

• 医药生物技术 •

# 小鼠生长过程中肝、肺、肾胶原蛋白与 MMP-1 含量变化

高建萍<sup>1,2</sup>, 张扬<sup>1</sup>, 邢芳毓<sup>1</sup>, 孔英俊<sup>1,2</sup>, 张贵锋<sup>1,2</sup>

1 中国科学院 过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

2 中国科学院大学 化学工程学院, 北京 100049

高建萍, 张扬, 邢芳毓, 等. 小鼠生长过程中肝、肺、肾胶原蛋白与 MMP-1 含量变化. 生物工程学报, 2021, 37(2): 646-654.  
Gao JP, Zhang Y, Xing FY, et al. Changes of collagen and MMP-1 in liver, lung and kidney during growth of mice. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 646-654.

**摘要:** 利用高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 和酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunoassay, ELISA) 对小鼠生长过程中肝、肺、肾胶原蛋白与基质金属蛋白酶-1 (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 含量变化规律进行研究。以 0-18 周的小鼠肝、肺、肾为研究对象, 通过 HPLC 法对不同周龄小鼠肝、肺、肾中羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp) 含量及比例进行测定, 并换算得到胶原蛋白的含量; 利用 ELISA 检测不同周龄小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的含量和活性。结果表明, 小鼠肝、肺、肾中胶原含量各不相同(肺 (COL)>肾 (COL)>肝 (COL)), 且随着周龄的增加胶原蛋白含量变化均呈先增加后降低的趋势。其中肝、肺、肾中胶原蛋白含量分别在第 9、6、9 周达到最高值, 分别为 5.52 ng/mg、54.10 ng/mg、19.20 ng/mg; 9-18 周呈缓慢降低趋势。ELISA 检测结果表明, 小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的含量随周龄增加呈先降低后增加的趋势, MMP-1 活性的变化趋势与之相反。这表明组织内胶原蛋白含量的增加会抑制 MMP-1 的分泌。

**关键词:** 生长过程, 肝脏, 肺脏, 肾脏, 胶原蛋白含量, 基质金属蛋白酶-1

## Changes of collagen and MMP-1 in liver, lung and kidney during growth of mice

Jianping Gao<sup>1,2</sup>, Yang Zhang<sup>1</sup>, Fangyu Xing<sup>1</sup>, Yingjun Kong<sup>1,2</sup>, and Guifeng Zhang<sup>1,2</sup>

1 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2 School of Chemical and Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** The high performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme-linked immunoassay (ELISA) were used to

**Received:** March 18, 2020; **Accepted:** August 13, 2020

**Supported by:** National Key Technology Research and Development Programs of China (Nos. 2018YFA0108200, 2018YFC1106400), Science and Technology Program of Guangzhou, China (No. 201803010086).

**Corresponding author:** Guifeng Zhang. Tel/Fax: +86-10-82613421; E-mail: gfzhang@ipe.ac.cn

国家重点研发计划 (Nos. 2018YFA0108200, 2018YFC1106400), 广州市科技计划项目 (No. 201803010086) 资助。

investigate the changes of collagen and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in liver, lung and kidney during growth process of mice. The mice from 0 to 18 weeks were used as the research objects. The contents and proportions of hydroxyproline (Hyp), which were used to calculate the collagen contents, in liver, lung and kidney of different weeks were analyzed with HPLC. The contents and activity of MMP-1 in liver, lung and kidney of different weeks were analyzed with ELISA. The results showed that the collagen contents in liver, lung, and kidney were different ( $Lung_{(COL)} > Kidney_{(COL)} > Liver_{(COL)}$ ), and they all increased first and then decreased with weeks. The collagen contents in liver, lung, and kidney reached the highest level in the ninth (5.52 ng/mg), sixth (54.10 ng/mg) and ninth (19.20 ng/mg) week, respectively. Then it declined slowly from 9 to 18 weeks. The result of ELISA showed that the MMP-1 contents in liver, lung and kidney decreased first and then increased with weeks, and the trend of MMP-1 activity was opposite. It indicated that the increase of collagen contents in the tissues will inhibit the secretion of MMP-1.

**Keywords:** growth process, liver, lung, kidney, collagen content, matrix metalloproteinase-1

胶原蛋白是哺乳动物细胞外基质的主要成分, 约占总蛋白含量的 25%–30%<sup>[1-2]</sup>。目前文献中报道的胶原蛋白有 28 种<sup>[3]</sup>, 主要分布于皮肤、骨骼、肌腱、血管壁和牙齿等部位<sup>[4-5]</sup>, 并广泛分布于结缔组织的间质中, 是一些重要脏器如肝脏、肺脏和肾脏间质组织中的重要成分<sup>[6-9]</sup>。胶原蛋白分子都是由 3 条左手螺旋的  $\alpha$  肽链构成的呈右手旋转的超三螺旋结构, 其一级结构均为 (Gly-X-Y)<sub>n</sub> 的重复序列 (其中 X 多为 Pro, Y 多为 Hyp)<sup>[10-12]</sup>, 其中羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp) 为胶原蛋白中特有的氨基酸, 其含量与动物来源、组织类型及年龄等密切相关<sup>[13-14]</sup>。正常组织中胶原蛋白的稳态由合成和降解途径共同调控, 基质金属蛋白酶-1 (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 是调节胶原蛋白降解的关键酶<sup>[15-16]</sup>, 它对胶原蛋白的降解是发育、组织重塑和肿瘤增殖等的关键步骤<sup>[17-18]</sup>。

