

MMP-1、TIMP-1 及 TGF- β 1 在风湿性心脏病瓣膜组织中的表达及意义*

余毅¹, 李增棋¹, 陈昆¹, 占平¹, 廖剑¹, 阮琴韵²

1. 福建医科大学附属第一医院 心脏外科 (福州 350004); 2. 福建医科大学附属第一医院 超声科 (福州 350004)

【摘要】 目的 探讨基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)在风湿性心脏病(RHD)瓣膜组织中的表达及意义。**方法** 采用 Western blot 及 RT-PCR 法检测 RHD 瓣膜组织(实验组, $n=30$)及无 RHD 瓣膜组织(对照组, $n=15$)中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF- β 1 蛋白与 mRNA 的表达, 碱水解法检测胶原代谢情况, Masson 法进行胶原纤维染色并检测胶原容积分数(CVF)。分析 MMP-1、TIMP-1 及 TGF- β 1 与 CVF 的相关性。**结果** MMP-1 及 TGF- β 1 蛋白和 mRNA 在实验组中的表达高于对照组, 而 TIMP-1 蛋白和 mRNA 在实验组中的表达低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组胶原含量及 CVF 均高于对照组($P<0.05$)。相关性分析显示, MMP-1 与 TGF- β 1 呈正相关, TIMP-1 与 TGF- β 1 呈负相关, MMP-1 及 TGF- β 1 与 CVF 呈正相关, TIMP-1 与 CVF 呈负相关。**结论** MMP-1、TGF- β 1 和 TIMP-1 参与了 RHD 瓣膜病变的纤维化进展。

【关键词】 风湿性心脏病 瓣膜组织 基质金属蛋白酶-1 基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 转化生长因子- β 1

Significance and Expressions of MMP-1, TIMP-1 and TGF- β 1 in Valve Tissues of Rheumatic Heart Disease YU Yi¹, LI Zeng-q¹, CHEN Kun¹, ZHAN Ping¹, LIAO Jian¹, RUAN Qin-yun². 1. Department of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. Department of Ultrasonography, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

【Abstract】 Objective To explore expressions of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in valve tissue of rheumatic heart disease (RHD), and to analyzed their roles in RHD. **Methods** The expressions of MMP-1, TIMP-1 and TGF- β 1 proteins and mRNAs were tested by Western blot and RT-PCR methods in valve tissues in participants with (experimental group, $n=30$) and without RHD (control group, $n=15$). Collagen fibers were detected by Masson staining, and collagen volume fraction (CVF) was caculated. The correlations of CVF and the expressions of MMP-1, TIMP-1 and TGF- β 1 were analyzed. **Results** The collagen fibers, CVF, and the protein and mRNA expressions of MMP-1 and TGF- β 1 in experimental group were higher than those in control group, while the protein and mRNA expressions of TIMP-1 in experimental group were lower than those in control group. The expression of TIMP-1 was negatively correlated with TGF- β 1 and CVF in valve tissues, while MMP-1 was positively correlated with them. The expression of TGF- β 1 was positively correlated with CVF in valve tissues. **Conclusion** MMP-1, TIMP-1 and TGF- β 1 contribute to the progression of fibrosis in RHD.

【Key words】 Rheumatic heart disease Valve tissue Matrix metalloproteinase-1 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 Transforming growth factor- β 1

风湿性心脏病(rheumatic heart disease, RHD)又称风湿性心脏瓣膜病, 临床早期表现为心脏和关节受累, 后期以心脏损害为主, 受损程度依次为二尖瓣、主动脉瓣、三尖瓣和肺动脉瓣^[1-3]。其特征为自身异常免疫反应引起的心脏炎症反复发作, 导致心脏瓣膜的纤维化及钙化。心脏瓣膜间质退变、纤维化及钙化主要涉及细胞外基质(ECM)的改变, 从而

