

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.36.002

TGF- β 1 对小鼠子宫内膜基质细胞 MMP-9 表达的影响*

高红艳^{1,2}, 陈继明¹, 刘芳³, 何援利^{2 Δ}

(1. 苏州大学附属第三医院妇产科, 江苏常州 213003; 2. 南方医科大学附属珠江医院妇产科, 广州 510280;
3. 石河子大学附属第一医院妇产科, 新疆石河子 832008)

[摘要] 目的 探讨转化生长因子- β 1(TGF- β 1)对小鼠子宫内膜基质细胞基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。方法 分离和纯化小鼠子宫内膜基质细胞,在此细胞培养体系中加入不同浓度的 TGF- β 1,终浓度为 0.1、2.5、5.0、10.0、20.0 ng/mL,培养 48 h 后通过 ELISA 法检测培养液中 MMP-9 的含量。结果 与对照组比较,实验组随 TGF- β 1 浓度的增加,小鼠子宫内膜基质细胞 MMP-9 表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 小鼠子宫内膜基质细胞体系中,TGF- β 1 可能通过调控 MMP-9 的表达,参与调节细胞外基质代谢。

[关键词] 子宫内膜;基质细胞;转化生长因子- β 1;基质金属蛋白酶-9;细胞外基质;宫腔粘连

[中图分类号] R711.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)36-5054-03

Effect of TGF- β 1 on the expression of MMP-9 in mouse endometrial stromal cells*

Gao Hongyan^{1,2}, Chen Jiming¹, Liu Fang³, He Yuanli^{2 Δ}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou, Jiangsu 213003, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) on the expression of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in cultured mouse endometrial stromal cells. **Methods** After separation and purification, the mouse endometrial stromal cells were cultured with different concentrations of TGF- β 1, and the final concentrations were 0.1, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 ng/mL, respectively. ELISA method was used to detect the content of MMP-9 in the culture medium after 48 h culture. **Results** Compared with the control group, the expression of MMP-9 in mouse endometrial stromal cells in the experimental groups increased with the TGF- β 1 concentration elevation, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** In the mouse endometrial stromal cell system, TGF- β 1 may be involved in the regulation of extracellular matrix metabolism through regulating the expression of MMP-9.

[Key words] endometrial; stromal cells; transforming growth factor- β 1; matrix metalloproteinase-9; extracellular matrix; intrauterine adhesions

宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)是指各种原因导致子宫内膜受损伤后出现瘢痕纤维化病变^[1]。正常的子宫内膜由单层柱状上皮和固有层组成。其中,主要由子宫内膜腺上皮细胞(endometrial epithelial cell, EEC)构成柱状上皮,该类细胞具有分泌功能;另有子宫内膜基质细胞(endometrial stromal cell, ESC),属于成纤维细胞^[2],主要构成固有层的结缔组织细胞。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一类具有多种功能的多肽类生长因子,对细胞外基质的合成有重要调节作用,在组织的纤维化过程中起重要作用^[3]。目前,大量的研究已经证实,基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是维持细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢平衡的关键蛋白酶类,而转化生长因子- β 1(TGF- β 1)与 MMP-9 二者之间在表达和活性上存在相互调节与影响^[4-10]。本研究以 ESC 为研究对象,观察外源性不同浓度的 TGF- β 1 对小鼠 ESC 中 MMP-9 表达的影响,以初步探讨 TGF- β 1 及 MMP-9 在宫腔粘连发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 性成熟清洁级 6 周龄的雌性中国昆明种

(KM)小白鼠 5 只(上海斯莱克实验动物有限公司提供),体质量 25~30 g。

1.2 实验试剂 MOUSE MMP-9 ELISA kit(USCN, SEA553 Mu, lot # L140508159), DMEM/F12 培养基(GIBCO 公司), SP 免疫组织化学染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司), DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司), Vimentin(波形蛋白) antibody(Santa 公司, sc-32322), Pan-cytokeratin(角蛋白) antibody(sc-8018)。

1.3 实验仪器 二氧化碳培养箱(3111 型, Thermo 公司), 倒置相差荧光显微镜(EcellSens19, OLYMPUS 公司), 台式低速离心机[80-2 型, 上海医疗器械(集团)有限公司], 电热恒温培养箱(DRP-9082 型, 上海森信实验仪器有限公司), 微量加样器(Thermo 公司), 涡旋振荡仪(QL-861 型, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 台式高速冷冻离心机(H1650R, 上海卢湘仪), 酶标仪(SPECTRA max Plus384, Molecular Devices 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠 ESC 的分离与培养 小鼠处死后, 无菌操作取出 Y 型子宫, PBS 液冲洗 2 遍, 去除脂肪和黏液, 尽量剪碎至糊

