DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.06.034
第24卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 6
2002年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2002

文章编号:1000-5404(2002)06-0709-04

论著

反义 $TIMP_1$ 基因转染 Ito 细胞后对其 ECM 代谢的影响

曾 仲,韩本立 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨反义 $TIMP_1$ 基因对 Ito 细胞(贮脂细胞)金属蛋白酶的表达和细胞外基质(ECM)降解的影响。方法 将大鼠全长 $TIMP_1$ cDNA 反向插入哺乳表达载体 pCI-neo 中,构建反义 $TIMP_1$ 基因真核表达载体,用脂质体介导的方法,将反义 $TIMP_1$ 基因导入 Ito 细胞株 CFSC-2G 中,选择稳定转染的 Ito 细胞株培养,采用 RT-PCR、原位杂交、免疫组化及 RIA 等方法,观察 $TIMP_1$ mRNA 和蛋白、MMP_1 mRNA 和蛋白、α1(Ⅲ)mRNA、FN 蛋白表达及细胞培养上清中 PCⅠ、PCⅢ、HA、LN 水平的变化。结果 反义 $TIMP_1$ 基因能明显地抑制 Ito 细胞中 $TIMP_1$ mRNA 和蛋白的高表达($P<0.01$)。转基因细胞中α1(Ⅲ)mRNA、MMP_1 mRNA、FN 蛋白的表达与未转基因细胞比较无明显变化($P>0.05$)。转基因后 Ito 细胞培养上清中 PCⅠ、PCⅢ、HA、LN 水平明显低于未转基因细胞($P<0.01$)。结论 反义 $TIMP_1$ 基因可以抑制贮脂细胞内源性 $TIMP_1$ 产生,但未影响 MMP_1 的表达,从而促进了细胞外基质的降解。

关键词:反义 $TIMP_1$ 基因;Ito 细胞;细胞外基质
中图法分类号:R394.2;R575.2 文献标识码:A

Effects of antisense TIMP1 gene on extracellular matrix metabolism in Ito cells *in vitro*

ZENG Zhong, HAN Ben-li (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the possible role of antisense TIMP1 gene on expression of MMP and the extracellular matrix metabolism of Ito cells. Methods A rat tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1) cDNA (750 bp) was inserted reversely into the mammalian expression vector pCI-neo. The recombinant antisense TIMP1 gene mammalian expression vector pCIATIMP1 was transfected into rat Ito cells line CFSC-2G with a liposome-mediated technique. By using RT-PCR, ISH and immunohistochemistry, the expression of TIMP1 mRNA and protein, MMP1 mRNA and protein, α1(Ⅲ) mRNA and FN protein were determined. The concentrations of PCⅠ, PCⅢ, HA and LN in the Ito cells culture media were determined with RIA. Results Antisense TIMP1 gene were markedly suppressed the expression of endogenous TIMP1 mRNA and protein in the transfected Ito cells ($P<0.01$). The expression of MMP1 mRNA and protein, α1(Ⅲ)mRNA and FN protein were not significantly different in the transfected Ito cells. The levels of PCⅠ, PCⅢ, HA and LN were decreased significantly in the transfected Ito cells culture media ($P<0.01$). Conclusion The antisense TIMP1 gene can be successfully used to inhibit Ito cell endogenous TIMP1 mRNA and protein, have no effect on the expression of MMP1, and enhance the degradation of extracellular matrix.

