

TGF- β 1 诱导大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 活化及上皮间质转换

王丽惠¹, 程变巧², 朱琪^{2*}, 林伟国²

(1. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361100; 2. 厦门大学附属福州第二医院 肝胆内科, 福建 福州 350007)

摘要: 目的 探讨转化生长因子- β 1(TGF- β 1)在大鼠肝星状细胞系(HSC-T6)活化及上皮间质转换(EMT)中的作用。方法 体外培养HSC-T6,用MTT法筛选TGF- β 1对HSC-T6作用的最佳浓度;用10 μ g/L TGF- β 1处理HSC-T6 24 h,相差倒置显微镜下观察细胞形态改变,免疫荧光染色法检测细胞骨架结构F-actin蛋白的表达,RT-qPCR法检测肌动蛋白 α -SMA及代表上皮间质转换的神经黏附素(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)和上皮黏附素(E-cadherin)基因表达;用不同浓度(0、5和10 μ g/L)的TGF- β 1处理HSC-T6 24 h,Western blot检测 α -SMA、N-cadherin、vimentin和E-cadherin蛋白表达。结果 10 μ g/L TGF- β 1干预HSC-T6 24 h有最好的细胞存活率;TGF- β 1刺激HSC-T6后,细胞拉伸,伪足增多呈星形,细胞间连接疏松,呈显著活化状态;F-actin聚集形成应力纤维丝,沿细胞长轴分布;实验组 α -SMA mRNA及vimentin mRNA的表达量明显高于对照组($P < 0.05$),而E-cadherin mRNA的表达量明显降低($P < 0.05$);在不同浓度的TGF- β 1呈剂量依赖性致 α -SMA及N-cadherin和vimentin的蛋白表达量增多,而E-cadherin的蛋白表达量减少。结论 TGF- β 1可诱导HSC-T6活化及上皮间质转换。

关键词: TGF- β 1; 肝星状细胞; 活化; 上皮间质转换

中图分类号: R575 文献标志码: A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2017.09.010

TGF- β 1 induces activation of HSC-T6 cells and epithelial-mesenchymal transition in rats

WANG Li-hui¹, CHENG Bian-qiao², ZHU Qi^{2*}, LIN Wei-guo²

(1. Medical College, Xiamen University, Xiamen 361100;

2. Dept. of Hepatology, the Second Fuzhou Affiliated Hospital of Xiamen University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: Objective To observe the effect of TGF- β 1 on activation and epithelial mesenchymal transition (EMT) in rat hepatic stellate cell-T6. **Methods** Adopt the MTT method to screen the optimum concentration of TGF- β 1 in vitro HSC-T6 cultured. After the HSC-T6 stimulation by TGF- β 1 of 10 μ g/L for 24 hours, the morphology of the cells was observed under inverted phase contrast microscope, the expression of F-actin which on behalf of cytoskeletal structure was detected by immunofluorescence staining; the expression of α -SMA and N-cadherin, vimentin, E-cadherin was measured by RT-qPCR; The changes of α -SMA, N-cadherin, vimentin and E-cadherin were assessed by Western blot after different concentrations (0, 5 and 10 μ g/L) of TGF- β 1 intervening HSC-T6 for 24 h. **Results** The optimal cell survival rate was recorded when 10 μ g/L TGF- β 1 dealt with

收稿日期: 2016-07-01 修回日期: 2016-11-04

基金项目: 福建省科技计划(2015Y01010224); 福州市科技计划(2014-S-137-1)

* 通信作者(corresponding author): zhuqi8979@163.com

cells for 24 h. After HSC-T6 were treated with TGF- β 1, cells stretched, pseudopodia increased and turn into stellate, cells connections were looser, so that represented a significantly activated state. F-actin filaments gathered to form stress and distributed along the long axis of the cells; The expression of α -SMA mRNA and vimentin mRNA in experimental group was significantly higher while E-cadherin mRNA was obviously lower than the control group ($P < 0.05$). TGF- β 1 made the protein expression of α -SMA and N-cadherin, vimentin in dose-dependent increased while E-cadherin was decreased. **Conclusions** TGF- β 1 may induce activation and epithelial-mesenchymal transition of HSC-T6.

