

文章编号:2095-0411(2017)02-0047-05

## 基质金属蛋白酶活性在 3 种肺疾病中的比较

蒋媛<sup>1</sup>, 张倩<sup>2</sup>, 吴雨丹<sup>1</sup>, 周晓鹰<sup>1</sup>

(1. 常州大学 制药与生命科学学院, 江苏 常州 213164; 2. 常州市第二人民医院 呼吸科, 江苏 常州 213164)

**摘要:**探究基质金属蛋白酶(MMPs)在慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘和肺癌患者中的表达和活性的差异。采用明胶酶谱法来检测 COPD、哮喘和肺癌患者血清中 MMP 表达和活性,其中作图和数据分析都是采用 GraphPad Prism software。结果发现,COPD 患者表达 MMP-9 的水平与哮喘患者相比较高( $P < 0.05$ ),比肺癌患者相比表达水平更高( $P < 0.0001$ ),但是 MMP-2 在 3 种病人中表达无明显差异。COPD 和哮喘患者表达 Pro-MMP-9 的概率大于肺癌患者。在 COPD、哮喘和肺癌患者中,MMPs 酶活性表达存在差异。

**关键词:**基质金属蛋白酶;哮喘;慢性阻塞性肺病;肺癌

中图分类号:R 392.7

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2017.02.009

## Comparison of Matrix Metalloproteinase Activity Between Three Lung Diseases

JIANG Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Qian<sup>2</sup>, WU Yudan<sup>1</sup>, ZHOU Xiaoying<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Engineering and Life Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Department of Respiratory, Second People's Hospital of Changzhou City, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** To explore the serum levels of matrix metalloproteinase (MMPs) in the patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and lung carcinoma were compared. Gelatin zymography was used to detect the gelatinolytic activity in serum of the patients with COPD, asthma and lung carcinoma; GraphPad Prism software was used for photography and statistic analysis. The serum levels of MMP-9 in the patients with COPD were significantly higher than asthmatics ( $P < 0.05$ ) and lung carcinoma ( $P < 0.0001$ ). However, there were no significant differences observed among these three patient's groups in the expression level of MMP-2 in serums. The probability of Pro-MMP-9 expression in the patients with COPD and asthma appeared more frequently than the patients with lung carcinoma. There are significant serum level differences of MMP-9 expression between patients with COPD, asthma and lung carcinoma.

**Key words:** matrix metalloproteinase (MMP); asthma; chronic obstructive pulmonary disease; lung carcinoma

肺是呼吸和气体交换的唯一器官,因此肺功能和结构的完整性是非常重要的。哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)都是呼吸道慢性炎症,并且在疾病的发展过程中伴随着呼吸道病理变化<sup>[1]</sup>。流行病学发现在哮喘

收稿日期:2016-05-28。

基金项目:常州科技局研究基金(KYJ1520305);常州大学高层次人才引进基金(ZMF14020066)。

作者简介:蒋媛(1992—),女,江苏镇江人,硕士生。通讯联系人:周晓鹰(1957—),E-mail:xiaoyingzhou@cczu.edu.cn

患者和 COPD 患者中,1s 用力呼气容积(FEV1)均会有所下降。肺又是原发性恶性肿瘤经常发生的部位,严重危害人类的健康。这些病理过程都与细胞外基质(ECM)有关,ECM 通过参与组织重塑从而影响组织的完整性,进而损伤正常的肺功能<sup>[2]</sup>。在肺部多种生理和病理过程中,基质金属蛋白酶(MMPs)参与 ECM 的降解和重塑。ECM 并不仅仅为器官、组织和细胞提供一个屏障保护,同时也积极参与到细胞的重要活动,例如细胞增殖或细胞周期停滞,运动性或不运动性,细胞存活或凋亡。

