

羊栖菜多糖对 TGF- β 1 诱导的大鼠肺成纤维细胞的影响

吴华勇 方红龙 罗建 王丹琼 张伟文

摘要 目的 研究羊栖菜多糖对 TGF- β 1 诱导的大鼠肺成纤维细胞的影响,探讨其抗肺纤维化作用及机制。方法 将实验分成对照组、TGF- β 1 组、TGF- β 1 + 不同剂量羊栖菜多糖组(25、50、100 μ g/ml),采用 MTT 法检测细胞增殖,RT-PCR 法检测 Smad3、Smad7、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 的表达,ELISA 法检测 I 型胶原蛋白的表达,Western blot 法检测 α -SMA 的表达。结果 TGF- β 1 能诱导肺成纤维细胞增殖及表达 Smad3 mRNA、Smad7 mRNA、I 型胶原、 α -SMA ($P < 0.05$)。羊栖菜多糖可以不同程度抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维细胞的增殖以及 Smad3mRNA、I 型胶原和 α -SMA 的表达,且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$),能促进 TGF- β 1 诱导的肺成纤维细胞表达 Smad7 mRNA,呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。结论 在离体细胞,羊栖菜多糖能抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维细胞增殖、分化与表达,其机制可能与其下调 Smad3,促进 Smad7 表达从而抑制 TGF- β /Smads 信号通路有关。

关键词 羊栖菜多糖 肺成纤维细胞 TGF- β /Smads 信号通路

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.019

Effects of Sargassum Fusiforme Polysaccharide on Transforming Growth Factor β 1 - induced Rat Lung Fibroblasts. Wu Huayong, Fang Honglong, Luo Jian, et al. Intensive Care Unit of Quzhou People's Hospital, Zhejiang 324000, China

Abstract Objective To investigate the effects of Sargassum fusiforme polysaccharide to the transforming growth factor beta1 (TGF- β 1) - induced rat lung fibroblast cells in vitro, and to evaluate the anti-fibrotic mechanism of SFPS. **Methods** Cultured rat lung fibroblast cells were divided into a control group, a TGF- β 1 - treated group and TGF β 1 (5ng/ml) plus different dosage SFPS - treated groups (TGF- β 1 5ng/ml + SFPS 25 μ g/ml group; TGF- β 1 5ng/ml + SFPS 50 μ g/ml group; TGF- β 1 5ng/ml + SFPS 100 μ g/ml group). Cell proliferation was assessed by MTT colorimetric assay. The levels of collagen type I mRNA and protein was measured by RT-PCR and ELISA. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of α -smooth muscle actin mRNA and protein. RT-PCR were used to detect the expression of Smad3, Smad7mRNA. **Results** TGF- β 1 induced proliferation and the expressions of Smad3, Smad7mRNA, collagen type I, α -smooth muscle actin of lung fibroblasts ($P < 0.05$). SFPS prevented TGF- β 1 - induced proliferation and the expressions of Smad3mRNA, collagen type I, α -smooth muscle actin of lung fibroblasts, this prevention effect was dose-dependent ($P < 0.05$). SFPS increased TGF- β 1 - induced expressions of Smad7 mRNA this effect was also dose-dependent ($P < 0.05$). **Conclusion** In vitro cell, SFPS can inhibit TGF- β 1 - induced lung fibroblast proliferation, differentiation and expression. The mechanism may be related to reduced Smad3, promoted Smad7 thereby inhibiting TGF- β /Smads signaling pathway.

Key words Sargassum fusiforme polysaccharide; Lung fibroblasts; TGF- β /Smads signaling

转生长因子- β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 是肺纤维化发病中关键的炎症因子,其功能的发挥依赖于 Smads 蛋白的信号转导及调控^[1]。TGF- β /Smads 信号通路激活使肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化进而导致肺纤维化的发生,如何有效抑制 TGF- β /Smads 信号通路成为治疗肺纤维化的

关键^[2]。

中药海藻羊栖菜属于褐藻门马尾藻科植物,其提取物成份复杂,但主要成分为羊栖菜多糖 (sargassum fusiforme polysaccharide, SFPS)。SFPS 是一种水溶性多糖,具有许多药理活性特点^[3]。已有研究表明 SFPS 对肾间质纤维化及肝纤维化具有拮抗作用^[4,5]。关于 SFPS 对肺纤维化的影响尚未见报道,本研究旨在研究 SFPS 是否具有抗肺纤维化的作用,并探讨其作用机制。

