

## 慢性高原病大鼠模型脏器组织中MMP-9及微血管表达

马轶 朱明明 杨敏 罗伟 冀林华

青海大学附属医院血液科, 西宁 810000

通信作者: 冀林华, Email: 13997244508@163.com

基金项目: 青海省科技计划项目(2019-ZJ-7081); 青海省卫生计生委一般指导性课题(2018-wjzdx-121)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.04.013

### Expression of MMP-9 and microvessels in rat organs with chronic mountain sickness

Ma Yi, Zhu Mingming, Yang Min, Luo Wei, Ji Linhua

Department of Hematology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000, China

Corresponding author: Ji Linhua, Email: 13997244508@163.com

慢性高原病(Chronic Mountain Sickness, CMS)又称蒙赫病,是长期暴露于高海拔地区所导致的一种临床综合征。全球有超过1.4亿人生活在海拔2500 m以上地区,其中5%~10%有患CMS的风险<sup>[1-2]</sup>。CMS可造成多器官损伤,心、肝、肺、脑等耗氧量较多的脏器受累较重,严重者可因血管栓塞而猝死<sup>[3]</sup>。CMS在血液系统中表现为红细胞增多,但无JAK2 V617F基因突变,与真性红细胞增多不同<sup>[4]</sup>。有研究显示,CMS患者骨髓微血管密度增加<sup>[5]</sup>,但目前未有CMS患者肝脏及心脏微血管密度(MVD)的相关研究。

基质金属蛋白酶9(MMP-9)为IV型胶原水解酶,广泛分布在肝脏及心脏中<sup>[6-7]</sup>,最典型的生物学功能是参与血管生成,与微血管增生、损伤密切相关<sup>[8]</sup>。既往研究显示,慢性间歇低氧可导致大鼠的骨髓组织微血管增生及MMP-9表达量升高<sup>[9]</sup>。本研究旨在探讨CMS大鼠模型肝脏及心脏MMP-9的表达情况以及与MVD的关系。

### 对象与方法

1. 动物、试剂及仪器: 雄性SD大鼠,清洁级6~7周龄(180~200 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠MMP-9 ELISA试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;BCA蛋白浓度试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;MMP-9、CD34单克隆抗体购于美国Abcam公司;SP-9002小鼠SP试剂盒及DAB显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;全自动血细胞分析仪购于深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;全自动酶标分析仪购于美国BIO-RAD公司。

2. 大鼠模型制备: 根据靳国恩等<sup>[10]</sup>方法制备大鼠模型,造模成功标准:HGB > 210 g/L,红细胞比容(Hct) > 65%,肺动脉压(PAP) > 30 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)。将SD大鼠从北京(海拔41 m)运至甘肃天水(海拔1100 m),适应性

喂养1周。将大鼠分为2组:实验组(CMS组)20只,运至青海省果洛藏族自治州玛多县(海拔4300 m),对照组20只,继续饲于甘肃天水(海拔1100 m),饲养30 d后,测定HGB、Hct及PAP判定是否造模成功,PAP数据由Powerlab系统采集分析。实验方案经过青海大学医学院伦理委员会批准,动物处理措施均按照《实验动物管理条例(GB14923-2010)》执行。

3. 取材:以20%乌拉坦(0.5 ml/100 g体重)腹腔麻醉大鼠,抽取腹主动脉血进行血常规检测;取靠近肝脏血管的肝脏组织及左室心肌组织,用于ELISA法检测及免疫组化检测。

4. ELISA法检测大鼠肝脏及心肌组织MMP-9表达水平:肝脏、心肌组织标本分别与生理盐水按照1:9体积比例放入EP管中,匀浆后离心取上清液。BCA法分别测两组大鼠肝脏、心肌组织匀浆总蛋白含量,ELISA法分别测定肝脏、心肌组织的MMP-9表达水平。按照试剂盒说明书进行操作,实验设2个复孔。

5. 免疫组化检测大鼠肝脏及心肌组织MMP-9水平及MVD:肝脏及心肌组织标本经4%多聚甲醛固定、包埋、切片后,按照试剂盒说明书进行免疫组化。以CD34表达水平表示MVD,每张切片于400倍镜下随机取5个视野拍照后,应用Image Pro Plus6.0分析图像,结果用平均吸光度表示。

