

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001621

NE、MMP-12 在慢性阻塞性肺疾病发病机制中的作用

曾春芳, 曾建明, 王 新

(德阳市人民医院呼吸内科, 德阳 618000)

【摘要】目的:探讨中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、基质金属蛋白酶 12(matrix metalloproteinase 12, MMP-12)在慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)发病中的作用。**方法:**收集因肺部肿瘤行肺叶切除手术患者肺组织 60 例,其中非 COPD 者(A 组)30 例,COPD 患者(B 组)30 例。患者术前均进行肺功能指标(FEV1%, FEV1/FVC%)检测;采用免疫组织化学方法检测 NE、MMP-12 在肺组织中的表达。**结果:**B 组肺组织中 NE、MMP-12 的蛋白表达较 A 组明显增强($P<0.05$);B 组 NE 的蛋白表达量与 FEV1%、FEV1/FVC%呈负相关(r 分别为-0.474、-0.364,均 $P<0.05$),B 组 MMP-12 的蛋白表达量与 FEV1%、FEV1/FVC%呈负相关(r 分别为-0.409、-0.791,均 $P<0.05$)。**结论:**NE、MMP-12 在 COPD 患者肺组织中的表达上调并与肺功能指标相关,NE、MMP-12 可能参与了 COPD 的气道炎症过程,也是引起气流阻塞的重要因素。

【关键词】慢性阻塞性肺疾病;中性粒细胞弹性蛋白酶;基质金属蛋白酶 12;发病机制

【中图分类号】R562.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-04-07

Role of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 12 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary diseases

Zeng Chunfang, Zeng Jianming, Wang Xin

(Department of Respiratory Medicine, Deyang People's Hospital)

【Abstract】Objective: To explore the role of neutrophil elastase (NE) and matrix metalloproteinase 12 (MMP-12) in the pathogenesis of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** Surgically resected lung specimens from 60 patients with lung cancer were collected and divided into non COPD group (A group, 30 cases) and COPD patients (B group, 30 cases). Pulmonary function indexes (FEV1%, FEV1/FVC%) were detected in all patients before operation. The expressions of NE and MMP-12 in lung tissue were detected by immunohistochemical method. **Results:** The protein expression of NE and MMP-12 in B group was significantly higher than those in A group ($P<0.05$). The expression of NE in B group was negatively correlated with FEV1%, FEV1/FVC% ($r=-0.474, -0.364; P<0.05$, respectively), and the expression of MMP-12 in B group was also correlated with FEV1%, FEV1/FVC% ($r=-0.409, -0.791, P<0.05$, respectively). **Conclusion:** The over-expression of MMP-12 and NE in lung tissue associated with lung function index. MMP-12 and NE may be involved in the airway inflammation, and play important role in the airway obstruction of COPD.

【Key words】chronic obstructive pulmonary disease; neutrophil elastase; matrix metalloproteinase 12; pathogenesis

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是常见的呼吸系统慢性疾病,患病人数多,死亡率高,近年来发病率和死亡率呈逐年上升趋势,社会经济负担重,严重威胁人们的健康和生活。COPD 发病机制复杂且未完全阐明,目前发病学说包括炎症反应、氧化应激、蛋白-抗蛋白酶和细胞凋亡等,其中蛋白酶/抗蛋白酶失衡是最被大家接受的发病学说之一^[1-2]。中性粒细胞弹性蛋白酶

(neutrophil elastase, NE)是含量高、作用广、水解能力强的蛋白水解酶之一,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是一族结构相似能够降解细胞外基质(matrix metalloproteinases, ECM)并引起 COPD 患者气道破坏和重构的酶类。本研究意在探讨 NE、基质金属蛋白酶 12(matrix metalloproteinase 12, MMP-12)在 COPD 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

标本取自我院胸外科因肺部肿瘤行肺叶切除术者 60 例;非 COPD 组 30 例,其中男 20 例,女 10 例,年龄 40~75

作者简介:曾春芳, Email: Zeng_cf68@126.com,

研究方向:慢性阻塞性肺疾病。

基金项目:四川省卫生厅科研课题资助项目(编号:120413)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1534.084.html>

