

贮脂细胞 Smad4 反义基因转移及对细胞外基质合成的抑制作用

徐新保, 冷希圣, 何振平, 梁志清

徐新保, 冷希圣, 北京大学人民医院肝胆外科中心 北京市 100044
何振平, 中国人民解放军第三军医大学西南肝胆外科医院 重庆市 400038
梁志清, 中国人民解放军第三军医大学西南医院妇产科 重庆市 400038
徐新保, 男, 1968-11-06 生, 河南省延津县人, 汉族, 1989 年第三军医大学
本科毕业, 1994 年第三军医大学硕士研究生毕业, 2000 年第三军医大学博
士毕业。现正在北京大学人民医院从事博士后工作。主要从事肝硬化、门静
脉高压症及肝癌的临床和实验研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 39870832
项目负责人: 徐新保, 100044, 北京市西直门南大街 11 号, 北京大学人民医
院肝胆外科中心。x_xb@163.net
电话: 010-68792703
收稿日期: 2003-03-29 接受日期: 2003-04-16

Smad4 antisense gene transfer into Ito cells and suppressed extracellular matrix production

Xin-Bao Xu, Xi-Sheng Leng, Zhen-Ping He, Zhi-Qing Liang

Xin-Bao Xu, Xi-Sheng Leng, Hepatobiliary Surgery Department, People's
Hospital, Peking University, Beijing 100044, China
Zhen-Ping He, Hepatobiliary Surgery Center, Southwestern Hospital,
Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Zhi-Qing Liang, Maternity Department, Southwestern Hospital, Third
Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.
39870832
Correspondence to: Dr. Xin-Bao Xu, Hepatobiliary Surgery Department,
People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China. x_xb@163.net
Received: 2003-03-29 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: To investigate possible role of antisense Smad4 RNA in the regulation of Smad4 and ECM production in Ito cells after blockade of TGF- β 1 signal transmission by antisense Smad4.

METHODS: A rat Smad4 cDNA (2.5 kb) was inserted in reverse orientation into the adenoviral shuttle vector pAdv5SR (+), and so pAdvATSmad4 was obtained. PAdvATSmad4 was transfected, together with pJM17, into 293 cells by a liposome-mediated technique. We acquired the recombinant virus (AdvATSmad4) containing the anti-Smad4 gene by PCR detecting method. AdvATSmad4 was amplified and purified and then introduced into the rat Ito cell line CFSC.

RESULTS: The presence of antisense Smad4 RNA was detected by RT-PCR. The expression of Smad4 and the production of extracellular matrix were markedly decreased in the antisense Smad4 transfected cultured cells by *in situ* hybridization and immunohistochemistry.

CONCLUSION: Antisense RNA of Smad4 can be used successfully to inhibit Ito cell activation, endogenous Smad4

mRNA and extracellular matrix production, and may provide a basis for the development of anti-fibrosis gene therapy.

Xu XB, Leng XS, He ZP, Liang ZQ. Smad4 antisense gene transfer into Ito cells and suppressed extracellular matrix production. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(11):1690-1693

摘要

目的: 探讨通过反义 Smad4 基因转移阻断 TGF- β 1 的信号传导后对贮脂细胞激活和细胞外基质产生的影响。

方法: 将 Smad4 的基因序列反向插入腺病毒表达质粒 pAdv5SR(+), 构建反义 Smad4 的表达质粒 pAdAT Smad4。该表达载体再与重组质粒 pJM17 同源重组, 共转染入 293 细胞, 通过 PCR 法筛选、鉴定, 得到含反义 Smad4 基因的复制缺陷型重组腺病毒 AdAT Smad4。将 AdATSmad4 扩增纯化, 再转入贮脂细胞株 CFSC 内, 应用 RT-PCR 检测反义基因的表达, 用原位杂交和免疫组织化学等方法检测 Smad4 和细胞外基质的产生。

