文章编号:1000-5404(2010)13-1413-04

论著

霉酚酸酯抑制转化生长因子-β在肺成纤维细胞中的表达及应用价值

王 颖,万 跃,谭 兵,蒋 勇,白 玉,吴永忠 (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所放疗科)

[摘要] **目的** 探讨霉酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF)抑制转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)在肺成纤维细胞 WI26 中的表达和应用价值。**方法** 肺成纤维细胞 WI26 常规细胞培养后分 4 组:对照组、MMF 组、TGF-β 组、MMF + TGF-β 组。采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TGF-β 介导相关基因 COL1A1 的表达,Western blot 和氯霉素乙酰基转移酶实验(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)方法检测 COL1 蛋白的表达;胶原基质收缩实验和细胞伤痕实验观察胶原纤维的收缩和细胞移行能力的差异。**结果** MMF 作用细胞 24、48 h 后,COL1A1 mRNA 表达分别为对照组的(77.0 ± 2.9)% 和(38.0 ± 3.7)%,MMF 降低了 COL1A1 mRNA 水平($P < 0.05$);TGF-β 作用细胞 24、48 h 后,COL1A1 mRNA 表达分别为对照组的(134.0 ± 3.1)% 和(189.0 ± 2.4)%,TGF-β 提高了 COL1A1 mRNA 水平($P < 0.05$);MMF + TGF-β 作用细胞 24,48 h 后,COL1A1 mRNA 表达分别为对照组的(95.0 ± 2.7)% 和(71.0 ± 3.3)%($P < 0.05$),48 h 后 MMF 阻止了 TGF-β 诱导的 COL1A1 mRNA 表达。48 h 后 MMF 组 COL1 蛋白表达为对照组的(44.0 ± 1.9)%($P < 0.05$);TGF-β 组 COL1 蛋白表达为对照组的(145.0 ± 1.5)%($P < 0.05$);MMF + TGF-β 组 COL1 蛋白表达为对照组的(79.0 ± 2.5)%,MMF 阻止 TGF-β 诱导的 COL1 蛋白表达。胶原基质收缩实验(第 0、1、5 天观察)和细胞伤痕实验(第 0、8、24 小时观察)结果显示:MMF 重建成纤维细胞的接触抑制生长。**结论** MMF 能阻止 TGF-β 介导的细胞纤维化。

[关键词] MMF;转化生长因子-β;肺成纤维细胞 WI26
[中图法分类号] R322.35; R394.2; R979.5 **[文献标志码]** A

Inhibitory effect of mycophenolate mofetil on expression of TGF-β in pulmonary fibroblasts and its application value

Wang Ying, Wan Yue, Tan Bing, Jiang Yong, Bai Yu, Wu Yongzhong (Department of Radiology, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

[Abstract] **Objective** To study the inhibitory effect of mycophenolate mofetil (MMF) on expression of TGF-β in pulmonary fibroblasts (WI26 cells) and its application value. **Methods** Pulmonary fibroblasts were divided into control group, MMF group, TGF-β group, and MMF + TGF-β group, after routine culture. Expression of TGF-β-induced COL1A1 was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Expression of COL1 proteins was detected by Western blot analysis and chloramphenicol acetyl transferase assay, respectively. Difference in contractility of collagen fibers and migration of cells was observed in collagen matrix contraction test and cell scratch test. **Results** The expression level of COL1A1 mRNA was higher in MMF group than in control group 24 and 48 h after treatment with MMF (77.0% ±2.9% *vs* 38.0% ±3.7%), and was lower in MMF group than in control group 24 and 48 h after treatment with TGF-β and MMF + TGF-β (134.0% ±3.1% *vs* 189.0% ±2.4%, and 95.0% ±2.7% *vs* 71.0% ±3.3%, $P < 0.05$), indicating that MMF can inhibit the expression of COL1A1 mRNA 48 h after treatment with TGF-β. The expression level of COL1A1 protein was 44.0% ±1.9%, 145.0% ±1.5%, and 79.0% ±2.5% lower in MMF, TGF-β, and MMF + TGF-β groups, respectively, than in control group, 48 h after treatment with TGF-β, indicating that MMF can suppress the expression of COL1A1 protein. Collagen matrix contraction test and cell scratch test showed that MMF can inhibit the growth of fibroblasts. **Conclusion** MMF can protect cells against TGF-β-induced fibrosis.

