文章编号:1000-5404(2007)15-1455-03

论著

C-ski和Smad3在大鼠皮肤成纤维细胞辐射性损伤中的变化及意义

刘 霞,李 平,张 恩,刘 苹,周元国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 重庆 400042)

提 要:目的 研究C-ski和Smad3在大鼠皮肤成纤维细胞辐射性损伤中的变化和意义。**方法** 软X线照射诱导大鼠皮肤成纤维细胞辐射性损伤,Western blot和RT-PCR观察C-ski、Smad3蛋白和mRNA水平的变化,EMSA检测Smad3转录活性的变化。**结果** 辐射后2 h,C-ski、Smad3蛋白和mRNA水平、Smad3转录活性无显著变化,4 h开始,C-ski表达逐渐下降,Smad3表达和转录活性逐渐升高,在8 h分别达到峰谷和峰顶。**结论** C-ski和Smad3参与大鼠皮肤成纤维细胞辐射性损伤的病理过程,辐射后C-ski下降,Smad3升高,并导致Smad3转录活性增强,细胞增殖受抑,凋亡增加。

关键词: C-ski;Smad3;成纤维细胞;辐射
中图法分类号: R322.99; R394.2; R818.023 **文献标识码**: A

Changes and significance of C-ski and Smad3 in rat skin fibroblast of radiation induced injury

LIU Xia, LI Ping, ZHANG En, LIU Ping, ZHOU Yuan-guo (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Molecular Biology Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To clarify the changes and significance of C-ski and Smad3 in rat skin fibroblast exposed to radiation. **Methods** The radiation induced injury of rat skin fibroblast was made by exposure to Soft X ray. Protein and mRNA expressions of C-ski and Smad3 were detected by Western blot and RT-PCR. The transcriptional activity of Smad3 was observed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** At 2 h after radiation, there were no obvious changes in protein and mRNA expression levels of C-ski, Smad3 or the transcriptional activity of Smad3. At 4 h, the expression of C-ski began to gradually decrease, reaching the minimum at 8 h, and Smad3 and Smad3 transcriptional activity began to increase, peaking at 8 h. **Conclusion** C-ski and Smad3 are involved in the pathological process of radiation induced fibroblast injury. Radiation can decrease C-ski and increase Smad3 expression, resulting in elevated Smad3 transcription activity, therefore cell proliferation is repressed and cell apoptosis is increased.

Key words: C-ski; Smad3; fibroblast; radiation

细胞辐射性损伤包括辐射引起的细胞周期阻滞、增殖受抑和凋亡增加,并涉及到多种信号途径的调节。辐射导致DNA损伤后,信号传递至效应分子,通过细胞周期检测点激酶1(checkpoint kinase 1,Chk1)、Chk2和P53引起细胞周期阻滞、增殖受抑,通过P53,乳腺癌易感基因(breast cancer susceptibility gene, BRCA1)等促进细胞凋亡,通过P53、BRCA1,Nijmegen破损综合征(Nijmegen breakage syndrome,Nbs1)和cAbl促进DNA修复等。一些信号在其中起着重要的作用,如P53不仅可以引起细胞周期阻滞,同时诱发细胞凋亡,启动DNA修复[1,2]。

原癌基因C-ski(cellular Sloan-Kettering Institute)是V-ski(virus Sloan-Kettering Institute)细胞内的同源物,有研究报道,C-ski可以以辅阻遏子的形式,结合转化生长因子-β1(transforming growth factors-β1, TGF-β1)的下游转录因子Smad3,从而逆转TGF-β1/Smad3对上皮细胞的抑制作用。我们前期的实验已经证明

基金项目:国家重点基础研究发展规划("973"项目)(G1999054205);国家自然科学基金(30400468)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054205) and the National Natural Science Foundation of China (30400468)

作者简介:刘 霞(1971-),女,河北省郸邯市人,博士,助理研究员,主要从事创伤愈合方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757465, E-mail: lxflying@yahoo.com.cn
通讯作者:周元国,电话:(023)68757475, E-mail: ygzhou@cta.cq.cn

