

房晨阳,周霞,杨艳珍,等. 重组 CC16 蛋白对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺组织结构及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2):222-228.

Fang CY, Zhou X, Yang YZ, et al. Effect of rCC16 protein on the lung histology and expressions of MMP-9 and TIMP-1 in mice with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2):222-228.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.015

重组 CC16 蛋白对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺组织结构及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响

房晨阳¹,周霞²,杨艳珍¹,梁李娟¹,庞敏^{1*},王文桃²,孙佳²,刘宏延²,王海龙²

(山西医科大学: 1. 第一医院呼吸科; 2. 基础医学院, 太原 030001)

【摘要】 目的 研究重组大鼠 CC16(rCC16)蛋白质对减轻慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)小鼠模型肺组织损伤的作用,及对肺组织中基质金属蛋白酶(MMP)-9 和基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)-1 表达的调节作用。方法 将 40 只清洁级 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组,分别为空白组、COPD 模型组、rCC16 剂量组 1 和剂量组 2。除空白组外,其余小鼠均采用吸烟 3 月法制备 COPD 模型,从第 3 月开始空白组和模型组给予 PBS 滴鼻,rCC16 剂量组 1 和剂量组 2 分别给予 1 μg/g 体重和 2.5 μg/g 体重的 rCC16 滴鼻干预。观察各组小鼠精神状态、饮食情况、体重变化及大小便情况等,H&E 染色观察各组小鼠肺组织形态结构变化,荧光定量聚合酶链式反应、免疫组织化学法检测 MMP-9 和 TIMP-1 信使 RMA(mRNA)和蛋白质的表达变化。结果 空白组小鼠体重随饲养周期增大,COPD 组小鼠体重较空白组明显减轻,rCC16 干预组后,干预组 2 小鼠体重逐周增大,但干预组 1 小鼠体重增加较缓慢,差异均有统计学意义($P < 0.05$);COPD 模型组小鼠肺组织结构明显破坏,肺泡间隔增宽,部分形成肺气肿,rCC16 干预组后,小鼠肺部的肺泡结构趋于完整,肺大泡的形成也减少;COPD 模型组小鼠肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 的表达均明显高于空白组($P < 0.05$);rCC16 干预后,均可降低 MMP-9 和 TIMP-1 的表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$),rCC16 对 MMP-9 的降低作用具有剂量依赖性,而对 TIMP-1 的调节不呈剂量依赖性。结论 rCC16 滴鼻干预可以减轻 COPD 小鼠肺组织的损伤,降低肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的表达,对 COPD 的治疗具有积极意义。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;CC16 蛋白质;基质金属蛋白酶-9;基质金属蛋白酶组织抑制因子-1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 02-0222-07

Effect of rCC16 protein on the lung histology and expressions of MMP-9 and TIMP-1 in mice with chronic obstructive pulmonary disease

FANG Chenyang¹, ZHOU Xia², YANG Yanzhen¹, LIANG Lijuan¹, PANG Min^{1*}, WANG Wentao², SUN Jia², LIU Hongyan², WANG Hailong²

(1. Department of Respiration, the First Hospital; 2. College of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.)

Corresponding author: PANG Min. E-mail: pangmin2009@126.com

【Abstract】 Objective To study the protective effect of recombinant rat Club cell 16 (rCC16) protein on lung injury and expressions of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 in mice

[基金项目] 山西省回国留学人员科研资助项目(2015-101);山西省留学回国人员科技活动择优资助项目(2016-097);山西医科大学博士启动基金(03201539)。

Funded by the Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (2015-101), the Fund Program for the Scientific Activities of Selected Returned Overseas Professionals in Shanxi Province (2016-097) and the Startup Foundation for Doctors of Shanxi Medical University (03201539).