结果: 转基因的 CFSC 细胞内有反义 Smad4 表达, 且其成分分泌 Smad4 和细胞外基质降低。

结论: 反义 Smad4 RNA 可以抑制贮脂细胞的激活和内源性 Smad4 和细胞外基质的产生, 为抗纤维化基因治疗提供理论依据。

徐新保, 冷希圣, 何振平, 梁志清. 贮脂细胞 Smad4 反义基因转移及对细胞外基质合成的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(11):1690-1693
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1690.asp>

0 引言

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 在肝纤维化的发生、发展中起重要作用^[1], 他既能激活 Ito 细胞合成细胞外基质 (ECM), 又能抑制肝细胞的再生^[2, 3]. 同时 Ito 细胞又能表达 TGF- β 1, 通过自分泌和旁分泌作用, 使 TGF- β 1 呈正反馈性增加和 ECM 大量合成, 加速肝纤维化的进程^[4, 5], 但 TGF- β 1 的信号传导需要 Smad 蛋白分子参与 (Smad2、Smad3 和 Smad4), 其中 Smad4 是最关键和必不可少的蛋白分子^[6, 7]. 为了阻断 TGF- β 1 的信号传导我们构建了反义 Smad4 基因的表达载体, 并导入 Ito 细胞系 CFSC 内, 观察了其抑制 Smad4 表达及细胞外基质合成的效应, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 克隆于重组腺病毒载体的多克隆位点的含有鼠反义 Smad4 cDNA 质粒载体 pAdvATSmad4 由本室构建. 腺病毒包装细胞 293 细胞为第三军医大学西南医院烧伤研究所王明海博士惠赠, 肝纤维化大鼠的贮脂细胞系(SFSC)由美国 Albert Einstein College of Medicine 的 Marcos Rojkind 惠赠^[8]. 脂质体转染试剂盒、地高辛标记 DNA 及检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司. Western blot 化学发光试剂盒、Smad4 抗体、I 型胶原和 IV 型胶原抗体均购自 Santa Cruz 生物技术公司.

1.2 方法 用脂质体介导反义 Smad4 重组腺病毒载体(pAdvATSmad4)和相应的空载体 pAdv5SR(+), 分别与 pJM17 同源重组, 共转染入 293 细胞. PCR 法筛选阳性克隆, 获得重组腺病毒 AdvATSmad4, 内含反义 Smad4 cDNA, 同时获得空病毒 Adv0. 用 293 细胞扩增 AdvATSmad4 和 Adv0, 采用反复冻融法纯化腺病毒. 用 293 细胞的细胞病变效率检测病毒滴度. 贮脂细胞分设正常组(CFSC)、空病毒转染组(CFSC/Adv0)、反义 Smad4 腺病毒转染组(CFSC/AdvATSmad4), 正常组以培养液处理, 后两组分别感染 50 MOI 的 Adv0 和 AdvATSmad4, 病毒感染 24 h 后换液, 继续培养 24 h 后, 收集细胞检测指标. 细胞 RNA 的提取按试剂盒说明书进行, PCR 引物设计, Smad4 cDNA 上游引物 P1; 5' -TGG ACA TTA CTG GCC GGT TCA CAA-3'; 下游引物 P2; 5' -CTC AAT CCA GCA CGG GGT TTC TTT-3'. 可扩出 685bp 的 Smad4 cDNA 条带. (3) RT-PCR 检测反义 Smad4 表达; 反转录 PCR (RT-PCR)按试剂盒说明书操作, 此时仅加 P2 引物, 其产物再行 PCR 扩增(同时加 P1、P2), 条件如下(PE 公司) 9600 型 PCR 仪; 94 °C 5 min → 加 Taq 酶 → 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环 → 72 °C 延伸 10 min → 4 °C 保存. 采用地高辛标记的 Smad4 cDNA (1.2 kb) 探针进行原位杂交, 检测 CFSC, CFSC/Adv0, CFSC/AdvATSmad4 等各组细胞的 Smad4 基因表达. 采用 Western Blot (化学发光法)检测上述三组细胞的 Smad4 蛋白. 参照说明书进行. RT-PCR 检测 TGF-β1 的 mRNA 表达. 引物设计, TGF-β1 cDNA 上游引物 P1; 5' -GGG ACT ATC CAC CTG CAA GA-3'; 下游引物 P2; 5' -GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3'; 能扩出 939 bp 和 648 bp 的 cDNA 条带. 看家基因 β-actin 上游引物 P3; 5' -TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG-3'; 下游引物 P4; 5' -GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3'; 能扩出 768 bp 的 cDNA 条带. 免疫组化检测 I、IV 型胶原的变化.

