论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411195

烟草烟雾提取物通过TGF-β1/Smad2通路诱导RLE-6TN细胞凋亡

廖 科[1],陈亚娟[1],赵绿翠[2],巫凤苹[1],陈 虹[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院呼吸与危重症医学科[1],组织学与胚胎学教研室,干细胞与组织工程研究室[2])

[摘要] **目的** 研究烟草烟雾提取物(cigarette smoke extract,CSE)对体外培养的大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞凋亡的影响,探究其潜在机制。**方法** 体外培养大鼠肺泡上皮RLE-6TN细胞株24 h,分别加入0.5%、1.0%、2.0% CSE共培养48 h;转化生长因子-β1(TGF-β1)受体抑制剂(SB431542)500 nmol/L作用RLE-6TN细胞株24 h后,加入2.0% CSE共培养48 h。Hoechst染色后观察细胞核的形态学改变;流式细胞仪检测细胞凋亡率;Western blot检测TGF-β1、p-Smad2和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3裂解片段(Cleaved Caspase-3)的表达。**结果** 经不同浓度(0.5%、1.0%、2.0%)的CSE作用48 h后,Hoechst染色可见部分凋亡细胞,核发白、固缩、染色质边集等现象;细胞早期凋亡率由(5.270±0.526)%增加至(32.580±0.413)% ($P<0.01$);TGF-β1、p-Smad2和Cleaved Caspase-3蛋白表达量增加;TGF-β1受体抑制剂(SB431542)干预后,Smad2和Cleaved Caspase-3表达量明显降低($P<0.05$)。**结论** CSE通过激活TGF-β1/Smad2信号通路,参与调节Cleaved Caspase-3的表达,从而诱导大鼠肺泡上皮细胞的凋亡。

[关键词] 烟草;烟雾提取物;肺泡Ⅱ型上皮细胞;细胞凋亡
[中图法分类号] R122.7;R322.35;R329.25 [文献标志码] A

Cigarette smoke extract induces apoptosis of RLE-6TN cells *via* TGF-β1/Smad2 pathway

Liao Ke[1], Chen Yajuan[1], Zhao Lyucui[2], Wu Fengping[1], Chen Hong[1] ([1]Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of cigarette smoke extract (CSE) on the apoptosis of rat type Ⅱ alveolar epithelial cells (RLE-6TN), and explore the possible mechanism. **Methods** Different concentrations of CSE were used to culture the RLE-6TN cells for 48 h, and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) type Ⅰ receptor inhibitor SB431542 was administered prior to CSE exposure. Morphological changes of apoptotic cells were observed with a fluorescence microscope after Hoechst staining. Cell apoptostic rate was measured by flow cytometry, and the expression levels of TGF-β1, p-Smad2 and apoptosis related protein Cleaved Caspase-3 were examined by Western blotting. **Results** Hoechst staining showed that the cells treated with CSE showed chromatin condensation and typical apoptotic morphological changes, and the cell apoptosis rate was increased from (5.270±0.526)% to (32.580±0.413)% ($P<0.001$). The expression of TGF-β1, p-Smad2 and Cleaved Caspase-3 was obviously increased after exposure to CSE, but the outcome could be abrogated by SB431542. **Conclusion** TGF-β1/Smad2 signal pathway may be involved

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81200009);重庆市卫生局中医药研究课题(ZY20132165);国家临床重点专科专项(卫办医政函[2012]949号)
[通信作者] 陈 虹, E-mail: hopehong2003@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150324.1315.009.html(2015-03-24)

in the CSE-induced apoptosis of the rat alveolar epithelial cells.

