

TGF- β_1 对甲状腺相关性眼病眼外肌成纤维细胞 Smads 基因表达的影响

陆燕, 丁颖, 侯培莉, 孟虎, 施宇华, 黄振平

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81200719)

作者单位: (210002) 中国江苏省南京市, 南京军区南京总医院眼科

作者简介: 陆燕, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼眶病、角膜病、屈光不正。

通讯作者: 陆燕. luyan366@126.com

收稿日期: 2013-05-27 修回日期: 2013-09-13

Effects of transforming growth factor - β_1 on gene expression of Smads in orbital fibroblasts with thyroid-associated ophthalmopathy

Yan Lu, Ying Ding, Pei-Li Hou, Hu Meng, Yu-Hua Shi, Zhen-Ping Huang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81200719)

Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yan Lu. Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. luyan366@126.com

Received: 2013-05-27 Accepted: 2013-09-13

Abstract

• AIM: To investigate the effects of transforming growth factor - β_1 (TGF - β_1) on gene expression of main components of Smads family including Smad3, Smad4 and Smad7 in orbital fibroblasts (OF) of fibrosis extraocular muscle with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO).

• METHODS: OF were treated with 5 μ g/L TGF - β_1 at different time points (0min, 15min, 30min, 1h, 2h and 4h), and real-time quantitative RT-PCR was performed to observe the effects of TGF - β_1 on the expression of Smad3, Smad4 and Smad7 mRNA.

• RESULTS: The expression of Smad3 mRNA was 10.71 times to that of control group at 15min and 25.07 times at 1h ($P < 0.01$); Smad4 mRNA was 1.54 times to that of control group at 15min and 15.99 times at 1h ($P < 0.01$); Smad7 mRNA was 3.21 times to that of control group at 30min and 14.66 times at 4h ($P < 0.01$).

• CONCLUSION: TGF - β_1 up-regulate the expression of Smad3, Smad4, Smad7 mRNA in OF in a time dependent fashion, TGF - β_1 /Smad pathway may play an important role in the pathogenesis of extraocular muscle fibrosis with TAO.

• KEYWORDS: thyroid-associated ophthalmopathy; extraocular muscle fibrosis; transforming growth factor - β_1 ; Smads; orbital fibroblasts

Citation: Lu Y, Ding Y, Hou PL, et al. Effects of transforming growth factor - β_1 on gene expression of Smads in orbital fibroblasts with thyroid-associated ophthalmopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(10):1956-1959

摘要

目的: 测定转化生长因子 - β_1 (transforming growth factor - β_1 , TGF - β_1) 对甲状腺相关性眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy, TAO) 患者纤维化眼外肌来源的成纤维细胞 (orbital fibroblasts, OF) 细胞 Smad3, Smad4, Smad7 基因表达的影响。

方法: 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real-time quantitative RT-PCR) 观察 5 μ g/L TGF - β_1 刺激 OF 在不同时间点 (0h; 15, 30min; 1, 2, 4h) 表达 Smad3 mRNA, Smad4 mRNA, Smad7 mRNA 的变化。

结果: 5 μ g/L TGF - β_1 刺激 OF 15min 后, Smad3 mRNA 的表达量已显著增加, 为对照组的 10.71 倍, 于 1h 达顶峰, 为对照组的 25.07 倍 ($P < 0.01$), 持续近 2h, 然后呈下降趋势, 4h 基本恢复正常; 5 μ g/L TGF - β_1 刺激 OF 15min 后, Smad4 mRNA 的表达量开始增加, 为对照组的 1.54 倍, 于 1h 达顶峰, 为对照组的 15.99 倍 ($P < 0.01$), 然后呈下降趋势, 4h 基本恢复正常; 5 μ g/L TGF - β_1 刺激 OF 30min 后, Smad7 mRNA 的表达量明显开始增加, 为对照组的 3.21 倍, 持续至 4h 为对照组的 14.66 倍 ($P < 0.01$)。

结论: TGF - β_1 可活化眼眶成纤维细胞 Smads 信号通路。在一定的时间范围内, 诱导 OF 表达 Smad3 mRNA 和 Smad4 mRNA 呈先增加后下降的趋势, 而 Smad7 mRNA 表达则呈现持续增加的趋势, 说明 TGF - β_1 /Smads 这一纤维化相关的经典信号转导通路可能在 TAO 眼外肌纤维化机制中发挥了重要的作用。

关键词: 甲状腺相关性眼病; 眼外肌纤维化; TGF - β_1 ; Smads 基因; 成纤维细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.04

