

转染 Smad 7 基因的大鼠肾小球系膜细胞 对 I、III 型胶原表达的改变

于鸿¹ 陈琦¹ 刘晔¹ 赵仲华¹ 郭慕依^{2Δ}

(¹ 江苏省泰州市人民医院病理科 江苏 泰州 225000; ² 复旦大学上海医学院病理学系 上海 200032)

【摘要】目的 探讨 Smad 7 基因对大鼠肾小球系膜细胞(MsC) I、III 型胶原(Col I、Col III)表达的影响,为试图运用 Smad 7 对肾纤维化进行基因治疗提供实验依据。**方法** 经脂质体介导将含有 Smad 7 重组表达质粒转染大鼠 MsC,用 G418 筛选及 Northern blot、Western blot 法鉴定;又分别采用 RT-PCR 和 Western blot 法,检测转染阳性 MsC 克隆 Col I、Col III 表达改变。**结果** 成功建立稳定高表达 Smad 7 的阳性 MsC 克隆(S-22 与 S-26),并证实两阳性 MsC 克隆 Col I 及 Col III mRNA 及蛋白的表达均被明显抑制,其中 S-22 克隆 Col I 及 Col III mRNA 表达分别降低 47% 和 56%,其蛋白表达分别降低 65% 和 54%。**结论** Smad 7 可能通过抑制组织内 Col I 及 Col III 的生成而起到减轻肾纤维化进展的作用。

【关键词】 系膜细胞; Smad 7; I 型胶原; III 型胶原

【中图分类号】 R 692.6 **【文献标识码】** A

Changes of type I, III collagen expression in cultured rat glomerular mesangial cells transfected with Smad 7 cDNA

YU Hong¹, CHEN Qi², LIU Ye², ZHAO Zhong-hua², GUO Mu-yi^{2Δ}

(¹ Department of Pathology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225000, Jiangsu Province, China;

² Department of Pathology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】Objective To investigate the changes of type I, III collagen(Col I, Col III) expression on cultured rat glomerular mesangial cells (MsC) transfected with Smad 7 cDNA in order to provide experimental proofs for blocking renal fibrosis with Smad 7 gene therapy. **Methods** Lipofectin method was used to transfect Smad 7 cDNA into MsC, and transfected cells were selected with G418. Smad 7 mRNA and protein expression was detected by Northern blot and Western blot analysis, respectively. The expression of type I, III collagen on MsC were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis. **Results** Overexpression of Smad 7 on two MsC clones (S-22, S-26) was successfully established. Two MsC clones showed decreased expression of Col I, Col III mRNA and their proteins. The level of Col I, Col III mRNA expression on S-22 clone decreased 47% and 56% respectively. However, the level of their protein expression decreased by 65% and 54%, respectively. **Conclusions** It is suggested that Smad 7 could alleviate the progression of renal fibrosis by down-regulating the expression of Col I and Col III at mRNA and protein level.

【Key words】 mesangial cell; Smad 7 gene; type I collagen; type III collagen

大量研究表明,转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)的作用是介导肾小球硬化发生的共同通路^[1],其不仅能促进肾小球系膜细胞(mesangial cell, MsC)合成细胞外基质(extracellu-

lar matrix, ECM),也能通过诱导基质降解酶抑制因子的表达,加剧 ECM 在肾组织内的积聚^[2]。近年来的实验研究证实, TGF-β 是通过与靶细胞膜上的相关受体(Tβ-R)结合后,磷酸化激活丝/苏氨酸

上海市科委发展基金重点资助项目(01JC14018)

ΔCorresponding author E-mail: myguo@shmu.edu.cn

激酶受体信号转导分子 Smad (果蝇 Mad 和 *C. elegans* Sma 基因产物的同类物), 如 Smad 2 和 Smad 3, 后与胞质内 Smad 4 形成异聚体转移至核内, 并在核内相关因子的共同作用下, 参与对一些靶基因表达的调节而完成的^[3]。而对于 Smad 家族中的 Smad 7 则认为是 Smad 2、Smad 3 和 Smad 4 三聚体的抑制因子, 其可多环节阻断 TGF- β 信号通路, 具有抗纤维化功能^[4]。因此, 本实验将 Smad 7 cDNA 经脂质体介导转染大鼠 MsC, 观察转基因 MsC 克隆 I、III 型胶原表达的改变, 以进一步阐明 Smad 7 抗组织纤维化的作用机制, 为实施对组织或器官纤维化的基因治疗提供理论依据。

