

①

降钙素基因相关肽对人支气管上皮细胞 分泌 MMP-9 的影响

管茶香¹,刘永平^{1,2},崔艳茹¹,于芳¹,孙国瑛¹,刘惠君¹

(1. 中南大学湘雅医学院生理学系,长沙 410078;2. 湖南中医药大学生理学教研室,长沙 410007)

[摘要] 目的:探讨降钙素基因相关肽(calcitonin-gene-related peptide, CGRP)对人支气管上皮细胞分泌基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)/明胶酶 B 的影响及其机制。方法:采用逆转录聚合酶链式反应及明胶酶谱法,观察给予不同浓度的 CGRP($10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L)刺激及 CGRP 10^{-6} mol/L 刺激后不同时间点(6, 12, 18, 24, 36 和 48 h) MMP-9 活性和基因表达量的变化。结果:体外培养的人支气管上皮细胞能分泌 MMP-9;CGRP 干预呈剂量及时间依赖方式上调人支气管上皮细胞 MMP-9 的活性和 MMP-9 mRNA 的表达($P < 0.01$);CGRP 上调人支气管上皮细胞 MMP-9 活性和表达的作用可为蛋白激酶 C 阻断剂 H-7 及钙调蛋白阻断剂 W-7 部分逆转($P < 0.05$)。结论:CGRP 可明显上调人支气管上皮细胞 MMP-9 的活性和表达,其胞内信号转导机制与蛋白激酶和钙调蛋白信号途径有关。

[关键词] 降钙素基因相关肽; 人支气管上皮细胞; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R329.26 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)05-0771-05

Effect of calcitonin-gene-related peptide on MMP-9 production in human bronchial epithelial cells

GUAN Cha-xiang¹, LIU Yong-ping^{1,2}, CUI Yan-ru¹,

YU Fang¹, SUN Guo-ying¹, LIU Hui-jun¹

(1. Department of Physiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078;

2. Department of Physiology, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: **Objective** To examine the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human bronchial epithelial cells treated with calcitonin-gene-related peptide (CGRP). **Methods** RT-PCR and gelatin zymography were performed to examine the dynamic expression and activity of MMP-9 in human bronchial epithelial cells at different doses (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , and 10^{-6} mol/L) and different time points (6, 12, 18, 24, 36, and 48 h) after the stimulation of CGRP. **Results** The unstimulated human bronchial epithelial cells only secreted a small amount of MMP-9. After the CGRP stimulation, the expression of MMP-9 presented in a concentration-dependent (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , and 10^{-6} mol/L) and time-dependent (6, 12, 18, 24, 36, and 48 h) manners ($P < 0.01$) in human bronchial epithelial cells. The effect of CGRP could be diminished by H-7 and W-7, an antagonist of protein kinase C (PKC) and calmodulin (CaM) ($P < 0.05$). **Conclusion** CGRP can stimulate the secretion and expression of MMP-9 in human bronchi-

①收稿日期(Date of reception) 2007-02-04

作者简介(Biography) 管茶香(1963-),女,湖南平江人,博士,教授,主要从事呼吸生理与临床的研究。

通讯作者(Corresponding author) 管茶香,E-mail: guanchaxiang@xysm.net

基金项目(Foundation item) 国家自然科学基金(39800053) This work was supported by National Nature Science Foundation of China (39800053)

al epithelial cells, and the signal transduction is partly via the PKC and CaM pathway.

Key words: calcitonin-gene-related peptide; human bronchial epithelial cells; matrix metalloproteinases-9

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007,32(5):0771-05]

支气管上皮细胞 (bronchial epithelial cells, BECs) 是气道炎症和物理刺激因子的靶细胞。气道疾病常伴有不同程度气道上皮结构完整性的破坏和功能受损,而疾病的缓解有赖于上皮完整性的恢复与维持。气道上皮的修复包括细胞向损伤部位的迁移、增殖和铺展,以及上皮基膜的修复。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 是一类活性依赖于锌离子的蛋白酶大家族,经激活后参与胶原等细胞外基质的降解,影响组织损伤后的修复及重塑,与支气管哮喘等多种肺部疾病密切相关^[1-3]。正常状态下支气管上皮细胞仅少量表达 MMP-9/明胶酶 B,但经 TNF- α 等促炎因子作用后表达显著增加,在气道损伤修复过程中起重要作用^[4-5]。降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是肺内重要的感觉神经肽之一,具有收缩支气管平滑肌、增加血管通透性及促进黏液分泌等多种生物学活性^[6];与速激肽一起参与神经源性炎症的形成,与哮喘等肺部疾病的发生、发展有关^[7-8]。而存在于气道局部微环境中的肺内神经肽 CGRP 对 MMP 有何影响尚未见报道。本研究旨在观察 CGRP 对人支气管上皮细胞 (human bronchial epithelial cells, HBECs) MMP-9 分泌的影响,并探讨其信号转导途径。

