论著

文章编号:1000-5404(2006)13-1374-04

CD147与类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞MMPs合成的关系

吴振彪,朱 平,卢 宁,史战国,樊春梅,王彦宏 (第四军医大学西京医院临床免疫科,西安 710032)

提 要:目的 观察类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)与高表达CD147的单核细胞株(THP-1)共培养后,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)合成的变化。**方法** 从手术切除的RA患者滑膜组织中,分离FLS,经流式细胞术测定CD14,CD68及免疫组化测定波形纤维蛋白(vimentin)证实后,传代培养。将FLS与高表达CD147的THP-1共培养,观察THP-1细胞对FLS MMPs合成的影响。用明胶酶谱法测FLS MMP-2,MMP-9含量。同时观察CD147拮抗肽(AP9)对MMPs表达的影响。**结果** 高表达CD147,低表达MMP-2、MMP-9的THP-1细胞与CD147表达水平低的RA FLS混合培养后,FLS合成MMP-2、MMP-9水平显著升高,随着THP-1细胞数的增加,MMP-2、MMP-9的合成量也增加。THP-1对FLS合成MMP-2、MMP-9的刺激作用可被CD147拮抗肽AP-9所抑制。**结论** 高表达CD147的THP-1细胞对共培养的RA FLS合成MMP-2、MMP-9有刺激作用,这种刺激作用可被CD147拮抗肽AP-9所抑制,提示THP-1表面的CD147对FLS合成MMPs有促进作用。

关键词: EMMPRIN/CD147;THP-1细胞;基质金属蛋白酶(MMP-2,MMP-9)

中图法分类号: R345.56; R392.13; R593.220.2 **文献标识码:** A

Enhanced production of MMP-2, MMP-9 by fibroblast cells from rheumatoid arthritis patients when co-cultured with monocytes of high CD147 expression

WU Zhen-biao, ZHU Ping, LU Ning, SHI Zhan-guo, FAN Chun-mei, WANG Yan-hong (Department of Clinical Immunology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To study the stimulating effects of CD147 on the production of MMPs by fibroblast cells isolated from rheumatoid arthritis patients. **Methods** Fibroblast cells were isolated from synovial tissues excised from rheumatoid arthritis patients during synovectomy, and confirmed by detection of CD147, CD68 with flow cytometry (FCM) and vimentin protein by immunostaining (SP). The fibroblast-like synoviocytes (FLS) were co-cultured with THP-1 cells (a cell line of monocytes) with high levels of CD147. The production of MMP-2, MMP-9 by synovial fibroblasts was evaluated by Gelatin zymography and RT-PCR. The expression of CD147 on THP-1 cells and synovial fibroblasts was detected by FCM. Antagonist peptide to CD147 AP-9 was used to study the effects on MMPs production. **Results** The isolated synovial fibroblasts characterized by negative expression of CD14, CD 68 and positive expression of vimentin protein, expressed low levels of CD147 and high levels of MMP-2 and MMP-9, while THP-1 cells expressed much higher levels of CD147 and lower levels of MMP-2, MMP-9. When the synovial fibroblasts were co-cultured with THP-1, the production of MMP-2, MMP-9 by FLS was enhanced, but when co-cultured with the antagonist peptide (AP-9) of CD147, it was suppressed. **Conclusion** The ability of MMP-2, MMP-9 production by synovial fibroblasts was enhanced when co-cultured with THP-1 of high levels of CD147, and the enhancement can be suppressed by the antagonist peptide (AP-9) of CD147.