胶原蛋白作为细胞外基质的主要成分, 其含量与动物组织的年龄和功能性质密切相关。Rotter 等利用 Hyp 检测法研究了鼻软骨中胶原蛋白含量与年龄的变化关系, 研究结果表明, 30 岁以前人鼻软骨的机械性能与胶原蛋白含量密切相关<sup>[19]</sup>; Bailey 等研究了人类骨头中骨胶原的含量与年龄的关系, 结果表明, 随着年龄的增加人骨中胶原含量呈降低趋势<sup>[20]</sup>; Mays 等研究老鼠骨骼、心脏、皮肤中胶原的合成和降解随年龄的变化, 结果表明, 随着年龄的增加, 小鼠体内胶原蛋白的合成速率显著降低<sup>[15]</sup>。有文献报道, 胶原蛋白的

含量与某些疾病的发生密切相关, Rojkind 等研究表明, 肝硬化组织中胶原含量是正常肝组织中胶原含量的 4–7 倍<sup>[21]</sup>; 聂丽等研究表明, 肺纤维化与 I 型胶原的过度沉积有关<sup>[22]</sup>; Omireeni 等研究表明, 胶原蛋白的含量和胶原纤维的分布与肾脏疾病的发生相关<sup>[23]</sup>。因此, 系统地分析动物生长过程中肝、肺、肾中胶原蛋白与 MMP-1 的含量变化规律对于相关疾病和生理状态的判断具有重要的意义。

本研究拟以小鼠肝、肺、肾为研究对象, 通过高效液相色谱法, 研究不同周龄的小鼠肝、肺、肾中 Hyp 的比例及含量, 换算得到生长过程中小鼠肝、肺、肾中胶原蛋白含量的变化规律。通过 ELISA 法测定各周龄小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的含量, 明确 MMP-1 与胶原蛋白含量变化的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠 (C57BL/6N, 雄性) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司; 氨基酸标准品、2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 购自美国 Sigma 公司; 小鼠 MMP-1 试剂盒购自武汉 Cloud-clone 公司; 色谱纯乙腈 (ACN) 及甲酸 (FA) 购自 Merck 公司; 其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

U3000 液相色谱, 美国赛默飞世尔科技有限公司, 采集软件为 Xcalibur 3.1; LGJ-100F 真空

冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;  
HC-2518R 高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学  
仪器有限公司;MYP19-2 磁力搅拌器,上海梅颖  
浦仪器仪表制造有限公司。

### 1.3 Hyp 含量分析

#### 1.3.1 小鼠内脏预处理

分别取 0、1、3、6、9、12、15、18 周小鼠,  
分为 8 组,每组设置 6 只小鼠,进行平行试验。  
脱颈处死小鼠,取出肝、肺、肾,用生理盐水清洗  
表面血渍,用滤纸吸干表面水分,称重,冷冻干燥,  
粉碎;每个样品用 10 倍体积的 Tris-HCl (0.1 mol/L,  
pH 7.5,含 5% 曲拉通-100) 于 4 °C 搅拌处理 48 h,  
除去杂质,每隔 12 h 换液一次;再用超纯水于  
4 °C 搅拌处理 24 h,每隔 12 h 换液一次,去除样  
本中残留的试剂;冷冻干燥,称重,保存待用<sup>[24]</sup>。

#### 1.3.2 水解

准确称取 10 mg 肝、肺、肾冻干样本分别置  
于安剖瓶中,各加入 2 mL HCl (6 mol/L),封口,  
110 °C 条件下水解 12 h,取出,冷却至室温,用  
6 mol/L NaOH 调至中性,转移至容量瓶中并用超  
纯水分别定容至 10 mL。

#### 1.3.3 氨基酸衍生

取样品、氨基酸标准品、超纯水 (空白对照)  
各 200 μL,分别加入 100 μL 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub>、  
20 μL DNFB (1%),于 60 °C 避光衍生 1 h,冷却至  
室温,各组分别加入 680 μL 0.1 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
10 000 r/min 离心 10 min。

#### 1.3.4 HPLC 分析

氨基酸高效液相色谱分离条件,色谱柱:  
Zorbax C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:  
A 为 0.05 mol/L 乙酸钠水溶液,B 为 50% 乙腈水  
溶液 (V/V);梯度:0–15 min, 30%–55% B,  
15–25 min, 55%–100% B, 25–35 min, 100%–30%  
B, 35–45 min, 30% B 保持 10 min;流速:  
0.5 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:30 °C;  
上样量 5.0 μL<sup>[25]</sup>。