6. 统计学处理:采用SPSS 26.0统计软件完成。对于正态分布计量资料采用均数±标准差表示,两组间均数比较采用独立样本t检验,相关性分析采用Pearson相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

### 结果

1. 大鼠一般资料的结果:大鼠的HGB、Hct、PLT及PAP差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),WBC及体重差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表1)。

2. ELISA 法检测 MMP-9 表达水平: CMS 组肝脏组织匀浆 MMP-9 表达水平为 (118.73±3.60) ng/ml, 高于对照组的 (91.27±3.26) ng/ml, 差异有统计学意义 ( $t = 25.293, P < 0.001$ ); CMS 组心肌组织匀浆 MMP-9 表达水平为 (111.16±3.50) ng/ml, 高于对照组的 (82.03±3.78) ng/ml, 差异有统计学意义 ( $t = 25.277, P < 0.001$ )。

3. 免疫组化结果: CMS 组肝脏组织中 MMP-9 表达水平为 0.23±0.01, 高于对照组的 0.21±0.01, 差异有统计学意义 ( $t = 3.112, P = 0.036$ ), 与此同时, CMS 组肝脏组织中 CD34 表达水平为 0.26±0.01, 高于对照组 0.22±0.01, 差异有统计学意义 ( $t = 4.579, P = 0.010$ ); CMS 组心肌组织中 MMP-9 表达水平为 0.22±0.02, 高于对照组 0.19±0.01, 差异有统计学意义 ( $t = 2.954, P = 0.042$ ), 与此同时, CMS 组肝脏组织中 CD34 表达水平为 0.22±0.02, 高于对照组 0.18±0.01, 差异有统计学意义 ( $t = 3.055, P = 0.038$ )。

4. 相关性分析: 在 CMS 组中, 用 ELISA 法测得的肝脏、心肌组织 MMP-9 与 HGB 均呈正相关 ( $r = 0.962, P < 0.001$ )、( $r = 0.989, P < 0.001$ ); 用免疫组化法测得的肝脏、心肌组织 MMP-9 的表达量与 HGB 也均呈正相关 ( $r = 0.993, P < 0.001$ )、( $r = 0.990, P < 0.001$ ), 肝脏、心肌组织 MMP-9 表达水平与 CD34 表达水平均呈正相关 ( $r = 0.998, P < 0.001$ )、( $r = 0.980, P < 0.001$ )。

### 讨 论

MMP-9 是 MMP 中分子量最大的酶, 由中性粒细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞等分泌, 可水解的底物为 IV 型胶原, 在心脏和血管生成中发挥关键作用<sup>[11]</sup>。肝脏作为体内最大的代谢器官, 在糖代谢、氨基酸代谢、脂类代谢等生存所必需的各种物质代谢中起着重要作用<sup>[12]</sup>。在低氧条件下肝脏生物学功能会受到影响, 出现脂质代谢紊乱、氧化应激障碍等<sup>[13]</sup>。慢性高原缺氧可刺激骨髓造血系统使红细胞数量增加, 血液黏度增加, 增加了血液循环过程的阻力, 心脏做功量增加。心肌细胞本身耗氧量大, 当身体在低氧条件下重新建立稳态时, 心肌能量代谢和生理功能会受到影响。心肌不能像骨骼肌一样维持无氧代谢, 平衡氧气需求与可用性对心脏功能和生存至关重要。心肌细胞肌丝溶解伴断裂, 线粒体肿胀, 数量增加, 线粒体嵴断裂、囊泡化等明显损伤<sup>[14]</sup>。当氧气供应减少时, ATP 生成减少影响着能量的生成、储备及利

用, 心脏收缩功能障碍, 并且这种时间延长可导致细胞凋亡和坏死<sup>[15]</sup>。慢性低氧条件下, 肺动脉血压的形成导致右心室肥大及心室重塑, 右心室壁厚度增加, 缺氧时间继续延长, 血液泵送至全身循环的阻力增加, 左室后负荷增加, 最后导致左心室肥大, 心脏重量增加, 严重时发展为心力衰竭<sup>[16]</sup>。

