·脂肪源性干细胞与组织工程专题论著·

雷帕霉素调控光老化成纤维细胞 MMPs 和 COL-1 表达

秦登科[1] 贾传龙[1] 卢勇舟[1] 杨清建[1] 陈亮[1] 吴心愿[1] 任润健[1] 朱晶晶[1]
郭妤[1] 杨平[1] 周轶群[1] 毕波[1] 朱宁文[2] 刘天一[1]

【摘要】 **目的** 探讨雷帕霉素(RAPA)对光老化皮肤成纤维细胞(FBs)基质金属蛋白酶(MMPs)表达和Ⅰ型胶原蛋白(collagen-Ⅰ)合成的影响。**方法** 采用 cck-8 法检测 RAPA 对 FBs 活性的影响,甄选最佳应用浓度,利用 UVB 体外反复照射构建成纤维细胞的老化模型,RAPA 预处理细胞,造模结束 24 h 后,实时荧光定量检测 MMPs 的表达;造模结束 48 h,蛋白质印迹法检测Ⅰ型胶原的表达。**结果** 低剂量 RAPA 对 FBs 的细胞活性无影响,5 μm/L 的 RAPA 作为后续细胞处理的药物浓度为佳。UVB 组的光老化 FBs 中,MMP-1、2、9 的表达均显著升高;而 RAPA 预处理后能明显降低 UVB 引起的 MMPs 过度分泌;同时使Ⅰ型胶原的表达量增多。**结论** RAPA 可降低光老化 FBs 中 MMPs 的表达,增加Ⅰ型胶原的合成,维持光老化皮肤 ECM 成分的稳定,在一定程度上缓解细胞光老化程度。

【关键词】 成纤维细胞;雷帕霉素;光老化;基质金属蛋白酶;Ⅰ型胶原

Regulation of rapamycin on the expression of MMPs and COL-1 in photo-aging fibroblasts

QIN Deng-ke, JIA Chuan-long, LU Yong-zhou, YANG Qing-jian, CHEN Liang, WU Xin-yuan, REN Run-jian, ZHU Jing-jing, GUO Yu, YANG Ping, ZHOU Yi-qun, BI Bo, ZHU Ning-wen, LIU Tian-yi. (*Department of Plastic Surgery, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China*)

Corresponding author: LIU Tian-yi, Email:tianyiliucn@163.com

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the influence of rapamycin (RAPA) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and the synthesis of type I collagen (collagen-I) in photo-aging skin fibroblasts (FBs). **Methods** The best concentration was selected by the effect of RAPA on the proliferative activity of FBs tested by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The photo-aging model of FBs was structured by repeated UVB radiation. The cells were pretreated with RAPA. The influence of RAPA on the expression of MMPs of photo-aging skin FBs was detected by real-time fluorescence quantitative PCR at 24 hours after modeling and the synthesis of collagen I was detected by western blotting at 48 h after modeling. **Results** The proliferative activity of fibroblasts was not affected by RAPA in a low dose manner, 5 μm/L was the best concentration for the subsequent treatment. The UVB irradiation increased the expressions of MMP-1, 2, 9 of FBs. RAPA pretreatment significantly decreased expression of MMPs caused by UVB and increased the expression of collagen I. **Conclusion** RAPA can maintain the metabolic balance of dermal ECM by decreasing the expression of MMPs and increasing the synthesis of collagen I in photo-aging FBs, and to a certain extent, alleviate the degree of cell photoaging.

