

Smad7抑制TGF- β 1对肝星状细胞 α 1(III)前胶原基因表达的促进作用

徐林芳, 刘海林

背景资料
肝纤维化时TGF- β 1的表达显著增加, 对肝纤维化的发生发展具有重要作用。Smad7是TGF- β /Smad信号转导通路中的主要抑制性调控蛋白, 其对 α 1(III)前胶原mRNA表达的影响及作用机制尚未完全明了。

徐林芳, 刘海林, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科 上海市 337000
上海市科学技术委员会基金资助项目, No. 04JC14043
作者贡献分布: 此课题由刘海林与徐林芳设计; 研究过程由徐林芳与刘海林完成; 数据分析由徐林芳与刘海林完成; 论文写作由徐林芳与刘海林完成。
通讯作者: 刘海林, 主任医师, 200011, 上海市制造局路639号, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科。
liuhailin@medmail.com.cn
电话: 021-23271023 传真: 021-63136856
收稿日期: 2009-11-14 修回日期: 2009-12-14
接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-01-28

Smad7 overexpression inhibits TGF- β 1-stimulated procollagen α 1 (III) expression in cultured hepatic stellate cells

Lin-Fang Xu, Hai-Lin Liu

Lin-Fang Xu, Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Ninth People's Hospital, Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Supported by: the Foundation of Shanghai Municipal Science and Technology Commission, No. 04JC14043

Correspondence to: Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Ninth People's Hospital, Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 639 Zhizaoju Road, Shanghai 200011, China. liuhailin@medmail.com.cn

Received: 2009-11-14 Revised: 2009-12-14

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-01-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of Smad7 overexpression on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated procollagen α 1 (III) expression in cultured hepatic stellate cells (HSC-T6).

METHODS: Cultured HSC-T6 cells were divided into six groups: normal control group, TGF- β 1 group, vehicle plasmid group, Smad7 plasmid group, TGF- β 1 plus vehicle plasmid group, and TGF- β 1 plus Smad7 plasmid group. Smad7 plasmid and vehicle plasmid were transfected into HSC-T6 cells with FuGENE 6 Reagent. Forty-eight hours after transfection, the expression lev-

el of procollagen α 1 (III) mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time RT-PCR.

RESULTS: Compared with the normal control group and the vehicle plasmid group, the expression levels of Smad7 mRNA increased significantly in the Smad7 plasmid group and the TGF- β 1 plus Smad7 plasmid group ($t = 59.43, 59.41, 54.27$ and 54.25 , respectively; all $t > t_{0.01}$ and all $P < 0.01$). Although there were no significant differences in the expression levels of procollagen α 1 (III) mRNA between the Smad7 plasmid group and the normal control group or the vehicle plasmid group ($t = 1.25$ and 1.27 , respectively; both $t < t_{0.05}$ and both $P > 0.05$), the expression level of procollagen α 1 (III) mRNA in the TGF- β 1 plus Smad7 plasmid group was significantly lower than those in the TGF- β 1 group and the TGF- β 1 plus vehicle plasmid group ($t = 103.8$ and 45.7 , respectively; both $t > t_{0.01}$ and both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Overexpression of Smad7 inhibits the expression of procollagen α 1 (III) stimulated by exogenous TGF- β 1 in cultured hepatic stellate cells.

Key Words: Smad7; transforming growth factor- β 1; Liver fibrosis; Hepatic stellate cell

Xu LF, Liu HL. Smad7 overexpression inhibits TGF- β 1-stimulated procollagen α 1 (III) expression in cultured hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(3): 280-283

摘要

目的: 探讨在加入TGF- β 1的条件下, Smad7过度表达对肝星形细胞-T6(HSC-T6) α 1(III)前胶原mRNA水平的作用。

方法: 体外培养HSC-T6细胞, 分为正常对照组、TGF- β 1对照组、空载质粒组、Smad7质粒组、TGF- β 1+空载质粒组和TGF- β 1+Smad7质粒组。通过Fugene6介导Smad7质粒转染, 继

同行评议者
高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科; 高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

续培养48 h. 采用Real time-PCR、RT-PCR方法检测Smad7和 α 1()前胶原mRNA水平.

