

[文章编号] 1000- 4718(2006)05- 0948- 05

香烟提出物对被动吸烟大鼠肺泡巨噬细胞源性明胶酶的表达和酶活性的影响

李亚清, 张珍祥[△], 徐永健, 陈仕新, 倪望, 杨朝, 马丹
(华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸病研究室, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨香烟烟雾对被动吸烟大鼠肺泡巨噬细胞源性明胶酶 A(MMP- 2) 和明胶酶 B(MMP- 9) 表达及酶活性的影响。方法: 复制被动吸烟大鼠模型, 从其支气管肺泡灌洗液(BALF) 中分离与培养大鼠肺泡巨噬细胞(AM), 经 Giemsa 染色法鉴定, 以台盼蓝染色计数和检测其活性; 制备香烟提出物(CSM), 刺激培养的 AM。以半定量 RT- PCR 法检测 MMP- 2、MMP- 9 mRNA 表达水平; 以明胶酶谱法检测 MMP- 2、MMP- 9 酶活性水平。结果: 以 0%、1%、3%、5%、10%、15% CSM 刺激 AM 时, MMP- 9 和 β - actin mRNA 灰密度值比分别为: 0.095 ± 0.006 、 0.215 ± 0.018 、 0.468 ± 0.038 、 0.837 ± 0.047 、 0.159 ± 0.028 、 0.092 ± 0.002 ; 而 MMP- 2 和 β - actin mRNA 灰密度值比分别为: 0.109 ± 0.023 、 0.176 ± 0.036 、 0.317 ± 0.024 、 0.370 ± 0.051 、 0.274 ± 0.025 、 0.087 ± 0.005 。MMP- 2 酶活性的相对灰密度值分别为 $6.007.83 \pm 147.39$ 、 $38.202.00 \pm 3.160.40$ 、 $70.532.00 \pm 3.225.18$ 、 $90.074.00 \pm 925.62$ 、 $70.070.17 \pm 2.060.33$ 、 $17.487.67 \pm 2.060.33$; MMP- 9 酶活性的相对灰密度值分别为 $10.904.67 \pm 1.697.00$ 、 $52.627.83 \pm 3.974.05$ 、 $95.284.83 \pm 3.098.89$ 、 $103.400.50 \pm 3.441.30$ 、 $94.650.33 \pm 3.825.08$ 、 $27.571.17 \pm 2.129.48$ 。组间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。结论: 香烟烟雾可诱导 AM 源性 MMP- 2 和 MMP- 9 mRNA 的表达, 并导致其酶活性升高; AM 及其分泌的明胶酶活性异常可能在吸烟相关的 COPD 中起重要作用。

[关键词] 肺疾病, 阻塞性; 巨噬细胞, 肺泡; 明胶酶类; 烟雾

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Gelatinases expression and their activity in rat alveolar macrophages induced by cigarette smoke medium

LI Ya- qing, ZHANG Zhen- xiang, XU Yong- jian, CHEN Shi- xin, NI Wang, YANG Zhao, MA Dan

(Department of Respiratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of cigarette smoke medium (CSM) on the gene expression and activity of gelatinases from alveolar macrophages (AMs) in the rat, and then to explore their role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **METHODS:** AMs were obtained from BALF of the rats that had smoked for 12 weeks. CSM was produced following the method of Wirtz and colleagues, and the cultured AMs were respectively stimulated for 24 h by 0%, 1%, 3%, 5%, 10%, 15% CSM. The mRNA levels of MMP- 9 and MMP- 2 were detected by semi- quantitative RT- PCR, and the enzyme activity was measured by Zymography. **RESULTS:** When the concentration of CSM was below 5%, the expression and activity of MMP- 9 and MMP- 2 significantly increased with the concentration of CSM in a dose- depended manner ($P < 0.05$). While the concentration of CSM exceeded 5%, the expression and activity of MMP- 9 and MMP- 2 correspondingly decreased with the increase in CSM concentrations ($P < 0.05$), which possibly were related with the cytotoxicity of CSM. **CONCLUSION:** The expression and activity of MMP- 9 and MMP- 2 are induced by CSM. The gelatinases induced by smoking from AM may play an important role in the pathogenesis of COPD.