(2018-04-08)

岁,平均年龄(56.1 ± 9.2)岁;COPD 组 30 例,其中男 22 例,女 8 例,年龄 48~78 岁,平均年龄(58.1 ± 10.3)岁。排除标准:①术前 2 个月内呼吸道感染病史。②合并其他肺部疾病。③合并心、肝、肾等其他慢性系统疾病。所有患者术前均进行胸部 CT 和肺功能检查。COPD 患者诊断符合中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组制定的 COPD 诊治标准^[3]。2 组患者在性别、年龄等方面无统计学差异。

1.2 主要仪器及试剂

肺功能仪为德国 JAEGER 生产。免疫组化试剂 NE、MMP-12 抗体检测试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 肺功能测定 2 组患者均与手术前测定肺功能指标 FEV1%、FEV1/FVC%。

1.3.2 标本收集 肺组织标本均于远离肿瘤病灶>5 cm 处取材,立即用 4%多聚甲醛浸泡固定,石蜡包埋切片,切片厚度 4 mm,HE 染色,病理学专家阅片排除肿瘤浸润。

1.3.3 NE、MMP-12 免疫组织化学染色 采用免疫组化法检测 NE、MMP-12 在肺组织中的蛋白含量表达。PBS 液代替一抗染色为阴性对照;NE、MMP-12 兔抗大鼠多克隆抗体 1:100 稀释;参照试剂盒说明进行免疫组化染色操作。染色阳性部位呈棕黄色。采用 IPP16.0 多功能彩色图像分析系统对免疫组化切片进行分析,以平均吸光度(absorbance, A)值代表 NE、MMP-12 蛋白的表达含量。

1.4 统计学方法

统计学分析采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析,计量资料实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料的比较采用两独立样本 *t* 检验,变量间相互关系用 Pearson 线性相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组受试者肺功能比较

B 组肺功能指标均明显低于 A 组($P<0.05$),见表 1。

表 1 2 组肺功能比较(%)
Tab.1 Comparison of two groups of lung function(%)

组别	FEV1	FEV1/FVC
A组($n=30$)	105.477 ± 6.550	83.812 ± 2.900
B组($n=30$)	82.017 ± 6.040	63.038 ± 2.020
<i>t</i> 值	5.162	13.699
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.2 支气管肺组织 NE、MMP-12 免疫组化表达

NE 主要表达于肺组织单核细胞、中性粒细胞胞浆内,B 组较 A 组患者明显升高($P<0.05$)。MMP-12 主要表达于肺组织肺泡上皮细胞、单核细胞细胞膜和细胞质内,B 组较 A 组患者明显升高($P<0.05$)。见表 2。

2.3 相关性分析

B 组 NE 与肺功能指标(FEV1%, FEV1/FVC%)呈负相关($r=-0.474, t=2.849, P=0.008; r=-0.364, t=2.071, P=0.048$)。B

组 MMP-12 与肺功能指标(FEV1%, FEV1/FVC%)呈负相关($r=-0.409, t=2.375, P=0.025; r=-0.791, t=6.836, P=0.000$)。

表 2 2 组 NE、MMP-12 表达(平均吸光度)

Tab.2 Expression of two groups of NE and MMP-12 in lung tissue(the average absorbance)

组别	NE	MMP-12
A组($n=30$)	0.119 ± 0.050	0.120 ± 0.010
B组($n=30$)	0.184 ± 0.000	0.189 ± 0.070
<i>t</i> 值	2.366	13.699
<i>P</i> 值	0.000	0.000