导致瓣膜狭窄和(或)关闭不全, 进而引起血流动力学的异常^[4-5]。ECM的合成与降解受基质金属蛋白酶(MMPs)/基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的精密调节, MMPs是一类依赖于 Zn^{2+} 的蛋白水解酶, MMP-1属于间质胶原酶, 能水解多种胶原。TIMP-1分布广泛, 可与除MMP-2外多种MMPs结合, 进而调控MMPs活性及转录^[6-7]。同时, 转化生长因子- β (TGF- β)是迄今发现最强的ECM沉积促进剂, 是强致纤维化因子, 其中TGF-

* 国家自然科学基金(No. 81171360)资助

β1 在细胞中最常见,且所占比例高,与纤维化关系最为密切,并且能够通过调控 MMPs 活性,从而影响细胞及组织的纤维化程度^[8-10]。本研究旨在检测 RHD 瓣膜组织及健康对照瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 蛋白及 mRNA 表达,进而探讨 RHD 瓣膜组织纤维化机制。

1 材料与方法

1.1 材料

取 2014 年 1 月至 2016 年 1 月在福建医科大学附属第一医院心脏外科接受瓣膜置换术的 RHD 患者的瓣膜组织 30 例作为实验组,患者临床资料完整,其中男 14 例,女 16 例,年龄 28~56 岁,平均年龄 41.2 岁,心功能分级(NYHA)Ⅱ~Ⅳ级,其中Ⅱ级 6 例,Ⅲ级 13 例,Ⅳ 11 例。对照组为无 RHD 病变、意外、非正常死亡者的 15 例瓣膜组织,排除肿瘤、肝肾疾病、结缔组织等疾病及损伤,NYHA 为Ⅰ级。研究经本院伦理委员会批准,研究对象与其家属均知情同意。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗 TGF-β1、MMP-1 及 TIMP-1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;羟脯氨酸检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;BCA 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;一步法 RT-PCR 试剂盒购自南京碧波生物科技有限公司;迷你双垂直电泳仪、迷你转印电泳仪购自北京六一仪器厂;ChemIDoc™ XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司,FC Multiskan FC 型酶标仪购自美国 Thermo 公司。

1.3 Western blot 检测瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 蛋白的表达

取各组瓣膜组织,用匀浆器处理后,加入适量的 RIPA 裂解液,裂解,获得总蛋白。根据 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,进行 SDS 凝胶电泳,后湿法转膜。将膜浸入一抗(TGF-β1、MMP-1 及 MMP-9,稀释比例为 1:100)溶液孵育,4℃过夜;浸入二抗(稀释比例为 1:500)溶液中室温孵育 1~2 h。将膜取出漂洗,在膜上滴加 ECL 曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用 Quantity one 软件对各抗体条带灰度值进行统计,以目的蛋白与内参蛋白 GADPH 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.4 RT-PCR 检测瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 mRNA 的表达

参考 Trizol 试剂盒(Invitrogen)使用说明书

提取总 RNA,并测定 RNA 纯度。引物设计见表 1。通过一步法 RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA 并进行 PCR 扩增;引物分别加入 25 μL PCR 反应体系中,反应条件为 94℃变性 45 s,59℃复性 45 s,72℃延伸 60 s,共 35 个循环。获取 5 μL 扩增产物用于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。目的基因的相对表达量以 2^{-ΔΔCt} 表示。

Table 1 Sequences of fluorescence quantitative primers		
Gene	Sequence (5'-3')	Amplified product length/bp
MMP-1	For: ACTCTGGAGTAATGTCACACCT	145
	Rev: GTTGGTCCACCTTTCATCTTCA	
TIMP-1	For: TCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATAGC	535
	Rev: CAGGCAAGGTGACGGGACTGGAAGC	
TGF-β1	For: CTGCTACCGCTGCTGCTGTGGCTACTG	227
	Rev: CGGTCGCGGGTGCTGTTGT	
GADPH	For: AGCCACATCGCTCAGACA	314
	Rev: TGGACTCCACGACGTACT	