[**Key words**] cigarette; smoke extract; type Ⅱ alveolar epithelial cell; apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81200009), the Project for Traditional Medicine Research of Chongqing Municipal Health Bureau (ZY20132165) and National Clinical Kery-discipline Construction Programs (2012-949). Corresponding author: Chen Hong, E-mail: hopehong2003@126.com

烟草烟雾中含大量的自由基,如烷基、烷氧基、Nox自由基等[1]。自由基具有强氧化性,进入人体后会引发氧化应激反应。研究结果表明,氧化应激在诱导细胞凋亡的病理过程中发挥重要作用[2]。Ando等[3]的一项流行病学研究显示,烟草烟雾暴露是急性肺损伤发生和进展的一项危险因素。故烟草烟雾导致的肺损伤性疾病可能与烟草烟雾导致的肺细胞凋亡有关。

肺泡上皮仅有两种类型,即肺泡Ⅰ型上皮细胞(ATⅠ)和肺泡Ⅱ型上皮细胞(ATⅡ)。ATⅡ被认为是肺泡上皮的干细胞,在正常的细胞更新及损伤修复过程中,它既可以分化为ATⅠ,也可以通过产生子代ATⅡ以自我补充。肺损伤时ATⅡ可转化为ATⅠ,修复损伤的肺,当ATⅡ凋亡严重时,修复受阻,可造成肺损伤加剧。故研究肺泡Ⅱ型上皮细胞的凋亡,对阐明肺损伤性疾病的发病机制极为重要。有研究表明,烟草烟雾可抑制肺泡上皮细胞增殖,诱导其损伤和凋亡[4],但其机制并不明确,尚需进一步研究。

转化生长因子-β1(TGF-β1)是肺部炎性损伤的重要调节因子[5],且TGF-β信号通路在急性肺损伤的早期阶段即被激活[6]。大量的研究表明TGF-β1也参与调控细胞的凋亡过程[7-8]。Smad蛋白作为TGF-β超家族的直接底物,能将TGF-β携带的信号由胞浆转入胞核,且Smad2是TGF-β1信号下传的第一个分子,可直接被TGF-β1激活。Yang等[9]发现Smad2在TGF-β1诱导的前列腺上皮细胞凋亡中发挥着重要作用。另有研究发现烟草烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)可刺激肺泡上皮细胞分泌TGF-β1增加[10]。故我们认为烟草烟雾可能通过TGF-β1/Smad2信号通路调节肺泡细胞的凋亡过程,引起肺的损伤性改变,进而逐渐进展为肺气肿、阻塞性肺疾病。因此,本研究观察TGF-β1/Smad2信号通路在CSE诱导肺泡上皮凋亡中的作用,以期为治疗烟草烟雾所致急性肺损伤疾病提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和仪器

高糖DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国GIBICO公司;Hoechst染色试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒、兔抗鼠Cleaved Caspase-3单克隆抗体均购自碧云天生物技术研究所;TGF-β1、GAPDH抗体以及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购于美国Santa Cruz公司;Smad2以及磷酸化的Smad2均购自美国Cell Signaling Technology公司;SB431542购于美国MCE公司;ECL发光液购自美国Millipore公司;其余均为国产试剂。CO_2恒温培养箱(美国Thermo Scientific公司),超低温冰箱(美国Revco公司),高速台式离心机(美国Sigma公司),倒置荧光显微镜(日本Nikon公司),纯水仪(美国Millipore公司),M450酶标仪(美国Bio-Rad公司),FACScan流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司),电泳仪、电转仪(北京六一公司)。

1.2 细胞株来源及培养

大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(RLE-6TN)购自上海必畅生物科技有限公司(细胞来自美国模式培养物集存库,货号:CRL-2300,国内传代)。用含10%胎牛血清的高糖DMEM完全培养基,于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度条件下常规培养,每2~3天传代1次,所有实验均选用对数生长期细胞。