收稿日期:2006-08-28;**修回日期**:2006-11-24

C-ski 作为大鼠皮肤成纤维细胞细胞周期 G_1 期调节蛋白，它可以通过抑制 Smad3 活性，加快 G_1 期进展，促进细胞增殖[3]，同时 C-ski 还可以增加成纤维细胞的抗辐射作用，减轻细胞凋亡[4]。C-ski 和 Smad3 作为成纤维细胞增殖和凋亡的调节子，是否参与了细胞辐射性损伤的病理过程，目前尚少见文献报道。因此，本研究在前期工作的基础上，选出有显著效应的软 X 线照射剂量，观察辐射后 C-ski、Smad3 表达及 Smad3 转录活性的变化，以期阐明二者在成纤维细胞辐射性损伤通路中的意义。

1 材料与方法

1.1 大鼠皮肤成纤维细胞培养

Wistar 大鼠皮肤成纤维细胞培养参见文献[3]。将 3～6 代之间细胞用于实验。

1.2 Western blot 和 RT-PCR 检测辐射后 C-ski、Smad3 表达

根据先前的实验，4 Gy 的软 X 线照射可以显著抑制大鼠皮肤成纤维细胞的增殖，增加其凋亡率[4,5]。我们选择 4 Gy 的软 X 线照射培养的成纤维细胞，分别于照射后 2、4、8 h 收集细胞，0 h 为作为对照未照射组。Western blot 和 RT-PCR 法分别检测 C-ski 和 Smad3 蛋白和 mRNA 表达。Anti-ski-goat IgG 和 anti-Smad3-goat IgG 购自美国 Santa Cruze 公司。Smad3 上游引物 5′-TCCTGGCTACCTGAGTGAAGA-3′，Smad3 下游引物 5′-GTTGGGAGACTGGACGAAAA-3′，扩增片断长 415 bp；C-ski 上游引物 5′-ACCATCTCGTGCTTCGTGGTGGGA-3′，C-ski 下游引物 5′-CTCCTTGCCCGTGTAATCCTGGCT-3′，扩增片断长 561 bp，均由上海生工合成。β-actin 引物购自上海生工，扩增片断长 318 bp。循环 30 次。

1.3 EMSA 检测辐射对 Smad3 转录活性的影响

细胞处理同上，用美国 Pierce 公司的 NE-PERTM 核蛋白抽提试剂盒提取核蛋白，Smad3 探针序列由上海生工合成，正义：5′-CTA GGATAGCGTCTAGACATAGTCTAGACTGAGT-3′，反义：5′-CTAGGACTCAGTCTAGACTATGTCTAGACGCTAT-3′。用 γ-^{32}P-ATP（福瑞生物工程公司，北京）标记 Smad3 探针。将已标记寡核苷酸探针和核提取物进行特异性核蛋白结合反应，同时将寡核苷酸探针、100 倍的未标记寡核苷酸探针和核提取物进行特异性竞争结合反应作为对照。制备 4% 的聚丙烯酰胺凝胶，将上述反应后的样品上样电泳，放射自显影。每个时相点复孔 3 个。

结果用扫描分析软件（Labwork4.0）测量积分光密度值（IOD）。Western blot 中将未照射组的实际 IOD 值设为 100，样本的实际 IOD 值与之相比后得到的数值为样本的相对含量；EMSA 中将未照射组的 IOD 值设为 100。

1.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Microsoft Excel 统计软件进行双尾 student's t 检验。

2 结果

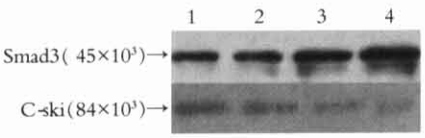
2.1 辐射后 C-ski 和 Smad3 的表达

与对照组（0 h）比较，2 h 时 Smad3 蛋白的表达有所升高，但并无显著差异（$P>0.05$）；4 h 和 8 h 时，Smad3 蛋白的表达逐渐升高，显著高于对照组（$P<0.01$）；而 C-ski 蛋白的表达与 Smad3 相反，在 2 h 时有轻微下降，在 4 h 和 8 h 显著下降（$P<0.01$），8 h 时达到最低值。详见表 1 和图 1。mRNA 的表达趋势和蛋白一致，见图 2。