2 结果

经测定 AdvATSmad4 和 Adv0 的滴度均为 5.0×10^{10} nfu/L. CFSC/AdvATSmad4 细胞 RNA 的 RT-PCR 可扩出 685 bp 的反义 Smad4 条带, 而 CFSC、CFSC/Adv0 则未扩出该片段(图 1). 原位杂交示 CFSC/AdvATSmad4 的 Smad4

mRNA 表达明显弱于 CFSC, 而 CFSC/Adv0 与 CFSC 相比无明显差别(图 2-4). Western blot 显示了类似的结果(图 5). RT-PCR 示 CFSC、CFSC/AdvATSmad4 均能扩出 939 bp 和 648 bp 的 TGF-β1 条带, 且强弱变化不明显, β-actin 扩出 768 bp 条带(图 6). 免疫组化显示 CFSC/AdvATSmad4 的 I 型胶原蛋白的阳性程度明显低于 CFSC,(图 7, 8). IV 型胶原蛋白的免疫组化结果类似于 I 型胶原.

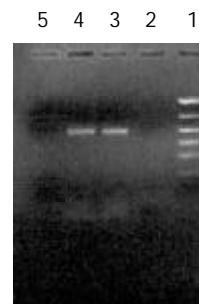


图 1 RT-PCR 鉴定各组 CFSC 的反义 Smad4 基因表达. 1: PCR Markers; 2: CFSC; 3, 4: CFSC/AdvATSmad4; 5: CFSC/Adv0.

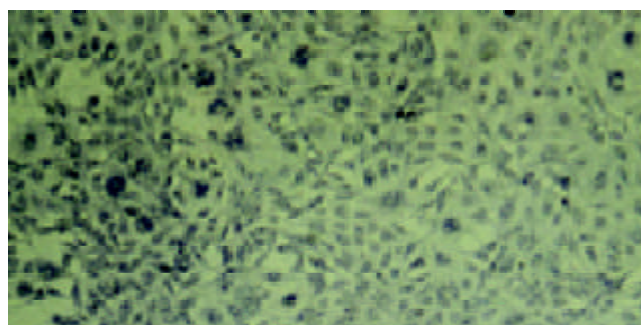


图 2 CFSC 的 Smad4 原位杂交 ISH × 40

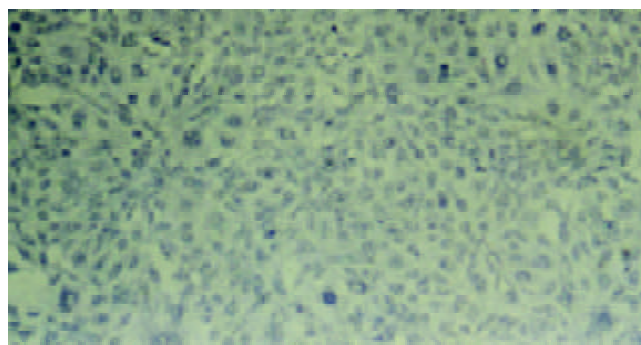


图 3 CFSC/ Adv0 的 Smad4 原位杂交 ISH × 40

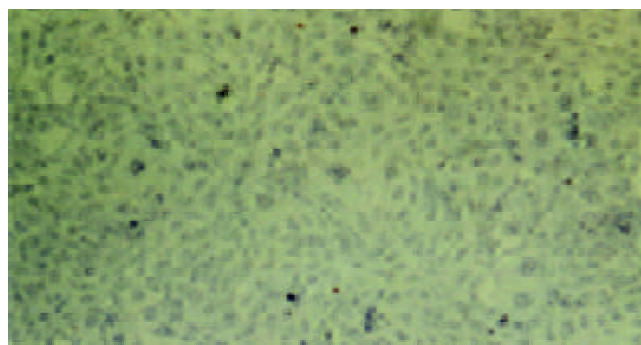


图 4 CFSC/ AdvATSmad4 的 Smad4 原位杂交示阳性程度减弱 ISH × 40.

