DOI:10. 15972/j. cnki. 43-1509/r. 2019. 06. 017

·论著:临床医学。

结缔组织病相关肺间质病变肺组织中 TIMP-1 表达及其 TGF-β1/Smad3 途径调控作用分析

周海艳1,李静云2,殷松楼3*

(1. 徐州医科大学研究生学院风湿科,江苏 徐州 223000;2. 徐州医科大学附属沭阳医院风湿科, 江苏 徐州 223600;3. 徐州医科大学附属医院风湿免疫科,江苏 徐州 223000)

摘 要: 探讨结缔组织病相关肺间质病变肺组织中基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)-1 表达水平。收集结缔组织病相关肺间质病变患者行 CT 引导下经皮肺穿刺活检时的肺组织(观察组),以及无感染和吸烟史的肺癌患者远离癌症病灶的正常肺组织(对照组),行 TIMP-1 免疫荧光染色分析。原代培养人肺成纤维细胞,选用第 $10\sim15$ 代的细胞,以不同浓度 TGF- β 1 诱导24 h,以及终浓度为 $10~\mu$ g/L 的 TGF- β 1 诱导不同时间。实验结果表明,观察组肺组织中 TIMP-1 荧光强度明显高于对照组(P<0.05)。 TGF- β 1 浓度 $3.5.10.15~\mu$ g/L 作用于人肺成纤维细胞 24~h 后,TIMP-1 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于 $0~\mu$ g/L(P<0.05)。使用 $10~\mu$ g/L TGF- β 1 作用 24.48~h 时,TIMP-1 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于作用 0~h 时(P<0.05)。Smad3 真核过表达载体组 TIMP-1、P300 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于空质粒转染组、空白对照组(P<0.05)。实验证明,结缔组织病相关肺间质病变肺组织中 TIMP-1 表达明显提升,TGF- β 1 可通过 TGF- β 1/Smad3 信号通路上调 TIMP-1 表达,参与结缔组织病相关肺间质病变的发生与发展。

关键词: 结缔组织病; 肺间质病变; 人肺成纤维细胞; TIMP-1; TGF-β1 中图分类号: R593. 2 文献标识码: A

Expression of TIMP-1 in lung tissues of connective tissue disease-related pulmonary interstitial lesions and the role of related regulatory factors

ZHOU Haivan¹, LI Jingyun², YIN Songlou³*

(1. Department of Rheumatism, Graduate School of Xuzhou Medical University, Jiangsu 223000, Xuzhou, China; 2. Department of Rheumatism, Shuyang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Jiangsu 223000, Xuzhou, China; 3. Department of Rheumatism Immunology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu 223000, Xuzhou, China)

Abstract: To investigate the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) -1 and the role of related regulatory factors in lung tissue of connective tissue disease-related pulmonary interstitial lesions. The lung tissues of patients with connective tissue disease-related pulmonary interstitial lesions undergoing CT-guided percutaneous lung biopsy (observation group) and normal lung tissues (control group) of lung cancer patients with no history of infection and smoking were collected and analyzed by TIMP-1 immunofluorescence staining. Human lung fibroblasts were cultured in primary culture. The cells of the 10th to 15th generations were induced by different concentrations of TGF-β1 for 24 hours, and the final concentration of 10 μg/L was induced by TGF-β1 for different time. The results showed that the fluorescence intensity of TIMP-1 in the lung tissue of the observation group was significantly higher than that of the control group (P<0.05). The relative expression of TIMP-1 protein and TIMP-1 mRNA was significantly higher than that of 0 μg/L after the treatment of human lung fibroblasts with 3, 5, 10 and 15 μg/L of TGF-β1 for 24 hours (P<0.05). When treated with 10 μg/L TGF-β1 for 24 h and 48 h, the relative expression of TIMP-1 protein and TIMP-1 mRNA was significantly higher than that at 0 h (P<0.05). The TIMP-1, P300 and protein relative expressions of Smad3 eukaryotic overexpression vector group were significantly higher than that at 0 h (P<0.05).