[Key words] mycophenolate mofetil; TGF-β; WI26 cell

Supported by the Program of Chongqing Science & Technology Committee (CSTC2009BB5059). Corresponding auther: Wu Yongzhong, Tel: 86-23-65350288, E-mail: cqmdwyz@yahoo.com.cn

[基金项目] 重庆市科委资助项目(CSTC2009BB5059)
[通信作者] 吴永忠,电话:(023)65350288, E-mail: cqmdwyz@yahoo.com.cn

肺纤维化可由多种病因引起,其病理演变常伴有成纤维细胞和Ⅱ型肺泡上皮细胞的增殖和细胞因子的释放,转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)与细胞纤维化密切相关已得到共识。TGF-β由两个结构相同或相近、相对分子质量为12.5×10^3的亚单位借二硫键连接的双体[1],能使正常的成纤维细胞的表型发生转化,在表皮生长因子同时存在的条件下,改变成纤维细胞壁生长特性而获得在琼脂中生长的能力,并失去生长中的接触抑制作用,同时TGF-β刺激成纤维细胞合成胶原,诱导Ⅰ型胶原基因(Ⅰ型胶原α1链COL1A1及α2链COL1A2基因型)的表达。霉酚酸酯(mycophenolate mofetil,MMF)是通过转变为霉酚酸起作用的。MMF选择性作用于真核细胞的单磷酸次黄苷脱氢酶IMPDH,它是嘌呤合成经典途径的关键酶之一,存在两种同功异构体(Ⅰ型和Ⅱ型)。MMF对Ⅱ型同工酶的抑制作用较Ⅰ型敏感4~5倍。由于淋巴细胞活化时Ⅱ型同工酶上调,且淋巴细胞只能利用经典途径合成嘌呤,而其他细胞还可通过挽救途径合成,因此MMF对成纤维细胞有强的抗增殖效应[2-4]。本研究从分子水平上探讨MMF抑制TGF-β在肺成纤维细胞中的表达,以及MMF抗细胞纤维化治疗的应用价值,有助于防治细胞纤维化引起的一系列疾病,包括肿瘤放射治疗引起的放射性肺炎。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol试剂(Sigma公司),逆转录试剂盒(Promega公司),蛋白裂解液(美国CST公司),TGF-β、霉酚酸酯粉末(上海罗氏公司)。人肺成纤维细胞(WI26)来源于法国卫生和健康研究所(INSERM697)。

1.2 细胞培养及分组

细胞用含10%新生牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的DMEM培养基培养,37 ℃、体积分数为0.05的CO_2饱和湿度培养,常规消化传代。取对数生长期细胞,消化后制成细胞悬液,按5×10^3/ml的密度接种于培养皿,培养24 h细胞完全贴壁后,细胞分4组,每组加入2 ml DMEM培养基:①对照组:常规培养细胞;②MMF组:加入MMF(2.5 μg/ml);③TGF-β组:加入TGF-β(10 μg/ml);④MMF+TGF-β组:加入MMF(2.5 μg/ml)和TGF-β(10 μg/ml)。分别于干预后24、48 h中止培养。重复实验3次。

1.3 RT-PCR检测TGF-β介导相关基因COL1A1的表达

按试剂盒说明抽提RNA。引物设计及合成:COL1A1引物上游5′-GGGCAAGACAGTGATTGAATA,下游5′-ACGTCGAAGCCGAATTCCT,产物大小249 bp;GAPDH为内参,引物序列上游为5′-GCTCCTCCTGTTCGACAGTCA,下游5′-ACCTTCCCCATGGTGTCTGA,产物大小500 bp。COL1A1引物设计参照文献[5]。RT-PCR按试剂盒使用说明书进行。反应条件为:48 ℃逆转录45 min;94 ℃灭活及预变性2 min;再经95 ℃ 30 s,60 ℃ 60 s,68 ℃ 120 s,反应40个循环;68 ℃延伸7 min。

1.4 Western blot检测COL1蛋白的表达

实验组分别加入MMF(2.5 μg/ml)、TGF(10 μg/ml)或MMF+TGF。对照组常规培养细胞,加入2 ml DMEM培养基。作用细胞24、48 h后收集细胞,冷磷酸盐缓冲液洗涤后,加入2倍体积细胞裂解液,冰上裂解30~60 min,4 ℃下12 000 r/min离心15 min,取上清行Bradford法蛋白质定量。蛋白质样品与等量2×SDS凝胶加样缓冲液混合均匀,煮沸变性5 min,10% SDS-PAGE 80 V电泳分离,250 mA恒流3 h湿转至硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉TBST缓冲液室温封闭1 h,加入抗COL1单抗(1∶500),室温孵育1 h。TBST洗膜3次,10 min/次,然后与结合有辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠及兔抗山羊IgG(1∶5 000)室温孵育1 h,TBS洗膜3次,10 min/次,与化学发光剂ECL反应,曝光显影。Bandleader软件分析计算COL1蛋白的相对表达率。蛋白质内参用细胞骨架蛋白β-actin。

