DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.12.009

文章编号:1000-5404(2003)12-1049-04

论著

Smad7基因转染拮抗TGF-β_1对培养肾小管细胞的影响

黄云剑,梅煜明,王沂芹,杨唐俊 (第三军医大学附属新桥医院肾内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨Smad7基因转染对TGF-β_1诱导的小管细胞生长阻滞,细胞凋亡和FN分泌的影响。方法 采用Tfx-50脂质体将小鼠Smad7转染入原代培养的肾小管细胞,用MTT法观测小管细胞的增殖、流式细胞仪观测其细胞周期的变化;ELISA法测定小管细胞FN的分泌。结果 培养基添加TGF-β_1(10 ng/ml)48 h后,小管细胞增殖能力明显下降,停滞于G_1期的细胞数增多,细胞分泌的FN量也明显增高,相反,Smad7基因转染后可明显拮抗TGF-β_1对小管细胞的上述作用。结论 Smad7基因转染可明显拮抗TGF-β_1对小管细胞的影响,此结果为今后体内Smad7基因治疗研究奠定了基础。

关键词:Smad7;转化生长因子-β_1;基因转染;肾小管细胞;细胞周期
中图法分类号:R322.6+1;R329.2+8;R394.2 文献标识码:A

Transfection and expression of Smad7 inhibits transforming growth factor-β_1 effects on renal tubular cells

HUANG Yun-jian, MEI Yu-ming, WANG Yi-qin, YANG Tang-jun (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effect of Smad7 gene transfer on tubular cell cycle arrest, tubular apoptosis and fibronectin (FN) synthesis by transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) induced. Methods Mouse Smad7 gene was transfected into renal tubular cells in primary cell culture by using Tfx-50 cationic liposome. Tubular cell proliferation was measured by MTT and cell cycle was observed by flow cytometry. The level of FN secretion in the supernatant was determined by ELISA. Results At 48 h after administration of 10 ng/ml TGF-β_1 to renal tubular cells, cell proliferation declined, G_0/G_1 arrested in cell cycle, and cell FN secretion increased significantly. These abnormalities were attenuated by liposome-mediated Smad7 gene transfection. Conclusion Transfection and expression of Smad7 can markedly inhibit TGF-β_1 responses in renal tubular cells, which is helpful for further studies of Smad7 gene therapy *in vivo*.

Key words: Smad7; TGF-β_1; gene transfection; renal cells; cell cycle

近年发现Smad7蛋白是TGF-β细胞内信号转导的负调控蛋白(Anti-Smads)[1],Smad7能与活化TGF-β I型受体牢固结合,阻止R-Smads(Receptor-activited Smads)的磷酸化,未磷酸化的R-Smads不能进入核内,从而阻断了TGF-β对靶基因的转录。我们最近研究证实Smad7基因表达下调是TGF-β致梗阻性肾病小管间质损伤的重要原因之一[2]。我们建立原代小管细胞培养模型,观测Smad7基因转染能否拮抗TGF-β_1对小管细胞生长和FN分泌的影响,旨为今后Smad7基因治疗小管间质疾病奠定实验基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100083);全军"十五"医药卫生青年科研基金资助项目(01Q103)
作者简介:黄云剑(1965-),男,四川省大邑县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肾脏小管间质损伤机制方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68755769
收稿日期:2002-07-10;修回日期:2002-12-26