Key words: extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147; THP-1; matrix metalloproteinase

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解是类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者软骨及骨破坏的主要环节之一,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是ECM降解破坏的主要酶[1]。MMPs与RA患者的骨关节破坏及病情密切相关。但RA患者MMPs合成及活性增加的机制尚不完全清楚。在肿瘤的研究中显示细胞外基质金属蛋白酶诱导剂(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN, CD147)表达增加是MMPs合成及活性增强的主要机制之一[2]。有学者证实RA患者CD147

基金项目:国家高技术研究发展计划("863")资助项目(2003AA215061)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA215061)

作者简介:吴振彪(1965-),男,黑龙江省齐齐哈尔市人,博士,副主任医师,主要从事风湿免疫病的发病机制方面的研究。电话:(029)84775360
通讯作者:朱 平,电话:(029)84775355

收稿日期:2005-03-18;修回日期:2006-01-19

表达也显著增加[3]。本研究用体外共培养的方法，观察高表达 CD147 的单核细胞（THP-1）对 RA 患者成纤维样滑膜细胞（fibroblast-like synoviocytes，FLS）MMPs 合成的影响，以期阐明 RA 的发病机制，为找寻新的治疗途径提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞来源　　THP-1 为高表达 CD147 的单核细胞株，引自 ATCC。

1.1.2　试剂　　胶原酶及 DNA 酶购自 Sigma 公司；FITC 标记的鼠抗人抗 CD14、CD68、CD147 单抗为 Becton-Dickinson（USA）产品；鼠抗人波形纤维蛋白（vimentin）单抗 Sigma 公司产品；反转录 PCR（RT-PCR）用 Promega 公司 AMV 逆转录试剂盒；10% 小牛血清杭州四季青公司产品；S-P 免疫组化试剂盒（美国 SantaCruz 公司）。CD147 拮抗肽 AP9 由西安美联公司合成，每一成品经高效液相色谱（HPLC，Waters 公司）进行纯度分析，纯度均 > 90 %[4]。

1.1.3　主要仪器　　流式细胞仪为 FACS Calibur（Becton-Dickinson，USA），图像分析用 Molecular Analyst（BIO-RAD，USA）图像分析系统，电泳仪为 BIO-RAD（USA）产品。

1.2　方法

1.2.1　FLS 分离、鉴定、培养　　将关节镜术切除的 RA 患者滑膜组织机械捣碎（切、剪），用无菌 PBS 洗涤 4 次，4 mg/ml 胶原酶Ⅱ和 1 mg/ml 的 DNA 酶 37 ℃连续振荡消化 1 h，用细胞滤网去除组织碎块，细胞悬液用含 10% 小牛血清（含青霉素、链霉素）的 DMEM（Sigma）培养。过夜培养后，用吸管吸除悬浮于培养液中未贴壁的细胞，每周换液 2 次。每周传代 1 次，按 1∶3的比例。从第 2 代开始，测定 MMP-2，MMP-9。FLS 的鉴定：流式细胞术测定 CD14，CD68，常规免疫组化法（S-P 染色，按试剂盒说明操作）测定 vimentin 蛋白。如果 CD14，CD68 阴性，vimentin 蛋白阳性，则证明分离的是 FLS[5]。

1.2.2　流式细胞术（FCM）分析　　用常规流式细胞术法测定 CD147、CD14、CD68 的表达。CD147、CD14、CD68 单抗均为直接免疫荧光法 FITC 标记的小鼠抗人单克隆抗体，小鼠 IgG1 为同型对照，为 Becton-Dickinson（USA）产品。结果用 Cell Quest 软件分析。

1.2.3　THP-1 细胞与 FLS 混合培养　　选用的 FLS 为传代培养 4 代后，MMP2，MMP9 表达极低的细胞株，与 THP-1 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 中培养，THP-1 细胞与 1×10^5 细胞/ml 的 FLS 分别单独培养及按 0.2∶1.0，0.5∶1.0，1.0∶1.0 的比例混合培养 48 h。同时设加 1 ml CD147 拮抗肽 AP9（10 mg/ml）组。

1.2.4　MMP-2，MMP-9 活性检测　　单独及混合培养的 THP-1、FLS 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 中培养 48 h 后，用无血清的 DMEM 洗涤 1 次，再用无血清 DMEM 培养 48 h 后测定 MMP-2、MMP-9。MMP-2、MMP-9 用明胶酶谱法测定，按文献[6]进行。经图像分析系统读取条带面积和酶解条带灰度，酶含量 = 条带面积 ×（条带灰度 - 背景灰度）。