材料与方法

1. 材料:大鼠肺成纤维细胞株(上海中华细胞

基金项目:浙江省卫生厅基金资助项目(2014KYB302)

作者单位:324000 衢州市人民医院重症医学科

通讯作者:张伟文,主任医师,电子信箱:ZWW5641@126.com

库),羊栖菜多糖(温州医科大学),DMEM(高糖型)培养液和胎牛血清(美国 Gibco 公司),重组人 TGF- β 1(美国 PeproTech 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,北京索来宝生物公司),大鼠 I 型胶原 ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司),小鼠抗大鼠 α -肌动蛋白单克隆抗体及 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司),山羊抗小鼠二抗(武汉博士得生物工程有限公司),引物合成(上海生工生物工程有限公司)。

2. 方法:(1)肺成纤维细胞的培养与传代:用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 孵箱培养,隔天换液,待细胞生长至 80% ~ 90% 密度时,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,按 1:3 比例传代。(2)实验分组:A 组:空白对照组;B 组:TGF- β 1 5ng/ml 组;C 组:TGF- β 1 5ng/ml + SFPS 25 μ g/ml 组;D 组:TGF- β 1 5ng/ml + SFPS 50 μ g/ml 组;E 组:TGF- β 1 5ng/ml + SFPS 100 μ g/ml 组。加药处理 48h 后检测相关指标。(3)MTT 法检测成纤维细胞增殖:取对数生长期细胞,按 1 $\times$ 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板,每组 4 个复孔,培养 24h 后,用无血清培养基同步化处理 24h,按分组加药处理 48h 后每孔加入 10 μ l MTT(5mg/ml),再培养 4h,小心吸除上清液,加 100 μ l DMSO/孔,振荡 10min 溶解结晶物,酶标仪 570nm 波长测各组吸光度(A)值。(4)RT-PCR 法检测 Smad3、Smad7、I 型胶原和 α -SMA mRNA 的表达:按 2 $\times$ 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,培养 24h 后,用无血清培养基同步化处理 24h,按分组加药处理 48h 后收集各组细胞,用 Trizol 和 RT-PCR 试剂盒分别提取总 RNA 和合成 cDNA。Smad3 及 I 型胶原基因 PCR 反应条件:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环后再 72℃ 延伸 10min。Smad7、 α -SMA 及 GAPDH 基因 PCR 反应条件:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 30s,57℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环后再 72℃ 延伸 10min。所有 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳后,用凝胶成像系统拍照,用图像分析软件 BioSens SC810 测定灰度值,以与内参 GAPDH mRNA 的比值作为目的基因 mRNA 的相对含量,引物序列见表 1。(5)ELISA 法检测 I 型胶原蛋白的表达:收集做 MTT 时药物处理后的上清液。按 I 型胶原 ELISA 试剂盒操作说明书操作。酶标仪 450nm 波长处测吸光度(A)值,绘出标准曲线,根据样品(A)值在曲线图上查出相应 I 型胶原含量。(6)Western blot 法检测 α -SMA(43kDa)的表达:加入各组蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离

后转移至 PVDF 膜,封闭 1h 后,加入 α -肌动蛋白单克隆抗体抗体(1:400)和内参照 GAPDH 抗体(1:500),一抗过夜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3000)作用 1h,电化学发光法检测,在暗室中 X 线片曝光并冲洗显影,用 BioSens SC810 软件测定各条带的灰度值,经内参照 β -actin 校正后得到蛋白的相对表达量。

3. 统计学方法:数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 做 One-way ANOVA 分析,两两比较用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列表

基因		序列(5'→3')
Smad3	上游	CCGAGTGCCTAAGTGAT
	下游	CTGCCTCCGGTATTCT
Smad7	上游	ACGGGAAGCAAGAGTCAGC
	下游	GAGCCAAGAACAGTGTCTCAGAGTA
I 型胶原	上游	TGGCGTCCGTGGTCTGA
	下游	CACCAGGGAACAGTAGCA
α -SMA	上游	CCGTGACATCAAGGAGAA
	下游	AAGCATTTGCGGTGGA
GAPDH	上游	CCAGCCTCGTCTCATAGA
	下游	TGTGCCGTTGAACCTGTC