引用: 陆燕, 丁颖, 侯培莉, 等. TGF - β_1 对甲状腺相关性眼病眼外肌成纤维细胞 Smads 基因表达的影响. 国际眼科杂志 2013; 13 (10): 1956-1959

0 引言

甲状腺相关性眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy, TAO) 所导致的眼外肌纤维化在病理学上具有不可逆的特点, 可使患者出现复视、斜视、甚至压迫视神经导致失明,

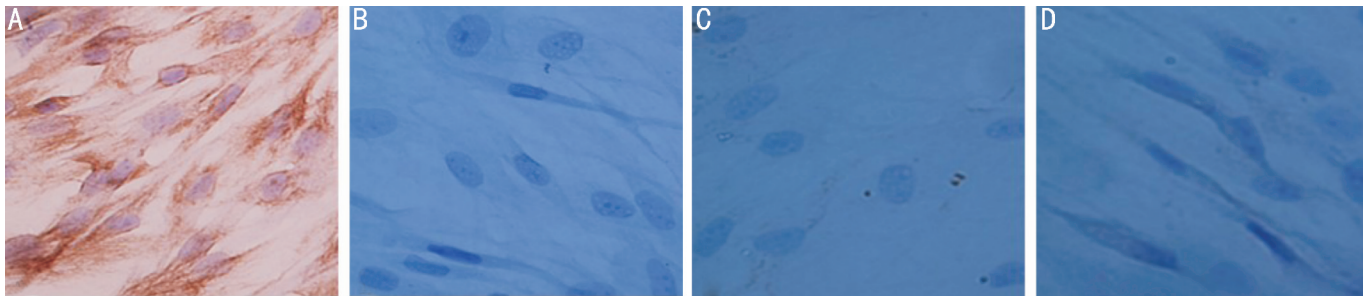


图1 免疫细胞化学鉴定($\times 400$) A:Vimentin 染色呈阳性;B:Desmin 染色阴性;C:Keratin 染色阴性;D:S-100 染色阴性。

药物及手术治疗效果均欠佳,目前发病机制不明。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)被公认为是纤维化形成与发展的启动枢纽^[1]。研究证明^[2], TGF- β_1 mRNA 在 TAO 患者眼眶组织中的表达量是正常人的 2 倍。TGF- β_1 /Smads 信号通路参与了一系列纤维化疾病的病理生理进程。而在 TAO 眼外肌纤维化中未见 TGF- β_1 /Smads 信号通路改变的报道,本实验采用 RT-PCR 观察 TGF- β_1 对 Smads 基因表达的影响,旨在明确 TAO 眼外肌纤维化的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 TAO 眼外肌来源的成纤维细胞培养及鉴定 眼眶成纤维细胞培养组织来源于 TAO 限制性斜视矫正术及严重性 TAO 行眼眶减压术取下的眼外肌,术前甲状腺功能控制在正常范围。采用组织块培养法培养眼眶成纤维细胞,采用细胞免疫化学染色进行鉴定,染色蛋白为:波形蛋白(Vimentin)、角蛋白(Keratin)、结蛋白(Desmin)及 S-100。

1.1.2 主要仪器与试剂 主要试剂:DMEM/F12 培养液,胎牛血清(FBS, Gibco 公司);人重组 TGF- β_1 (Peprotech, 美国);TransScriptTM Green Two-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒及总 RNA 抽提试剂 TransZOL Up(北京全式金生物技术有限公司);Smad3, Smad4, Smad7 及内参 GAPDH 引物合成(上海生工生物技术公司)。主要仪器:超净工作台(美国 ESCO 公司),CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司),倒置相差显微镜(日本 Nikon),水平电泳仪(Bio-Rad),Backman 721 型紫外分光光度计(Backman, USA),荧光定量 PCR 仪(MyiQ, BiO-Rad),高速低温离心机(Eppendorf),台式高速离心机(美国 Thermo 公司)。

1.1.3 引物的设计与合成 根据 NCBI 已报道的基因序列,用 Primer Premier 6.0 软件设计特异性的引物, Smad3 上游引物:5'-GTCAACACCAAGTGCATCAC-3',下游引物:5'-ATGGCTGTAGTCGTCCAGTG-3',扩增长度 297bp; Smad4 上游引物:5'-GGACTGTTGCAGATAGCATC-3',下游引物:5'-GCTGGAATGCAAGCTCATTG-3',扩增长度 229bp; Smad7 上游引物:5'-GACAGCTCAATTCGGACAAC-3',下游引物:5'-TCTCGTAGTCGAAAGCCTTG-3',扩增长度 222bp; GAPDH 上游引物:5'-TGGCTGTGAACCACGAGAA-3',下游引物:5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3',扩增长度 143bp。引物设计完成后交给上海生工生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞干预措施 选取 3~5 代成纤维细胞,消化计数后接种于 6 孔板中,每孔 3×10^4 个细胞,待细胞贴壁后,换成无血清培养基 24h,使细胞同步化。每孔加入终浓度