### 1.3.5 胶原含量计算公式

胶原蛋白含量按以下 3 个公式计算:

$$C = \frac{\text{Hyp 个数} \times \text{Hyp 分子量}}{\sum \text{氨基酸分子量} \times \text{氨基酸个数}} \quad (\text{公式 1})$$

$$m = \text{Hyp 浓度} \times \text{样品体积} \quad (\text{公式 2})$$

$$M = \frac{m}{c} \quad (\text{公式 3})$$

其中:  $C$  为 Hyp 占总胶原蛋白的质量分数;  
 $m$  为经过液相检测的样品中 Hyp 的质量;  $M$  为样  
品中胶原蛋白的质量。

### 1.4 MMP-1 含量检测

#### 1.4.1 样品预处理

将冻干的肝、肺、肾样本充分研磨成粉末,  
每个样品各取 5 mg,加入 2 mL 磷酸盐缓冲液 (pH  
7.4), 4 °C 搅拌提取 12 h,取出, 10 000 r/min 离  
心 10 min,取上清,待用。

#### 1.4.2 ELISA 检测

MMP-1 的检测采用双抗夹心 ELISA 法<sup>[26]</sup>,  
具体方法参照试剂盒说明书进行,操作步骤如下:  
(1) 加样:分别设置标准孔、待测样品孔、空白  
孔。依次加入 100 μL 不同浓度的标准品、空白孔  
加 100 μL 标准品稀释液、余孔加 100 μL 待测样  
品,酶标板上覆膜,37 °C 温浴 1 h,弃去液体后  
甩干。(2) 每孔加 100 μL 检测溶液 A 工作液,  
酶标板覆膜,37 °C 温浴 1 h。每孔加 350 μL 洗涤  
液,浸泡 1–2 min,甩干,该过程重复 3 次。(3) 每  
孔加 100 μL 检测溶液 B 工作液,酶标板覆膜,  
37 °C 温浴 30 min。每孔加 350 μL 洗涤液,浸泡  
1–2 min,甩干,该过程重复 5 次。(4) 每孔加  
90 μL TMB 底物溶液,酶标板覆膜,37 °C 避光显  
色,反应 10–20 min,每孔加 50 μL 终止液,终  
止反应,轻轻摇匀。(5) 立即用酶标仪在 450 nm  
测量各孔的光密度值 ( $OD_{450}$ )。(6) 根据标准品  
建立标准曲线,代入公式得到样品中活性生长因  
子含量,再换算成其在肝、肺、肾中样品干重中  
的含量。

MMP-1 活性检测采用双抗夹心 ELISA 法, 具体方法参照试剂盒说明书进行, 操作步骤如下: (1) 加样: 分别设置标准孔、待测样品孔、空白孔。依次加入 50  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品、空白孔加 50  $\mu\text{L}$  标准品稀释液、余孔加 50  $\mu\text{L}$  待测样品。(2) 温浴: 酶标板上覆膜, 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 0.5 h。(3) 配液: 将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。(4) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干。每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。(5) 加酶: 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  酶标试剂, 空白孔除外。(6) 温浴: 操作同 (2)。(7) 洗涤: 操作同 (4)。(8) 显色: 每孔先加入 50  $\mu\text{L}$  显色剂 A, 再加入 50  $\mu\text{L}$  显色剂 B, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 10 min。(9) 终止: 每孔加 50  $\mu\text{L}$  终止液, 终止反应。(10) 测定: 以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 ( $OD_{450}$ ) 值。

### 1.5 统计学方法

采用 SAS 9.3 统计软件处理数据, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 对各组数据进行单因素方差分析, 组间比

较采用 SNK-q 检验,  $P \leq 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠肝、肺、肾中 Hyp 含量变化分析

实验通过 HPLC 法检测了 0–18 周小鼠肝、肺、肾中的 Hyp 含量。图 1 为 19 种氨基酸标准品色谱图, 其中保留时间为 7.29 min 的色谱峰为 Hyp。表 1 为不同周龄小鼠肝、肺、肾中每 1 000 个氨基酸中 Hyp 数量。结果表明, 在 0–15 周时, 肝脏胶原中 Hyp 数量随着年龄的增加而增加。其中, 0 周小鼠肝脏胶原中每 1 000 个氨基酸中 Hyp 平均数量为 45.67, 15 周时增加至 74.19; 15–18 周, 肝脏胶原中 Hyp 数量基本保持不变; 肺脏和肾脏中 Hyp 含量变化表现为, 0–12 周内, 每 1 000 个氨基酸中 Hyp 平均数量分别由 43.59 和 35.47 增加至 88.20 和 79.74; 12–18 周内, Hyp 数量均随周龄的增加反而呈降低趋势, 分别降至 76.75 和 55.65。

