文章编号:1000-5404(2006)03-0185-04

论著

在支气管上皮细胞恶性转化过程中Smad7表达变化对TGF-βR、SMADs及STRAP蛋白的影响

王 莉[1,2],霍艳英[1],张开泰[1],王 莹[1,2],何欣蓉[2],项晓琼[1],胡迎春[1],李 刚[1],米 粲[2],吴德昌[1] ([1]军事医学科学院放射医学研究所四室,北京 100850;[2]重庆医科大学病理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 研究永生化人支气管上皮细胞BEP2D恶性转化过程中,作为Smad蛋白家族的抑制分子,Smad7对TGF-βR、R Smads及STRAP蛋白的表达影响。**方法** 培养BEP2D、BERP35T2细胞及稳定表达Smad7蛋白的细胞BS7(来源于BEP2D)、RS7(来源于BERP35T2),提取细胞蛋白,用Western blot方法比较稳定转染Smad7基因前后的BEP2D和BERP35T2细胞中TGF-βRⅠ、TGF-βRⅡ、Smad2/3、Smad4及STRAP蛋白表达差异。**结果** 稳定转染Smad7基因后细胞中TGF-βRⅡ表达降低,Smad2和STRAP蛋白表达增高,Smad3、Smad4蛋白表达无变化。**结论** Smad7高表达导致TGF-β信号通路发生改变,其中TGF-βRⅡ表达降低,STRAP表达增高可能是诱使细胞发生恶性转化的机制之一。

关键词:Smad7;TGF-βR;R SMADs;STRAP;恶性转化
中图法分类号:R322.34;R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Effect of Smad7 on the expression of TGF-βR, SMADs, and STRAP in the process of malignant transformation of human bronchial epithelial cells

WANG Li[1,2], HUO Yan-ying[1], ZHANG Kai-tai[1], WANG Ying[1,2], He Xin-rong[2], XIANG Xiao-qiong[1], HU Ying-chun[1], LI Gang[1], MI Can[2], WU De-chang[1] ([1]Department 4, Institute of Radiomedical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, [2]Department of Pathology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To analyze the effect of Smad7 on the expression of TGF-βR, R Smads and STRAP in the process of malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells BEP2D. **Methods** Cells were cultured and protein were extracted from BEP2D, BERP35T2, BS7 and RS7 cells, then Western blotting was performed to examine the expression level of TGF-βRⅠ, TGF-βRⅡ, Smad2/3, Smad4 and STRAP. **Results** Stable transfection of Smad7 gene led to decreased expression of TGF-βRⅡ and increased expression of Smad2 and STRAP in both BEP2D and BERP35T2 cells. There were no changes in the expression of Smad3 and Smad4. **Conclusion** Overexpression of Smad7 leads to decreased expression of TGF-βRⅡ and increased expression of STRAP in BEP2D and BERP35T2 cells, which could be one of the mechanisms of the malignant transformation of BEP2D cells.

Key words: Smad7; TGF-βR; R SMADs; STRAP; malignant transformation

转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)作为TGF-β超家族的成员调节多种靶基因的表达,在细胞的生长、分化以及凋亡的调节中发挥重要作用。TGF-β首先与跨膜的Ⅱ型丝氨酸/苏氨酸激酶受体(type Ⅱ TGF-β receptor, TβRⅡ)结合,TβRⅡ磷酸化后与Ⅰ型受体(type Ⅰ TGF-β receptor, TβRⅠ)形成异源复合物并使之磷酸化,启动TGF-β信号。受体结合的Smads(R Smads)能结合上述TGF-β-受体复合物中的TβRⅠ并发生磷酸化,活化的R Smads整个分子伸展开,继而与Smad4形成异源寡聚复合物,转位到核,调节靶基因的转录应答,从而抑制细胞生长、诱导其凋亡。Smad7是TGF-β信号通路的抑制元件,通过与丝氨酸/苏氨酸激酶受体相关蛋白(serine-thre-

