

极低频电磁辐射下 HFSF 中 MMP-2 的表达及作用

田甜 朱煌

【摘要】 目的 研究极低频电磁场(ELF-EMF)作用下人胚胎眼巩膜成纤维细胞(HFSF)中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)活性与蛋白表达的变化以及 ELF-EMF 对 I 型胶原(Collagen I)合成的影响。方法 实验研究。根据是否暴露于 50 Hz、0.2 mT 电磁场或加入 MMP-2 特异性抑制剂(sc-204092),将实验细胞分为对照组、辐照组和抑制剂组。明胶酶谱法检测各组 HFSF 中 MMP-2 酶活性的变化;Western Blot 法检测各组 HFSF 中 MMP-2、Collagen I 蛋白水平的变化。采用单因素方差分析进行数据分析。结果 3 组 HFSF 细胞中 MMP-2 酶活性、MMP-2、Collagen I 蛋白表达比较差异均具有统计学意义($F=14.96$ 、 139.88 、 63.46 , P 均 <0.01);辐照组较对照组 MMP-2 酶活性和蛋白表达升高($P<0.05$),Collagen I 蛋白表达下降($P<0.01$);抑制剂组较辐照组 MMP-2 酶活性和蛋白表达下降($P<0.01$),Collagen I 蛋白表达升高($P<0.05$)。结论 ELF-EMF 可能通过影响体外培养的 HFSF 中 MMP-2 的酶活性和蛋白表达来调节 Collagen I 的合成。

【关键词】 辐射,电离; 巩膜成纤维细胞; 基质金属蛋白酶 2; 胶原 I 型

Expression and effect of matrix metalloproteinase 2 in human fetal scleral fibroblasts treated with an extremely low frequency electromagnetic field Tian Tian, Zhu Huang. Department of Ophthalmology, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Corresponding author: Zhu Huang, Email: drzhuhuang@163.com

【Abstract】 Objective To observe the matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity and protein expression in human fetal scleral fibroblasts (HFSFs) exposed to an extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) and its impact on collagen I synthesis. **Methods** This was an experimental study. HFSFs were cultured and divided into a control group, radiation group and inhibitor group according to their exposure to 50 Hz, 0.2 mT electromagnetic field or joint MMP-2 specific inhibitors (sc-204092). MMP-2 activity was measured by gelatin zymography. MMP-2 and collagen I protein expression were detected by Western Blot. A single factor analysis of variance was used to determine whether there was a difference among these groups. **Results** There were significant differences between the three groups ($F=14.96$, 139.88 , 63.46 , $P<0.01$). Compared to the control group, MMP-2 activity and protein expression increased in the radiation group ($P<0.05$) and collagen I protein expression decreased ($P<0.01$). Compared to the radiation group, MMP-2 activity and protein expression decreased in the inhibitor group ($P<0.01$) and collagen I protein expression increased ($P<0.05$). **Conclusion** ELF-EMF may regulate the synthesis of collagen I by affecting the activity and protein expression of MMP-2.

【Key words】 Radiation, ionizing; Human fetal sclera fibroblast; Matrix metalloproteinase 2; Collagen type I

科学技术迅猛发展的今天,电磁辐射污染,已被公认为继大气污染、水质污染、噪音污染后的第四大环境公害^[1]。尤其由于 iPad 等电子产品在青少年甚

至低龄儿童中的普及,日益庞大的“宅一族”使中国孩子的近视率远高于欧美。有专家进行护眼灯电磁辐射水平调查,提出保护视力的关键是解决光源频闪和电磁辐射^[2]。但有关电磁辐射对近视等视觉系统疾病的研究国内外鲜见报道。本课题组研究发现极低频电磁场(extremely low frequency electromagnetic field, ELF-EMF)可导致豚鼠眼轴变长,屈光度向近视

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.06.004

基金项目:上海市卫生局中药科研基金(2014JP015A)