【**Key words**】 Fibroblast; Rapamycin; Photoaging; Matrix metalloproteinases; Collagen-I

皮肤的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)主要由皮肤成纤维细胞分泌的Ⅰ型胶原蛋白组成,对于维持皮肤张力和承受力具有重要作用[1]。紫外线的照射会导致皮肤的光老化,表现为皮肤皱纹增加、弹性降低、色素沉着等[2],这与 UVB 照射导致的基质金属蛋白酶分泌增加及Ⅰ型胶原蛋白合成减少有关[3]。最近的研究证明,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路的抑制剂雷帕霉素(rapamycin, RAPA),作为一种新型的大环内酯类免疫抑制剂,具有调节衰老,改善细胞应激的作用[4]。自 2016 年 9 月至 2017 年 3 月,我们利用此前构建的体外成纤维细胞(fibroblast, FBs)光老化模型[2],通过 RAPA 预处理并做相关检测,探索 PAPA 是否能够改善因 UVB 照射而导致 ECM 的紊乱生物学状态。

1 材料与方法

1.1 小鼠皮肤 FBs 的获取 取 1~3 d SPF 级 C57BL/6 小鼠,乙醚麻醉处死,浸泡于 75%乙醇中约 10 min,用 DMEM 洗去残留乙醇,置于培养皿中;用剪刀分离背部皮肤,剪下皮肤组织块约 1 cm×1 cm,立即置于 2%中性蛋白酶中,4℃冰箱中过夜; 第 2 天

DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.006
基金项目:国家自然科学基金(81272125)
作者单位:复旦大学附属华东医院(1.整形外科;2.皮肤科),上海 200040
通信作者:刘天一,Email:tianyiliucn@163.com

将皮肤取出，用镊子分离表皮真皮，将真皮剪碎后，置于 0.1%胶原酶中，37℃恒温摇床消化 1.5 h，至组织块基本消失；1500 r/min 离心 5 min，收集沉淀，弃上清，制成 DMEM+10% FBs 悬液，吹打均匀后以约 2×10^5/cm^2 的密度接种于培养皿，于 37℃、5% CO_2、100%饱和湿度的条件下培养，接近 80%～90%融合进行传代，比例约为 1:4。

1.2　药物处理及光老化模型的建立　选用 P1 代细胞，用含不同浓度 RAPA 的 DMEM+10%FBs 处理 48 h。cck-8 检测细胞活性，选取最适浓度。实验共分 4 组：第 1 组，正常 FBs；第 2 组，RAPA 预处理的正常皮肤 FBs；第 3 组，UVB 照射后的光老化 FBs；第 4组，经过 RAPA 预处理后，UVB 照射构建的光老化 FBs。然后，采用此前本研究小组确立的通过 UVB 照射所建造 FBs 的光老化模型，移去培养液，覆盖薄层磷酸盐缓冲液（phosphate bufferedsolution, PBS）；打开盖子，置于 UVB 灯管正下方进行首次照射，120 mJ/cm^2，照射后吸去 PBS，加入 10.0 ml DMEM+1% FBs 继续培养，每隔 12 h 照射 1 次，120 s/ 次，共 4 次，末次照射改为 DMEM+10%FBs 培养[2]。

1.3　Real-time PCR 检测 mRNA 含量　末次照射 24 h 后，移除培养液，PBS 冲洗 3 遍，加入 1.0 ml 细胞裂解液，室温静置 5 min，使其充分裂解，然后移至 1.5 ml EP 管中，加入氯仿 400 μl，剧烈震荡 30 s，冰上静置 15 min，12 000 r/min，4℃离心 10 min；吸取上层水相，加入 500 μl 异丙醇，冰上静置 10 min，12 000 r/min，4℃离心 10 min；弃上清液，加入 75%乙醇洗涤，7500 r/min，4℃离心 5 min；用 50 μl DEPC 水溶解 RNA 并用紫外分光光度计测定浓度。按每管 2 μg RNA 进行逆转录反应（TAKARA），反应体系为缓冲液 4 μl，脱氧核糖核苷三磷酸 1 μl，寡核苷酸 1 μl，逆转录酶 1 μl，酶抑制剂 1 μl，RNA 及 H_2O 共 12 μl。30℃ 10 min，42℃ 60 min，4℃保存。实时荧光定量 PCR 体系为预混液 10 μl，上游及下游引物各 1 μl，cDNA 1 μl，DEPC 水 7 μl。引物序列见表 1。反应条件为热启动 95℃ 10 min，随后 95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 45 s，共 40 循环。