[KEY WORDS] Lung diseases, obstructive; Macrophages, alveolar; Gelatinases; Smog

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是引起呼吸系疾病发病率和死亡率不断上升的重要原因。吸烟是导致 COPD 的主要原因^[1], 弹性物质的降解则是 COPD 特征性的病理表

[收稿日期] 2005- 03- 14

[修回日期] 2005- 06- 28

[△]通讯作者 Tel: 027- 62130727; E- mail: zxzhang@tjh.tjmu.edu.cn

现^[2,3]。肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)能分泌基质金属蛋白酶(MMPs)和组织蛋白酶(cathepsins)等,是降解弹性蛋白物质的重要来源。明胶酶属于MMPs超家族成员,包括MMP-2(明胶A)和MMP-9(明胶B),可参与细胞外基质(ECM)的降解,故AM源性明胶酶在COPD中的作用越来越引起人们关注。本研究通过复制被动吸烟大鼠模型,观察香烟提取物对AM源性明胶酶的表达及酶活性的影响,从而探讨吸烟及AM源性明胶酶在COPD发病中的相互关系与作用。

材 料 和 方 法

1 被动吸烟大鼠肺泡巨噬细胞的分离与培养

清洁级雄性Wistar大鼠50只,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。按本实验室方法复制被动吸烟大鼠模型^[4]:即每天对大鼠被动吸烟1次。每次燃烧10只香烟,每只10 min,间隔5 min,每周7 d,共12周。12周后以20%乌拉坦(7 mL/kg)腹腔内注射麻醉、固定、消毒后,暴露气管,气管插管,用预冷的D-Hanks液进行支气管肺泡灌洗,总量30 mL,分6次灌洗。将支气管肺泡灌洗液(BALF)移入离心管中,1 200 r/min离心12 min,弃上清,PBS洗涤细胞,1 200 r/min离心10 min,弃上清,用含10%胎牛血清(FBS)、 10^5 U/L青霉素、100 mg/L链霉素RPMI-1640培养液(Hyclone)混悬细胞,将细胞悬液加入培养瓶中,在37℃5%CO₂条件下培养2.5 h后用PBS洗涤细胞,收集细胞,用含10%FBS的RPMI-1640培养液混悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^9 cells/L,进一步培养。以Giemsa染色法鉴定AM,台盼蓝染色检测其活性。

2 香烟提出物的制备与对细胞的干预

参照Wirtz等^[5]的方法。点燃2支除去过滤嘴的香烟(XXX牌),经烟雾驱动装置连续抽吸燃烧,将烟雾经装置的另一端口导入50 mL RPMI-1640培养液内,制成香烟烟雾-RPMI-1640混悬液(CSM)。CSM经过滤除菌后在紫外分光光度仪上进行全波长扫描,绘制吸光度与波长曲线。重复实验6次,得最大吸光度为2.9420,其对应波长为300 nm,此时CSM浓度为100%。将上述CSM以RPMI-1640培养液按0.5、1.0、2.0、3.0、5.0倍稀释,测其在300 nm时的吸光度值,绘制吸光度与浓度线性图($r = 0.9994$)。由于CSM浓度与其在300 nm时的吸光度值成正比,因此可根据300 nm时的吸光度值得测CSM实际浓度,并以RPMI-1640培养液稀释,使CSM的终浓度分别为

1%、3%、5%、10%、15%,并分别和AMs在37℃5%CO₂条件下孵育24 h,收集细胞和上清液,以未用CSM刺激的AMs为对照组(0%CSM组)。

3 CSM对MMP-2、MMP-9 mRNA的表达的影响

以RT-PCR法检测。以Trizol试剂提出总RNA,并以22 μ L DEPC处理的超纯水溶解,以GeneQuant RNA/DNA calculator测定其纯度和含量。按MMLV逆转录酶试剂盒(Promega)说明合成cDNA:在DEPC处理的微离心管中加入2 μ g RNA与2 μ L Oligo(dT) 15(0.5 μ g/ μ L)混合,补充DEPC处理的无菌水至总体积为12 μ L,离心,70℃温育5 min,迅速置冰上,分别加入5 \times buffer 5 μ L, RNase(4 $\times 10^7$ U/L) 0.6 μ L, dNTP(10 mmol/L) 1.25 μ L, MMLV(2 $\times 10^8$ U/L) 1 μ L,补充DEPC处理的超纯水至总体积为25 μ L,离心,37℃温育1 h,95℃5 min灭活逆转录酶。根据目的基因向微离心管中分别加入:10 \times buffer 2.5 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 2.0 μ L, dNTP(10 mmol/L) 1.0 μ L,上游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L,下游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L,逆转录产物 2.5 μ L, Taq酶 0.5 μ L,加无菌去离子水补至总体积25 μ L,离心混匀,置PTC-200型PCR仪中95℃预变性5 min,然后完成35个循环,PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳,用UVP-GDS8000凝胶成像分析系统进行拍照、图像灰度分析,将每一种目的基因扩增片段灰密度值与相应的内参照 β -actin扩增片段灰密度值的比值作为其mRNA表达水平的定量指标。引物由上海赛百盛公司合成:MMP-2(GenBank:NM-031054)正义链5'-GATAACCTGGATGCTGTCG-3',反义链5'-GCTGAAGCCAATAAAAGG-3',452 bp;MMP-9^[6](GenBank:NM-0321055)正义链5'-TTCGACTCCAGTAGACAATCC-3',反义链5'-CAGAGAACTCGT-TATCCAAGCG-3',443 bp;内参 β -actin正义链5'-ACCCAGATCATGTTGAGACCT-3',反义链5'-TCAGGAGGAGCAATGATCITG-3',644 bp。