Key words: antisense TIMP1 gene; extracellular matrix; Ito cells

肝纤维化的实质就是细胞外基质(ECM)在肝中病理性过多的堆积,而激活的贮脂细胞在这一过程中发挥了关键作用[1]。它不仅是纤维化肝脏中 ECM 的主要来源,而且也是基质金属蛋白酶组织抑制剂-1($TIMP_1$)的主要合成细胞,TIMP1 通过特异地抑制基质金属蛋白酶(MMPs)的活性,阻止了 ECM 的降解,增加 ECM 在肝中的堆积而在肝纤维化过程中发挥了重要作用[2,3]。因此,本研究选用真核表达载体重组反义 $TIMP_1$ 基因并转染大鼠贮脂细胞,观察其抑制 $TIMP_1$ 表达及对细胞外基质降解的效应,以探讨利用 $TIMP_1$ 反义基因逆转治疗肝纤维化的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠 $TIMP_1$ 和 MMP_1 基因质粒由法国 Louis Pasteur 大学 Paul Basset 教授赠送,基因片段长度 0.75 kb。真核表达载体 pCI-neo 购自 Promega 公司。大鼠肝纤维化贮脂细胞株 CFSC-2G 由美国肝脏研究中心的 Marcos Rojkind 博士惠赠。$TIMP_1$ 和 MMP_1 多抗为美国癌症研究所 Stetler-Stevenson 教授赠送。纤维连接蛋白(FN)多抗购自 DaKo 公司。Ⅲ型前胶原 α_1 链[α_1(Ⅲ)]探针质粒由本院传染科李奇芬教授赠送。Ⅰ型前胶原(PCⅠ)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、层粘连蛋白(LN)、透明质酸(HA)放免测定试剂盒分别购自重庆市肿瘤研究所和上海海军医学研究所。脂质体转染试剂盒(DOTAP)和限制性内切酶购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 细胞培养、转染及抗性克隆的筛选

贮脂细胞培养按常规方法进行,用脂质体介导法将反义 TIMP1 基因质粒导入 CFSC-2G 细胞中,经 G_{418} 筛选获得抗性克隆,并命名为 CFSC-2GAT。

1.3 RT-PCR 半定量检测 $TIMP_1$ RNA 表达

采用一步法提取细胞总 RNA,并用紫外分光光度计行 RNA 浓度及纯度测定。用德国 Boehringer Mannheim 公司的一步法 RT-PCR 试剂盒对细胞总 RNA 进行扩增,同时加入 $TIMP_1$ 引物序列:5′-GACTAAGATGCTCAAAGGATTCGACGCTG,5′-GAGAAAGAAGATG GAGGAAAGGTAAACAG,扩增长度为 493 bp。加入反应体系中的 RNA 和引物的量每组均相同。扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析并 GS300 扫描吸光度仪进行半定量分析。

1.4 原位杂交

MMP1 mRNA、α_1(Ⅲ) mRNA 表达的原位杂交检测按蔡文

作者简介:曾 仲(1967-),男,湖南省汉寿县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝纤维化的发病机制和治疗方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)68754544

收稿日期:2002-01-19;修回日期:2002-03-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

琴[4]方法进行。探针用地高辛标记。阴性对照不加探针或经 Rnase 处理后再进行原位杂交。

1.5 免疫组化

TIMP1、MMP1、FN 的免疫组化采用北京中山公司的 SPTM 免疫组化试剂盒进行。阴性空白对照不加一抗。

1.6 图像分析

每组任选 100 个细胞测量其平均灰度，再自动统计出这 100 个细胞的灰度均值和标准差来代表每组细胞相应物质的表达强度。

1.7 细胞培养上清中 PCⅠ、PCⅢ、HA、LN 检测

每组细胞接种数相同，并加等量的无血清培养液，培养 72 h，收集上清，用 RIA 法检测上清中 PCⅠ、PCⅢ、HA、LN 的浓度。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，运用组间 t 检验进行统计学分析。

