

纤维化胰腺组织中TGF- β 1、Smad3、Smad7的表达及意义

马松林, 赵秋, 龚勇, 王渝, 杨芳

马松林, 赵秋, 龚勇, 王渝, 杨芳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科.

tongji46@sina.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2006-10-30 接受日期: 2006-11-24

Expression of transforming growth factor- β 1, Smad3 and Smad7 and their significances in pancreatic fibrosis

Song-Lin Ma, Qiu Zhao, Yong Gong, Yu Wang, Fang Yang

Song-Lin Ma, Qiu Zhao, Yong Gong, Yu Wang, Fang Yang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com

Received: 2006-10-30 Accepted: 2006-11-24

Abstract

AIM: To investigate the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Smad3 and Smad7 protein in human pancreatic fibrosis as well as their significances.

METHODS: SP immunohistochemical method was used to determine the expression of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 protein in 34 cases of pancreatic fibrosis tissues and 15 cases of normal pancreatic tissues.

RESULTS: The expression of TGF- β 1 and Smad3 were significantly higher in pancreatic fibrosis tissues than those in normal pancreatic tissues (TGF- β 1: 79.4% vs 6.7%, $P < 0.01$; Smad3: 64.7% vs 20.0%, $P < 0.01$), while the expression of Smad7 was marked lower in pancreatic fibrosis tissues than that in normal pancreatic tissues (26.5% vs 73.3%, $P < 0.01$). The expression

of TGF- β 1 was positively correlated with that of Smad3 ($r = 0.385$, $P < 0.05$), but reversely correlated with that of Smad7 ($r = -0.519$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: TGF- β 1, Smad3 and Smad7 may play distinct intermediate roles in the process of pancreatic fibrosis. Blockage of TGF- β 1 and Smad3 signaling and/or enhancement of Smad7 signaling may be a new approach in the treatment of pancreatic fibrosis.

Key Words: Transforming growth factor- β 1; Smad3; Smad7; Pancreatic fibrosis

Ma SL, Zhao Q, Gong Y, Wang Y, Yang F. Expression of transforming growth factor- β 1, Smad3 and Smad7 and their significances in pancreatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(2):185-188

摘要

目的: 检测人纤维化胰腺组织中TGF- β 1, Smad3和Smad7蛋白的表达, 探讨他们在胰腺组织纤维化发生中的意义。

方法: 采用免疫组织化学SP法检测34例纤维化胰腺组织标本中TGF- β 1, Smad3和Smad7蛋白的表达, 并以同期15例正常胰腺组织作对照。

结果: TGF- β 1, Smad3在纤维化胰腺组织中的表达(79.4%, 64.7%)明显高于正常胰腺组织(6.7%, 20.0%)($P < 0.01$), Smad7在纤维化胰腺组织中的表达(26.5%)则低于正常胰腺组织(73.3%)($P < 0.01$), 纤维化胰腺组织中TGF- β 1的表达与Smad3的表达呈正相关($r = 0.385$, $P < 0.05$)而与Smad7的表达呈负相关($r = -0.519$, $P < 0.01$)。

结论: TGF- β 1, Smad3和Smad7在胰腺纤维化形成过程中起不同的介导作用, 通过靶向性阻断TGF- β 1、Smad3信号和(或)加强Smad7信号可能成为治疗胰腺纤维化的新手段。

关键词: 转化生长因子 β 1; Smad3; Smad7; 胰腺纤维化

■背景资料

器官纤维化发生、发展的机制及其治疗是当前研究的热点之一, 研究发现, TGF- β /Smad信号途径在多种器官纤维化中起重要作用; 胰腺纤维化会导致胰腺内外分泌功能严重受损, 其发生机制仍不清楚, 已有的研究证实TGF- β 1可能在胰腺纤维化发生发展中起关键作用。

■应用要点

本文结果提示TGF- β /Smad信号途径在胰腺纤维化的发生、发展中可能起到重要作用, 不论是对于发现胰腺纤维化机制还是胰腺纤维化的逆转治疗均有重要意义。

马松林, 赵秋, 龚勇, 王渝, 杨芳. 纤维化胰腺组织中TGF- β 1、Smad3、Smad7的表达及意义. 世界华人消化杂志 2007;15(2):185-188