结 果

1. MTT 法检测肺成纤维细胞增殖:各组 A 值均数分别为 A:0.81 $\pm$ 0.03, B: 1.49 $\pm$ 0.04, C: 1.29 $\pm$ 0.03, D: 1.19 $\pm$ 0.04, E:0.98 $\pm$ 0.04,组间比较,差异有统计学意义($F = 215.13, P < 0.01$)。LSD 法检验可以发现 TGF- β 1 对成纤维细胞的增殖有明显的促进作用($P < 0.01$),而 SFPS 对 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞的增殖具有明显的抑制作用,且随着剂量的增加细胞增殖下降,呈剂量依赖性($P < 0.01$)。

2. RT-PCR 法检测 Smad3、Smad7 mRNA 的表达 Smad3 基因组间比较,差异有统计学意义($F = 222.31, P < 0.01$)。LSD 法检验可以发现 TGF- β 1 能明显促进成纤维细胞表达 Smad3 mRNA ($P < 0.05$),不同剂量 SFPS 作用后,TGF- β 1 诱导的 Smad3 mRNA 表达受到抑制并呈剂量依赖性($P < 0.05$)。Smad7 基因组间比较,差异有统计学意义($F = 222.31, P < 0.01$)。LSD 法检验可以发现 TGF- β 1 能明显促进成纤维细胞表达 Smad7 mRNA ($P < 0.01$),不同剂量 SFPS 作用后,TGF- β 1 诱导的 Smad7 mRNA 表达增加并呈剂量依赖性($P < 0.05$,表 2,图 1、图 2)。

表 2 各组 Smad3、Smad7 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Smad3	Smad7
A 组	$(1.67 \times 10^3) \pm (3.06 \times 10^2)$	$(2.74 \times 10^2) \pm (1.67 \times 10)$
B 组	$(1.93 \times 10^5) \pm (3.80 \times 10^4)^*$	$(5.56 \times 10^3) \pm (2.45 \times 10^2)^*$
C 组	$(1.32 \times 10^5) \pm (1.42 \times 10^4)^{\#}$	$(7.28 \times 10^3) \pm (3.26 \times 10^2)^{\#}$
D 组	$(7.25 \times 10^4) \pm (3.90 \times 10^3)^{\#}$	$(8.74 \times 10^3) \pm (5.14 \times 10^2)^{\#}$
E 组	$(2.66 \times 10^3) \pm (5.25 \times 10^2)^{\#}$	$(1.40 \times 10^4) \pm (5.51 \times 10^2)^{\#}$

A 组:对照组;B 组:TGF-β1 5ng/ml 组;C 组:TGF-β1 5ng/ml + SFPS 25μg/ml 组;D 组:TGF-β1 5ng/ml + SFPS 50μg/ml 组;E 组:TGF-β1 5ng/ml + SFPS 100μg/ml 组(以下同)。与 A 组(对照组)比较,**P*<0.01;与 B 组(TGF-β1 组)比较,[#]*P*<0.01

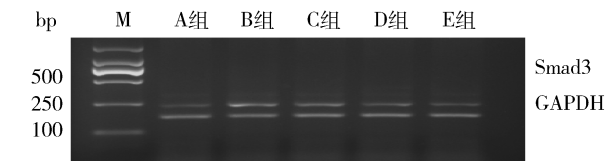


图 1 RT-PCR 检测 Smad3 mRNA 表达

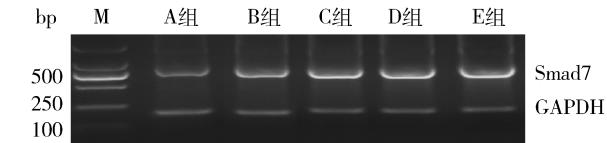


图 2 RT-PCR 检测 Smad7 mRNA 表达

3. RT-PCR 和 ELISA 法检测 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达:I 型胶原 mRNA 组间比较,I 型胶原蛋白组间比较,差异有统计学意义(*F* = 120.14, *P* < 0.01; *F* = 34.30, *P* < 0.01)。LSD 法检验发现TGF-β1 能明显促进成纤维细胞表达 I 型胶原(*P* < 0.01),不同剂量 SFPS 作用后,TGF-β1 诱导的 I 型胶原表达均受到抑制并呈剂量依赖性(*P* < 0.05,表 3,图 3)。

表 3 各组 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	I 型胶原 mRNA	I 型胶原蛋白
A 组	0.54 ± 0.25	140.51 ± 4.56
B 组	1.57 ± 0.61 [*]	207.98 ± 11.49 [*]
C 组	1.14 ± 0.62 [#]	186.32 ± 7.07 [#]
D 组	0.86 ± 0.35 [#]	170.80 ± 6.42 [#]
E 组	0.75 ± 0.35 [#]	155.95 ± 7.53 [#]