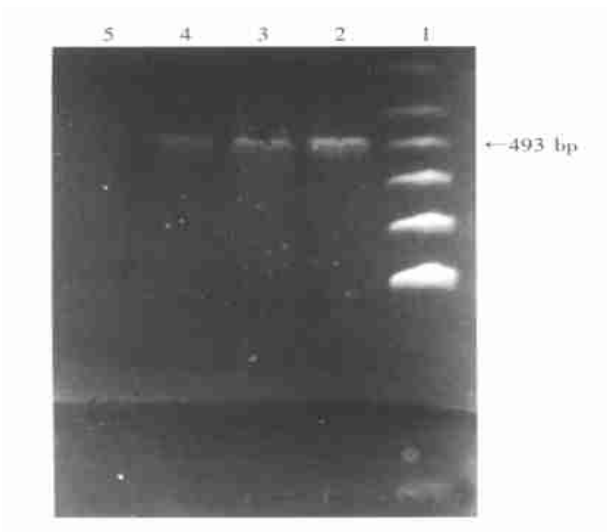
2 结果

2.1 重组质粒的内切酶图

质粒载体为 pCI-neo，长度为 5 474 bp，Nar Ⅰ酶切位点位于 2 593 bp，$TIMP_1$ cDNA 片段长度为 750 bp，Nar Ⅰ 酶切位点位于 22 bp，故重组体经 Nar Ⅰ 酶切后正义 $TIMP_1$ 重组体产生 2 225 bp 和 3 999 bp 两个片段，而反义 $TIMP_1$ 重组体产生 1 519 bp 和 1 705 bp 两个片段。

2.2 反义 $TIMP_1$ 基因对贮脂细胞内源性 $TIMP_1$ mRNA 表达和蛋白合成的影响

RT-PCR 结果发现转染反义 $TIMP_1$ 基因的贮脂细胞正义 $TIMP_1$ RNA 的表达明显低于未转基因组（$P<0.01$），免疫组化结果也显示转染反义 $TIMP_1$ 基因组细胞较未转基因组 $TIMP_1$ 蛋白的表达显著降低（$P<0.01$），见图 1，2，表 1，2。



1：PCR Marker（PBR322）；2：Sense TIMP1 RNA of CFSC-2G cells；3：Antisense TIMP1 RNA of CFSC-2GAT cells；4：Sense TIMP1 RNA of CFSC-2GAT cells；5：Antisense TIMP1 RNA of CFSC-2G cells

图 1 细胞总 RNA 的 RT-PCR 扩增 $TIMP_1$ RNA

Fig 1 Amplification of TIMP1 gene in Ito cells with RT-PCR

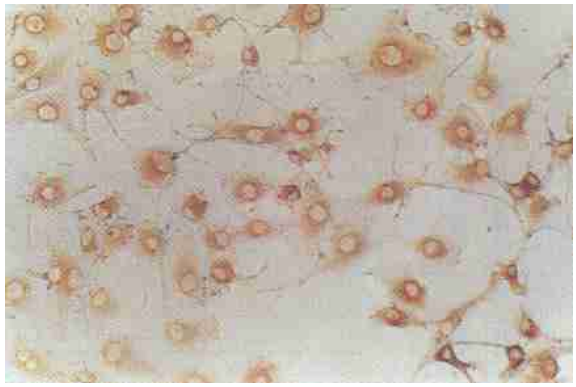


图 2 CFSC-2G 细胞 $TIMP_1$ 免疫组化染色示强阳性 （S-P×100）

Fig 2 Expression of TIMP1 protein in CFSC-2G cells （S-P×100）

表 1 反义 $TIMP_1$ 基因对 Ito 细胞 $TIMP_1$ mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effects of antisense TIMP1 gene on TIMP1 mRNA expression in Ito cells（$\bar{x}\pm s$）

Group	$TIMP_1$ mRNA
CFSC-2GAT	0.51±0.07△
CFSC-2G	0.92±0.05

△：$P<0.01$ *vs* CFSC-2G

表 2 反义 $TIMP_1$ 基因对 Ito 细胞 $TIMP_1$ 蛋白表达的影响（$\times 10^{-4}$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effects of antisense TIMP1 gene on TIMP1 protein expression in Ito cells（$\times 10^{-4}$，$\bar{x}\pm s$）

Group	$TIMP_1$ protein
CFSC-2GAT	10 209±2 445△
CFSC-2G	33 108±4 089

△：$P<0.01$ *vs* CFSC-2G

2.3 反义 $TIMP_1$ 基因对贮脂细胞细胞外基质合成的影响

原位杂交及免疫组化显示，转染反义 $TIMP_1$ 基因的贮脂细胞 α_1（Ⅲ）mRNA 和 FN 蛋白的表达与未转基因组细胞比较无明最差异（$P>0.05$），见图 3，4，表 3。

