

· 基础论著 ·

MMP-2 和 CRP 在咽炎动物模型中的表达与意义

张莉 杨持

【摘要】 目的 探讨咽炎模型日本大耳白兔基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 及 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 的表达与意义。**方法** 选择 20 只日本大耳白兔, 用彭氏造模法制造咽炎模型, 免疫组织化学检测法分别检测造模前后及咽炎痊愈后的 CRP 及 MMP-2 表达。**结果** 造模前检测血中 CRP 含量低, 此时咽炎黏膜组织中 MMP-2 为弱表达, 造模成功后咽炎形成, 血中 CRP 含量极高, 此时 MMP-2 为中强表达; 动物模型康复过程中, 随着咽炎的好转, 血中 CRP 含量逐渐降低, 此时 MMP-2 表现为强表达。**结论** 兔咽炎模型 MMP-2 和 CRP 的表达与咽炎患病过程中有较强的相关性。

【关键词】 咽炎; 动物模型; 基质金属蛋白酶-2; C-反应蛋白

Significance of MMP-2 and CRP expression on pharyngitis animal model
ZHANG Li, YANG Chi. Department of Otorhinolaryngology of the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhehaote 010050, China

Corresponding author: ZHANG Li, Email: zhangli471@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the significance and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and C-reactive protein (C-reactive protein, CRP) in Japanese pharyngitis rabbits models. **Methods** Twenty Japanese rabbits were selected and built into pharyngitis model by Peng's model manufacturing method. Immunohistochemical method was applied to check MMP-2 and CRP expression before and after manufacturing model and during their recovery. **Results** The results showed that blood CRP content was low before the model was manufactured, with weaker MMP-2 expression in pharyngitis mucosa tissue; after the model was made, the blood CRP content raised significantly, meanwhile with a stronger expression of MMP-2 appearing in pharyngitis mucosa tissue; during the recovery of pharyngitis, CRP content in the blood decreased and MMP-2 expression was the strongest in pharyngitis mucosa tissue. **Conclusions** MMP-2 and CRP expression in pharyngitis rabbit models were closely related to pharyngitis sick process.

【Key words】 Pharyngitis; Animal model; MMP-2; CRP

基金项目: 2005 年内蒙古自治区自然科学基金资助项目 (200508010906)

作者单位: 010050 呼和浩特, 内蒙古医学院附院耳鼻喉科 (张莉); 内蒙古大学生命科学学院生态专业 (杨持)

通讯作者: 张莉, Email: zhangli471@sina.com

慢性咽炎是北方地区的常见病、多发病,尤易发生于温度和湿度变化无常的春秋两季,这两个季节北方昼夜温差大,而且由于近年来生态环境恶化,沙尘暴发作频繁,空气质量逐年下降,导致慢性咽炎患者增多,其发病率占咽喉部疾病的10%~20%^[1],多种炎症因子与慢性咽炎的发生有密切关系。本研究检测了兔咽炎模型基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP),研究了其与咽炎的相关性,观察咽部组织细胞MMP-2和血中CRP表达的变化,借以说明咽炎的炎症反应与相关炎症因子之间的关系,并应用中药银黄含化片对咽炎模型进行治疗,观察其疗效。

材料与方法

一、动物与分组

I级健康成年日本大耳白兔由北京富豪实验动物中心提供,动物实验合格证号:SCXK(京)2005~2009,体重(3.10 ± 0.12)kg,雌雄不限,检疫后适应性颗粒饲料喂养2周。20只日本大耳白兔,随机分组,每组5只。

二、咽炎动物模型制备及免疫组织化学检测设备和试剂

1. 设备:(1)咽炎动物模型制备场所及设备由内蒙古中蒙医药研究所提供:①咽喉喷雾器:上海嘉定医疗设备厂生产,沪医械字(76)第2050061号;②医用额带反光镜、电子肛温表、婴儿称、扁桃体注射针、兔开口器、压舌板;(2)免疫组织化学检测的场所及设备由内蒙古医学院细胞化学研究室提供:切片(Japan);SQKC-III A生物制片快速处理仪(兰州飞控仪器总厂);光学显微镜(日本OLYMPUS公司);图像分析仪(Japan);图像分析软件系统(江苏捷达科技发展有限公司);(3)免疫化学检测的场所及设备由内蒙古医学院附属医院临床检验中心提供:罗氏(COBAS)4010自动生化分析仪(瑞士罗氏公司)。