状,转移至离心管,0.125%胰酶,37℃、放入5%CO₂培养箱中消化5~10 min。1 000 r/min离心3 min,弃上清液。再向组织沉淀中加入0.8 mg/mL的I型胶原酶(体积比1:5),37℃、再放入5%CO₂培养箱中消化约90 min,每15 min振荡离心管1次。反复吹打消化悬液,静置,小心吸取细胞悬液,200目及400目筛网过滤2次。滤液1 000 r/min离心8 min,此时沉淀主要为基质细胞和红细胞。以10%FBS-DMEM/F12培养基重悬细胞,接种,0.25%胰酶传代消化,传至P3代,行免疫组织化学法鉴定。

1.4.2 ESC表型纯度免疫组织化学鉴定 细胞爬片培养后,用4%甲醛固定15 min,加入鼠抗人波形蛋白单抗和细胞角蛋白单抗(PBS代替一抗作空白对照),4℃过夜,加入经生物素标记的二抗,具体操作按说明书进行,DAB显色,苏木精复染,光学显微镜下观察。以细胞质棕黄染色为阳性结果,细胞质未着色为阴性结果。

1.4.3 不同剂量TGF-β1作用组样本制备 第3代小鼠ESC贴壁生长至80%~90%融合时,用0.125%胰蛋白酶消化,用含5%胎牛血清的DMEM高糖培养液制备细胞悬液,细胞计数调整浓度至 2.5×10^4 ng/mL,每孔200 μL,按每孔 5×10^3 个细胞,接种在96孔板中,培养板的四边孔只加培养基,而不作为指标检测孔;在37℃、CO₂培养箱中培养,24 h后换无胎牛血清DMEM培养液,继续孵育24 h,使细胞同步化,进入静止生长期。弃无胎牛血清培养液,分别加入含0、0.1、2.5、5.0、10.0、20.0 ng/mL TGF-β1的5%胎牛血清DMEM高糖培养液,每组设5个复孔,对照组只加入含5%胎牛血清的DMEM高糖培养液,每孔200 μL,培养48 h。

1.4.4 ELISA法检测MMP-9 离心取上清液,以ELISA法检测不同浓度的TGF-β1对ESC分泌的MMP-9表达的影响。

1.5 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠ESC形态学观察 倒置相差显微镜下ESC散在单个分布。基质细胞主要为圆形或不规则多角形状,大小不相同,细胞胞质稀薄,且呈透明状,胞质之间突起,延伸并相互连接一起,细胞核居中,圆形,外观呈伸展、挺直,形态似成纤维细胞,将细胞平铺生长后,传代多次,细胞体积渐渐增大,细胞外形伸长成梭形,胞质丰富,胞核变为椭圆形,相互之间平行排列,可见少量梭状的基质细胞。在ESC基质细胞中,波形蛋白染色呈阳性表达,棕色颗粒充满细胞质,而角蛋白染色表现为阴性,本组ESC纯度高达95%以上。

2.2 小鼠ESC分离鉴定结果 采用免疫组织化学法检测细胞,角蛋白染色阴性;波形蛋白染色阳性,并且细胞染色阳性率大于95%。结果表明该细胞为ESC。DAB显色,苏木素复染。显微镜下观察,随机取10个视野($\times 200$ 倍),计算波形蛋白着色细胞即基质细胞比例,超过95%基质细胞的细胞质区域存在波形蛋白强阳性表达,大部分细胞不表达角蛋白。小鼠ESC呈现梭形和多角形,培养至第5代基本停止增长。

2.3 TGF-β1对小鼠ESC中MMP-9的影响 TGF-β1加入ESC中培养48 h后,TGF-β1 0.1 ng/mL组中MMP-9含量与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但呈上升趋势,其余组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),呈现浓度正相关趋势,5.0、10.0、20.0 ng/mL组间比较差异无统计学意义($P < 0.05$)。TGF-β1与MMP-9的表达呈正相关($r = 0.876, P < 0.01$),见表1。

表1 不同浓度TGF-β1与MMP-9表达水平($\bar{x} \pm s, n = 5$)

TGF-β1浓度(ng/mL)	MMP-9
0	1.647 1 ± 0.084 2
0.1	2.600 0 ± 0.093 2
2.5	7.901 2 ± 1.629 2*▼
5.0	9.244 0 ± 1.227 4*▼△
10.0	9.865 3 ± 0.416 0*▼△
20.0	9.247 6 ± 1.628 0*▼△

*: $P < 0.05$,与0 ng/mL组比较;▼: $P < 0.05$,与0.1 ng/mL组比较;△: $P < 0.05$,与2.5 ng/mL组比较。

