

## SC514对ARDS模型大鼠肺组织中MMP-2/9表达的影响

马扬杰<sup>1</sup>, 苏盈<sup>1</sup>, 韦凌云<sup>1</sup>, 廖品琥<sup>2</sup>

(1. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;

2. 广西壮族自治区卫生健康委员会, 广西 南宁 530021)

**摘要:**目的 探究转录核因子 kappa B(NF-κB)信号通路的抑制剂 SC514 对急性呼吸窘迫综合征(ARDS)大鼠模型肺组织中的基质金属蛋白酶-2/9(MMP-2/9)表达的影响。方法 培养 SPF 级 SD 大鼠,随机分为空白对照(NC)组、脂多糖(LPS)组、生理盐水对照(CTL)组和 LPS+SC514 组,HE 染色及免疫组化法观察大鼠肺组织病理变化,使用 Western Blot 法检测 p65 磷酸化水平和 MMP-2/9 蛋白表达水平,RT-qPCR 法检测 ARDS 模型大鼠的肺组织中 MMP-2/9 转录水平。结果 与 NC 组大鼠相比,ARDS 模型大鼠肺组织 p65 磷酸化水平明显上升,肺组织中的 MMP-2/9 表达及转录水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 LPS 组相比,LPS+SC514 组 p65 磷酸化水平被抑制,肺组织中 MMP-2/9 蛋白表达减少,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 SC514 可抑制 LPS 诱导的 ARDS 模型大鼠中 MMP-2/9 的表达。

**关键词:**急性呼吸窘迫综合征;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-9;NF-κB 通路

**中图分类号:**R563.8;R341.31

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-5817(2020)02-0147-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.003

### Effect of SC514 on MMP-2/9 expression in lung tissue of ARDS model rats

Ma Yangjie<sup>1</sup>, Su Ying<sup>1</sup>, Wei Lingyun<sup>1</sup>, Liao Pinhu<sup>2</sup>

(1. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,

Guangxi, China; 2. Health Committee of Guangxi Zhuang Autonomous

Region, Nanning 530021, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of SC514, an inhibitor of transcription nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway, on the expression of matrix metalloproteinase-2/9 (MMP-2/9) in lung tissues of rats with acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods** SPF grade SD rats were cultured and randomly divided into blank control (NC) group, lipopolysaccharide (LPS) group, normal saline control (CTL) group and LPS+SC514 group. HE staining and immunohistochemistry were used to observe the pathological changes of lung tissues in rats. Western Blot method was used to detect p65 phosphorylation level and MMP-2/9 protein expression. The transcription level of MMP-2/9 in lung tissues of ARDS model rats was detected by RT-qPCR method. **Results** Compared with the NC group, p65 phosphorylation level in the lung tissues of ARDS model rats increased significantly, and MMP-2/9 expression and transcription level in the lung tissues increased significantly, and all the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the LPS group, the phosphorylation level of p65 in the LPS+SC514 group was inhibited, and MMP-2/9 protein expression in the lung tissues was reduced, and all the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** SC514 can inhibit the expression of MMP-2/9 in ARDS model rats induced by LPS.

**Key words:** ARDS; MMP-2; MMP-9; NF-κB pathway

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81560321)