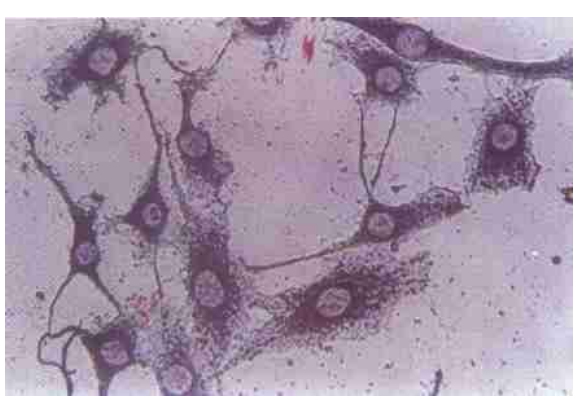


图 3 转基因细胞Ⅲ型胶原 α_1 链 mRNA 的表达仍见强阳性表达，变化不明显 （ISH×200）

Fig 3 Expression of α1（Ⅲ）mRNA in CFSC-2G and CFSC-2GAT cells （ISH×200）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

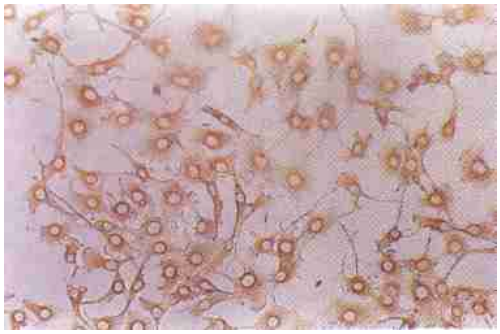


图 4　转基因细胞 FN 免疫组化仍见强阳性染色, 与未转基因细胞(CFSC-2G)比较, 无明显变化　(S-P× 100)

Fig 4　Expression of FN protein in CFSC-2GAT and CFSC-2G cells　(S-P× 100)

表 3　反义 $TIMP_1$ 对 Ito 细胞 α_1(Ⅲ) mRNA 和 FN 蛋白的影响($\times 10^{-4}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of antisense TIMP1 gene on α1 (Ⅲ) mRNA and FN protein in Ito cells($\times 10^{-4}$, $\bar{x}\pm s$)

Group	α_1(Ⅲ) mRNA	FN protein
CFSC-2GAT	53 133±5 820△	33 092±6 711△
CFSC-2G	53 149±5 296	32 706±6 790

△: $P>0.05$ *vs* CFSC-2G

2.4　反义 $TIMP_1$ 基因对贮脂细胞内 MMP_1 mRNA 表达和蛋白合成的影响

原位杂交及免疫组化显示, 转染反义 $TIMP_1$ 基因的贮脂细胞 MMP_1mRNA 和蛋白的表达与未转基因组细胞比较无明显差异($P>0.05$), 见图 5, 6, 表 4。

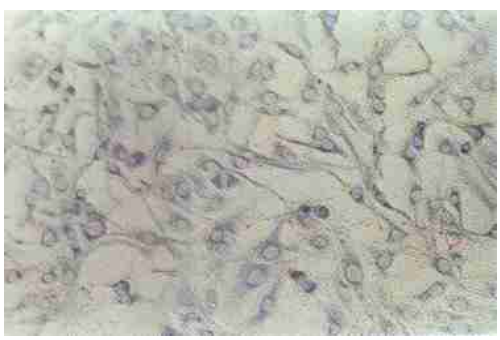


图 5　转基因细胞 MMP_1 mRNA 仍见强阳性表达, 与未转基因细胞相较变化不明显　(ISH× 100)

Fig 5　Expression of MMP1 mRNA in CFSC－2GAT and CFSC-2G cells　(ISH× 100)

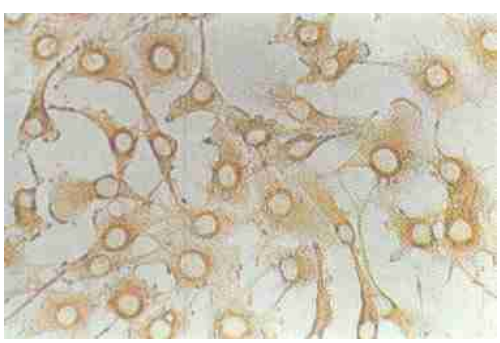


图 6　转基因细胞 MMP_1 免疫组化见强阳性染色, 与未转基因细胞(CFSC-2G)比较, 无明显变化　(S-P× 200)