1 材料与方法

1.1 材料 永生化人支气管上皮细胞株 16HBE14o-由美国加州大学旧金山分校 Gruenert 教授惠赠;RPMI1640 培养基, W-7 (钙调素抑制剂), H-7 (PKC 抑制剂), CGRP, LPS (脂多糖), 考马斯亮蓝 R-250, 溴酚蓝, 丙烯酰胺, N-N'-甲叉双丙烯酰胺, 明胶, 甘氨酸, 过硫酸胺, TEMED 和 Triton X-100 均为 Sigma 产品, tris-base, SDS 为 Amresco 公司产品; ZnCl₂, DEPC 为 BBI 公司产品; 蛋白 Marker, Taq DNA 聚合酶, dNTP 为 MBI 公司产品; 逆转录试剂盒为 Promega 产品; Trizol 为 Invitrogen Life technologies 产品; 引物、DNA marker 为 Takara (大连宝生物公司) 产品; 胎牛血清、青/链霉素均为国产。

1.2 细胞培养 HBECs 在含有 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养, 然后按 1×10^8 个/L 接种至 6 孔培养板中。当细胞 80% 融合时, 换无血清培养基, 于 24 h 后进行以下处理: (1) 量效研究。采用不同浓度的 CGRP ($10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L) 处理 HBECs 24 h; (2) 时效研究。在培养的 HBECs 中加入 CGRP 10^{-6} mol/L 分别孵育 6, 12, 18, 24, 36 和 48 h; (3) 信号转导。在培养的 HBECs 中加入 H-7 和 W-7 (10^{-5} mol/L) 30 min 后, 再加入 CGRP (10^{-6} mol/L)。实验结束时, 提取 HBECs 培养上清及细胞总 RNA。

1.3 实验分组 (1) 对照组; (2) CGRP ($10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L) 组; (3) CGRP (10^{-6} mol/L) + H-7 (10^{-5} mol/L) 组; (4) CGRP (10^{-6} mol/L) + W-7 (10^{-5} mol/L) 组。

1.4 HBECs 培养上清液总蛋白含量测定 用考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 测定培养上清液总蛋白含量。

1.5 明胶酶谱法检测 HBECs 的 MMP-9 活性 参照文献 [9], 配制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (分离胶, 含 1% 明胶) 和 5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (浓缩胶)。取总蛋白含量为 10 μ g 的细胞培养上清液与 4 \times 上样缓冲液 (5% SDS, 2% 蔗糖, 0.2% 溴酚蓝, 50 mmol/L Tris HCl, pH 6.8) 混匀, 置 55 $^{\circ}$ C 水浴 3 ~ 5 min, 上样; 于 4 $^{\circ}$ C 条件下在电泳缓冲液 (25 mmol/L Tris HCl, 250 mmol/L 甘氨酸, pH 8.3, 0.1% SDS) 中电泳 (100 V, 约 2 ~ 3 h) 后, 用 2.5% Triton X-100 洗涤 2 次 (每次 30 min), 置于底物缓冲液 (50 mmol/L Tris HCl, 10 mmol/L CaCl₂, 200 mmol/L NaCl, 1 μ mol/L ZnCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.5) 中 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (16 ~ 20 h), 0.125% 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色液 (甲醇: 水: 冰醋酸 45: 45: 10) 脱色至蓝色背景下白色条带清晰为止。用 NIH ImageJ V1.31 软件进行分析, 测定面积灰度, 以光密度代表其活性及表达量。

1.6 RT-PCR 检测 HBECs 的 MMP-9 mRNA 的表达 按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA, 取总 RNA 1 μ g 进行逆转录。根据 GeneBank 序列, 设计

引物序列为: MMP-9 上游引物为 5'-GCGGAGATT-GGGAACCAGCTGTA-3', 下游引物 5'-GACGCGCCT-GTGTACACCCACA-3', 扩增片段 313 bp。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min 预变性, 94 °C 50 s, 62 °C 30 s, 72 °C 40 s 共 35 个循环, 72 °C 5 min 终止反应; β -actin 作为内参照, 上游引物 5'-ACCCCACT-GAAAAAGATGA-3', 下游引物 5'-ATCTTCAAAC-CTCCATGATG-3', 扩增片段 120 bp。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min 预变性, 94 °C 50 s, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s 共 30 个循环, 72 °C 5 min 终止反应。取 10 μ L 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 g/L) 电泳, 用 NIH ImageJ V1.31 软件进行分析, 测定面积灰度, 以光密度代表其表达量, 并用对应 β -actin 表达量计算目的基因的相对表达量。