作者单位:200092 上海交通大学医学院附属新华医院眼科

通信作者:朱煌,Email:drzhuhuang@163.com

方向发展;巩膜组织出现厚度变薄,纤维直径变细,间隙变宽,纤维排列不规则等病理重塑现象^[3],认为 ELF-EMF 可能是影响近视形成的重要因素。巩膜作为眼球的最外层屏障,通过改变细胞外基质的成分及生物力学特性来调节眼轴长度及屈光状态^[4-5]。其中以 I 型胶原(Collagen I)的变性和减少为特征^[6],而基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)是降解巩膜细胞外基质的重要物质^[7]。前期研究我们发现 ELF-EMF 可使体外培养的人胚胎眼巩膜成纤维细胞(human fetal scleral fibroblast, HFSF)中 Collagen I mRNA 表达下降, MMP-2 mRNA 表达升高^[8]。本次研究通过在体外培养的 HFSF 中加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MMP-2 特异性抑制剂(sc-204092),观察 MMP-2 酶活性、蛋白表达的变化以及 I 型胶原的合成情况,进一步明确 MMP-2 在 ELF-EMF 造成的眼后部近视样变中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司);MMP-2 抑制剂(sc-204092,美国 Santa Cruz 公司);明胶酶谱试剂盒(美国 Invitrogen 公司);Western-Blot 相关试剂(大连碧云天公司);MMP-2、Collagen I 抗体(美国 Abcam 公司);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);电泳仪、电转仪、化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司);电磁辐射分析仪 TES-1393(台湾泰仕公司)。

1.2 方法

1.2.1 ELF-EMFs 辐射系统的建立 自制磁场辐照系统,由周长 60 cm、高度 8 cm、168 匝的 Helmholtz 线圈和变压器构成,其中 3 个线圈相互串联后叠放并与细胞培养箱外的变压器相连(见图 1)。用变压器调节线圈内电压大小,使 3 个线圈的空间区域产生一个恒定、均匀的 50 Hz 正弦磁场辐照区,该辐射系统所产生的磁场用电磁辐射分析仪测定。在细胞受磁场辐照时,培养皿中心位于辐照系统的中心轴上。

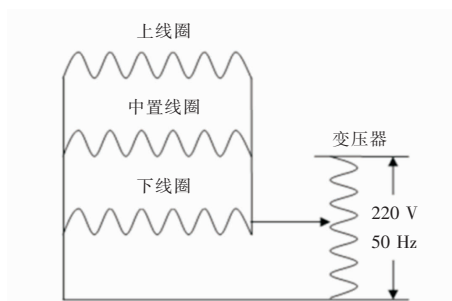


图 1 本项目组建立的电磁辐射系统模拟图

1.2.2 细胞培养及分组 HFSFs 株(编号: 3111C0001CCC000139)购自北京市眼科研究所,用 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素)在 37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养,每 48 h 更换新鲜培养液,待细胞融合长满瓶底 80%左右,按 1:3 比例消化传代。每次实验均取自同一批传代细胞,经胰蛋白酶消化后以 3×10^5 个/孔的细胞密度铺 6 孔板,待细胞全部贴壁后更换新鲜培养基分组培养,抑制剂组加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MMP-2 特异性抑制剂 sc-204092。辐照组与抑制剂组的细胞置于 0.2 mT、50 Hz 的电磁辐射系统中,对照组置于同等条件未通电的相同线圈系统中,继续培养 24 h。

1.2.3 明胶酶谱法检测 MMP-2 酶活性 收集各组细胞培养液,离心得上清,测细胞蛋白浓度,根据测得的蛋白浓度计算上清上样体积。SDS-PAGE 明胶电泳,110 V 电泳至浓缩胶与分离胶交界处,再改为 120 V 直至溴酚蓝跑出胶外;电泳结束后,将凝胶在复性缓冲液中振荡洗脱 2 次,每次 45 min,入显影缓冲液振荡平衡 30 min,再置新鲜显影液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;凝胶入染液中染色 5 h 后,再入双蒸水中轻柔振荡洗脱 7 h,得到蓝色背景上的透亮带即是明胶被 MMP-2 降解;用 Bio-Rad 凝胶图像分析系统拍照,读取条带面积和灰度值。