1.3 烟草烟雾提取物的制备

宏升牌香烟,每只烟含焦油11 mg、一氧化碳17 mg、尼古丁1.1 mg。根据Wirtz等[11]的CSE制备方法进行操作:点燃香烟,去滤嘴,并安放于抽吸装置上。使烟雾通过10 mL无血清的DMEM培养基,以DMEM培养基中产生大小均匀的气泡,每支香烟燃烧2 min为度。当10支香烟产生的烟雾通过该培养基后,停止抽吸。调节pH值至7.4,0.22 μm的过滤器除去杂质和细菌,即为CSE。使用Beckman DU 640分光计(美国),于320 nm处测定光密度值,约为(1.36±0.12),CSE浓度为100%。根据实验需要将CSE稀释至所需浓度即可。烟草提取物最好现配现用,尽量在制备好30 min内使用。

1.4 Hoechst染色

取无菌的防脱盖玻片置于6孔板内,按1×10^5/孔接种细胞。设置对照组和实验组,每组3个复孔。培养24 h后实验组加入终浓度为0.5%、1.0%、2.0%的CSE处理48 h。吸尽培养液,加入固定液1 mL/孔,固定30 min。PBS洗2遍,每次3 min。加入1 mL的Hoechst33258染色液,染色5 min。弃去染色液,用PBS洗2遍,每次3 min。滴1~2滴抗荧光淬灭封片

液。使用荧光显微镜观察,激发波长 350 nm,发射波长 460 nm。随机选取 3 个视野,观察细胞核并拍照。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

取对数生长期 RLE-6TN 细胞,以 1×10^5/孔的细胞量接种于 6 孔板,设置对照组和实验组,每组平行 3 个复孔。培养 24 h 后加入浓度为 0.5%、1.0%、2.0% 的烟草烟雾提取物处理 48 h,收集全部细胞(贴壁细胞 + 培养基中漂浮的细胞),按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞检测试剂盒说明书操作:加入 500 μL 的 Binding Buffer 液重悬细胞,加入 5 μL 的 Annexin-V 混匀后,再加入 5 μL 的碘化丙啶(PI)混匀,室温避光反应 10 min,流式细胞仪检测分析。

1.6 Western blot 检测 TGF-β1、Smad2、p-Smad2 和 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达

取 RLE-6TN 细胞接种于 10 cm 的培养皿中,分别设置对照组和实验组,常规培养 24 h 后实验组分别加入终浓度为 0.5%、1.0%、2.0% CSE 处理 48 h,加入细胞裂解液于冰上同时裂解细胞 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,提取细胞总蛋白,BCA 测定蛋白含量。每个点样孔加 40 μg 蛋白样品液,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。凝胶上的蛋白转到 0.45 μm 的 PVDF 膜,5% 的脱脂牛奶或 BSA 封闭 2 h。采用兔抗鼠 TGF-β1(1∶500)、Smad2(1∶1 000)、P-smad2 (1∶1 000)、Cleaved Caspase-3 (1∶1 000),内参 GAPDH 多抗(1∶1 000),4 ℃孵育过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。分别加入辣根过氧化物标记的山羊抗兔 IgG(1∶1 000)常温孵育 1.5 h。TBST 溶液漂洗,ECL 试剂发光,胶片曝光。运用图像分析软件 Quantity One 分析条带的灰度值,目的条带与内参的灰度值之比为蛋白质相对表达水平。

1.7 TGF-β1 受体抑制剂 SB431542 阻滞 TGF-β1/Smad2 信号通路

取对数生长期 RLE-6TN 细胞,以 5×10^5/孔的细胞量接种于 10 cm 的培养皿中,设置对照组和实验组,常规培养 24 h 后,实验组分别加入浓度为 5、50、500 nmol/L 的 SB431542 处理 48 h,提取各组细胞总蛋白,BCA 测定蛋白含量。并用 Western blot 检测 Smad2 和 p-Smad2 的表达量,以筛选最佳实验浓度。再设置空白对照组、CSE 组、SB431542 处理组、CSE + SB431542 处理组,常规培养 48 h,提取各组细胞总蛋白,用 Western blot 检测 Smad2、p-Smad2、Cleaved Caspase-3 的表达。

