

曲伏前列腺素对培养人眼睫状肌细胞基质金属蛋白酶-2 表达的影响

蓝育青, 肖剑晖, 彭蔚, 张弛, 郭慧, 宋欣
(中山大学附属第二医院眼科, 广东 广州 510120)

摘要: **【目的】**研究曲伏前列腺素作用下, 基质金属蛋白酶-2(MMP-2) 在人睫状肌细胞的表达。 **【方法】**在人睫状肌细胞无血清培养基中加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 曲伏前列腺素(travoprost), 根据曲伏前列腺素孵育时间的不同, 分为 4 个时间组, 即 0 h 组(对照组)、6 h、12 h、24 h 组。Real-time PCR 和 ELISA 法分别检测上述各时间组人睫状肌细胞 MMP-2 在基因和蛋白水平的表达, 每种方法分别重复做 3 次。Zymography 技术分别检测 4 组细胞 MMP-2 的活性, 重复 4 次。 **【结果】**设定对照组 mRNA 相对表达量为 1 作为标准, 6 h、12 h、24 h 组 MMP-2 mRNA 相对表达量为 0.58 ± 0.04 、 1.20 ± 0.05 、 1.95 ± 0.11 , MMP-2 mRNA 表达呈逐渐升高趋势 ($P=0.000$); ELISA 检测 MMP-2 的 A 值分别为 0.0503 ± 0.0021 、 0.0627 ± 0.0017 、 0.0673 ± 0.0025 、 0.0783 ± 0.0039 , MMP-2 的表达随 travoprost 作用时间延长逐渐升高 ($P=0.000$)。Zymography 技术检测 MMP-2 校正光密度值分别为 10 ± 5 、 52 ± 7 、 104 ± 21 、 237 ± 40 ; MMP-2 活性随 travoprost 作用时间延长而逐渐增强 ($P=0.000$)。 **【结论】**曲伏前列腺素作用于人睫状肌细胞后, MMP-2 表达随药物作用时间延长逐渐增加, 活性逐渐增强。

关键词: 睫状肌细胞; 基质金属蛋白酶; 曲伏前列腺素; 基因表达

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0498-03

Effects of Travoprost on Matrix Metalloproteinases-2 in Cultured Human Ciliary Muscle Cells

LAN Yu-qing, XIAO Jian-hui, PENG Wei, ZHAN Chi, GUO Hui, SONG Xin

(Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: **【Objective】**To study the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human ciliary muscle cells after administration of travoprost. **【Methods】** 1 $\mu\text{mol/L}$ travoprost was diluted in the serum-free cultured medium of human ciliary muscle cells (HCM). Four groups which including group 0 h (control group), group 6 h, group 12 h, and group 24 h were determined according to the exposed time. Real-time PCR and ELISA were used to detect the relative quantitative mRNA and expression of protein of MMP-2 in the 4 groups, respectively. Each method was repeated for 3 times. Zymography was used to detect the activity of MMP-2 in the HCM cells of 4 groups for 4 times. **【Results】** When considering the result of relative quantitative mRNA of control group as 1, the results of relative quantitative mRNA of 6 h, 12 h, and 24 h were 0.58 ± 0.04 , 1.20 ± 0.05 , and 1.95 ± 0.11 , respectively. Expression of MMP-2 in mRNA level was showed a gradually increasing trend ($P=0.000$). The value A of 4 groups with ELISA were 0.0503 ± 0.0021 , 0.0627 ± 0.0017 , 0.0673 ± 0.0025 , and 0.0783 ± 0.0039 , respectively, which revealed that the expression of MMP-2 in protein level increased gradually with the exposed time ($P=0.000$). With zymographic analysis, the corrected ray density of 4 groups were 10 ± 5 , 52 ± 7 , 104 ± 21 , and 237 ± 40 , respectively. The activity of MMP-2 improved gradually with the exposed time ($P=0.000$). **【Conclusion】** The expression of MMP-2 in mRNA and protein level increased gradually and the activity of MMP-2 improved with the exposed time of travoprost in human ciliary muscle cells.

