文章编号:1000-5404(2009)11-1045-04

论著

尿酸对人尿道成纤维细胞 TGF-β1、Smad3 的影响

郭 旭,卢根生 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察人尿道成纤维细胞在尿液、尿酸刺激下 TGF-β1、Smad3 的表达变化,探讨尿道瘢痕的形成机制。**方法** 体外培养人尿道成纤维细胞,以尿液、350 μmol/L 浓度的尿酸刺激溶液刺激人尿道成纤维细胞,通过免疫荧光染色和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测各组细胞 TGF-β1、Smad3 因子表达变化, ELISA 法比较各组细胞上清液Ⅰ型胶原蛋白差异。**结果** 免疫荧光检测提示 TGF-β1 与 Smad3 蛋白在人尿道成纤维细胞中均有表达,尿液及生理浓度的尿酸刺激后,TGF-β1 与 Smad3 的 mRNA 表达上调,蛋白表达明显升高($P<0.05$);ELISA 法检测显示,尿液和尿酸刺激人尿道成纤维细胞 24、48 h 后,细胞上清液中Ⅰ型胶原蛋白含量显著升高($P<0.05$)。**结论** 尿酸刺激引起人尿道成纤维细胞 TGF-β1、Smad3 的表达升高;尿酸可能对尿道瘢痕的形成起促进作用。

关键词: 尿道瘢痕;成纤维细胞;转化生长因子-β1;尿液;尿酸
中图法分类号: R363.13; R619.6; R693.5 **文献标识码**: A

Effects of uric acid on TGF-β1 and Smad3 expression in human urethral fibroblasts

GUO Xu, LU Gen-sheng (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of urine on TGF-β1 and Smad3 expression in cultured human urethral fibroblasts and explore the mechanism of urethral scar fibrosis. Methods The human urethral fibroblasts were cultured and stimulated by urine or 350 μmol/L uric acid. The mRNA and protein expression of TGF-β1 and Smad3 were measured by PT-PCR and immunofluorescent staining, respectively. Collagen Ⅰ levels in the supernatants in different groups were detected by ELISA. Results TGF-β1 and Smad3 were detected in human urethral fibroblasts by immunofluorescent staining. After being presented with urine or uric acid at physiological concentration, both TGF-β1 and Smad3 in human urethral fibroblasts were increased significantly at both the protein and mRNA levels($P<0.05$). By ELISA, the upregulation of Collagen Ⅰ in the supernatant was also discovered at 24 or 48 h after stimulation with urine or uric acid. Conclusion Uric acid stimulation could increase the expression of TGF-β1 and Smad3. Uric acid probably take part in promotion of urethral scar fibrosis.

Key words: urethral scar; fibroblast; TGF-β1; urine; uric acid

尿道下裂术后瘢痕狭窄的发生率较高,往往需要尿道扩张或者再次手术进行治疗,给患者带来了很大的痛苦。目前临床上尚没有确实的方法预防尿道下裂术后瘢痕狭窄的发生。我们在临床工作中注意到,尿道下裂术后尿流改道患者,其尿道瘢痕狭窄的发生率较未改道患者降低,其机制不十分清楚。研究证实 TGF-β1 在尿道瘢痕的纤维化病变发生、发展过程中起关键性作用[1]。Smad3 作为 TGF-β 下游转导信号因子也同样起着重要作用。本研究用尿液和尿酸溶液刺激体外培养的人尿道成纤维细胞,观察成纤维细胞 TGF-β1、Smad3 的表达变化,探讨尿液在尿道瘢痕形成中的作用机制,为临床预防和治疗尿道下裂术后尿道瘢痕狭窄提供理论依据。

作者简介:郭 旭,男,河北省黄骅市人,硕士研究生,医师,主要从事尿道瘢痕方面的研究。电话:(023)68752948, E-mail: guoxu197654@yahoo.com.cn
通信作者:卢根生,电话:(023)68765841
收稿日期:2009-01-19;修回日期:2009-03-10