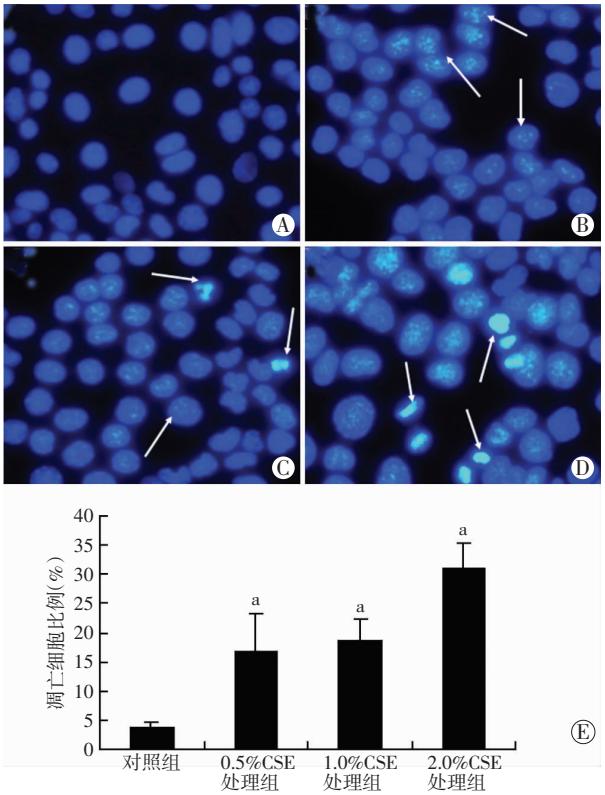
1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,多重比较采用 Tukey 检验。

2 结果

2.1 CSE 对 RLE-6TN 细胞核形态的影响

Hoechst 染色结果显示:对照组(图 1A)发出均匀的淡蓝色荧光;经 0.5%、1.0%、2.0% CSE 作用 48 h 后,随着浓度的增加,细胞核出现程度增强的核染色质浓缩聚集,核碎裂,核边集,发出较强的蓝白色荧光(图 1B ~ D)。CSE 处理组中,凋亡细胞百分数明显多于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$,图 1E)。



A ~ D:荧光显微镜下观察(×400);A:对照组;B ~ D:分别为 0.5%、1.0%、2.0% CSE 处理组 ↑:示凋亡细胞;E:定量分析结果 a:$P<0.01$,与对照组比较

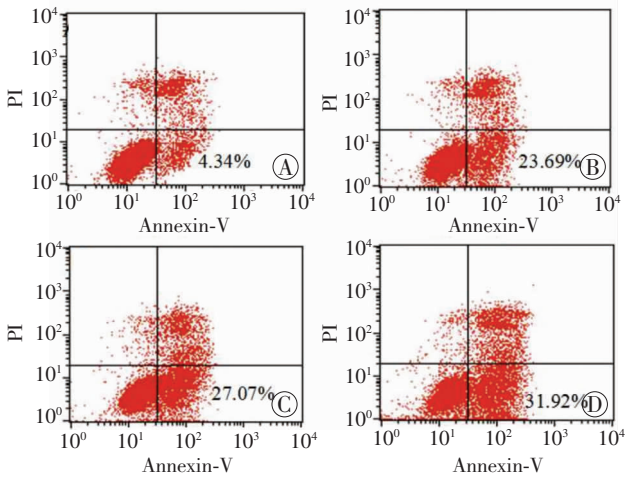
图 1 荧光显微镜下观察 CSE 对 RLE-6TN 细胞核形态变化的影响

2.2 CSE 对可诱导大鼠肺泡Ⅱ型上皮 RLE-6TN 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示:细胞早期凋亡率分别为(22.563 ± 1.048)%、(27.467 ± 0.735)% 和(32.580 ± 0.413)%,与正常对照组[(5.270 ± 0.526)%]比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