材料和方法

主要试剂 大鼠重组 pcDNA3.0-Smad 7 (日本 Dr. Takeshi Imamura 馈赠), Smad 7 cDNA 探针 (复旦大学上海医学院分子病理实验室保存), Lipofectin 及 G418 (Gibco BRL 公司), 无血清培养液 (Sigma 公司), Smad 7 多克隆抗体、Col I、III 单克隆抗体 (Oncogene 公司)。

重组 Smad 7 真核表达质粒的鉴定与超纯质粒的制备 pcDNA3.0-Smad 7 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 及 *EcoR* I 单酶切鉴定, 送测序 (联合基因公司) 后大量扩增, Qiagen 试剂盒纯化。

细胞培养 实验用 MsC 为其第 8 代, 其制备及鉴定可参阅文献的常规方法^[5], 培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱常规培养, 细胞呈贴壁生长。所有培养试剂均分别购自 Gibco BRL 公司和 Sigma 公司。

Smad 7 基因转染入 MsC 及阳性细胞克隆的筛选 呈融合生长的 MsC 以 1×10^6 个的密度转入 6 孔板内, 到呈现 30%~50% 融合生长时弃完全培养液, 分别加含有 Lipofectin 和 pcDNA3.0-Smad 7 或 Lipofectin 和 pcDNA3.0 混合液的无血清培养液 1 mL, 20 h 后, 弃无血清培养液, 加入含 20% 血清的完全培养液, 72 h 后再改用含 G418 (600 μ g/mL) 的完全培养液。20 d 后克隆形成, 挑取单克隆细胞并将其种入 24 孔板中, 继续扩增培养直至生长融合, 再转入 6 孔板, 最后转入 100 mL 培养瓶中。

对含有 Smad 7 MsC 克隆的鉴定 分别采用 Northern blot 法及 Western blot 法检测 Smad 7 mRNA 及其蛋白表达水平。Northern blot 法简述如下: 阳性克隆细胞生长至亚融合时, 用 Trizol (Gibco BRL 公司) 抽提总 RNA, 取 10 μ g 进行 1% 变性琼脂糖凝胶电泳, 转膜, 紫外交联固定, α -³²P-

dATP (Amersham 公司) 随机引物法标记 Smad 7 cDNA 探针, 按常规方法^[6] 进行 Northern blot 杂交。Western blot 法简述如下: 阳性细胞克隆生长至亚融合时, 弃完全培养液, PBS 洗 2 次, 20 μ L 蛋白依标准方法进行 8% SDS-PAGE 变性电泳, 转移至 PVDF 膜。一抗为山羊抗小鼠 Smad 7 多克隆抗体 (1:200), 二抗为生物素化兔抗山羊 IgG (1:500, ABC 试剂盒, Vector 公司)。

逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法检测 Col I 与 Col III mRNA 阳性细胞克隆生长至亚融合时, 用 Trizol 抽提总 RNA, 等量 cDNA 依照 Advantage cDNA PCR kit (Clontech 公司) 提供的步骤进行 PCR。PCR 引物 (Prime 5 软件合成, Genbank 核对特异性) 如下: 内参照 GAPDH (上游: 5'-ACCA-CAGTCCATGCCATGCCATCAC-3'; 下游: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3', 预计扩增片段长度为 450 bp)。Col I (上游: 5'-AGGGT-CATCGTGGCTTCT-3'; 下游: 5'-CCTTCGCT-TCCATACTCG-3', 预计扩增片段长度为 703 bp)。Col III (上游: 5'-CTCCCAGAACATTACATAC-CA-3'; 下游: 5'-AATGTCATAGGGTGCATA-3', 预计扩增片段长度为 256 bp)。反应条件为 94 °C 预变性 7 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 32 个循环。并分别设空载体转染组和未转染 MsC 组, 与其作对比观察和分析。