**第一作者简介:**马扬杰(1993-),男,在读硕士研究生,研究方向:呼吸内科学,E-mail:mayangjie93@163.com

**通讯作者简介:**廖品琥(1967-),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:呼吸内科学,E-mail:liaopinhu@163.com

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)为危重症科常见疾病,病死率为 40%<sup>[1]</sup>。即使在之前的二十年中,其诊治手段获得了极大的进步,但其死亡率仍然很高<sup>[2]</sup>。适当的治疗决策和资源分配,对 ARDS 患者预后的诊疗至关重要。然而,病因复杂导致 ARDS 的诊断和治疗复杂,为了开发有效的治疗方法,有必要更好地了解 ARDS 的发病机制。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组依赖  $Zn^{2+}$  离子并作用于细胞外基质的蛋白水解酶<sup>[3]</sup>。MMPs 具有通过降解细胞外基质并影响细胞外基质重塑以参与 ARDS 病理机制进展的能力<sup>[4]</sup>。本次实验,我们使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的大鼠肺损伤的 ARDS 模型,研究 SC514 对 LPS 诱导的 ARDS 模型大鼠肺组织中 MMP-2/9 表达的影响,并探讨该途径作为 ARDS 治疗靶标的可行性。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只,(湖南天勤生物有限公司),8 周龄,每只质量(200±10) g。将这些实验动物全部饲养于右江民族医学院的 SPF 级实验动物房,实验室温度设置为 22℃~24℃,湿度恒定在 50%~70%,且给予相同标准的经过高温高压消毒的固体颗粒饲料,以每笼 5 只,饲养于 8 只笼子当中。适应性喂养 1 周后再进行实验。本次实验动物研究已通过右江民族医学院动物保护和使用委员会的审批。

1.2 主要试剂、仪器 LPS(Sigma, L2880), SC514(GK 01140, MCE), BCA 蛋白定量试剂盒(ZJ101L, 上海雅酶有限公司), 磷酸酶抑制剂(GRF102, 上海雅酶有限公司), RIPA 裂解液(P0013D, 上海碧云天公司), Omni-Easy™ PAGE 凝胶快速制备试剂盒(PG212, 上海雅酶有限公司), p-p65 抗体(ab16502, Abcam), GAPDH 抗体(ab9485, Abcam), MMP-2 抗体(ab97779, Abcam), MMP-9 抗体(ab76003, Abcam), 山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(a32731, Thermo Fisher), DAB 显色试剂盒(DAB-0031, 福建迈新公司), SYBR Green(Roche), 逆转录试剂盒(Thermo Fisher), Triol(Thermo Fisher), BH2 生物显微镜(Olympus)。

1.3 模型制备分组与标本采集 按照随机区间分组设计的原则将 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分配到 4 组内,分别为空白对照(NC 组),生理盐水(CTL)组, LPS 组和 LPS+SC514 组,其中 NC 组不做任何处理, CTL 组中大鼠支气管滴入生理盐水 1 ml, LPS 组中大鼠支气管滴入 LPS10 mg/kg, LPS+SC514 组: SC514 10 mg/kg 腹腔注射 30 min 后予以 LPS 10 mg/kg 支气管滴入。24 h 之后在大鼠腹腔注射水合氯醛溶液,深

度麻醉大鼠后,取大鼠右肺上叶,放入甲醛中固定,后做成石蜡包埋病理切片,其余肺组织放入液氮中保存。

1.4 Western Blot 检测 NF- $\kappa$ B p65、MMP-2、MMP-9 蛋白表达 用 4℃ 的生理盐水清洗肺组织,加入磷酸化蛋白酶抑制剂 RIPA 裂解液(10  $\mu$ l/mg),匀浆机搅拌,收取匀浆液于 1.5 ml EP 管中,4℃, 11000 r/min 离心 10 min,收取上清液。按照 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。每孔取 45  $\mu$ g 总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳;湿转至 PVDF 膜;使用快速封闭液在室温下封闭半小时后,加入相应的兔抗鼠一抗抗体(1:1000),4℃下摇床孵育过夜。次日,用 TBST 重复洗膜 3 次,每次 10 min 后,加入相应的二抗,室温孵育 40 min。用 TBST 重复清洗膜 3 次,每次 10 min。加入 ECL 化学发光试剂,在凝胶成像系统上显影,最后用 Image J 软件分析目的条带。

1.5 免疫组化法检测肺组织病变 将大鼠肺组织的病理切片依次于二甲苯及不同浓度的乙醇中脱蜡、水化。并用 PBS 冲洗 3 min×3 次。放入枸橼酸溶液中,加热至 95℃,15 min,抗原修复。PBS 冲洗 5 min×3 次。加入过氧化物酶抑制剂,室温孵育 8 min。PBS 冲洗 3 min×3 次。封闭液封闭,去除封闭液滴加一抗,4℃孵育过夜。PBS 冲洗 5 min×3 次。加二抗, PBS 冲洗 5 min×3 次。滴入辣根过氧化物, PBS 润洗 3 min×3 次。滴加 DAB 试剂,后脱水封片。