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗人多克隆抗体 TGF-β1、Smad3 购自武汉博士德生物工程有限公司,羊抗兔荧光二抗(TRITC)购自北京中杉金桥公司,总 RNA 提取试剂(RNAiso PLUS)、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 购自 TaKaRa 公司,人Ⅰ型胶原 ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司),DMEM 细胞培养基、胎牛血清(Gibco 公司,美国)。

尿液刺激溶液:健康体检者(近期未服用任何药物,且尿常规检查未见异常)尿液。收集 24 h 尿混匀,滤菌器过滤除菌,按适当比例配制成 DMEM 溶液,碳酸氢钠调 pH 值到 7.2,配制成 10% 胎牛血清的尿液刺激溶液,测得尿酸浓度 350 μmol/L。

尿酸刺激溶液:尿酸在体液中的溶解度较低,pH 7.4 时尿酸的最高溶解度为 380 μmol/L,高浓度会形成过饱和状态。因此,我们选取 350 μmol/L(正常尿液的尿酸浓度范围内)的尿酸溶液浓度配制尿酸刺激溶液。10% 胎牛血清的 DMEM 培养液加入适量尿酸(分析纯,美国),使尿酸终浓度 350 μmol/L。

1.2 标本来源

标本均取自我科,从 2008 年 3 -9 月尿道下裂术后狭窄再次手术患者共计 10 例,均为男性,年龄 5 ~20 岁,病程 6 个月 ~2 年。手术切除尿道瘢痕及少量阴茎正常皮肤组织,取材局部无感染和溃疡,手术切除前未经药物及放射治疗。所取标本术前均征得患者及家属同意,并经病理学检查证实。

1.3 人尿道成纤维细胞体外培养

采用组织块法培养原代人尿道成纤维细胞。将正常尿道组织、尿道瘢痕分别去除表皮后,切成 1 mm × 1 mm 左右的组织块置于培养瓶,在 5% CO_2、37 ℃饱和湿度条件下培养 4 h,使组织块贴壁,加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养,3 ~4 d 换液 1 次,当细胞达到 80% 融合时行传代培养,每 6 ~7 天传代 1 次,实验用第 4 ~6 代细胞。

1.4 免疫荧光染色检测各组细胞爬片 TGF-β1、Smad3 表达情况

每组取生长良好的第 4 代成纤维细胞,在 24 孔板内做细胞爬片,成纤维继续培养至细胞密度适合时。细胞分为 4 组:尿道瘢痕组、正常尿道组、尿液刺激组、尿酸刺激组(后 3 组均为正常尿道成纤维细胞)。其中尿液刺激组用尿液刺激液培养;尿酸刺激组用尿酸刺激溶液。刺激 2 h 后 PBS 冲洗,4% 多聚甲醛固定;PBS 洗 3 次(5 min/次);滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min;分别滴加兔抗人 TGF-β1、Smad3 一抗;4 ℃过夜后,PBS 洗 3 次;滴加羊抗兔荧光二抗 50 μl,37 ℃ 1 h;PBS 洗 3 次;DAPI 染核 5 min,甘油封片后,激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 各组细胞 TGF-β1、Smad3 mRNA 基因表达情况

1.5.1 细胞总 RNA 提取和检测 取生长良好的第 4 代人尿道正常成纤维细胞,分 3 组,依次为正常尿道组、尿液刺激组、尿酸刺激组。尿液刺激组给予尿液刺激溶液培养;尿酸刺激组用尿酸刺激溶液(尿酸含量 350 μmol/L,分析纯试剂配制)刺激。2 h 后,按 TaKaRa RNAiso PLUS 试剂盒所述方法提取各组细胞的总 RNA。取少许总 RNA 经稀释后在紫外分光光度仪定量,凝胶电泳检测所提 RNA 的纯度。