[作者简介] 房晨阳(1991—)女,硕士研究生,研究方向:慢性阻塞性肺疾病防治。Email:957930659@qq.com

[通信作者] 庞敏(1976—)女,副教授,硕士生导师。研究方向:慢性阻塞性肺疾病防治。Email: pangmin2009@126.com

suffering from chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** C57BL/6 mice ($n=40$) were randomly divided into four groups: blank, COPD model, rCC16 treatment 1, and rCC16 treatment 2 groups. The mice were exposed to tobacco smoke for 3 months to create a COPD model. The blank-group mice were exposed to room air. When the model was stable, mice in the blank and model groups were administered phosphate-buffered saline (PBS; i.n.), and mice in the other two groups were treated with rCC16 (1.0 or 2.5 $\mu\text{g/g}$ body weight, i.n., respectively). The mental state, diet, body-weight changes and urine of mice were observed. Histological changes in the lung tissues in different groups were observed with hematoxylin and eosin staining. mRNA and protein levels of MMP-9 and TIMP-1 were analyzed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. **Results** Body weights in the COPD group were decreased compared with those in the blank group, which were increased with the feeding period. Body weights in the rCC16 treatment 2 group were increased obviously, whereas the body weights in the rCC16 treatment 1 group increased more slowly, and the differences were significant ($P < 0.05$). Lung structure in the COPD group was changed with widened interalveolar septa and development of emphysema. rCC16 treatment alleviated those pulmonary alterations and reduced the formation of pulmonary bullae. The expressions of MMP-9 and TIMP-1 were significantly higher than those in the blank group ($P < 0.05$). rCC16 treatment inhibited the expressions of MMP-9 and TIMP-1, which were overexpressed in the COPD group, and the differences were significant ($P < 0.05$). Moreover, the rCC16's regulation on MMP-9 expression was dose-dependent. **Conclusions** Intranasal administration of rCC16 reduces the pulmonary injury and expressions of MMP-9 and TIMP-1 in lung tissues of COPD mice. Our results demonstrate that rCC16 has a promising therapeutic effect against COPD.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; CC16 protein; MMP-9; TIMP-1

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续性气流受限为特征的呼吸系统疾病,病理变化表现为由慢性炎症引起的呼吸道损伤,破坏肺部结构,引起气道重塑^[1]。临床主要应用支气管扩张剂、激素抗炎剂、抗氧化剂等进行对症治疗,难以改善肺功能,远期疗效较差。克拉拉细胞蛋白 16 (club cell protein 16, CC16) 主要由位于气道上皮上的 club 细胞分泌合成,具有抗炎和免疫调节活性^[2]。研究发现,气道 CC16 蛋白质含量的减少,是引起慢性阻塞性肺疾病发生发展的重要因素之一^[3],而给予 CC16 蛋白质被视为干预肺部炎症性疾病的一种措施^[4]。本文在前期获得重组大鼠 CC16 蛋白质 (rCC16) 且确定其安全剂量的基础上^[5-6],研究 CC16 对香烟烟雾 (cigarette smoke, CS) 联合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 制备的 COPD 小鼠肺组织病理改变及基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和基质金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 C57BL/6 小鼠 40 只,8 周龄,体重为 18

~ 20 g,由山西医科大学实验动物中心提供【SCXK (晋)2010-0002】,符合国家及国际动物伦理学标准。小鼠饲养于山西医科大学实验动物中心屏障环境中【SYXK (晋)2015-0001】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀,且所有实验操作均符合实验动物伦理学要求 (伦理审批号: IACUC2014-16)。

1.1.2 试剂与仪器

芙蓉牌过滤嘴香烟 (焦油量 12 mg; 烟碱量 1.0 mg, 烟气 CO 量 14 mg); TRIzol、RT reagent Kit 和 SYBR Premix Ex Taq Kit (大连宝生物科技有限公司, 中国); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo Scientific 公司, 美国), 兔抗小鼠 MMP-9 多克隆抗体、兔抗小鼠 TIMP-1 多克隆抗体、SABC 免疫组织化学检测试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司, 中国), 其余试剂为国产分析纯。自制熏烟箱 (有机玻璃, 长宽高分别为 80 cm $\times$ 80 cm $\times$ 80 cm); BX 41TF 型光学显微镜 (日本电子株式会社); PikoREAL 实时定量荧光 PCR 仪 (Thermo Scientific 公司, 美国); UV-2602 型紫外可见分光光度计 (尤尼柯 (上海) 仪器有限公司, 中国); QWin 图象分析软件 (Leica 公司, 德国); Tanon 2500 天能凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 重组大鼠 CC16 蛋白质的制备

参考文献[5]和[6]的方法制备并纯化重组大鼠 CC16 蛋白质(rCC16)。蛋白质定量后溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中,制备成 $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 于 -80°C 冰箱保存备用。

