

博莱霉素致肺间质成纤维细胞 MMP-2/TIMP-1 表达失衡

马万里* 叶红¹ 辛建保 陶晓南 白明

(华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸内科, 武汉 430022;

¹华中科技大学同济医学院病理生理学系, 武汉 430030)

摘要 观察博莱霉素对肺间质成纤维细胞中基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)及组织金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1)表达的影响, 探讨博莱霉素引起肺纤维化的机制。体外培养肺间质成纤维细胞, 并向培养基中加入博莱霉素, 在作用不同时间后收集样本, 采用酶谱图测定细胞培养上清液中 MMP-2 酶活性、ELISA 测定 TIMP-1 量, 免疫组织化学法检测细胞中 MMP-2、TIMP-1 的原位表达, RT-PCR 法检测 MMP-2 和 TIMP-1 的 mRNA 水平。结果发现, 博莱霉素在 2 h、12 h 促进 MMP-2 的分泌, 24 h 后无促分泌作用; 而 2~48 h, MMP-2 的原位表达及 mRNA 均不受博莱霉素的影响; 博莱霉素从 12 h 开始促进 TIMP-1 及 mRNA 的表达, 并持续至 48 h。结果表明博莱霉素可引起肺间质成纤维细胞 MMP-2/TIMP-1 表达失衡, 并可能参与肺纤维化的发生。

关键词 博莱霉素; 肺间质成纤维细胞; MMP-2; TIMP-1

博莱霉素(bleomycin, BLM)属于抗生素类抗癌药物, 但可引起肺纤维化, 影响了它的使用, BLM 导致肺纤维化的确切机制尚不清楚。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)的失衡在肺纤维化中起重要作用, 肺间质成纤维细胞(pulmonary interstitial fibroblast, PIF)是参与肺纤维化的重要细胞, 但是, 尚未见关于 BLM 影响 PIF 中 MMPs/TIMPs 表达的报道。MMP-2、TIMP-1 是 MMPs/TIMPs 家族中的重要成员, 本文以 BLM 直接刺激 PIF, 观察对 MMP-2/TIMP-1 表达的影响, 探讨 BLM 引起肺纤维化的机制。

1 材料与方

1.1 材料

博莱霉素 A5 (BLM-A5, 冻干粉, 天津太河制药有限公司, 批号: 030902), MEDIUM199 培养基(Hyclone, USA), 新生牛血清(Gibco BRL, USA), BCA 法蛋白质检测试剂盒(Pierce, USA), 牛血清白蛋白(BSA) (Sigma), TIMP-1 ELISA 试剂盒, 羊抗 MMP-2 和 TIMP-1 亲和纯化多克隆抗体(Santa Cruz, USA), Trizol 一步法总 RNA 提取试剂盒(Gibco BRL, USA), M-MLV 逆转录酶(Promega, USA), Taq 酶

(MBI, 立陶宛), Oligo(dT)₁₅(Promega, USA), MMP-2、TIMP-1 和 β 肌动蛋白 PCR 引物(上海生工公司合成)。二氧化碳培养箱(Nuaire, USA), PCR 仪(MJresearch, USA), 超低温冰箱(-70 °C, Nuaire, USA), 电泳槽(Bio-Rad, USA), 电泳仪(北京六一仪器厂), Sunrise Remote/Touch Screen 酶标仪(Tecan, Austria)。

1.2 BLM-A5 条件培养基的制备

以生理盐水稀释 BLM-A5 冻干粉, 制成 10 μ g/ml BLM-A5 母液。临用时加入无血清 M199 培养基中, 其终浓度为 0.1 μ g/ml。

1.3 大鼠 PIF 培养及分组

1.3.1 细胞培养 取 SD 大鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)一只, 体重 200 g 左右, 断颈处死, 75% 酒精浸泡 2~5 min, 剪开胸部皮肤, 并暴露肺和气管, 钳夹气管, 将心肺取出, 除去心脏及食管等, D-Hanks 冲洗, 尽量避开支气管、血管, 剪下部分周边肺组织, D-Hanks 冲洗后切成 0.5 mm \times 0.5 mm 小块, 以 0.25% 胰蛋白酶

收稿日期: 2005-03-29 接受日期: 2005-06-10

卫生部呼吸系疾病重点实验室开放基金资助项目(No.WHK03016)