为 $5 \mu\text{g/L}$ TGF- β_1 (预实验中因 $5 \mu\text{g/L}$ TGF- β_1 与 $10 \mu\text{g/L}$ TGF- β_1 对 OF 有相同的作用,因此选用 $5 \mu\text{g/L}$ TGF- β_1 作为终浓度),分别于处理后 15min, 30min, 1h, 2h, 4h 提取细胞总 RNA,同时设立空白对照组、实验组和对照组均做 3 个复孔。

1.2.2 细胞总 RNA 抽提 所有操作严格按照北京全式金生物技术有限公司 TransZOL Up 总 RNA 抽提说明书进行,用 10g/L 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测 RNA 的纯度和浓度。

1.2.3 cDNA 合成及 Real-time PCR 检测 Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达 cDNA 合成:采用 TransScriptTM 反转录试剂盒。总 RNA $8 \mu\text{L}$,引物 $1 \mu\text{L}$,逆转录酶 $1 \mu\text{L}$,反应混合物 $10 \mu\text{L}$,共 $20 \mu\text{L}$ 的反应体系。 42°C 30min, 85°C 5min, 4°C 5min。所得 cDNA -20°C 保存备用。PCR 扩增目的 DNA 片段:定量聚合酶联反应混合物 $10 \mu\text{L}$,上下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$,模板 cDNA $1 \mu\text{L}$,双蒸水 $8 \mu\text{L}$,共 $20 \mu\text{L}$ 的反应体系,每个样本做 3 个复孔。在荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 95°C 30s; 95°C 5s; 60°C 30s,循环 40 次。扩增完成后从 60°C 开始升温做溶解曲线验证扩增产物的特异性。反应完成后设定基线值(baseline)和阈值(threshold),读取循环(Ct)值。采用公式 $\Delta\text{Ct} = [\text{Ct}(\text{目的基因})] - [\text{Ct}(\text{内参基因})]$, $\Delta\Delta\text{Ct} = [\Delta\text{Ct}(\text{实验组})] - [\Delta\text{Ct}(\text{对照组})]$,计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,即为实验组目的基因表达量相对于对照组的倍数。所有实验均重复 3 次。

统计学分析:实验结果以均数 \pm 标准差表示,应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据统计,各组间均数比较采用单因素方差分析(one way-ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学鉴定 细胞 Vimentin 染色呈阳性,胞质中可见到棕黄色反应产物,胞核清晰,无染色(图 1A),而 Desmin, Keratin, S-100 均呈阴性反应(图 1B, C, D),证明细胞为中胚层来源,鉴定细胞为成纤维细胞。

2.2 RNA 的纯度与浓度鉴定 10g/L 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测 RNA 的纯度和浓度, RNA 标本均显示 28S, 18S 和 5S 三个条带, 28S 亮度为 18S 的两倍,说明抽提 RNA 完整性较好。选取 D_{260}/D_{280} 比值 $1.8 \sim 2.2$ 为合格标本,进行下一步实验(图 2)。

2.3 TGF- β_1 对 Smad3 mRNA 的影响 TGF- β_1 以时间依赖方式诱导 OF 表达 Smad3 mRNA。 $5 \mu\text{g/L}$ TGF- β_1 刺激 15min 后, Smad3 mRNA 的表达量已显著增加,为对照组的 10.71 倍,于 1h 达顶峰,为对照组的 25.07 倍($P < 0.01$),持续小于 2h,然后呈下降趋势,4h 基本恢复正常(图 3)。