1.5 瓣膜组织胶原含量检测

通过羟脯氨酸检测试剂盒(碱水解法)操作说明书进行羟脯氨酸含量的检测。瓣膜组织胶原含量为组织羟脯氨酸含量的 7.46 倍^[11]。将体积分数为 10% 甲醛固定的石蜡切片,进行 Masson 染色,在 200 倍下每张切片取 5 个不重叠的视野,使用 Leica DC100 图像分析仪进行胶原容积分数(CVF)的测定,计算每个视野中胶原组织面积占视野总面积的百分比,取平均值代表该标本的 CVF。

1.6 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验,两因素间的相关性分析采用 Pearson 相关分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 蛋白的表达

结果见图 1、表 2。Western blot 结果表明实验组 MMP-1 及 TGF-β1 蛋白的表达高于对照组,而 TIMP-1 蛋白的表达低于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 mRNA 的表达

结果见图 2、表 3。RT-PCR 结果表明实验组中 MMP-1 及 TGF-β1 mRNA 表达高于对照组,而 TIMP-1 mRNA 表达低于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

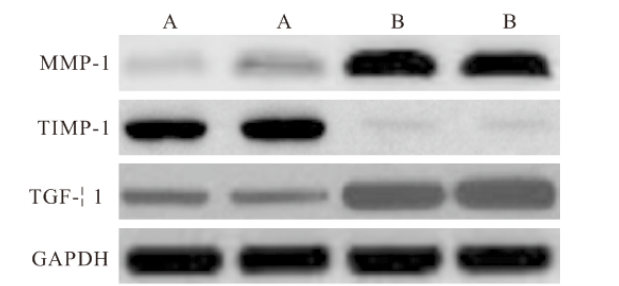


图1 Western blot 检测瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 蛋白的表达

Fig 1 Protein expressions of MMP-1, TIMP-1 and TGF-β1 in valve tissues detected by western blot

A: Control group; B: Experimental group

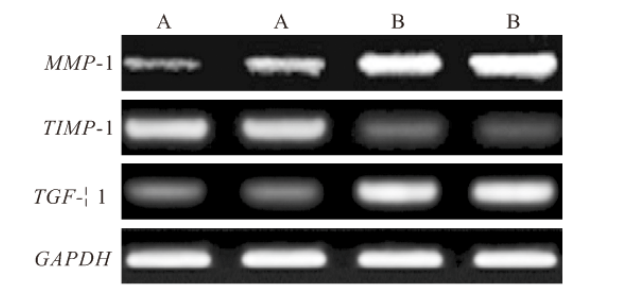


图2 RT-PCR 检测瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 mRNA 的表达

Fig 2 Expressions of MMP-1, TIMP-1 and TGF-β1 mRNA in valve tissues detected by RT-PCR

A: Control group; B: Experimental group

表 2 瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 蛋白表达的组间比较($\bar{x}\pm s$)				
Table 2 Protein expressions of MMP-1, TIMP-1 and TGF-β1 in valve tissues ($\bar{x}\pm s$)				
Group	<i>n</i>	MMP-1 protein	TIMP-1 protein	TGF-β1 protein
Control	30	0.18±0.02	0.92±0.08	0.29±0.03
Experimental	15	0.98±0.10	0.08±0.01	1.03±0.10
χ^2		4.235	5.238	0.764
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

表 3 瓣膜组织中 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 mRNA 表达的组间比较($\bar{x}\pm s$)				
Table 3 mRNA expressions of MMP-1, TIMP-1 and TGF-β1 in valve tissues ($\bar{x}\pm s$)				
Group	<i>n</i>	MMP-1 mRNA	TIMP-1 mRNA	TGF-β1 mRNA
Control	30	0.29±0.03	0.94±0.09	0.29±0.03
Experimental	15	1.14±0.12	0.14±0.02	0.96±0.10
χ^2	—	3.246	3.276	0.401
<i>P</i>	—	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 瓣膜组织胶原的表达

结果见图 3、表 4。实验组右心瓣膜结构模糊，内膜下纤维组织增生、胶原变性或玻璃样变，并见黏液样变性。实验组中胶原含量及 CVF 均高于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 MMP-1、TIMP-1 及 TGF-β1 与 CVF 的相关性分析