1.2.4 Western Blot 检测 MMP-2、Collagen I 蛋白表达水平 提取各组细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。煮沸 10 min 使蛋白变性。配制 10%SDS-PAGE 凝胶,蛋白上样,各孔上样总蛋白量相等。电泳仪电泳,湿法电转仪转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,PBS 洗涤 3 次。孵育 MMP-2(1:2 000),Collagen I 一抗(1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗涤 3 次后加入山羊抗鼠、山羊抗兔二抗,室温孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次。避光加 ECL 化学发光液,利用化学发光成像系统检测蛋白条带及条带灰度值。

1.3 统计学方法

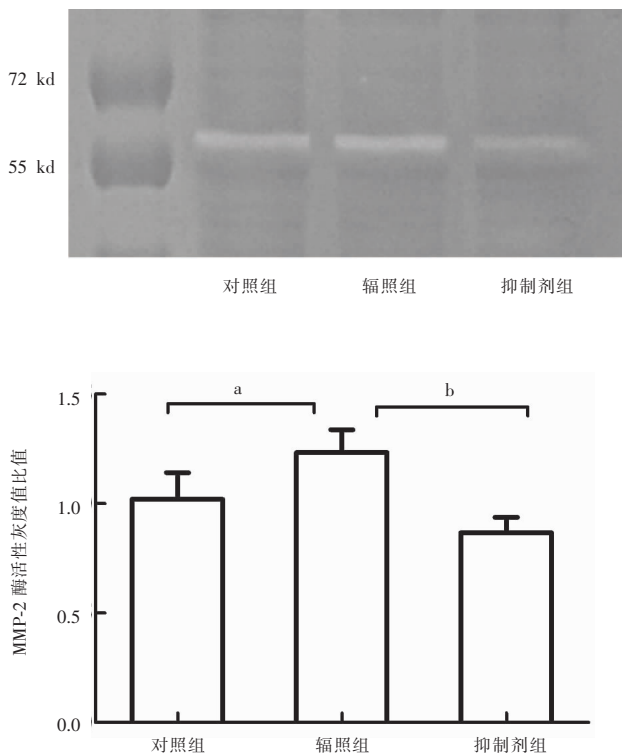
实验研究。采用 SPSS 17.0 对结果进行处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 LSD 检验分析数据。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 明胶酶谱法检测 MMP-2 酶活性结果

3 组 HFSF 细胞中 MMP-2 酶活性的组间比较差异具有统计学意义($F=14.96, P < 0.01$)。暴露于 0.2 mT、50 Hz 电磁辐射系统 24 h 后,HFSF 细胞 MMP-2 酶活性增高,辐照组和对照组相比,代表

MMP-2 酶活性的条带灰度值升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 加入 sc-204092 的抑制剂组与单纯辐照组比较, HFSF 细胞 MMP-2 酶活性下降, 代表 MMP-2 酶活性的条带灰度值降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2。

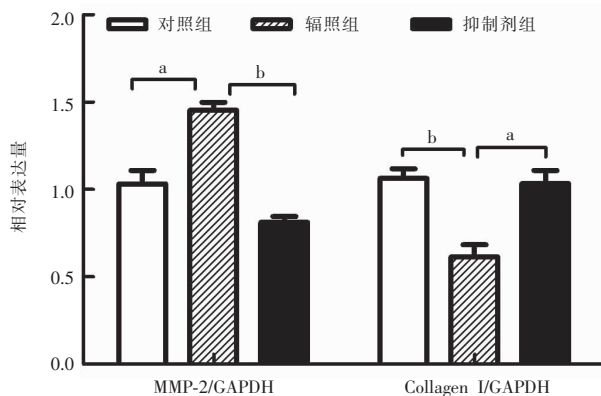
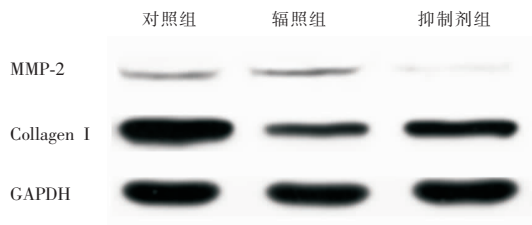