1.4　统计学处理　利用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组间的比较采用方差分析，P<0.05 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　RAPA 对小鼠 FBs 活性的影响　为选择最适的 RAPA 浓度处理细胞进行后续实验，我们分别用含有不同浓度 RAPA 的 DMEM+10% FBs 处理小鼠的 FBs，发现在 48 h 的处理时间内，较低浓度的（0~5 μm/L）RAPA 对细胞的活性不产生影响，而较高浓度（10 μm/L）的 RAPA 会产生细胞毒性（$P\leqslant$0.05），抑制细胞增殖。因此，我们选择 5 μm/L 的 RAPA 作为后续细胞处理的药物浓度。见图 1。

表 1　引物序列

基因		序列（5′ to 3′）
Collagen Ⅰ	F	CCA GTG GCG GTT ATG ACT
	R	GCT GCG GAT GTT CTC AAT
MMP-1	F	ACT TTG AGA ACA CGG GGA
	R	CGG GGA TAA TCT TTG TCC
MMP-2	F	ATT CTG TCC CGA GAC CGC
	R	CAC CAC ACC TTG CCA TCG
MMP-9	F	ACG ATA AGG ACG GCA AAT
	R	CA AAG ATG AAC GGG AAC AC
GAPDH	F	TGG TGA AGG TCG GTG TG
	R	GG TCA ATG AAG GGG TCG TT

2.2　RAPA 降低光老化 FBs 中 MMPs 的表达　经 5 μm/L RAPA 处理后，体外建立光老化 FBs 模型，继续培养 24 h。实时荧光定量 PCR 检测显示，UVB 组与 Ctrl 组相比，MMP-1，2，9 的表达分别增加 3.4，4.1，8.8 倍；而 UVB +RAPA 组与 UVB 组相比，MMP-1，2，9 的表达分别下降 38.2%，48.7%，35.2%，差异有统计学意义（P<0.05）。见图 2。

2.3　RAPA 可以增加光老化 Fbs 中Ⅰ型胶原的产生　经5 μm/L RAPA 处理后，体外建立光老化 FBs 模型，继续培养 48 h。PCR 检测结果显示，UVB 模型组与 Ctrl 组相比，Ⅰ型胶原表达明显下降，为 Ctrl 组的 47.8%；而 RAPA 可以缓解 UVB 对 FBs Ⅰ型胶原合成的抑制，差异具有统计学意义（P< 0.05）。见图 3。

3　讨论

外源性因素是导致皮肤老化的重要原因，包括吸烟、环境污染、紫外线照射等[5]。其中 UVB 照射是导致皮肤老化的主要外源性因素，又称为皮肤光老化，主要表现为皮肤色素沉着、皱纹增多及弹性降低等[6]。本实验根据我们课题组之前的研究，利用 UVB 每天 120 mJ/cm^2 连续 2 d 照射小鼠的 FBs，可以导致 MMPs 分泌增多，Ⅰ型胶原合成减少，从而成功地建立了新的应激诱导提前衰老的模型[2]。

胶原纤维是组成皮肤蛋白质的主要成分，也是评估成纤维细胞老化状态的最重要参数之一。正常情况下，占皮肤干重的 70%～80%，而其中Ⅰ型胶原则占 80%，是真皮中最主要的胶原成分[7]。Ⅰ型胶原在真皮中聚集成与皮面平行的粗大纤维束，相互交织成网，使得皮肤外观充盈饱满，维持了皮肤正常弹性和强度[8]。通过正常的合成和分解代谢，胶原