收稿日期:2019-04-18;修回日期:2019-09-16

^{*}通信作者,E-mail:6454654598@gq.com.

nificantly higher than those in blank plasmid transfection group and blank control group (P<0.05). So The expression of TIMP-1 in lung tissues of connective tissue disease-related pulmonary interstitial lesions is significantly increased, and the expression of TIMP-1 can be up-regulated by TGF- β 1, Smad3 participate in the occurrence and development of connective tissue disease-related pulmonary interstitial lesions through the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway.

 $\textbf{Key words:} \quad \text{connective tissue disease;} \quad \text{pulmonary interstitial disease;} \quad \text{human lung fibroblasts;} \quad \text{TIMP-1;} \\ \text{TGF-}\beta 1$

结缔组织病相关肺间质病变主要由自身免疫 异常所致[1],病理过程为:炎性细胞弥漫性浸润,间 质细胞及胞外基质成分在肺间质大量沉积,损伤肺 泡及毛细血管,肺间质组织反复的修复及损伤导致 肺结构重塑,引发肺纤维化[2]。虽然对结缔组织病 相关肺间质病变发病机制的认知不断深入,但间质 性肺疾病仍是临床中的难治病,尚无特效疗法[3]。 相关研究显示,基质金属蛋白酶(MMPs)及多种细 胞因子参与了肺间纤维化的病理过程[4]:基质金属 蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)是 MMPs 的特异性抑 制剂,在基质降解调节中发挥重要平衡作用[5]:其 中 TIMP-1 广泛分布于体液及多个组织中,多种细 胞因子均可诱导分泌,但 TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4 具有很强的特异性^[6]。转化生长因子(TGF)-β1 是 目前研究最广泛的致纤维化细胞因子,可通过经典 TGF- β 1/Smad3 信号通路发挥促纤维化效应^[7]; Smad33 与 P300 结合在 TGF-B1/Smad3 信号通路活 化的重要步骤之一[8]。本研究分析了结缔组织病 相关肺间质病变肺组织中 TIMP-1 表达水平,并进 一步探讨 TIMP-1 与 TGF-β1 之间的关系,以及 TIMP-1 在结缔组织病相关肺间质病变中作用的分 子机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2016 年 10 月至 2018 年 10 月间本院收治的结缔组织病相关肺间质病变患者 74 例为观察组,均行 CT 引导下经皮肺穿刺活检,其中男性 16 例,女性 58 例;年龄 35 ~ 63 岁,平均年龄(48.40±3.94)岁。另取 40 例无感染和吸烟史的肺癌患者远离癌症病灶的正常肺组织为对照组,其中男性 11 例,女性 29 例;年龄 38 ~ 65 岁,平均年龄(50.21±5.80)岁。两组患者性别、年龄间差异无统计学意义(P>0.05)。本研究经当地伦理委员会批准,参检患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

胎牛血清、DMEM 培养基购于上海素尔生物科

技有限公司;人重组 TGF-β1 细胞因子购于美国 PeproTech 公司;鼠抗人 TIMP-1 单克隆抗体、兔抗人 P300 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购于迈威(上海)生物科技有限公司;PCD-NA3.1(+)/Smad3 真核过表达载体由上海生工生物工程技术服务有限公司构建合成。

1.3 方法

1.3.1 肺组织中TIMP-1 表达的免疫荧光检测 取两组患者的新鲜肺组织放入 EP 管中,加入液氮,-80 ℃保存待用。切片前将切片机提前预冷,取出肺组织后用 OCT 冰冻切片包埋剂包埋,0.3 μm 连续切片,丙酮固定后,-80 ℃保存待用。检测前取出切片,磷酸缓冲液洗涤后,使用 0.5% 细胞通透剂室温下反应 30 min,加入 5% BSA 封闭液室温下静置 30 min,滴加鼠抗人 TIMP-1 单克隆抗体(1:500),4 ℃过夜,次日滴加 HRP 标记的山羊抗鼠的 IgG (1:2000),室温下避光反应 2 h,封片后在共聚焦荧光显微镜下观察拍照,测定 450 nm 波长处的荧光强度。