Western blot 法检测 Col I 与 Col III 蛋白 阳性细胞克隆生长至亚融合时, 弃完全培养液, PBS 洗 2 次, 取 20 μ L 蛋白按标准方法作 7.5% SDS-PAGE 变性电泳, 转移至 PVDF 膜, 一抗分别为兔抗鼠 Col I、III 多克隆抗体 (1:200, Oncogene 公司), 二抗为生物素化羊抗兔 IgG (1:500, ABC 试剂盒)。并分别设空载体转染组和未转染 MsC 组, 与其作对比观察和分析。

定量和统计分析 用凝胶成像仪进行拍照记录, Kodak Digital Science 1D 扫描分析系统测定条带的积分光密度 (ID), 其中 ID 值等于平均光密度与条带面积之乘积。进行半定量分析, 将各组内参照 (β -actin 或 GAPDH) 的实际 ID 值均设为 100, 样本的实际 ID 值与之相比后得到的数值为样本的相对含量。每一样本的强度之比的结果为 3 次独立电泳实验的平均值。经 SPSS9.0 统计软件对数据进行标准差计算和 *t* 检验。

结 果

转染 Smad 7 cDNA 的 MsC 鉴定 经两端测序

结果显示,与基因库中小鼠 Smad 7 序列完全一致,又经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切及 *EcoR* I 单酶切鉴定,证明 Smad 7 基因已被正确地重组至 pcDNA3.0 载体中。转染的 MsC 经 G418 筛选后,共获得 26 个克隆,经 Northern blot 及 Western blot 检测,其中 S-22 与 S-26 两克隆稳定高表达 Smad 7。Northern blot 结果显示,S-22 克隆 Smad 7 mRNA 的表达比空载体组高约 2.9 倍,而 S-26 克隆的表达水平大致与 S-22 克隆接近(图 1A、C)。Western blot 结果显示,S-22 克隆 Smad 7 蛋白表达比空载体组高约 2.5 倍,而 S-26 克隆的表达水平大致与 S-22 克隆接近,其相对分子质量约为 46 000 蛋白条带(图 1B)。

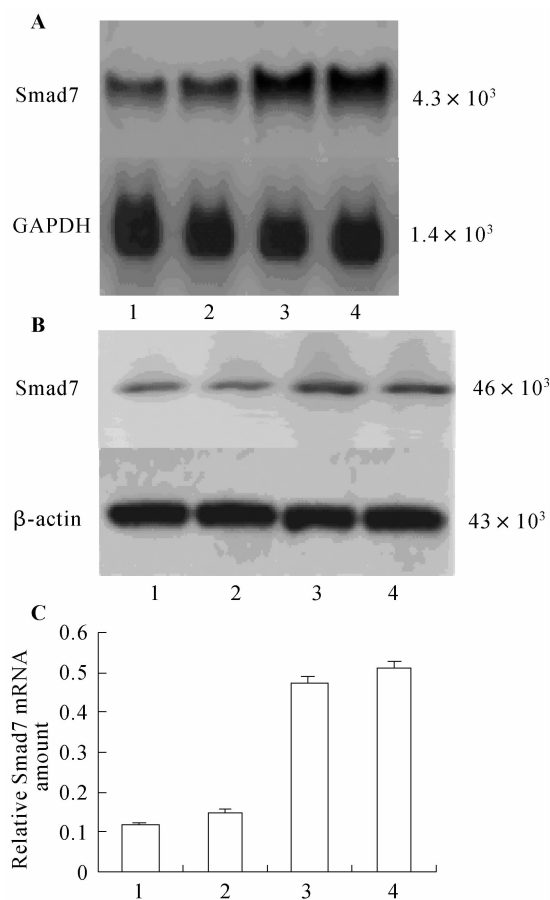


图 1 大鼠转染细胞 Smad 7 的表达

Fig 1 Smad 7 expression on transfected cells in rats

1: MsC; 2: MsC transfected by pcDNA3.0; 3: S-22; 4: S-26

A: Northern blot analysis for detecting Smad 7 mRNA;

B: Western blot analysis for detecting Smad 7 protein;