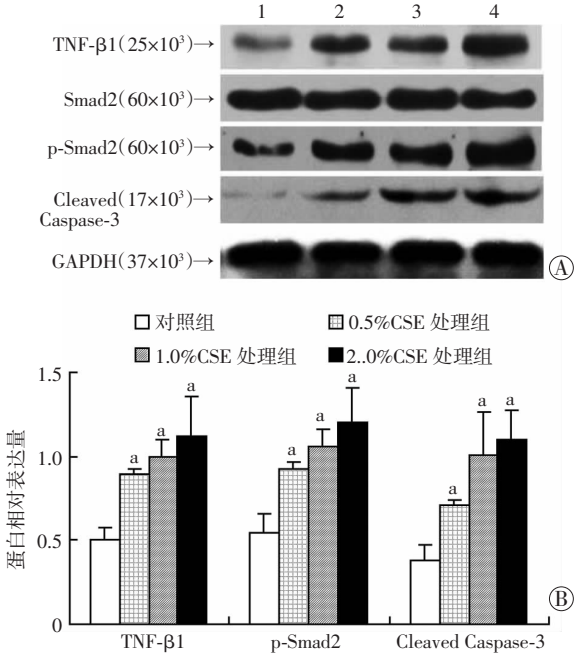
2.3 CSE 对 RLE-6TN 细胞 TGF-β1/Smad2 信号通路及 Cleaved Caspase-3 蛋白的影响

Western blot 检测结果(图 3)显示:随着 CSE 浓度的增加,TGF-β1、磷酸化的 Smad2(p-Smad2)和 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达均上调,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。



A:对照组;B~D:分别为 0.5%、1.0%、2.0% CSE 处理组

图 2 流式细胞仪检测各组 RLE-6TN 细胞凋亡



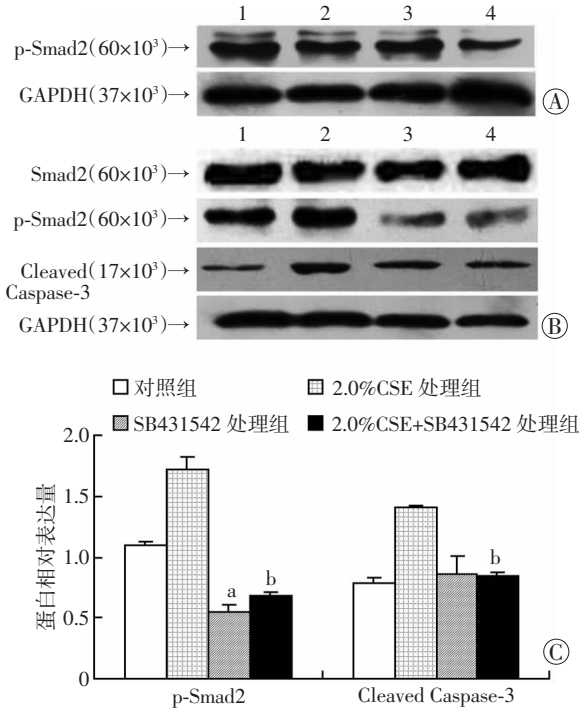
A:Western blot 检测结果 1:对照组,2:0.5% CSE 处理组,3:1.0% CSE 处理组,4:2.0% CSE 处理组;B:定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 Western blot 检测各组 RLE-6TN 细胞 TGF-β1/Smad2 信号通路蛋白及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达

2.4 阻滞 TGF-β1/Smad2 信号通路对 CSE 诱导的 RLE-6TN 细胞 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

SB431542 在 5~500 nmol/L 范围内对 RLE-6TN 细胞株的 TGF-β1/Smad2 通路的阻滞作用逐渐增强,且 500 nmol/L 的 SB431542 能最大限度地抑制 TGF-β1/Smad2 通路的激活(图 4A)。