* 通讯作者。Tel/Fax: 027-85726801, E-mail: whmawl@yahoo.com.cn

溶液消化 10 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 去上清液后加入 M199 培养基, 移入培养瓶中培养, 并用 0.25% 胰蛋白酶消化传代纯化, 获得纯度大于 95% 的 PIF, 倒置显微镜下, 细胞呈长梭型同心圆状排列, 正常传代, 第 2~4 代的细胞用于实验。

1.3.2 细胞处理及分组 0.25% 胰蛋白酶消化 PIF, 调整细胞浓度约 5×10^5 个/孔, 移入事先置入血盖片的 6 孔培养板中, 先用 M199 完全培养基培养 24 h 后, 去掉培养基, D-Hanks 液洗 2 次, 再加入含 BLM-A5 的无血清 M199 条件培养基进行培养。设立对照组(加入不含 BLM-A5 的无血清 M199 培养基)。分别作用 2、12、24、48 h 后, 收集培养上清液, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用(用于 MMPs 酶活性检测、TIMP-1 检测); 以 4% 多聚甲醛固定生长于血盖片上的细胞, $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用(用于 MMP-2、TIMP-1 免疫组织化学实验)。

相同于 6 孔培养板中的细胞处理方法, 部分细胞持续在培养瓶中培养, 也以含 BLM-A5 的条件培养基处理 12、24、48 h 后, 分别收集实验组及对照组细胞, 用于提取 RNA。

1.4 MMPs 酶谱图检测细胞培养上清液中 MMP-2 活性

PIF 培养上清液用 BCA 法蛋白质检测试剂盒先进行蛋白质定量。参考 Swiderski 等^[1]的方法, 采用含有 2% 明胶的 10% SDS-PAGE 凝胶进行蛋白质电泳(又称酶谱图法)。上样量为 15 μg , 电泳后经洗脱和温育, 用考马斯亮蓝染色。用 Image-Pro-Plus 图像分析系统分析条带的吸光度值反映培养上清液中 MMP-2 的酶活性。

1.5 ELISA 检测细胞培养上清中 TIMP-1 的表达

按照 ELISA 试剂盒的操作要求进行, 依据标准曲线求得刺激不同时间的培养上清液中 TIMP-1 的含量。

1.6 免疫组织化学法检测 PIF 中 MMP-2、TIMP-1 的原位表达

采用 SABC 法。将培养的 PIF 种于玻片上, 乙醇和丙酮 1:1 固定 15 min; 0.3% Triton X-100 室温温育 20 min; 3% H_2O_2 室温温育 15 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 10% 山羊血清封闭, 室温 30 min; 甩去多余液体, 加入 1:100 稀释的 MMP-2、TIMP-1 多克隆抗体, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 1~2 h 或 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 45 min; 滴加 SAB 试剂, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 20 min; DAB 显色, 苏木素

轻度复染, 脱水、透明、封片。结果经显微图像分析, 以阳性颗粒的强度反映蛋白质表达水平。

1.7 RT-PCR 法检测 MMP-2 和 TIMP-1 的 mRNA 表达

1.7.1 细胞总 RNA 的提取 采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA。按试剂盒说明书操作。

1.7.2 逆转录 参照 M-MLV 逆转录酶说明书操作。

1.7.3 PCR 针对大鼠 MMP-2、TIMP-1 和 β 肌动蛋白 cDNA 序列设计的引物序列分别为: MMP-2 上游 5'-CAC CAT CGC CCA TCA TCA AGT-3', 下游 5'-TGG ATT CGA GAA AAG CGC AGC GG-3', 产物长度为 400 bp; TIMP-1 上游 5'-CTC ATC GCG GGC CGT TTA AG-3', 下游 5'-GAA GGC TTC GGG TCA TCG AG-3', 产物长度为 313 bp; β 肌动蛋白上游 5'-GGC TAC AGC TTC ACC ACC AC-3', 下游 5'-TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC -3', 产物长度为 498 bp。扩增条件均避开平台期, MMP-2 的扩增条件为 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min、 $53\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min、 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 末次延伸 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, 循环次数为 40 次; TIMP-1 的扩增条件为 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min、 $57\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min、 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 末次延伸 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, 循环次数为 35 次; β 肌动蛋白的扩增条件为 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min、 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min、 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 末次延伸 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, 循环次数为 25 次。