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(30200329)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China(30200329)
作者简介:王 莉(1974-),女,四川省合江县人,博士,讲师,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文8篇。现在重庆市肿瘤医院肿瘤内科,电话:(023)89013707
通讯作者:霍艳英,E-mail:huoyy@nic.bmi.ac.cn
收稿日期:2005-03-25;修回日期:2005-07-15

onine kinase receptor-associated protein, STRAP) 作用，与 R Smads 竞争 TGF-β 受体，启动抑制功能[1]。TGF-β 信号转导通路的配体、受体、细胞质内信号转导分子-Smads 蛋白等组成一个肿瘤抑制通路。通路中任一元件的异常都可引起信号传导的紊乱，从而导致肿瘤的发生。前期以人永生化支气管上皮细胞 BEP2D 及经辐射诱发恶性转化的支气管上皮细胞 BERP35T2 为基础所做的研究表明[2-4]：Smad7 基因在细胞发生恶性化后表达增高；高表达 Smad7 基因的细胞增殖能力强，TGF-β 对该细胞的生长抑制效应弱。说明 Smad7 基因的表达变化同支气管上皮细胞的恶性转化及肺癌发生相关。我们最近的研究发现在 BEP2D 细胞中，Smad7 对 TGF-β/Smads 信号通路的拮抗作用主要通过抑制 Smad3 的活化、Smad3/Smad4 异源复合物的形成及核转位，从而拮抗 TGF-β 对细胞的生长抑制效应[5]。为了进一步调查 Smad7 过表达对 TGF-β 信号通路元件的影响，探讨 Smad7 促进细胞增殖及恶性转化的机制，我们用 Western blot 分析了稳定转染 Smad7 基因前后 BEP2D 及 BERP35T2 细胞中 TβR Ⅰ/Ⅱ、STRAP、Smad2/3/4 蛋白的表达变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LHC-8 无血清培养液为美国 Biofluids 公司产品；M-PER 蛋白提取剂购自美国 PIERCE 公司；兔抗人 TβRⅠ多抗、兔抗人 TβR Ⅱ多抗、羊抗人 Smad2/3 多抗、鼠抗人 Smad4 单抗、羊抗鼠 STRAP 多抗、羊抗人 Actin 多抗及发光显迹液均购自 Santa cruz 公司，辣根过氧化物酶(HRPO)抗 Ig 抗体偶联物购自中山公司。

1.2 细胞来源

永生化人支气管上皮细胞 BEP2D 由美国 Harris CC 馈赠，BERP35T2 细胞为 BEP2D 细胞经 1.5 Gy α 粒子照射后第 35 代细胞接种裸鼠成瘤后的恶性转化细胞中分离出的第 2 号细胞克隆，BS7、RS7 分别为 BEP2D 和 BERP35T2 细胞稳定转染 Smad7 基因筛选的阳性克隆，BERP35T2 及 BS7、RS7 细胞均由吴德昌实验室建立。

1.3 细胞培养

按文献[2]的方法进行，上述细胞用 LHC-8 无血清培养液 37 ℃，5% CO_2 条件下培养。

1.4 Western blot 分析

待细胞生长铺满瓶底后，收获细胞，加入 M-PER 蛋白提取剂(250 ~ 500 μl 蛋白提取剂/60 mm 培养瓶)，按试剂盒方法提取蛋白质，BCA 法进行定量。取 50 μg 蛋白与 6 × SDS 加样缓冲液混合(按每 30 μl 含 50 μg 蛋白稀释)，100 ℃变性 5 min，用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，电转移至硝酸纤维素膜上，用丽春红 S 染色观察转移效果并标出分子量标准。以含 5% 脱脂奶粉 TBS-T 溶液(10 mmol/L Tris · Cl，100 mmol/L NaCl + 0.1% Tween 20)封闭，而后加入一抗 (1∶400 稀释)，再以 HRPO 抗 Ig 抗体耦联物 (1∶2 000 ~ 1∶4 000 稀释) 孵育，以上步骤间用 TBS-T 常温下充分洗膜。最后用发光底物显迹法进行显迹，在暗室中将膜贴在 X 线胶片下曝光，常规方法显影、定影后分析杂交信号，并以同一张膜上重复杂交 β-actin 作为对照，所用软件为 Labworks analysis software(UVP, INC) 。所有实验重复 3 次，取其有代表性的结果。