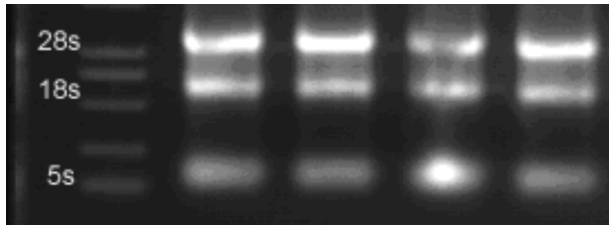


图2 10g/L琼脂糖凝胶电泳检测RNA的纯度,显示28S,18S和5S三个条带,28S亮度为18S的两倍,说明抽提RNA完整性较好。

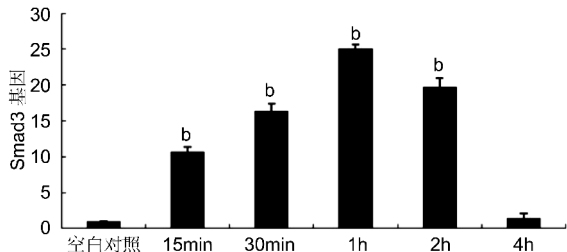


图3 TGF-β₁诱导OF表达Smad3 mRNA的时间效应^b*P*<0.01 vs 空白对照组。

2.4 TGF-β₁对Smad4 mRNA的影响 TGF-β₁以时间依赖方式诱导OF表达Smad4 mRNA。5μg/L TGF-β₁刺激15min后,Smad4 mRNA的表达量开始增加,为对照组的1.54倍,于1h达顶峰,为对照组的15.99倍(*P*<0.01),然后呈下降趋势,4h基本恢复正常(图4)。

2.5 TGF-β₁对Smad7 mRNA的影响 TGF-β₁以时间依赖方式诱导OF表达Smad7 mRNA。5μg/L TGF-β₁刺激30min后,Smad7 mRNA的表达量明显开始增加,为对照组的3.21倍,持续至4h为对照组的14.66倍(*P*<0.01,图5)。

3 讨论

TGF-β₁是导致纤维化最重要的细胞因子之一,可促使成纤维细胞增殖、向肌成纤维细胞转分化及合成细胞外基质。近年来TGF-β₁在TAO发病中的作用有多项报道:TGF-β₁可导致CD90⁺眼眶成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,产生炎症因子及合成细胞外基质而参与眼眶的纤维化^[3];TGF-β₁可显著促进TAO眼眶成纤维细胞增殖^[4];TGF-β₁可调节TAO自身抗原-促甲状腺自身抗体(TSH-receptor, TSHR)的表达^[5];TGF-β₁可刺激TAO眼眶成纤维细胞表达纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)^[6];TGF-β₁可促使TAO眼眶成纤维细胞Smad3磷酸化^[2],并且SB431542(特异性Smad信号阻断剂)以剂量依赖的方式阻断了TGF-β₁诱导的透明质酸合成酶基因1(hyaluronan synthases one, HAS-1)的表达;TGF-β₁刺激OF通过PKC通路信号,激活PKC-β II,分泌透明质酸(HA)^[7];TGF-β₁还可以激活OF分泌糖胺聚糖(GAG)^[8]。

Smads蛋白是将胞外TGF-β信号经胞质传导到细胞核内的中介分子,这一信号通路是发现最早、并被广泛研究的经典通路。目前已发现的Smad有9种,根据其结构和功能特性分为三类:(1)受体激活型Smads(receptor-regulated Smads, R-Smads),包括Smad1,2,3,5和8等,是TGF-β家族受体激酶的直接底物。在哺乳动物细胞中,Smad1,5,8是BMP特异性R-Smads,Smad2和Smad3是TGF-β/活素特异性R-Smads;(2)共同型Smads(common-Smad, Co-Smad),主要为Smad4,Smad4B;(3)抑制型Smads(inhibitory Smads, I-Smads),包括Smad6和Smad7,