1.3.2 人肺成纤维细胞分离与培养 取对照组正 常肺组织,放入75%乙醇溶液中浸泡3~4s,转入 含磷酸缓冲液的平皿中,使用无菌手术剪剪成直径 为 1 mm 的正方体小块,将组织块转入 6 孔板中,每 孔放入5~6块,加入含10%胎牛血清的 DMEM 培 养基至浸没组织块,放入37 ℃ 10% CO。培养箱,当 细胞从组织块周围爬出形成细胞岛时弃去组织块: 4~5天更换一次细胞培养液,当细胞完全覆盖6孔 板后进行消化传代,取第10~15代的细胞用于实验。 1.3.3 TGF-β1 刺激后人肺成纤维细胞中 TIMP-1 mRNA 表达的 RT-PCR 检测 取第 10~15 代的人 肺成纤维细胞,按6×105/孔的密切加入6孔板中, 继续培养48~72 h,观察细胞铺满80%以上培养孔 板底后,加入含不同浓度 TGF-β1(0、1、3、5、10、15 μg/L)的无胎牛血清 DMEM 培养基继续培养 24 h; 或加入 10 μg/L TGF-β1 的无胎牛血清 DMEM 培养 基分别培养 0、12、24、48 h。 Trizol 法提取人肺成纤 维细胞总 RNA, 逆转录得到 cDNA。TIMP-1、 GAPDH 引物序列由上海启因生物科技有限公司设 计合成。TIMP-1 上游 5'-GTCACT TCCACCACTTC G-3',下游 5'-GTAGTCGGCACAGATAAGG-3'; 内参 GAPDH 上游 5'-TCTGCCGTCCAGTCCAGGTG-3',下游 5'-TGTCGCTGTG GGTGAGGA GG-3'。反应条件: 95 $^{\circ}$ 10 min,95 $^{\circ}$ 30 s,56 $^{\circ}$ 30 s,共 40 个循环,延伸 72 $^{\circ}$ 20 s。扩增产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,计算 TIMP-1 mRNA 的相对表达量。

1.3.4 TGF-β1 刺激后人肺成纤维细胞中 TIMP-1 蛋白表达的 Western blot 检测 人肺成纤维细胞铺板、计数、TGF-β1 刺激同 RT-PCR 实验。细胞中加入全蛋白提取液,离心收集上清,BCA 蛋白定量,收集目标蛋白,行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜至 PVDF,5%脱脂奶粉封闭 2 h,滴加鼠抗人 TIMP-1 单克隆抗体 (1:1000),最抗人 GAPDH 单克隆抗体 (1:1000),4 ℃过夜,次日滴加 HRP 标记的山羊抗鼠的 IgG(1:2000),室温静置 2 h, ECL 显色,暗室中显影、采集图像并分析各条带灰度值。

1.3.5 Smad3 过表达对细胞 TIMP-1、P300 mRNA 和蛋白检测 取第 10~15 代的人肺成纤维细胞,分别使用 PCDNA3.1(+)/Smad3 真核过表达载体、空质粒载体转染细胞,同时设置空白对照组,转染 24 h后收集细胞。RT-PCR 和 Western blot 检测细胞中TIMP-1、P300 mRNA 和蛋白表达水平。

1.4 统计学分析

本实验数据以均数±标准差表示,进行 t 检验,使用 SPSS23.0 分析.以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TIMP-1 在两组肺组织中荧光表达比较

共聚焦荧光显微镜下观察显示, TIMP-1 为绿色 荧光表达于肺组织间质, 观察组荧光强度为(6.95±0.80) A. U, 明显高于对照组的(1.82±0.37) A. U(P<0.05)。见图 1。