与 A 组(对照组)比较,**P*<0.01;与 B 组(TGF-β1 组)比较,[#]*P*<0.01

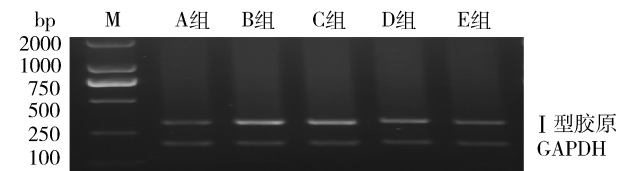


图 3 RT-PCR 检测 I 型胶原 mRNA 表达

4. RT-PCR 和 Western blot 法检测 α-SMA mRNA 及蛋白 α-SMA mRNA 组间比较:α-SMA 组间比较,差异有统计学意义(*F* = 99.29, *P* < 0.01; *F* = 120.14, *P* < 0.01)。LSD 法检验可以看出 TGF-β1 能明显促进 α-SMA 产生(*P* < 0.01),不同剂量 SFPS 作用后,TGF-β1 诱导的 α-SMA 产生受到抑制并呈剂量依赖性(*P* < 0.05,表 4,图 4、图 5)。

表 4 各组 α-SMA mRNA 及蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	α-SMA mRNA	α-SMA
A 组	0.53 ± 0.03	0.04 ± 0.02
B 组	1.04 ± 0.56 [*]	0.60 ± 0.05 [*]
C 组	0.90 ± 0.21 [#]	0.46 ± 0.05 [#]
D 组	0.68 ± 0.21 [#]	0.36 ± 0.04 [#]
E 组	0.60 ± 0.32 [#]	0.14 ± 0.03 [#]

与 A 组(对照组)比较,**P*<0.01;与 B 组(TGF-β1 组)比较,[#]*P*<0.01

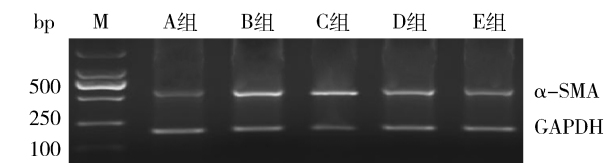


图 4 RT-PCR 检测 α-SMA mRNA 的表达

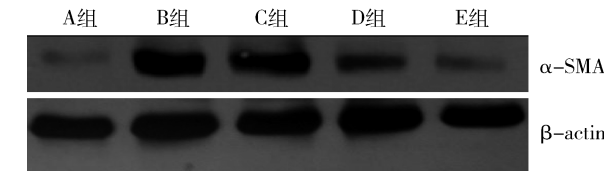


图 5 Western blot 法检测 α-SMA 的表达

讨 论

目前研究认为肺成纤维细胞是各种原因肺纤维化的最后靶细胞,而 TGF-β1 能通过 TGF-β/Smads 信号通路刺激成纤维细胞向肌成纤维细胞转化、增殖及产生胶原等细胞外基质,是肺纤维化发生、发展的关键细胞因子^[2]。寻找能阻断 TGF-β/Smads 信号通路的药物对治疗肺纤维化尤为重要。SFPS 是一种水溶性多糖,具有许多药理活性特点,已有研究表明 SFPS 对肾间质纤维化及肝纤维化具有拮抗作用^[3-5]。关于 SFPS 对肺纤维化的影响尚未见报道,本研究旨在探讨 SFPS 是否具有抗肺纤维化的作用,并探讨其作用机制。

MTT 法检测结果显示 TGF-β1 对成纤维细胞的增殖具有明显的促进作用,而 SFPS 能抑制 TGF-β1

诱导的增殖,且随着剂量的增加对细胞增殖的抑制作用增强。 α -SMA 是成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的生物标志物^[2]。RT-PCR 及 Western blot 法检测发现,TGF- β 1 能明显促进 α -SMA 表达,SFPS 能抑制 TGF- β 1 诱导的 α -SMA 表达,尤以 100ng/ml 组的抑制作用最强,提示 SFPS 能抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,其抑制作用呈剂量依赖性。RT-PCR 及 ELISA 法检测结果显示,SFPS 能抑制 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞表达 I 型胶原,并随着 SFPS 剂量的增加,I 型胶原表达逐渐减少。TGF- β 1 与受体结合后能使 Smad2 和 Smad3 磷酸化,磷酸化的 Smad2、Smad3 与 Smad4 蛋白形成复合物后转移到细胞核发挥生物学效应^[2]。Smad7 是 TGF- β /Smads 信号通道的主要抑制者,能阻止 Smad2、Smad3 的磷酸化,从而对 TGF- β 1 信号转导起着负性调控作用^[6]。