1.2.2 实验分组及 COPD 模型建立

将 40 只小鼠随机均分为空白组、COPD 模型组、rCC16 剂量组 1($1\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 体重)和 rCC16 剂量组 2($2.5\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 体重)。除空白组不进行 COPD 模型制备外,其余小鼠均采用香烟烟雾吸入法制作 COPD 稳定期小鼠模型。将除空白组外的各组小鼠(共 30 只)分别置于熏烟箱中进行人为被动吸烟,每日吸入烟雾 2 次(上午 1 次、下午 1 次),每次使用 12 支,时间大致为 60 min,每个星期 6 d,整个熏烟持续 12 周。在熏烟期间,持续监测熏烟箱内 O_2 含量,保证其始终在 $19.2\% \sim 20.5\%$ 范围之内(如氧浓度低于标准,停止香烟燃烧,仅泵入空气)。rCC16 干预组大鼠于吸烟第 3 月开始,应用不同剂量 rCC16 对吸烟小鼠进行滴鼻干预。rCC16 剂量组 1($1\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 体重)和 rCC16 剂量组 2($2.5\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 体重),每次 $20\text{ }\mu\text{L}$,每日 1 次。空白组和 COPD 组则用等量的 PBS 来替代,持续干预 4 周。滴鼻操作由固定人员完成,操作前先抚摸小鼠,增进熟悉,减少小鼠紧张;将 $20\text{ }\mu\text{L}$ 滴鼻液吸入吉尔森 P20 微量移液器($2 \sim 20\text{ }\mu\text{L}$),左手固定小鼠,右手持移液器进行滴鼻。为减轻小鼠的不适感,滴鼻在两个鼻孔间隔进行,1 只小鼠的滴鼻操作在 3 min 完成。

1.2.3 一般行为观察

观察各小鼠精神状态、饮食情况、体重变化及大小便情况等。

1.2.4 小鼠肺组织形态学观察

小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠($100\text{ mg}/\text{kg}$ 体重)进行麻醉,腹主动脉取血后,打开胸腔,暴露双肺,将右肺部取下,放入 4% 甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切片($4\text{ }\mu\text{m}$ 厚),行常规 H&E 染色,显微镜下分析各组小鼠肺组织形态结构变化。

1.2.5 Real-time PCR 检测小鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1 mRNA 的表达

小鼠麻醉后,将左肺取出,迅速置于液氮中进行研磨,加入 1 mL Trizol 裂解液,按说明书提取各组组织总 RNA,紫外分光光度计测量浓度后取 $1\text{ }\mu\text{g}$

按照试剂盒说明书进行逆转录及 PCR 扩增。qPCR 的引物及扩增条件参照已发文章^[7],具体为 94°C 5 min,接着 94°C 30 s, 58°C 30 s, 70°C 45 s, 40 个循环,将目的基因的 Ct 用大鼠 GAPDH 的 Ct 值进行标准化,基因表达的相对倍数变化用比较阈值法(即 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)表示。此外,PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进一步检测。小鼠 MMP-9 的上游引物序列为 $5' - \text{CGTCGTGATCCCCACTTACT} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{AACACACAGGGTTTGCCTTC} - 3'$;TIMP-1 的上游引物序列为 $5' - \text{CATGGAAAGCCTCTGTGGAT} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{CTCAGAGTACGCCAGGGAAC} - 3'$; β -actin(β -肌动蛋白)的上游引物序列为 $5' - \text{CTAAGGCCAACCGTGAAAAG} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{ACCAGAGGCATACAGGGACA} - 3'$,引物由北京(中美)泰和生物技术有限公司合成。

1.2.6 免疫组织化学检测小鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1 蛋白质的表达

严格按照 SABC 试剂盒说明书操作,切片脱蜡至水,微波修复,洗涤,滴加山羊血清封闭,滴加一抗(MMP-9, $1:100$; TIMP-1, $1:100$) 4°C 过夜孵育,第 2 天 PBS 洗涤,滴加二抗($1:500$),PBS 洗涤,DAB 显色,流水冲洗,苏木精复染,流水冲洗,脱水,树胶封片。每只小鼠的组化切片选取 3 个视野,镜下观察($\times 200$)。用 Leica 图像分析系统对每组 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达水平进行分析处理,胞质中的棕色颗粒为阳性表达,表达水平用灰度值来表示,灰度值越高,表达强度越小。