C: Statistical analysis of relative Smad 7 mRNA amount

阳性 MsC 克隆 Col I mRNA 与蛋白表达的改变 RT-PCR 结果显示, S-22 与 S-26 细胞克隆 Col I mRNA 表达均降低,其中 S-22 克隆比空载体组降低约 47%(图 2A、C)。Western blot 结果显示,上述两细胞克隆 Col I 蛋白表达均降低,其中 S-22

克隆比空载体组降低约 65% ($P < 0.05$),相对分子质量约为 80 000(图 2B、D)。

阳性 MsC 克隆 Col III mRNA 与蛋白表达的改变 RT-PCR 结果显示, S-22 与 S-26 细胞克隆 Col III mRNA 表达均降低,其中 S-22 克隆比空载体组降低约 56%(图 3A、C)。Western blot 结果显示, S-22 与 S-26 细胞克隆 Col III 蛋白表达均降低,其中 S-22 克隆比空载体组降低约 54% ($P < 0.05$),相对分子质量约为 66 000(图 3B、D)。

讨 论

体内外实验研究表明,肾小球固有细胞 MsC 具有合成和分泌 ECM 的功能,在肾小球硬化发生中起重要作用^[7]。大量研究证实,人类各种肾小球疾病其病变进展的共同结局是肾小球硬化,其重要的病理特征是肾小球内 ECM 的积聚,而 TGF- β 则是促进这一过程的一个重要细胞因子^[8]。

近年来,研究人员通过上调 Smad 7 表达,以阻断 TGF- β 信号转导通路,从而达到拮抗肾间质纤维化的实验性研究,已成为肾病研究领域的一个热点。1999 年 Nakao 等将重组含有腺病毒载体的小鼠 Smad 7 cDNA 导入由博来霉素所诱导的肺纤维化小鼠模型体内,发现肺组织内 I 型胶原 mRNA、羟脯氨酸含量降低,且其组织病变程度的减轻,并推断其作用机制可能与阻断细胞内 Smad 2 的磷酸化过程有关^[9]。Lan 等通过构建超声微泡介导系统,用强力霉素上调 Smad 7 基因表达,来治疗大鼠梗阻性肾纤维化模型也获得成功,研究发现 Col I、Col III mRNA 与蛋白表达下降约 60%~70%,提示可调控性 Smad 7 基因治疗可能为治疗肾间质纤维化提供一种全新、安全的方法^[10]。由此可见,Smad 7 在抗器官纤维化/硬化的治疗中具有潜在的应用价值。为此,我们应用脂质体将重组的大鼠 Smad 7 基因导入大鼠 MsC 中,经 G418 筛选,挑取了 26 个单克隆进行扩增培养后,分别采用 Northern blot 及 Western blot 检测 Smad 7 mRNA 及蛋白的表达。经研究发现,在大鼠 MsC 中有不同程度的 Smad 7 mRNA 及其蛋白的表达;与空载体组比较,其中有两 MsC 克隆 Smad 7 mRNA 及蛋白表达呈稳定性增高。在我们先前的研究中,已证实其阳性细胞克隆基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、尿激酶型纤溶原激活物(uPA)活性增强,而基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)和纤溶原激活物抑制因子 1(PAI-1)的表达被抑制,提示其可影响基质降解酶系统的活性而介导 MsC ECM 代谢过程^[11,12]。本

实验则进一步观察其对 I、III 型胶原表达的影响,结果同样发现,经转染 Smad7 基因的 MsC Col I 及 Col III mRNA 与蛋白表达均显著降低,从而表明