本实验研究结果显示,TGF- β 1 组中 Smad3、7 mRNA 表达均较对照组明显上升。而 SFPS 能明显抑制 TGF- β 1 诱导的 Smad3 mRNA 的表达并促进抑制性 Smad7 mRNA 的表达,其作用具有浓度依赖性。提示下调 Smad3 并促进 Smad7 的表达可能是 SFPS 抑制成纤维细胞转化、增殖和胶原表达的作用靶点

所在。

综上所述,在离体细胞,羊栖菜多糖能抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维细胞增殖、分化与表达,其机制可能与其下调 Smad3,促进 Smad7 表达从而抑制 TGF- β /Smads 信号通路有关。

参考文献

- 1 Tarantal AF, Chen H, Shi TT, *et al*. Overexpression of TGF- β 1 in foetal monkey lung results in prenatal pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2010, 29(4): 186-207
- 2 Roach KM, Wulff H, Feghali-Bostwick C, *et al*. Increased constitutive α SMA and smad2/3 expression in idiopathic pulmonary fibrosis myofibroblasts is K_{ca}3.1-dependent [J]. *Respi Res*, 2014, 15(1): 155-164
- 3 吴利敏,吴金明,黄智铭,等. 羊栖菜多糖对软脂酸诱导的 HL-7702 细胞凋亡的保护作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2011; 29(3): 634-637
- 4 雷作熹,罗仁,李咏梅,等. 羊栖菜对 UUO 大鼠肾间质纤维化的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2006, 22(1): 46-48
- 5 张雪琴,吴金明,黄智铭,等. 羊栖菜多糖对内毒素诱导的大鼠肝星状细胞的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(15): 1333-1337
- 6 Kimura T, Nojiri T, Hino J, *et al*. C-type natriuretic peptide ameliorates pulmonary fibrosis by acting on lung fibroblasts in mice [J]. *Respir Res*, 2016, 17(1): 19-27

(收稿日期:2016-07-07)

(修回日期:2016-07-29)

(上接第 64 页)

- 3 Landsberger M, Zhou J, Wilk S, *et al*. Inhibition of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces leukocyte adhesion within the intestinal microcirculation in experimental endotoxemia in rats [J]. *Crit Care*, 2010, 14(6): R223
- 4 Yoshimoto R, Fujita Y, Kakino A, *et al*. The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25(5): 379-391
- 5 冉小丽,吴芹,石京山,等. 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 在动脉粥样硬化中的作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(5): 865-871
- 6 Inoue K, Arai Y, Kurihara H, *et al*. Overexpression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipo-protein E-null mice [J]. *Circ Res*, 2005, 97(2): 176-184
- 7 White SJ, Sala-Newby GB, Newby AC. Overexpression of scavenger receptor LOX-1 in endothelial cells promotes atherogenesis in the ApoE(-/-) mouse model [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(6): 369-373
- 8 Dorothee G, Alan S, Yu L. Claudins and the modulation of tight junction permeability [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(2): 525-569
- 9 Xu S, Ogura S, Chen J, *et al*. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(16): 2859-2872

- 10 Shi Y, Cosentino F, Camici GG, *et al*. Oxidized low-density lipoprotein activates p66Shc via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, protein kinase C-beta, and c-Jun N-terminal kinase kinase in human endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(9): 2090-2097
- 11 Sakamoto N, Ishibashi T, Sugimoto K, *et al*. Role of LOX-1 in monocyte adhesion-triggered redox, Akt/eNOS and Ca²⁺ signaling pathways in endothelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 220(3): 706-715
- 12 Kowalczyk AP, Green KJ. Structure, function, and regulation of desmosomes [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 116: 95-118
- 13 Resnik N, Sepcic K, Plemenitas A, *et al*. Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 1499-1507
- 14 Amar LS, Shabana al-HM, Oboeuf M, *et al*. Desmosomes are regulated by protein kinase C in primary rat epithelial cells [J]. *Cell Adhes Commun*. 1998, 5(1): 1-12
- 15 Geraldles P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 106: 1319-1331

(收稿日期:2016-08-01)

(修回日期:2016-09-08)