1.6 实时荧光定量 PCR(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)法检测大鼠肺组织 MMP-2/9 的表达 使用 triol 法提取总 RNA,电泳检测总 RNA 的完整性。取 0.8  $\mu$ g 总 RNA 配置逆转录反应体系,按逆转录试剂盒进行逆转录。MMP-2/9 及 GAPDH 引物由上海生工合成并验证。以 20  $\mu$ l 为总反应体系, GAPDH 作为管家基因,每个样本 3 个副孔,采用采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 MMP-2/MMP-9 的相对表达量。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,数据均于非同日可重复 3 次,经正态分布检验,计量资料符合正态分布,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间对比应用两独立样本  $t$  检验分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肺组织 HE 染色及免疫组化观察结果比较 NC 组即空白组大鼠的肺组织 HE 染色结果:肺泡结构较清晰、完整,肺泡间隔无水肿,肺泡腔内未见组织液,肺组织中未见炎性细胞浸润; LPS 组肺泡及肺间质水肿并有大量炎性细胞浸润,肺泡壁增厚并可见肺泡腔缩小变形,部分肺泡塌陷,支气管腔和肺泡腔可见大量分泌物,肺毛细血管充血水肿;生理盐水对

照组较空白组有少量的炎性细胞浸润,肺部有轻微损伤,肺微血管内皮损伤较轻。SC514 组较 LPS 组损伤程度减轻,少量炎性细胞浸润,肺泡结构较为完整,细胞塌陷较少,出血、渗出较少,肺微血管内皮水肿较轻。比较各组大鼠肺组织免疫组化的 MMP-2/9 表达可见,较多表达在气道黏膜上皮细胞、血管内皮细胞、浸润的中性粒细胞和巨噬细胞等细胞中。LPS 处理导致 ARDS 大鼠肺组织中 MMP-2/9 明显表达增加,SC514 预处理后,降低了 ARDS 大鼠肺组织中 MMP-2/9 的表达。见图 1。

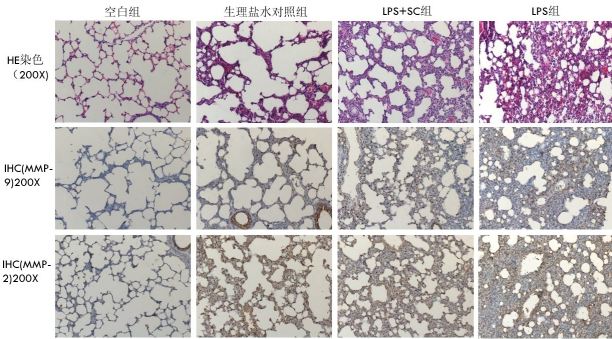


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色及免疫组化观察结果

2.2 各组大鼠肺组织 Western Blot 结果比较 见图 2 和图 3,与 NC 组相比,LPS 组中的 MMP-2/9 蛋白表达明显增高 ( $P < 0.05$ ),SC514 预处理组中的 MMP-2/9 蛋白表达与 LPS 组相比明显下降 ( $P < 0.05$ )。

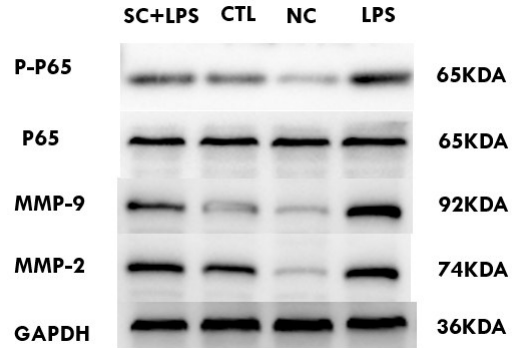


图 2 各组大鼠肺组织 Western Blot 检测结果

2.3 各组大鼠肺组织 RT-qPCR 结果比较 见图 4,与 NC 组对比,LPS 组 MMP-2/9 转录水平升高 ( $P < 0.05$ ),SC+LPS 组与 LPS 组相比,MMP-2/9 转录水平下降 ( $P < 0.05$ )。

