

阻断 Smad3 表达对转化生长因子 $\beta 1$ 诱导肌成纤维细胞增殖的影响

邓长柏¹, 杨作成²

(1. 南方医科大学南方医院儿科, 广东省广州市 510515; 2. 中南大学湘雅三医院儿科, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 病理学与病理生理学; 成纤维细胞; Smad3 基因; 转化生长因子 $\beta 1$; RNA 干扰

[摘要] 目的 探讨转化生长因子 $\beta 1$ 及其信号转导分子 Smad3 在肌成纤维细胞 C2C12 中的作用。方法 以转化生长因子 $\beta 1$ 作用于 C2C12 细胞, 对其信号转导分子 Smad3 基因进行 RNA 干扰, 用 MTT 法检测转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的 C2C12 细胞增殖。结果 0、1、5 和 10 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 1$ 作用 C2C12 细胞 24 h 后, C2C12 细胞增殖随转化生长因子 $\beta 1$ 浓度增加而增加, 且呈剂量依赖性(光密度值分别为 0.096 ± 0.015 、 0.177 ± 0.014 、 0.240 ± 0.028 和 0.312 ± 0.012 , $P < 0.01$); 经 200 pmol/L siRNA-Smad3 转染 24 h 后, 再用 5 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 1$ 作用, 其细胞增殖(光密度值 0.063 ± 0.011) 比内对照组下降(光密度值 0.137 ± 0.016 , $P < 0.01$)。结论 转化生长因子 $\beta 1$ 通过 Smad3 信号转导促进 C2C12 细胞增殖并呈剂量依赖性, siRNA-Smad3 可有效阻断其信号转导而降低 C2C12 细胞增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of siRNA-Smad3 on Growth of C2C12 Cells Induced by Transforming Growth Factor- $\beta 1$

DENG Chang-Bo¹, and YANG Zuo-Cheng²

(1. Pediatric Department, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515; 2. Pediatric Department, The 3rd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

[KEY WORDS] Fibroblast Cell; Smad3; Transforming Growth Factor- $\beta 1$; RNA Interference

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Smad3 on the growth of C2C12 cells induced by transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). **Methods** C2C12 cells were transfected with siRNA-Smad3 in vitro, and the cell proliferations were examined with MTT methods. **Results** After the C2C12 cells interfered with different concentrations of TGF- $\beta 1$ (0, 1, 5, 10 $\mu\text{g/L}$) for 24 h, the MTT (OD) values were 0.096 ± 0.015 , 0.177 ± 0.014 , 0.240 ± 0.028 , 0.312 ± 0.012 respectively ($P < 0.01$). While the C2C12 cells were transfected with 200 pmol/L siRNA-Smad3 for 24 h and then treated with 5 $\mu\text{g/L}$ of TGF- $\beta 1$, the MTT (OD) values in experimental group (0.063 ± 0.011) were decreased compared with internal control group (0.137 ± 0.016 , $P < 0.01$). **Conclusion** The TGF- $\beta 1$ could promote C2C12 cells proliferation by the Smad3 pathway and showed dose dependent manner, siRNA-Smad3 could block the signal transduction and decreased C2C12 cell proliferation effectively.

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 具有多种生物学功能, 并参与多种病理生理过程, 尤其是在器官纤维化的发生发展中起关键作用。器官纤维化是间质细胞激活增殖并产生大量细胞外基质的结果。TGF- $\beta 1$ 对肌成纤维细胞 C2C12 的作用及其机制尚在探索之中。我们的前期研究^[1]表明 TGF- $\beta 1$ 作用肌成纤维细胞是通过 Smad3 通路完成的, 针对 Smad3 基因设计的短链干扰 RNA (siRNA), 可有效阻断 Smad3 基因表达和磷酸化, 阻断 TGF- $\beta 1$ -Smad3 信号通路。为进一步探讨 TGF- $\beta 1$ 对

C2C12 细胞增殖的影响及其内在机制, 本文采用 siRNA 经 RNA 干扰方法对 TGF- $\beta 1$ 信号转导分子 Smad3 基因进行沉默以阻断 TGF- $\beta 1$ 作用的信号转导, 为探讨器官纤维化治疗提供靶点和依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

噻唑蓝 (MTT) (Amresco 公司生产, 配制成 5 g/L 溶液), DMEM 培养基 (Hyclone 公司生产, pH 7.0~7.2), 小牛血清 (杭州四季青生物公司生产), TGF- $\beta 1$ (Peprotech 公司生产), siRNA-Control 和 siRNA-Smad3 试剂 (武汉晶赛生物工程公司生产), 脂质体 (Lipofectamine 2000, Invitrogen 公司生产), 胰酶、牛血清白蛋白、DEPC、PMSF 和考马斯亮兰 R-250 均购于美国 Sigma 公司。CO₂ 培养箱 (美国 SHEL-LAB 公司生