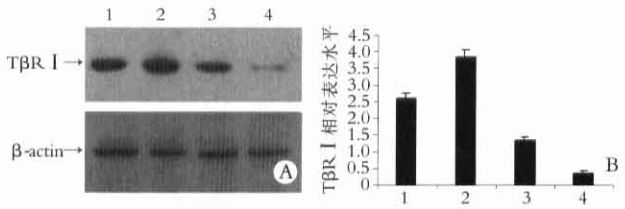
1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 SPSS 10.0 统计分析程序进行方差分析和均数间多重比较。

2 结果

2.1 稳定转染 Smad7 基因前后 TβR Ⅰ Western blot 检测结果

图 1A 为 TβR Ⅰ在各细胞系中表达丰度的 Western blot 检测结果，图 1B 为 Western 相对定量结果。由图 1 可知，BERP35T2 细胞中 TβR Ⅰ表达较 BEP2D 细胞低($P < 0.05$)，BEP2D 细胞稳定转染 Smad7 基因后 TβR Ⅰ表达增高($P < 0.05$)，BERP35T2 稳定转染 Smad7 基因后 TβR Ⅰ表达降低($P < 0.05$)。



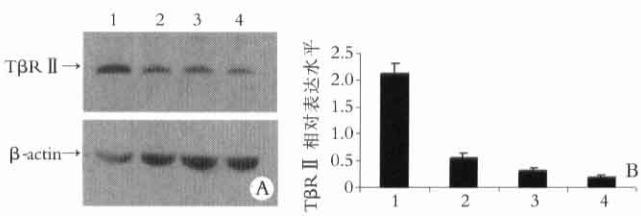
A：黑白电泳图；B：蛋白电泳相对定量结果

1：BEP2D；2：BS7；3：BERP35T2；4：RS7

图 1 稳定转染 Smad7 基因前后 TβR Ⅰ Western blot 检测结果

2.2 稳定转染 Smad7 基因前后 TβR Ⅱ Western blot 检测结果

图 2A 为 TβR Ⅱ在各细胞系中表达丰度的 Western blot 检测结果，图 2B 为 Western 相对定量结果。由图 2 可知，BERP35T2 细胞中 TβR Ⅱ表达较 BEP2D 细胞低($P < 0.05$)，BEP2D 和 BERP35T2 细胞稳定转染 Smad7 基因后 TβR Ⅱ表达均降低($P < 0.05$)。



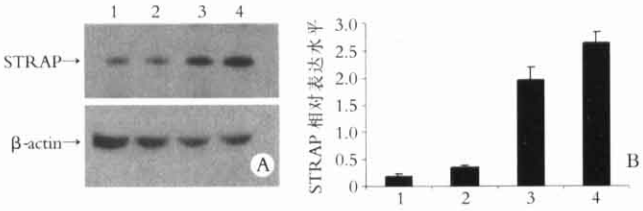
A：黑白电泳图；B：蛋白电泳相对定量结果

1：BEP2D；2：BS7；3：BERP35T2；4：RS7

图 2 稳定转染 Smad7 基因前后 TβR Ⅱ Western blot 检测结果

2.3　稳定转染 Smad7 基因前后 STRAP Western blot 检测结果

图3A为STRAP在各细胞系中表达丰度的Western blot检测结果，图3B为Western相对定量结果。由图3可知，BERP35T2细胞中STRAP表达较BEP2D细胞高（$P<0.05$），BEP2D和BERP35T2细胞稳定转染Smad7基因后STRAP表达均增高（$P<0.05$）。



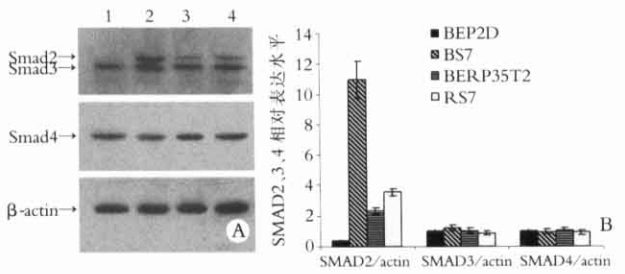
A：黑白电泳图；B：蛋白电泳相对定量结果

1：BEP2D；2：BS7；3：BERP35T2；4：RS7

图3　稳定转染 Smad7 基因前后 STRAP Western blot 检测结果

2.4　稳定转染 Smad7 基因前后 Smad2/3、Smad4 Western blot 检测结果

图4A为Smad2/3、Smad4在各细胞系中表达丰度的Western blot检测结果，图4B为Western相对定量结果。由图4可知，BERP35T2中Smad2表达较BEP2D增高（$P<0.05$），BEP2D和BERP35T2稳定转染Smad7基因后Smad2表达均增高（$P<0.05$），而Smad3、Smad4蛋白表达无显著性差异（$P>0.05$）。



