (见表 1)。

表 1 不同时间点两组大鼠肺动脉平均压力

Table 1 Mean pulmonary artery pressure of rats in the two groups at different time points (kPa)

组别	n	不同时间点				不同时间点比例 F 值
		1 周	2 周	3 周	4 周	
对照组	24	1.88 ± 0.22	1.91 ± 0.18	2.01 ± 0.20	2.19 ± 0.27	2.74
模型组	24	1.92 ± 0.23	2.19 ± 0.25	3.42 ± 0.53	4.55 ± 0.58	5.32 ^c
t 值		0.61	0.72	2.481 ^a	4.012 ^b	

注:与对照组比较 a $P < 0.05$; b $P < 0.01$; 模型组不同
时间点比较 c $P < 0.01$

2.2 两组大鼠肺组织 MMP-1 基因表达的相对水平 (以 MMP-1/GAPDH 表示)

对照组大鼠于 4 个不同时间点均可见 MMP-1 基因表达,各时间点之间无显著性差异。模型组大鼠第 1 周 MMP-1 基因表达水平无明显改变,而第 2 周其表达水平显著上调并达高峰,与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$),第 3 周则快速下调,但仍高于对照组 ($P < 0.05$),第 4 周则维持在第 3 周水平 (表 2 和图 1,2)。

表 2 不同时间点两组大鼠肺 MMP-1 基因表达

Table 2 Gene expression of rats in the two groups at different time points

组别	n	不同时间点				不同时间点比例 F 值
		1 周	2 周	3 周	4 周	
对照组	24	0.38 ± 0.08	0.39 ± 0.05	0.35 ± 0.06	0.37 ± 0.07	2.67
模型组	24	0.37 ± 0.10	0.72 ± 0.15	0.50 ± 0.11	0.47 ± 0.07	6.01 ^c
t 值		0.53	4.89 ^b	3.12 ^a	2.91 ^a	

注:与对照组比较 a $P < 0.05$; b $P < 0.01$; 模型组不同
时间点比较 c $P < 0.01$

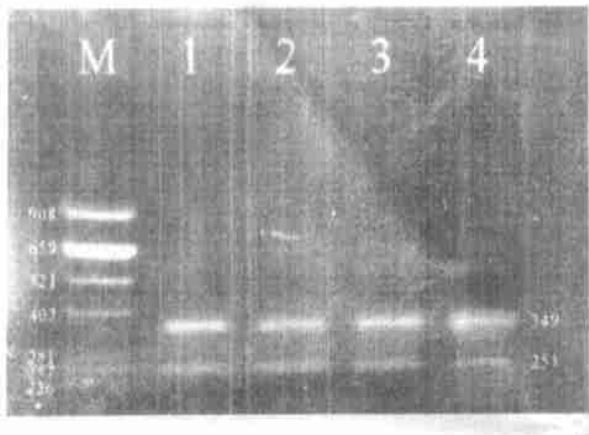


图 1 对照组各时间点 MMP-1 基因表达

Figure 1 Expression of rats in the control group

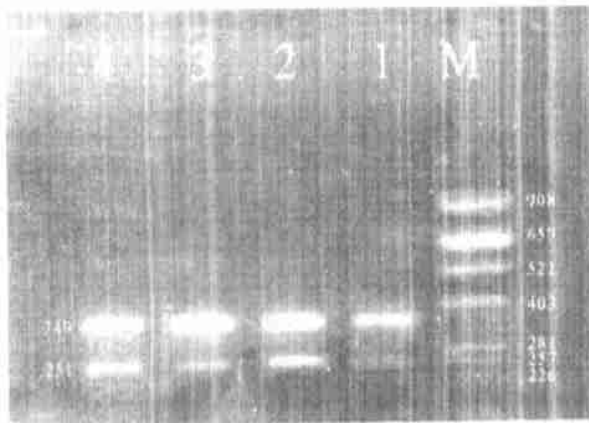


图 2 实验组各时间点 MMP-1 基因表达

Figure 2 Expression of rats in the model group

注:图 1、2 中 1~4 分别为实验第 1、2、3、4 周,M 为 PCR 分子量标准

3 讨论

血管的完整性与稳定性有赖于细胞外基质合成与降解之间的平衡,基质金属蛋白酶家族及其特异性组织抑制剂是维持这种平衡最重要的因素之一。先天性心脏病,尤其是左向右分流型,持续增多的肺血流量可破坏这种平衡,导致肺血管结构重建,形成不可逆性肺高压,其确切机制尚不清楚,但在此过程中必然存在细胞外基质积聚以及血管平滑肌细胞的增殖和迁移,且需要分解细胞外基质屏障^[2]。胶原是细胞外基质的主要成分,它的分解主要依靠基质金属蛋白酶家族(MMPs)中的胶原酶(包括 MMP-1,MMP-8,MMP-13)^[3]。本研究结果表明,MMP-1 基因表达水平升高发生于大鼠接受 MCT 注射第 1 周以后,在第 2 周最为明显,以后表达水平下降,但仍高于对照组。对照组大鼠各时间点 MMP-1 表达水平无显著性差异。大鼠肺动脉平均压的升高则发

生在注射 MCT 第 2 周后,到第 3 周已显著升高,以后继续升高。由此可以看出 MMP-1 基因过度表达的发生时间早于肺动脉高压的形成,提示 MMP-1 可能参与早期细胞外基质屏障的降解,对肺高压肺血管重建起了触发作用^[4]。MMP-1 基因过度表达的机制可能是 MCT 选择性作用于肺血管内皮细胞,破坏其屏障功能^[5],使一些细胞因子,如白介素 1(IL-1),血小板衍生生长因子(PDGF),肿瘤坏死因子(TNF)等渗入到内皮下层,刺激包括 MMP-1 在内的多种胶原酶基因表达与合成^[6]。实验后期,MMP-1 基因表达则由早期的高水平逐渐下调,肺血管细胞外基质合成超过了降解,基质不断积聚,造成管腔狭窄,结果肺动脉压力持续升高。下调 MMP-1 基因表达的机制可能与 MMPs 的组织特异性抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteases, TIMPs)酶活性及基因表达水平逐渐升高从而抑制 MMP-1 的基因表达有关^[7]。本结果提示 MMP-1 参与了肺高压肺血管重建的全过程,抑制其早期过度表达或提高其后期的表达水平可能有助于肺高压形成的抑制及逆转。

[参 考 文 献]

[1] Zhu LD, Wigle D, Hinek A, et al. The endogenous vascular elastase that governs development and progression of monocrotaline - induced pulmonary hypertension in rats is a novel enzyme related to the serine proteinase adipsin [J]. J Clin Invest, 1994, 94(3): 1163 - 1171.

[2] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM, et al. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease [J]. Circ Res, 1995, 77(3): 863 - 868.

[3] Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, et al. A novel/ tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen [J]. J Biol Chem, 1999, 274(36): 25371 - 25378.

[4] Tozzi CA, Thakker - Varia S, Shiu Y, et al. Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 18(2): 497 - 510.

[5] Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling [J]. Annu Rev Physiol, 1997, 59(1): 89 - 144.

[6] Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, et al. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(11): 2065 - 2074.

[7] Hughes CE, Little CB, Buttner FH, et al. Differential expression of aggrecanase and matrix metalloproteinase activity in chondrocytes isolated from bovine and porcine articular cartilage [J]. J Biol Chem, 1998, 273(46): 30576 - 30582.

(本文编辑:黄榕)