2. 试剂:(1)氨水,500 ml瓶装,天津化学试剂三厂,批号1050109;(2)松节油,500 ml瓶装,天津大化学试剂开发中心,批号2005-7-8;(3)MMP-2多克隆抗体由天津津脉基因测绘技术有限公司提供,货号为MMP-2:JMF-311,(4)SP即用型试剂盒、DAB显色液等由福州迈新生物技术开发公司提供;(5)抗原修复缓冲液:柠檬酸盐缓冲液(0.101 mmol/L , $\text{pH} = 6.10$)、EDTA缓冲液(1 mmol/L , $\text{pH} = 8.10$)按1:50比例稀释;(6)二甲苯、10%甲醛液、3%过氧化氢甲醇液、PBS液($\text{pH} = 7.12 \sim 7.14$);(7)CRP检测应用免疫比浊法进行测定,试剂盒由上海申索佑福医学诊断用品有限公司提供。

三、造模方法

根据彭顺林^[2]咽炎动物模型的研究方法将20只日本大耳白兔随机分为4组:A组为空白对照组,B组为咽炎模型组,C组为咽炎自然恢复组,D组咽炎中药治疗组,每组5只。

1. 空白对照组:自由饮水,颗粒饲料喂养,不用任何药物及试剂。第26日取耳缘静脉血涂片,处死动物后立即取下咽黏膜及黏膜下组织作切片以供观察。

2. 咽炎模型组:第1~15天各用0.5%氨水喷咽部1次,每次用喷雾器喷3

下,第8天用扁桃体注射针将0.2 ml 松节油注射于家兔咽部黏膜下,第16日取耳缘静脉血后处死动物,立即取下咽黏膜及黏膜下组织作切片以供观察。

3. 咽炎自然恢复组:第1~15天各用0.5%氨水喷咽部1次,每次用喷雾器喷3下,第8天用扁桃体注射针将0.2 ml 松节油注射于家兔咽部黏膜下,第16~25日让其自然恢复,第26日取耳缘静脉血后处死动物,立即取下咽黏膜及黏膜下组织作切片以供观察。

4. 咽炎中药治疗组:第1~15天各用0.5%氨水喷咽部1次,每次用喷雾器喷3下,第8天用扁桃体注射针将0.2 ml 松节油注射于家兔咽部黏膜下,第16~25日用喉头喷雾器给兔咽部喷银黄含化片的混悬液(按照1mg/kg给药),上下午各1次,第26日取耳缘静脉血后处死动物,立即取下咽黏膜及黏膜下组织作切片以供观察。

以上各组动物自由饮水,颗粒饲料喂养,不用任何抗生素。

四、免疫组织化学检测

1. 检测MMP-2:按照说明书严格操作,在显微镜下观察,免疫组织化学阳性染色为细胞质内棕黄色颗粒,有阳性结果后再用图像分析软件进行定量检测,每张切片选取10个阳性区域的视野,计算视野内阳性细胞的平均灰度值与平均光密度(灰度值越小表明阳性越强),以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2. C-反应蛋白(CRP)的检测:早晨空腹抽耳缘静脉血2 ml,离心后取上层血清,使用罗氏(COBAS)4010自动生化分析仪,应用免疫比浊法进行测定,试剂盒由上海申索佑福医学诊断用品有限公司提供。

五、结果判定

以咽部黏膜细胞胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片在400倍镜下采集图像,应用图像分析软件系统进行图像分析。对视野内细胞测定结果以灰度值表示(染色越深灰度值越小,表明阳性越强)。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

六、统计方法

所有数据均用SPSS 12 for windows统计软件分析,统计方法采用 χ^2 检验、 F 检验、 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、C-反应蛋白(CRP)

各组实验动物血CRP检测结果发现空白对照组在各时间段的CRP测定值没有变化,其他3组在造模成功后CRP值均明显高于造模前($P < 0.01$),B、C、D各组在康复后又明显低于造模成功时($P < 0.01$),详见表1。

二、MMP-2在实验组和对照组中的表达

MMP-2在A组呈阴性表达,而在B组咽黏膜组织中的表达明显增强,淋巴细胞等胞浆中有棕黄色免疫阳性物质,且主要分布于咽黏膜下层。MMP-2在实验组的阳性表达与对照组中的差异有统计学意义($P < 0.01$),见表2、表3,图1~3。

表1 CRP 检测结果($\bar{x} \pm s$, mg/L)

	A	B	C	D
造模前	0.14 ± 0.021	0.14 ± 0.018	0.12 ± 0.022	0.13 ± 0.034
造模成功	0.12 ± 0.018	4.3 ± 0.87	4.1 ± 1.03	2.7 ± 0.91
康复后	0.13 ± 0.023	0.56 ± 0.036	0.70 ± 0.051	0.61 ± 0.043

表2 MMP-2 免疫组织化学平均灰度值

分组	n	灰度值($\bar{x} \pm s$)	t	P
A组	5	128.0712 ± 5.3625	6.3124	<0.01
B组	5	143.0734 ± 8.4783		