A：黑白电泳图；B：蛋白电泳相对定量结果

1：BEP2D；2：BS7；3：BERP35T2；4：RS7

图4　稳定转染 Smad7 基因前后 SMAD2/3、SMAD4 Western blot 检测结果

3　讨论

TGF-β信号通路元件的突变失活或表达下调所导致的功能紊乱，在细胞恶性变中扮演重要作用。许多上皮来源的肿瘤，如结肠癌、乳腺癌、胰腺癌、肝细胞癌中都存在TGF-β通路基因如Smad2、Smad4、TβR Ⅱ的改变[6]。那么在辐射诱发致癌过程中，Smad7基因是否引起TGF-β信号通路元件异常表达？我们通过调查稳定转染Smad7基因前后BEP2D及BERP35T2细胞中TβR Ⅰ/Ⅱ、STRAP、Smad2/3/4蛋白的表达变化，以探讨Smad7促进细胞增殖及恶性转化的机制。由于本研究的BEP2D细胞是用人乳头状瘤病毒HPV-18转化正常人支气管上皮细胞建立的永生化细胞系，BEP2D经辐射诱发恶性转化后建立了人肺鳞癌细胞系BERP35T2，分别代表体外多阶段致癌模型的发生发展阶段，因此，也将进一步阐明人肺鳞癌发生发展的分子机制。

3.1　Smad7 对 TβR 蛋白表达的影响

癌细胞表面TβR表达降低或功能失活是其逃逸TGF-β1负性生长调控的原因之一。在乳腺癌、前列腺癌、T淋巴瘤、卵巢癌、胃癌、结肠癌、视网膜母细胞瘤、皮肤T细胞淋巴瘤和头颈部鳞癌等中均报道有TβR Ⅰ突变失活或TβR Ⅱ表达下调[7]。免疫组织化学显示，Ⅰ型和Ⅱ型TGF-β受体在正常前列腺组织中总为高表达，而在前列腺癌组织中则为弱表达，转移到淋巴结的前列腺癌组织中有45%完全不表达[8]。这种TGF-β受体的异常影响了正常TGF-β信号的传导，使其生长抑制功能丧失。在前列腺癌细胞系中，由于LNCap细胞不表达TGF-β Ⅰ型受体，所以其生长不受TGF-β1的抑制[9]。Fukai等[10]研究人食管鳞状细胞癌时发现，癌灶中TβR Ⅰ、Ⅱ表达下降与肌层浸润深度、淋巴结转移及临床分期有关。本研究结果显示，稳定转染Smad7基因后细胞中TβR Ⅰ和/或TβR Ⅱ表达降低，尤其是TβR Ⅱ，转染后表达量仅为BEP2D细胞表达量的10%～20%。因TβR Ⅱ表达改变不仅能直接影响TGF-β与TβR Ⅰ结合，还直接影响到TβR Ⅰ活化。而TβR Ⅱ介导的TβR Ⅰ磷酸化是TGF-β信号传导的关键环节。因此，Smad7过表达所导致的TβR表达降低，会进一步使TGF-β对通路下游分子的调控能力减弱，从而使细胞增殖能力增强，恶性度增高。我们的研究还发现，TβR Ⅰ在BS7中表达上调，而在RS7中表达下降，这一结果有一定的偶然性，与两种细胞系本身的差异无关。

3.2　Smad7 对 STRAP 蛋白表达的影响

TGF-β信息传递是通过其受体依次结合、磷酸化而实现的。Smad7能与TβR Ⅰ稳定结合，阻止TβR Ⅰ与R Smads的结合而抑制后者的活化。那么Smad7是怎样与TβR Ⅰ稳定结合而发挥抑制作用的呢？STRAP的发现解开了这个谜团[11]。STRAP能与Smad7及TβR Ⅰ的MH2区结合，协同抑制TGF-β信号，过表达的STRAP使TGF-β介导的转录活性受到抑制。在无