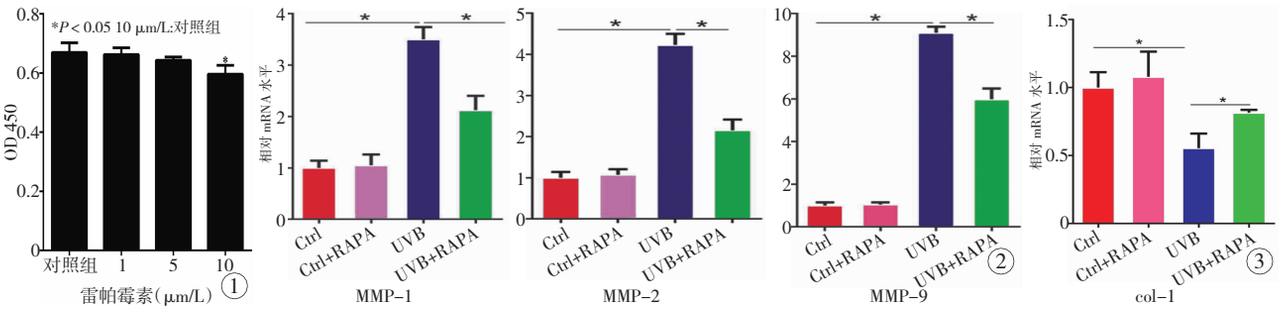

图 1　不同浓度的 RAPA 对小鼠皮肤 FBs 活性的影响　**图 2**　RAPA 对 UVB 诱导的 FBs MMPs 的影响　**图 3**　RAPA 对 UVB 诱导 FBs Ⅰ型胶原表达的影响(荧光定量 PCR)

成分的结构和数量都保持相对的平衡。在病理状态下,合成分解失去了平衡而导致胶原的异常,在分解机制中，基质金属蛋白酶(metalloproteinases, MMPs)是最重要的参与因素之一,它是一类锌离子依赖的蛋白酶超家族,参与组织修复、血管生成、肿瘤转移、宿主防御等多种生理功能[9]。在光老化的进程中,MMPs 可以降解Ⅰ型胶原,破坏和重组 ECM,导致皮肤结缔组织结构的重建，加剧的皮肤老化。紫外线照射会上调皮肤中 MMPs 的分泌,参与光老化进程中主要包括降解Ⅰ型、Ⅲ型胶原的 MMP-1(胶原酶)、MMP-2(明胶酶 A)、MMP-9(明胶酶 B)以及降解基底膜中Ⅳ型胶原的 MMP-3（基质溶解素)等[10]。UVB 照射会导致细胞产生大量的 ROS,包括 $O_2^{\cdot-}$、H_2O_2 及 $HO_2^{\cdot}$、$\dot{O}H$ 等[11]。这些物质可以使细胞膜表面的磷酸化增加,从而活化丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,激活蛋白 -1(activator protein-1, AP-1)等信号通路,使 MMP-1、MMP-2、MMP-9 的分泌增加，胶原的降解增多[12]。AP-1 的上调还可以抑制转化生长因子 -β(transforming growth factor-β, TGF-β)通路,导致胶原的合成减少,同时促进 MMP-1 的分泌增加,促进胶原的分解[13-14]。UVB 的照射还会导致激活核因子 Kappa B(nuclear factor Kappa B, NF-KB)通路的激活，诱导炎症因子如白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF)等表达的增多,促进 MMPs 的分泌增多,从而使胶原降解[15]。在本实验中,UVB 照射组 MMP-1,-2,-9 的分泌量,分别比 Ctrl 组增加 4.5,6.1,13.8 倍,而Ⅰ型胶原的分泌量为 Ctrl 组的 50%,从而进一步验证了我们建立的光老化模型的合理性。

RAPA 是一种大环内酯类化合物，主要用来抑制器官移植后产生的免疫排斥反应,还可以改善神经退行性疾病,如帕金森和阿尔茨海默病的进展[16]。研究证明,RAPA 在改善氧化应激反应、延缓衰老过程等方面发挥着重要作用[17]。RAPA 可以通过抑制 mTOR 受体活性,诱导细胞发生自噬,清除细胞内衰老的蛋白和细胞器,起到抗老化的作用[18]。Kang 等发现,用 RAPA 处理后可以降低 ROS 的产生并且延长人正常 FBs 的寿命[19]。RAPA 可以抑制 MAPK 通路的激活,通过上调对应激的适应能力来提高细胞的生存率[20]。同时,Finkel 等[21]研究证明,RAPA 预处理后可以减少 ROS 和总体炎症因子的产生,从而降低辐射对上皮干细胞造成的损伤。