Key words: ciliary muscle cell; matrix metalloproteinase; travoprost; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):498-500]

收稿日期: 2007-01-10

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动基金(04300243)

作者简介: 蓝育青(1968-), 女, 广东和平人, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: lyqj@163.com

前列腺素 (prostaglandin, PG) 是一组具有一个五碳环和两条侧链共 20 个碳原子的不饱和脂肪酸衍生物, 上世纪 90 年代初发现带苯环的 PGF₂ α 较传统的抗青光眼药具有更好的降眼压效果, 因而受到更多学者的关注。研究表明^[1], 与传统的房水流出的小梁途径不同, PGF₂ α 作用是通过增加睫状肌细胞间间隙, 使葡萄膜巩膜房水流出通道流出阻力下降, 进而降低眼压。而其作用机制有可能是增强了睫状肌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 表达, 从而使睫状肌细胞外基质降解房水流出增加。曲伏前列腺素 (travoprost, 商品名苏为坦, Travatan) 是上述前列腺素中的一种, 它可高选择性地与 PGF₂ α 受体结合, 临床上仅采用 0.004% 的浓度, 每天使用一次, 即能发挥持久而显著的降眼压作用^[2]。有关 Travoprost 作用的分子机制目前仍不确切。因此, 本文拟采用 real-time PCR, ELISA 和 Zymography 技术, 从分子和蛋白水平观察曲伏前列腺素对人睫状肌细胞 MMP-2 表达的影响, 进一步探讨葡萄膜巩膜房水流出通道的分子调控机制, 为青光眼的药物治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 人睫状肌细胞培养及加药条件

1.1.1 供体 摘自死亡 1 h 内无眼疾青年尸体眼球, 取自中山大学中山眼科医院, 供体排除眼部疾患。眼球摘出置冰壶保存, 取回后抗菌处理, 湿房保存 7~24 h。人睫状肌细胞培养方法见参考文献^[3]。本实验采用第 4、5 代融合睫状肌细胞。

1.1.2 加药条件 将第 4、5 代细胞用无牛血清培养液换液, 24 h 后, 将细胞分为对照组和实验组, 试验组分别加入含 travoprost 药物浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的无牛血清培养液 0.5 mL, 按照加入药物后孵育细胞的时间不同, 分成 6 h 组, 12 h 组, 24 h 组, 收集细胞行 real-time RT-PCR 分析, 收集细胞外液做 ELISA 分析和 Zymography 活性分析。

1.2 Real-time PCR 检测睫状肌细胞中 MMP-2 的表达

1.2.1 主要试剂和仪器 Trizol (美国 Invitrogen), Realtime PCR Master Mix (已含有 SYBR Green 1 $\mu\text{mol/L}$ 日本 TOYOBO), ABI 定量 PCR 扩增仪 (美国 ABI applied Bios-system)。

1.2.2 Real-time PCR Trizol 一步法提取人睫状肌细胞总 RNA, 反转录得到 cDNA 产物, real-time PCR 进行 cDNA 产物扩增, 并计算 mRNA 相对表达量^[4]。PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列 MMP2 引物序列 (F: 5 - agcgtgaagtttgaagcat - 3 ; R: 5 - gttctaaggcagccagcagt - 3, 530 bp)。内参照 G3PDH : (F: 5 - accacagtcacatgccatcac - 3 ; R: 5 - tcaccaccctgtgtcgtga - 3, 450 bp)。取模板 (10 pmol/ μL) 共 2 μL , 总反应体积为 25 μL 进行逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)。设置反应程序: 95 变性 30 s, 56 退火 30 s, 72 延伸 45 s, 共计 40 个循环, 最后 72 延伸 7 min, 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下拍照。Real-time PCR 反应体系含: 模板 (10 pmol/ μL) 2 μL , 反转录产物 2 μL , Real-time PCR Master Mix 15 μL , 总反应体积为 30 μL 。反应条件设置: 95 变性 15 s, 56 退火 15 s, 72 延伸 1 min, 共计 40 个循环。