1.5 CAT(chloramphenical acetylerase)检测COL1蛋白含量

细菌的CAT将乙酰基从乙酰辅酶A转移到氯霉素(Chloramphenicol)上。通过测量放射性标记的底物而量化COL1蛋白含量。

1.6 胶原基质收缩实验

将对数生长期细胞用胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为5×10^7个细胞/L,各组按细胞悬液∶1% DMEM∶Ⅰ型胶原纤维溶液=1∶4∶2(体积分数)的比例,将上述3种成分快速混匀,置于60 mm培养皿,每皿7 ml,置入37 ℃孵箱内2 h,混悬液即呈凝胶状。敲打培养皿使凝胶成游离状。观察第0、1、5天凝胶的收缩情况。

1.7 细胞伤痕实验观察细胞的移行能力

取对数生长期细胞,消化后制成细胞悬液,按5×10^3/L接种于培养皿,直到玻片上几乎爬满单层细胞。用微量吸液管头在培养皿表面正中划一条直线痕迹,用PBS冲洗掉脱落细胞,倒置显微镜下照相(Olympus公司,IX-40型)观察和计算细胞在药物干预下移动距离,期间每隔6 h观察同一视野一次并拍照,每隔12 h换培养基或含药物的培养基1次。以上步骤重复3次。

1.8 统计学方法

数据用$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 13.0进行t检验。

2 结果

2.1 各组细胞COL1A1 mRNA表达水平比较

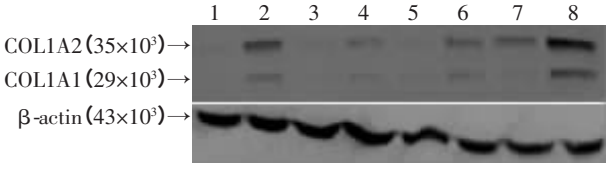
24 h后MMF组COL1A1 mRNA表达下降为对照组的(77.0±2.9)%($P<0.05$);TGF-β组COL1A1 mRNA表达增高为对照组的(134.0±3.1)%($P<0.05$);MMF+TGF-β组

COL1A1mRNA 表达下降为对照组的(95.0 ± 2.7)%。

48 h 后 MMF 组 COL1A1 mRNA 表达下降为对照组的(38.0 ± 3.7)%(P < 0.05);TGF-β 组 COL1A1 mRNA 表达增高为对照组的(189.0 ± 2.4)%(P < 0.05);MMF + TGF-β 组 COL1A1mRNA 表达下降为对照组的(71.0 ± 3.3)%(P < 0.05)。

2.2 MMF 抑制 TGF-β 诱导 COL1 蛋白质的表达

COL1 蛋白质的表达 Western blot 检测发现:TGF-β 诱导 COL1 蛋白质的表达;MMF 抑制 COL1 蛋白质的表达(图 1)。Bandleader 软件分析凋亡相关蛋白的相对表达率:MMF 组 24、48 h 后 COL1 蛋白质的表达分别为对照组的(86.0 ± 2.3)%及(44.0 ± 1.9)%(P < 0.05);TGF 组 24、48 h 后 COL1 蛋白质的表达分别为对照组的(116.0 ± 2.7)%及(145.0 ± 1.5)%(P < 0.05);MMF + TGF-β 组 24、48 h 后 COL1 蛋白质的表达分别为对照组的(102.0 ± 2.0)%及(79.0 ± 2.5)%。

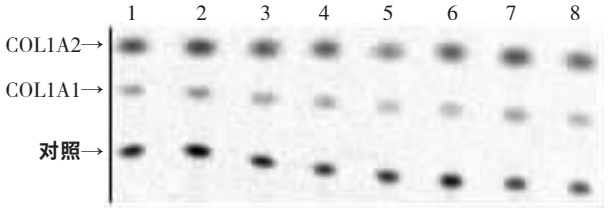


1、2:对照组 24、48 h;3、4:MMF 组 24、48 h;5、6:TGF-β 组 24、48 h;7、8:MMF + TGF-β 组 24、48 h

图 1　Western blot 检测 MMF 和 TGF 作用后不同时间 COL1 蛋白

2.3 氯霉素乙酰转移酶实验检测 COL1 蛋白含量

TGF-β 增加 COL1 起动子含量,MMF 对抗 TGF-β 的作用(图 2)。COL1 蛋白含量:TGF-β 组为对照组的(119.0 ± 1.5)%(P < 0.05);MMF 组为对照组的(81.0 ± 2.9)%(P < 0.05);MMF + TGF-β 组为对照组的(92.0 ± 1.1)%。