结果: TGF- β 1+Smad7质粒组、Smad7质粒组Smad7 mRNA水平较正常对照组、空载质粒组显著增高($t = 59.43$ 、 59.41 、 54.27 及 54.25 , 均 $t > t_{0.01}$, 均 $P < 0.01$). Smad7质粒组 α 1()前胶原基因mRNA表达与正常对照组、空载质粒组相比无明显差异($t = 1.25$ 与 1.27 , 均 $t < t_{0.05}$, 均 $P > 0.05$). 但TGF- β 1+Smad7质粒组 α 1()前胶原mRNA水平较TGF- β 1+空载质粒组和TGF- β 1对照组明显降低($t = 103.87$ 与 45.70 , 均 $t > t_{0.01}$, 均 $P < 0.01$).

结论: Smad7可显著抑制TGF- β 1对HSC-T6 α 1()前胶原mRNA表达的促进作用, 而对HSC-T6 α 1()前胶原mRNA表达无明显影响.

关键词: Smad7; 转化生长因子 β 1; 肝纤维化; 肝星状细胞

徐林芳, 刘海林. Smad7抑制TGF- β 1对肝星状细胞 α 1()前胶原基因表达的促进作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(3): 280-283 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/280.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化形成过程中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要来源. 活化的HSC合成大量ECM, 包括 I、III型胶原, 在肝内过度沉积^[1,2]. 作为促肝纤维化细胞因子, TGF- β 1能激活HSC促进ECM合成, 并抑制其降解^[3,4]. 而Smad7可抑制TGF- β 1的信号转导^[5,6]. 我们的前期研究表明转染Smad7质粒可显著减少HSC α 1(I)前胶原mRNA表达, 但对 α 1(III)前胶原mRNA水平无明显影响^[7]. 究竟是Smad7对 α 1(III)前胶原基因表达无调控作用, 还是需要在特定条件下才能发挥作用, 值得进一步深入研究. 肝纤维化时TGF- β 1表达显著增加^[8-10]. 因此, 本文应用Real time-PCR定量检测了加入TGF- β 1后, Smad7质粒转染对HSC-T6细胞 α 1(III)前胶原mRNA表达的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 HSC-T6细胞由上海中医药大学肝病研究所提供; pcDNA3.0-人Smad7重组质粒和pcDNA3.0空载质粒为本院组织工程实验室惠赠; Eugene6转染试剂、TRIzol RNA提取试剂盒、TGF- β 1分别购自Roche公司、Sigma公司和英国

Peprotech公司; 各目的基因引物由上海生工生物工程公司合成.

1.2 方法 将浓度为 1×10^8 细胞/L的HSC-T6细胞悬液接种于6孔培养板, 每孔2 mL, 37 °C, 50 g/L CO₂、饱和湿度培养24 h, 随机分为6组: (1)正常对照组; (2)TGF- β 1对照组; (3)Smad7质粒组; (4)TGF- β 1+Smad7质粒组; (5)空载质粒组; (6)TGF- β 1+空载质粒组. 每组3复孔. pcDNA3.0-人Smad7重组质粒或空载体pcDNA3.0质粒用配制的脂质体Eugene6转染液介导转染. TGF- β 1的终浓度为10 μ g/L, 正常对照组加入同体积的50 g/L FSC DMEM培养基. 继续培养48 h后, 收集细胞, 用TRIzol试剂盒提取细胞总RNA. 取RNA 2 μ g按照RT试剂盒(Sigma公司)说明书进行逆转录. 应用Mx3000P实时荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)分别检测Smad7, α 1(III)前胶原mRNA水平. 引物序列如下: Smad7: 5'-CACTGCAGACTGTCCAGATG-3'(上游), 5'-CTGCTGCATAAACTCGTGGTC-3'(下游); α 1(III)前胶原: 5'-GTACAGCTGGCCTTCCTCAG-3'(上游), 5'-GGCCTTGCGTGTTTGATATT-3'(下游); 反应体系为: ddH₂O 10.125 μ L, cDNA 1 μ L, 2 \times SYBR Green QPCR master mix 12.5 μ L, ROX passivereference 0.375 μ L, Forward primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L, Reverse primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 总体积25 μ L. 每个样品设3个复孔, 并设置无模板对照. 各目的基因反应条件为: Smad7: 95 °C 预变性10 min, 95 °C, 2 min, 60 °C, 30 s, 72 °C, 1.5 min, 共40个循环; α 1(III)前胶原: 95 °C 预变性10 min, 1个循环; 接着94 °C, 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C, 30 s, 共40个循环. 循环结束后继续进行建立溶解曲线的反应, 最后用专用软件自动分析结果. mRNA水平用相对含量图表示. 同时采用RT-PCR测定各目的基因mRNA水平, 其中Smad7和 α 1(III)前胶原均为扩增28个循环, 引物和其他反应条件同上. PCR产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳, 用天能凝胶分析系统图像分析. 计算目的基因条带灰度值, 与内参 β -actin条带灰度值的比值, 作为该目的基因表达的相对值.