1.2.5　反转录 PCR（RT-PCR）　　用 RT-PCR 法分析 MMP-2，MMP-9，CD147 在 THP-1 细胞、FLS 及共培养后的表达。总 RNA 以常规方法按试剂盒说明操作。单股 cDNA 用逆转录酶 TrueScript 合成（BioRad，Hercules，CA，USA）。MMP-2，MMP-9，CD147 cDNA 分别用特异性引物 PCR 扩增。MMP-2 上游引物为 5′-ACGACCGCGACAAGAACTAT-3′下游引物为 5′-CTGCAAAGAACACAGCCTTCTC-3′；MMP-9 上游引物为 5′-GCCTGCGTCCATCAACACT-3′下游引物为 5′--CCCTCCTCGTCCACCTCAA-3′；CD147 上游引物为 5′-GGCCGTGAAGTCGTCAGAAC-3′下游引物为 5′-GCCACGATGCCCAGGAA-3′。PCR 按以下条件进行：变性 94 ℃ 3 min，然后再 94 ℃ 30 s 变性；退火 56 ℃15 s；延伸 72 ℃ 30 s，进行 20 ~ 30 个循环。扩增产物用 1.5% 凝胶电泳分析。

1.3　统计学分析

采用统计软件 SPSS 10.0 进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　FLS 的分离鉴定

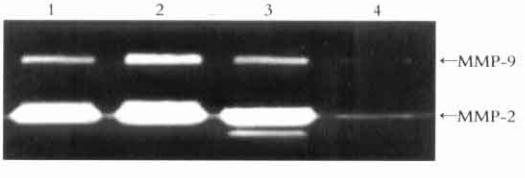
分离的 RA 患者 FLS 光镜下呈典型的纤维细胞形态，FCM 测定 CD14、CD68 均阴性，vimentin 蛋白免疫组化染色呈阳性，由此证实所分离的细胞为滑膜成纤维样细胞。

2.2　THP-1 细胞及 FLS 表面 CD147 及 MMP 表达

FCM 分析显示 THP-1 细胞 CD147 表达率为 99.3%，平均荧光强度为 321.6；而 FLS 细胞 CD147 表达率 56.3%，平均荧光强度 79.5。统计分析示二者有显著差异（$P < 0.01$）。明胶酶谱法显示 THP-1 细胞 MMP-2、MMP-9 表达低，分别为 4.5、3.0；FLS 细胞 MMP-2，MMP-9 表达高于 THP-1，分别为 8.4、6.5。RT-PCR 测定发现 THP-1 细胞不表达 MMP-2 及 MMP-9，但表达高水平的 CD147。而 FLS 细胞表达一定水平的 MMP-2、MMP-9 及 CD147。