4 CSM对MMP-2、MMP-9酶活性的影响

以明胶酶谱法检测。用考马斯亮蓝比色法测细胞上清液蛋白浓度。取30 μ L(含10 μ g蛋白)浓缩的上清液与10 μ L 4 \times 上样缓冲液(4% SDS、16%甘油、0.12%溴酚蓝、0.32 mol/L Tris, pH 6.8)混匀。将待测样品和MMP-2、MMP-9标准蛋白(1 μ g)不经加热,分别上样于10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(含1 g/L明胶)的加样孔中。电泳约3 h,电泳过程中使Tris-甘氨酸缓冲液(0.125 mol/L Tris-HCl、1.25 mol/L甘氨酸、0.5% SDS, pH 8.3)保持在4℃左右。电泳结束

后,将凝胶置于脱液(2.5% TritonX-100,50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl₂,1 μmol/L ZnCl₂,pH 7.6)中振荡洗脱2次,每次45 min;然后用漂洗液(50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl₂,1 μmol/L ZnCl₂,pH 7.6)漂洗2次,每次20 min;接着用孵育液(50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl₂,1 μmol/L ZnCl₂,0.02% Brij-35,pH 7.6)漂洗约10 min,然后于孵育液中37℃孵育36 h。然后将胶浸入染色液(0.05%考马斯亮蓝R-250,30%甲醇,10%冰乙酸)中染色3 h,接着分别在脱色液A(30%甲醇,10%冰乙酸)、B(20%甲醇,10%冰乙酸)、C(10%甲醇,5%冰乙酸)中脱色15 min、30 min、60 min,然后用UVP-GDS8000凝胶成像分析系统对凝胶进行摄像、图像灰密度分析。

5 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件包进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用单因素方差分析(组间差异用F检验,组间两两比较用q检验)。

结 果

1 CSM对AM源性MMP-2、MMP-9 mRNA表达的影响

以0%、1%、3%、5%、10%、15% CSM刺激AMs 24 h后,MMP-9和β-actin mRNA灰密度比值分别为:0.095±0.006、0.215±0.018、0.468±0.038、0.837±0.047、0.159±0.028、0.092±0.002;而以0%、1%、3%、5%、10%、15% CSM刺激AM 24 h后MMP-2和β-actin mRNA灰密度比值分别为:0.109±0.023、0.176±0.036、0.317±0.024、0.370±0.051、0.274±0.025、0.087±0.005。因此,当CSM浓度低于5%时,随着其刺激浓度的增加MMP-2、MMP-9 mRNA表达也相应增加,但当CSM浓度过高时,MMP-2、MMP-9 mRNA表达下降,组间存在显著差异($P < 0.05$),且1%、3%、5%、10% CSM刺激组MMP-2、MMP-9 mRNA表达显著高于未刺激组(0% CSM组)($P < 0.05$),见图1、2。

2 CSM对AM源性MMP-2、MMP-9酶活性的影响

当AM未被CSM刺激时,MMP-2、MMP-9酶活性均很低,其灰密度值分别为6 007.83±147.39、10 904.67±1 697.00。而以1%、3%、5%、10%、15% CSM刺激后,MMP-2酶活性的相对灰密度值分别为38 202.00±3 160.40、70 532.00±3 225.18、90 074.00±925.62、70 070.17±2 060.33、17 487.67±2 060.33。MMP-9酶活性的相对灰密度值分别为52 627.83±