[收稿日期] 2008-01-21 [修回日期] 2008-04-20

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金 (B2005-072) 和教育部留学回国启动基金 (2006-331)

[作者简介] 邓长柏, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事儿科心血管病和器官纤维化的研究, E-mail 为 dengchangbo@163.com。通讯作者杨作成, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事儿科心血管病研究, E-mail 为 yang-zcr@126.com。

产), 医用净化工作台(YJ-875, 苏州净化设备公司生产), 倒置显微镜(Olympus 公司生产), 图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司生产), 350 型酶联免疫检测仪(美国 Beckman 公司生产), 96 孔培养板和 24 孔培养板(Costar 公司生产)。

1.2 细胞与细胞培养

小鼠肌成纤维细胞 C2C12 细胞系由中南大学病理生理研究室引进。C2C12 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养于 37℃ 含 5% CO₂ 的恒温、恒湿培养箱中。细胞见贴壁生长, 形态呈梭形, 铺满培养底约 60%~80% 后传代, 传代时常规吸去培养液, 用 1:1 的 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% 的 EDTA 混合液消化, 加入消化液后在倒置显微镜下观察, 待生长的细胞收缩呈圆形至细胞分界清楚时, 弃去消化液, 用消毒好的 PBS 液轻轻冲洗 2~3 次, 加入适量含血清培养液吹打成单细胞悬液, 按所需浓度接种。

1.3 转化生长因子 β_1 干预 C2C12 细胞

取对数生长期细胞, 按 1×10^5 /L 接种于六孔板中, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养于 37℃ 含 5% CO₂ 的恒温、恒湿培养箱中, 培养 18~24 h, 使细胞铺满瓶底 30%~50%, 用无血清的 DMEM 培养液轻轻冲洗细胞 1~2 次。在各孔中加入不同量 DMEM 培养液和 TGF- β_1 , 使 TGF- β_1 终浓度成为 0、1、5 和 10 μ g/L, 作用 24 h 后, 收集细胞做 MTT 实验。

1.4 siRNA-Smad3 转染 C2C12 细胞

取 0.05 pmol 的 siRNA-Smad3, 加入 DMEM(无血清、无抗生素)中, 使混合液成 250 μ L, 轻轻混匀, 使配制的浓度分别为 200 pmol/L; 取 5 μ L Lipofectamine 2000, 加入 245 μ L DMEM(无血清、无抗生素)混匀, 室温放置 5 min; 混合上述两种液体, 共成 500 μ L, 室温温育 20 min。将混合液 500 μ L siRNA-Smad3+ Lipofectamine 2000(实验组)加入到六孔培养板的 1 个孔细胞中在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养(转染) 24 h, 同样方法转染空白对照组(脂质体加 DMEM 混合液培养)和内对照组(200 pmol/L siRNA-control 脂质体加 DMEM 培养转染)。

1.5 MTT 法测 C2C12 细胞增殖

按细胞培养法培养细胞和转染细胞, 制成单细胞悬液后, 以每孔 10 000 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔体积为 200 μ L。将培养板放入 CO₂ 培养箱, 在 37℃、5% CO₂ 恒温恒湿条件下, 培养 24 h; 用无血清的 DMEM 培养液洗细胞 1~2 次; 加无血清 DMEM 培养液和 TGF- β_1 (使终浓度成 0、1、5 和 10 μ g/L), 再培养 24 h; 加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μ L/孔 37℃继续

培养 5 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液。再在每孔中加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 使甲臌充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值(OD 值), 记录结果。每一浓度做 5 个复孔, 计算平均值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.5 for windows 统计分析软件进行统计学处理, 分析前均进行方差齐性检验。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 多组间两两比较采用方差分析 SNK-q 检验; TGF- β_1 作用浓度与 MTT 值的关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 转化生长因子 β_1 对 C2C12 细胞增殖的影响

与对照组(0 μ g/L)比, 1、5 和 10 μ g/L TGF- β_1 干预 C2C12 细胞 24 h, 均能促进 C2C12 细胞增殖($P < 0.01$, 表 1); 对 TGF- β_1 作用浓度与 C2C12 细胞增殖(OD 值)行直线相关分析, 结果表明, 随着 TGF- β_1 浓度增大, C2C12 细胞增殖也相应增加($r = 0.955$, $P < 0.05$)。

表 1. 转化生长因子 β_1 对 C2C12 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

TGF- β_1 (μ g/L)	OD 值
0 (对照组)	0.096 \pm 0.015
1	0.177 \pm 0.014 ^a
5	0.240 \pm 0.028 ^{ab}
10	0.312 \pm 0.012 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与 1 μ g/L 组比; c 为 $P < 0.01$, 与 5 μ g/L 组比。