1、2:对照组 24、48 h;3、4:MMF 组 24、48 h;5、6:TGF-β 组 24、48 h;7、8:MMF + TGF-β 组 24、48 h

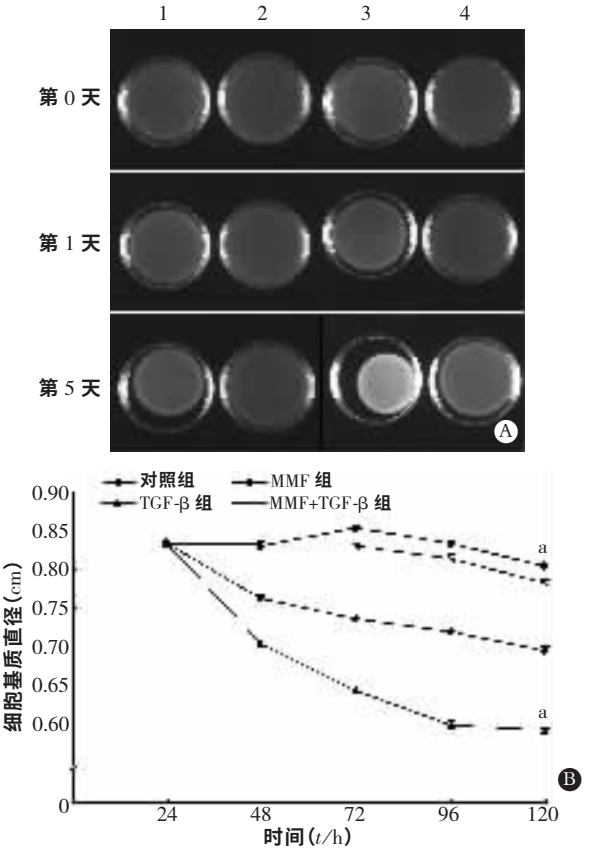
图 2　氯霉素乙酰转移酶检测 MMF 和 TGF 作用后不同时间 COL1 蛋白含量

2.4 胶原基质收缩实验

与对照组比较:MMF 干预后抑制胶原基质收缩(P < 0.05);TGF-β 干预后胶原基质明显收缩(P < 0.05),见图 3。

2.5 各组细胞不同时间细胞间迁移距离比较

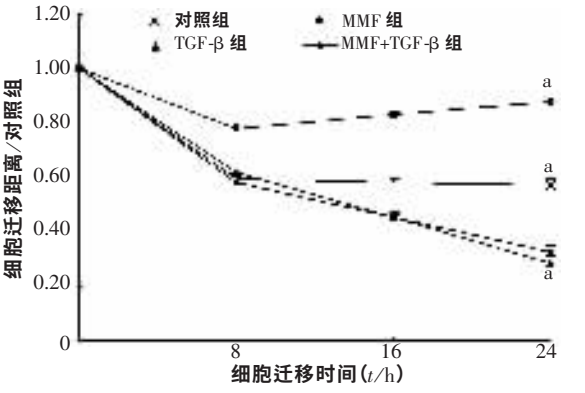
TGF 组细胞迁移速度增快,迁移距离缩短(P < 0.05);MMF 组细胞迁移速度减慢,迁移距离较对照组增大(P < 0.05),见图 4。



a:P < 0.05,与对照组比较

A:培养皿中胶原基质收缩变化观察　1:对照组;2:MMF 组;3:TGF-β 组;4:MMF + TGF-β 组;B:培养皿中胶原基质直径测量对比

图 3　MMF 和 TGF 作用后不同时间胶原基质收缩情况



a:P < 0.05,与对照组比较

图 4　各组不同时间细胞间迁移距离比较

3　讨论

新型免疫抑制剂霉酚酸酯对淋巴细胞、白细胞、成纤维细胞等有较强的抗增殖效应;并且治疗浓度的霉酚酸酯能有力地抑制单核细胞增殖,诱导分化,减轻炎症反应。在体内,霉酚酸酯显示出特有的抑制血管平

滑肌细胞增殖的效应。转化生长因子-β 分 3 型。人 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3 的基因分别定位于染色体 19q3、1q41 和 14q24，均含有 7 个外显子，核苷酸序列有高度同源性，所编码的前体分子 C 端者有 9 个保守的 Cys，提示 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3 基因可能来自一个共同的基因。TGF-β 生物学作用广泛：包括抑制免疫活性细胞的增殖；对细胞表型的调节；抑制淋巴细胞的分化；抑制细胞因子产生等[6-8]。