表 1 辐射对 C-ski 和 Smad3 蛋白表达的影响（%，$n=3$）

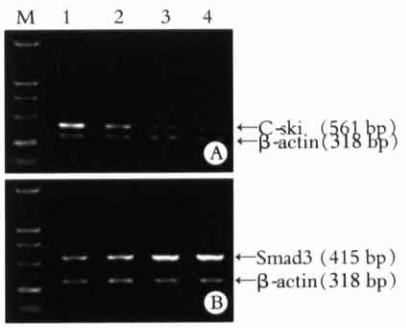
蛋白	照射后的时相点		
	2 h	4 h	8 h
C-ski	83.3±19.9	64.5±16.8[a]	31.5±12.9[a]
Smad3	108.9±28.7	213.2±25.9[a]	344.6±61.2[a]

表中数据为占对照组的百分数；a：$P<0.01$，与对照组（100%）比较



1：对照组；2：2 h；3：4 h；4：8 h

图 1 辐射对 C-ski 和 Smad3 蛋白表达的影响



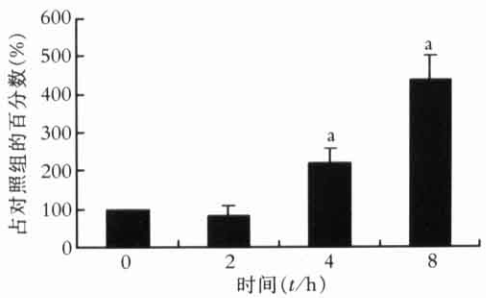
A：C-ski mRNA；B：Smad3 mRNA

M：标准；1：0 h；2：2 h；3：4 h；4：8 h

图 2 辐射后 Smad3 和 C-ski mRNA 表达

2.2 辐射后 Smad3 转录活性的影响

和对照组相比，在辐射后 2 h 时 Smad3 的转录活性有轻微的下降，但并无统计学差异（$P>0.05$）。从 4 h 到 8 h，Smad3 的转录活性显著增高（$P<0.01$），详见图 3。



a：$P<0.01$，和 0 h 组比较

图 3 辐射对 Smad3 转录活性的影响

3　讨论

C-ski 首先发现于禽类动物，它是成纤维细胞复杂的调节子，如促进鹌鹑胚胎成纤维细胞的快速增殖和肌肉分化，却抑制小鼠胚胎成纤维细胞（mouse embryonic fibroblasts，MEFs）增殖[6]。中胚层来源的皮肤成纤维细胞是重要的创伤愈合修复细胞，辐射导致的肉芽组织中成纤维细胞增殖受抑，凋亡增加是愈合延迟的重要影响因素。阐明成纤维细胞辐射性损伤相关基因的变化，对辐射难愈伤口的干预性治疗有着重要的指导意义。

我们前期的研究表明，C-ski 不仅能表达于大鼠的皮肤成纤维细胞，而且能促进其增殖[3]。Smad3 是 TGF-β1 的下游转录因子，由 TGF-β1 受体活化后，在 Smad4 的协同下，转位到核内，发挥其转录因子的作用。Smad3 是成纤维细胞重要的调节因子，它可以通过促进 P21、P15 表达抑制细胞周期进展，通过上调 B 细胞淋巴瘤 2 偶联死亡区域蛋白（Bcl-2-associated death protein，Bad）、B 细胞淋巴瘤 2 相关凋亡调节蛋白（Bcl-2-interacting mediator of cell death，Bim），下调 B 细胞淋巴瘤-XL（B cell lymphoma-XL，Bcl-XL）等机制参与不同细胞凋亡的调控。C-ski 是细胞内 Smad3 重要的辅阻遏子[7]，它可以通过抑制 Smad3 活性来调节细胞的增殖和凋亡。我们的研究已经表明，在大鼠皮肤成纤维细胞内，C-ski 主要通过 Smad3 来促进细胞的增殖[3]。