表 4 瓣膜组织胶原含量和 CVF 的组间比较($\bar{x}\pm s$)			
Table 4 Collagen content and CVF in valve tissues ($\bar{x}\pm s$)			
Group	<i>n</i>	Collagen content/ (μg/mg)	CVF/%
Control	30	130±0.09	18.34±1.02
Experimental	15	180±1.11	37.00±1.03
χ^2		2.974	0.657
<i>P</i>		<0.05	<0.05

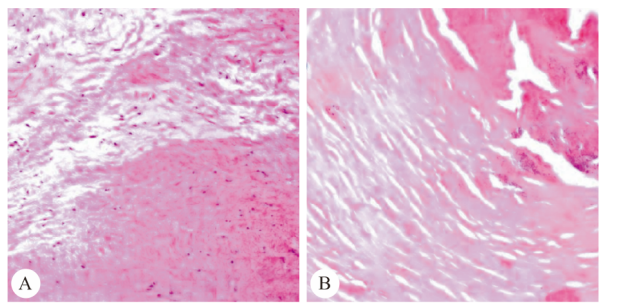


图3 实验组(A)和对照组(B)瓣膜组织 Masson 染色。×200

Fig 3 Masson staining in valve tissues of experimental group (A) and control group (B). ×200

MMP-1、TGF-β1 蛋白及 mRNA 表达量皆与 CVF 呈正相关($r_{\text{MMP-1 蛋白}}=0.768$, $r_{\text{MMP-1 mRNA}}=0.868$, $P<0.05$; $r_{\text{TGF-β1 蛋白}}=0.851$, $r_{\text{TGF-β1 mRNA}}=0.807$, $P<0.05$), TIMP-1 蛋白及 mRNA 表达量皆与 CVF 呈负相关($r_{\text{TIMP-1 蛋白}}=-0.613$, $r_{\text{TIMP-1 mRNA}}=-0.714$, $P<0.05$), MMP-1 与 TGF-β1 呈正相关($r=0.609$), TIMP-1 与 TGF-β1 呈负相关($r=-0.620$)。

3 讨论

人类心脏瓣膜组织主要由内皮细胞、间质细胞及 ECM 组成,ECM 对于瓣膜的三维空间结构及功

能起到维护作用,并能支持瓣膜细胞与心肌肌束等相连接。胶原是 ECM 最主要的成分,有近 85% 心脏间质由 I 型胶原和 III 型胶原构成。正常生理状态下,胶原处于合成与分解的动态平衡之中,而在 RHD、心肌梗死等心血管系统发生纤维化的过程中,胶原代谢发生异常,间质胶原纤维沉积于 ECM,各类型胶原比例失调且排列紊乱。胶原纤维主要含有胶原蛋白、甘氨酸、脯氨酸及羟脯氨酸,其中羟脯氨酸在胶原蛋白中所占比例为 13.4%,而在弹性蛋白中含量极少,且不存在于其它蛋白中,因此,羟脯氨酸含量能反映瓣膜组织中胶原代谢情况。因此本研究通过碱水解法检测 RHD 及无 RHD 瓣膜组织中羟脯氨酸含量,同时观察胶原纤维化情况,结果表明 RHD 瓣膜组织中胶原含量和 CVF 均明显高于无 RHD 瓣膜组织。同时李艳萍等^[12]证实 RHD 主动脉瓣膜纤维组织纤维增生,胶原纤维玻璃样变性、钙化;BANERJEE 等^[4]也通过组织病理学证实 RHD 患者二尖瓣纤维化;HER 等^[5]通过斑点追踪成像技术证实接受瓣膜手术的 RHD 患者左房室纤维化。上述结果均充分说明瓣膜纤维化是 RHD 的病理特征。