目前对胶原基因表达调控及信号传导的知识多是基于在体外针对某个环节的实验研究得到的，因而不一定能真实、完整地反映在机体内的实际效应。如 TGF-β 能够促进胶原的表达、并抑制胶原的降解，显然是促进纤维化的重要因子；但同时有很强的抑制免疫应答和炎症反应的功能，因而也可能有抗纤维化作用[9]。研究显示霉酚酸酯对自身免疫性疾病有治疗作用[10]。本实验中，MMF 作用细胞 24、48 h 后，COL1A1 mRNA 表达较对照组显著降低（$P<0.05$）；TGF-β 作用细胞 24、48 h 后，COL1A1 mRNA 表达较对照组显著升高（$P<0.05$）；MMF + TGF-β 作用细胞 24、48 h 后，COL1A1 mRNA 表达分别为对照组的（95.0±2.7）%和（71.0±3.3）%（$P<0.05$），48 h 后 MMF 阻止了 TGF-β 诱导的 COL1A1 mRNA 表达。COL1 蛋白分为 COL1A1 和 COL1A2 两型，MMF 能阻止 TGF-β 诱导的 COL1 蛋白表达。胶原基质收缩实验和细胞伤痕实验提示：MMF 重建成纤维细胞的接触抑制生长。这均提示 TGF-β 加快细胞纤维化的进程，MMF 能阻止 TGF-β 介导的细胞纤维化。

近年来研究显示细胞纤维化的过程是多步骤的，包括多种细胞（巨噬细胞、上皮细胞和纤维母细胞）分泌的促炎症反应细胞因子、促纤维化细胞因子和化学因子过度分泌。目前认为既然细胞纤维化是多因子参与的渐进过程，就有可能被逆转。从分子水平上探讨 MMF 和 TGF-β 相互作用机制，阐明细胞纤维化的形成与 TGF-β 介导的信号传导有关，MMF 对细胞纤维化有抑制作用，有助于预防和治疗细胞纤维化引起的一系列疾病[11-13]。细胞纤维化同时是肿瘤治疗的最严重的并发症之一，防治细胞纤维化的产生，有助于提高放化疗的疗效，改善患者的生存质量[12-16]。这方面的工作值得进一步深入研究。

参考文献：

[1] Verrecchia F, Mauviel A, Farge D. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis[J]. Autoimmun Rev, 2006, 5(8): 563-569.

[2] Abraham D J, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models[J]. Trends Immunol, 2005, 26(11): 587-595.

[3] Ciancio G, Miller J, Gonwa T A. Review of major clinical trials with mycophenolate mofetil in renal transplantation[J]. Transplantation, 2005, 80(2 Suppl): S191-S200.

[4] Distler J H, Jungel A, Huber L C, *et al*. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(1): 311-322.

[5] Roos N, Poulalhon N, Farge D, *et al*. In vitro evidence for a direct antifibrotic role of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321(1): 583-589.

[6] Poulalhon N, Farge D, Roos N, *et al*. Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin. A direct role as an antifibrotic agent? [J]. J Biol Chem, 2006, 281(44): 33045-33052.

[7] Verrecchia F, Wagner E F, Mauviel A. Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF-kappaB pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF-alpha[J]. EMBO Rep, 2002, 3(11): 1069-1074.

[8] 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.

[9] 谭强，刘新民，曾惠惠，等. TGF-β 与肺纤维化[J]. 中华临床医师杂志，2007，1(1)：50-55.

[10] 谭晓姝，王顺和. 霉酚酸酯对实验性自身免疫性脑脊髓炎的治疗作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(24)：2452-2454.

[11] Kobayashi T, Liu X, Wen F Q, *et al*. Smad3 mediates TGF-beta1-induced collagen gel contraction by human lung fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(1): 290-295.

[12] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(22): 3056-3062.

[13] 胡晓，陈明. TGF-β 在放射性肺损伤中的作用及临床应用价值[J]. 中国肿瘤，2008，17(10)：856-860.

[14] 殷蔚伯，余子豪，徐国镇，等. 肿瘤放射治疗学[M]. 第 4 版. 北京：中国协和医科大学出版社，2008：578.

[15] 于世英. 癌症化疗手册[M]. 第7版. 北京：科学出版社，2010：63.

[16] 侯友贤. 肿瘤放疗并发症防治[M]. 北京：人民军医出版社，2008：27-33.

（**收稿**：2010-03-30；**修回**：2010-05-18）

（编辑　汪勤俭）