Fig 6　Expression of MMP1 protein in CFSC－2GAT and CFSC-2G cells　(S-P× 200)

表 4　反义 $TIMP_1$ 对 Ito 细胞内 MMP_1 mRNA 和蛋白表达的影响($\times 10^{-4}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effects of antisense TIMP1 gene on MMP1 mRNA and protein in Ito cells($\times 10^{-4}$, $\bar{x}\pm s$)

Group	MMP_1 mRNA	MMP_1 protein
CFSC-2GAT	23 641±2 080△	20 429±3 017△
CFSC-2G	24 189±1 963	19 782±2 789

△: $P>0.05$ *vs* CFSC-2G

2.5　反义 $TIMP_1$ 基因对贮脂细胞培养上清中细胞外基质降解的影响

结果显示转基因贮脂细胞培养上清中 PCⅠ、PCⅢ、HA、LN 的浓度明显低于未转基因细胞($P<0.01$)。

3　讨论

现已证明, 纤维化肝脏中 ECM 的过多堆积, 一方面是由于贮脂细胞产生 ECM 增多, 另一方面是因为激活的贮脂细胞合成分泌了大量的 $TIMP_1$, 并随着肝纤维化的进展, $TIMP_1$ 的表达持续升高, 抑制了 MMPs 的活性, 导致了 ECM 降解减少[5~8], 因此, 如能抑制 $TIMP_1$ 的高表达, 将解除其对 MMPs 的抑制作用, 增加 MMPs 的 ECM 降解活性, 达到降解这种过多堆积在肝脏中的 ECM、逆转治疗肝纤维的目的。

本研究结果表明反义 $TIMP_1$ 基因的转入, 确能抑制贮脂细胞中内源性 $TIMP_1$ 的高表达。另外, 我们通过检测贮脂细胞培养上清中细胞外基质成分 PCⅠ、PCⅢ、HA、LN 的水平来反映贮脂细胞细胞外基质的合成和降解状况, 结果发现转基因细胞培养上清中 PCⅠ、PCⅢ、HA、LN 浓度明显降低。但原位杂交和免疫组化的结果显示转基因后贮脂细胞表达 α_1(Ⅲ) mRNA 和 FN 蛋白的水平并未发生变化, 表明反义 $TIMP_1$ 基因的转入并未减少或抑制贮脂细胞的细胞外基质合成。而转基因细胞培养上清中 ECM 成分的减少则归因于贮脂细胞 $TIMP_1$ 表达受抑制的结果。

原位杂交和免疫组化的结果表明, 反义 $TIMP_1$ 基因的转入并未影响的 MMP_1 表达, 但 $TIMP_1$ 表达的下调势必会增加贮脂细胞培养上清中 MMPs 的活性, 促进了上清中 ECM 的降解, 导致了 ECM 水平的下降。因此, 我们认为反义 $TIMP_1$ 基因能通过抑制贮脂细胞 $TIMP_1$ 的表达, 促进 ECM 的降解, 这可能对肝纤维化的进程有一定程度的改善和逆转作用。

参考文献:

[1] Gressner A M. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogensis[J]. Kidney Int Suppl, 1996, 54(3): S39.

[2] Li D, Friedman S L. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy[J]. J. Gastroentero and Hepato, 1999, 14(5): 618－633.

[3] McCrudden R, Iredale J P. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tis-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

sue inhibitors of metalloproteinases[J]. Histol Histopathol, 2000, 15(4): 1 159—1 168.
[4] 蔡文琴, 王伯彝, 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 406—409.
[5] Arthur M J, Iredle J P, Mann D A. Tissue inhibitors of metalloproteinases: role in liver fibrosis and alcoholic liver diease[J]. Alcohol Clin Exp Res, 1999, 23(2): 940—943.
[6] Ramadori G, Knittel T, Saile B. Fibrosis and altered matrix synthesis[J]. Digestion, 1998, 59(4): 372—375.
[7] Albanis E, Friedman S L. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy[J]. Clin. Liver Dis, 2001, 5(2): 315—334.
[8] Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model [J]. Hepatology, 2000, 32(6): 1 248—1 254.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)06-0712-02