MVD 是组织血管生成的重要衡量指标。CD34 是血管内皮细胞的特异性标志物, 因其具有不与淋巴细胞和基质细胞发生交叉反应的特点, 并且比 CD31 和 VWF 更为敏感和特异。因此, 在微血管染色方面, 比 CD31 和 VWF 更准确。CD34 可以在大鼠组织血管内皮细胞表达, 可用于检测早期新生 MVD 的形成<sup>[17]</sup>, 因此, 本研究我们以 CD34 表达水平反映 MVD。结果显示 CMS 模型大鼠肝脏及心肌组织的 MMP-9 含量及 CD34 表达均高于对照组。低氧条件下 MMP-9 表达增多, 使得细胞线粒体凋亡途径受到抑制, Bcl-2 家族、Cyt-C 等凋亡相关因子释放减少细胞凋亡减少, 血管生成增加, 这是缺氧时细胞的代偿性反应<sup>[18]</sup>。低氧状态下, 在氧化应激作用下, 肝脏脂质代谢受到影响, 增加了肝脏组织的 MVD。在本研究中, CMS 组大鼠肝脏组织的 MMP-9 含量高于对照组, 且与 CD34 呈正相关, MMP-9 最重要的作用便是血管生成, 血管生成是一种对缺氧的生理反应, MVD 的增加可能是缓解缺氧状态的部分代偿过程<sup>[5]</sup>。相比较平原环境下饲养的大鼠, CMS 组大鼠心肌组织的 MMP-9 表达含量及 CD34 升高。心肌细胞受损可影响心肌线粒体糖酵解和氧化磷酸化的过程, 使得 MVD 升高<sup>[19-20]</sup>。CMS 引起的多器官损伤类似于其他缺氧缺血损伤造成的多器官损伤, 一方面低氧本来可使氧化应激物的水平升高, 另一方面氧化应激过程与炎症过程存在密切联系, 可激活许多复杂的通路和相关蛋白, 如 IL-6-JAK2/STAT3-MMP-9 通路, 高表达的 MMP-9 参与微血管的形成最终促使 MMP-9 的升高<sup>[21]</sup>。CMS 本质上是一种在全球高海拔地区人群中流行的适应不良的临床综合征, 高海拔生活适应不良的主要指标是红细胞过度产生<sup>[22]</sup>, 高海拔环境下 MMP-9 的增加与 HGB 增加有关, 红细胞生成和血管生成的调节本身是对缺氧的一种适应, 低氧可刺激骨髓造血系统, 造成红细胞计数升高, MMP-9 通过对基膜的降解作用参与血管生成, 并可导致组织 MVD 增加。

本研究证实了在 CMS 大鼠模型中, 肝脏及心脏的 MMP-9 及 MVD 均增加, 为阐明 CMS 发病机制和病理生理过程提供重要资料。CMS 引起肝脏及心肌组织 MMP-9 和

表 1 慢性高原病(CMS)模型大鼠与对照组一般资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	鼠数	HGB(g/L)	Hct(%)	WBC( $\times 10^9/L$ )	PLT( $\times 10^9/L$ )	PAP(mmHg)	体重(g)
CMS组	20	225.65±9.57	68.55±2.50	5.65±1.13	659.0±44.9	68.0±3.99	248.20±14.98
对照组	20	120.55±6.77	39.35±3.05	6.05±1.23	809.0±36.2	28.2±3.29	247.00±14.46
<i>t</i> 值		40.076	33.113	-1.058	-11.611	34.450	0.269
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001	0.297	< 0.001	< 0.001	0.790