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

pcDNA3/小鼠Smad7质粒由瑞典Serhiy Souchelnytskyi博士惠赠[1]。昆明小鼠12只(1~2月龄)由第三军医大学实验动物中心提供。Tfx-50试剂盒购于Promega公司。重组人TGF-β_1、转铁蛋白、MTT购于Sigma公司。DMEM/F12培养基购于Hyclone公司。DH5α大肠杆菌由本校分子遗传学教研室惠赠。高效纯化质粒提取试剂盒、G418购于Roche公司。兔抗Flag抗体购于Santa Cruz公司。抗上皮角蛋白抗体购于武汉博士德公司。纤维结合蛋白测定试剂盒购于福建太阳公司。Gene-pluer电穿孔为美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Smad7质粒的转染、筛选、阳性克隆的繁殖、质粒的提取 感受态细菌的制备、电穿孔法质粒导入细菌、阳性菌落的繁殖均参照《精编分子生物学实验指南》中的方法进行。质粒抽提参照Roche公司试剂盒说明书进行。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2 原代小管细胞的培养[3] 将小鼠断颈处死后，无菌取肾，然后转入超净工作台内，去包膜，分离肾皮质，用眼科剪剪碎肾皮质，然后移到100、160目筛网上研磨，并用D-Hanks液冲洗，小心收集160目上的肾小管节段（过筛后相差显微镜检查肾小管纯度可达90%以上），然后分装于预先用胶原处理的6孔培养板中，加入含10%小牛血清的DMEM/F12培养基（含胰岛素1 U/ml，地塞米松5 μg/ml，转铁蛋白5 μg/ml）2~3 ml，置孵育箱中培养。48 h后肾小管贴壁，大约7~8 d细胞铺满孔底，形态呈鹅卵石样。

1.2.3 肾小管上皮细胞的鉴定 上皮角蛋白（Cytokeratin）抗体S-P组化染色，PBS缓冲液替代一抗作阴性对照。

1.2.4 基因转染 接种小管细胞 1×10^5 于24孔板中，37 ℃过夜培养，使细胞达30%~50%的平板密度。添加适量DMEM/F-12培养基在一无菌EP管中，预加温至37 ℃，然后加入2.6 μg Smad7质粒DNA，振荡10 s，再加入7.8 μl的Tfx-50存储液和DME/F-12培养使终体积为700 μl，立即振荡10 s。室温孵育10~15 min后，分装上述混合液于3.5个孔中（200 μl/well），将培养板置入 CO_2 孵育箱中培养1 h，同时预温育含5%小牛血清DME/F-12完全培养基至37 ℃。1 h后，加入上述预温的37 ℃培养基1 ml，不换上述培养液，继续培养48 h。48 h后，胰酶消化，然后接种细胞于含G418（400 μg/ml）的DMEM/F12培养基中，筛选克隆。3~4 d换液一次。第2周后，未转染的细胞逐渐死亡、脱落，可见含Smad7阳性克隆细胞岛出现，见图1。



图1 Flag融合蛋白组化染色
经G418筛选后可见一克隆细胞Flag蛋白组化染色阳性 (S-P×400)

Fig 1 Positive signals of Flag antigens in the cytoplasm of the cultured tubular cells after G418 selection (S-P×400)

1.2.5 含外源Smad7阳性克隆细胞的鉴定 Flag抗体S-P染色，PBS缓冲液替代一抗作阴性对照。

1.2.6 细胞分组 将培养的正常小管细胞和Smad7阳性载体组细胞分别按加和不加TGF-β_1分为4组：① NKC（正常细胞组，未转移Smad7基因）；② NKC+TGF-β_1（培养上清加10 ng/ml TGF-β_1）；③ NKC/Smad7（Smad7载体组未加10 ng/ml TGF-β_1）；④ NKC/Smad7+TGF-β_1（Smad7载体组加10 ng/ml TGF-β_1）

1.2.7 MTT检测细胞增殖 用0.25%胰蛋白酶消化单层培养细胞，用含10%小牛血清培养基以每孔 1×10^3 个细胞接种于96孔培养板中，每孔体积200 μl。48 h细胞完全贴壁后，换无血清的培养基继续培养48 h，然后换液，在上述②、④组中加入含10 ng/ml的TGF-β_1的无血清培养基，其余组不加TGF-β_1。将培养板移入 CO_2 孵箱中，在37 ℃、5% CO_2 的孵箱中继续培养48 h后，每孔加入MTT液20 μl，继续培养4 h，终止培养，弃去孔内的培养液，每孔加入150 μl的二甲亚砜，振荡10 min，使结晶物完全溶解。选择490 nm波长，在酶联免疫仪上测定各孔的 A 值。