1.3 ELISA 法检测细胞外液 MMP-2 蛋白

1.3.1 主要仪器及试剂 兔抗人 MMP-2 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), HRP 羊抗兔 IgG (北京博奥森生物技术有限公司), 四甲基联苯胺显色试剂盒 (北京赛驰生物科技有限公司), SDS (美国 Sigma 公司)。

1.3.2 步骤 将收集 0 h、6 h、12 h、24 h 组细胞溶于 1 g/L SDS, 100 加热 5 min 裂解。包被, 洗涤。MMP-2 一抗按 1 1000 稀释后, 加 0.1 mL 于已包被反应孔, 同时做空白孔, 37 保温 1 h。洗涤。加 1:500 稀释酶标抗体 (HRP-羊抗兔 IgG) 0.1 mL。37 保温 1 h, 洗涤。TMB 底物溶液显色。于 450 nm 处, 以空白对照孔调零后测各孔 A 值。

1.4 Zymography 技术检测 MMP-2 活性

1.4.1 仪器和设备 明胶 (广州化学试剂厂), Triton 100 (广州化学试剂厂), 40 g/L 丙稀酰胺/甲叉双丙稀酰胺溶液 (上海生工), 十二烷基磺酸钠 (美国 Sigma 公司) 过硫酸铵 (APS) (美国 Sigma 公司) 垂直平板微电泳槽 (美国 Bio-Rad), NIH image 软件分析系统。

1.4.2 方法 将 4 组细胞外液于低温离心机 2 000 r/min \times 5 min, $r = 6$ cm, 取上清分装。置 -20 冰箱备用。配含 0.15 g/L 明胶的 10 g/L 分离胶和 5 g/L 浓缩胶灌胶。加样, 电泳 80 V \times 30 min + 120 V \times 90 min, 取胶后置于 2.5 g/L Triton 100 液

中 4 冰箱 45 min ×2 次, 然后将胶放入调定 pH 7.4 的孵育液中, 置于 37 °C 温箱中 24 h, 取胶用考马斯亮蓝染色 30 min。脱色液脱色 90 min, 干燥胶, NIH image 软件分析条带。

1.5 统计学分析

SPSS 8.0 统计软件, 以方差分析法进行统计学检验。

2 结 果

2.1 Real-time PCR 检测细胞内 MMP-2 mRNA 的表达

设定对照组 mRNA 相对表达量为 1 作标准, 6 h、12 h、24 h 组 MMP-2 mRNA 相对表达量为 0.58 ± 0.04 、 1.20 ± 0.05 、 1.95 ± 0.11 ($n=3$)。经统计分析, 培养基加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 曲伏前列腺素后, MMP-2 表达水平 6 h 下降, 12 h、24 h 逐渐升高趋势 ($F=236.959$, $P=0.000$)。

2.2 ELISA 分析细胞外液 MMP-2 蛋白表达

对照组、6 h、12 h、24 h 组的 MMP-2 的 A 值均数分别为 0.0503 ± 0.0021 、 0.0627 ± 0.0017 、 0.0673 ± 0.0025 、 0.0783 ± 0.0039 ($n=4$)。提示 MMP-2 随药物作用时间延长呈现逐渐升高趋势 ($F=38.110$, $P=0.001$)。

2.3 Zymography 技术检测 MMP-2 活性

Zymography 凝胶中(图 1)可见一条 MMP-2 透明条带, 分子质量为 72 ku。对照组与 6 h、12 h、24 h 组 MMP-2 校正光密度值分别为 10 ± 5 、 52 ± 7 、 104 ± 21 、 237 ± 40 ($n=4$); 实验各组 MMP-2 活性比对照组增强 ($F=74.348$, $P=0.000$), 提示随药物作用时间延长, MMP-2 活性逐渐增强。