本实验在 0.01~10 μmol/L 之间选取合适的药物处理浓度，预处理 48 h 后经过检测发现,PAPA 确实可以明显抑制因 UVB 照射而导致多种 MMPs 分泌增多,同时增加了Ⅰ型胶原的合成,延缓了 FBs 的老化进程,为预防和治疗光老化提供了一个新的思路。但是 RAPA 是如何影响调控光老化细胞周期的阻滞,是通过其诱导的自噬或是与衰老相关信号通路的激活,这是我们下一步需要研究的内容。

参考文献:

[1] 卢勇舟, 陈亮, 毕波, 等. 胶原蛋白碎片对光老化真皮细胞外基质的影响[J]. 中国美容整形外科杂志, 2015,26(4):213-215.

[2] Zeng JP, Bi B, Chen L, et al. Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of UVB leads to premature senescence: a robust model of cellular photoaging[J]. J Dermatol Sci, 2014,73(1):49-56.

[3] Chen L, Bi B, Zeng J, et al. Rosiglitazone ameliorates senescence-like phenotypes in a cellular photoaging model[J]. J Dermatol Sci, 2015,77(3):173-181.

[4] Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, et al. Rapamycin decelerates cellular senescence[J]. Cell Cycle, 2009,8(12):1888-1895.

[5] Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, et al. Skin ageing[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011,25(8):873-884.

[6] 陈亮, 毕波, 曾继平, 等. 罗格列酮对 UVB 诱导的小鼠光老化皮肤成纤维细胞 MMPs 表达和细胞外基质蛋白合成的影响[J].

(下转 732 页)

decellularized porcine tendon using tributyl phosphate[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011,96(2):199-206.
[7] Yu C, Bianco J, Brown C, et al. Porous decellularized adipose tissue foams for soft tissue regeneration[J]. Biomaterial, 2013,34(13):3290.
[8] Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, et al. Decellularized rhesusmonkey kidney as a three-dimensional scaffold for rena tiss ueengineering[J]. Tissue Eng Part R, 2010,16(7):2207-2216.
[9] 解传飚, 林月秋, 阮默, 等. Edc 交联改性的脱细胞异种(猪)肌腱生物学特性研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2010,28(4):425.
[10] 潘明新, 程远, 汪燕, 等. 去细胞化肝脏生物支架材料的制备[J]. 南方医科大学学报, 2011,31(1):69-72.
[11] De Carlo E, Baiguera S, Conconi MT, et al. Pancreatic acellular matrixsupports islet survival and function in a synthetic tubular device: in vitro and in vivo studies[J]. Int J Mol Med, 2010,25(2):195.
[12] Choi JS, Kim BS, Kim JY, et al. Decellularized extracellular matrix derived from human adipose tissue as a potential scaffold for allograftissue engineering[J]. J Biomed Mater Res A, 2011,97(3):292-299.
[13] Mangold S, Schrammel S, Huber G, et al. Evaluation of decellularized human umbilical vein (HUV) for vascular tissue engineering-comparison with endothelium-denuded HUV[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015,9(1):13-23.
[14] Turner AE, Yu C, Bianco J, et al. The performance of decellularized adipose tissue microcarriers as an inductive substrate for human adipose-derived stem cells[J]. Biomaterials, 2012,33(18):4490-4499.
[15] Yu C, Bianco J, Brown C, et al. Porous decellularized adipose tissue foams for soft tissue regeneration[J]. Biomaterials, 2013,34(13):3290-3302.
[16] Eto H, Suga H, Matsumoto D, et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue[J]. Plast Reconstr Surg, 2009,124(4):1087-1097.
[17] Barakat O, Abbasi S, Rodriguez G, et al. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ[J]. J Surg Res, 2012,173(1):11-25
[18] Park KD, Wang X, Lee JY, et al. Research trends in biomimetic medical materials for tissue engineering: commentary[J]. Biomater Res, 2016,20:8.
[19] Vranka JA, Kelley MJ, Acott TS, et al. Extracellular matrix in the trabecular meshwork: intraocular pressure regulation and dysregulation in glaucoma[J]. Exp Eye Res, 2015,133:112-125
[20] Wang L, Johnson JA, Zhang Q, et al. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering[J]. Acta Biomaterialia, 2013,9(11):8921-8931.
[21] Wu I, Nahas Z, Kimmerling KA, et al. An injectable adipose matrix for soft tissue reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 2012,129(6):1247-1257.