1.3 统计学方法

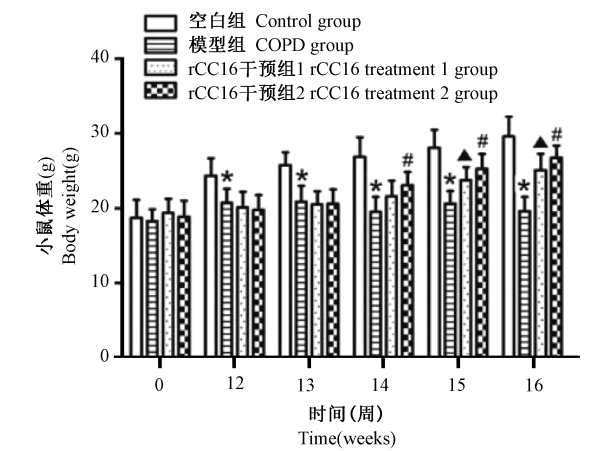
采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 校正的 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性。

2 结果

2.1 一般行为观察

空白组小鼠活泼好动,皮毛柔顺有光泽,饮食摄水正常,体重随饲养周期增大。模型组小鼠皮毛枯槁无光泽,撮毛,行动迟缓,呼吸急促,进食进水量减少,体重较空白组明显减轻,差异有显著性($n = 10, P < 0.05$)。rCC16 干预组 1 和干预组 2 小鼠体型偏瘦,活动较自如,皮毛欠润泽,气促不明显,体重较模型组增加,以干预组 2 增加明显。与模型

组比较,干预组 2 在干预后第 3 周开始体重明显增加,而 rCC16 干预组 1 在第 4 周体重才开始增加,差异有显著性($n=10, P<0.05$) (图 1)。



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 COPD 组比较,# $P<0.05$,
▲ $P<0.05$ 。(下同)
图 1 各组小鼠在 rCC16 处理前后体重变化
Note. * $P<0.05$, vs control group; # $P<0.05$, ▲ $P<0.05$, vs
COPD group. (The same in the following figures)
Figure 1 Body weight of the mice in different
groups before or after rCC16 treatment

2.2 rCC16 干预可以减轻 COPD 小鼠的肺部损伤
病理学观察结果显示空白组小鼠肺组织正常,呼吸道及肺泡结构正常,无代偿性肺气肿形成,肺泡腔未见炎症细胞(图 2A)。COPD 模型组小鼠肺泡的结构出现明显的破坏,肺泡间隔增宽,部分肺泡壁断裂融合形成肺泡气肿,代偿性肺气肿形成,血管及支气管炎症细胞浸润(图 2B)。1 $\mu\text{g/g}$ 体重 rCC16 干预后,小鼠仍然有肺大泡的形成,但较之 COPD 组明显减少,且炎性细胞浸润也有所改善(图 2C)。2.5 $\mu\text{g/g}$ 体重 rCC16 干预后炎性细胞浸润明显减少,肺大泡的形成也明显减少,肺泡结构趋于完整(图 2D)。

2.3 rCC16 干预减少 COPD 小鼠肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 的表达

RT-qPCR 结果显示,与正常组小鼠比较,COPD 组小鼠肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达量显著增加,表达差异有显著性($n=10, P<0.01$),rCC16 干预组 1 可以降低 MMP-9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达,表达差异有显著性($n=10, P<0.05$),而 rCC16 干预组 2 对 MMP-9 mRNA 的降低作用更明显,表达差异有显著性($n=10, P<0.01$),但对 TIMP-1 mRNA 表达的降低作用与 rCC16 干预组 1 比较,差异无显著性表达(图 3)。与 mRNA 表达结

果一致,免疫组化结果显示,肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白质主要表达于气道上皮细胞胞质中,与正常组小鼠比较,COPD 组小鼠肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白质表达量显著增加,表达差异有显著性($n=10, P<0.01$),rCC16 干预后可以显著降低 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白的表达,表达差异有显著性($n=10, P<0.01$),我们还发现,rCC16 对小鼠肺组织中 MMP-9 的表达有剂量依赖性,而对 TIMP-1 表达的降低作用没有剂量依赖关系(图 4-5)。