1.5.2 细胞 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达的变化 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法,根据人 TGF-β1、Smad3 和 GAPDH 基因 cDNA 序列,按照引物设计要求,应用 Designer PCR 软件设计。TGF-β1 上游引物序列为:5′-TGGAAACCCACAACGAAATCTTGA-3′,下游引物:5′-CGCTAAGGCGAAAGCCCTCAAT-3′,产物长度为 325 bp;Smad3 的上游引物:5′-GAGCCTGGTCAAGAAACTCAAG-3′,下游引物:5′-CTCTGGTAGTGGTAGGGATTCAC-3′,产物长度为 279 bp;GAPDH 上游引物:5′-GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3′,下游引物:5′-AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC-3′,产物长度 542 bp。所有样品取等量的模板进行 PCR 扩增,反应条件为:变性 94 ℃ 2 min;扩增 94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;延伸 72 ℃ 10 min。每个基因进行 38 个循环。PCR 扩增后,取 5 μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳观察。Quantity One 图像分析系统测定灰度,计算目的基因与 GAPDH mRNA 的比值。

1.6 ELISA 法检测各组细胞上清液Ⅰ型胶原含量表达情况

取对数生长期人尿道正常成纤维细胞及尿道瘢痕细胞,分为 4 组:尿道瘢痕组、正常尿道组、尿液刺激组、尿酸刺激组,每组设 5 个复孔。以 5 000/孔铺于 96 孔板,细胞贴壁生长后,吸去原有含胎牛血清培养液,改为无血清 DMEM 培养液培养。尿液刺激组、尿酸刺激组用上述相同浓度的尿液、尿酸的无血清 DMEM 培养液培养。24、48 h 后分别收集各组细胞上清液,ELISA 法检测各组上清液Ⅰ型胶原含量。

1.7 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行组间 t 检验。

2 结果

2.1 TGF-β1 在各组成纤维细胞中的表达

免疫荧光结果显示 TGF-β1 在各组成纤维细胞中均有表达,主要定位于成纤维细胞质中,细胞核内表达较少。在正常尿道成纤维细胞中表达较低(241.7 ±42.1),在尿道瘢痕成纤维细胞质中的 TGF-β1 表达(871.7 ±102.4)明显高于正常尿道组($P < 0.05$)。尿液刺激组(654.4 ± 85.3)和尿酸刺激组(576.2 ±78.2)成纤维细胞中 TGF-β1 蛋白表达较正常尿道组细胞明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 Smad3 在各组成纤维细胞中的表达

Smad3 在各组成纤维细胞中也均有表达,主要定位于成纤维细胞质中。在正常尿道成纤维细胞中表达较低(307.8 ± 41.8),尿道瘢痕成纤维细胞中表达(833.4 ± 131.8)明显高于正常尿道组($P < 0.05$)。尿液刺激组(741.1 ± 75.4)和尿酸刺激组(750.2 ± 101.9)Smad3 蛋白表达较正常尿道组细胞明显升高($P < 0.05$)。部分成纤维细胞发生 Smad3 蛋白核转位现象,见图 2。

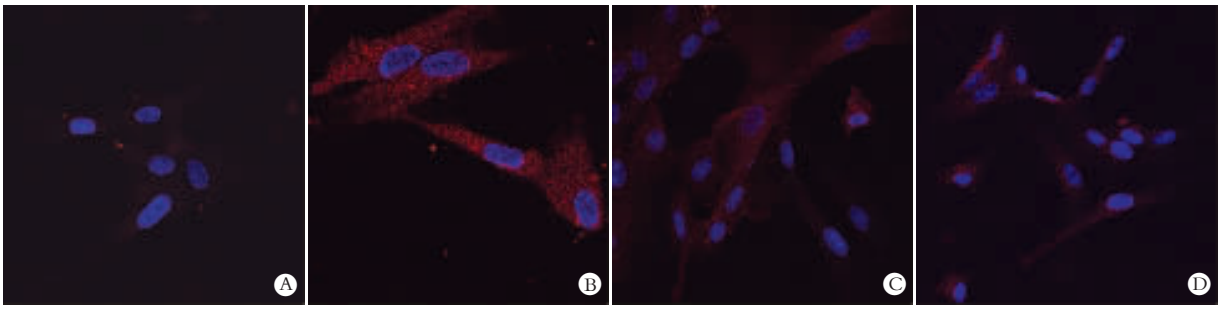
2.3 各组细胞 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达

RT-PCR 显示各组成纤维细胞均有 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达,正常尿道组相对表达较低。尿道瘢痕组、尿液刺激组和尿酸刺激组 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达均较正常尿道组明显升高($P < 0.05$,图 3,表 1)。