（收稿日期：2017-07-30）

本文引用格式：廖选, 刘宏伟. 脂肪组织脱细胞基质研究现状及展望[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(12):729-732. DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.008.

（上接 725 页）

中国美容整形外科杂志, 2015,26(8):500-503.
[7] Kim EJ, Kim YK, Kim M, et al. UV-induced inhibition of adipokine production in subcutaneous fat aggravates dermal matrix degradation in human skin[J]. Scientific Reports, 2016,6:25616.
[8] Sun Z, Hwang E, Park SY, et al. Angelica archangelia prevented collagen degradation by blocking production of matrix metalloproteinases in UVB-exposed dermal fibroblasts[J]. Photochem Photobiol, 2016,92(4):604-610.
[9] Karthikeyan R, Kanimozhi G, Prasad NR, et al. 7-Hydroxycoumarin prevents UVB-induced activation of NF-kappaB and subsequent overexpression of matrix metalloproteinases and inflammatory markers in human dermal fibroblast cells[J]. J Photochem Photobiol B, 2016,161:170-176.
[10] Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, et al. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2016,17(6)[2016].
[11] Baek B, Lee SH, Kim K, et al. Ellagic acid plays a protective role against UV-B-induced oxidative stress by up-regulating antioxidant components in human dermal fibroblasts[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2016,20(3):269-277.
[12] Lu J, Guo JH, Tu XL, et al. Tiron inhibits UVB-induced AP-1 binding sites transcriptional activation on MMP-1 and MMP-3 promoters by MAPK signaling pathway in Human dermal fibroblasts[J]. PLoS One, 2016,11(8):e159998.
[13] Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez JA, et al. Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals[J]. Antioxidants (Basel), 2015,4(2):248-268.
[14] Bravo K, Duque L, Ferreres F, et al. Passiflora tarminiana fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts[J]. J Photochem Photobiol B, 2017,168:78-88.
[15] Bae JS, Han M, Shin HS, et al. Perilla frutescens leaves extract ameliorates ultraviolet radiation-induced extracellular matrix damage in human dermal fibroblasts and hairless mice skin[J]. J Ethnopharmacol, 2017,195:334-342.
[16] Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging[J]. Cell, 2011,146(5):682-695.
[17] Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease[J]. Redox Biol, 2013,2:82-90.
[18] Nacarelli T, Azar A, Sell C. Inhibition of mTOR prevents ROS production initiated by ethidium bromide-induced mitochondrial DNA depletion[J]. Front Endocrinol, 2014,5:122.
[19] Kang HT, Lee KB, Kim SY, et al. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts[J]. PLoS One, 2011,6(8):e23367.
[20] Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes[J]. Biochem Soc Trans, 2009,37(Pt 1):217.
[21] Finkel T. Relief with rapamycin: mTOR inhibition protects against radiation-induced mucositis[J]. Cell Stem Cell, 2012,11(3):287-288.

（收稿日期：2017-07-02）

本文引用格式：秦登科, 贾传龙, 卢勇舟, 等. 雷帕霉素调控光老化成纤维细胞 MMPs 和 COL-1 表达[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(12):723-725,732.DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.006.