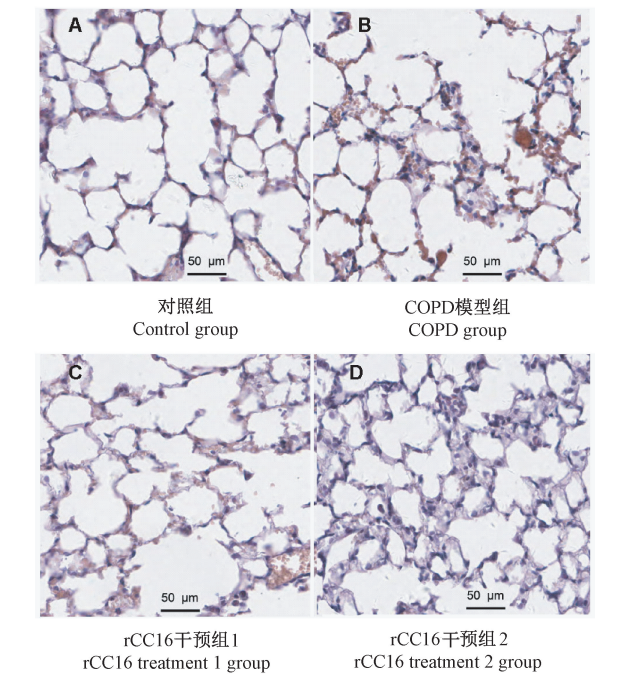
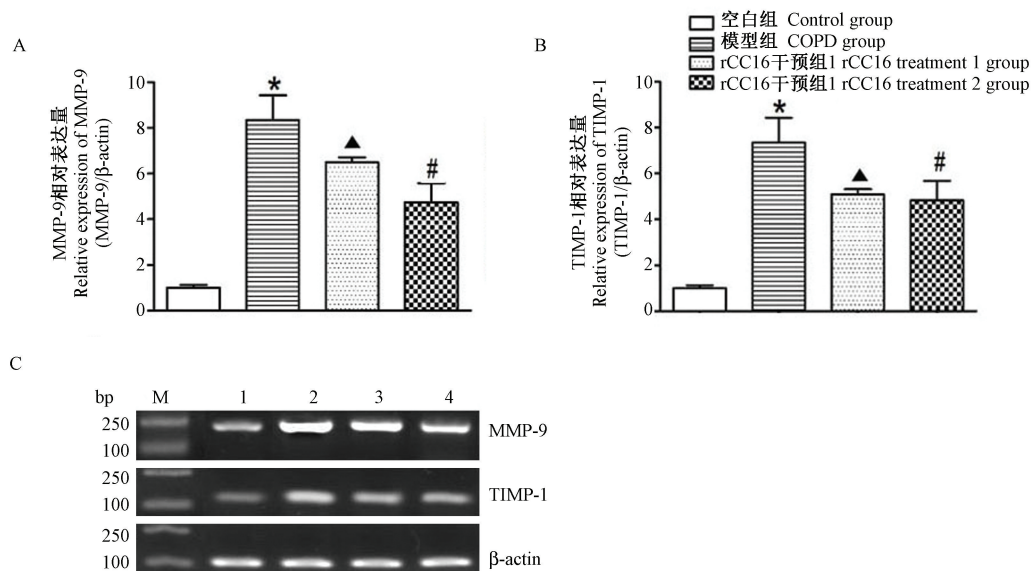


图 2 各组小鼠肺组织病理学改变(H&E 染色,×200)
Figure 2 Histological changes of the lung tissues in mice of different groups(H&E staining, ×200)

3 讨论

目前,COPD 居全球病死原因第 4 位,且随着工业化进程的推进,造成空气污染(如雾霾)的频发,导致 COPD 的发病率及死亡率逐年上升,世界卫生组织估计,至 2020 年 COPD 将位居世界疾病经济负担的第 5 位,全球病死原因的第 3 位^[8]。COPD 的临床特点主要为慢性炎症反应所引起的呼吸道的损伤。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)又称为明胶酶,主要由巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞分泌,能够降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM),破坏肺部结构,参与气道重塑。临床实验发现在 COPD 患者的痰液和支气管灌洗液中 MMP-9 的含量明显增高^[9]。TIMP 也是由巨噬细胞、内皮细胞分泌,可以特异性的抑制基质金属蛋白酶的活性。TIMP-1



