

[文章编号] 1000-4718(2009)07-1430-03

# TGF- $\beta_1$ 对肌成纤维细胞 MMP-2 激活的影响

邓长柏<sup>1</sup>, 朱萍<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 南方医科大学南方医院儿科, 广东 广州 510515; <sup>2</sup> 顺德区桂洲医院超声科, 广东 佛山 528305)

**[摘要]** 目的: 观察转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 对鼠肌成纤维细胞 (C2C12 细胞) 分泌基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 及其激活的影响, 探讨其内在机制。方法: 用不同浓度的 TGF- $\beta_1$  (0、1、5、10  $\mu\text{g/L}$ ) 干预 C2C12 细胞 24 h, 200 pmol/L *Smad3* 基因短干扰 RNA (siRNA-*Smad3*) 转染 C2C12 细胞 24 h, 用 ELISA 方法测定 MMP-2 及其活性型 MMP-2。结果: (1) 0、1、5、10  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta_1$  干预 C2C12 细胞 24 h, ELISA 检测总 MMP-2 的结果 ( $\mu\text{g/L}$ ) 分别为  $177 \pm 20$ 、 $180 \pm 15$ 、 $171 \pm 18$ 、 $179 \pm 28$ , 方差分析无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 活性型 MMP-2 分别为  $23.09 \pm 4.37$ 、 $14.42 \pm 2.30$ 、 $9.50 \pm 1.18$ 、 $4.48 \pm 0.69$ , 比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。 (2) 5  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta_1$  干预 C2C12 细胞 4 h、12 h 和 24 h, 总 MMP-2 ELISA 值分别为  $160 \pm 16$  (对照组) /  $157 \pm 17$  (干预组)、 $174 \pm 6$  /  $174 \pm 16$ 、 $187 \pm 12$  /  $189 \pm 18$ , 不同时点干预组总 MMP-2 值比较无差异,  $P > 0.05$ ; 活性型 MMP-2 值分别为:  $16.92 \pm 1.26$  (对照组) /  $16.53 \pm 2.56$  (干预组)、 $22.70 \pm 3.03$  /  $8.00 \pm 2.02$ 、 $23.15 \pm 2.66$  /  $9.39 \pm 2.60$ , 干预组活性型 MMP-2 值比较有差异,  $P < 0.01$ 。 (3) 200 pmol/L siRNA-*Smad3* 转染 C2C12 细胞 24 h, 再用 5  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta_1$  干预 C2C12 细胞 24 h, 活性型 MMP-2 值分别是  $20.80 \pm 1.53$  (siRNA-control, 空白对照组)、 $9.82 \pm 2.18$  (siRNA-control + 5  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta_1$ , 内对照组)、 $20.09 \pm 2.27$  (siRNA-*Smad3* + 5  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta_1$ , 实验组); 实验组和内对照组比较差异显著 ( $P < 0.01$ ), 实验组和空白对照组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ )。结论: TGF- $\beta_1$  并不影响 C2C12 细胞分泌 MMP2, 但显著抑制 MMP-2 的活化; siRNA-*Smad3* 阻断 *Smad3* 信号转导可以消除 TGF- $\beta_1$  对 MMP-2 活化的抑制作用。

**[关键词]** 成纤维细胞; 基因, *Smad3*; 转化生长因子  $\beta$ ; RNA 干扰; 基质金属蛋白酶

**[KEY WORDS]** Fibroblasts; Genes, *Smad3*; Transforming growth factor beta; RNA interference; Matrix metalloproteinases

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是由锌离子依赖性酶组成的酶系家族, 能够降解所有的细胞外基质。根据它们的底物特异性和结构特点, MMPs 可分为胶原酶、明胶酶、基质分解素、膜型基质金属蛋白酶 (membrane type MMPs, MT-MMPs) 和其它基质金属蛋白酶, 不同的 MMPs 分解不同的细胞外基质。MMP-2 (即明胶酶 A, 72 kD) 可降解 I 型胶原, 激活 MMP-9、MMP-13, 可被 MT-MMPs 激活。MMP-2 由各种各样的正常细胞和转化细胞分泌。多种细胞因子如白细胞介素 1、肿瘤坏死因子等可刺激细胞合成 MMP-2, 有关转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 对肌成纤维细胞 (C2C12 细胞) MMP-2 的影响及其内在机制未见明了。为探讨 TGF- $\beta_1$  对 C2C12 细胞 MMP-2 作用的影响及其内在机制, 我们采用不同浓度 TGF- $\beta_1$  干预 C2C12 细胞, 检测 MMP-2 活性; 并以 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 方法阻断 *Smad3* (small and mothers against dpp, *Smad*) 基因信号转导, 观察其对 MMP-2 活性的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 细胞与细胞培养