无牙颌伴上颌骨缺损的扣式分段阻塞器赝复体修复

Fastened sectional obturators and denture for dentition and maxillary defects

容国俊, 熊 宇, 冉光亮 （第三军医大学附属西南医院口腔科, 重庆 400038）

因外伤或肿瘤手术后所致单侧上颌骨缺损的病员, 由于牙列丧失, 发音困难, 面形畸变, 给患者的生活和工作带来诸多不便, 直接影响着患者的身心健康。怎样为患者做赝复体修复, 国内外有诸多报道[1], 但往往需要对侧有余留牙帮助固位效果才较好。对予无牙颌伴单侧上颌骨缺损的病员却没有满意的修复方法。1996 年以来, 我科对这类病员用弹性塑料制作扣式连接型分段阻塞器赝复体修复 4 例, 取得了良好效果, 在此予以报告。

1 制作方法与步骤

1.1 上颌缺损区取模

上颌骨缺损后遗留的腔洞, 往往裂口较小, 凹陷深而广。充分利用该腔洞固位, 是无牙颌赝复体修复成功与否的关键[2]。但要取得准确的印模有一定难度, 所以需选用分段印模法。首先将调拌好的打样膏填入大小适中的气球内, 在打样膏结固前充分挤压入腔洞内, 洞口外需留有适量的膨大部分, 待其结固后取出检查, 适合后再戴入, 否则, 重复以上操作。然后用托盘常规取模, 翻制石膏模型。

1.2 制作中空式上颌阻塞器

首先依据石膏模型上腔洞的大小, 制作大小适中的石膏砂球备用; 再以蜡片覆盖洞口, 以获得满意的腭部形态为佳, 雕刻出阻塞器边缘形态和预留按扣连接孔。然后装盒、去蜡, 填充热凝塑料, 填塑料时将预先准备的石膏砂球挤压在塑料中, 加热聚合后取出塑料阻塞器, 挖出阻塞器中的石膏砂球, 并对塑料过厚的部分从内壁处作适当磨除, 然后在病员口内试戴调整, 满意后将阻塞器顶端用自凝塑料封堵, 并打磨光滑, 以利于病人顺利取戴。

1.3 装配弹性塑料扣

预先用弹性塑料制作成按扣固位体 2~3 个, 根据所需力量的大小, 将按扣用金刚砂片切割 3~4 个裂口, 以赋予弹力, 然后用蜡将裂口和扣顶封住, 再用自凝塑料将弹性塑料固位扣固定在前述阻塞器预留的按扣连接孔上, 注意调整好按扣的基底部分, 以后这部分将与全口义齿的基托相连。待自凝塑料固化后, 热水去蜡, 至此扣式阻塞器制作完成, 弹性塑料扣可以在阻塞器上自由开、扣。

1.4 取义齿制作模型

将扣式阻塞器戴入患者口中(注意弹性塑料扣需扣上), 用个别托盘取功能印模, 此时弹性塑料扣的基底部分被埋入打样膏中, 使塑料扣与印模相连, 翻制石膏模型, 获得工作模。这时, 塑料扣被留在了石膏模型上, 而阻塞器却可让病人戴走, 以利于病人语言交流。

1.5 全口义齿制作

常规方法完成全口义齿制作, 但因弹性塑料扣与热凝塑料是机械结合, 所以在其连接处需注意热凝塑料的厚度以保证其强度。完成后的上颌义齿组织面便有了塑料固位扣。至此, 所有制作完成, 见图 1。



图 1 赝复体义齿制作完成情况

2 典型病例

刘××, 男, 58 岁, 左侧上颌骨因肿瘤切除, 无牙颌。采用本研究所述方法行义齿修复。义齿戴用后, 固位良好, 开闭口自如, 发音清楚, 能较好地行使咀嚼功能, 取戴灵活, 病员极为满意。

作者简介: 容国俊(1963—), 男, 四川省绵阳市人, 主管技师, 主要从事口腔修复及口腔正畸方面的研究, 共发表论文 5 篇。电话: (023)68754439

收稿日期: 2001-10-27; 修回日期: 2001-12-29

（下转 715 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net