Key words: TGF- β 1; hepatic stellate cells; activation; epithelial-mesenchymal transition

肝纤维化(hepatic fibrosis)是在许多致病因子作用下,细胞外基质合成大于降解,肝内纤维组织过度增生而引发肝脏自我保护性修复的可逆性病理过程,该过程不被及时阻抑,可逐渐发展成肝硬化甚至肝衰竭等不可逆的终末期肝脏疾病。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的活化是肝纤维化发生与发展的关键环节,通过抑制 HSCs 的活化可以促进肝纤维化的逆转,有报道^[1-3]表明 TGF- β 是重要的致肝纤维化的细胞因子之一,参与促进细胞外基质的合成及抑制其降解,但 TGF- β 1 作为肝星状细胞活化的主要致病因子机制目前尚不十分明确。上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指分化成熟的细胞由外界因素刺激引起部分上皮特性和细胞极性消失,细胞骨架结构改变,并获得迁移游走能力的间质细胞特征的过程,近年来被认为^[3-5]是纤维化发展的新机制,但在肝脏疾病中是否存在 EMT 鲜见报道,本文旨在研究 TGF- β 1 在肝星状细胞(hepatic stellate cell-T6, HSC-T6)活化及上皮间质转换中的作用,为临床上 HSCs 的靶向抗纤维化治疗提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: DMEM 高糖培养基(Hyclon 公司);胎牛血清(Biological Industries 公司);胰蛋白酶(Gibco 公司); TGF- β 1(PeproTech 公司);四甲基偶氮唑盐(Sigma 公司); Trizol (Vazyme 公司);引物由上海博尚生物技术有限公司合成并测序;多克隆兔抗人 α -SMA (ab5694)、单克隆兔抗人 N-cadherin (ab76011)、单克隆鼠抗人 vimentin (ab8978)、单克隆鼠抗人 E-cadherin (ab76055) 和多克隆兔抗人 F-actin (Bioss 公司); HRP 标记羊抗

小鼠或抗兔 IgG、FITC 标志的羊抗兔 IgG (EMAR 公司)。

1.1.2 细胞培养: 大鼠 HSC-T6 系(购自广州吉尼欧公司)用含 10% 胎牛血清及 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 庆大霉素的 DMEM 高糖培养基,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,隔 48 h 更换培养液,细胞贴壁增殖至 70%~80% 汇合时传代 1 次。

1.2 方法

1.2.1 筛选 TGF- β 1 的最适浓度: 取对数期增殖的 HSC-T6,用 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后以 10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板中,培养 12 h 弃去培养液,加入终浓度为 0、5、10 和 20 μ g/L TGF- β 1,同时设置空白组,每个浓度均做 5 个复孔,培养 24 h 后每孔加入 20 μ L 的 5 g/L MTT 溶液,4 h 后弃去培养液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,震荡 10 min 后,用酶标仪检测 490 nm 处每孔的吸光度(A)值。以对照组的细胞存活率为 100%,其余各组与之相比,细胞存活率(%) = (实验组 A - 空白组 A) / (对照组 A - 空白组 A) \times 100。

1.2.2 细胞形态观察: 以每孔 30×10^5 个细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁生长 12 h 后弃培养液,实验组加入终浓度为 10 μ g/L 的 TGF- β 1 培养液,对照组加入等量基础培养液,均置于培养箱中培养 24 h,在倒置相差显微镜下观察细胞形状、伪足和细胞间连接的变化并拍照。

1.2.3 免疫荧光染色法鉴定 F-actin 的表达: 以每孔 2×10^4 个细胞接种于预置有细胞载玻片的 6 孔板中,细胞贴壁爬片,实验组和对照组的处理如前,培养 24 h 取出载玻片,4% 多聚甲醛固定, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min; 0.1% Triton X-100 穿透作用 20 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min; 用 7.5% BSA 室温封闭 60 min 后,加入 F-actin 一抗(1:100),并用 PBS 代

替一抗做阴性组 4 °C 孵育过夜后用 FITC 标记的荧光二抗 (1 : 50) 作用 1 h; DAPI 复染核 15 min, PBS 洗涤后, 荧光显微镜观察摄片。