1.2.8 细胞周期和凋亡的检测 以每孔 5×10^5/ml接种小管细胞于50 ml培养瓶中，生长3 d达30%~50%的瓶底面积。换无血清的培养基继续培养48 h，使细胞周期基本一致，然后按细胞分组条件，添加和不加10 ng/ml TGF-β_1处理细胞。48 h后胰酶消化细胞成单细胞悬液，预冷的0.1 mol/L PBS离心漂洗细胞2次，2 000 r/min离心弃去PBS后，加2 ml 70%乙醇置4 ℃冰箱固定过夜。取150 μl的细胞悬液于流式细胞仪专用管中，加入1%的Rnase酶，37 ℃孵育30 s。加入70 μl的PI染料，过滤后，上机检测。

1.2.9 培养上清FN的检测 细胞以每孔 5×10^4/ml接种于24孔培养板中，每孔体积500 μl。48 h细胞完全贴壁后，换无血清的培养基继续培养48 h，然后换液，按细胞分组条件处理细胞。在37 ℃、5% CO_2 的 CO_2 孵箱中继续培养细胞48 h。48 h后终止培养，分别取4倍稀释的培养上清和对照稀释液100 μl，加入96孔的ELISA板中，37 ℃孵育1 h。弃去反应孔中的液体，洗涤后，每孔加酶标抗体100 μl，37 ℃孵育1 h。弃去反应孔中的液体，洗涤后，每孔加入OPD反应液100 μl，37 ℃孵育20 min。再加入终止液50 μl，选择490 nm波长，以空白对照孔调零，在酶联免疫仪上测定各孔的 A 值。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用SPSS10.0统计软件进行组间方差分析。

2 结果

2.1 Smad7基因转移对TGF-β_1诱导小管细胞生长抑制的影响

添加10 ng/ml TGF-β_1于培养基48 h后，小管细胞出现明显的生长抑制，而Smad7基因转移可明显缓解TGF-β_1对小管细胞的生长抑制作用，但细胞增殖仍低于正常小管细胞生长水平（$P<0.05$）。NKC/Smad7组与NKC组细胞生长无显著差异，见表1。

表1 Smad7基因转移对TGF-β_1诱导小管细胞生长抑制的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effect of Smad7 transfer on TGF-β_1-induced renal tubular cell growth inhibition and FN secretion（$n=6$ $\bar{x}\pm s$）

Group	MTT	FN
NKC	0.24±0.03	0.23±0.01
NKC+TGF-β_1	0.05±0.01 *	0.89±0.02 *
NKC/Smad7	0.25±0.03	0.22±0.01
NKC/Smad7+TGF-β_1	0.18±0.02 #*	0.42±0.02 #*

*：$P<0.05$ *vs* NKC groups； #：$P<0.05$ *vs* NKC/Smad7+TGF-β_1

2.2 Smad7基因转移对TGF-β_1诱导小管细胞周期停滞和凋亡的影响

添加10 ng/ml TGF-β_1于培养基48 h后，小管细胞出现明显的G_1期生长停滞，分布于G_2和S期细胞数也明显下降，同时还诱导小管细胞凋亡，而Smad7基因转移可明显拮抗TGF-β_1诱导的G_1停滞，提高G_2、S的细胞的分布，减低小管细胞的凋亡

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

($P<0.05$)。NKC/Smad7 组与 NKC 组细胞生长情况无显著差异, 见表 2。

表 2　Smad7 基因转移对 TGF-β_1 诱导小管细胞周期停滞和凋亡的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of Smad7 transfer on TGF-β_1-induced renal tubular cells ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Cell cycle distribution			
	G_1	G_2	S	Apoptosis
NKC	38.64±1.4	20.39±0.65	40.96±1.90	1.15±0.20
NKC+TGF-β_1	68.80±2.00 *	8.68±0.76 *	22.50±1.52 *	5.12±0.53 *
NKC/Smad7	38.58±1.67	18.15±0.88	43.24±1.70	1.08±0.19
NKC/Smad7+TGF-β_1	42.69±1.69 *#	19.62±1.34 *#	37.68±1.39 *#	2.11±0.27 *#