各取 5 μl PCR 产物在含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 在紫外灯下照相, 以条带的大小和条带深浅判断 mRNA 的表达水平, 运用凝胶成像分析系统进行半定量分析, 以 MMP-2、TIMP-1 与 β 肌动蛋白的条带积分吸光度比值表示 MMP-2 mRNA、TIMP-1 mRNA 的表达水平。

1.8 统计学处理

每组每个时点 8 份样品($n=8$); TIMP-1 含量直接计算平均值; MMPs 酶谱图、MMP-2、TIMP-1 的原位表达及 RT-PCR 结果经图像分析处理后, 求得平均吸光度值; 统计分析采用两样本间均数比较的 t 检验, $P<0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 PIF 培养上清液中 MMP-2 的活性

对图 1 进行图像分析, 测其吸光度值, 结果见表 1。

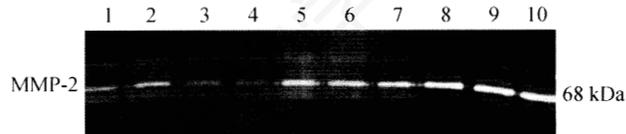


图1 BLM-A5对PIF分泌MMP-2的影响(MMPs酶谱图)

1, 2: 2 h 实验组; 3, 4: 2 h 对照组; 5, 6: 12 h 实验组; 7: 12 h 对照组; 8: 24 h 实验组; 9, 10: 24 h 对照组。

表1 BLM-A5刺激下PIF的MMP-2活性变化结果分析(吸光度值: $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

时间(h)	2	12	24	48
对照组	0.27±0.04	0.53±0.05	0.61±0.12	0.62±0.07
实验组	0.34±0.02*	0.71±0.09*	0.57±0.09 [#]	0.58±0.13 [#]

与对照组比, * $P<0.05$, [#] $P>0.05$ 。

表2 BLM-A5对PIF分泌TIMP-1蛋白的影响结果(单位ng/ml; $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

时间(h)	2	12	24	48
对照组	10.4±2.0	28.9±2.7	31.6±2.4	37.2±3.5
实验组	12.8±1.6 [#]	39.3±4.3*	46.3±4.8*	57.9±6.3**

与对照组比, [#] $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

在BLM-A5刺激下, 2 h、12 h时, PIF分泌的MMP-2活性明显增强, 24 h、48 h与对照组间无明显差异。可见, BLM-A5对PIF分泌MMP-2的促进作用有时相性, 局限于早期, 24 h后已无促进作用。

2.2 PIF培养上清液中TIMP-1的表达

不同时间, BLM-A5刺激下PIF培养上清液中TIMP-1的表达量较对照组逐渐增高, 结果见表2。

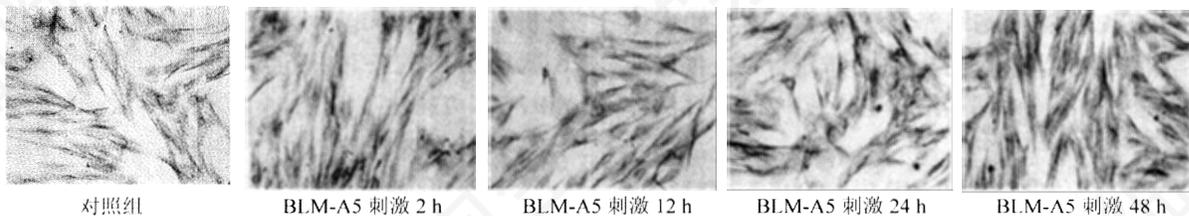


图2 BLM-A5对PIF中MMP-2原位表达的影响(SABC法, 400×)

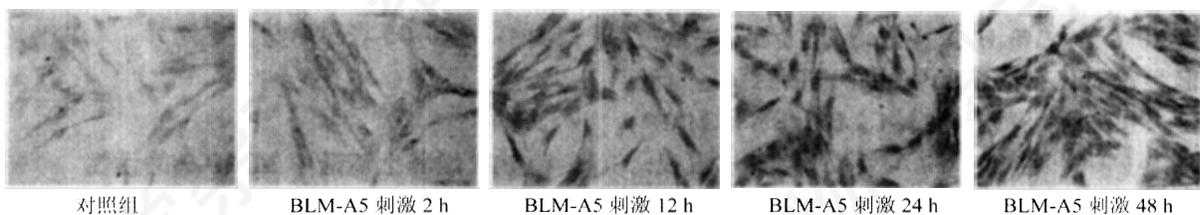


图3 BLM-A5对PIF中TIMP-1原位表达的影响(SABC法, 400×)