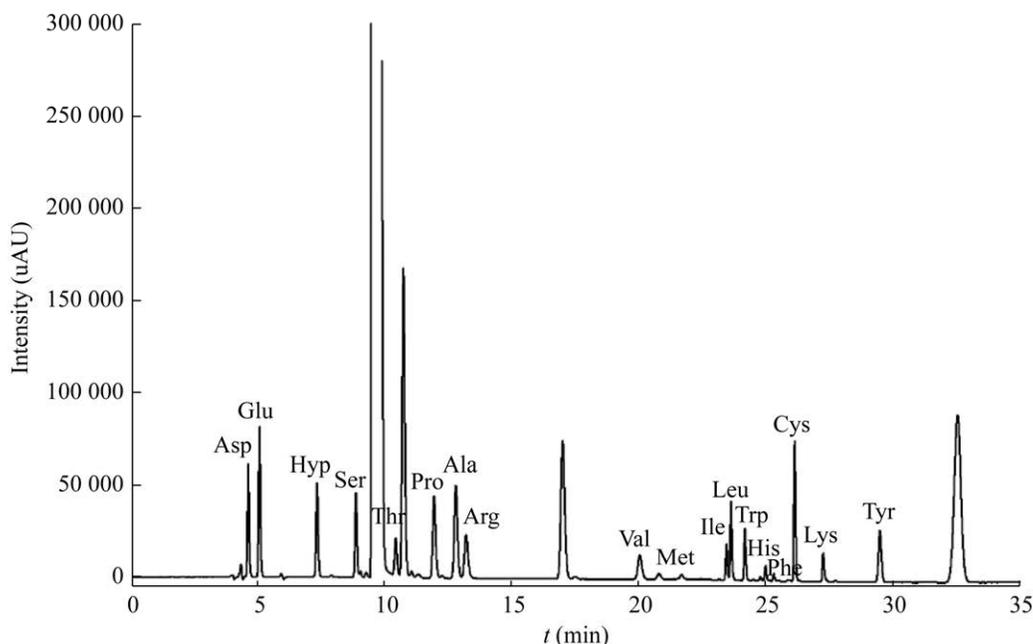


图 1 19 种氨基酸标准品液相色谱图

Fig. 1 Liquid chromatogram of 19 amino acid standards.

表 1 不同周龄小鼠肝、肺、肾中每 1 000 个氨基酸中 Hyp 数量

Table 1 Number of hydroxyproline in every 1 000 amino acids in liver, lung and kidney of mice of different weeks

Weeks	Liver	Lung	Kidney
0	45.67±2.15	43.59±1.99	35.47±0.87
1	49.52±2.72	48.24±3.04	37.17±1.15
3	47.56±1.93	53.35±2.19	42.24±1.32
6	42.48±2.01	67.17±3.27	47.47±2.15
9	57.71±2.14	77.00±2.94	48.00±3.01
12	66.50±1.87	88.20±3.33	79.74±2.72
15	74.19±2.96	75.38±1.57	66.29±2.68
18	73.76±3.05	76.75±4.02	55.65±2.12

综上,小鼠肝、肺、肾中羟脯氨酸羟基化修饰的比例与其生长发育程度相关,即在小鼠的快速生长发育时期,其胶原蛋白的 Hyp 比例会随着年龄的增加而增加,当生长发育成熟之后, Hyp 比例呈缓慢降低趋势。

## 2.2 小鼠肝、肺、肾中胶原蛋白含量变化分析

取不同浓度的 Hyp 标准溶液,从低浓度到高

浓度分别进样 10  $\mu$ L,按照 1.4 中列举的方法进行分析。图 2 为不同浓度的 Hyp 标准品的液相色谱图,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归。回归方程及线性范围为  $y=9\ 470.7x+5\ 488.2$  ( $R^2=0.999\ 9$ ),在 4–400  $\mu$ g/mL 范围内线性良好。

各称取 10 mg 冻干后的内脏样品,经盐酸水解、中和、衍生后根据上述方法分析,图 3 为 9 周龄小鼠肝、肺、肾的氨基酸液相色谱图,根据 Hyp 标准曲线和 1.3.5 公式计算得到各脏器中胶原蛋白的含量,图 4 为小鼠肝、肺、肾中胶原蛋白含量随周龄的变化趋势。结果表明,在 0–3 周范围内小鼠肝脏中胶原蛋白含量随周龄的增加而显著增加 ( $P<0.01$ ),由 2.23  $\mu$ g/mg 增加至 5.36  $\mu$ g/mg; 3–12 周肝脏中胶原含量保持稳定,在 5.31–5.52  $\mu$ g/mg 之间;在 12–18 周范围内,小鼠肝脏中胶原含量随着周龄的增加而降低,其中 12–15 周降低显著 ( $P<0.05$ ),由 5.42  $\mu$ g/mg 降低至 3.95  $\mu$ g/mg,第 18 周时降低至 3.63  $\mu$ g/mg,且低于 1 周龄的含量。与 9 周龄的最高含量相比,第 18 周的胶原含量降低 34.29%。