1.2.4 RT-qPCR 法检测 α -SMA 和 N-cadherin、vimentin 和 E-cadherin mRNA 表达量: 实验组和对照组处理方法同细胞形态学观察, 培养 24 h 后, Trizol 试剂提取两组细胞的总 RNA, 用 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性, 计算 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值检验 RNA 纯度在 1.8~2.2 间再反转录成 cDNA, 按说明书操作进行 RT-qPCR 反应。采用引物序列为: α -SMA 上游: 5'-CCACTGCTGCTTCCTCTTC-3', 下游: 5'-CGCCGACTCCATTCCAAT-3'; N-cadherin 上游: 5'-TATGTGTTGTTGATGACTGA-3', 下游: 5'-CGGTGCTAGTGGACTACAGA-3'; vimentin 上游: 5'-CGCCACCTTCGTGAATACC-3', 下游: 5'-ACCGTCTTAATCAGGAGTGTCT-3'; E-cadherin 上游: 5'-GCTCGCTGAACTCCTCTGA-3', 下游: 5'-TCGCCGCCACCATACATA-3'; GAPDH 上游: 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3', 下游: 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'; 以 GAPDH 为内参, $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算基因的相对表达量。

1.2.5 Western blot 法检测 α -SMA 和 N-cadherin、vimentin 和 E-cadherin 的蛋白表达: 以每孔 3×10^5 个细胞接种于 6 孔板, 细胞贴壁生长 12 h 后换液, 分别加入不同浓度的 TGF- β 1, 使其终浓度为 0、5 和 10 $\mu\text{g/L}$, 每个浓度设定平行的 3 个孔, 培养 24 h, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加适量裂解液 (RIPA : PMSF = 100 : 1), 冰上裂解 30 min, 转移至 EP 管, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清; 用 50 μg /泳道的蛋白上样, 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 60 min, 加入 α -SMA (1 : 1 000)、N-cadherin (1 : 1 000)、vimentin (1 : 500)、E-cadherin (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 2 000) 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 加 HRP 标记的羊抗小鼠或抗兔 IgG (1 : 2 000) 于室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, ECL 发光并显影; 重复 4 次, 结果以目的蛋白/GAPDH 吸光度比值表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对所有数据进行统计学分析, 计量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本间均数比较选用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度 TGF- β 1 对肝星状细胞存活率的影响

5~20 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 浓度组的 A 值均高于对照组 ($P < 0.05$), 10 $\mu\text{g/L}$ 组比 20 $\mu\text{g/L}$ 组的细胞增殖率高, 故选择 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 作为最适浓度 (表 1)。

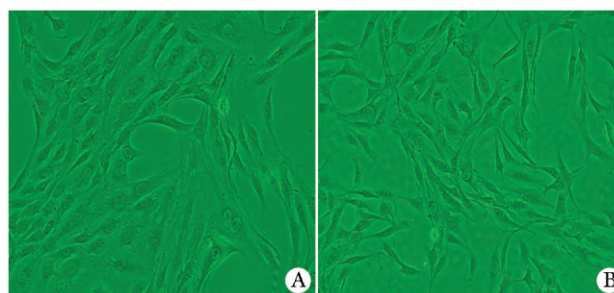
表 1 不同浓度 TGF- β 1 对细胞存活率的影响
Table 1 Effect of different concentration of TGF- β 1 on the cell survival rate ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

group	concentration/($\mu\text{g/L}$)	A value	survival rate/%
control	0	0.615 \pm 0.020	100
	5	0.692 \pm 0.021*	112.52
TGF- β 1	10	0.714 \pm 0.022**	116.15
	20	0.668 \pm 0.002*	108.56

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

2.2 TGF- β 1 对细胞形态的影响

用 10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β 1 处理 HSC-T6 24 h 后, 细胞拉伸, 伪足增多呈星形, 细胞间也变得连接疏松, 呈明显的活化状态 (图 1)。