注:A; MMP-9 mRNA 相对表达量;B: TIMP-1 mRNA 相对表达量;C: RT-qPCR 扩增 MMP-9、TIMP-1 产物琼脂糖凝胶电泳图。
M;DNA Marker,1~4 分别为对照组、COPD 模型组、rCC16 剂量组 1 和 rCC16 剂量组 2 的 PCR 产物。

图 3 RT-qPCR 检测 rCC16 对香烟诱导小鼠 COPD 模型肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响

Note. A: Relative mRNA expression of MMP-9. B: Relative mRNA expression of TIMP-1. C: Agarose gel electrophoresis of MMP-9 and TIMP-1 RT-qPCR amplification products. M: DNA Marker, 1 ~ 4: PCR products of the control group, COPD group, rCC16 treatment 1 group and rCC16 treatment 2 group, respectively.

Figure 3 RT-qPCR detection of the effect of rCC16 on the mRNA expressions of MMP-9 and TIMP-1 in lung tissues of the cigarette-induced mouse COPD models

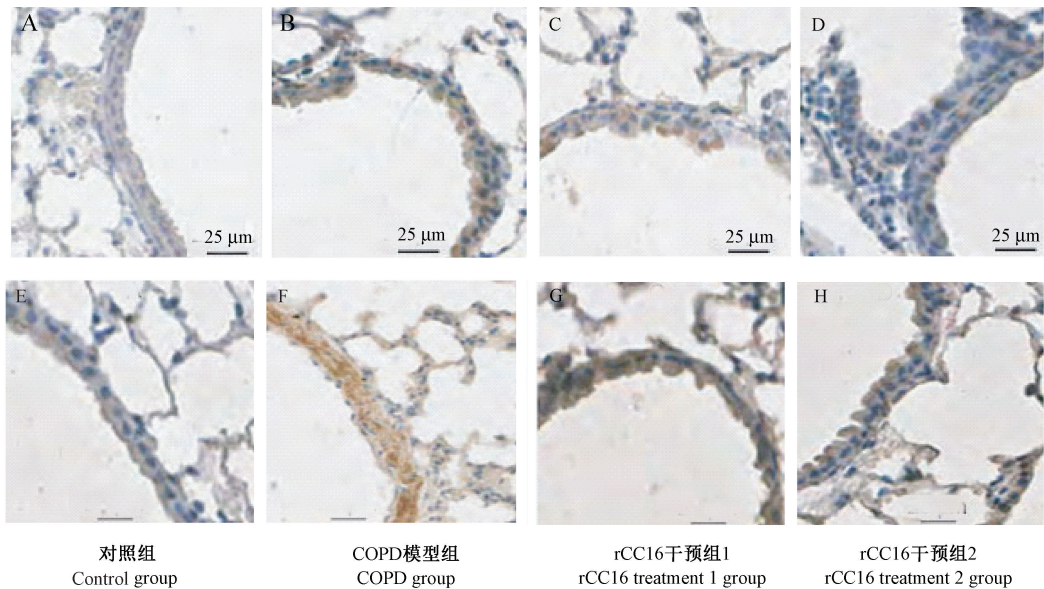
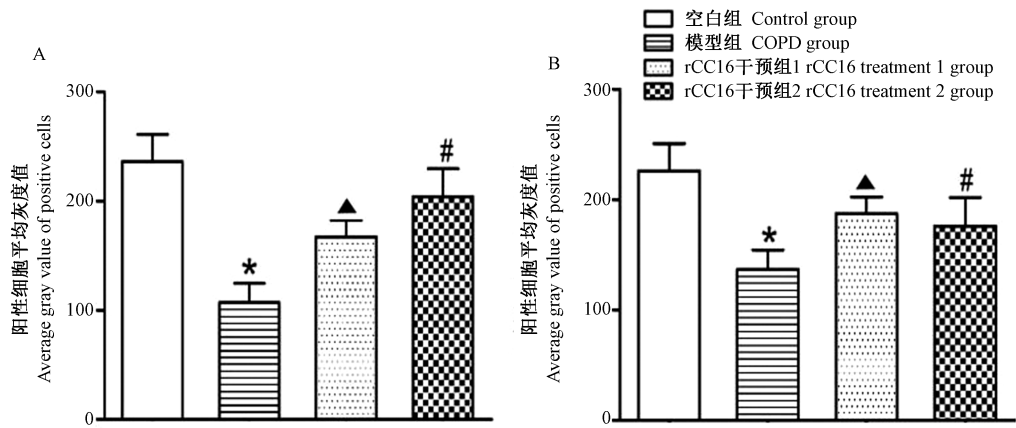