小鼠肌成纤维细胞 C2C12 细胞系由中南大学病理生理

研究室引进。C2C12 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、恒温、恒湿培养箱中。细胞见贴壁生长, 形态呈梭形, 铺满培养瓶底约 60% - 80% 后传代, 传代时常规吸去培养液, 用 1:1 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液消化, 加入消化液后在倒置显微镜下观察, 待生长的细胞收缩呈圆形至细胞分界清楚时, 弃去消化液, 用消毒好的 PBS 液轻轻冲洗 2-3 次, 加入适量含血清培养液吹打成单细胞悬液, 按所需浓度接种。

### 2 主要试剂

MMP-2 ELISA 试剂盒 (Amersham Pharmacia), 其余试剂见参考文献<sup>[1]</sup>。siRNA-control 序列正义链 5' - gctt cat aag geg cat agc uu - 3', siRNA-*Smad3* 序列正义链 5' - gag cuu ggu gaa gaa gcu cuu - 3', siRNA-*Smad3* 序列反义链 3' - uuc ucg aac cac uuc uuc gag - 5', 靶 mRNA 5' - gag ctt ggt gaa gaa get c - 3'。

### 3 TGF- $\beta_1$ 干预 C2C12 细胞和 siRNA 转染 C2C12 细胞

在培养的各孔细胞中加入不同量的 DMEM 培养液和 TGF- $\beta_1$ , 使 TGF- $\beta_1$  终浓度为 0 (1 000  $\mu\text{L}$  DMEM)、1  $\mu\text{g/L}$  (999  $\mu\text{L}$  DMEM + 1  $\mu\text{L}$  TGF- $\beta_1$ )、5  $\mu\text{g/L}$  (995  $\mu\text{L}$  DMEM + 5  $\mu\text{L}$  TGF- $\beta_1$ )、10  $\mu\text{g/L}$  (990  $\mu\text{L}$  DMEM + 10  $\mu\text{L}$  TGF- $\beta_1$ ), 干预 C2C12 细胞 24 h, 配制 200 pmol/L siRNA-*Smad3* 转染

[收稿日期] 2008-05-07

[修回日期] 2009-04-01

E-mail: dengchangbo@163.com

C2C12 细胞 24 h, 见参考文献<sup>[1]</sup>。

#### 4 ELISA 检测 MMP-2

按 ELISA 试剂盒说明测定细胞培养液活性型 MMP-2 含量和总 MMP-2 蛋白含量。实验重复 3 次, 结果取平均值。

#### 5 统计学处理

计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用方差分析 *F* 检验, 多组间两两比较采用方差分析 SNK-*q* 检验。采用 SPSS11.5 for Windows 统计分析软件进行处理, 分析前均进行了方差齐性检验。

### 结 果

#### 1 不同浓度 TGF-β<sub>1</sub> 对 C2C12 细胞 MMP-2 分泌及活化的影响

0、1、5、10 μg/L TGF-β<sub>1</sub> 干预 C2C12 细胞 24 h, 抑制 MMP-2 激活呈剂量依赖性, 而对 MMP-2 蛋白分泌无影响, 见表 1。

表 1 TGF-β<sub>1</sub> 浓度对 C2C12 细胞 MMP-2 的影响

Tab 1 Effects of TGF-β<sub>1</sub> at different concentration on MMP-2 production and activation in C2C12 cells ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

TGF-β <sub>1</sub>	Activated MMP-2 (μg/L)	Total MMP-2 (μg/L)
0 μg/L	23.09 ± 4.37	177 ± 20
1 μg/L	14.42 ± 2.30*	180 ± 15
5 μg/L	9.50 ± 1.18**	171 ± 18
10 μg/L	4.48 ± 0.69**Δ	179 ± 28

\* *P* < 0.05 vs 0 μg/L group; \*\* *P* < 0.05 vs 1 μg/L group; Δ *P* < 0.05 vs 5 μg/L group.