1.7 统计学处理 实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CGRP 对 HBECs 分泌的 MMP-9 活性的影响

2.1.1 不同浓度 CGRP 对 HBECs 分泌的 MMP-9 活性的影响 在培养的 HBECs 中分别加入 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L 的 CGRP 作用 24 h, 提取上清液。明胶酶谱法分析 HBECs 上清液显示, CGRP 处理组 HBECs 上清液中 MMP-9 的活性与对照组比较均有不同程度增加, 在 10^{-6} mol/L 时达到峰值, 约为对照组的 2 倍 (图 1), 表明 CGRP 能呈剂量依赖性增加 HBECs MMP-9 的活性。以此结果为根据, 选择 CGRP 10^{-6} mol/L 为进一步的实验剂量。

2.1.2 不同时间点 CGRP 对 HBECs 分泌的 MMP-9 活性的影响 在培养的 HBECs 中加入 10^{-6} mol/L 的 CGRP, 分别孵育 6, 12, 18, 24, 36 和 48 h, 提取上清液。明胶酶谱法分析上清液显示, 从 12 h 起, HBECs MMP-9 的活性在同一时间点 CGRP

10^{-6} mol/L 处理组均较对照组明显增加 (图 2, 表 1), 表明 CGRP 呈时间依赖性增加 HBECs 分泌的 MMP-9 活性。

2.2 CGRP 对 HBECs MMP-9 mRNA 表达的影响

RT-PCR 扩增结果表明, 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L 的 CGRP 处理组与对照组比较 MMP-9 mRNA 表达量差异有显著性 (CGRP 浓度为 10^{-10} mol/L 时与对照组相比, $P < 0.05$; 其余浓度与对照组相比, $P < 0.01$, 图 3), 提示 CGRP 亦能促进 HBECs MMP-9 mRNA 的表达。

2.3 H-7 和 W-7 对 CGRP 促进 HBECs 分泌与表达 MMP-9 的影响

2.3.1 H-7 和 W-7 对 CGRP 促进 HBECs MMP-9 分泌的影响 明胶酶谱法分析上清液显示, 与 CGRP (10^{-6} mol/L) 单独处理组相比较, 经 H-7 (10^{-5} mol/L) 和 W-7 (10^{-5} mol/L) 预处理后, HBECs 培养上清液中 MMP-9 的相对活性分别为 (88.3 ± 4.7)% 和 (79.5 ± 7.1)%, 差异有显著性 ($P < 0.05$, 图 4), 提示 CGRP 促进 HBECs 分泌 MMP-9 的作用可被 H-7 及 W-7 部分阻断。

2.3.2 H-7 和 W-7 对 CGRP 促进 HBECs 表达 MMP-9 mRNA 的影响 RT-PCR 扩增结果表明, 经 H-7 和 W-7 预处理后, HBECs 的 MMP-9 mRNA 相对表达量分别为 0.94 ± 0.03 和 1.01 ± 0.02 , 与 CGRP (10^{-7} mol/L) 单独处理组相比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$, 图 5), 表明 H-7 及 W-7 能部分阻断 CGRP 刺激 HBECs MMP-9 mRNA 表达的作用。

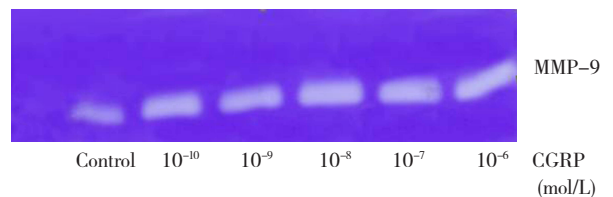


图 1 CGRP 对人支气管上皮细胞分泌 MMP-9 的影响

Fig. 1 CGRP ($10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L) on MMP-9 production and activity in human bronchial epithelial cells