我们选择对数生长期的成纤维细胞为观察对象，以 4 Gy 的软 X 线有效照射造成大鼠皮肤成纤维细胞增殖受抑、凋亡增加的状态，观察了辐射后 C-ski、Smad3 的表达及其 Smad3 转录活性的变化，以判断二者是否参与辐射后细胞受损的病理过程。研究表明，照射后 2 h，Smad3、C-ski 的表达均无显著改变，而从 4 h开始，Smad3 的表达逐渐升高，C-ski 的表达逐渐下降。与此对应的是，Smad3 的转录活性在照后 2 h 也无显著变化，而在 4 h 显著升高。我们据此推测：辐射导致 C-ski 表达下降，对 Smad3 的阻遏作用降低，再加上 Smad3 表达增加，从而导致了 Smad3 转录活性增强，P21，P15 增加，BAD、Bim 上调等，从而周期阻滞，凋亡增加。这一结果和我们的动物实验观察相一致[8]：辐射侧肉芽组织 C-ski 表达下降，Smad3 增加，同时伴随组织增殖下降、凋亡增加，愈合延迟。

DNA 损伤后的信号反应是一个非常复杂的网络，可简单分为 DNA 损伤的感受、传递和效应 3 个过程。对射线敏感的基因（radiation-sensitive，Rad）家族是目前较公认的感受器[9]，毛细血管扩张性共济失调症突变基因（ataxia telangiectasia mutation，ATM）和 ATR（ATM-Rad3-related protein）在对离子辐射的传递反应中起着重要的作用，控制着几个 DNA 损伤关键反应蛋白 P53，鼠双微体基因（murine double minute 2，MDM2），乳腺癌易感基因 1（breast cancer susceptibility gene 1，BRCA1），细胞周期检测点激酶 2（checkpoint kinase 2，Chk2）的起始磷酸化[10]。DNA 损伤的效应包括磷脂酰肌醇激酶（phosphotidylinositol kinase，PIK）和关卡激酶（checkpoint kinase，Chk）的底物以及涉及转录调节、细胞周期调控、细胞凋亡调控和 DNA 修复的蛋白。我们推测：C-ski 作为转录的调节子和原癌基因，辐射后表达受抑，是 DNA 损伤的效应之一，其上游的分子机制尚不清楚，但是因此而削弱了对 Smad3 的抑制作用，同时又由于 Smad3 的表达增强，导致了 Smad3 的转录活性增强，细胞增殖受抑、凋亡增加。因此进一步研究以提高 C-ski 的表达水平或抑制 Smad3 的表达是否具有改善辐射难于伤口的愈合将有积极的意义。

参考文献：

[1] Zhou B B, Elledge S J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective[J]. Nature, 2000, 408 (6811): 433 - 439.

[2] Concin N, Stimpfl M, Zeillinger C, *et al*. Role of p53 in G2/M cell cycle arrest and apoptosis in response to gamma-irradiation in ovarian carcinoma cell lines[J]. Int J Oncol, 2003, 22 (1): 51 - 57.

[3] 刘　霞，李　平，张　恩，等. C-ski 对大鼠皮肤成纤维细胞增殖的调节作用及机制[J]. 细胞生物学杂志，2005，27(5)：559 - 564.

[4] 刘　霞，李　平，张　恩，等. C-ski 对大鼠皮肤成纤维细胞抗辐射作用的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志，2006，26(2)：141 - 143.

[5] 李　平，周元国，刘　霞，等. 软 X 线照射对体外培养大鼠成纤维细胞增殖的影响[J]. 创伤外科杂志，2002，4(增刊)：39 - 42.

[6] Shinagawa T, Nomura T, Colmenares C, *et al*. Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice [J]. Oncogene, 2001, 20(56): 8100 - 8108.

[7] Suzuki H, Yagi K, Kondo M, *et al*. c-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements[J]. Oncogene, 2004, 23(29): 5068 - 5076.

[8] Liu X, Zhang E, Li P, *et al*. Expression and possible mechanism of C-ski, a novel tissue repair-related gene during normal and radiation-impaired wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2006, 14(2): 162 - 171.

[9] Lindsey-Boltz L A, Bermudez V P, Hurwitz J, *et al*. Purification and characterization of human DNA damage checkpoint Rad complexes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(20): 11236 - 11241.

[10] Saito S, Goodarzi A A, Higashimoto Y, *et al*. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (15): 12491 - 12494.

（编辑　张大春）