将 TGF-β1/Smad2 通路阻滞后,观察 CSE 对 Cleaved Caspase-3 的表达的影响。结果表明:500 nmol/L 的 SB431542 能部分逆转 CSE 诱导的 Cleaved Caspase-3 的表达(图 4B、C)。



A:SB431542 干预后 RLE-6TN 细胞中 p-Smad2 的表达 1:对照组,2~4:分别为 5、50、500 nmol/L SB431542 处理组;B:TGF-β1/Samd2 通路阻滞后 RLE-6TN 细胞中 Smad2、p-Smad2和 Cleaved Caspase-3 的表达 1:对照组,2:2.0% CSE 处理组,3:SB431542 处理组,4:2.0% CSE + SB431542 处理组;C:Smad2、p-Smad2 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 2.0% CSE 处理组比较。

图 4 Western blot 检测各组 RLE-6TN 细胞中 Smad2、p-Smad2和 Cleaved Caspase-3 的表达

3 讨论

凋亡是多基因参与调控细胞程序化死亡的过程,是细胞死亡的另一种形式。正常情况下,机体细胞凋亡与增殖保持动态平衡,当理化因素刺激导致细胞过度凋亡,打破细胞增殖、凋亡平衡,最终导致组织、器官受损[12]。烟草烟雾中含有大量自由基(ROS)和有毒物质,可诱导机体细胞发生凋亡。但对于烟草烟雾诱导细胞凋亡的机制,目前仍不明确。

已有研究证明,CSE 可诱导人肺泡上皮细胞发生凋亡[13-14],均是基于细胞株 A549 的研究。A549 是肺泡上皮来源的肿瘤细胞株,其不能代表正常肺泡上皮细胞。本课题组培养正常大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(RLE-6TN),通过 Hoechst 染色法和流式细胞仪检测均发现 CSE 可诱导 RLE-6TN 发生凋亡,且具有浓度依赖性,与 Jiao 等[14]的研究结果相符。目前对 CSE 诱导肺泡上皮细胞凋亡机制的研究均指向氧化应激[15],但

其并不能解释凋亡发生的全貌,故可能还有其他的信号通路参与其中。

TGF-β是一种多功能蛋白,具有影响多种细胞的生长,分化、及免疫调节等功能。新近研究发现,TGF-β1也参与细胞凋亡的过程[7]。Smads家族蛋白是TGF-β信号传递的关键载体。TGF-β与其配体形成的受体复合物,可激活胞浆内的Smads进入核内,共同激活或抑制它们调节的靶基因的转录。Zhang等[16]发现,抑制Smad2/Smad3基因的表达,可部分逆转非甾体类抗炎药活化基因诱导的胶质细胞瘤的凋亡。Yang等[9]发现,Smad2在TGF-β诱导的前列腺上皮细胞凋亡中发挥重要的作用。由此可见,TGF-β1/Smad2参与细胞凋亡的调节过程,但在正常的肺泡上皮细胞的凋亡过程中的作用还不清楚。本研究结果显示CSE可促进TGF-β1、磷酸化的Smad2(p-Smad2)和Cleaved Caspase-3蛋白的表达上调,表明CSE不仅激活肺泡上皮细胞中的TGF-β1/Smad2信号通路,还能激活caspase-3,促进其裂解片段的产生。这与Liu等[17]研究的CSE诱导人肺泡上皮细胞A549中TGF-β1表达增加,促进A549细胞凋亡一致。Caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,在细胞的凋亡中起着不可替代的作用,通过检测Cleaved Caspase-3的表达量,可证实凋亡发生。目前尚无研究表明TGF-β1/Smad2信号通路参与调节Caspase-3的活性。本研究首次发现阻滞TGF-β1/Smad2信号通路后,能逆转CSE对Caspase-3激活。这说明CSE诱导RLE-6TN细胞发生凋亡可能通过激活TGF-β1/Smad2通路来调控Caspase-3的活性而实现的。