辐照组与对照组比, 代表基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 酶活性的条带灰度值升高 ($P < 0.05$); 抑制剂组与辐照组比, 代表 MMP-2 酶活性的条带灰度值降低 ($P < 0.01$) ($^a P < 0.05, ^b P < 0.01$)

图 2 各组人胚胎巩膜成纤维细胞 MMP-2 酶活性变化 (24 h, 0.2 mT, 50 Hz)

2.2 Western Blot 检测 MMP-2、Collagen I 蛋白结果

3 组 HFSF 细胞中, MMP-2、Collagen I 蛋白表达的组间比较差异均具有统计学意义 ($F=139.88, P < 0.01; F=63.46, P < 0.01$)。HFSF 暴露于 0.2 mT、50 Hz 电磁辐射系统 24 h 后细胞内 MMP-2 蛋白表达升高, 辐照组和对照组相比, MMP-2/GAPDH 灰度值比值增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Collagen I 蛋白表达下降, 辐照组和对照组相比, Collagen I/GAPDH 灰度值比值减小, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。加入 sc-204092 的抑制剂组与辐照组比较, 细胞内 MMP-2 蛋白表达降低, MMP-2/GAPDH 灰度值比值下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Collagen I 蛋白表达升高, Collagen I/GAPDH 灰度值比值增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。



辐照组与对照组比, 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)/GAPDH 灰度值比值增加 ($P < 0.05$), I 型胶原 (Collagen I)/GAPDH 灰度值比值减小 ($P < 0.01$); 抑制剂组与辐照组比, MMP-2/GAPDH 灰度值比值下降 ($P < 0.01$), Collagen I/GAPDH 灰度值比值增高 ($P < 0.05$) ($^a P < 0.05, ^b P < 0.01$)

图 3 各组人胚胎巩膜成纤维细胞 (HFSF 中) MMP-2 与 Collagen I 蛋白表达情况 (24 h, 0.2 mT, 50 Hz)

3 讨论

近视的机制研究一直是眼科领域的热点问题, 实验性近视的常规模型为形觉剥夺和光学离焦, 虽以上方法都能制作出近视的动物模型, 但这些模型并不能代表全部近视的原因, 且从本质上讲与人类后天获得性近视的发生仍有差别, 因此, 如何制作与人类后天获得性近视相近的近视动物模型或寻找到更多有价值的影响因素是许多眼科工作者研究的方向。

ELF-EMF 是指电力传输线、电力设施或电器产生的频率在 0~300 Hz 的电磁辐射。国际上从分子生物学、流行病学等角度进行了大量医学调查及实验, 发现长期暴露于 ELF-EMF 能增加肿瘤 (尤其是白血病、脑瘤和乳腺癌等) 发生的概率, 在一定程度上具有促癌效应, 并且对神经、免疫、内分泌和生殖系统也有影响^[9]。长时间近距离接触电视、电脑、手机、iPad 等电器, 使眼球长期直接暴露在这些设备所发出的极低频电磁辐射中, 是否会对近视的发生发展造成一定的影响值得探究。ELF-EMF 可以损伤角膜、结膜、晶状体和视网膜的研究已有报道^[10], 但

对于巩膜作用的报道较少。巩膜病理性重塑是近视形成过程中的重要环节,研究表明以 Collagen I 减少为特征的巩膜细胞外基质病理性重塑是导致眼轴延长和近视性屈光改变的重要原因,基质金属蛋白酶(MMPs)作为降解细胞外基质最主要的酶家族,在近视的形成与发展过程中占有重要地位,尤其是 MMP-2,其活性和蛋白表达的增高是近视形成过程中的典型表现^[5]。王淑然等^[7]观察负透镜诱导豚鼠离焦性近视发生时巩膜 MMP-2 的变化,提出近视发生过程中可能存在 MMP-2 参与的眼后部巩膜细胞外基质改变。邹蕾蕾等^[11]利用 RNA 干扰技术敲除人巩膜成纤维细胞中的 MMP-2 后,检测到 Collagen I 蛋白的表达显著增加。关于 MMP-2 酶活性的研究发现,近视过程中活化的 MMP-2 明显增多,提示 MMP-2 活性增高在近视的发病机制中发挥作用^[12]。