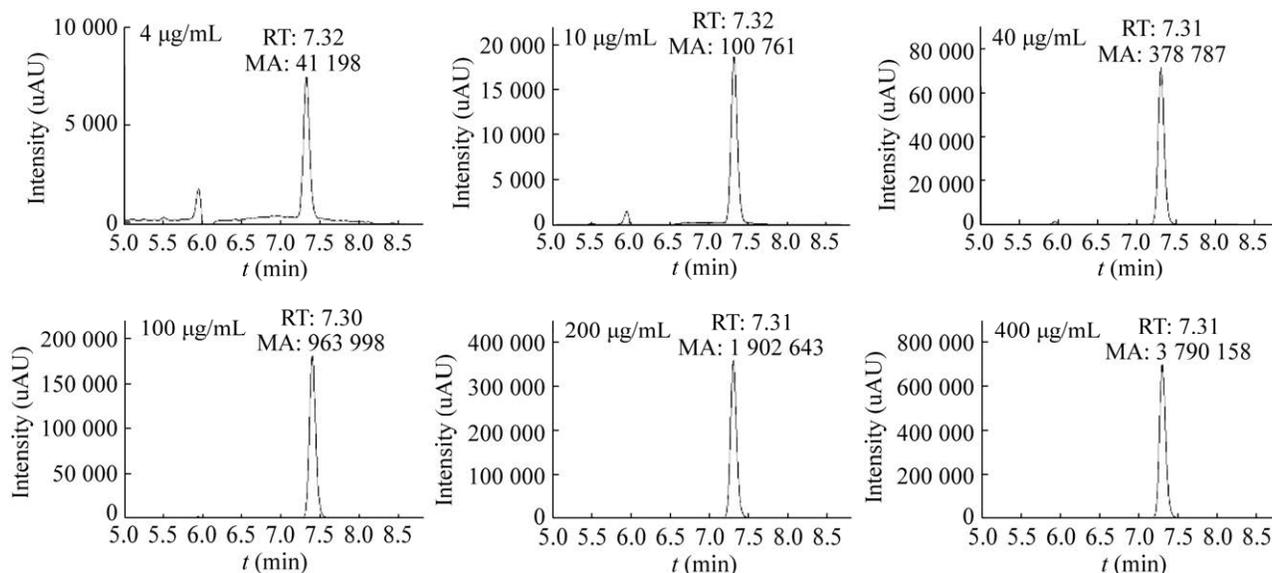


图 2 不同浓度 Hyp 标准品液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatograms of different concentrations of hydroxyproline standard.

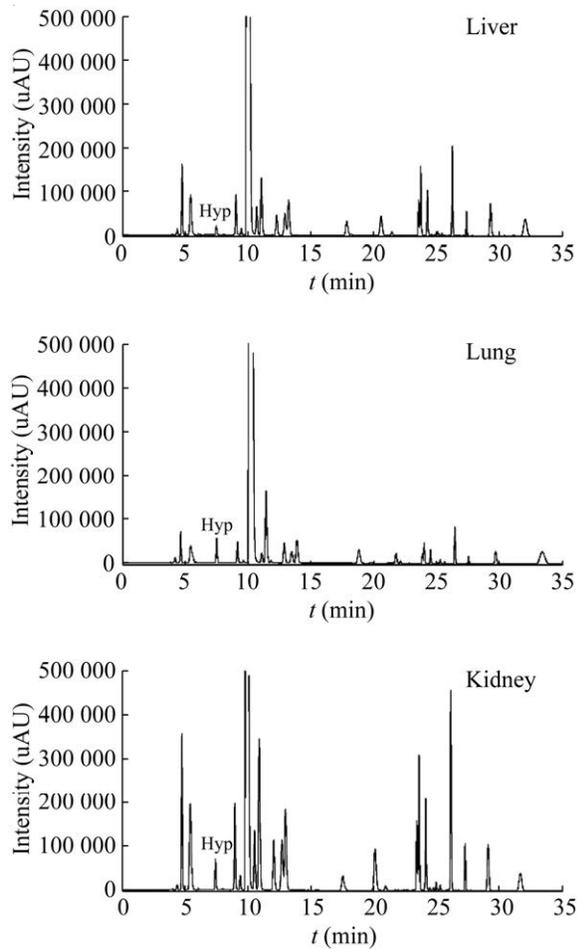


图3 9周龄的小鼠肝、肺、肾氨基酸液相色谱图  
Fig. 3 Amino acid liquid chromatogram of liver, lung and kidney of 9-week-old mice.

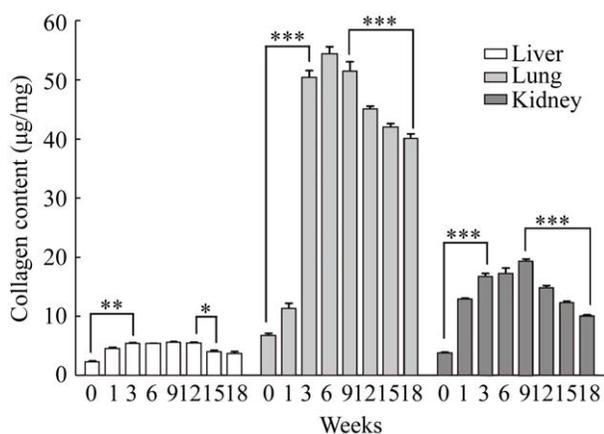


图4 小鼠肝、肺、肾中胶原蛋白含量随周龄的变化  
Fig. 4 Changes of collagen content in liver, lung and kidney of mouse with weeks.