综上所述,CSE对肺泡上皮细胞有促凋亡作用,其作用有浓度依赖性。且CSE促进肺泡上皮凋亡可能是通过激活肺泡上皮细胞中的TGF-β1/Smad2信号通路,进一步促进Caspase-3的活化来实现的。本实验首次研究了TGF-β1/Smad2信号通路在CSE诱导的大鼠肺泡上皮细胞凋亡中的作用,为认识和防治因吸烟所导致的肺损伤性疾病提供理论依据。但本研究只在细胞水平研究了TGF-β1/Smad2信号通路在CSE诱导肺泡上皮细胞凋亡中的作用,还需进一步行动物在体实验予以论证。

参考文献:

[1] Perfetti T A, Rodgman A. The complexity of tobacco and tobacco smoke[J]. Beitrage zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research, 2011, 24(5): 215-232.

[2] Bicer M, Senturk T, Yanar M, *et al*. Effects of off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting: apoptosis, inflammation, and oxidative stress[J]. Heart Surg Forum, 2014, 17(5): E271-E276.

[3] Ando K, Doi T, Moody S Y, *et al*. The effect of comorbidity on the prognosis of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. Intern Med, 2012, 51(14): 1835-1840.

[4] Kosmider B, Messier E M, Chu H W, *et al*. Human alveolar epithelial cell injury induced by cigarette smoke[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e26059.

[5] Kan S F, Huang W J, Lin L C, *et al*. Inhibitory effects of evodiamine on the growth of human prostate cancer cell line LNCaP[J]. Int J Cancer, 2004, 110(5): 641-651.

[6] Huang Y C, Guh J H, Teng C M. Induction of mitotic arrest and apoptosis by evodiamine in human leukemic T-lymphocytes[J]. Life Sci, 2004, 75(1): 35-49.

[7] Campion E M, Hakimjavadi R, Loughran S T, *et al*. Repression of the proapoptotic cellular BIK/NBK gene by Epstein-Barr virus antagonizes transforming growth factor β1-induced B-cell apoptosis[J]. J Virol, 2014, 88(9): 5001-5013.

[8] Cencetti F, Bernacchioni C, Tonelli F, *et al*. TGFβ1 evokes myoblast apoptotic response *via* a novel signaling pathway involving S1P4 transactivation upstream of Rho-kinase-2 activation[J]. FASEB J, 2013, 27(11): 4532-4546.

[9] Yang J, Wahdan-Alaswad R, Danielpour D. Critical role of Smad2 in tumor suppression and transforming growth factor-beta-induced apoptosis of prostate epithelial cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2185-2190.

[10] Shen H J, Sun Y H, Zhang S J, *et al*. Cigarette smoke-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition is mediated by Rac1 activation[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(6): 1838-1849.

[11] Wirtz H R, Schmidt M. Acute influence of cigarette smoke on secretion of pulmonary surfactant in rat alveolar type Ⅱ cells in culture[J]. Eur Respir J, 1996, 9(1): 24-32.

[12] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. Science, 2004, 305(5684): 626-629.

[13] He B, Luo B, Chen Q, *et al*. Cigarette smoke extract induces the expression of GRP78 in A549 cells via the p38/MAPK pathway[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(6): 1683-1688.

[14] Jiao Z X, Ao Q L, Xiong M. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis[J]. Sheng Li Xue Bao, 2006, 58(3): 244-254.

[15] Hoshino Y, Mio T, Nagai S, *et al*. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type Ⅱ cell-derived cell line[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(2): L509-516.

[16] Zhang Z, Wu L, Wang J, *et al*. Opposing effects of PI3K/Akt and Smad-dependent signaling pathways in NAG-1-induced glioblastoma cell apoptosis[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e96283.

[17] Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system[J]. Clin Exp Med, 2010, 10(3): 159-167.

(收稿:2014-11-20;修回:2015-01-12)

(编辑 邓强庭)