3 974.05、95 284.83±3 098.89、103 400.50±3 441.30、94 650.33±3 825.08、27 571.17±2 129.48。因此,在一定范围内,随着CSM浓度增加,MMP-2、MMP-9酶活性均相应上升,但当CSM浓度超过5%时,MMP-9酶活性则下降,组间存在显著差异($P < 0.05$),且1%、3%、5%、10% CSM刺激组MMP-2、MMP-9酶活性显著高于未刺激组(0% CSM组)($P < 0.05$)。见图3。

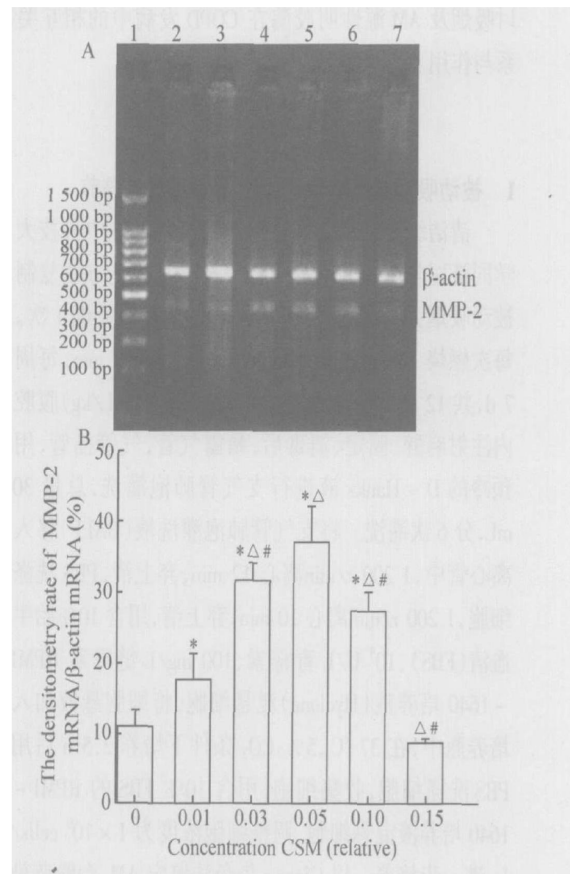


Fig 1 The effect of CSM on the MMP-2 mRNA expression from AMs of rats. A: semi-quantitative RT-PCR analysis of MMP-2 mRNA expression from AMs of the rats. As an internal control, β-actin was coamplified with MMP-2. Lane 1: DNA ladder marker; Lane 2: MMP-2 mRNA expression from the AMs not stimulated by CSM; Lane 3-7: MMP-2 mRNA expression from AMs respectively stimulated by 1%, 3%, 5%, 10% and 15% CSM. B: densitometric analysis of A. $\bar{x} \pm s$, n = 6. * $P < 0.05$ vs 0 CSM; Δ $P < 0.05$ vs 1% CSM; # $P < 0.05$ vs 5% CSM.

图1 香烟提出物对被动吸烟大鼠肺泡巨噬细胞源性MMP-2 mRNA表达的影响

讨 论

香烟烟雾中含有氧自由基、尼古丁、一氧化氮、焦油等4 000多种有害物质,可通过多种途径损伤机

体。但人们往往只认识到主动吸烟的危害性,对被动吸烟的危害则了解甚少。本研究通过复制被动吸烟大鼠模型及体外实验发现:在一定范围内,CSM可诱导AM源性明胶酶的表达并使其酶活性水平升高;但当CSM浓度过高时,MMP-2和MMP-9的表达水平和酶活性下降,这可能与CSM对AM的细胞毒性作用有关。而活化的MMP-9则可作用于IV型胶原、弹性蛋白、蛋白聚糖等;MMP-2可作用于IV型胶原、弹性蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖等。因此,无论主动还是被动吸烟,香烟烟雾均可通过诱导机体表达过量的明胶酶造成机体损伤。