表3 BLM-A5刺激下PIF中MMP-2、TIMP-1原位表达结果分析(阳性表达的吸光度值: $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

时间(h)	2	12	24	48
MMP-2				
对照组	0.54±0.02	0.52±0.03	0.53±0.07	0.57±0.05
实验组	0.55±0.07 [#]	0.54±0.08 [#]	0.51±0.04 [#]	0.55±0.10 [#]
TIMP-1				
对照组	0.34±0.02	0.33±0.05	0.35±0.06	0.33±0.03
实验组	0.36±0.01 [#]	0.45±0.07*	0.60±0.05**	0.67±0.12**

与对照组比, [#] $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.3 PIF中MMP-2、TIMP-1的原位表达

不同作用时间PIF中MMP-2原位表达的结果见图2。不同作用时间PIF中TIMP-1原位表达的结果见图3。分别对两组照片进行图像分析, 测其吸光度值, 结果见表3。

在BLM-A5刺激下, PIF中MMP-2的原位表达与对照组无明显差异。而TIMP-1的表达逐渐增强。可见, PIF中MMP-2的原位表达不同于培养上清液中的变化, 说明细胞外MMP-2活性增强不在于细胞内合成增多, 可能主要是促进其向细胞外分泌。

2.4 PIF中MMP-2和TIMP-1的mRNA表达

RT-PCR照片(图4)经图像分析, 结果见表4。

结果说明, 在BLM-A5刺激下, PIF中MMP-2 mRNA的表达不受影响, 而TIMP-1 mRNA的表达随时间变化而逐渐增强。

3 讨论

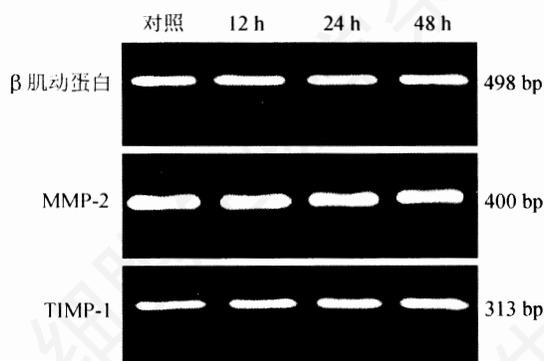


图4 BLM-A5对PIF中MMP-2、TIMP-1 mRNA表达的影响

表4 BLM-A5刺激下PIF中MMP-2、TIMP-1 mRNA表达的结果分析(吸光度值; $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分组	对照	12 h	24 h	48 h
MMP-2	1.54±0.13	1.56±0.20	1.55±0.17	1.53±0.11
TIMP-1	0.74±0.05 [#]	0.86±0.10 [*]	0.93±0.07 [*]	1.08±0.09 ^{**}

与对照组比, [#] $P>0.05$, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$

BLM属抗生素类抗癌药物,用于治疗睾丸癌、头颈部肿瘤、肺癌及淋巴瘤等多种实体瘤。它直接作用于DNA,使GpC或GpT处单链断裂,而发挥抗癌作用,且BLM的糖链对癌细胞有一定的识别作用,从而它能较专一地进入癌细胞破坏DNA^[2]。但是BLM有一定的副作用,尤其可导致肺纤维化。BLM引起肺纤维化确切机制尚不清楚,一般认为,肺脏上皮细胞中特异性灭活BLM的酶含量较其他脏器的上皮细胞低,因此肺泡上皮容易受到损伤,并最终引起PIF增殖而发生肺纤维化^[3]。PIF是参与肺纤维化的主要细胞^[4,5],它不仅是纤维化的主要效应细胞,而且能分泌许多炎症因子、纤维化因子,参与肺纤维化发生、发展。除了上皮细胞、炎性细胞释放的各种因子作用于PIF外,关于PIF本身是否可以直接感受BLM的毒性并在纤维化中起作用的报道少见。成纤维细胞可分泌MMPs、TIMPs^[6],而MMPs、TIMPs与肺纤维化密切相关^[7,8],但是未见关于BLM直接影响PIF表达MMPs、TIMPs的