表 1 各组 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达差异的比较($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

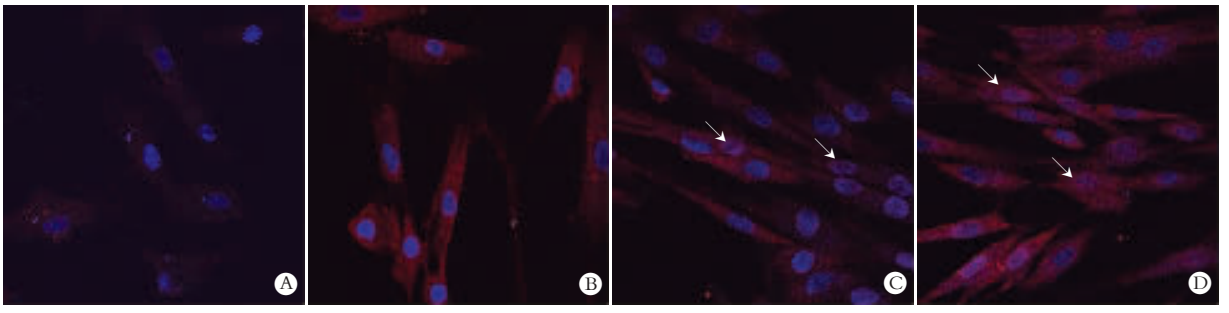
组别	TGF-β1	Smad3
正常尿道组	1.41 ±0.18	1.15 ±0.17
尿道瘢痕组	2.51 ±0.32[a]	1.81 ±0.24[a]
尿液刺激组	2.44 ±0.30[a]	1.68 ±0.19[a]
尿酸刺激组	2.36 ±0.38[a]	1.63 ±0.21[a]

a:$P < 0.05$,与正常尿道组比较



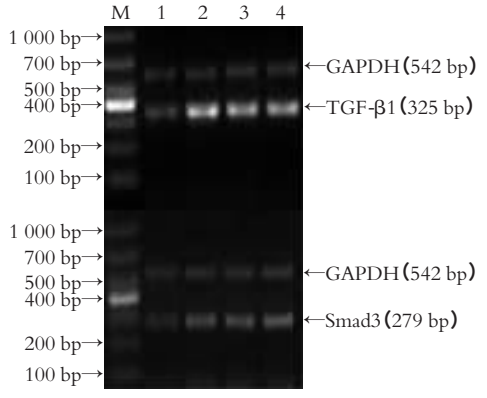
A：正常尿道组；B：尿道瘢痕组；C：尿液刺激组；D：尿酸刺激组

图 1　免疫荧光染色检测 TGF-β1 在各组成纤维细胞中的表达　（激光共聚焦显微镜 ×400）



A：正常尿道组；B：尿道瘢痕组；C：尿液刺激组；D：尿酸刺激组　　↑：细胞核中出现的橙红色颗粒，表明发生了 Smad3 蛋白由细胞质到细胞核发生核转位

图 2　免疫荧光染色检测 Smad3 在各组成纤维细胞中的表达　（激光共聚焦显微镜 ×400）



M：DNA 标准（DL 1000）；1：正常尿道组；2：尿道瘢痕组；3：尿液刺激组；4：尿酸刺激组

图 3　RT-PCR 检测各组成纤维细胞 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达变化

2.4　各组细胞上清液Ⅰ型胶原含量

如表 2 所示，尿道瘢痕组与正常尿道组比较，在 24、48 h 尿道瘢痕组细胞上清液Ⅰ型胶原蛋白含量较正常尿道组明显增多（$P<0.05$）。尿液刺激组、尿酸刺激组与正常尿道组比较，Ⅰ型胶原蛋白含量明显升高（$P<0.05$），提示尿液、尿酸促进了尿道成纤维细胞对细胞基质Ⅰ型胶原蛋白的表达。