*: $P<0.05$ *vs* NKC groups; #: $P<0.05$ *vs* NKC/Smad7 groups

2.3　Smad7 基因转移对 TGF-β_1 诱导小管细胞合成 FN 的影响

添加 10 ng/ml TGF-β_1 于培养基 48 h 后, 小管细胞 FN 分泌明显增加, 而 Smad7 基因转移可明显拮抗 TGF-β_1 刺激小管细胞分泌 FN, 但 FN 仍高于正常小管细胞水平($P<0.05$)。NKC/Smad7 组与 NKC 组细胞分泌 FN 无显著差异。

3　讨论

近年人们发现 Smads 蛋白是 TGF-β 家族信号从受体到核的细胞内转导分子[4], 这为我们深入了解 TGF-β 细胞内分子机制提供了重要的途径和方法。既往研究表明, TGF-β 不仅可以抑制小管细胞的增殖并诱导其凋亡, 还可诱导小管细胞转分化为肌成纤维细胞(MyoF)[5,6]。我们采用梗阻性肾病, 发现 TGF-β 诱导小管细胞生长停滞、凋亡以及小管间质纤维化与其细胞内 Smad7 负调控作用的不足有关。因此本研究首先建立小管细胞原代培养, 将 Smad7 基因转移到小管细胞中, 观察 Smad7 载体细胞是否能拮抗 TGF-β_1 对小管细胞的影响。

本研究采用筛网分离纯化技术, 获取较纯净的肾小管节段悬液, 镜检纯度在 90%以上。小管节段贴壁后 2～3 d 可见上皮细胞从小管节段周围长出, 生长 7～8 d 后细胞像鹅卵石样铺满瓶底。上皮角蛋白免疫组化染色阳性证实是小管上皮细胞。考虑原代细胞生长缓慢, 本实验利用胶原处理的培养瓶加快小管节段贴壁、培养基中添加胰岛素、地塞米松、转铁蛋白促进细胞增殖, 并选用转染率不受血清影响的 Tfx-50 脂质体, 该 Tfx-50 阳离子脂质体是阳性磷脂分子[N, N, N, -tetramethyl-N, N, bis(2-hydroxyethyl)-2, 3-di(oleoyloxy)-1, 4-butanedi-ammonium iodide]和 L-dioleoyl phosphatidylethanolamine(DOPE)的合成复合物, Tfx-50 的优点是可以在有血清存在条件下转染细胞, 尤其适合生长缓慢原代培养细胞。pcDNA3/Smad7 真核表达质粒含小鼠 Smad7 全长 cDNA 序列并连有融合蛋白 Flag 报告基因的序列, 二者均由同一启动子 CMV 驱动。小管细胞经 G418(400 μg/ml)筛选, 表达出特异的 Flag 融合蛋白, 表明 Smad7 基因转移成功。