3 讨 论

IUA属于纤维化病变的一种,是子宫内膜受到创伤(如手术、放射性因素)后,出现了瘢痕纤维化改变。子宫内膜主要由2种细胞构成,即基质细胞和腺上皮细胞,其中前者属于成纤维细胞。因此,能否成功在体外建立ESC培养体系模型,然后进行实验分析,是临床基础研究ESC的生理功能及细胞间的相互作用的应答机制的关键。目前,国内已有许多有关人ESC分离培养及蜕膜化的诱导方法,但是人子宫标本往往存在取材困难及容易污染等问题^[11-12]。因此,分离培养小鼠ESC,并通过研究小鼠ESC上TGF-β1对MMP-9表达的影响,可为探讨TGF-β1参与调节细胞外基质代谢的可能机制与途径进一步研究IUA的发病机制,奠定动物模型的理论基础。

相关研究证明^[13],TGF-β是最强的致纤维化因子,也是增加ECM的重要细胞因子。在组织的纤维化过程中TGF-β起着关键作用,能明显促进ECM的产生,刺激间质细胞生长,增加胶原蛋白和纤维连接蛋白含量,在机体不同器官纤维化形成中发挥关键的促进作用。目前,已发现哺乳动物TGF-β有3种异构体,即TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3,功能以及结构相似,以TGF-β1活性最强^[13]。MMP-9是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族成员之一。MMP-9是调节蛋白水解活动的关键酶,能对多种蛋白起着降解作用,它的底物包括明胶、弹性蛋白、IV型胶原、V型胶原和黏结蛋白等。MMP-9能有效水解ECM中多种成分,在组织塑形过程中影响着ECM的代谢、新生血管的形成等^[14]。研究证实^[14-16],IUA的形成与TGF-β1及MMP-9关系密切,但是,TGF-β1及MMP-9在IUA中发挥怎样的作用,以及他们之间如何相互作用、相互调控,目前争议较多。

本研究采用浓度为0.1、2.5、5.0、10.0、20.0 ng/mL的TGF-β1作用于小鼠ESC,分别作用48 h后以ELISA法检测培养液中MMP-9的含量。结果表明,小鼠ESC对TGF-β1有较好的反应,TGF-β1浓度升高后,MMP-9的表达也逐渐增加。TGF-β1生物学活性广泛,作为一种不同细胞合成分泌的多功能肽,能促进或抑制细胞的增殖与分化,它有自分泌或旁分泌2种方式。大量研究证实,TGF-β1对不同组织细胞的调节控制作用不完全相同。在人表皮成纤维细胞中加入TGF-β1可刺激MMP-9的表达,而TGF-β1对人羊膜细胞MMP-9的表达则具有抑制作用。Martin等^[17]实验表明,人肾小球上皮细胞中,TGF-β1体外同时上调了MMP-2及MMP-9的表达。Kim等^[18]在研究子宫内膜癌、子宫肌瘤等疾病过程中发现,TGF-β对ESC分泌MMP-9的调节作用也是不同的。Kamakar等^[19]实验表明,TGF-β1能降调MMP-9的表达,抑制MMP-9的生物学活性。动物实验发现,TGF-β1能增加小鼠MMP-9 mRNA及proMMP-9的表达,并能诱导体外培养的牛ESC产生MMP-9^[20]。本研究发现,随着TGF-β1浓度的逐渐升高,小鼠ESC分泌MMP-9升高,呈剂量依赖性。该结果与

相关研究结果相类似。

此外,在不同情况及不同阶段,TGF- β 1 在同种细胞上表现的作用也可能是双重的。例如,恶性肿瘤早期,TGF- β 1 主要表现为抑制效应;随着肿瘤的进展,TGF- β 1 逐渐演变为正性介质,即促进作用。体外实验表明^[19],TGF- β 1 可通过抑制 MMP-9 的表达与活性,从而缓解滋养细胞的过度侵袭与浸润。即对于正常的滋养细胞,TGF- β 1 起着下调 MMP-9 的表达作用;但对于绒毛膜 JAR 细胞系,一定浓度范围内,MMP-9 表达会随着 TGF- β 1 浓度的增加而逐渐增高^[21]。由此可见,TGF- β 1 对细胞 MMP-9 表达调控作用与细胞的功能状态及疾病的病理生理阶段密切相关。本实验的研究对象为小鼠正常 ESC 细胞系,推测此时 ESC 细胞尚未进入纤维化发生与发展的阶段,TGF- β 1 作为纤维化促进因子,原本对 MMP-9 分泌的抑制作用在正常 ESC 细胞中主要表现为促进作用,促进 MMP-9 的表达,导致 ECM 的溶解,使去纤维化与纤维化作用处于平衡状态。TGF- β 1 对 MMP-9 的这种双重的调控作用对于机体来说,是一种很好的保护机制。而一旦这种调控平衡被打破,纤维化的发生不可避免时,具有多种生物活性及双重调控效应的 TGF- β 1 可能改变对 ESC 的调控机制,抑制 MMP-9 的表达,从而导致 IUA 等纤维化疾病的发生与发展。