小鼠肺脏中胶原蛋白含量在0–3周范围内随周龄的增加显著增加 ( $P<0.005$ ), 由  $6.62 \mu\text{g}/\text{mg}$  增加至  $50.25 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 6周时达到最高值  $54.10 \mu\text{g}/\text{mg}$ ; 9–15周肺脏中胶原含量显著降低 ( $P<0.005$ ), 第15–18周缓慢降低。与第6周的最高含量相比, 第18周时肺部胶原含量降低  $25.97\%$ 。

小鼠肾脏中的胶原蛋白含量在0–3周范围内随周龄的增加显著增加 ( $P<0.005$ ), 由  $3.80 \mu\text{g}/\text{mg}$  增加至  $12.86 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 第3–9周增加速度缓慢, 第9周时达到最高值  $19.20 \mu\text{g}/\text{mg}$ ; 9–12周肾脏中胶原含量随周龄的增加而显著降低 ( $P<0.005$ ), 第18周降低至  $10.04 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 且低于第1周龄的含量。与第9周的最高含量相比, 第18周时肾脏胶原含量降低  $47.71\%$ 。

综上, 小鼠肺脏中的胶原蛋白含量最高, 肾脏其次, 肝脏最低。小鼠肝、肺、肾中总胶原蛋白含量均随周龄增加呈现先增加后降低的趋势。三种脏器中胶原蛋白含量均在第6–9周达到最高值; 在第12–18周呈降低趋势。其中在第18周时, 肝脏和肾脏胶原蛋白含量均低于第1周的含量, 肺脏中胶原蛋白含量低于第3周的含量。

### 2.3 小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 含量变化分析

通过 ELISA 的方法对不同周龄小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的含量进行分析, 结果如图5所示, 小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的含量均随周龄的增加呈先降低后增加的趋势。肝脏中 MMP-1 的含量在0–1周和3–6周范围内呈明显降低趋势 ( $P<0.05$ ), 9–12周范围降低最明显 ( $P<0.005$ ), 12周迅速降低至最低 ( $40 \text{ pg}/\text{mg}$ ), 12周的含量为0周的  $5.9\%$ ; 12–18周呈显著增加趋势 ( $P<0.005$ ), 18周时达到  $230 \text{ pg}/\text{mg}$ , 为0周的  $33.82\%$ ; 小鼠肺脏中 MMP-1 变化趋势与肝脏相似, 其中0–9周肺脏中 MMP-1 的含量呈显著降低趋势 ( $P<0.05$ ), 9–12周降低趋势最显著 ( $P<0.005$ ), 12周时降低至  $190 \text{ pg}/\text{mg}$ , 为0周的  $31.67\%$ , 12–18周显著增加 ( $P<0.005$ ), 第18周 MMP-1 的含量高于0周含

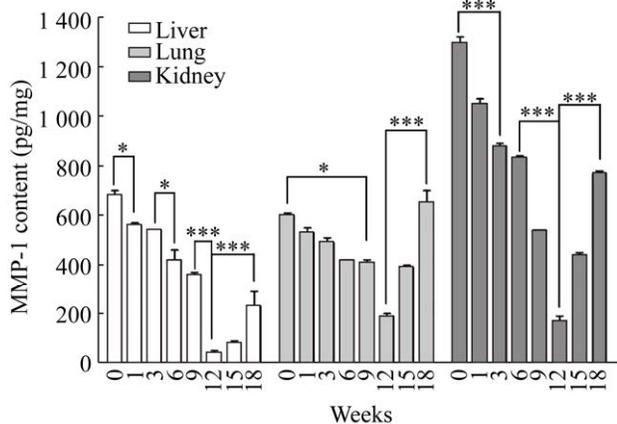


图5 小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 含量随周龄的变化  
Fig. 5 Changes of MMP-1 content in liver, lung and kidney of mouse with weeks.

量；小鼠肾脏中的 MMP-1 含量变化除 3-6 周之外，其余相邻两组之间变化均比较显著 ( $P < 0.005$ )，第 12 周时为最低值，降低至 170 pg/mg，为 0 周的 13.18%，18 周时增加至 770 pg/mg，为 0 周的 59.69%。

综上，小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的含量均随周龄的增加呈先降低后增加的趋势，肝脏和肺脏中 MMP-1 含量相当，肾脏中 MMP-1 含量最高。三种脏器中 MMP-1 含量均在第 12 周时达到最低值。

#### 2.4 小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 活性变化分析

利用 ELISA 对不同周龄的小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 活性进行检测，结果如图 6 所示，小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的活性随周龄的增加呈先增加后降低的趋势。肝脏中 MMP-1 的活性在 0-3 周范围内呈明显增加趋势 ( $P < 0.005$ )，3 周后开始呈降低趋势，3-9 周降低趋势明显 ( $P < 0.005$ )，9-12 周呈缓慢降低趋势，18 周达到最低值，18 周的活性为 0 周的 3.06%；肺脏中 MMP-1 的活性与肾脏和肝脏相比最高，在 0-1 周和 6-9 周之间基本无变化，1-3 周呈快速增加趋势 ( $P < 0.005$ )，6 周达到最高值，6-18 周呈快速降低趋势 ( $P < 0.005$ )，18 周 MMP-1 的活性为 0 周的 30.90%；肾脏中