TIMPs 是 MMPs 的内源性特异抑制剂,能通过 1 : 1 的比例特异性结合于 MMPs,从而与 MMPs 竞争底物,抑制 MMPs 蛋白水解活性^[13]。在正常生理条件下,具有完整结构及功能的胶原被 MMP-1 等 MMPs 所降解变成缺乏连接结构的纤维性间质,纤维化程度增加;但当 MMP-1 活性升高到一定程度后,TIMP-1 表达量也显著升高,竞争性地与 Zn^{2+} 等结合,占据 MMP-1 结合位点,从而抑制 MMP-1 过表达,使得 MMP-1/TIMP-1 比值保持稳定,进而保持心脏瓣膜弹性与功能。而在 RHD 等病理条件下,MMP-1/TIMP-1 比值降低,使得 MMP-1 不断分泌到细胞外,降解弹性蛋白及明胶,从而导致心脏瓣膜纤维化。本研究通过 Western blot 及 RT-PCR 法检测 RHD 及无 RHD 瓣膜组织中 MMP-1 及 TIMP-1 蛋白及 mRNA 表达,结果表明 RHD 瓣膜组织中 MMP-1 蛋白及 mRNA 表达量明显高于无 RHD 瓣膜组织,而 TIMP-1 蛋白及 mRNA 表达量明显低于无 RHD 瓣膜组织,并且 MMP-1 表达与 CVF 呈正相关,TIMP-1 表达与 CVF 呈负相关。BANERJEE 等^[4]通过组织病理学证实 RHD 患者二尖瓣纤维化,且随着二尖瓣纤维化面积增大,MMP-1/TIMP-1 比值增加,且 C 端 I 型胶原(P I CP)和氨基末端 III 型胶原(P III NP)表达

异常。上述结果均充分说明 MMP-1 表达的升高加剧了 RHD 瓣膜组织的纤维化,而 TIMP-1 能够抑制 MMP-1 的作用。

TGF- β 是目前已知最强的促纤维化因子,TGF- β 1 是其主要成分。TGF- β 1 表达与肝纤维化程度、胰腺纤维化、肾纤维化等及其 ECM 的代谢密切相关^[14-15]。TGF- β 1 具有广泛的来源,如上皮细胞、内皮细胞、神经细胞及结缔组织等,其基因位于人染色体 19q13 上,与心肌梗死、RHD、心肌重构等多种心血管病理密切相关^[16]。ROSENKRANZ 等^[17]在转基因老鼠的模型中研究发现,TGF- β 的过度表达是导致心房肌间质纤维化的主要原因。XIAO 等^[18]证实在 RHD 房颤患者心肌中 TGF- β 1 高表达,且随着心房纤维化程度加深其表达量逐渐升高。均充分说明 TGF- β 1 在心脏疾病中高表达,且与心肌组织纤维化密切相关,本研究亦显示一致的结果: RHD 瓣膜组织中 TGF- β 1 蛋白及 mRNA 表达明显高于无 RHD 瓣膜组织,且与 CVF 呈正相关。

有研究报道 TGF- β 1 能提高心肌组织及纤维化细胞中 MMPs 活性,从而进一步降解胶原蛋白,产生间质胶原纤维,使组织或细胞纤维化严重^[8-10]。因此,本研究进一步分析 MMP-1 及 TIMP-1 与 TGF- β 1 的相关性,结果表明 MMP-1 与 TGF- β 1 呈正相关,TIMP-1 与 TGF- β 1 呈负相关。SUN 等^[8]证实 TGF- β 1 在 RHD 心房微颤患者心肌组织中高表达,TIMP-4 低表达,I 型胶原和 III 型胶原表达异常,且 TGF- β 1 与 TIMP-4 表达量呈负相关,说明 TGF- β 1 通过下调 TIMP-4 表达,促使 RHD 心房纤维化及 ECM 变化。说明通过下调 TGF- β 1 表达,从而抑制 MMP-1 表达,促进 TIMP-1 表达,能一定程度上阻止 RHD 瓣膜组织纤维化及 ECM 改变。

综上所述,MMP-1 及 TGF- β 1 在 RHD 瓣膜组织中高表达,且与 CVF 呈正相关,TIMP-1 在 RHD 瓣膜组织中低表达,且与 CVF 呈负相关,提示三者参与 RHD 瓣膜病变的纤维化进展。