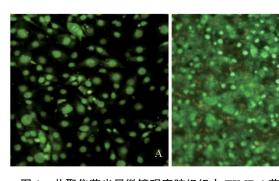


图 1 共聚焦荧光显微镜观察肺组织中 TIMP-1 荧光表达 (n=6,200×) A: 对照组;B: 观察组

2.2 不同浓度 TGF-β1 对人肺成纤维细胞 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响

TGF-β1 浓度 3、5、10、15 μg/L 作用于人肺成纤维细胞 24 h 后, TIMP-1 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于 0 μg/L(P<0.05); TGF-β1 浓度 1μg/L 作用于人肺成纤维细胞 24 h 后, TIMP-1 mRNA 和蛋白相对表达量与 0 μg/L 相比差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1,图 2,图 3。

表 1 不同浓度 TGF-β1 对人肺成纤维细胞 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响

TGF-β1 浓度 (μg/L)	TIMP-1mRNA	TIMP-1 蛋白
0	3. 94±0. 27	2. 55±0. 21
1	4. 21±0. 34	2. 84±0. 28
3	7. 02±0. 40 ^a	5. 71 ±0. 40 ^a
5	8. 39±0. 54 ^a	6. 25±0. 32 ^a
10	9. 16±0. 62 ^a	7. 60±0. 45 ^a
15	9. 50±0. 67 ^a	7. 82±0. 49 ^a

与 TGF-β1 浓度 0 μg/L 比较, ^aP<0.05(n=6)

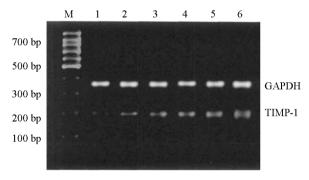


图 2 不同浓度 TGF-β1 对人肺成纤维细胞 TIMP-1 mRNA 表达的影响(n=6)

注:1~6分别为 TGF-β1 浓度 0、1、3、5、10、15 μg/L

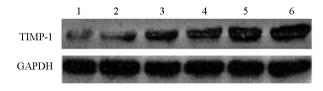


图 3 不同浓度 TGF-β1 对人肺成纤维细胞 TIMP-1 蛋白表达的影响(n=6)

注:1~6分别为 TGF-β1 浓度 0、1、3、5、10、15 μg/L

2.3 TGF-β1 不同作用时间对人肺成纤维细胞 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响

使用 10 μg/L TGF- β 1 作用 24、48 h 时,TIMP-1 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于作用 0 h 时(P< 0.05);使用 10 μg/L TGF- β 1 作用 12 h 时 TIMP-1

mRNA 和蛋白相对表达量与作用 0 h 时差异无统计 学意义(*P*>0.05)。见表 2,图 4。

表 2 TGF-β1 不同作用时间对人肺成纤维细胞 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响

时间(h)	TIMP-1mRNA	TIMP-1 蛋白
0	5.87±0.33	4. 70±0. 26
12	6. 62 ± 0.38	5.56 ± 0.30
24	8. 40±0. 51 ^a	7. 89 ± 0.43^{a}
48	8. 74±0. 56 ^a	8. 15±0. 49 ^a

与 TGF-β1 作用 0 h 比较, a P<0.05(n=6)

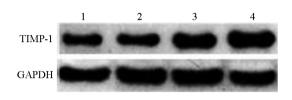


图 4 TGF-βI 不同作用时间对人肺成纤维细胞 TIMP-1 蛋白表达的影响(n=6)

注:1~4分别为10 μg/L TGF-β1作用0、12、24、48 h

2.4 Smad3 过表达对人肺成纤维细胞 TIMP-1、 P300 mRNA 和蛋白表达的影响

Smad3 真核过表达载体组 TIMP-1、P300 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于空质粒转染组、空白对照组(P<0.05);空质粒转染组、空白对照组 TIMP-1、P300 mRNA 和蛋白相对表达量之间差异无统计学意义(P>0.05)。见表 3,图 5。