图 4 免疫组织化学法检测 rCC16 对香烟诱导小鼠 COPD 模型肺组织 MMP-9(A-D)及 TIMP-1(E-H)表达的影响 (×400)
Figure 4 Immunohistochemical detection of the effect of rCC16 on protein expression of MMP-9 (A-D) and TIMP-1(E-H) in lung tissue of the cigarette-induced mouse COPD models (×400)

和 MMP-9 以一定的比例(1:1)形成聚合体,从而使酶的活性降低^[10]。两者之间的动态平衡是维持 ECM 的关键,是呼吸道和肺部损伤及修复的标志^[11]。

克拉拉细胞沿气道对称分布的无纤毛柱状上皮细胞,CC16 是其主要的合成并分泌的蛋白质。该蛋白质具有抗炎和免疫调节功能,在肺部炎症性疾病的发生发展中具有重要作用^[2]。我们前期的体



注：A：MMP-9 阳性细胞平均灰度值；B：TIMP-1 阳性细胞平均灰度值。

图 5 各组小鼠肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 免疫组化阳性表达灰度分析

Note. A: The average gray value of MMP-9 positive cells. B: The average gray value of TIMP-1 positive cells.

Figure 5 Gray analysis of positive expression of MMP-9 and TIMP-1 in the lung tissues of mice in different groups

外研究显示,rCC16 蛋白质可以降低脂多糖诱导的大鼠气道上皮细胞中 MMP-9 的表达^[6]。组成大鼠和小鼠 CC16 蛋白质的氨基酸具有 89.58% 的一致性,rCC16 可以作用于小鼠来源的巨噬细胞,减少由脂多糖诱导的炎症因子肿瘤坏死因子、白细胞介素-6 和白细胞介素-8^[12-13]。此外,被动吸烟还可导致实验动物如大鼠气道上皮 Clara 细胞及其分泌蛋白(CC16)的减少^[14]。然而,rCC16 干预能否减轻 COPD 实验动物模型中肺组织的损伤及对 MMP-9 的表达有所影响还未见研究。本实验采用被动吸烟法成功构建了小鼠 COPD 模型,应用 rCC16 进行滴鼻干预治疗。研究结果显示 COPD 组的小鼠肺泡的完整性出现了明显的破坏,融合形成较大的肺泡,rCC16 干预后,上述表现有所改善,且高剂量组较低剂量组的作用明显,即具有剂量依赖关系。进一步我们分析了肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 的表达,RT-PCR 和免疫组化均显示 rCC16 可以降低 COPD 组小鼠肺组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的表达。有趣的是 rCC16 对 MMP-9 和 TIMP-1 表达的抑制作用主要体现在气道上皮细胞,而对肺泡上皮细胞中二者的表达则没有影响,且 rCC16 对 MMP-9 的调节具有剂量依赖性,而对 TIMP-1 的调节并不具有剂量依赖关系,这可能是因为气道上皮细胞通过网格蛋白介导的内吞作用将 rCC16 摄取后调控核转录因子-KB 的转录活性而直接影响 MMP-9 的表达^[6,15],而 rCC16 调节 TIMP-1 的具体机制还需进一步研究。