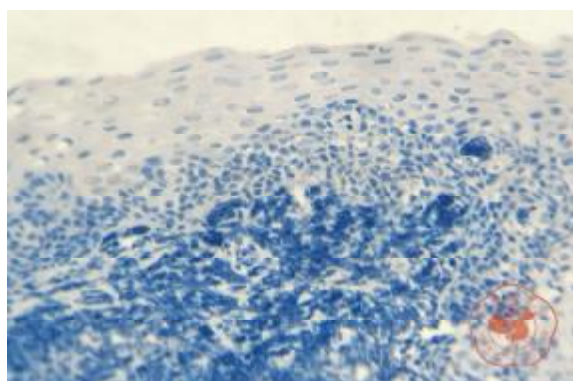


图1 MMP 阴性表达 (DAB 显色, 40 ×)

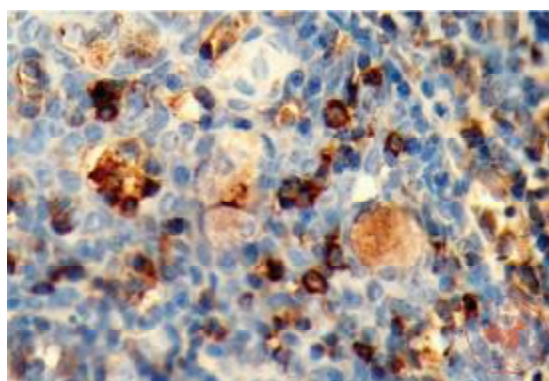


图2 MMP 强阳性表达 (DAB 显色, 400 ×)

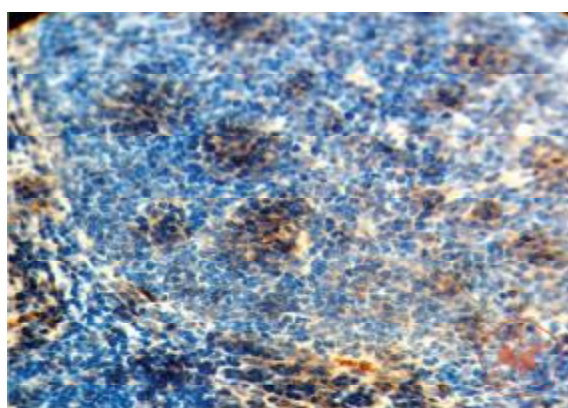


图3 MMP 在淋巴滤泡中强阳性表达 (DAB 显色, 40 ×)

讨 论

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一类以 Zn^{2+} 为辅助因子的蛋白酶家族,在体内主要降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM),参与结缔组织的降解和重建、炎症反应、肿瘤扩散转移等过程。到目前为止,已发现 20 多种 MMP,根据其对底物特异性的不同可分为间质胶原酶、明胶酶和溶解素三类^[3,4]。MMP-2 可能在明胶水解和Ⅳ型胶原清除中起重要作用,因此被认为可能

影响酶与细胞外基质(ECM)的相互作用^[5]。体内多种细胞均能产生 MMP,内皮细胞在基础状态下表达一定水平的 MMP,在受到刺激或处于某种特定状态下其表达谱或表达量有所改变。体外培养内皮细胞一旦形成卵石样单层,即表达 MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9,但不表达 MMP-7 和 MMP-13。许多细胞因子和生长因子能够诱导和刺激 MMP 的合成,这些因子包括白细胞介素-1(IL-1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等,而其他如转化生长因子 β (TGF- β)、肝素、皮质类固醇激素对 MMP 的合成有抑制效果^[6]。本实验证实了 MMP-2 在咽炎发病中的作用,Parra 和 Badier-Commander 等^[7,8]的研究结果均显示 MMP-2 免疫活性蛋白含量在静脉曲张静脉壁中减少。炎症条件下,有不同程度的炎性细胞浸润和炎性细胞因子产生,炎性细胞与内皮细胞黏附,相互诱导 MMP 的表达^[9]。大多数情况下,MMP 产生于炎性细胞浸润之前,可能首先由血管内皮细胞分泌,当炎性细胞侵入后,侵入的炎性细胞才成为 MMP 的主要产生细胞。有研究显示 MMP-2 的分泌及活性增高参与了炎症介导的纤维化始动机制^[10],MMP-2 主要降解炎症引起的一些胶原蛋白、弹性蛋白、纤维连接蛋白等细胞外基质^[11]。咽炎发生时,其临床特征有炎症细胞浸润、上皮细胞增生、伴有上皮下组织重构并导致细胞外基质(ECM)成分的降解^[12]。陈锡美等研究显示抑制 MMP-2 可有效减轻组织破坏及炎症过程^[13]。