3 讨论

COPD 是一种以气流受限进行性发展为特征的慢性气道炎症性疾病^[3],COPD 气流受限的病理基础是慢性炎症导致的呼吸道损伤及之后的组织修复,改变了呼吸道结构,最终导致不可逆气流受限。气道炎症和气道重构是 COPD 的主要病理特征^[4]。ECM 是分布和聚集在细胞表面和细胞间质的复杂网络结构,其降解和沉积失衡是导致呼吸道壁异常构建重要原因^[5],而在此过程中,蛋白酶-抗蛋白酶系统失衡起着重要作用^[1]。蛋白酶增加和抗蛋白酶不足均可导致 ECM 过度水解、气道重构,最终导致 COPD 的发生。研究证明,参与 COPD 发病过程的蛋白酶主要包括 NE、MMPs 等^[6]。

NE 为丝氨酸蛋白酶超家族成员之一,是 218 个氨基酸组成的单一肽链,主要来源于中性粒细胞和肺泡巨噬细胞^[7]。NE 是一种杂食性酶,可溶解多种蛋白^[8]。正常情况下,NE 对肺部病原菌清除具有重要作用^[9],而在急性炎症时,NE 大量释放,造成肺组织结构破坏而参与发病^[10]。本研究结果显示 B 组 COPD 患者肺组织中 NE 的蛋白表达较 A 组明显增强($P<0.05$),提示 COPD 患者 NE 释放增多,造成肺部 ECM 蛋白过度降解、肺弹性回缩力丧失,导致肺气肿的发生,且研究表明 COPD 稳定期 NE 含量仍高于正常^[8]。Belaouaj 等^[11]的研究结果也显示 NE 基因的缺失对肺气肿的发展有明显的保护作用。NE 不仅造成肺组织和气道结构破坏,还通过促进炎性细胞聚集、引起黏液高分泌等机制参与 COPD 发病。Sandhaus 等^[12]研究表明在炎症过程中 NE 对中性粒细胞具有趋化作用;此外,NE 还是一种最强的促黏液分泌剂^[13],可引起黏蛋白合成和黏液分泌增加,加重 COPD 气道炎症,导致一过性气道狭窄及阻塞,引起通气功能下降^[9]。Vignola 等^[14]实验发现 COPD 患者痰中 NE 的活性与肺通气功能及气道结构的改变

呈明显的相关性。王嘉等^[9]研究也表明 COPD 患者血清的 NE 含量与气流受限呈负相关。本文研究显示 B 组 COPD 患者肺组织中 NE 的表达与肺功能指标(FEV1%, FEV1/FVC%)呈负相关,也提示 NE 的释放增加与 COPD 气流受限的发生相关。

MMP-12 是基质金属蛋白酶家族中的一员,是 ECM 降解的主要介质,结构包括前肽域、催化域和血红素结合蛋白样域^[15],主要由中性粒细胞、巨噬细胞等分泌^[16]。MMP-12 可以降解多种 ECM,弹性蛋白是其底物^[17],且降解的 ECM 对炎性细胞有趋化作用,从而加重局部炎症反应^[18]。弹性蛋白的破坏与胶原的降解是肺气肿的重要组织学特征^[6],MMP-12 作为弹性蛋白及多种胶原成分的降解者,是 COPD 形成过程中的重要损伤性因子。本研究结果显示 B 组 COPD 患者肺组织中 MMP-12 的蛋白表达较 A 组明显增强,且与肺功能指标(FEV1%, FEV1/FVC%)呈负相关,表明 COPD 肺组织中 MMP-12 增多造成肺组织中弹性蛋白破坏与胶原降解增加,导致肺泡和气道结构破坏,并可通过降解的 ECM 加重炎症反应而参与 COPD 发病。国外不少研究也证明了 MMP-12 在 COPD 发病中的作用。Molet 等^[19]研究表明在 COPD 患者支气管肺泡灌洗液和支气管活检组织中 MMP-12 的表达水平明显升高;Yu 等^[20]研究表明 MMP-12 基因多态性与 COPD 发生密切相关。Hunninghake 等^[21]的研究发现 MMP-12 参与了 COPD 发病过程,且与 FEV1 下降有关。此外, MMP-12 还可激活其他 MMPs,从而增加 ECM 蛋白的降解,促进肺气肿的发生^[22]。研究^[6]还显示 NE 和 MMP-12 具有协同作用,两者通过消除对方抑制物的作用,加重肺组织的破坏和气道的持续炎症,导致气道重塑和气流受限,在 COPD 发病中有重要作用。