#### 2 不同时间 TGF-β<sub>1</sub> 干预 C2C12 细胞对 MMP-2 的影响

5 μg/L TGF-β<sub>1</sub> 干预 C2C12 细胞 4 h、12 h、24 h, 抑制 MMP-2 激活呈时间依赖性, 对 MMP-2 蛋白表达无影响, 见表 2。

表 2 不同时间的 TGF-β<sub>1</sub> 干预对 C2C12 细胞 MMP-2 激活的影响

Tab 2 Effects of TGF-β<sub>1</sub> at different time on MMP-2 production and activation in C2C12 cells ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Time	Group	Activated MMP-2 (μg/L)	Total MMP-2 (μg/L)
4 h	Control	16.92 ± 1.26	160 ± 16
	TGF-β <sub>1</sub>	16.53 ± 2.56	157 ± 17
12 h	Control	22.70 ± 3.03	174 ± 6
	TGF-β <sub>1</sub>	8.00 ± 2.02**	174 ± 16
24 h	Control	23.15 ± 2.66	187 ± 12
	TGF-β <sub>1</sub>	9.39 ± 2.60**	189 ± 18

\*\* *P* < 0.01 vs 4 h TGF-β<sub>1</sub> group.

#### 3 siRNA - Smad3 转染对 TGF-β<sub>1</sub> 干预 C2C12 细胞 MMP-2 的影响

200pmol/L siRNA - Smad3 转染 C2C12 细胞 24 h, 用 5

μg/L TGF-β<sub>1</sub> 干预 24 h, ELISA 检测实验组 MMP-2 活性无改变, 内对照组活性激活减弱, 见表 3。

表 3 siRNA - Smad3 转染 C2C12 细胞对 MMP-2 激活的影响

Tab 3 Effects of siRNA - Smad3 on MMP-2 activation in C2C12 cells ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Group	Activated MMP-2 (μg/L)
siRNA control (blank control group)	20.80 ± 1.53
siRNA control + 5 μg/L TGF-β <sub>1</sub> (internal control group)	9.82 ± 2.18*
siRNA - Smad3 + 5 μg/L TGF-β <sub>1</sub> (experimental group)	20.09 ± 2.27#

\* *P* < 0.01 vs siRNA control; # *P* < 0.01 vs siRNA control + 5 μg/L TGF-β<sub>1</sub>.

### 讨 论

器官纤维化是由于细胞外基质合成与降解之间失衡, 间质成纤维细胞大量激活、增生, 分化为肌成纤维细胞, 产生过多的细胞外基质, 而降解减少所致。研究证实, TGF-β<sub>1</sub> 是主要的细胞调控因子。本课题组前期研究表明, TGF-β<sub>1</sub> 促进 C2C12 细胞增殖是通过 Smad3 通路而完成的, 与文献<sup>[2]</sup> 相似。MMPs 是由锌离子依赖性酶组成的酶系家族, 降解细胞外基质。有关 TGF-β<sub>1</sub> 与 MMP-2 的关系尚在研究之中。本研究发现, TGF-β<sub>1</sub> 抑制 MMP-2 的激活, 呈剂量和时间依赖性。从表 1 可见: 不同浓度的 TGF-β<sub>1</sub> 干预 C2C12 细胞, 培养液中总 MMP-2 比较无明显差异, 总 MMP-2 量不因 TGF-β<sub>1</sub> 作用浓度而改变, 而活性型 MMP-2 随 TGF-β<sub>1</sub> 作用浓度增加而减少, 从 23.09 μg/L 减少为 4.48 μg/L, 不同浓度 TGF-β<sub>1</sub> 作用后各组活性型 MMP-2 值比较有明显差异 (*F* = 28.67, *P* < 0.01), 说明 TGF-β<sub>1</sub> 抑制 MMP-2 的激活, 并呈剂量依赖性; 从表 2 可见: 活性型 MMP-2 由 4 h 时 16.53 μg/L 减少为 8.00 μg/L (12 h) 和 9.39 μg/L (24 h), 4 h 与 12 h 值比较及 4 h 与 24 h 值比较均有显著差异, 而 12 h 与 24 h 值比较却没有显著差异, 说明用 5 μg/L TGF-β<sub>1</sub> 抑制 MMP-2 激活在 12 h 时达最大程度, 超过 12 h 后不再起作用, 这种现象值得进一步研究。从表 3 可见, TGF-β<sub>1</sub> 抑制 MMP-2 激活是通过 Smad3 途径而起作用的, 阻断 Smad3 信号转导可以减轻其抑制作用。