表 2　刺激 24、48 h 各组细胞上清液Ⅰ型胶原蛋白含量的比较
（ng/ml，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h	48 h
正常尿道组	45.03 ± 4.76	80.51 ± 6.12
尿道瘢痕组	67.81 ± 8.22[a]	123.74 ± 19.33[a]
尿液刺激组	60.21 ± 6.06[a]	106.46 ± 11.08[a]
尿酸刺激组	57.42 ± 6.37[a]	98.48 ± 10.24[a]

a：$P<0.05$，与正常尿道组比较

3　讨论

尿道下裂是小儿泌尿生殖畸形中常见病，目前尿道下裂修复的术式虽然很多，但尿道下裂术后尿道瘢痕狭窄，尚无有效的措施和方法阻止其发生，始终不能摆脱狭窄-扩张/手术-再狭窄的怪圈，这主要是人们对尿道瘢痕狭窄的发生机制认识有限。尿道瘢痕组织是尿道创伤修复过程中产物，没有瘢痕组织就不会有创面的愈合。但是瘢痕组织一旦生长过度，就会产生尿道狭窄。在对皮肤创面瘢痕形成原因实验研究发现：创面愈合过程中成纤维细胞表现出强烈的增殖能力以及胶原大量分泌、沉积，其中以Ⅰ型胶原纤维为主，认为成纤维细胞过度表达及胶原的异常分泌是瘢痕产生的根本原因。尿道狭窄的病理学改变是创面过度修复，产生增生性瘢痕，进而破坏尿道完整性，造成功能障碍[2]。我们临床发现尿道下裂患者中，术后尿流改道的尿道瘢痕狭窄发生率明显低于未行尿道改道患者。其机制可能为：①尿道在排尿或勃起时的伸缩活动性，可在局部产生一定的张力。研究表明尿道成纤维细胞在一定张力作用下可产生大量的胶原纤维及纤维连接蛋白，增加创面组织的收缩能力，易形成增生性瘢痕[3]。②受尿液的影响。尿道作为尿液的输出道，在尿道受到各种损伤刺激后，尿液必然会到达损伤部位。关于尿液在瘢痕形成中的作用报道不多，但

对尿外渗导致腹膜后纤维化病变众多学者较为认可。本研究用尿液及尿酸刺激人尿道成纤维细胞,测得细胞上清液Ⅰ型胶原蛋白含量较未刺激组明显升高。提示尿道瘢痕的过度增生可能与尿液有关。

TGF-β 被公认为是最重要的致纤维化细胞因子,瘢痕的形成与成纤维细胞对 TGF-β1 的敏感性增加密切相关[4]。TGF-β1 作为成纤维细胞的强效趋化因子,通过旁分泌和自分泌直接或间接、单独或协同、同时或不同时相作用于炎症及修复细胞,能抑制大多数类型细胞增殖,诱导上皮细胞凋亡。但刺激间质细胞增殖,产生细胞的趋化性迁移、增生分化,细胞外基质合成及分泌 3 类重要的生物学效应,诱导体内各种组织纤维化[5-7]。而 Smad3 作为 TGF-β1 重要的信号因子,参与了胶原的合成和收缩,并在瘢痕中有高表达[8]。体外实验表明过表达 Smad3 的皮肤成纤维细胞合成Ⅰ型胶原明显增加,阻断成纤维细胞中 Smad3 表达后,TGF-β 不能诱导Ⅰ型胶原的合成[9,10],说明 Smad3 是伤口愈合中瘢痕形成的重要介导分子。TGF-β1 在细胞内合成之初是无生物活性的前体蛋白,TGF-β1 分泌后必须经过激活才能发挥效应[11]。当 TGF-β1 活化后,通过与 2 种类型的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体(TGF-β1 受体)结合形成多聚体,TGF-β1 受体磷酸化从而活化受体调节型 Smad(Smad2、Smad3),活化后的 Smad2 和 Smad3 与共同中介型 Smad4 结合并转位于细胞核,在细胞核里它们通过直接活化转录启动子或直接与某一基因结合而行使调节转录功能。本研究中免疫荧光实验表明 TGF-β1、Smad3 在尿道瘢痕成纤维细胞的表达明显高于正常尿道成纤维细胞,并且观察到了 Smad3 蛋白核转位现象,与文献[12]报道相一致。