IUA 的产生与发展是一个相当复杂的过程,其发病机制尚未完全清楚。但多项研究已经证实,MMP-9 的表达及功能与 IUA 的产生及发展关系密切。综合本实验研究结果,可以初步认为,TGF- β 1 和 MMP-9 是调节 ESC 纤维化平衡状态的重要因子,TGF- β 1 可能通过调控体外培养的 ESC 中 MMP-9 的分泌与表达从而影响 IUA 的发生与发展,参与调节细胞外基质的代谢,而且这种调控作用可能具有双重性。TGF- β 1 对 MMP-9 调控作用的发挥与细胞的功能状态及疾病的病理、生理阶段密切相关,具体作用机制尚未完全明确,需进一步研究探索。

参考文献

- [1] Panayotidis C, Weyers S, Bosteels J, et al. Intrauterine adhesions (IUA): has there been progress in understanding and treatment over the last 20 years[J]. *Gynecol Surg*, 2009, 6(3): 197-211.
- [2] Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells[J]. *Bio Reprod*, 2004, 70(6): 1738-1750.
- [3] Meola J, Rosae Silva JC, Dentillo DB, et al. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(6): 1750-1773.
- [4] Kobayashi T, Kim H, Liu X, et al. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels[J]. 2014, 306(11): L1006-1015.
- [5] Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis[J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(15): 1349-1365.
- [6] Zhao H, Dong Y, Tian X, et al. Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases [J]. *World J Nephrol*, 2013, 2(3): 84-89.
- [7] Zhou Y, Hagood JS, Lu B, et al. Thy-1-integrin alphav beta5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor-beta1 activation and myofibroblast differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29): 22382-22393.
- [8] Tatler AL, Jenkins G. TGF-beta activation and lung fibrosis[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, 9(3): 130-136.
- [9] Perng DW, Chang KT, Su KC, et al. Matrix metalloproteinase-9 induces transforming growth factor beta(1) production in airway epithelium via activation of epidermal growth factor receptors[J]. *Life Sci*, 2011, 89(5/6): 204-212.
- [10] Wang Y, Xu F, Chen J, et al. Matrix metalloproteinase-9 induces cardiac fibroblast migration, collagen and cytokine secretion; inhibition by salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Phytomedicine*, 2011, 19(1): 13-19.
- [11] 刘永巧, 任亮, 周雯慧, 等. 人早孕期蜕膜基质细胞及蜕膜腺上皮细胞的分离培养方法[J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2012, 33(2): 195-198.
- [12] 陆品红, 刘嘉茵. 人子宫内膜基质细胞及腺上皮细胞的分离纯化和体外培养[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2005, 25(5): 334-336.
- [13] Pardali E, Ten Dijke P. TGF- β signaling and cardiovascular diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 195-213.
- [14] 李敏, 王嵩明. 宫腔粘连的研究进展[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(8): 1267-1270.
- [15] 成九梅, 段华, 夏恩兰. 宫腔粘连患者子宫内膜基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的研究[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(18): 2574-2575.
- [16] Yu D, Wong YM, Cheong Y, et al. Asherman syndrome— one century later[J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(4): 759-779.
- [17] Martin J, Steadman R, Knowlden J, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human glomerular epithelial cells in vitro[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9(9): 1629-1637.
- [18] Kim JH, Hong SH, Nah HY, et al. Influence of transforming growth factor-alpha on expression of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and epidermal growth factor receptor in the mouse blastocysts[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2002, 19(5): 232-239.
- [19] Kamakar S, Das C. Regulation of trophoblast invasion by IL- β 1 and TGF β 1 [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2002, 48(4): 210-219.
- [20] Yabushita H, Narumiya H, Hiratake K, et al. The association of transforming growth factor-beta 1 with myometrial invasion of endometrial carcinomas through effects on matrix metalloproteinase[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2000, 26(3): 163-170.
- [21] 符爱珍, 蔡永广, 李英勇, 等. TGF- β 1 对人早孕细胞滋养层细胞和绒毛膜癌 JAR 细胞明胶酶 mRNA 表达的影响和意义[J]. *肿瘤*, 2007, 27(9): 698-701.