MMPs 是一种需要依靠  $Zn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  的酶,该家族至少包括 17 个成员,可共同作用降解构成细胞外基质的蛋白<sup>[3]</sup>。他们都有着重要的序列同源性和多区域结构,但是根据所需底物的不同,大致可以分为 4 个主要的类别,其中 MMP-9 和 MMP-2 属于明胶蛋白酶。这些酶的活化是通过切除氨基末端一个 10kD 的结构域<sup>[4]</sup>。在这些 MMPs 中,明胶 A(MMP-2)和明胶 B(MMP-9)可以通过降解基底膜 IV 型胶原和其他基质蛋白,从而在组织重塑和修复中起着重要作用。这两种酶在催化结构域中都有和明胶结合的位点。但是在某些特定的情况下,MMP 的表达以及激活会产生失调,导致病理状态,例如癌症侵袭和转移,关节炎,自身性免疫疾病,动脉瘤和心力衰竭等<sup>[5]</sup>。肿瘤组织的基质重塑主要是由 MMP 造成,并且该过程对于实体瘤的进程是至关重要的。

目前研究表明,在哮喘病人和 COPD 病人的支气管灌洗液中可以检测到 MMP-9,并且这些 MMP-9 是由肺泡巨噬细胞释放的<sup>[6-7]</sup>。与正常人对,哮喘病人和 COPD 病人痰液中含有高浓度的 MMP-9 和金属蛋白酶组织抑制物(Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, TIMP)<sup>[8]</sup>。并且,在哮喘患者中发现 TIMP-1 的水平与 FEV1 呈正相关,FEV1 的数值越小,TIMP 表达水平越低<sup>[2]</sup>。另有研究表明在肺腺癌中不仅总的 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平升高,其活化结构较正常人而言增加了 10~20 倍。在原发性肺癌患者的血液中,MMP-9 和 TIMP-1 的水平也比较高<sup>[9]</sup>。

但是目前有关 MMPs 的研究主要是关于单一肺疾病中的表达,而我们研究的焦点在于比较 MMPs 在三种不同肺疾病中表达的差异。通过使用明胶酶谱法来评估 COPD 患者、哮喘患者以及肺癌患者血清中 MMP-9 和 MMP-2 的表达和活性不同。明胶酶谱法是一种可识别 MMP-2/9,并且给出有关他们活化状态信息的灵敏度很高的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

明胶 gelatin(sigma),甘氨酸 glycine(sigma),其余试剂均购自阿拉丁。

### 1.2 样本收集

从常州市第二人民医院收集血液样品(所用样品的收集都遵照临床样品采用的规范,经患者本人的同意,并且得到常州大学医学伦理学会的批准),其中,哮喘患者 38 例,COPD 患者 38 例以及肺癌患者 40 例。哮喘、COPD 患者都是按照美国胸科协会的标准来划定。哮喘患者有着反复咳嗽、气喘、以及由非特异性有关的支气管高反应性引起的呼吸困难等临床病史。诊断哮喘的方法有两种:①支气管舒张实验阳性(支气管扩张药物在检查之前停用,短效  $\beta_2$  受体激动剂大于等于 4h,长效  $\beta_2$  受体激动剂大于等于 15h),吸入沙丁胺醇 200~400mg 后,在 10~15min 后 FEV1 的增加大于 12%并且绝对值增加大于 200mL;②支气管激发试验阳性,在标准剂量的乙酰胆碱和组胺治疗后,FEV1 下降超过 20%,或者在过度通气、高渗盐水和甘露醇使用后 FEV1 大于等于 15%。COPD 患者有着现在或过去吸烟史,并且伴随着咳嗽,运动过后呼吸困难以及有无痰液产生的病史。COPD 患者吸入支气管舒张剂以后,基于 FEV1/FVC 小于 70%(持续性气流受阻),COPD 气流受限严重程度分级如下:FEV1 大于 80%预计值为轻度;FEV1 在 50%(含)~80%预计值为中度;FEV1 在 30%(含)~50%预计值为重度;FEV1 小于 30%预计值为极重度。肺癌患者在胸部 X 线检查时,可通过透视或正侧位 X 线胸片发现胸部阴影。