表 3 TIMP-1 表达对人肺成纤维细胞 Smad3、P300 mRNA 和蛋白表达的影响

组别	TIMP-1		P300	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
Smad3 真核过 表达载体组	6. 18±0. 62 ^{ab}	6. 50±0. 25 ^{ab}	5. 53±0. 60 ^{ab}	5. 14±0. 58 ^{ab}
空质粒转染组	4. 20±0. 18	4.83±0.40	3. 08±0. 51	2. 46±0. 25
空白对照组	4. 33±0. 21	4. 95±0. 35	3. 14±0. 49	2. 55±0. 31

与空质粒转染组比较, $^{a}P<0.05$;与空白对照组比较, $^{b}P<0.05(n=6)$

3 讨 论

研究者发现,MMPs与肺间质纤维明显相关^[9]。基础研究显示,大鼠矽肺模型中早期 MMP-9、MMP-13、TIMP-1等表达明显提升,晚期仅存在 TIMP-1表达升高^[10]。TIMPs是 MMPS的特异性抑制因子,可降低基质溶解活性,引发胶原沉积,导致肺间质纤维化的发生^[11];但在结缔组织病种的研究较少。本

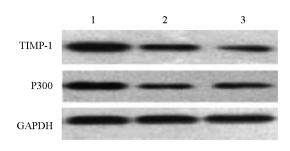


图 5 各组人肺成纤维细胞 TIMP-1、 P300 蛋白表达水平(n=6)

注:1 Smad3 真核过表达载体组;2 空质粒转染组;3 空白对照组

研究中,TIMP-1 表达于肺组织间质,结缔组织病相关肺间质病变肺组织中 TIMP-1 表达水平明显高于正常肺组织。提示 TIMP-1 表达与结缔组织病相关肺间质病变相关,有可能成为治疗的潜在靶点,下调 TIMP-1 表达可能抑制结缔组织病相关肺间质病变。

TGF-B 是胶原合成最有效的促进剂,可有效促 进细胞外基质的合成与沉积,在成纤维细胞增殖中 也发挥重要调控作用[12]。相关研究显示,以纤维化 病变为主的结缔组织病相关肺间质病变患者外周 血单核细胞中 TGF-β mRNA 表达水平较正常对照 组明显升高[13]: TGF-β1 是 TGF-β 中活性最强、所占 比例最高的亚型[14]:为探究 TGF-β1 与 TIMP-1 表 达的关系,本研究在体外原代培养人肺成纤维细 胞,使用不同浓度的 TGF-β1 进行刺激,通过 RT-PCR 和 Western blot 法检测细胞中 TIMP-1 mRNA 和蛋白的表达水平,结果显示,随着 TGF-81 浓度增 加,人肺成纤维细胞中 TIMP-1 mRNA 和蛋白的表达 水平明显升高;进一步分析 TGF-β1 作用不同时间 对细胞中 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响显示, 随 着 TGF-β1 作用时间的延长,人肺成纤维细胞中 TIMP-1 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高。上述 结果表明, TGF-β1 可上调 TIMP-1 表达, 是 TIMP-1 的正向调节剂,能够促进结缔组织病相关肺间质病 变的发生与发展。

相关研究显示, TGF-β1/Smad3 信号通路在肺纤维化进展中发挥重要调控作用^[15], 其中 Smad3 复合物与 SBE 序列结合、Smad3 活化与聚集均于双重效应的 P300 有关^[16]。在肺成纤维细胞中加入 TGF-β1 刺激后 Smad3、P300 表达水平明显提升, Smad3 与 P300 的结合也明显增加, TGF-β1/Smad3 信号通路被激活,促进肺纤维化的发展^[17]。本研究中 Smad3 真核过表达质粒转染后人肺成纤维细胞高表达 P300,提示 TGF-β1/Smad3 信号通路被激