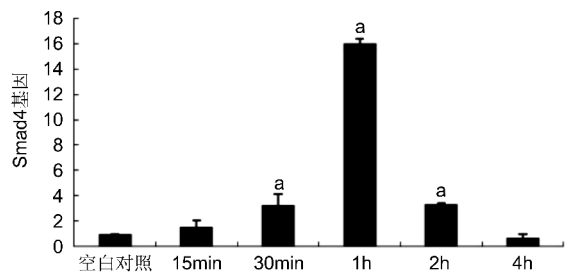


图4 TGF-β₁诱导OF表达Smad4 mRNA的时间效应^a*P*<0.05 vs 空白对照组。

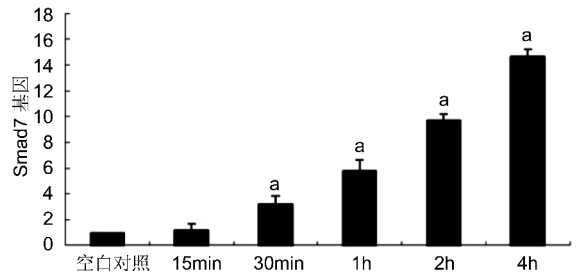


图5 TGF-β₁诱导OF表达Smad7 mRNA的时间效应^a*P*<0.05 vs 空白对照组。

它通过与激活的TGF-β受体I牢固结合,阻止后者对R-Smad的磷酸化从而阻断信号转导。Smad6是BMP异性I-Smads,而Smad7是TGF-β/活素特异性I-Smads^[9];在信号通路中,TGF-β₁首先与TGF-β受体II(TβR II)结合形成复合物,其构型发生变化,从而可被TβRI识别并结合,形成TβR II-配体-TβRI三聚体,TβRI被TβR II磷酸化,活化的TβRI进一步磷酸化后进而与Co-Smad结合并形成复合物,转移到核内调控转录。

TGF-β/Smads信号转导途径可通过刺激成纤维细胞合成胶原及其它细胞外基质成分等多种机制,参与真皮纤维化、肺纤维化和肾小球硬化等机体内多种纤维化疾病的进程。为此我们采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative RT-PCR)技术从mRNA水平对TAO眼外肌纤维化中TGF-β信号转导途径的多个重要环节,如受体活化型Smad、共同型Smad及抑制型Smad的表达情况进行了研究,旨在探讨TAO眼外肌纤维化分子机制。实验结果表明,在一定的浓度范围之内,随着时间的增加,眼眶成纤维细胞Smad3和Smad4,Smad7 mRNA的表达增高,而随着时间的继续延长,Smad3和Smad4 mRNA表达水平下降,这可能与Smad7表达持续增加,抑制了TGF-β₁诱导的Smad3和Smad4表达有关。

Li等^[10]用TGF-β₁刺激肾小管上皮细胞,发现上调Smad2蛋白的上升高峰时间出现在1h之前,维持时间不到2h;而Smad7表达高峰出现时间较晚,维持时间较久。这与我们的实验结果一致。

我们的研究表明,TGF-β₁/Smad参与了TAO眼外肌来源的成纤维细胞的活化过程,并且涉及多个重要环节的表达改变,可能与TAO眼外肌纤维化的发病机制有关,但是本实验中由于未加入TGF-β₁/Smads信号通路阻断剂等干预因素,因此尚不能明确这一通路在TAO眼外肌纤维化中的具体发病机制,我们将会在今后的实验中进行完善。

参考文献

1 Hills CE, Squires PE. TGF-β₁-induced epithelial-to-

mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2010;31(1):68-74

2 Van Steensel L, Paridaens D, Schrijver B, et al. Imatinib mesylate and AMN107 inhibit PDGF-signaling in orbital fibroblasts: a potential treatment for Graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(7):3091-3098

3 Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 2010;362:726-728

4 Heufelder AE, Bahn RS. Modulation of Graves' orbital fibroblast proliferation by cytokines and glucocorticoid receptor agonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(1):120-127

5 Valyasevi RW, Jyonouchi SC, Dutton CM, et al. Effect of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and transforming growth factor-beta on adipogenesis and expression of thyrotropin receptor in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(2):903-908

6 Cao HJ, Hogg MG, Martino LJ, et al. Transforming growth factor-beta induces plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human orbital fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(7):1411-1419

7 Wang HS, Tung WH, Tang KT, et al. TGF-beta induced hyaluronan synthesis in orbital fibroblasts involves protein kinase C beta II activation in vitro. *J Cell Biochem* 2005;95(2):256-267

8 Korducki JM, Loftus SJ, Bahn RS. Stimulation of glycosaminoglycan in cultured human retroocular fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(6):2037-2042

9 Moustakas A, Soucheinytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001;14(Pt24):4359-4369

10 Li JH, Zhu HJ, Huang XR, et al. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(6):1464-1472

科技期刊对论文关键词的要求

关键词是论文的检索标志,是表达文献主题概念的自然语言词汇,一般是词和词组。

科技论文的关键词是从其题名、摘要和正文中选出来的。

发表的论文不标注关键词,读者就检索不到,文献数据库也不会收录;关键词选用不当,就会降低论文的被检率,甚至检索不到。

关键词包括3部分:1)叙词(正式主题词),经过规范化的并收入主题词表中的词或词组;2)非正式主题词(词表中的上位词+下位词+替代词);3)自由词(标引需要但主题词表中找不到的词)。

每篇论文中应列出3~8个关键词,其中叙词应尽可能多一些。

关键词作为论文的组成部分,置于摘要段之后。

摘自《科学技术期刊编辑教程》