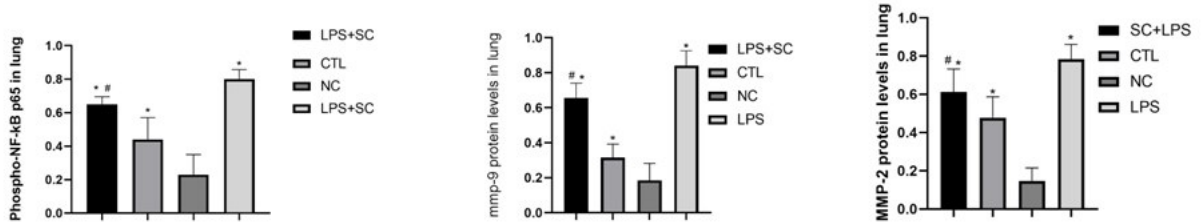


图 3 各组大鼠肺组织 Western Blot 数据统计结果

注: \* 与 NC 组相比,  $P < 0.05$ ; # 与 LPS 组相比,  $P < 0.05$

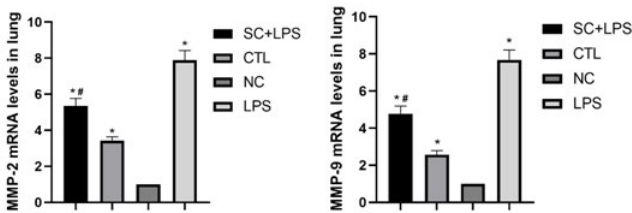


图 4 各组大鼠肺组织 RT-qPCR 结果比较

注: \* 与 NC 组相比,  $P < 0.05$ ; # 与 LPS 组相比,  $P < 0.05$

### 3 讨论

ARDS 是失衡的炎症过程,以炎症细胞浸润为主要病理特征,并伴随肺微血管通透性的增加,以及弥漫性肺间质水肿和细胞外基质的失衡<sup>[5]</sup>。其中肺组织内的细胞外基质对肺的生理功能有重要的作用,细胞外基质通常处于一个动态的平衡中<sup>[6]</sup>。基质金属蛋白酶

(MMPs)是机体的一种重要的水解酶,其特征在于在催化域和几个保守的蛋白域中具有保守的  $Zn^{2+}$  结合基序<sup>[7]</sup>。这种重要的蛋白水解酶可降解细胞中的许多成分,与细胞外基质的自身稳定密切相关<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究证实,在肺上皮 A549 细胞中,MMPs 和基质金属蛋白酶抑制剂有较为广泛表达,并在炎症反应初期存在着双向改变<sup>[9]</sup>。MMPs 的活性升高,可造成肺泡上皮细胞和血管内皮细胞基底膜的大量破坏<sup>[10]</sup>,肺组织的通透性增强,发生肺水肿和呼吸困难。基质金属蛋白酶中的 MMP-2 和 MMP-9 可通过信号传导而参与几种不同的细胞功能<sup>[11]</sup>,包括那些与炎症反应有关的信号传导。因此,MMP-2/9 的失衡可能参与了 ARDS 病理的进展过程。

过度激活的 NF- $\kappa$ B 通路可能是 ARDS 发病机制的基础。有研究表明在新生大鼠模型中,NF- $\kappa$ B 通路参与了 LPS 诱导的急性肺损伤<sup>[12]</sup>,而血管紧张素转