C-反应蛋白(CRP)由于能与肺炎球菌荚膜的 C-多糖发生沉淀而得名,是肝脏在白细胞介素-6(IL-6)调控下产生的一种急性时相蛋白,因为其有降低多型核中性粒细胞(PMN)调节趋化作用的功能,故具有抗炎特性^[14]。CRP 与病原微生物上的多糖或坏死细胞表面的配体结合后通过经典途径激活补体,促进巨噬细胞对微生物的吞噬,同时结合于表面的 CRP 也可以减少替代途径产生的补体 C5 ~ C9,并抑制其沉积,从而减轻溶细胞反应;通过这样的机制,CRP 限制过度的炎症反应,减轻组织的损失,在炎症的早期对机体内环境的稳定发挥重要作用。CRP 在正常血清中含量极微,当机体有炎症或创伤时明显升高^[15],广泛分布于人体,产生于抗原进入机体的早期,为机体受到微生物入侵或组织损伤等炎性刺激时由肝脏产生的蛋白。炎症开始数小时 CRP 就升高,48 小时即可达峰值。随着病变的消退、组织结构和功能的恢复,CRP 降至正常水平。而且此反应不受化疗、放疗、皮质激素治疗的影响,因此 CRP 的检测是一个稳定的临床急性感染性疾病的诊断和鉴别诊断的指标。除了炎症发生时 CRP 明显升高外,Ridker 等^[16]在内科医生健康研究(Physician's Health Study)项目中对健康男性的长期随访发现在随后发生的缺血性脑卒中及心肌梗死患者中,其基线 C-反应蛋白水平也均高于对照组,说明在这种血管病变中也伴发着急性炎症反应。有实验证明^[17]CRP 的骤然升高可通过促进内皮细胞及单核/巨噬细胞 MMP2 的表达,本研究也清楚显示造模前 CRP 检测血中含量低,此时咽炎黏膜组织中 MMP2 为阴性表达;造模成功后咽炎形成,CRP 检测血中含量极高,此时 MMP2 为中强表达;动物模型康复过程中,随着咽炎的好转,CRP 检测血中含量降低,此时 MMP2 表现为强表达。说

明在咽炎发病及转归的过程中炎症因子发生着重要的作用。

参 考 文 献

- 1 邬晓力, 郭永清. 慢性咽炎患者咽喉反流分析. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007, 14: 63-65.
- 2 彭顺林, 钟渠, 熊大经, 等. 慢性咽炎动物模型研究. 成都中医药大学学报, 1999, 22: 51-53.
- 3 Haas TL, Madri JA. Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis. Trends Cardiovasc Med, 1999, 9: 70-77.
- 4 Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. Enzyme Protein, 1996, 49: 117-137.
- 5 Benjamin IJ. Matrix metalloproteinases: from biology to therapeutic strategies in cardiovascular disease. J Investig Med, 2001, 49: 381-397.
- 6 Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circ Res, 1995, 77: 863-868.
- 7 Parra JR, Cambria RA, Hower CD, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. J Vasc Surg, 1998, 28: 669-675.
- 8 Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, et al. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. J Pathol, 2000, 192: 105-112.
- 9 Madri JA, Graesser D, Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. Biochem Cell Biol, 1996, 74: 749-757.
- 10 吴运瑾, 翟为溶, 庄丽. 基质金属蛋白酶 2 在慢性乙型肝炎患者组织中的表达. 上海医学, 1999, 22: 592-594.
- 11 陶君, 蔡卫民, 陈家林. 晚期日本血吸虫病患者肝组织基质金属蛋白酶 2 和 9 的表达. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21: 173-175.
- 12 Podolsky DK. Healing the epithelium: solving the problem from two sides. J Gastroenterol, 1997, 32: 122-126.
- 13 陈锡美, 刘文滨, 陈文骏. 溃疡性结肠炎患者基质金属蛋白酶 2、9 和抑制因子 1、2 的表达及意义. 中国内科杂志, 2003, 20: 384-386.
- 14 方能新, 张健, 曾一平, 等. 心肺转流下不停跳心脏手术对血浆 C-反应蛋白及细胞因子水平的影响. 临床麻醉学杂志, 2005, 21: 156-158.
- 15 Brix-Christensen V, Petersen TK, Ravn HB, et al. Cardiopulmonary bypass elicits a pro- and anti-inflammatory cytokine response and impaired neutrophil chemotaxis in neonatal pigs. Acta Anaesthesiol Scand, 2001, 45: 407-413.
- 16 Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med, 1997, 336: 973-979.
- 17 沈彬, 吴宗贵. C 反应蛋白对 U937 细胞表达基质金属蛋白酶 2 的影响. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13: 25-28.

(收稿日期: 2008-10-21)

(本文编辑: 温少芳)

张莉, 杨持. MMP-2 和 CRP 在咽炎动物模型中的表达与意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(3): 259-264.