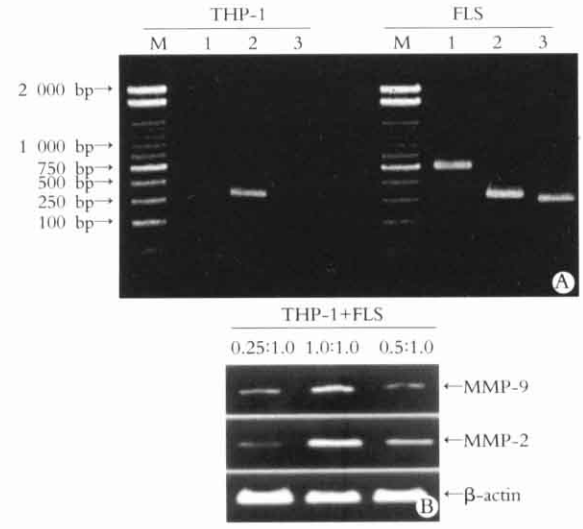
2.3　THP-1 细胞与 FLS 共培养后 MMP 合成增加

传代培养第 4 代的 FLS 与 THP-1 细胞（等量）混合共培养后，MMP-2，MMP-9 的合成增加（图 1），分别为 15.6，11.5，与 FLS 及 THP-1 单独培养比有统计学意义（$P < 0.01$）；而加入 CD147 拮抗肽 AP-9 后再混合培养，MMP-2，MMP-9 合成减少（图 2），分别为 9.0、6.2，（与 THP-1 + FLS 比 $P < 0.01$）。其中 MMP-9 变化更明显。随着 THP-1 细胞比例的增加，FLS 细胞产生 MMP-2、MMP-9 的量也增加，THP-1 与 FLS 按 1.0∶1.0 比例培养时，对 FLS 产生 MMP-2，MMP-9 的刺激作用强于 0.2∶1.0 及 0.5∶1.0（图 3）。表明 THP-1 细胞可以刺激 FLS 产生 MMP-2，MMP-9；而这种刺激作用可被 CD147 拮抗肽 AP-9 抑制。



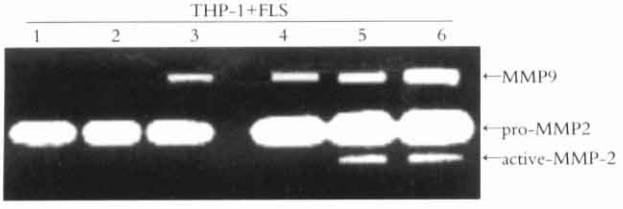
1：THP-1 + FLS + AP9；2：THP-1 + FLS；3：FLS；4：THP-1

图 1　FLS 与 THP-1 共培养后，MMP-2，MMP-9 合成变化的明胶酶谱结果



A:THP-1 与 FLS 单独培养后结果；B：THP-1 与 FLS 混合培养后结果，β-actin 为对照；M：标准；1：MMP-9；2：CD147；3：MMP-2.

图2 RT-PCR 法分析 THP-1 与 FLS 混合及单独培养后，MMP-2、MMP-及 CD147 mRNA 表达



1、2：细胞比例为 0.25:1.0；3、4：细胞比例为 0.5:1.0；5、6：细胞比例为 1.0:1.0

图3 THP-1 细胞与 FLS 按不同比例培养后 MMP 合成的明胶酶谱结果

3 讨论

RA 关节破坏的一个重要环节是基质金属蛋白酶(MMP)对细胞外基质(ECM)成分的降解。RA 患者滑液、滑膜及外周血均有 MMPs 的高表达，且与病情进展相关[7]。FLS 是合成 MMPs 的重要细胞，RA 患者 FLS 合成 MMPs 增加的机制尚不完全清楚。MMP-2，MMP-9 是明胶酶，其作用的底物是关节软骨的重要组成成分。RA 患者的滑液及外周血中 MMP-2，MMP-9 水平均增高[8]。Uchibori 等[9]对关节炎模型小鼠研究也证明 MMP-2，MMP-9 在类风湿性关节炎的发病中起一定作用。CD147 是免疫球蛋白超家族成员，广泛表达于造血及非造血细胞系[2]。国内外研究均证实，EMMPRIN/CD147 在 RA 患者呈高表达，尤其在滑液及滑膜[3,10,11]。从而推测，在 RA 的发病机制中，存在通过 CD147 增加，促进 MMPs 的合成，进而破坏关节软骨及骨这一途径。我们的既往研究显示，RA 患者的滑液及滑膜细胞上均有 CD147 的高表达，越接近软骨及骨的部位，表达水平越高，并且与病情相关[10,11]。本研究的目的拟通过将高表达 CD147 的 THP-1 细胞与分离的 RA 患者 FLS 混合培养，以观察 CD147 对 FLS 合成 MMPs 的影响。结果进一步证实，CD147 通过促进 FLS 合成 MMP-2，MMP-9 而参与 RA 的发病过程。