化酶通过抑制 ERK1/2 降低 LPS 诱导的大鼠肺损伤<sup>[13]</sup>。另一项证明重组人脑利钠肽通过抑制 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 途径活化来减轻 LPS 诱导的人肺成纤维细胞的细胞损伤<sup>[14]</sup>。根据这些观察结果,本研究表明在 ARDS 大鼠模型中,肺组织 NF- $\kappa$ B 通路被异常激活,从而刺激了 MMP-2/9 的表达并加剧了肺损伤。本次实验结果展现了 NF- $\kappa$ B/MMP-2/9 信号转导轴在 ARDS 相关炎症中的作用,这可能会有利于进一步了解该疾病的分子机制。

根据实验结果,LPS 组大鼠肺泡中存在大量炎性细胞浸润,肺泡腔隙缩小变形,并可见大量分泌物及肺间质水肿;而 SC514 组损伤程度均有不同程度的减轻,表明采用支气管滴注 LPS 方法复制大鼠 ARDS 模型成功。本次研究发现,正常大鼠肺组织 MMP-2/9 表达水平较低,LPS 干预后 MMP-2/9 的蛋白表达水平及转录水平明显上调,进一步实验发现,应用 SC514 可下调 LPS 诱导升高的 MMP-2/9 表达,这说明 MMP-2/9 与 LPS 诱导的 ARDS 大鼠模型的肺损伤机制关系密切,值得对其进行深入研究。

综上所述,本次研究发现 NF- $\kappa$ B 通路在 LPS 诱导的 ARDS 模型大鼠肺损伤的过程中被明显激活,SC514 的应用抑制了 NF- $\kappa$ B 通路,使 MMP-2/9 表达水平降低,从而减轻了 LPS 诱导的大鼠肺组织的炎症应激反应。尽管在大鼠的肺组织可以模拟出 ARDS 的炎症损伤表现,但 ARDS 病理机制复杂,仍需在细胞模型上作进一步探索。

#### 参考文献:

[1] Wang D, Gu C, Liu M, et al. Analysis of Long Noncoding RNA Expression Profile in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells Exposed to Lipopolysaccharide[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(4): 653-667.

[2] Wei XB, Wang ZH, Liao XL, et al. Role of Neuromuscular Blocking Agents in Acute Respiratory Distress Syndrome: An Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1637.

[3] Galliera E, Tacchini L, Corsi Romanelli MM. Matrix metalloproteinases as biomarkers of disease: updates and new insights[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53(3): 349-355.

[4] Ito JT, Loureno JD, Righetti RF, et al. Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies? [J]. *Cells*, 2019, 8(4): E342.

[5] Wang S, Li Z, Chen Q, et al. NF- $\kappa$ B-Induced MicroRNA-211 Inhibits Interleukin-10 in Macrophages of Rats with Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(1): 332-342.

[6] Manninen A. Epithelial polarity-generating and integrating signals from the ECM with integrins[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 334(2): 337-349.

[7] Garcia-Fernandez N, Jacobs-Cachá C, Mora-Gutiérrez JM, et al. Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2): E472.

[8] Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(6): 2223-2268.

[9] 黄莹, 庞静, 覃春艳, 等. TNF- $\alpha$  对 A549 细胞 MMPs 和 TIMPs mRNA 的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(1): 1-5.

[10] Davey A, McAuley DF, O'Kane CM. Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair[J]. *Eur Respir J*, 2011, 38(4): 959-970.

[11] Hannocks MJ, Zhang X, Gerwien H, et al. The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes[J]. *Matrix Biol*, 2019, 75-76: 102-113.

[12] Li Y, Wu R, Tian Y, et al. RAGE/NF-kappaB signaling mediates lipopolysaccharide induced acute lung injury in neonate rat model[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 13371-13376.

[13] Li Y, Zeng Z, Cao Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27911.

[14] Song Z, Zhao X, Liu M, et al. Recombinant human brain natriuretic peptide attenuates LPS-induced cellular injury in human fetal lung fibroblasts via inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B pathway activation[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1785-1790.

收稿日期: 2020-02-28; 修回日期: 2020-03-27