本研究显示, 培养基添加 10 ng/ml TGF-β_1 48 h 后, MTT 法证实小管细胞增殖能力明显下降; 流式细胞仪分析细胞周期表明停滞于 G_1 期的小管细胞数明显增加, 而进入 G_2、S 期的细胞数明显减少, 而细胞凋亡明显增加。检测的直方图中, 可见具有典型的凋亡二倍体(亚 G_1)峰, 表明 TGF-β_1 对肾小管上皮细胞具有明显的生长抑制和促凋亡作用。同时我们也证实 TGF-β_1 可刺激小管细胞合成 FN, 由于 FN 是纤维化的前驱物质和阶段性标志物, 因此 TGF-β_1 参与了小管间质的纤维化进程。Terada 等[7]证实 TGF-β_1 诱导小管细胞的生长阻滞、G_1 停滞作用与其诱导细胞下调细胞周期蛋白 cyclinD1 的表达有关。Huang 等[8]还发现 TGF-β_1 诱导糖尿病肾小管肥大和 G_1 期停滞与 Smad2, 3 的高表达有关, 指出 TGF-β/Smads 信号通路参与了这一过程。除小管细胞外, 新近研究发现 TGF-β 还诱导多种细胞如肝细胞、上皮细胞、造血干细胞生长抑制和凋亡, 这些改变大多与 Smad7 的负调控不足有关[9]。TGF-β_1 对上述细胞的作用能否被逆转, 特别是在细胞内信号分子水平被逆转, 是一个非常重要值得研究的问题。应用基因转移技术, 我们构建了 Smad7 阳性表达的小管细胞, 发现培养基中加入 TGF-β_1 48 h 后, 与未转移组细胞相比, Smad7 转移组细胞 MTT 吸光度、细胞进入 S 期和 G_2 期的细胞数均显著增多, 而停滞 G_1 期的细胞数和细胞分泌 FN 的量较未转移组明显下降, 说明外源 Smad7 基因表达可拮抗 TGF-β_1 诱发的小管细胞生长抑制和凋亡, 并下调小管细胞 FN 的分泌, 同时也揭示小管细胞内存在 Anti-Smads 负调控作用不足, 这为我们下一步应用体内基因转移技术治疗小管间质疾病奠定了实验基础。

近来研究表明 Smad7 的负调控作用存在缺点, Itoh 等[10]观察到缺乏配体时, Smad7 主要位于细胞核内, 有配体存在时, Smad7 需完成核到胞质转移过程, 才能与受体结合, 该负调控机制存在反应缓慢, 而且也存在蛋白合成不足的问题, 因此, 要改变这些现象, 采用基因转移技术将外源性的 Smad7 基因转移到调控不足的地点是非常必要的。Smad7 基因转染于其它细胞也有相关的报道。Yamamura 等[11]发现 Smad3, Smad4 和转录活化因子 AP-1 形成的转录复合物参与了 TGF-β 诱发的 Hep3b 细胞的凋亡, 而细胞转移 Smad3 变异体或 Smad7 基因后, 可明显抑制这一过程。Kato 等[12]将 Smad7 基因转移入培养的血管平滑肌细胞, 发现外源性 Smad7 可明显下调 TGF-β_1 诱导的 α-SMA 蛋白的表达, 还阻断 TGF-β_1 对平滑肌细胞的生长抑制作用; 结

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

合上述研究结果可以得出，加强体内Anti-Smads的调控作用，恢复细胞内TGF/Smads的信号平衡是未来治疗的方向。

参考文献：

[1] Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, *et al*. Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors[J]. J Biol Chem, 1998, 273(39): 25364—25370.

[2] 黄云剑，杨惠标. Smad6,7蛋白表达与梗阻性肾病小管间质损伤关系的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002, 24(2): 173—175.

[3] Kreisberg J I, Wilson P D. Renal cell culture[J]. J Electron Microsc Tech, 1988, 9(3): 235—263.

[4] 黄云剑，杨唐俊. Smads分子在TGF-β超家族信号转导中的作用[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册，2001, 12(3): 172—174.

[5] Nowak G, Schnellmann R G. Autocrine production and TGF-beta 1-mediated effects on metabolism and viability in renal cells[J]. Am J Physiol, 1996, 271(3 Pt 2): F689—697.

[6] Fan J M, Ng Y Y, Hill P A, *et al*. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*[J]. Kidney Int, 1999, 56(4): 1455—1467.

[7] Terada Y, Nakashima O, Inoshita S, *et al*. TGF-beta-activating kinase-1 inhibits cell cycle and expression of cyclin D1 and A in LLC-PK1 cells[J]. Kidney Int, 1999, 56(4): 1378—1390.