A. control group; B. 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 group

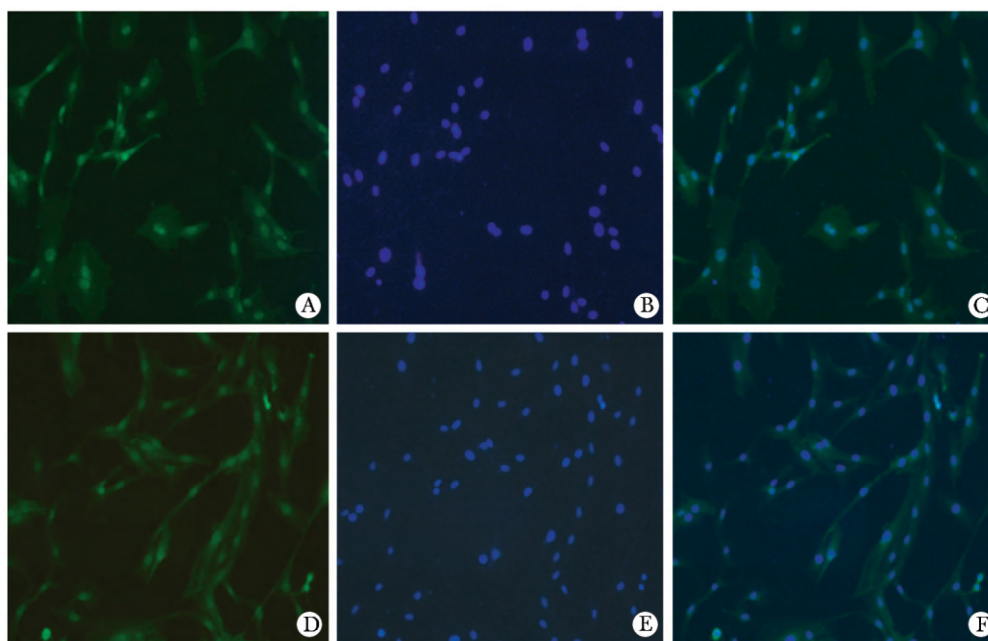
图 1 HSC-T6 经 TGF- β 1 处理 24 h 后的形态学变化
Fig 1 Morphologic changes of HSC-T6 induced TGF- β 1 for 24 h ($\times 100$)

2.3 TGF- β 1 对细胞内 F-actin 的影响

对照组细胞内荧光物质为弥漫状态, 可见少量方向不规则的肌动蛋白纤维丝 (图 2A~C); TGF- β 1 组 F-actin 大部分聚集形成较粗大纤长并沿细胞长轴呈细束状平行排列纤维丝 (图 2D~F)。

2.4 TGF- β 1 对 HSC-T6 α -SMA、vimentin 和 E-cadherin mRNA 表达的影响

10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 组 α -SMA mRNA 及 N-cadherin



A , B , C. control group; D , E , F. 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 group; A , D. F-actin skeleton structure; B. EDAPI redyeing nuclei; C. combination of A and B; F. combination of D and E

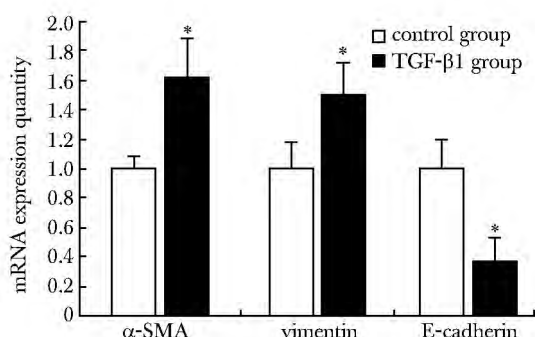
图2 免疫荧光染色观察 TGF- β 1 处理后细胞内 F-actin 的改变

Fig 2 Cytoskeletal structure changes of F-actin induced by TGF- β 1 observed by immunofluorescence($\times 100$)

mRNA、vimentin mRNA 的表达量明显高于对照组，而 E-cadherin mRNA 的表达量明显降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.5 TGF- β 1 对 HSC-T6 内 α -SMA 及 N-cadherin、vimentin 蛋白及 E-cadherin 蛋白的影响

不同浓度(0、5 和 10 $\mu\text{g/L}$) 的 TGF- β 1 处理



* $P < 0.05$ compared with control group

图3 RT-qPCR 法检测 α -SMA、vimentin 和 E-cadherin mRNA 表达

Fig 3 mRNA expression of α -SMA , vimentin and E-cadherin in HSC was assessed by RT-qPCR ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

HSC-T6 24 h 后 细胞活化标志蛋白 α -SMA、间质标志蛋白 N-cadherin、vimentin 的表达呈剂量依赖性上调；上皮标志蛋白 E-cadherin 的表达呈剂量依赖性下调(图 4 表 2)。