注: Hct: 红细胞比容; PAP: 肺动脉压, 1 mmHg = 0.133 kPa

MVD增加的具体机制仍需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Sahota IS, Panwar NS. Prevalence of Chronic Mountain Sickness in high altitude districts of Himachal Pradesh [J]. *Indian J Occup Environ Med*, 2013, 17(3):94-100. DOI: 10.4103/0019-5278.130839.
- [2] Vyas KJ, Danz D, Gilman RH, et al. Noninvasive Assessment of Excessive Erythrocytosis as a Screening Method for Chronic Mountain Sickness at High Altitude [J]. *High Alt Med Biol*, 2015, 16(2):162-168. DOI: 10.1089/ham.2015.0026.
- [3] Enserink M. Hypoxia city [J]. *Science*, 2019, 365(6458):1098-1103. DOI: 10.1126/science.365.6458.1098.
- [4] 冀林华, 李占全, 崔森, 等. JAK2 基因 V617F 点突变在高原红细胞增多症患者中的临床意义研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(4): 319-320. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.04.017.
- [5] 苏娟. 慢性高原骨髓细胞 HIF- $\alpha$ /EPO 和 VEGF 变化及低氧条件下 miR-122 对 EPO 的调控作用 [D]. 青海大学, 2018.
- [6] 刘丽莉, 崔南, 王革丽. MMP-9 抑制剂对大鼠肝脏缺血再灌注模型的影响分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(3):243-246. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2020.03.006.
- [7] Azevedo A, Prado AF, Antonio RC, et al. Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 115(4): 301-314. DOI: 10.1111/bcpt.12282.
- [8] Aguilera-Montilla N, Bailón E, Ugarte-Berzal E, et al. Matrix metalloproteinase-9 induces a pro-angiogenic profile in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(1): 198-204. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.09.127.
- [9] 朱明明, 杨敏, 刘文玲, 等. 慢性间歇低氧大鼠模型骨髓中基质金属蛋白酶-9 及微血管增生的变化 [J]. *广东医学*, 2020, 41(18):1858-1862. DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.20194377.
- [10] 靳国恩, 韵海霞, 马兰, 等. 高原红细胞增多症动物模型的建立及其生理功能反应 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(24):4713-4716. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2009.24.023.
- [11] Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, et al. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes [J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33(2):119-208. DOI: 10.1016/j.mam.2011.10.015.
- [12] Xu Z, Jia Z, Shi J, et al. Transcriptional profiling in the livers of rats after hypobaric hypoxia exposure [J]. *PeerJ*, 2019, 7:e6499. DOI: 10.7717/peerj.6499.
- [13] 荣黎, 曾维政, 吴晓玲. 高原缺氧与肝脏损伤 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(21):2171-2178. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2009.21.010.
- [14] 曾靖. 高原红细胞增多症 (HAPC) 大鼠模型的病理学研究 [D]. 四川农业大学, 2016.
- [15] Holloway C, Cochlin L, Codreanu I, et al. Normobaric hypoxia impairs human cardiac energetics [J]. *FASEB J*, 2011, 25(9): 3130-3135. DOI: 10.1096/fj.11-183426.
- [16] Ferdinal F, Suyatna FD, Wanandi SI, et al. Structural and morphological changes in rat ventricular myocardium induced by chronic systemic hypoxia [J]. *Acta Med Indones*, 2010, 42(3): 135-141.
- [17] Susarla SM, August M, Dewsnup N, et al. CD34 staining density predicts giant cell tumor clinical behavior [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009, 67(5):951-956. DOI: 10.1016/j.joms.2008.12.045.
- [18] Ma J, Ji L, Li Z, et al. Downregulation of intrinsic apoptosis pathway in erythroblasts contributes to excessive erythrocytosis of chronic mountain sickness [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2019, 76: 25-31. DOI: 10.1016/j.bcmd.2019.01.002.
- [19] Chou CH, Ho CM, Lai SL, et al. B-cell activating factor enhances hepatocyte-driven angiogenesis via B-cell CLL/lymphoma 10/Nuclear factor- $\kappa$ B signaling during liver regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20). DOI: 10.3390/ijms20205022.
- [20] Zhao W, Zhao T, Chen Y, et al. Angiotensin 1-7 promotes cardiac angiogenesis following infarction [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(1):37-42. DOI: 10.2174/15701611113119990006.
- [21] Zhu M, Yang M, Yang Q, et al. Chronic Hypoxia-Induced Microvessel Proliferation and Basal Membrane Degradation in the Bone Marrow of Rats Regulated through the IL-6/JAK2/STAT3/MMP-9 Pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 9204708. DOI: 10.1155/2020/9204708.
- [22] Bermudez D, Azad P, Figueroa-Mujica R, et al. Increased hypoxic proliferative response and gene expression in erythroid progenitor cells of Andean highlanders with chronic mountain sickness [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2020, 318(1): R49-R56. DOI: 10.1152/ajpregu.00250.2019.

(收稿日期:2020-09-20)

(本文编辑:刘爽)