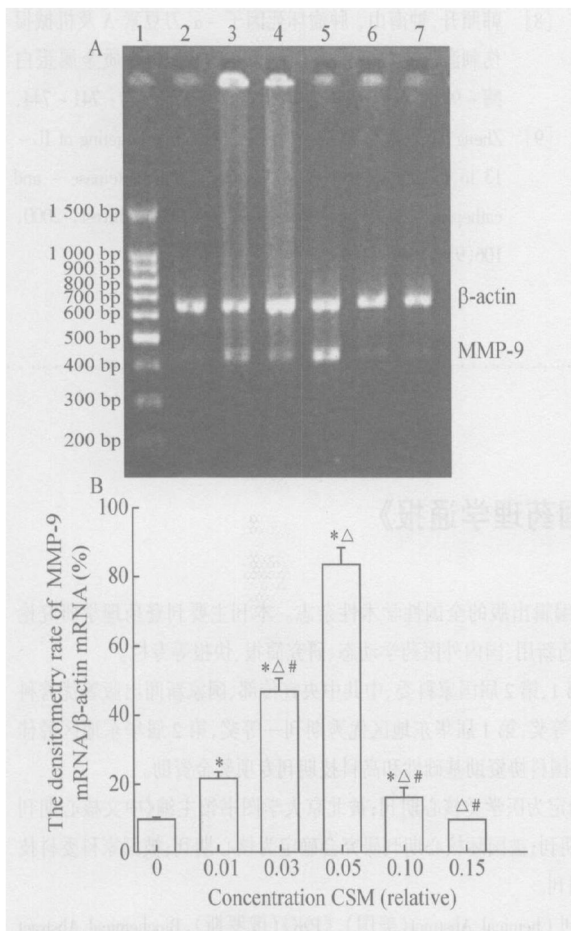


Fig 2 The effect of CSM on the MMP-9 mRNA expression from AMs of the rats. A: semi-quantitative RT-PCR analysis of MMP-9 mRNA expression from AMs of the rats. As an internal control, β-actin was coamplified with MMP-9. Lane 1: DNA ladder marker; Lane 2: MMP-9 mRNA expression from the AMs not stimulated by CSM; Lane 3-7: MMP-9 mRNA expression from AMs respectively stimulated by 1%, 3%, 5%, 10% and 15% CSM. B: densitometric analysis of A. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs 0 CSM; $\Delta P < 0.05$ vs 1% CSM; # $P < 0.05$ vs 5% CSM.

图2 香烟提出物对被动吸烟大鼠肺泡巨噬细胞源性 MMP-9 mRNA 表达的影响

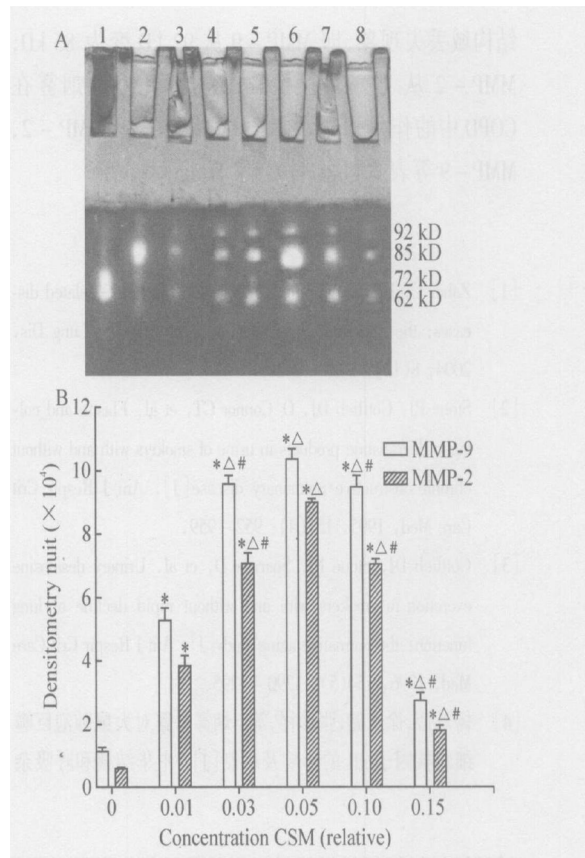


Fig 3 The effect of CSM on gelatinase activity from AM in the rats. A: gelatin zymogram showing MMP-9 activity in cultured AMs supernatants. Lane 1: MMP-2 (latent and active) control; Lane 2: MMP-9 (active) control; Lane 3: the group not stimulated by CSM; Lane 4-8: the groups respectively stimulated by 1%, 3%, 5%, 10% and 15% CSM. B: the densitometric analysis of 85 kD and 62 kD bands from gelatin zymogram in A. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs 0 CSM; $\Delta P < 0.05$ vs 1% CSM; # $P < 0.05$ vs 5% CSM.