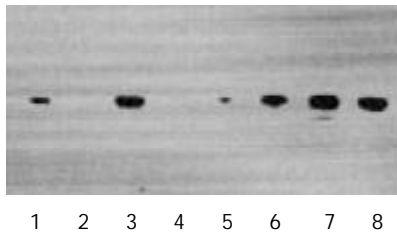


图5 Western Blot检测各组CFSC的Smad4蛋白。1, 2, 4, 5, 6: CFSC/AdvATSmad; 3, 8: CFSC/ Adv0; 7: CFSC.

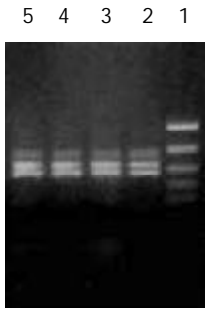


图6 RT-PCR检测各组CFSC的TGF-β₁ mRNA。1: PCR Markers; 2, 4: CFSC; 3, 5: CFSC/AdvATSmad₄.

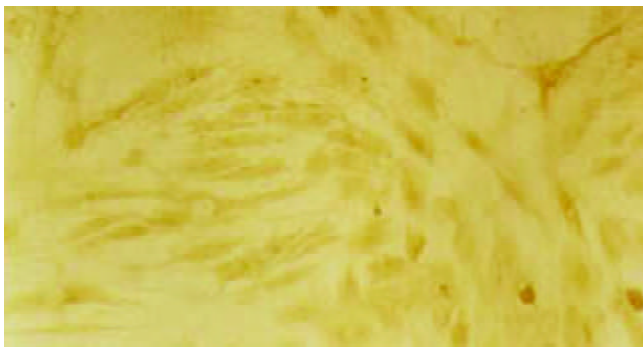


图7 CFSC细胞I型胶原免疫组化染色, 示强阳性 SP × 100.



图8 CFSC/ AdvATSmad₄细胞的I型胶原免疫组化染色, 示阳性程度降低 SP × 100.

3 讨论

肝纤维化为细胞外基质(ECM)过度沉积所致, 其发生与肝脏中ECM的合成增多及降解减少有关^[9]. 研究表明, 肝脏中的ECM主要由肝间质细胞之一的肝星状细胞(HSC)产生^[10]. 肝星状细胞(HSC)的激活与转化是肝纤维化形成的中心环节, 在肝纤维化的发生、发展中发挥了重要作用^[10, 11]. 一些细胞因子、生长因子通过调控肝星状细胞ECM的合成与分泌在肝纤维化形成中起作

用, 其中TGF-β₁是最重要的促进肝纤维化的生长因子^[9, 12].

贮脂细胞系CFSC (Fat-storing cell lines from CCl₄-cirrhotic liver) 1991年建系^[8]. 该细胞株是从肝硬化大鼠(CCl₄腹腔注射5 wk)的肝脏中分离培养而得到的连续细胞系. 在mRNA水平和蛋白水平, 该细胞系表达I、III、IV型胶原, 纤维连接蛋白, TGF-β, 白介素-6, 白介素-8和TNF-α^[13-15]以及NF-kappaB^[16]. 经我们检测, 该细胞也表达Smad₄的mRNA及蛋白, 因而非常适宜于本实验. 腺病毒具有产生的滴度高、感染效率高(既能感染静止期细胞, 又能感染分裂期细胞)、不整合入染色体基因组、不易引起插入突变等优点^[17], 已经被广泛应用于肝纤维化的实验治疗研究并且获得了比较理想的效果^[18-22], 因此, 本研究采用了腺病毒作为载体.