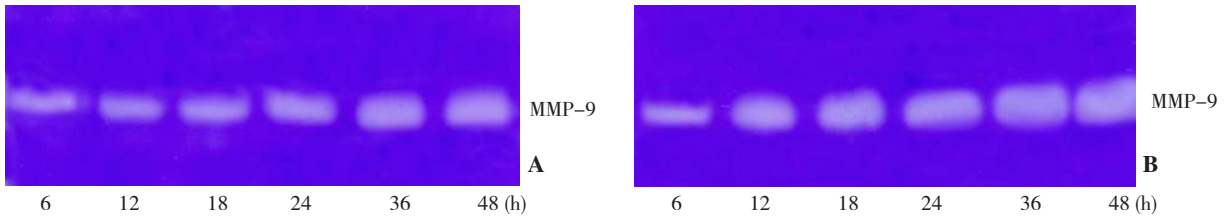


图2 不同时间点 CGRP 对人支气管上皮细胞分泌 MMP-9 的影响 A:对照组;B:CGRP(10^{-6} mol/L)处理组

Fig.2 Effect of CGRP on MMP-9 production and activity in human bronchial epithelial cells at 6,12,18,24,36,48 h A: Control group; B: CGRP (10^{-6} mol/L) treated group

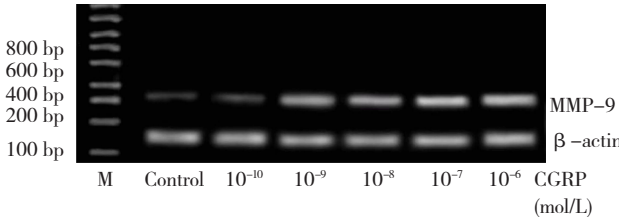


图3 CGRP 对人支气管上皮细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响
Fig.3 Influences of CGRP on MMP-9 mRNA level in human bronchial epithelial cells

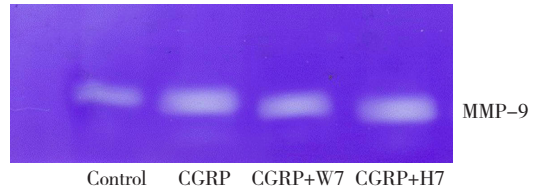


图4 H-7 和 W-7 对 CGRP 促进人支气管上皮细胞 MMP-9 分泌的影响

Fig.4 Inhibition of MMP-9 production and activity by W-7 and H-7 in human bronchial epithelial cells

表1 不同时间点 CGRP 对人支气管上皮细胞 MMP-9 活性的影响(平均吸光度, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of CGRP on MMP-9 production and activity in human bronchial epithelial cells at 6,12,18,24,36,and 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	MMP-9 活性				
	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h
对照组	26.8 ± 0.83	0.3 ± 1.1	33.1 ± 1.2	37.1 ± 0.8	35.2 ± 0.5
CGRP 组	29.8 ± 0.6	37.7 ± 0.8**	39.0 ± 1.0**	43.2 ± 2.5**	46.1 ± 2.7**

与 6 h 组相比, ** $P < 0.01$

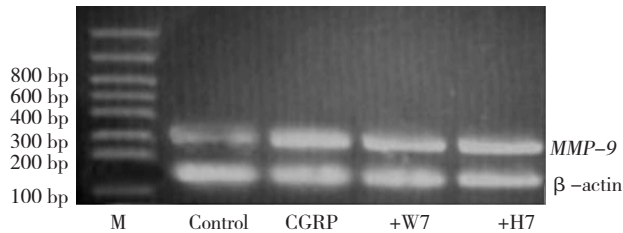


图5 H-7 和 W-7 对 CGRP 促进人支气管上皮细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响

Fig.5 Effects of H-7 and W-7 on MMP-9 mRNA expression in human bronchial epithelial cells

3 讨论

支气管上皮细胞本身具有活跃的 CGRP 基础分泌和 CGRP 受体的表达,是气道局部 CGRP 的重要来源之一,也是 CGRP 作用的重要靶细胞。CGRP 能促进气道上皮细胞的迁移,也能刺激 BEC

合成和释放多种炎症因子,引起气道上皮细胞的脱落而导致哮喘等气道高反应性疾病^[7-8,10]。MMPs 是一类能水解细胞外基质和基底膜成分的蛋白酶大家族,目前在人类至少已经分离识别出 23 个成员,其底物主要为细胞外基质。大多数 MMPs 以酶原形式分泌,随后在细胞外间隙激活发挥作用。因此,MMP 的调节至少存在 3 个水平:转录水平调控、酶原的激活和 MMPs 活性的抑制。MMPs 的活性能被其特异性基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, TIMPs)所抑制。而 MMPs/TIMPs 比值失衡与多种肺疾病的发生、发展相关,是哮喘气道重塑及慢性阻塞性肺病肺结构破坏的主要特征之一。近年来的研究显示,多种细胞因子可刺激支气管上皮细胞分泌 MMP-9 并参与气道重塑^[11-12]。Hozumi 等^[13]发现,TNF- α 能刺激人支气管上皮细胞分泌、表达 MMP-9,其胞内信号转导途径与 NF- κ B 激活有关,