Smad 7 也直接参与,并干扰 MsC I、III 型胶原的合成代谢过程,从而为其实验性治疗肾组织纤维化模型提供了重要依据。

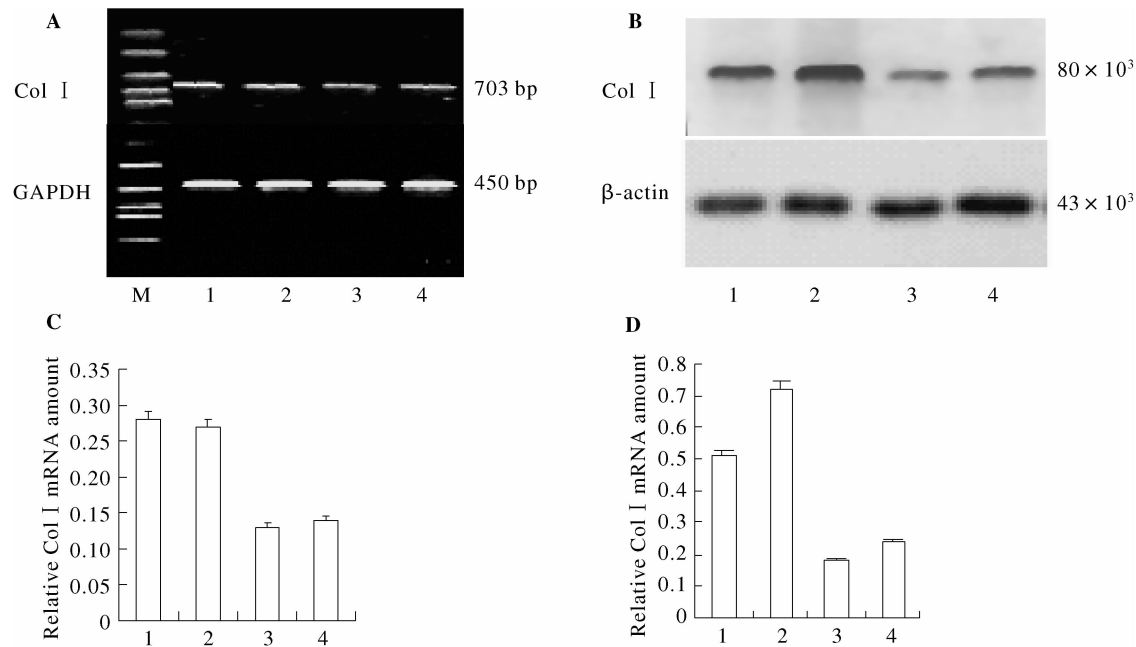


图 2 大鼠转染细胞 Col I 的表达

Fig 2 Col I expression on transfected cells in rats

M;DL-2000 marker; 1;MsC; 2;MsC transfected by pcDNA3.0; 3;S-22; 4;S-26

A:RT-PCR analysis for detecting Col I mRNA; B: Western blot analysis for detecting Col I protein;

C:Statistical analysis of relative Col I mRNA amount; D:Statistical analysis of relative Col I protein amount

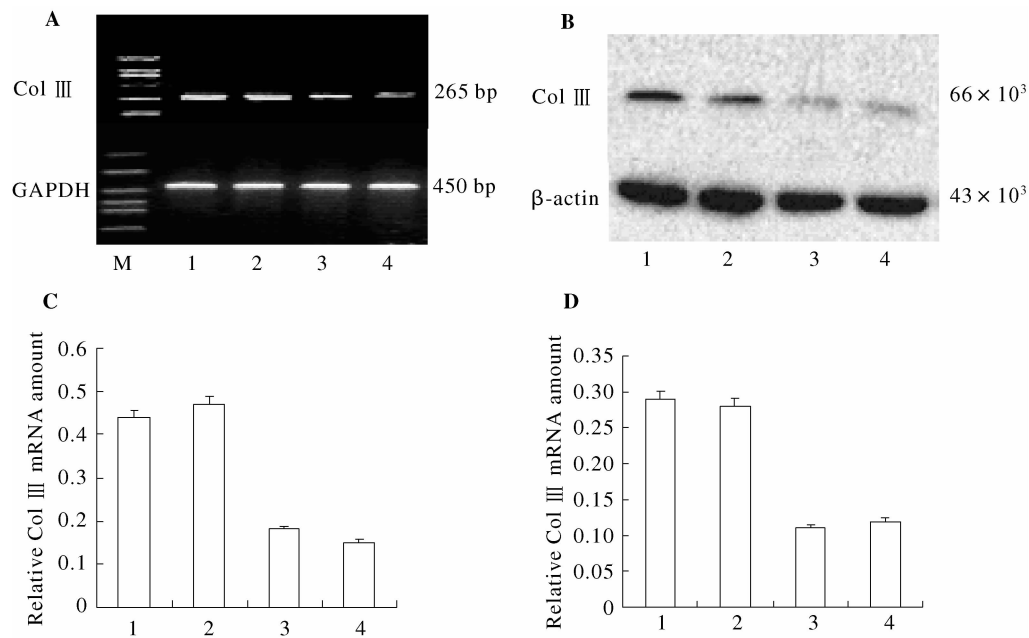


图 3 大鼠转染细胞 Col III 的表达

Fig 3 Col III expression on transfected cells in rats

M;DL-2000 marker; 1;MsC; 2;MsC transfected by pcDNA; 3.0;3;S-22; 4;S-26. A:RT-PCR analysis for