在哺乳动物组织中存在三种形式的TGF-β, 分别是TGF-β₁、TGF-β₂、TGF-β₃. 他们位于不同的染色体上, 由不同的细胞分泌和表达. 其中, TGF-β₁所占比例最高(大于90%), 活性最强^[23]. TGF-β₁有三种受体, 被分别命名为I型、II型和III型受体, 他们存在于所有的细胞中, I型、II型受体是跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶^[24]; III型受体无信号转导结构但可递呈TGF-β₁给其他受体, I型受体介导TGF-β₁的细胞外基质的合成和降解作用, II型受体介导TGF-β₁的细胞生长和分化作用^[5].

TGF-β₁的激活分四个步骤: (1) TGF-β₁首先与辅助性的TGF-β III型受体(TβR-III)结合; (2) 随后, TGF-β₁与TGF-β II型受体(TβR-II)结合, 并与TGF-β I型受体(TβR-I)结合形成异源复合物, 包括两个TβR-IIs和两个TβR-Is; (3) 活化的TβR-II激酶磷酸化TβR-I; (4) TβR-I通过特定的Smads分子传导TGF-β₁的信号^[25]. Smads是近几年发现的一类TGF-β的下游细胞内信号传导蛋白, 包括8个成员, 即Smad1-8. 他们可被合为三类: (1) 受体激活Smads (receptor-activated smads, R-smads). (2) 共同伴侣Smads (common-partner smads, co-smads). (3) 抑制性Smads (inhibitory smads, anti-smads). R-Smads包括Smad1、2、3、5和8. 其中, Smad1、5、8传导BMP的信号, 而Smad2、3传导TGF-β^[10, 11, 26]和激活素(activin)的信号^[27]. Co-Smads是Smad₄, 他是R-Smads传导信号的伴侣^[28]. R-Smads传导信号必须先与Smad₄结合形成异源复合物, 才能进到核中, 调节转录活动. Anti-smads包括Smad₆和Smad₇, 他们抑制R-Smads传导信号. 由此可见, 在TGF-β的信号传导中, Smad₄起着关键性的作用^[28, 29].

因为TGF-β₁在肝纤维化中起重要作用^[1-5, 29], 因此, 抑制TGF-β₁的活性, 可以阻止肝纤维化的进程^[30-32]. 也有报道通过抑制TGF-β I型^[32]和II型受体活性的方法来消弱TGF-β的信号传导通路, 从而显著减轻了二乙基亚硝胺所诱导的大鼠肝纤维化程度.

因此, 通过反义 Smad4 封闭贮脂细胞内源性 Smad4 的产生, 削弱 TGF- β_1 的信号传导, 能够达到抑制 TGF- β_1 活性的目的. 我们采用反义技术, 将 Smad4 基因反向构建于腺病毒载体, 用脂质体介导, 与 PJM17 共转染包装细胞 293 细胞, 获得重组腺病毒 AdvATSmad4, 将其感染贮脂细胞 CFSC, 使其在基因转录、翻译水平阻止 CFSC 的 Smad4 表达. 通过 RT-PCR 发现反义 Smad4 已在 CFSC/AdvATSmad4 中表达, 而转染空病毒的 CFSC/Adv0 和未转基因 CFSC 中无反义 Smad4 表达. 原位杂交发现: CFSC/AdvATSmad4 的 Smad4 的 RNA 表达明显低于 CFSC/Adv0 和 CFSC, 表明反义 Smad4RNA 能使贮脂细胞合成分泌 Smad4 减少. RT-PCR 显示反义 Smad4 对 CFSC 的 TGF- β_1 表达无明显直接影响. 免疫组化表明反义 Smad4 能减少 CFSC 的 I、IV 型胶原合成. 因此, 我们认为反义 Smad4RNA 不仅可以阻止贮脂细胞内源性 Smad4 的合成, 还能阻止或减少贮脂细胞细胞外基质的合成, 以减缓或阻止肝纤维化的进程, 这种作用主要是通过阻断或削弱 TGF- β_1 的信号传导而实现的.