COPD 发病机制复杂,各种机制相互作用相互影响。研究 COPD 发病机制,探索新的治疗靶点,将为 COPD 治疗提供更广阔的前景。提纯或重组的特异性蛋白酶抑制物,如 NE 的特异性抑制物 $\alpha 1$ -AT、MMP-12 特异性抑制物 TIMPs 能选择性抑制蛋白酶活性,有效减轻肺组织的损伤,抑制炎性介质释放及黏液高分泌状态,为 COPD 治疗开辟一条新途径。

参 考 文 献

- [1] 陈颖,郭超,杨晓红,等. 新疆地区 COPD 急性发作期及稳定期血清中性粒细胞弹性蛋白酶、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶变化的研究[J]. 医学临床研究,2013,30(7):1310-1312.
- [2] Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L. Metalloproteases/anti-

- metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications[J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17(s1):11-19.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(4):255-264.
- [4] 蒋辉,朱清艺,毕迎春,等. MMP-9/TIMP-1 与 COPD 肺气肿关系研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(6):1166-1167.
- [5] 杨波,盛辉,苑春莉,等. MMP-9 及其抑制剂 TIMP-1 在非小细胞肺癌中的表达及其与病理特征的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(9):1166-1167.
- [6] 官秋玥,向征. 慢性阻塞性肺疾病中蛋白酶与抗蛋白酶系统的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(15):1185-1188.
- [7] 来薛,蔡哲,敬岳,等. 固本止咳中药对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺组织中弹性蛋白酶表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7):2512-2514.
- [8] 骆元正,肖玉艳,赵玲瓏,等. 中性粒细胞弹性蛋白酶在慢性阻塞性肺疾病发病中的作用[J]. 天津医药, 2012, 40(4):391-392.
- [9] 王嘉,孙武装,王鹏羽,等. 慢性阻塞性肺病患者血清蛋白酶与抗胰蛋白酶的表达及意义[J]. 山东医药, 2012, 52(21):54-56.
- [10] Makita H, Nasuhara Y, Naqai K, et al. Characterization of phenotypes based on severity of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Thorax, 2007, 62(11):932-937.
- [11] Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram-negative bacterial sepsis[J]. Nat Med, 1998, 4(5):615-618.
- [12] Sandhaus RA, Turino G. Neutrophil elastase-mediated lung disease[J]. COPD, 2013, 10(1):60-63.
- [13] 冯萍灵,司娜,王骏,等. 清金化痰汤对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织中中性粒细胞弹性蛋白酶及黏蛋白基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(5):76-79.
- [14] Vignola AM, Paganin F. Airway Remodeling Assessed by Sputum and HRCT in Asthma and COPD[J]. Eur Respir J, 2004, 24(6):910-917.
- [15] 杨宁. MMP-12 与肺部疾病的关系[J]. 国际儿科学杂志, 2010, 37(6):582-584.
- [16] 卢旭东,周兴菊,陆益民,等. 肺癌患者胸水 CD40、MMP-12 水平的检测及临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(7):1174-1176.
- [17] 殷培,石柱秀. 结缔组织病相关肺间质病变的血清生物标志物研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2014, 11(3):151-155.
- [18] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases[J]. Amino Acids, 2011, 41(2):271-290.
- [19] Molet S, Belleguic C, Lena H, et al. Increase in macrophage elastase(MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Inflamm Res, 2005, 54(1):31-36.
- [20] Yu XL, Zhang J, Zhao F, et al. Relationships of COX2 and MMP12 genetic polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(12):8149-8162.
- [21] Hunninghake GM, Cho MH, Tesfayigzi Y, et al. MMP-12, lung function, and COPD in high-risk populations[J]. N Engl J Med, 2009, 361(27):2599-2608.
- [22] Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L. Metalloproteases/anti-metalloproteases Imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications[J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17(s1):11-19.

(责任编辑:冉明会)