### 1.3 血清制备

抽取哮喘患者、COPD 患者以及肺癌患者 2mL 空腹血于抗凝管中,静置于 4℃,4 000r/min 高速离心机

离心 15min,取其上层血清,500 $\mu$ L/管,-80 $^{\circ}$ C冻存待用。

#### 1.4 MMPs 酶活性测定

按照文献[10]报道的方法来进行实验。样品上样量是根据血清总蛋白含量而决定的,样品稀释度经过优化试验,用 PBS 8 倍稀释,然后与等体积的 2 倍浓度的样品 SDS-PAGE 非还原缓冲液(0.5mol/L Tris, glycerol, 10% SDS, 0.1% bromophenol blue)混匀。用 8%分离胶,其中含有 1mg/mL 明胶,100V 电泳跑胶直到蓝色前方染料到达底部。然后使用 2.5% Triton X-100 洗脱液,于室温,置摇床 60r/min,洗脱 3 次,20min/次。胶在含有 50mmol/L Tris, 0.2mol/L NaCl, 5mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Triton X-100 的孵育液中,37 $^{\circ}$ C孵育过夜。第 2d,0.5%考马斯亮蓝 R-250 染色 30min,再用 V(甲醇):V(乙酸):V(水)=5:1:4 的洗脱液洗脱,直到蓝色的背景上出现清晰的白色条带。使用 Bio-Rad 凝胶成像仪拍摄照片,ImageLab 软件对其进行半定量分析。

#### 1.5 统计分析

使用 GraphPad Prism 软件作图,各组别间的比较采用 Mann-Whitney nonparametric test, $P < 0.05$  视为有统计学差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 血清中 Pro-MMP-9 和 MMP-9 活性

根据明胶酶谱法结果,将 MMP-2/9 活性表达的概率归纳在表 1,表明 Pro-MMP-9 在 COPD 患者和哮喘患者出现的概率大于其在肺癌患者出现的概率。由于条件的限制,没有采集到正常人的血样,但是根据文献报道,正常人血液和痰液中 MMP-9 的表达量很低,与患者比较有明显的差距<sup>[8, 11]</sup>。在老鼠哮喘模型实验中,哮喘模型组老鼠的肺组织 MMP-9 水平明显高于正常组<sup>[12]</sup>。这是由于 COPD 和哮喘都是炎症性疾病,在正常的情况下,肺部的细胞一般不表达 MMPs,除了内皮组织表达正常水平的 MMP-2。但是在感染和炎症的情况疾病中,支气管上皮细胞,克氏细胞,肺泡 II 型上皮细胞,平滑肌细胞和成纤维细胞会表达 MMP-9<sup>[2]</sup>。并且,白细胞的浸润又是产生 MMPs 的重要来源之一,中性细胞和嗜酸性细胞可以既定表达 MMP-9,然而巨噬细胞、肥大细胞和淋巴细胞在炎症的情况下也可产生大量的 MMP-9。

从表 1 中可以发现,所有的患者都表达 MMP-9,但是从图 1 明胶酶谱法中发现其表达水平有所差异。图 2 的数据显示,总体而言 COPD 患者和哮喘患者表达 MMP-9 的水平都比肺癌患者高;COPD 患者 MMP-9 酶活性的表达与哮喘患者比较其表达水平较高( $P < 0.05$ ),与肺癌患者相比其表达水平明显增加( $P < 0.0001$ )。这一部分可能是由于收集的肺癌患者接受过化疗或其他类似的治疗。研究表明,肺癌<sup>[13]</sup>、宫颈癌<sup>[14]</sup>、胃癌<sup>[15]</sup>等患者在化疗前后,血液中 MMP-9 的表达有明显变化,化疗后 MMP-9 水平比化疗前明显下降。另外的研究发现,在 COPD 患者和哮喘患者的痰液和血液中 MMP-9/TIMP 的比例下降<sup>[16]</sup>,在肺癌患者血液中 MMP-9/TIMP-1 的比例增加<sup>[17]</sup>。癌细胞表达 MMP-9 也许和其状态有关,微环境中过量的

表 1 各类患者血清中 MMP-2/9 表达活性的概率

|                 | COPD  | Asthma | Carcinoma |
|-----------------|-------|--------|-----------|
| Pro-MMP-9(92kD) | 32/38 | 29/38  | 19/40     |
| MMP-9(85kD)     | 38/38 | 38/38  | 40/40     |
| Pro-MMP-2(72kD) | 0/38  | 0/38   | 0/40      |
| MMP-2(65kD)     | 38/38 | 38/38  | 40/40     |