3 讨论

肝纤维化是临床上常见的各种慢性肝病发展

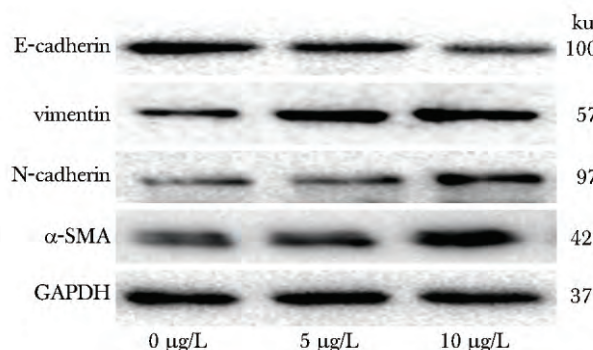


图4 Western blot 法检测不同浓度 TGF- β 1 对 HSC 的 α -SMA 及 N-cadherin、vimentin 和 E-cadherin 蛋白表达

Fig 4 Protein expression of α -SMA and N-cadherin , vimentin , E-cadherin in HSC was detected by Western blot

表 2 α-SMA、N-cadherin、vimentin 和 E-cadherin 蛋白表达

Table 2 Protein expression of α-SMA, N-cadherin, vimentin and E-cadherin ($\bar{x} \pm s$ $n=4$)

group	α-SMA	N-cadherin	vimentin	E-cadherin
0 μg/L	0.57±0.11	0.49±0.08	0.78±0.02	1.43±0.04
5 μg/L	0.86±0.25*	0.77±0.13*	1.29±0.14#	1.08±0.16*
10 μg/L	1.35±0.03#	1.02±0.16#	1.41±0.26#	0.81±0.07*

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$ compared with control (0 μg/L).

成肝硬化和肝癌的共同病理过程,有效治疗肝纤维化对于改善慢性肝病预后,降低慢性肝病病死率至关重要,尽管国内外对肝纤维化发生发展机制及防治策略做了大量研究,但至今仍无早期特异的诊断方法和有效逆转的治疗策略;HSCs 被激活后可表达 α-SMA、vimentin 及合成并分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分参与肝纤维化的形成^[6-7]。

HSCs 的活化是由多种细胞因子和多条信号通路相互协调作用的复杂过程, TGF-β、内皮素和肿瘤坏死因子等细胞因子已被证实可参与调控 HSCs 的激活^[8-9];本研究发现 TGF-β1 刺激 HSC-T6 后,伪足增多呈星形,细胞间连接呈疏松状态,符合其活化的生物学特性;F-actin 聚合呈成纤维细胞样,提示 TGF-β1 可诱导 HSC-T6 活化;α-SMA 是标志细胞活化的蛋白, TGF-β1 可明显上调 α-SMA 的表达量,进一步证实了 TGF-β1 可诱导 HSC-T6 的活

化。

大量研究表明 EMT 在各种纤维化疾病发生过程中起重要作用^[10-12], TGF-β1 是 TGF-β 超家族里的一种亚型,可利用 TGF-β1 促使体外培养的肝细胞发生 EMT 而创建肝纤维化模型;肾小管间质纤维化中,肾小管上皮细胞的 EMT 可使 α-SMA 出现高表达现象,而此过程中 TGF-β1 起重要的诱导作用;由此可见, TGF-β1 可通过诱导 EMT 发生而参与纤维化的形成。vimentin 和 N-cadherin 表达量的改变可反映细胞的间质成分变化,而 E-cadherin 是一种介导细胞间相互聚集的上皮黏附分子,其表达量的多少代表上皮成分的增多或减少;本研究中 TGF-β1 可明显上调 vimentin mRNA 的表达,下调 E-cadherin mRNA 的表达,但对 N-cadherin mRNA 表达没有影响,有研究^[15]证实细胞可通过不完全的 EMT 机制而获得迁移和游走能力的间质细胞特性;此外, TGF-β1 呈剂量依赖性致 vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达上调, E-cadherin 蛋白表达下调。因此, TGF-β1 可诱导 HSC-T6 发生上皮间质的转换。

TGFβ1-Smads 信号通路在肝纤维化发生及发展中的研究中已经取得了一定进展,但 TGF-β1 在激活 HSCs 发生上皮间质转换所致的肝纤维化过程中还存在复杂的调控机制,仍需进一步研究,这也将为临床上针对 HSCs 的靶向抗纤维化治疗提供必要的理论依据。

参考文献:

- [1] Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver [J]. *Hepatology*, 2001, 34: 859-867.
- [2] Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d793-807.
- [3] Park J-H, Yoon J, Lee KY, et al. Effects of geniposide on hepatocytes undergoing epithelial-mesenchymal transition in hepatic fibrosis by targeting TGFβ/Smad and ERK-MAPK signaling pathways [J]. *Biochimie*, 2015, 113: 26-34.
- [4] Chen T, Nie HY, Gao X, et al. Epithelial-mesenchymal transition involved in pulmonary fibrosis induced by multi-walled carbon nanotubes via TGF-beta/Smad signaling pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 226: 150-162.
- [5] Jia LN, Ma XT, Gui BS, et al. Sorafenib Ameliorates Renal Fibrosis through Inhibition of TGF-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition [J]. *PLoS One*, 2015, 10: 348-352.
- [6] Friedman SL. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver [J]. *Physiol Rev*, 2008, 88: 125-172.
- [7] Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol*, 2000, 35: 665-672.
- [8] Li JT, Liao ZX, Ping J, et al. Molecular mechanism of he-

- patie stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies [J]. *Gastroenterol* 2008 ,43: 419-428.
- [9] Schildberg FA , Wojtalla A , Siegmund SV , et al. Murine Hepatic Stellate Cells Veto CD8 T Cell Activation by a CD54-Dependent Mechanism [J]. *Hepatology* ,2011 ,54: 262-272.
- [10] Zhang YQ , Liu YJ , Mao YF , et al. Resveratrol ameliorates lipopolysaccharide-induced epithelial mesenchymal transition and pulmonary fibrosis through suppression of oxidative stress and transforming growth factor-beta 1 signaling [J]. *Clin Nutr* 2015 ,34: 752-760.
- [11] Guo L , Xu JM , Liu L , et al. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Is Involved in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis [J]. *Biomed Res Int* ,2015 ,2015: 232791-232791.
- [12] Li M , Luan F , Zhao Y , et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis [J]. *Exp Biol Med* 2016 ,241: 1-13.

科普沙龙

抗抑郁药可促使药物进入大脑

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2017.09.032

NIH 一项新研究发现 将抗抑郁药物阿米替林与治疗中枢神经系统疾病药物配伍 通过抑制大鼠的血脑屏障 可加强药物在大脑的释放。这项研究结果 4 月 27 日在线发表于《脑血流和代谢杂志》(*Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*)。

尽管研究人员提醒说 要确定人们是否从这一发现中获益 还需要做更多的研究 然而新发现很有可能彻底改变对脑部一系列疾病的治疗 包括癫痫、卒中、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抑郁等。实验结果令科学家们兴奋不已 他们已将中枢神经系统药物与阿米替林的联合给药方法申请了临时专利。

NIH 国家环境卫生研究院的科学家 Ronald Cannon 博士称 药物被有效释放大脑的最大障碍是被称为 P 糖蛋白(P-glycoprotein) 的蛋白质泵。P 糖蛋白沿脑血管内层分布,“命令”毒素和药物在未获准进入大脑的情况下回到体循环中。

为了解 P 糖蛋白的工作原理 ,Cannon 博士将这一蛋白想象为宾馆大门的保安 站在大厅入口的旋转门前。未经授权者被禁止入内 ,保安将它们引导到旋转门周边通向外面的地方 由此进入街区。打个比方 这如同我们吃的蔬菜 其中的分子若溜进大脑 对大脑是有毒的。它们没能进入大脑 是因为 P 糖蛋白在把守 但是这个保护神把有益的治疗药物也拒之门外了。

Cannon 博士和他的同事最初发现 阿米替林非常明显地降低了野生型大鼠大脑毛细血管内 P 糖蛋白泵的活性。后来他们发现 阿米替林在模拟人类 ALS 的基因修饰大鼠大脑毛细血管有相同的效果。在两个大鼠模型中 阿米替林在 10~15 min 内关闭了 P 糖蛋白。把阿米替林除掉 P 糖蛋白泵的活力又恢复到全能状态。文章第一作者 David Banks 称 阿米替林对 P 糖蛋白的作用快速而且可逆。这些优势使治疗充满了诱人的魅力。

大多数实验室的发明不能应用于临床 但是科学家们对他们的发现转化为医生和病人更好的治疗选择满怀希望。

Cannon 博士预期 将阿米替林与小剂量阿片类药物配伍 可减轻疼痛 并减小副作用 如便秘和上瘾。这些副作用在使用大剂量阿片类的病人中很常见。

目前美国正面临阿尔茨海默病、自杀、阿片类药物滥用病人的不断增多 这一发明将有助于应对这些严重的健康挑战 科学家对此充满信心。

韩桂芬 编译

章静波 审校