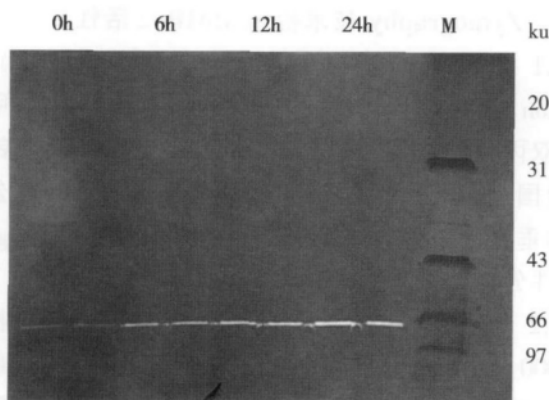


图 1 MMP-2 Zymography 凝胶

Fig.1 The result of zymography analysis

The transparent bands were the MMP-2 (72 ku)

3 讨 论

基质金属蛋白酶(MMP)是一个天然的蛋白酶家族, 能降解细胞外基质成分的特殊肽链序列, 目前已知基质金属蛋白酶至少 19 种。1997 年 Weinreb 等^[5]在培养的人睫状肌细胞中, 应用 Zymography 技术和 Western 印迹杂交法, 发现有多种 MMP 的表达。Oh 等^[6]发现在睫状肌细胞中 MMP-1、-2、-3、-11、-12、-14、-15、-16、-17、-19 的 mRNA 均有表达, 用前列腺素类药物 latanoprost 作用于人睫状肌后, MMP-1、-2、-3、-12、-14、-15、-17 的表达均发生改变, 并且出现 MMP-9 的表达。Husain 等^[8]研究发现, PGF₂ 类制剂 Latanoprost Acid 作用 6 h 内即可于人睫状肌细胞内产生 MMP-2 的急性效应, 表现为细胞外分泌 MMP-2 表达随加药时间而增加, 加药 4 h 出现分泌峰值。Travoprost 是一类新型的完全的黄素蛋白受体激动剂, 具有降眼压作用强, 并且平稳持久降眼压的特点。临床实验表明只需 0.004 g/L 的 Travoprost 即可达到良好的降眼压效果^[2]。有关其降眼压的分子机制尚未明确, 可能是通过增强睫状肌细胞基质金属蛋白酶表达, 降解睫状肌细胞外基质, 胶原分解, 最终使睫状肌细胞之间间隙增加, 葡萄膜巩膜房水流出通道流出阻力下降, 进而降低眼压。上述 Husain 等^[7]研究还表明, 拟前列腺素类药物与黄素蛋白受体结合后, 通过蛋白激酶 C 和 ERK1/2 通路, 从而使睫状肌细胞分泌 MMP-2 增多, 活性增强。蛋白激酶 C 抑制剂可阻断黄素蛋白受体的激活, 最终使 MMP-2 分泌下降。本研究中, 加入 Travoprost 12 h 和 24 h, real time PCR 和 ELISA 显示 MMP-2 基因和蛋白表达水平呈逐渐升高趋势, 而在 6 h MMP2 mRNA 表达出现下降, 与上述 latanoprost 作用的峰期不一样, 提示 Travoprost 早期可能存在不同于 latanoprost 的作用机制, 有可能与二者的化学结构不全相同或采用的浓度不同有关, 需进一步研究明确。

Zymography 技术又称明胶酶谱技术, 是用于检验酶的蛋白分解活性的一种电泳技术。其原理是在预先加入明胶作为反应底物的聚丙烯酰胺凝胶中加样进行电泳, 然后在一定条件进行酶分解底物反应, 最后聚丙烯酰胺凝胶染色, 已发生酶分解处会出现透明条带, 对透明条带进行图像分析,