说明:该表为显示条带的阳性结果统计,其中阴性结果为明胶酶谱法中不显示条带。

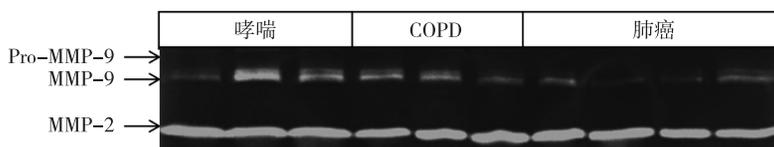


图 1 明胶酶谱法分析病人血清中明胶酶活性

MMPs 会加速 ECM 降解,从而使癌细胞得以活动或凋亡。近期的细胞学实验研究表明,激活的肺癌细胞分泌高水平的 MMP-9,有助于 ECM 降解并促使肺癌细胞脱离原有基质而迁移,在新的环境中又可以重新增长繁殖。

## 2.2 血清中 Pro-MMP-2 和 MMP-2 活性

根据表 1 和图 1 可以发现,COPD 患者和哮喘患者以及肺癌患者在明胶酶谱法中都没有检测到 Pro-MMP-2,并且三类病人表达 MMP-2 的水平无明显的差异。这是由于 MMP-2 主要由一些结缔组织分泌,并不受炎症和癌症的影响。最近的研究表明,Mautino 等人发现哮喘患者的肺泡灌洗液中 MMP-2 的表达水平是正常人的 20 倍左右<sup>[18]</sup>。哮喘患者气道重塑的最主要的一个特点是气道平滑肌细胞的大量增殖,而 MMP-2 被认为是促进平滑肌细胞增殖的重要因子之一<sup>[19]</sup>。利用明胶酶谱法检测到 Pro-MMP-2 的概率与 Pro-MMP-9 的概率相比,明显小了很多,这是由于,与分泌 MMP-9 的细胞相比,分泌 MMP-2 的细胞大多数是结缔组织,并不受炎症或肿瘤环境的影响<sup>[20]</sup>。

## 3 结 论

本实验采用明胶酶谱法来检测病人血液中明胶酶活性,是由于这个方法灵敏度高且并不需要依靠特定的抗体与酶结合。该方法更是可以检测到明胶酶的前体和活化形式。实验结果表明,MMP 在哮喘、COPD 以及肺癌患者都有表达,但是 MMP-9 在肺癌患者中的活性表达明显低于哮喘和 COPD 患者,MMP-2 无明显变化。尽管过去的研究都在分别讨论 MMPs 在肺疾病中的表达,但本研究表明了哮喘、COPD 病人以及肺癌患者之间 MMP-9 的表达是存在着差异的。也许由于 MMP-9 相关的免疫细胞在哮喘和 COPD 的炎症环境中更活跃而使 MMP-9 有更高的表达,而肿瘤微环境和哮喘和 COPD 疾病的微环境的不同导致了 MMP-9 相关细胞在表达上产生差异。这需要进一步的探讨。

总之,明胶 MMP-9 的活性可能通过降解反常的蛋白沉积和促进炎症细胞的募集和间质细胞的增殖来改变 ECM,也可以通过改变 ECM 的成分从而改变肺癌细胞的状态。但是,MMPs 及其抑制剂在 COPD、哮喘和肺癌中降解、重塑 ECM 以及接下来一系列肺功能恶化的机制还不是很明确,需要进一步的研究。