TGF-β<sub>1</sub> 抑制 MMP-2 激活的机制可能是通过抑制 MT1 - MMP 或诱导 TIMP-2 的表达而起作用。我们课题组的研究表明 TGF-β<sub>1</sub> 抑制 MT1 - MMP 蛋白的合成和基因表达呈时间和剂量依赖性, 其抑制过程通过 Smad3 途径而起作用, 阻断 Smad3 信号转导可以消除其抑制作用。Strongin 等<sup>[3]</sup> 研究 MT1 - MMP 激活 MMP-2 是经过 TIMP-2 介导的, 即 MT1 - MMP - TIMP2 - proMMP2 三聚体形成后激活 MMP2。Maquoi 等<sup>[4]</sup> 进一步证实 MT1 - MMP 结合 TIMP-2 后激活 MMP-2, MT1 - MMP 转化为无活性的 43 kD 形式。

(下转第 1434 页)

[参 考 文 献]

[1] 邓新国,张清炯,贾小芸,等. 川芎嗪对 *rd* 和 *rds* 小鼠视网膜光感受器细胞干预作用的光镜观察[J]. 中草药, 2006,37(6):236-238.

[2] 邓新国,葛 坚,何梅凤,等. 不同 MNU 剂量诱导大鼠视网膜光感受器细胞损伤的视网膜电图和病理形态的改变[J]. 中国病理生理杂志,2008, 24(4):828-832.

[3] Vande Velde C, Cleveland DW. VEGF: multitasking in ALS[J]. Nat Neurosci, 2005,8(1):5-7.

[4] Yoshizawa K, Tsubura A. Characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals

and application for the therapy of human retinitis pigmentosa[J]. Nippon Ganka Gankkai Zasshi, 2005,109(6):327-337.

[5] Yourey PA, Gohari S, Su JL, et al. Vascular endothelial cell growth factors promote the *in vitro* development of rat photoreceptor cells[J]. J Neurosci, 2000,20(18):6781-6788.

[6] Hashimoto T, Zhang XM, Cheng BY, et al. VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation[J]. Development,2006,133(11):2201-2210.

(上接第 1431 页)

我们研究证实 TGF- $\beta_1$  对 MMP-2 表达无影响,与 Ester 等<sup>[5]</sup> 研究结果相似, MMP-2 表达与 Smad3 无关。Kim 等<sup>[6,7]</sup> 证实, TGF- $\beta_1$  促进人乳腺癌上皮细胞 MMP-2 表达是通过 p38MAPK 通路激活 H-ras。而 Lee 等<sup>[8]</sup> 研究报道, TGF- $\beta_1$  对 MMP-2 促进人单核细胞 THP-1 细胞 MMP-2 表达是通过诱导 Smad7 表达而完成的。我们的研究表明, Smad3 参与了 TGF- $\beta_1$  对 MMP2 激活的抑制作用, siRNA 阻断 Smad3 信号通路可以消除其抑制作用, MMP-2 基因表达信号转导途径可能不需要 Smad3 参与。

[参 考 文 献]

[1] 邓长柏,杨作成. siRNA 阻断肌成纤维细胞内源性 Smad3 表达的研究[J]. 临床儿科杂志,2007,25(10):815-817.

[2] 牟 达,何 芳,任红林,等. Smad 通路参与 ERK 通路诱导血管平滑肌细胞增殖的过程[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(4):701-706.

[3] Strongin AY, Collier I, Bannikov G, et al. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease[J]. J Biol Chem, 1995,270(10):5331-5338.

[4] Maquoi E, Francken F, Baramova E, et al. Membrane type I matrix metalloproteinase-associated degradation of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human tumor cell lines[J]. J Biol Chem,2000,275(15):11368-11378.

[5] Ester P, Wen JJ, Jorg H, et al. Functional characterization of transforming growth factor  $\beta$  signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts [J]. J Biol Chem, 2001, 276(23):19945-19953.

[6] Kim ES, Kim MS, Moon A. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells[J]. Int J Oncol, 2004,25(5):1375-1382.

[7] Kim ES, Kim MS, Moon A. Transforming growth factor (TGF)-beta in conjunction with H-ras activation promotes malignant progression of MCF10A breast epithelial cells[J]. Cytokine,2005,29(2):84-91.

[8] Lee EO, Kang JL, Chong YH. The amyloid-beta peptide suppresses transforming growth factor-beta 1-induced matrix metalloproteinase-2 production via Smad 7 expression in human monocytic THP-1 cells[J]. J Biol Chem, 2005,280(9):7845-7853.