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/185.asp>

0 引言

胰腺纤维化主要是由于胰腺组织中以胶原为主的细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)合成与沉积增加、降解减少, 两者失去动态平衡所致, 最终将导致胰腺内、外分泌功能严重障碍, 胰腺纤维化形成的分子机制尚未完全阐明, 多种细胞因子在胰腺纤维化发生发展中可能起重要作用^[1]. 胰腺纤维化与慢性胰腺炎的关系十分密切, 慢性胰腺炎的主要病理特征是胰腺纤维化, 胰腺纤维化可使慢性胰腺炎迁延不愈, 二者相互促进、相互影响^[2]. 本实验收集34例因患慢性胰腺炎所致胰腺纤维化患者胰腺标本, 免疫组化SP法检测TGF- β 1, Smad3, Smad7蛋白在纤维化胰腺组织中的表达, 并探讨其在胰腺组织纤维化发生中的意义及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 收集1996-01/2006-06武汉同济医院病理科存档石蜡包埋的胰腺标本, 其中胰腺组织呈不同程度纤维化标本34例, 主要从慢性胰腺炎患者标本中筛选出, 部分为胰腺癌癌旁纤维化组织, 正常胰腺组织15例, 主要为胰腺周围肿瘤手术切除标本, 诊断由临床及病理证实. 全部标本均经甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片. 兔抗人Smad3, Smad7多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 工作浓度1:60; 兔抗人TGF- β 1多克隆抗体(美国Santa Cruz公司产品, 工作浓度1:100)、兔抗SP免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京中衫金桥生物技术有限公司。

1.2 方法 免疫组化实验步骤按SP试剂盒说明书进行, 以微波枸橼酸盐溶液进行抗原热修复, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封片. 用试剂公司提供的已知阳性片作为阳性对照, PBS代替一抗作为阴性对照. 3者均以细胞质内颗粒状或弥漫棕黄染色为阳性细胞, 每张切片随机计数5—10个高倍视野1000个清晰细胞, 计算阳性细胞比例. <10%为阴性, \geq 10%为阳性。

统计学处理 所有数据均用SPSS12.0统计软件包进行统计学处理, 统计方法采用卡方检验、精确概率法、相关性分析, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

表 1 TGF- β 1, Smad3和Smad7蛋白的表达 (n, %)

	n	TGF- β 1阳性	Smad3阳性	Smad7阳性
正常胰腺组织	15	1 (6.7)	3 (20.0)	11 (73.3)
纤维化胰腺组织	34	27 (79.4) ^b	22 (64.7) ^b	9 (26.5) ^b

^b $P<0.01$ vs 正常胰腺组织。

2 结果

2.1 TGF- β 1, Smad3和Smad7在正常胰腺组织和纤维化胰腺组织中的表达 TGF- β 1, Smad3及Smad7在两种不同组织中的表达均有显著差异性($P<0.01$, 表1). TGF- β 1, Smad3在正常胰腺组织中表达较低, 阳性率分别为6.7% (1/15)和20.0% (3/15), 且他们在正常胰腺组织实质细胞中几乎无表达, 在间质细胞中可见少量表达. TGF- β 1, Smad3在纤维化胰腺组织中均高表达, 阳性率分别为79.4% (27/34)和64.7%(22/34), 主要表达于间质的纤维组织、成纤维细胞、巨噬细胞、胰腺星状细胞(pancreatic stellate cell, PSC)及导管上皮细胞等, 主要定位于细胞质. Smad7在正常胰腺组织胰腺实质细胞中表达十分明显, 主要定位于胞质, 阳性率为73.3%(11/15), 其在纤维化胰腺组织中则呈低表达, 阳性率为26.5%(9/34), 在实质细胞及间质细胞中均有表达。

2.2 TGF- β 1在纤维化胰腺组织中的表达与Smad3, Smad7表达之间的关系 34例纤维化胰腺组织中, 有27例TGF- β 1呈阳性表达, 27例TGF- β 1阳性表达组中有20例Smad3呈阳性表达, 仅4例Smad7呈阳性表达. 纤维化胰腺组织中TGF- β 1的表达与Smad3的表达呈正相关($r=0.385$, $P<0.05$)而与Smad7的表达呈负相关($r=-0.519$, $P<0.01$)。

3 讨论

由于胰腺纤维化的危害尚未引起人们的足够重视且目前尚缺少胰腺纤维化动物模型, 与其他器官纤维化相比, 胰腺纤维化的研究明显滞后, 直接的研究资料较少. 胰腺纤维化主要见于慢性胰腺炎、胰腺囊性纤维化、系统性硬化等疾病, 是多种原因导致胰腺损伤修复的结果. 临床上胰腺纤维化与慢性胰腺炎的关系最为密切, 二者相互影响并促进病程进展, 因此, 一般以慢性胰腺炎作为胰腺纤维化的研究模型^[1]. 本实验选择34例因患慢性胰腺炎而致胰腺组织不同程