## 参考文献:

- [1]MIGLINO N, ROTH M, TAMM M, et al. Asthma and COPD[J]. Open Respiratory Medicine Journal, 2012,6(1):1-13.
- [2]CHAKRABARTI S, PATEL K D. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology[J]. Experimental Lung Research, 2005,31(6):599-621.
- [3]PARKS W C, SHAPIRO S D. Matrix metalloproteinases in lung Biology[J]. Respiratory Research, 2001,2(1):10-19.
- [4]SHAPIRO S D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences[J]. Current Opinion in Cell Biology, 1998,10(5):602-608.
- [5]SBARDELLA D, FASCIGLIONE G F, GIOIA M, et al. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2012,33(2):119-208.
- [6]POLVERINO F, DOYLE-EISELE M, MCDONALD J, et al. A novel nonhuman primate model of cigarette smoke-induced airway disease[J]. American Journal of Pathology, 2015,185(3):741-755.
- [7]XIONG Y, WANG J, YU H, et al. The effects of nodakenin on airway inflammation, hyper-responsiveness and remodeling in a murine model of allergic asthma[J]. Immunopharmacology & Immunotoxicology, 2014,36(5):341-348.
- [8]CATALDO D, MUNAUT C, NOËL A, et al. MMP-2-and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients

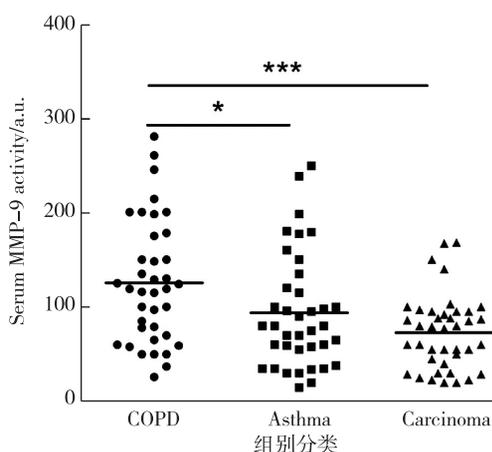


图 2 MMP-9 酶活性分析

- with asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *International Archives of Allergy & Immunology*, 2000,123(3):259-267.
- [9] RUIZ-Morales J M, DORANTES-Heredia R, ARRIETA O, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) prognostic value in lung adenocarcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2015,36(5):1-10.
- [10] HEUSSEN C, DOWDLE E B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates[J]. *Analytical Biochemistry*, 1980,102(1):196-202.
- [11] 叶明阳. 哮喘患儿 Th1、Th2 细胞与 MMP-2、MMP-9 血清水平相关性分析[J]. *海南医学院学报*, 2014,20(5):697-699.
- [12] 陈静, 赵文娟, 李玉卿, 等. TGF- $\beta$ 1、MMP-9 在哮喘大鼠气道重建模型中的表达及丹参的干预作用[J]. *世界中医药*, 2016,11(3):479-482.
- [13] 钱海红. 非小细胞肺癌化疗前后血清 VEGF 和 MMP-9 水平的对照观察[J]. *河北医药*, 2013,35(4):496-497.
- [14] 杨秀凤, 魏晓强, 张文华. 宫颈癌介入化疗前后 MMP-2 和 Ki67 表达及意义[J]. *齐鲁医学杂志*, 2010,25(5):391-393.
- [15] 赖光芒, 黄宏伟, 陈志伟, 等. 新辅助化疗对晚期胃癌患者血清 MMP、VEGF 及 PG 的影响[J]. *海南医学院学报*, 2016,22(4):381-384.
- [16] CHAUDHURI R, MCSHARRY C, BRADY J, et al. Low sputum MMP-9/TIMP ratio is associated with airway narrowing in smokers with asthma[J]. *European Respiratory Journal*, 2014,44(4):895-904.
- [17] SUSSKIND H, HYMOWITZ M H, LAU Y H, et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy[J]. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2003,56(4):1161-1169.
- [18] MAUTINO G, HENRIQUET C, JAFFUEL D, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects [J]. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 1999, 160(1):324-330.
- [19] SEO K W, LEE S J, KIM Y H, et al. Mechanical stretch increases MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via activation of PDGFR- $\beta$ /Akt signaling pathway [J]. *Plos One*, 2013, 8(8):7043-7047.
- [20] TABOURET E, BERTUCCI F, PIERGA J Y, et al. MMP2 and MMP9 serum levels are associated with favorable outcome in patients with inflammatory breast cancer treated with bevacizumab-based neoadjuvant chemotherapy in the BEVERLY-2 study [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14):18531-18540.

(责任编辑:殷丽莉)