2.2 siRNA 转染对转化生长因子 β_1 诱导 C2C12 细胞增殖的影响

200 pmol/L siRNA-Smad3 转染 C2C12 细胞 24 h, 再加 5 μ g/L TGF- β_1 干预 C2C12 细胞 24 h, MTT 测定 C2C12 细胞增殖, 发现其 OD 值明显低于 siRNA-Control+ 5 μ g/L TGF- β_1 组($P < 0.01$, 表 2)。

表 2. siRNA 转染对转化生长因子 β_1 诱导 C2C12 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

分 组	OD 值
siRNA-Control	0.066 \pm 0.006 ^a
siRNA-Control+ 5 μ g/L TGF- β_1	0.137 \pm 0.016
siRNA-Smad3+ 5 μ g/L TGF- β_1	0.063 \pm 0.011 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与 siRNA-Control+ 5 μ g/L TGF- β_1 组比较。

3 讨论

Smads 蛋白是 TGF- β 1 在细胞中的信号转导分子。目前已发现的 Smads 至少有 8 种, 根据其结构和功能可分为三大类: 第一类为 R-Smads, 包括 Smad1、2、3、5、8 及 Mad (果蝇); 第二类是 CO-Smads, 包括 Smad 4、Me、Leu (果蝇中); 第三类是 I-Smad, 包括 Smad 6 和 Smad 7; 它们在信号转导中起不同的作用。研究表明 Smad3 在成纤维细胞分化为肌成纤维细胞中起重要作用^[2,3]。

器官纤维化主要是间质成纤维细胞大量激活、增殖, 分化为肌成纤维细胞, 产生过多的基质所致, TGF- β 1 是主要的调控细胞因子^[4,5]。TGF- β 1 对肌成纤维细胞的作用及机制如何, 是否通过 Smad 信号通路而促进肌成纤维细胞增殖, 是本研究要探讨的问题。本实验结果表明 TGF- β 1 促进肌成纤维细胞增殖, 并随着 TGF- β 1 浓度升高, 细胞增殖增加, 呈剂量依赖性, 5 μ g/L 和 10 μ g/L TGF- β 1 干预肌成纤维细胞 24 h, MTT 测得其 OD 值分别是 1 μ g/L TGF- β 1 干预的 1.5 倍和 3 倍。TGF- β 1 促进肌成纤维细胞增殖是通过 Smad3 信号通路完成的, 阻断 Smad3 信号通路, 可以阻断 TGF- β 1 促进肌成纤维细胞增殖作用。前期研究表明 siRNA-Smad3 阻断了 Smad3 表达及其磷酸化^[1], 而本文研究表明 siRNA-Smad3 消除了 TGF- β 1 的促肌成纤维细胞增殖作用, 转染 siRNA-Smad3 组细胞增殖比内对照组减少了近 1/2, 这与 Ester

等^[6]报道的结果相似。Ester 等^[6]研究表明 Smad3 缺乏的小鼠成纤维细胞 S3 ko 在 TGF- β 1 刺激后细胞增殖比野生型有 Smad3 基因细胞低 8 倍, 且 *c-fos* 和 p21 mRNA 表达 (在刺激后 10 h 时) 升高 5.4 倍。siRNA-Smad3 的作用机制可能是在转录后水平沉默了 Smad3 基因表达, 阻断了 TGF- β 1-Smad3 信号通路, 从而阻断 TGF- β 1 对 C2C12 细胞增殖作用, 导致细胞增殖受到抑制。

本实验结果表明 Smad3 信号通路在肌成纤维细胞增殖中起重要作用, 针对 Smad3 靶点设计 siRNA 药物, 减少肌成纤维细胞增殖, 可能会为器官纤维化的治疗提供依据。

[参考文献]

- [1] 邓长柏, 杨作成. siRNA 阻断肌成纤维细胞内源性 Smad3 表达的研究 [J]. 临床儿科杂志, 2007, 25 (10): 815-817.
- [2] Liu HX, Wang SW, Zhao CH, et al. The mechanism of transforming growth factor beta1 in myofibroblast differentiation [J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2007, 45 (14): 986-989.
- [3] Hu B, Wu Z, Phan SH. Smad3 mediates transforming growth factor-beta1 induced alpha-smooth muscle actin expression [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29 (3pt1): 397-404.
- [4] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta1 and fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13 (22): 3 056-062.
- [5] 周志斌, 郭毅, 王思鸿, 等. 基质金属蛋白酶 9 及转化生长因子 β 1 在人动脉粥样硬化斑块的表达及其与斑块稳定性的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (3): 217-220.
- [6] Ester P, Wen JJ, Jorg H, et al. Functional characterization of transforming growth factor β signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (23): 19 945-953.

(此文编辑 许雪梅)