前期研究中,我们发现 ELF-EMF 对豚鼠眼球发育有一定的影响,随辐射时间延长豚鼠眼轴变长,屈光度向近视方向发展;巩膜组织较对照组出现巩膜厚度变薄、纤维直径变细、间隙变宽、纤维排列不规则等病理重塑现象^[3]。且 ELF-EMF 可使 HFSF 细胞中 MMP-2 mRNA 表达升高, Collagen I mRNA 表达下降^[8],认为 ELF-EMF 可能是影响近视形成的一个重要因素。此次研究,我们通过在外体培养的 HFSF 中加入 MMP-2 特异性抑制剂(sc-204092),观察 HFSF 中 MMP-2 的酶活性和蛋白表达以及 Collagen I 合成的变化,进一步明确 MMP-2 在 ELF-EMF 造成的眼后部近视样变中的作用。结果显示,3 组 HFSF 细胞中 MMP-2 酶活性、MMP-2、Collagen I 蛋白表达的组间比较差异均具有统计学意义。辐照组较对照组 MMP-2 酶活性和蛋白表达升高, Collagen I 蛋白表达下降;抑制剂组较辐照组 MMP-2 酶活性和蛋白表达下降, Collagen I 蛋白表达升高。提示 ELF-EMF 可

能通过调节 HFSF 中 MMP-2 活性与蛋白表达来调控巩膜细胞外基质中 Collagen I 含量的变化,从而影响巩膜重塑过程。该研究为验证极低频电磁辐射对近视形成的影响提供了理论依据,但具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Nathan I. Engineering Electromagnetics[M]. 2nd ed. New York: Springer-Verlag New York Inc., 2004:748-750.
- [2] 王东,郭键锋,刘宝华,等. 护眼灯电磁辐射水平调查[J]. 中国辐射卫生, 2012, 21(4):418-419.
- [3] 孔繁琪,朱煌,冯婕好,等. 极低频电磁辐射对豚鼠眼球发育的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(7):3141-3144.
- [4] Liu TX, Wang Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin[J]. Acta Ophthalmol, 2013, 91(4):e253-257.
- [5] Dotan A, Kremer I, Livnat T, et al. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of progressive myopia in a rabbit model[J]. Exp Eye Res, 2014, 127:190-195.
- [6] 纪风涛,周翔天,瞿佳,等. I 型胶原基因与近视关系的研究进展[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2010, 12(2):155-158.
- [7] 王淑然,叶俊杰,龙琴,等. 负透镜诱导豚鼠离焦性近视眼后部巩膜 I 型胶原、基质金属蛋白酶-2 及金属蛋白酶组织抑制因子-2 的表达[J]. 中国医学科学院学报, 2010, 32(1):55-59.
- [8] Wang J, Cui J, Zhu H. Suppression of type I collagen in human scleral fibroblasts treated with extremely low-frequency electromagnetic fields[J]. Mol Vis, 2013, 19:885-893.
- [9] 徐向荣,林胡,张晓鑫,等. 50Hz 工频磁场暴露对成年男性精子活力参数和精液酸碱度的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(3):178-180.
- [10] Keklikci U, Akpolat V, Ozekinci S, et al. The effect of extremely low frequency magnetic field on the conjunctiva and goblet cells[J]. Curr Eye Res, 2008, 33(5):441-446.
- [11] 邹蕾蕾,刘睿,刘红,等. MMPs 激动剂和抑制剂对人巩膜成纤维细胞 MMP-1/2 以及 I 型胶原表达的作用研究[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2013, 13(2):91-95.
- [12] Zhuang H, Zhang R, Shu Q, et al. Changes of TGF- β 2, MMP-2, and TIMP-2 levels in the vitreous of Patients with high myopia[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2014, 252(11):1763-1767.

(收稿日期:2015-03-13)

(本文编辑:季魏红)