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 多组比较用方差分析, 两组间比较用 t 检验. $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 Smad7 mRNA表达 TGF- β 1+Smad7质粒

创新盘点
本研究采用体外培养肝星状细胞系(HSC-T6), 探讨在加入TGF- β 1条件下Smad7过量表达对 α 1()前胶原mRNA水平的影响, 有助于进一步了解Smad7的抗纤维化机制.

应用要点
 本研究表明, Smad7过量表达可显著抑制TGF- β 1对HSC-T6细胞 α 1(III)前胶原mRNA表达的促进作用. 为Smad7用于抗纤维化治疗提供了实验依据.

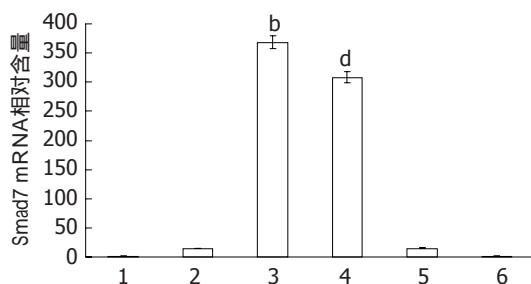


图1 Real time-PCR检测Smad7 mRNA表达. 1: 正常对照组; 2: TGF- β 1对照组; 3: TGF- β 1+Smad7质粒组; 4: Smad7质粒组; 5: TGF- β 1+空载质粒对照组; 6: 空载质粒组. ^b P <0.01 vs 正常对照组和空载质粒组; ^d P <0.01 vs TGF- β 1对照组和TGF- β 1+空载质粒对照组.

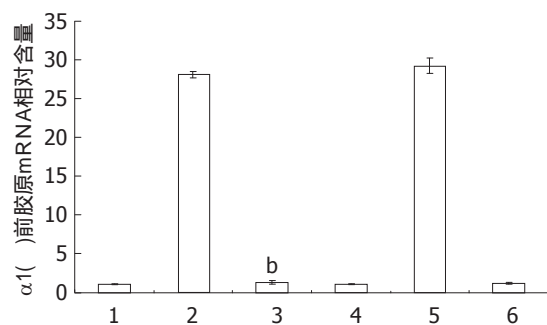


图2 Real time-PCR检测 α 1(III)前胶原mRNA水平. 1: 正常对照组; 2: TGF- β 1对照组; 3: TGF- β 1+Smad7质粒组; 4: Smad7质粒组; 5: TGF- β 1+空载质粒对照组; 6: 空载质粒组. ^b P <0.01 vs TGF- β 1对照组和TGF- β 1+空载质粒对照组.

组、Smad7质粒组Smad7 mRNA水平较其他4组(正常对照组、空载质粒组、TGF- β 1对照组、TGF- β 1+空载质粒对照组)显著升高($t = 59.43, 59.41, 57.15, 57.13, 54.27, 54.25, 44.66, 51.70$, 均 P <0.01, 图1). 与正常对照组和空载质粒组相比, TGF- β 1对照组、TGF- β 1+空载质粒对照组Smad7 mRNA表达亦有增加($t = 37.26, 36.99, 54.26, 53.87$, 均 P <0.01). RT-PCR的结果与Real time-PCR一致. 表明Smad7质粒有效转染至HSC-T6细胞; TGF- β 1可增加Smad7 mRNA表达, 但远低于Smad7质粒转染组.

2.2 α 1(III)前胶原mRNA水平 与正常对照组和空载质粒组相比, Smad7质粒组 α 1(III)前胶原mRNA水平无明显差异($t = 1.25, 1.27, P$ >0.05). 但TGF- β 1+Smad7质粒组 α 1(III)前胶原mRNA水平较TGF- β 1组和TGF- β 1+空载质粒组显著降低($t = 103.87, 45.70$, 均 P <0.01, 图2). RT-PCR结果与Real time-PCR一致.