度纤维化的胰腺标本作为研究对象。

在多种器官纤维化的研究中, 转化生长因子- β (TGF- β)是研究得最多、也是作用最强的致纤维化因子, 在哺乳动物中TGF- β 可分为TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3 3种亚型, 其中TGF- β 1的生物学活性最明显, 在生理状态下, TGF- β 1主要由淋巴细胞、巨噬细胞和血小板分泌, 组织间质细胞对其也有不同程度的表达, 而实质细胞则不表达, 但在器官慢性炎症或纤维化时, 间质细胞对其表达增加且实质细胞对TGF- β 1的表达也启动^[3-4]。本研究证实, TGF- β 1在纤维化胰腺组织中的表达明显高于正常胰腺组织($P < 0.01$), 提示TGF- β 1是胰腺组织的致纤维化因子。近年来大量的研究证实, smad蛋白家族可能在哺乳动物细胞内充当TGF- β 信号的介导子, TGF- β 1主要通过TGF- β /Smad途径发挥生物学效应。活性的TGF- β 1结合并激活II型/I型TGF- β 受体, 活化的受体进一步激活Smads家族中的Smad2, Smad3和Smad4, 然后其聚集成共同复合物或形成数个异源二聚体, 进入细胞核内与特异的DNA连接蛋白结合, 直接启动靶基因转录, 靶细胞出现生物学效应; 在此过程中Smad6和Smad7能够抑制其信号传导^[5-7]。在肝纤维化的发生发展中观察到TGF- β /Smad信号途径可能起重要作用^[8]。本研究通过免疫组化技术证实纤维化胰腺组织中TGF- β 1, Smad3表达上调, Smad7表达下降, 且纤维化胰腺组织中TGF- β 1的表达与Smad3的表达呈正相关而与Smad7的表达呈负相关, 从而提示, TGF- β 1可能是通过TGF- β /Smad信号途径导致胰腺纤维化的发生、发展。

另外, 近年的研究证明, 胰腺内也存在与肝星状细胞相似的细胞, 称之为胰腺星状细胞(pancreatic stellate cell, PSC), Apte *et al*^[9]的研究证明, 胰腺星状细胞占胰腺细胞总数的3.99%, 位于腺细胞间, 并围绕在邻近腺细胞的基底部。研究证明, 在人胰腺纤维化和大鼠实验性纤维化的纤维化区有大量 α -SMA阳性星状细胞, 他们定位于胶原表达的部位, 表明胰腺星状细胞是胰腺纤维化时胶原的主要来源, 活化的胰腺星状细胞在胰腺纤维化的发生、发展中起到重要作用^[10]。研究证实, 多种作用因子在胰腺星状细胞活化中可能起关键作用^[11]。最近研究发现, 用TGF- β 1和血小板衍化生长因子(PDGF)等促纤维化细胞因子处理可使胰腺星状细胞激活, 如细胞增值、表达 α -SMA和产生更多的ECM,

促使胰腺纤维化^[12]。本实验也观察到TGF- β 1, Smad3在胰腺星状细胞中表达增加, 可能在胰腺纤维化的发生发展中TGF- β 1激活胰腺星状细胞也是重要途径之一。

纤维化的形成是一个缓慢的动态过程, 涉及到细胞、细胞因子和ECM等多种因素、多个环节间相互作用和相互调节的复杂过程, 不论何种原因引起的器官纤维化, 最终都将因ECM的大量沉积而严重破坏组织结构, 影响组织功能。过去认为, 一旦纤维化形成即不能逆转, 然而, 近年大量实验研究结果表明, 纤维化是可以逆转的^[13]。已有充分证据表明, 在调节ECM代谢的细胞因子中, 研究得最多、与ECM积聚关系最密切的是TGF- β , 他已被公认为是器官纤维化治疗的靶标^[14]。另外, Smad7是TGF- β 信号转导途径的主要抑制性调控蛋白, 已有的研究表明其异常表达与肾纤维化、肺纤维化等密切相关, 因此调控Smad7的表达也可能提供一种纤维化疾病的新治疗手段 β 。本实验的研究结果初步证实TGF- β 1, Smad3和Smad7在胰腺纤维化形成过程中可能起到不同的介导作用, TGF- β 1, Smad3的高表达与Smad7的低表达可能促进胰腺纤维化的发生发展, 提示通过靶向性阻断TGF- β 1产生和(或)TGF- β /Smad信号通路的传导可能会阻断胰腺纤维化的进展, 从而达到治疗胰腺纤维化、慢性胰腺炎的目的。至于如何在信号通路上靶向性抑制TGF- β 1, Smad3信号和(或)加强Smad7信号仍有待于进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 李才, 张一宁, 牛俊奇, 侯芳玉, 黄三英, 李广生, 孙立波, 张得恒. 器官纤维化基础与临床. 北京: 人民卫生出版社. 2003: 268-284
- 2 Draganov P, Toskes PP. Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2002; 18: 558-562
- 3 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292
- 4 Di Mola FF, Friess H, Martignoni ME, Di Sebastiano P, Zimmermann A, Innocenti P, Graber H, Gold LI, Korc M, Buchler MW. Connective tissue growth factor is a regulator for fibrosis in human chronic pancreatitis. *Ann Surg* 1999; 230: 63-71
- 5 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 6 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated

■名词解释

胰腺星状细胞(PSC): 1998年Bachem等从人和大鼠胰腺基质中分离出能产生I, III型胶原、纤维结合蛋白和层黏蛋白等细胞外基质的细胞, 该细胞位于胰腺小叶间和腺泡周围区, 围绕邻近腺细胞基底部, 与纤维化区肌成纤维细胞相似, 故将其命名为PSC, 研究证实PSC的活化在胰腺纤维化中起重要作用。

■同行评价

转化生长因子- β 与多种器官纤维化相关,其在发病机制和治疗中所起的作用是当今研究热点之一,本实验运用免疫组化技术研究转化生长因子- β 在胰腺纤维化发生的作用及机制,目的明确,结果可信,其结论对于胰腺纤维化的基础研究和临床研究均有指导意义,是一篇较好的基础研究论文。

- hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001; 187: 117-123
- 7 Kuang C, Xiao Y, Liu X, Stringfield TM, Zhang S, Wang Z, Chen Y. *In vivo* disruption of TGF- β signaling by Smad7 leads to premalignant ductal lesions in the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1858-1863
- 8 Song SL, Gong ZJ, Zhang QR, Huang TX. Effects of Chinese traditional compound, JinSanE, on expression of TGF- β 1 and TGF- β 1 type II receptor mRNA, Smad3 and Smad7 on experimental hepatic fibrosis *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2269-2276
- 9 Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 1999; 44: 534-541
- 10 Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer* 2004; 3: 26
- 11 余晓云, 陈婕, 侯晓华. 胰腺星状细胞活化相关因子研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 20
- 12 Vogelmann R, Ruf D, Wagner M, Adler G, Menke A. Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGF- β 1 transgenic mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G164-G172
- 13 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46: 443-446
- 14 Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 366-370
- 15 Nakao A, Okumura K, Ogawa H. Smad7: a new key player in TGF- β -associated disease. *Trends Mol Med* 2002; 8: 361-363

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

● 消息 ●

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

本刊讯 “2007中华肝胆胰脾外科(国际)论坛”应澳门特区外科学会的盛情邀请于2007-04-13/16在澳门举办,现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1)肝癌诊断及外科与综合治疗:新诊断技术-可切除与否的界定-综合治疗与序贯化思路-对复发转移的研究进展-微创技术实际应用的可能性;(2)医源性胆管损伤的预防-胆管下端功能状态对修复及重建的影响-肝胆管结石外科治疗的新经验-肝门胆管癌根治性切除的实施与效果;(3)胰腺炎-重症急性、出血坏死性、“凶险性”-治疗中早期复苏的策略与实施-相关并发症的预防和处理;(4)胰腺癌-早期诊断的思路与进展-根治术在当前的含义和尺度-术前减黄与并发症的处理;(5)脾功能研究进展-保脾和切脾含义和抉择-PH时单纯切脾的指征与价值;(6)肝移植-应用指征的决策-供肝切取与保存-技术性与非技术性并发症-再移植-远期存活的努力。

2 投稿要求及截稿日期

来稿请寄未曾公开发表过4000字以内全文及800字论文摘要各1份(无摘要不入汇编)并请在信封上注明“会议征文”。截稿日期:2007-01-31。正式代表发论文证书并授一级继续教育学分。来稿请寄:《中华肝胆外科杂志》编辑部。

3 联系方式

地址:北京市复兴路28号;邮编:100853;电话:010-66936223;电传:010-68177009;E-mail:zhgdwkzz@vip.163.com;详情请登陆网站:www.zhgdwkzz.net.