图3 香烟提出物对被动吸烟大鼠肺泡巨噬细胞源性明胶酶活性的影响

MMPs 是一类与维持 ECM 的正常结构和生理功能密切相关的内切蛋白酶水解酶。生理状态下 MMPs 酶活性较低,且受组织金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 的抑制;但在血浆蛋白酶^[7]、TNFα^[8]、活性氧等多种物质刺激下,其表达和酶活性可异常增加,从而引起 ECM 损伤。Zheng 等^[9]研究发现 IL-13 诱导的 MMP-2、MMP-9、MMP-12、MMP-13 和 MMP-14 能使转基因鼠肺形成肺气肿。本研究也发现:未用 CSM 刺激前,MMP-2、MMP-9 mRNA 水平及酶活性均较低;当以 CSM 刺激后,MMP-2、MMP-9 mRNA 水平显著升高,以 MMP-9 更明显。明胶酶谱结果也表明:以 CSM 刺激后,MMP-2、MMP-9 酶活性显著升高,且活化的 MMP-9、MMP-2 均存在前肽

结构域丢失现象, 即 MMP-9 从 92 kD 变为 85 kD, MMP-2 从 72 kD 变为 62 kD。因此香烟烟雾在 COPD 中的作用可能与其诱导的肺组织 MMP-2、MMP-9 等表达和酶活性异常有关。

[参 考 文 献]

[1] Zaher C, Halbert R, Dubois R, et al. Smoking-related diseases: the importance of COPD[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8(12): 1423-1428.

[2] Stone PJ, Gottlieb DJ, O'Connor GT, et al. Elastin and collagen degradation products in urine of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151(4): 952-959.

[3] Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, et al. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the normative aging study[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(5): 1290-1295.

[4] 杨丹蕾, 徐永健, 张珍祥, 等. 烟雾暴露对大鼠肺泡巨噬细胞核因子 κ B 的影响及机制[J]. *中华结核和呼吸杂*

志, 2003, 26(11): 724-725.

[5] Wirtz HR, Schmidt M. Acute influence of cigarette smoke on secretion of pulmonary surfactant in rat alveolar type II cells in culture[J]. *Eur Respir J*, 1996, 9(1): 24-32.

[6] Peters TJ, Alberi A, Bevilacqua E, et al. Differentiation dependent expression of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in trophoblast cells[J]. *Cell Tissue Res*, 1999, 295(2): 287-296.

[7] Claire L, Myriam P, Jean-Marie Tournier, et al. uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 264(2): 326-336.

[8] 韩照升, 钟南山. 肿瘤坏死因子- α 、刀豆素 A 及机械损伤刺激人支气管上皮细胞系 H292 表达基质金属蛋白酶-9[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(7): 741-744.

[9] Zheng T, Zhu Z, Wang Z, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(9): 1081-1093.

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办, 安徽医科大学编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文, 辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获 2003、2005 年两届国家期刊奖百种重点期刊奖, 第 1、第 2 届全国国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖, 第 1、第 2、第 3 届中国科学技术协会优秀期刊二等奖, 第 1 届华东地区优秀期刊一等奖, 第 2 届华东地区最佳期刊奖。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项奖金资助。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊; 被北京大学图书馆主编《中文核心期刊要目总览》第 1、第 2 版及 2000 版, 2004 版均选定为药理学类核心期刊; 被国际核心期刊研究会确定为核心期刊; 被国家科委科技信息研究所确定为科技论文统计源期刊即中国科技核心期刊。

本刊已被国内几乎所有相关检索期刊及国际著名检索期刊 Chemical Abstract(美国)、《P Ж》(俄罗斯)、Biochemical Abstract(美国)、Index Medicus(美国)、EMBASE/Excerpta Medica(荷兰)、Kunst and Wissen(德国)、Centre for Agriculture and Biosciences international(CAB international, 英国)等收录利用。连续 9 年进入《CA 千种表》。

医师用药要懂药理, 药师药研人员要更懂药理。中国药理学通报, 医师药师都需要

本刊为月刊, 大 16 开 128 页, 彩色铜版纸印刷, 每期定价 15.00 元(零售: 20 元/期), 全年 180.00 元。邮发代号: 26-52, 请及时向当地邮局订阅, 漏订读者请直接汇款至本刊编辑部(零售价: 每期 20 元), 免收邮寄费。地址: 安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部, 邮编: 230032, 联系人: 吴慧、程西望、武明静。电话: 0551-5161221 5161222, 电子信箱: cpb@ahmu.edu.cn