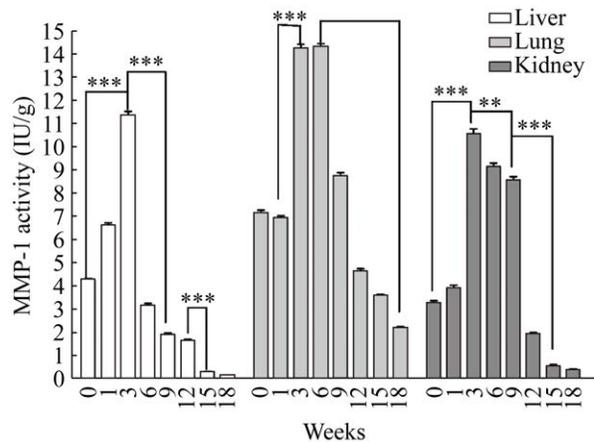


图6 小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 活性随周龄的变化  
Fig. 6 Changes of MMP-1 activity in liver, lung and kidney of mouse with weeks.

MMP-1 的活性在 0-3 周内呈快速增加趋势 ( $P < 0.005$ )，3-9 周缓慢降低 ( $P < 0.01$ )，9-15 周呈快速降低趋势 ( $P < 0.005$ )，18 周降至最低值，为 0 周的 11.84%。

综上，小鼠肝、肺、肾中 MMP-1 的活性均随周龄的增加呈先增加后降低的趋势，肝脏和肾脏中 MMP-1 活性相当，肺脏中 MMP-1 活性最高。三种脏器中 MMP-1 活性均在第 3-6 周时达到最高值。

### 3 讨论

胶原蛋白作为细胞外基质的主要成分，在动物生长发育过程中发挥重要作用。研究表明在成年之前，动物体内胶原蛋白合成活跃，与年龄呈正相关；然而随着个体年龄增长，各组织中胶原的代谢速率大于合成速率，表现为随年龄呈负相关的增加趋势<sup>[15]</sup>。而且肝硬化、肺纤维化、肾炎等相关疾病都与胶原蛋白的含量相关，但目前关于肝、肺、肾中胶原蛋白含量在生长过程中的变化尚未有报道。

本实验选择 0-18 周小鼠作为研究对象，研究了不同周龄小鼠肝、肺、肾中 Hyp 含量及比例的变化。Hyp 作为胶原蛋白的特征氨基酸，可根据

其比例及含量换算得到胶原蛋白含量。本研究结果显示,在小鼠肝、肺、肾中,胶原蛋白的含量均随周龄的增加呈先增加后降低的趋势,在 6-9 周达到最高值。由于肝、肺、肾等组织中 I 型胶原最丰富,还含有少量的 III、IV、V 型胶原,而 MMP-1 是 I、III 型胶原蛋白的降解酶,是控制体内 I、III 型胶原蛋白在体内降解的主要因素, MMP-1 的活性在多个水平上受调节,包括合成、激活、活性抑制和降解。因此,本研究利用 ELISA 测定了不同周龄的肝、肺、肾中 MMP-1 的含量和活性。结果显示, MMP-1 的含量均随年龄的增加先降低后增加,在 12 周达到最低值;而 MMP-1 的活性随周龄的增加呈现先增加后降低的趋势,在 3-6 周达到最高值。胶原蛋白和 MMP-1 变化呈相反的趋势,而与 MMP-1 的活性呈相似趋势。这可能是由于从出生到成年阶段体内胶原蛋白的合成速率在逐渐增加,胶原蛋白的大量合成可能会抑制 MMP-1 的合成,因此,体内 MMP-1 的含量从出生到成年期逐渐降低,而 MMP-1 的活性会随着小鼠的生长发育逐渐增加,发育到 3-6 周时达到最大活性。虽然 MMP-1 活性的增加会加速胶原蛋白的降解,但由于在幼年阶段小鼠体内胶原蛋白的合成速率较高,因此,在这个阶段,胶原蛋白的含量仍呈现增加趋势,这就使合成的胶原蛋白主要用于组织的正常生长发育。在 6-9 周胶原蛋白含量达到最高值,而 MMP-1 的含量均在 12 周时达到最低值,12 周之后开始逐渐增加,这可能是由于成年期之后虽然胶原蛋白的含量开始降低,但 MMP-1 的合成需要一定的时间。这就使得体内 MMP-1 的含量从 12 周之后开始逐渐增加。而 MMP-1 的活性在 3 周或 6 周之后均呈现快速降低趋势,但 8-9 周为小鼠的成年期,在成年期之后胶原蛋白的合成速率会大大降低,因此,在 9-12 周,即使 MMP-1 含量和活性均较低的情况下,小鼠肝、肺、肾中的胶原蛋白含量也开始降低。其中肺和肾中在 18 周时 MMP-1 含量均增

加至 0 周的 50% 以上,这与肺和肾中胶原蛋白含量在 9-18 周时均呈显著降低 ( $P < 0.005$ ) 相对应;而肝脏中的 MMP-1 在 18 周时仅增加至 0 周的 33%,而肝脏中胶原蛋白含量仅在 12-15 周范围内显著降低 ( $P < 0.05$ )。这表明,在成年期之后胶原蛋白的降低量与 MMP-1 的增加量相关。