FLS 是 RA 患者 MMP2，MMP-9 的主要产生细胞，分离的 RA 患者 FLS 表达一定水平的 MPP-2，MMP-9，体外传代培养后 MMPs 产生能力下降，FLS CD147 表达水平很低。THP-1 细胞表达高水平的 CD147，仅产生低水平的 MMP-2，MMP-9。将 THP-1 细胞与分离的 RA 患者 FLS 混合培养，明胶酶普法在蛋白水平及 RT-PCR 在 mRNA 水平均证实 MMP-2，MMP-9 产生增加(图1，3)。随着 THP-1 细胞比例的增加，FLS 细胞产生 MMP-2 的量也增加，1.0:1.0 比例培养时，刺激作用强于 0.2:1.0 及 0.5:1.0 比例时(图2)。再继续增加 THP-1 细胞数，刺激作用是否会继续增强？将在今后的研究中予以证实。而在混合培养同时，加入 CD147 拮抗肽 AP9，则使这种刺激作用受到抑制，MMP-2，MMP-9 的产生减少。既往研究表明，CD147 单克隆抗体也可阻断 CD147 对成纤维细胞合成 MMPs 的刺激作用[12]。所以认为，THP-1 细胞是通过其表面的 CD147 分子，刺激 FLS 合成 MMP-2，MMP-9。而 CD147 拮抗肽对该通路的抑制作用，则提示通过抑制 CD147-MMPs 这一机制，可能成为类风湿性关节炎治疗的又一新途径。这种刺激作用是通过 THP-1 细胞与 FLS 的直接接触，还是仅需 THP-1 表面 CD147 作用，而不需直接接触即可实现？这种体外研究的情况在患者体内是否如此？RA 患者的单核细胞与成纤维细胞的作用是否与此类似？除 MMP-2，MMP-9 外，对其他 MMP 合成有无刺激作用？这些均还不十分清楚，有待深入研究。

参考文献：

[1] OKADA Y. Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction[J]. Mod Rheumatol, 2000, 10(1): 121-128.

[2] KANEKURA T, CHEN X, KANZAKI T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts[J]. Int J Cancer, 2002, 99(4): 520-528.

[3] TOMITA T, NAKASE T, KANEKO M, *et al*. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(2): 373-378.

[4] 黄宝成，商 澎，骞爱荣，等. HAb18G/CD147 拮抗肽的筛选及对肝癌细胞侵袭力的抑制[J]. 中华肿瘤杂志，2003，25(2)：111-114.

[5] ZIMMERMANN T, KUNISCH E, PFEIFFER R, *et al*. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture - primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells [J]. Arthritis Res, 2001, 3(1): 72-76.

[6] LEBER T M, BALKWILL F R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels [J]. Anal Biochem, 1997, 249(1): 24 - 28.
[7] MURPHY G, KNAUPER V, ATKINSON S, *et al*. Matrix metalloproteinases in arthritic disease[J]. Arthritis Res, 2002, 4 (Suppl 3): S39 - S49.
[8] GIANNELLI G, ERRIQUEZ R, IANNONE F, *et al*. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2004, 22(3): 335 - 338.
[9] UCHIBORI M, NISHIDA Y, TABATA I, *et al*. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in pigmented villonodular synovitis suggests their potential role for joint destruction[J]. J Rheumatol, 2004, 31(1): 110 - 119.
[10] 董惟佳,朱 平,樊春梅,等. CD147分子和基质金属蛋白酶在类风湿关节炎滑膜中的表达[J]. 中华风湿病学杂志,2004, 8(3): 135 - 138.
[11] 丁 进,朱 平,樊春梅,等. 类风湿关节炎外周血与滑液细胞CD147分子表达的研究[J]. 中华风湿病学杂志,2003, 7(12): 742 - 745.
[12] SUN J, HEMLER M E. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions[J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 2276 - 2281.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2006)13-1377-01

个案与短篇

鼻中隔矫正术治疗重度鼻中隔偏曲并发鼻出血的临床观察

蒋路云,戚思国,唐尚成 (达州市中心医院耳鼻咽喉科,达州 635000)