3 讨论

TGF- β 1能激活HSC, 促进I、III、IV胶原和纤维连接蛋白、蛋白多糖等细胞外基质的合成. 同时, 使金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)表达增加, 减少胶原的降解, 导致ECM大量沉积, 加速肝纤维化的发展^[11]. TGF- β 1首先通过与其II型受体结合使之激活, 活化的II型受体蛋白激酶使I型受体(T β R I)磷酸化, 后者再作用于Smad2、Smad3, 并与Smad2、Smad3和Smad4形成异源寡聚体复合物, 由胞质转入核内. 通过与特定的序列结合, 启动基因转录, 包括胶原基因、纤溶酶原激活物抑制因子-1基因、Smad7基因等发挥生物学效应^[12-14]. Smad7是TGF- β 1/Smad信号转导通路中的主要抑制性调控蛋白^[5,15], 可与

Smad2、Smad3竞争性结合T β R I, 抑制TGF- β 1/Smads的信号转导; 另外, Smad7还可与smurf1/2结合, 通过泛素化途径降解T β R I. TGF- β 1与Smad7之间存在负反馈调节. 本文中, TGF- β 1组、TGF- β 1+空载质粒组Smad7 mRNA表达较正常对照组和空载质粒组增高, 即是这种负反馈调节的反应. 但仅靠自身的负反馈调节尚不足以抑制TGF- β 1对 α 1(III)前胶原mRNA表达的促进作用. 因此, TGF- β 1组、TGF- β 1+空载质粒组的 α 1(III)前胶原mRNA水平显著高于正常对照组和空载质粒组.

与正常对照组和空载质粒组相比, Smad7质粒组Smad7 mRNA水平显著升高, 而 α 1(III)前胶原mRNA水平无明显差异. 说明Smad7对HSC-T6的 α 1(III)前胶原mRNA表达并无直接作用, 与我们的前期研究结果一致^[7]. TGF- β 1+Smad7质粒组 α 1(III)前胶原mRNA水平显著低于TGF- β 1组和TGF- β 1+空载质粒组, 表明Smad7过度表达可抑制TGF- β 1对 α 1(III)前胶原mRNA表达的促进作用.

总之, Smad7表达上调本身并不能直接抑制HSC-T6细胞 α 1(III)前胶原基因转录, 但可抑制TGF- β 1对 α 1(III)前胶原基因表达的促进作用. 由于在肝纤维化发展过程中, TGF- β 1显著增加, 所以Smad7过度表达可以发挥抗纤维化作用.

4 参考文献

- 1 Chen YW, Li DG, Wu JX, Chen YW, Lu HM. Tetrandrine inhibits activation of rat hepatic stellate cells stimulated by transforming growth factor-beta in vitro via up-regulation of Smad 7. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 299-305
- 2 Kharbanda KK, Rogers DD 2nd, Wyatt TA, Sorrell MF, Tuma DJ. Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004; 41: 60-66
- 3 Gressner AM, Weiskirchen R. The tightrope of

- therapeutic suppression of active transforming growth factor-beta: high enough to fall deeply? *J Hepatol* 2003; 39: 856-859
- 4 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 5 Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 2002; 191: 1-16
- 6 Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 1997; 89: 1165-1173
- 7 阮艺华, 刘海林. Smad7质粒转染对肝星形细胞 α 1()和 α ()胶原基因达的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2593-2596
- 8 Sun Y, Xuan S, Xin Y, Lu W, Chu L. [Relationship between serum TGF beta-1 with chronic hepatitis B involving in liver cell function and liver biopsy fibrosis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002; 10: 221-222
- 9 高春芳, 徐玲玲, 王皓, 赵文静, 孔宪涛. TGF- β 1在慢性肝病肝纤维化诊断中的初步应用. *肝脏* 2002; 7: 28-29
- 10 刘东屏, 杨晴, 张艳梅, 王炳元. 血浆TGF- β 1测定在肝纤维化和炎症分期中的临床实用价值. *中国医科大学学报* 2008; 37: 270-271
- 11 Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Johnson R, Lan HY. Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int* 2003; 63: 2010-2019
- 12 Vozenin-Brotons MC, Sivan V, Gault N, Renard C, Geffrotin C, Delanian S, Lefaix JL, Martin M. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 30-42
- 13 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471
- 14 Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S
- 15 Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Böttinger EP. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S45-S52

同行评价
本文研究了目前肝病治疗领域的热点之一-肝纤维化的防治机制, 密切联系临床, 值得参考。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)