那么尿液是否参与了 TGF-β1、Smad3 在尿道成纤维细胞的高表达呢? 本实验通过用尿液、尿酸对人尿道成纤维细胞的刺激表明:适当浓度的尿液、尿酸能引起人尿道成纤维细胞 TGF-β1、Smad3 基因及蛋白表达升高。尿液对尿道创面的持续刺激,导致尿道成纤维细胞 TGF-β1、Smad3 mRNA 持续高表达,TGF-β1 的过量表达和持续的高浓度,激活 Smad3 或 Smad2 基因表达,促进成纤维细胞增殖,调节细胞外基质合成,促进前胶原蛋白Ⅰ和纤维连接蛋白合成,并可通过降低基质金属蛋白酶的合成和增加基质金属蛋白酶抑制物的表达而抑制细胞外基质降解[13,14],继而大量分泌细胞外基质,诱导肉芽组织的形成,引起瘢痕增生[15]。提示尿液刺激可能促进了尿道瘢痕的增生。实验中发现尿酸作为尿液成分之一,刺激尿道成纤维细胞引起 TGF-β1、Smad3 蛋白表达升高,提示尿酸是尿液促进尿道瘢痕增生的重要因素。尿液中的尿酸和尿液的其他有机成分可能与尿液的高渗、pH 值、感染等有关因素一起参与了尿道瘢痕形成的过程[16]。本研究结果提示:为减轻尿道瘢痕,避免加重尿道瘢痕狭窄,尿道下裂修复术后应尽量避免尿液刺激,力求理想的创伤愈合结果。

参考文献:

[1] 张庆华,卢根生. TGF-β1 在复发性尿道狭窄发生中的作用[J]. 第三军医大学学报,2007, 29(9): 837-839.

[2] 章咏裳. 应用腔内泌尿外科技术治疗尿道狭窄[J]. 中华泌尿外科杂志,1999,20(1):58-59.

[3] Montandon D, D'andiran G, Gabbiani G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies[J]. Clin Plast Surg, 1977,4(3):325-346.

[4] Faler B J, Macsata R A, Plummer D, *et al*. Transforming Growth factor-beta and wound healing[J]. Perspect Vasc Surg Endovasc Ther, 2006,18(1): 55-62.

[5] Moustakas A, Stournaras C. Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts[J]. J Cell Sci,1999,112(Pt 8): 1169-1179.

[6] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation[J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(2): 211-215.

[7] Gordon K J, Blobe G C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2008,1782(4):197-228.

[8] Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, *et al*. Smads regulate collagen gel contraction by human dermal fibroblasts[J]. Br J Dermatol,2003, 149(3): 464-470.

[9] Stramer B M, Austin J S, Roberts A B, *et al*. Selective reduction of fibrotic markers in repairing corneas of mice deficient in Smad3[J]. J Cell Physiol, 2005, 203(1): 226-232.

[10] Wang Y, Moges H, Bharucha Y, *et al*. Smad3 null mice display more rapid wound closure and reduced scar formation after a stab wound to the cerebral cortex[J]. Exp Neurol,2007, 203(1):168-184.

[11] Moran S L, Taguchi M, Amadio P C, *et al*. Wound healing and TGF-beta expression in TIEG knockout mice[J]. Matrix Biol, 2006, 25 (Suppl 1): S35-S36.

[12] 程 伟,孙润芹,赵世平,等. 人尿道狭窄瘢痕组织中胶原蛋白含量和转化生长因子 β_1 的表达及意义[J]. 西安交通大学学报:医学版,2006,27(2):207-208.

[13] Ten-Dijke P, Goumans M J, Itoh F, *et al*. Regulation of cell proliferation by Smad proteins[J]. J Cell Physiol,2002,191(1):1-16.

[14] Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing[J]. J Dermatol Sci,2004,35(2):83-92.

[15] 陈 伟,付小兵,孙同柱,等. 增生瘢痕中转化生长因子基因的表达[J]. 中华外科杂志,2002,40(1):17-19.

[16] Hunt T K. Basic principles of wound healing[J]. J Trauma,1990, 30(12 Suppl):S122-S128.

(编辑 吴培红)