CC16 作为药物具有诸多优点,如体积小、易通过人工重组获得、对酶、温度、酸碱等变化的稳定性好,这些特点成为临床用药的巨大优势。前期的研

究证明大鼠 CC16 蛋白质能够降低脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)炎症反应^[12],表明其生物学活性不仅仅局限于大鼠,但该研究仅为体外实验。COPD 动物模型的建立主要有空气污染(特别是二氧化硫)、被动吸烟和呼吸道感染(主要是细菌)等^[16]。本文在研究中选用小鼠被动吸烟法制备 COPD 模型,就是要在体内实验的基础上进一步证实大鼠 rCC16 蛋白质的生物学活性。我们的实验表明,重组 CC16 蛋白质可以减轻 COPD 小鼠肺组织损伤,通过影响 MMP-9 和 TIMP-1 的表达来改善肺组织的气道重塑,为 CC16 在临床作为干预气道炎症疾病的应用提供了实验依据。

参 考 文 献(References)

[1] 钟南山. 慢性阻塞性肺疾病在中国[J].中国实用内科杂志. 2011, 31(5): 321-322.
Zhong NS. Chronic obstructive pulmonary disease in China[J]. Chin J Prac Intern Med, 2011, 31(5): 321-322.

[2] Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159 (5Pt1): 1585 -1591.

[3] Tsoumakidou M, Bouloukaki I, Thimaki K, et al. Innate immunity proteins in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Exp Lung Res, 2010, 36(6): 373-380.

[4] Plopper CG, Mango GW, Hatch GE, et al. Elevation of susceptibility to ozone-induced acute tracheobronchial injury in transgenic mice deficient in Clara cell secretory protein [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 213(1):74-85.

[5] 庞敏,王冬,李婷,等. 重组大鼠 CC16 蛋白质对 LPS 诱导大鼠气道上皮细胞表达 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(10):1843-1847.

- Pang M, Wang D, Li T, et al. Effect of recombinant rat CC16 protein on LPS-induced expression of TNF- α , IL-6 and IL-8 in rat tracheal epithelial cells[J]. Chin J Pathophys, 2016, 32(10):1843-1847.
- [6] Pang M, Wang H, Bai JZ, et al. Recombinant rat CC16 protein inhibits LPS-induced MMP-9 expression via NF-kappaB pathway in rat tracheal epithelial cells[J]. Exp Biol Med, 2015, 240(10):1266-1278.
- [7] Liu MW, Liu R, Wu HY, et al. Atorvastatin has a protective effect in a mouse model of bronchial asthma through regulating tissue transglutaminase and triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2):917-930.
- [8] Mannino DM. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity[J]. Chest, 2002, 121(5 Suppl):121S-126S.
- [9] Lowrey GE, Henderson N, Blakey JD, et al. MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD[J]. Respir Med, 2008, 102(6):845-851.
- [10] 朱平,严励,陈黎红,等. MMP-9/TIMP-1 表达在糖尿病鼠皮肤伤口愈合过程中的变化及意义初探[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(11):2204-2208.
- Zhu P, Yan L, Chen LH, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases during wound healing in diabetic rats[J]. Chin J Pathophys, 2008, 24(11):2204-2208.
- [11] Zhou XM, Hou G, Gu DX, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ in induced sputum is correlated with MMP-9/TIMP-1 imbalance and formation of emphysema in COPD patients[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(10):3703-3710.
- [12] Pang M, Yuan Y, Wang D, et al. Recombinant CC16 protein inhibits the production of pro-inflammatory cytokines via NF- κ B and p38 MAPK pathways in LPS-activated RAW264.7 macrophages[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(5):435-443.
- [13] Pang M, Liu HY, Li T, et al. Recombinant club cell protein 16 (CC16) ameliorates cigarette smoke induced lung inflammation in a murine disease model of COPD[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2):2198-2206.
- [14] 庞敏,王海龙,张彰,等. 不同药物对 COPD 大鼠 Clara 细胞和 CC16 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2):1-4.
- Pang M, Wang HL, Zhang Z, et al. Effects of different drugs on the number of Clara cells and CCL16 in rat COPD model[J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(2):1-4.
- [15] Long XB, Hu S, Wang N, et al. Clara cell 10-kDa protein gene transfection inhibits NF-kappaB activity in airway epithelial cells[J]. PLoS One, 2012, 7: e35960
- [16] 郑鸿翱,何韶衡. 建立慢性阻塞性肺疾病动物模型方法的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(4):249-252.
- Zheng HA, He SH. Progress in methods to produce COPD animal model[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2003, 11(4):249-252.

[收稿日期] 2018-09-05