[8] Huang H C, Preisig P A. G_1 kinases and transforming growth factor-beta signaling are associated with a growth pattern switch in diabetes-induced renal growth[J]. Kidney Int, 2000, 58(1): 162—172.

[9] Hocevar B A, Howe P H. Mechanisms of TGF-beta-induced cell cycle arrest[J]. Miner Electrolyte Metab, 1998, 24(2-3): 131—135.

[10] Itoh S, Landstrom M, Hermansson A, *et al*. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7[J]. J Biol Chem, 1998, 273(44): 29195—29201.

[11] Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, *et al*. Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta-dependent apoptosis[J]. J Biol Chem, 2000, 275(46): 36295—36302.

[12] Kato S, Ueda S, Tamaki K, *et al*. Ectopic expression of smad7 inhibits transforming growth factor-β responses in vascular smooth muscle cells[J]. Life Sciences, 2001, 69(6): 2641—2652.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)12-1052-02

腹腔镜结合病理活检对慢性肝病的诊断价值

Clinical significance of laparoscopy with biopsy for diagnosing chronic hepatic diseases

于化梅[1]，赵 丽[2]（第三军医大学附属西南医院：[1] 预防保健科；[2] 全军消化专科中心，重庆 400038）

1992年3月至2002年6月在我院诊治并接受腹腔镜检查患者160例，本研究通过对这些患者腹腔镜检查结果进行回顾性分析，进一步探讨腹腔镜检查在慢性肝病诊断中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组160例患者中男性98例、女性62例，年龄12～79岁。病程3～30年。主要临床表现包括：肝区疼痛、食欲减退、腹痛、腹胀和疲乏无力等。主要体征有：黄疸、肝脾肿大、腹水、上腹部包块和上腹部压痛。

1.2 仪器及操作方法

采用OlympusNCS-C型（针式）和Machida LA-SL-C Ⅱ型（标准式）腹腔镜，按常规操作方法进行检查[1]。

2 结果

160例患者经腹腔镜检查后，156例行病理活检，4例未进行活检取材，结合病理改变，有155例得以确诊，确诊率达91.25%。

2.1 腹腔镜检查对慢性肝病的临床诊断价值

160例临床考虑慢性肝病而未确诊的患者经腹腔镜检查，155例得以确诊，其病因分别为肝硬化69例(43.13%)，慢性肝炎52例(32.50%)，肝癌24例(15.00%)，肝囊肿3例(1.87%)，其他12例(7.50%)，包括慢性胆囊炎2例，慢性胰腺炎5例等，虽经其他相关辅助检查仍不能明确病因者4例。

2.1.1 各种肝病的镜下表现 69例肝硬化和52例慢性肝炎的镜下表现为肝脏增大或缩小，肝脏呈紫红色或灰白色，表面结节不平，部分呈斑纹样，部分呈结节状改变或橘皮样外观，有白色纤维素渗出物，肝边缘翘起，质硬，部分患者肝脏与腹膜有粘连。24例肝癌主要表现为肝脏增大，癌肿均呈淡黄色或灰白色，周围有出血瘀斑，肝脏表面有局限性不规则隆起和充血，一般伴有血性腹水；部分镜下表现很难与肝硬化和慢性肝炎鉴别。

2.1.2 病理活检 156例在腹腔镜直视下进行病理活检的患者，病理活检的准确性较经皮肝穿刺高，155例病理表现可对慢性肝炎、肝硬化及肝癌做出准确鉴别诊断。对于肝癌病理标本不但可以对肿瘤进行分期分型，个别病例尚能判断肿瘤的来源。结合临床表现、腹腔镜直视下肝脏及其周围脏器的表现和准确病理活检，慢性肝病的诊断准确性进一步提高。

2.1.3 并发症 本组1例患者出现腹部局部皮下气肿，1例

（下转1055页）

作者简介：于化梅(1971—)，女，四川省平昌市人，医师。电话：(023)68753527

收稿日期：2003-04-05；修回日期：2003-05-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net