IL-1 β 也具有相同的作用^[14]。因此, CGRP 的促炎作用可介导支气管上皮细胞 MMP-9 的分泌增加, 与支气管哮喘等炎症疾病中的气道重塑相关^[15]。本实验结果显示, CGRP 可呈剂量依赖性和时间依赖性促进 HBECs 分泌及表达 MMP-9, 提示 CGRP 对 HBECs 分泌和表达 MMP-9 具有调控作用。

蛋白激酶 C (protein kinase, PKC) 和钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 是细胞内信号转导的重要环节。文献报道, PKC 途径与 MMP-9 的表达相关^[16]。本室进一步研究观察到, CGRP 促进 HBECs 分泌和表达 MMP-9 的作用可被 PKC 阻断剂 H-7 及 CaM 阻断剂 W-7 部分逆转, 表明其胞内信号途径与 PKC 及 CaM 有关。

气道上皮损伤修复和气道重塑的调控因子网络十分复杂。本研究观察到, 肺内神经肽 CGRP 可上调支气管上皮细胞促炎因子的分泌及 MMP-9 的表达。气道内的 MMP-9 参与气道上皮细胞迁移铺展, 有利于损伤后的修复; 但 MMP-9 表达过量可放大炎症反应, 基底膜过度降解, 加重组织损伤, 导致支气管上皮的脱落, 抑制气道损伤后的修复, 从而加速支气管哮喘的发生发展。鉴于 CGRP 和 MMP-9 在肺内作用的复杂性, 作者推测在气道轻度损伤或损伤的早期 CGRP 促进 MMP-9 的适度表达有助于气道上皮修复, 而严重或反复损伤可导致 MMP-9 的过度分泌或活性过强则加重损伤。

参考文献:

[1] Parks W C, Shapiro S D. Matrix metalloproteinases in lung biology [J]. *Respir Res*, 2001, 2(1): 10-19.

[2] Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2002, 3(4): 409-421.

[3] Doherty G M, Kamath S V, de Courcey F, et al. Children with stable asthma have reduced airway matrix metalloproteinase-9 and matrix-metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(9): 1168-1174.

[4] Legrand C, Gilles C, Zahm J M, et al. Airway epithelial cell migration dynamics: MMP-9 role in cell extracellular matrix remodeling [J]. *J Cell Biol*, 1999, 146(2): 517-529.

[5] Bove P F, Wesley U V, Greul A K, et al. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(2): 138-146.

[6] Dakhama A, Larsen G L, Gelfand E W. Calcitonin gene-related peptide: role in airway homeostasis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(3): 215-220.

[7] Springer J, Geppetti P, Fischer A, et al. calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2003, 16(3): 121-130.

[8] 谭宇蓉, 秦晓群, 管茶香, 等. 肺内调节肽对兔支气管上皮细胞分泌白介素的影响 [J]. *生理学报*, 2002, 54(2): 107-110.

TAN Yu-rong, QIN Xiao-qun, GUAN Cha-xiang, et al. Influence of regulatory peptides on the secretion of interleukins from bronchial epithelial cells of the rabbit [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2002, 54(2): 107-110.

[9] Hawkes S P, Li H, Taniguchi G T. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs [J]. *Methods Mol Biol*, 2001, 151(4): 399-410.

[10] Veronesi B, Carter J D, Devlin R B, et al. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line [J]. *Neuropeptides*, 1999, 33(6): 447-456.

[11] Wong W R, Kossodo S, Kochevar I E. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels [J]. *J Formos Med Assoc*, 2001, 100(6): 377-382.

[12] Saren P, Welgus H G, Kovanen P T. TNF-alpha and IL-1 beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages [J]. *J Immunol*, 1996, 157(9): 4159-4165.

[13] Hozumi A, Nishimura Y, Nishiuma T, et al. Induction of MMP-9 in normal human bronchial epithelial cells by TNF-alpha via NF-kappa B-mediated pathway [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(6): L1444-L1452.

[14] Lappalainen U, Whitsett J A, Wert S E, et al. Interleukin-1 beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32(4): 311-318.

[15] WU Hong, GUAN Cha-xiang, QIN Xiao-qun, et al. Upregulation of substance P receptor expression by calcitonin gene related peptide, a possible cooperative action of two neuropeptides involved in airway inflammation [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2007, 20(5): 513-524.

[16] Alonso-Escolano D, Medina C, Cieslik K, et al. Protein kinase C delta mediates platelet-induced breast cancer cell invasion [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(1): 373-380.