detecting Col III mRNA; B:Western blot analysis for detecting Col III protein; C:Statistical analysis

of relative Col III mRNA amount; D:Statistical analysis of relative Col III protein amount

经越来越多的研究表明,Smad 7 拮抗 TGF- β /Smad 信号转导系统,介导肾小球 ECM 沉积的机制是十分复杂的。有研究表明,除 Smad 7 可阻断 Smad 2 和 Smad 3 与 I 型 T β -R 的结合及其磷酸化之外,还可能通过直接与活化的 T β -R 结合,而减少细胞膜上的 T β -R 的数量^[11],与细胞内各转录因子组氨酸去乙酰基酶结合,影响转录因子的乙酰化而抑制 TGF- β 的信号通路^[12,13]。表明从分子水平上阐明 Smad 7 抑制 MsC ECM 合成和沉积的机制,还为期较远,只有今后作深入研究才能将其逐步澄清。

参 考 文 献

- [1] Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A, *et al.* Down-regulation of Smad 7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice [J]. *PNAS*, 2004,101(23):8 687 - 8 692.
- [2] Wang S, Hirschberg R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor β in mesangial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004,279(22):23 200 - 23 206.
- [3] Kleiter I, Pedre X, Mueller AM, *et al.* Inhibition of Smad 7, a negative regulator of TGF-beta signaling, suppresses autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 187 (1-2):61 - 73.
- [4] Saika S, Yamanaka O, Nishikawa-Ishida I, *et al.* Effect of Smad 7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model [J]. *Arch Ophthalmol*, 2007, 125 (5):647 - 654.
- [5] 张明,郭慕依,陈琦,等. 大鼠肾小球系膜细胞培养 [J]. 上海医科大学学报,1995,22(3):207 - 209.
- [6] 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]//萨姆布鲁克. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2版. 北京:科学出版社,1995:1 - 55.
- [7] Okado T, Terada Y, Tanaka H, *et al.* Smad 7 mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 2002,62(4):1 178 - 1 186.
- [8] Poncelet AC, de Caestecker MP, Schnaper HW. The transforming growth factor- β /SMAD signaling pathway is present and functional in human mesangial cell [J]. *Kidney Int*, 1999,56:1 354 - 1 365.
- [9] Nakao A, Fujii M, Matsumura R, *et al.* Transient gene transfer and expression of Smad 7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 1999,104:5 - 11.
- [10] Lan HY, Mu W, Tomita N, *et al.* Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003,14(6):1 535 - 1 548.
- [11] 于鸿,王小刚,汪怡,等. 转染 Smad 7 基因的大鼠系膜细胞基质金属蛋白酶 2 及其组织抑制因子 2 表达的改变 [J]. 中华病理学杂志,2003,32(6):544 - 547.
- [12] 于鸿,王小刚,汪怡,等. 转染 Smad 7 基因的大鼠系膜细胞 uPA 及 PAI-1 表达的改变 [J]. 复旦大学学报:医学版, 2004,31(1):5 - 8.
- [13] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, *et al.* Smad 7 binds to Smurf 2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation [J]. *Mol Cell*, 2000, 6 (6):1 365 - 1 375.
- [14] Zhu HJ, Iaria J, Sizeland AM. Smad 7 differentially regulates transforming growth factor β -mediated signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(45) : 32 258 - 32 264.
- [15] Ka SM, Huang XR, Lan HY, *et al.* Smad 7 gene therapy ameliorates an autoimmune crescentic glomerulonephritis in mice [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007,18(6):1 777 - 1 788.

(收稿日期:2007-09-21;编辑:沈玲)