4 参考文献

- 刘芳, 刘金星. 转化生长因子 β_1 在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- Albanis E, Safadi R, Friedman SL. Treatment of hepatic fibrosis: almost there. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5:48-56
- Lietard J, Loreal O, Theret N, Campion JP, L' Helgoualc' h A, Turlin B, Ramee MP, Yamada Y, Clement B. Laminin isoforms in non-tumoral and tumoral human livers. Expression of α 1, α 2, β 1, β 2 and γ 1 chain mRNA and an α chain homologous to the α 2 chain. *J Hepatol* 1998;28:691-699
- Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat perisinusoidal lipocytes by transforming growth factor derived from myofibroblastlike cells: A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992;89:19-27
- 姜虹, 李定国. TGF- β_1 与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11:326-329
- Heldin CH, Miyazonok K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-471
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 24):4359-4369
- Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M. Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl4-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest* 1991;65:644-653
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807
- Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003;124:147-159
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001;502:4-10
- Bissell DM. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp Mol Med* 2001;33:179-190
- Hernandez E, Correa A, Bucio L, Souza V, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC. Pentoxifylline diminished acetaldehyde-induced collagen production in hepatic stellate cells by decreasing interleukin-6 expression. *Pharmacol Res* 2002;46:435-443
- Freeman TL, Kharbanda KK, Tuma DJ, Mailliard ME. Inhibition of hepatic stellate cell collagen synthesis by N-(methylamino) isobutyric acid. *Biochem Pharmacol* 2002;63:697-706
- Gutierrez-Ruiz MC, Bucio L, Correa A, Souza V, Hernandez E, Gomez-Quiroz LE, Kershenobich D. Metadoxine prevents damage produced by ethanol and acetaldehyde in hepatocyte and hepatic stellate cells in culture. *Pharmacol Res* 2001;44:431-436
- Vasilio V, Lee J, Pappa A, Petersen DR. Involvement of p65 in the regulation of NF-kappaB in rat hepatic stellate cells during cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:546-550
- Zhang L, Graziano K, Pham T, Logsdon CD, Simeone DM. Adenovirus-mediated gene transfer of dominant-negative Smad4 blocks TGF-beta signaling in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1247-1253
- Song E, Chen J, Wang K, Zhang H, Su F, Wang M, Heemann U. Intrasplenic transplantation of syngenic hepatocytes modified by IFN-gamma gene ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Transpl Int* 2002;15:472-478
- Imuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner DA, Yamaoka Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* 2003;124:445-458
- Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178-191
- Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, Yoshida K, Kazui T, Kato N, Inoue K, Kohara M, Yoshida T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha improves dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther* 2003;10:765-773
- Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000;287:1253-1258
- Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001;34:859-867
- Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R. Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. *Science* 1993;262:900-902
- Persson U, Izumi H, Souchelnytskyi S, Itoh S, Grimsby S, Engstrom U, Heldin CH, Funai K, ten Dijke P. The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members of a critical determinant in specifying smad isoform activation. *FEBS Lett* 1998;434:83-87
- Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001;34:89-100
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta receptor-mediated signalling through smad 2, Smed3 and Smad4. *EMBO J* 1997;16:5353-5362
- Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* 2003;282:90-100
- 李清华, 秦成勇, 劳萍. 转化生长因子 β_1 在人肝纤维化组织中的表达及作用的探讨. 世界华人消化杂志 2003;11:103-105
- Arias M, Lahme B, Van de Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells. *Cell Growth Differ* 2002;13:265-273
- 梁志清, 何振平. 反义核酸对大鼠肝纤维化转化生长因子 β 受体表达的调节作用. 中华实验外科杂志 1999;16:44-45
- Liu X, Zhang Z, Yang L, Chen D, Wang Y. Inhibition of the activation and collagen production of cultured rat hepatic stellate cells by antisense oligonucleotides against transforming growth factor-beta 1 is enhanced by cationic liposome delivery. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2000;31:133-135