报道。

本文的研究证实,BLM直接作用于体外培养的PIF,2~12 h,促进MMP-2的分泌,24 h后无促进作用。从12 h后,BLM一直发挥促进TIMP-1表达的作用。可见,BLM在12 h内,提高PIF分泌于细胞外MMP-2/TIMP-1的比例,MMP-2/TIMP-1比例提高后,其降解细胞外基质的能力增强,引起肺组织损伤,触发肺纤维化。24 h后BLM使MMP-2/TIMP-1的比例降低,其降解细胞外基质的能力减弱,利于细胞外基质的沉积与肺纤维化的形成。由此说明在肺纤维化中BLM对PIF的直接作用可能也参与了肺纤维化的发生与发展。在BLM-A5刺激下,PIF中MMP-2 mRNA的表达不受影响,而TIMP-1 mRNA的表达随时间变化而逐渐增强,说明BLM-A5对MMP-2的影响不在转录水平,而在于促进其分泌与活化,BLM对TIMP-1的影响表现在促进TIMP-1基因转录,并促进了其蛋白质水平和细胞外分泌水平的提高。正常肺组织中,肺间质细胞占全肺细胞的36.1%,而PIF又占肺间质细胞的52%~62%^[9],由此计算,PIF占全肺细胞的20%左右,其比例高于肺泡I型上皮细胞(8.3%)及肺泡II型上皮细胞(15.9%)^[9];而且BLM有促进PIF增殖的作用,所以在应用BLM进行化疗的过程中,PIF占全肺细胞的比例还将提高,BLM直接作用于PIF而导致MMP-2/TIMP-1失衡及致纤维化的意义就更大。

参考文献 (References)

- [1] Swiderski RE et al. *Am J Pathol*, 1998, **152**: 821
- [2] 邹国林等. *生命的化学*, 1994, **14**: 42
- [3] 朱元珏等主编. *呼吸病学*, 北京: 人民卫生出版社, 2003, 1089
- [4] 曾庆富等. *中华病理学杂志*, 2001, **30**: 371
- [5] Gauldie J et al. *Respir Res*, 2002, **3**: 1
- [6] Papakonstantinou E et al. *Cytokine*, 2003, **24**: 25
- [7] Bakowska J et al. *J Pathol*, 1998, **185**: 319
- [8] 马万里等. *华中科技大学学报(医学版)*, 2002, **31**: 527
- [9] 孙秀泓等主编. *肺的非呼吸功能基础与临床*, 北京: 人民卫生出版社, 2003, 1

Bleomycin Induced Imbalance of MMP-2/TIMP-1 in Pulmonary Interstitial Fibroblasts

Wan-Li Ma*, Hong Ye¹, Jian-Bao Xin, Xiao-Nan Tao, Ming Bai

(*Department of Respiratory Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; ¹Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*)

Abstract To investigate the effect of bleomycin on the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in pulmonary interstitial fibroblasts. Pulmonary interstitial fibroblasts were primary cultured, then treated with bleomycin-A5. MMP-2 activity in medium was determined by gelatin zymography. Protein content of TIMP-1 in medium was detected by ELISA. Intracellular protein content of MMP-2 and TIMP-1 were detected by immunocytochemistry. Expression of MMP-2 and TIMP-1 mRNA were determined by RT-PCR. The results showed BLM-A5 induced secreting of MMP-2 from pulmonary interstitial fibroblasts at 2 h and 12 h, and there was no effect after 24 h. Intracellular proteins and mRNA of MMP-2 were not influenced by BLM-A5 from 2 h to 48 h. BLM-A5 up-regulated the expression of protein and mRNA of TIMP-1 after 12 h. The results demonstrated that BLM-A5 induced secreting of MMP-2 in early stage in pulmonary interstitial fibroblasts, and then up-regulate the expression of TIMP-1. These maybe contributed to the mechanism of MMP-2/TIMP-1 imbalance in pulmonary fibrosis.

Key words bleomycin; pulmonary interstitial fibroblasts; MMP-2; TIMP-1

Received: March 29, 2005 Accepted: June 10, 2005

This work was supported by the Opening Fund of Pulmonary Disease Laboratory of Ministry of Health of China (No.WHK03016)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-27-85726801, E-mail: whmaw1@yahoo.com.cn