配体的情况下 Smad7 主要位于核内，当 TGF-β 受体活化后，Smad7 才在细胞质积聚。STRAP 引导 Smad7 与活化的 TβR Ⅰ结合形成复合物，并使该复合物稳定，这样有助于 Smad7 阻止 R-Smad 与 TβR-Ⅰ的结合。本研究结果显示，稳定转染 Smad7 基因后细胞中 STRAP 表达增高（图 3），因此在辐射诱发致癌过程中，STRAP 表达增高可能是诱使细胞发生恶性转化的机制之一。

3.3 Smad7 对 Smad2，3，4 蛋白表达的影响

Smads 在 TGF-β 信号由细胞膜向细胞核内传导过程中发挥着决定性作用。Smads 异常可以使 TGF-β 的细胞增殖抑制作用丧失，从而诱发癌变。在多种肿瘤（包括胰腺癌、肺癌、大肠癌和乳腺癌）中都存在 Smad2、Smad4 的突变与表达下调[7,12]。本研究结果显示，Smad7 过表达不影响 Smad3、4 蛋白的表达水平，但 Smad2 表达增高。结合近期国外研究结果：细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinases，ERKs）通路的活化可增强 Smad2 的转录活性，并使 Smad2 蛋白表达增高[13]。我们推测：Smad7 可能同 TGF-β 介导的 ERK 通路的活化相关。

以上研究结果提示，Smad7 基因稳定转染人支气管上皮细胞系后，细胞增殖能力增强，TGF-β 对该细胞系的生长抑制能力效应减弱，其机制可能为：①Smad7 过表达导致 TβR Ⅰ、TβR Ⅱ表达降低，进一步使 TGF-β 信号通路功能减弱；②STRAP 表达增高，进一步拮抗 TGF-β 信号通路。有关 Smad7 如何引起 TβR 及 STRAP 表达发生改变，Smad2 表达增高的机制等，还有待于进一步研究。

参考文献：

[1] TEN DIJKE P, HILL C S. New insights into TGF-beta-Smad signalling [J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(5): 265 - 273.

[2] 霍艳英，张开泰，李邦印，等. 在 BEP2D 细胞恶性转化过程中 TGF-β1 对 Smad7 表达的调节[J]. 癌症，2001，21(2)：117 - 121.

[3] 霍艳英，张开泰，李邦印，等. 辐射诱发 BEP2D 恶性转化中 Smad7 对 TGF-β/SMADs 信号通路的调控[J]. 中华放射医学与防护杂志，2003，23(5)：311 - 313.

[4] 王 莹，霍艳英，张开泰，等. Smad7 基因沉默对细胞增殖的影响[J]. 中华医学杂志，2004，84(22)：1909 - 1910.

[5] 王 莉，霍艳英，张开泰，等. Smad7 对 Smad2、Smad3、Smad4 核转位的抑制作用[J]. 生物技术通讯，2005，16(2)：128 - 130.

[6] KIM S J, LETTERIO J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis[J]. Leukemia, 2003, 17(9): 1731 - 1737.

[7] CHIN D, BOYLE G M, PARSONS P G, *et al*. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta) [J]? Br J Plast Surg, 2004, 57(3): 215 - 221.

[8] TEICHER B A. Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta[J]. Cancer Metastasis Rev, 2001, 20(1 - 2): 133 - 143.

[9] HAYES S A, HUANG X, KAMBHAMPATI S, *et al*. p38 MAP kinase modulates Smad-dependent changes in human prostate cell adhesion [J]. Oncogene, 2003, 22(31): 4841 - 4850.

[10] FUKAI Y, FUKUCHI M, MASUDA N, *et al*. Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2003, 104(2): 161 - 166.

[11] DATTA P K, MOSES H L. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(9): 3157 - 3167.

[12] PAREKH T V, GAMA P, WEN X, *et al*. Transforming growth factor beta signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition[J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2778 - 2790.

[13] FUNABA M, ZIMMERMAN C M, MATHEWS L S. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase [J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 41361 - 41368.

（编辑 汪勤俭）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有 1 个，2 个或 3 个，但“姓”只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 PUBLIC J Q。

本刊编辑部