参 考 文 献

- [1] RUSSELL EA, TRAN L, BAKER RA, *et al.* A review of outcome following valve surgery for rheumatic heart disease in Australia. BMC Cardiovasc Disord, 2015 (15): 103. doi: 10.1186/s12872-015-0094-1.
- [2] SAURAV A, ALLA VM, KAUSHIK M, *et al.* Outcomes of mitral valve repair compared with replacement in patients undergoing concomitant aortic valve surgery: a meta-analysis of observational studies. Eur J Cardiothorac Surg, 2015, 48

- (3):347-353.
- [3] 张 涛, 温纯洁, 沈冬亚, 等. 风湿性心脏病易感基因多态性研究进展. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(10): 1186-1191.
- [4] BANERJEE T, MUKHERJEE S, GHOSH S, *et al.* Clinical significance of markers of collagen metabolism in rheumatic mitral valve disease. PLoS One, 2014, 9(3): 90-92[2016-03-20]. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090527>.
- [5] HER AY, CHOI EY, SHIM CY, *et al.* Prediction of left atrial fibrosis with speckle tracking echocardiography in mitral valve disease: a comparative study with histopathology. Korean Circ J, 2012, 42(5): 311-318.
- [6] 陈 枫, 杨爱萍, 李 燕, 等. 糖尿病对大鼠肝纤维化组织 TIMP-1/MMP-1 表达的影响. 重庆医学, 2013, 42(9): 964-967.
- [7] HIDA Y, HAMADA J. Differential expressions of matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs and their endogenous inhibitors among histologic subtypes of lung cancers. Anticancer Agents Med Chem, 2012, 12(7): 744-752.
- [8] SUN Y, HUANG ZY, WANG ZH, *et al.* TGF-beta1 and TIMP-4 regulate atrial fibrosis in atrial fibrillation secondary to rheumatic heart disease. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1/2): 131-138.
- [9] SRI MK, NALLARI P, VIDYASAGAR A, *et al.* Plasma TGF-beta1, MMP-1 and MMP-3 levels in chronic pancreatitis. Indian J Clin Biochem, 2012, 27(2): 152-156.
- [10] YU SH, LIU LJ, LV B, *et al.* Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells might be mediated by decreasing MMP9, TIMP-1, INF-gamma and TGF-beta. Cell Biochem Funct, 2015, 33(6): 356-366.
- [11] JIMENEZ SA, BASHEY RI. Solubilization of bovine heart-valve collagen. Biochem J, 1978, 173(1): 337-341.
- [12] 李艳萍, 胡秀芬, 王宏伟, 等. 风湿性心脏病患儿主动脉瓣病变组织基质金属蛋白酶-2、-9 表达的意义. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(21): 1457-1458.
- [13] 高 峰, 刘淑霞, 郝 军, 等. 软骨肉瘤中 MMP-1 及 TIMP-1 的表达及意义. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(10): 1074-1076.
- [14] SURESHBABU A, MUHSIN SA, CHOI ME. TGF-beta signaling in the kidney: pro-fibrotic and protective effects. Am J Physiol Renal Physiol, 2016: ajprenal. 00365. 2015 [2016-04-08]. <http://ajprenal.physiology.org/content/310/7/F596>. doi: 10.1152/ajprenal.00365.2015.
- [15] MENG XM, TANG PM, LI J, *et al.* TGF-beta/Smad signaling in renal fibrosis. Front Physiol, 2015, 8(6): 82-85.
- [16] 李 勇, 马瑞彦, 陈 林, 等. TGF- β_1 信号通路在瓣膜病合并房颤患者心房中的表达变化及意义. 解放军医学杂志, 2011, 36(11): 1159-1162.
- [17] ROSENKRANZ S, FLESCH M, AMANN K, *et al.* Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(3): H1253-H1262.
- [18] XIAO H, LEI H, QIN S, *et al.* TGF-beta1 expression and atrial myocardium fibrosis increase in atrial fibrillation secondary to rheumatic heart disease. Clin Cardiol, 2010, 33(3): 149-156.

(2016-05-27 收稿, 2016-10-10 修回)

编辑 余 琳