我科于2003年2月至2005年6月对16例重度鼻中隔偏曲并发鼻出血患者一期行鼻中隔矫正术治疗取得满意疗效,现总结如下。

1 资料与方法

16例患者中,男性12例,女性4例;年龄22~61岁,平均42岁;右侧鼻出血11例,左侧5例;此次鼻出血病史最长2周,最短半天,平均4.5 d;总失血量最大1 000 ml,最少100 ml,平均400 ml;13例曾在院外反复行鼻腔填塞,后鼻孔填塞等治疗,3例未作鼻腔填塞(病史短,12~24 h)。检查发现均鼻中隔重度偏曲,高位3例,低位8例,高低位同时偏曲5例。

治疗方法:患者入院后急查血常规、凝血象、心电图、血糖,对正在出血患者暂时用1%麻黄碱或油纱填塞减少出血,2例因病史长,出血量大,血红蛋白<8 g,先进行输液、补液等治疗,完善上述处理后在鼻窦内镜下行鼻中隔矫正术。全部采用鼻腔表面麻醉(2%丁卡因20 ml+1%肾上腺素3支)。于鼻出鼻的对侧(即鼻腔宽大1例)作切口,剥离鼻中隔软骨、筛骨、犁骨骨膜,务必要保持此侧黏骨膜遍完整,解开各骨缝并剥离出血侧筛骨、犁骨骨膜,剥离时多会出现黏骨膜遍破损,特别是在嵴突部位,此时常常遇较多出血,可用麻醉棉片压迫片刻,必要时还可用纯肾上腺棉片来压迫,并可辅以双极电凝止血。经上述处理后出血一般可暂时减少,应尽快完成剥离后切除偏曲骨质,切除偏曲骨质后患侧使可填入纱条止血,适当修整鼻中隔软骨,见中隔基本端正后缝合切口,抽出患侧填塞物后此时一般出血基本停止,如有渗血可用双极电凝处理,用内窥镜进一步检查鼻腔、鼻咽部后填入油纱条。术后抗炎、适当止血药物,营养支持等治疗。48~72 h逐渐抽出油纱条,之后每日用贝复济金霉素棉片换药。

作者简介:蒋路云(1969-),男,四川省达州市人,主治医师,主要从事鼻内窥镜方面的研究。电话:0818-2386613

收稿日期:2005-11-23;修回日期:2006-03-24

2 结果

16例患者均顺利完成手术,术中失血量最多的400 ml,最少50 ml,平均150 ml。术后未再出血,术后1周顺利拆线,术后10~14 d鼻膜创面愈合后出院。

3 讨论

重度鼻中隔偏曲患者因偏曲侧黏膜甘薄,血管表浅,嵴突部位黏膜缺血造成黏膜糜烂,气道压力过大等因素造成鼻腔反复出血。此时因鼻腔狭窄,出血部位往往无法检查到,反复的盲目填塞造成新的损伤,感染使本就不易愈合的创面进一步扩大,导致顽固性鼻腔出血[1]。本组16例中有13例曾反复行鼻腔填塞,且有4例曾行后鼻孔填塞,均未能有效止血,而且有2例患者因失血较多导致输血。我们通过行鼻中隔矫正手术使该组病人成功止血,且术后未再出血,我们认为可能与鼻中隔矫正术后鼻中隔血管压力减轻,鼻腔宽大后便于准确及时止血,术后黏膜张力减轻便于愈合等因素有关[2]。术中平均出血150 ml,比常规鼻中隔矫正术稍多,但患者完全耐受,术后创面全部愈合,未出现鼻中隔穿孔等并发症,说明该方式是安全可行的。

关键词:鼻中隔偏曲;鼻出血;鼻中隔矫正术
中图法分类号:R756.230.5 文献标识码:B

参考文献:

1 卞国强.鼻科学[M].第2版.上海:上海科学技术出版社,2000: 303 - 310.
2 杨成章,汪广平,肖红俊.鼻中隔矫正术在老年大咯血中的应用[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2000,14(9): 427 - 428.
3 简敦炳,邱洛平,陈述军,等.顽固性鼻出血的临床治疗[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2004,18(11): 660 - 661.
4 周智永,郑晓红.经鼻内窥镜治疗老年顽固性鼻出血的体会[J].中国内镜杂志,2003,9(6): 92.

(编辑 张大春)