本研究表明,小鼠生长过程中肝、肺、肾中胶原蛋白含量变化呈先增加后降低的趋势,均在成年期达到最高值,且胶原蛋白与 MMP-1 的含量和活性变化分别呈相反和相似的趋势,胶原含量受 MMP-1 含量和活性两个方面的控制。

## REFERENCES

- [1] Bhagwat PK, Dandge PB. Collagen and collagenolytic proteases: a review. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2018, 15: 43-55.
- [2] Nimptsch A, Schibur S, Ihling C, et al. Quantitative analysis of denatured collagen by collagenase digestion and subsequent MALDI-TOF mass spectrometry. *Cell Tissue Res*, 2011, 343(3): 605-617.
- [3] Silvipriya KS, Kumar KK, Bhat AR, et al. Collagen: animal sources and biomedical application. *J Pharm Sci*, 2015, 5(3): 123-127.
- [4] Song HD, Zhang SQ, Zhang L, et al. Effect of orally administered collagen peptides from bovine bone on skin aging in chronologically aged mice. *Nutrients*, 2017, 9(11): 1209.
- [5] Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev*, 1998, 106(1/2): 1-56.
- [6] Pataridis S, Eckhardt A, Mikulikova K, et al. Determination and quantification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. *Curr Anal Chem*, 2009, 5(4): 316-323.
- [7] Da Silva CML, Spinelli E, Rodrigues SV. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. *Food Chem*, 2015, 173: 619-623.
- [8] Aycocock RS, Seyer JM. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Conn Tis Res*, 1989, 23(1): 19-31.

- [9] Ricard-Blum S, Baffet G, Th  ret N. Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis. *Matrix Biol*, 2018, 68/69: 122-149.
- [10] Yasmin H, Kabashima T, Rahman MS, et al. Amplified and selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions. *Sci Rep*, 2014, 4: 4950.
- [11] Kisling A, Lust RM, Katwa SLC. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease. *Life Sci*, 2019, 228: 30-34.
- [12] Kitamura A, Ishida Y, Kubota H, et al. Detection of substrate binding of a collagen-specific molecular chaperone HSP47 in solution using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 279-284.
- [13] Hofman K, Hall B, Cleaver H, et al. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. *Anal Biochem*, 2011, 417(2): 289-291.
- [14] 吕雅琼, 张冬梅, 格日勒图. 乌珠穆沁羊生长过程中肌肉结缔组织中 I 型胶原蛋白变化研究. *农产品加工(学刊)*, 2013(8): 13-16.  
L   YQ, Zhang DM, Geri LT. Changes in Type I collagen of intramuscular connective tissue in the growth of Ujumqin sheep. *Acad Period Farm Pro Process*, 2013(8): 13-16 (in Chinese).
- [15] Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, et al. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J*, 1991, 276(2): 307-313.
- [16] Panwar P, Butler GS, Jamroz A, et al. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. *Matrix Biol*, 2018, 65: 30-44.
- [17] Cicek M, Tumer MK, Unsal V. A study of chewing muscles: Age-related changes in type I collagen and matrix metalloproteinase-2 expression. *Arch Oral Bio*, 2020, 109: 104583.
- [18] Mekkat A, Poppleton E, An B, et al. Effects of flexibility of the  $\alpha 2$  chain of type I collagen on collagenase cleavage. *J Struct Biol*, 2018, 203(3): 247-254.
- [19] Rotter N, Tobias G, Lebl M, et al. Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 403(1): 132-140.
- [20] Bailey AJ, Sims TJ, Ebbesen EN, et al. Age-related changes in the biochemical properties of human cancellous bone collagen: relationship to bone strength. *Calcif Tissue Int*, 1999, 65(3): 203-210.
- [21] Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*, 1979, 76(4): 710-719.
- [22] 聂莉, 程德云, 朱刚艳, 等. 龙血竭对肺纤维化大鼠肺组织转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 及 I 型胶原蛋白表达的影响. *河北中医*, 2010, 32(7): 1071-1074.  
Nie L, Cheng DY, Zhu GY, et al. Effect of the Dragon's blood on TGF- $\beta 1$  mRNA and collagen I expression in lungs of rats with pulmonary fibrosis. *Hebei J Tradit Chin Med*, 2010, 32(7): 1071-1074 (in Chinese).
- [23] Omireeni EA, Omireeni NJ, Alhomida AS. Biochemical and histological studies on the effect of sodium fluoride on rat kidney collagen. *J Saudi Chem Soc*, 2010, 14(4): 413-416.
- [24] Lin YK, Lin TY, Su HP. Extraction and characterisation of telopeptide-poor collagen from porcine lung. *Food Chem*, 2011, 124(4): 1583-1588.
- [25] 崔琳, 张贵锋, 刘涛, 等. 液相色谱/质谱联用法分析不同年龄鼠皮肤中 I 型、III 型胶原蛋白相对含量. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(4): 71-76.  
Cui L, Zhang GF, Liu T, et al. High performance chromatography/mass spectrometric analysis of the collagen I/III ratio in rat skin at different stages of growth. *China Biotechnol*, 2007, 27(4): 71-76 (in Chinese).
- [26]   gren VS, Schnabel R, Christensen LH, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 *ex vivo*. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(1): 12-21.

(本文责编 陈宏宇)