(下转第 514 页 to page 514)

- [11] NAKAJIMA A, AZUMA M, KODERA S, et al. Preferential dependence of autoantibody production in murine lupus on CD86 costimulatory molecule [J]. *Eur J Immunol*, 1995, 25(11): 3060-3069.
- [12] NAGAFUCHI H, SHIMOYAMA Y, KASHIWAKURA J, et al. Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2003, 21(1): 71-77.
- [13] YE X, ZHU T, BASTACKY S, et al. Prevention and reversal of lupus in NZB/NZW mice by costimulatory blockade with adeno-associated virus-mediated gene transfer [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(12):3975-3986.
- [14] SABAHI R, ANOLIK J H. B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus [J]. *Drugs*, 2006, 66(15): 1933-1948.

(编辑 张恩健)

(上接第 500 页 from page 500)

可得出校正光密度, 从而对酶活性进行相对定量估计。Kleiner^[8] 曾从多个方面系统地研究了多因素对其敏感性及其可行性的影响, 认为此技术可检测到皮克(微微克)的蛋白活性, 因此具有高度灵敏性, 现在已广泛用于检测基质金属蛋白酶的活性。金明等^[9] 在实验中, 为了得到浓度较高的 MMP 样品, 加样前先将睫状肌细胞无血清培养液按 10 倍浓缩。收集样品时, 仅用 0.5 mL 无血清培养液的进行细胞孵育, 从而不需要透析提纯样品, 亦能看到明胶酶条带的改变, 是一种简单可行的方法。由于 MMP 是一类依赖于 Zn^{2+} 的蛋白水解酶类, 所以孵育液中作者加入氯化锌促进反应进行。本研究采用 Zymography 技术检测发现, Travoprost 作用人睫状肌细胞后, 细胞分泌 MMP-2 的活性随作用时间延长而逐渐增强。

通过本实验初步证实了 Travoprost 药物可增加人睫状肌细胞 MMP-2 表达, 增强睫状肌 MMP-2 活性。至于不同浓度 Travoprost 对于人睫状肌细胞 MMP 作用及上游分子调控机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ANTHONY T L, LINDSEY J D, WEINREB R N. Latanoprost s Effects on TIMP -1 and TIMP -2 Expression in Human Ciliary Muscle Cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43 (2): 3705-3711.
- [2] GOLDBERG I, CUNHA-VAZ J, JAKOBSEN J E, et al. Comparison of topical travoprost eye drops given once daily and timold 0.5% given twice daily in parents with open-angle glaucoma of ocular hypertension [J]. *J Glaucoma*, 2001, 10(2):414-422.
- [3] LINDSEY J D, TO H D, WEINREB R N. Induction of c-fos by prostaglandin F2 alpha in human ciliary smooth muscle cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 242-250.
- [4] 王子亮, 庄文权, 陈伟, 等. 基质金属蛋白酶-2 在退变椎间盘髓核组织中的表达 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(6): 557-559.
- [5] WEINREB R N, KASHIWAGI K, KASHIWAGI F, et al. Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(13): 2772-2780.
- [6] OH D J, MARTIN J L, WILLIAMS A J, et al. Analysis of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human ciliary body after latanoprost [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3): 953-963.
- [7] HUSAIN S, JAFRI F, CROSSON C E. Acute Effects of PGF2 on MMP-2 Secretion from Human Ciliary Muscle Cells: A PKC- and ERK- Dependent Process [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(5):1706-1713.
- [8] KLEINER D E, STETLER-STEVENSON W G. Quantitative zymography: detection of pictogram quantities of gelatinases [J]. *Analy Biochem*, 1994, 218: 325-329.
- [9] 金明, 洪晶, 吴景天, 等. PGF2 类抗青光眼药 Unoprostone 对培养猴睫状肌细胞中胶原、及 MMP-1 表达的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2002(31): 40-42.

(编辑 刘清海)