活;且 TGF-β1/Smad3 真核过表达载体组 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达水平明显高于空质粒转染组、空白对照组,提示 TIMP-1 可能通过 TGF-β1/Smad3 信号通路参与结缔组织病相关肺间质病变的发生与发展。

参考文献:

- [1] 张继云,穆清爽,赵旌,等. 结缔组织病相关肺间质病变患者血清和支气管肺泡灌洗液生物学标志物的表达及其临床意义 [J].广西医学,2017,39(12):1773-6.
- [2] 金环,王友莲. 系统性硬化症并发肺间质病变发病机制与诊断研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版),2017,57(6):88-93.
- [3] 苏暄. 结缔组织病相关肺间质纤维化临床诊治的"协和经验"-中华医学会风湿病学分会副主任委员、北京协和医院张烜教授谈 CTD-ILD 最新诊疗进展[J]. 中国医药科学,2017,7(17): 1-4.
- [4] 徐锦荣,丛斌,李淑瑾,等. CCK-8 对 TNF-α 诱导大鼠 RSC-364 细胞 MMPs/ TIMP-1 的影响[J]. 中国药理学通报,2017,33 (4):567-71.
- [5] 孙忻,高粹,黄警,等. 肺间质病患者血清抗中性粒细胞胞质抗体阳性的临床意义及研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019,42(7):526-529.
- [6] MYUNGHEE K, SEUNG H, MEE R. Cytologic features of pulmonary langerhans cell histiocytosis in bronchial washing: a report of two cases[J]. J Cytology, 2019, 36(2): 131-2.
- [7] JOSH CH, JAMES WF, JEFF H, et al. Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy [J]. The American J Forensic Medicine and Pathology, 2018, 39(1):56-60.
- [8] PADMANABHAN A, AZHARUL H, RAHUL R. Incidentally detected lung lesions in a patient with crohn's disease [J]. Lung

- India, 2018, 35(1):82-4.
- [9] 高娟,王添印,韩茹,等. MMP-9、TIMP-1 在肺纤维化中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(26):104-6.
- [10] PRASHANT K. Radiological evaluation of interstitial lung disease [J]. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2011, 17 (5): 337-45.
- [11] 陈珂,许君望,周琦,等. 全反式维甲酸对 TGF-β1 刺激的肝星 状细胞 COLlα2、MMP-2、TIMP-1 以及信号通路的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版),2017,38 (6):857-61.
- [12] 万爱妮,徐栋生,蔡燕飞,等. 人胰岛素样生长因子-1 的体外 抗肝纤维化活性[J]. 中国药科大学学报,2017,48(4): 476-82.
- [13] PRASAD MP, ERIC AJ, JAMES FG, et al. Cystic pulmonary parenchymal disorders: expanding differential considerations[J]. Clinical Pulmonary Medicine, 2014, 21(6): 290-3.
- [14] HAN T, LIU YM, YANG T, et al. A novel case of pulmonary nocardiosis with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Chinese Medical J,2017,130(17): 2128-9.
- [15] 屈艳,张崇,贾岩龙,等. 大黄酸通过抑制 miR-21 而干预 TGFβ1/Smad3 通路并减轻博莱霉素所致大鼠肺纤维化[J]. 中国 病理生理杂志,2017,33(1):149-53.
- [16] 代炼,王左,张珂. CTD-ILD 患者血清中 SP-D、抗 MDA5 抗体、IL-6及 TNF-α 的变化及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2019,40(8):999-1003.
- [17] 代文静,李万成. Smurf2 与肺纤维化关系研究进展[J]. 海南 医学,2017,28(24): 4053-5.
- [18] DOMINIQUE V, HILARIO N, BERN JF. Advanced pulmonary sarcoidosis[J]. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2014, 20(5):488-95.

(本文编辑:蒋湘莲)