

SAHA 对 TGF- β 1 诱导的人胚肺成纤维细胞 胶原蛋白表达的影响

谢 莉,何振华,张秀峰

(南华大学附属第二医院呼吸内科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 探讨辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)对转化生长因子- β 1(TGF- β 1)所诱导的人胚肺成纤维细胞(HEL F)胶原表达的影响。**方法** 体外培养人胚肺成纤维细胞系 HELF,并分为空白对照组、SAHA 组、TGF- β 组以及 SAHA + TGF- β 组。其中空白对照组加入等体积 PBS;SAHA 组加入 5 μ mol/L SAHA;TGF- β 组加入终浓度为 5 ng/mL TGF- β 1 孵育 24 h;SAHA + TGF- β 组在 TGF- β 组基础上分别加入 0.5、2.0、和 5.0 mol/L SAHA,共同孵育 24 h。处理结束后,获取培养上清,比色法测量羟脯氨酸(HYP)的含量,并用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HELF 细胞中 I、III 型前胶原的 mRNA 表达水平。**结果** 对照组脯氨酸表达极低,TGF- β 1 处理后,羟脯氨酸含量达 $12.684 \pm 1.485 \mu\text{g/mL}$ 。当分别用 0.5、2.0、和 5.0 mol/L SAHA 处理后,HYP 含量随着 SAHA 浓度的增加而减少($P < 0.05$);SAHA 孵育 24 h 后,能够明显抑制 TGF- β 1 刺激后的细胞表达 I 型和 III 型前胶原蛋白 mRNA,并且具有明显的剂量依赖性($P < 0.05$)。**结论** SAHA 能减少 TGF- β 1 诱导的 HELF 羟脯氨酸含量及 I、III 型前胶原蛋白表达,这可能是其抗纤维化的重要机制。

关键词: 辛二酰苯胺异羟肟酸; 转化生长因子- β 1; 人胚肺成纤维细胞; 胶原蛋白

中图分类号:R563.9

文献标识码:A

Effect of SAHA on TGF- β -induced Collagen Protein Expression in Human Embryonic Lung Fibroblast Cells

XIE Li, HE Zhenhua, ZHANG Xiufeng

(Respiratory Department of Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital,
University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced collagen protein expression in human embryonic lung fibroblast cells (HEL F). **Methods** HELF cells were cultured in vitro and divided into Control group (group A), SAHA group (group B), TGF- β group (group C) and SAHA groups (group D) according to the different purpose. PBS was used as negative control, and the cells were stimulated with 5 ng/mL of TGF- β for 24h. For group B, 5mol/L SAHA was added. In group C, 5 ng/mL of TGF- β was used. HELF cells in group D were treated with 5 ng/mL of TGF- β followed by SAHA at 0.5mol/L, 2mol/L or 5mol/L for an additional 24h. Concentration of Hydroxyproline was determined by colorimetry, and the mRNA levels of I, III procollagen in HELF cells were detected by RT-PCR. **Results** Hydroxyproline expression was very low in the control group, while the hydroxyproline content reached to $(12.684 \pm 1.485) \mu\text{g/mL}$ after TGF- β 1 treatment. When HELF cells were treated with 0.5 μ M, 2 μ M or 5 μ M SAHA, hydroxyproline content decreased with the increase of concentration of SAHA ($P < 0.05$). After 24h incubation of SAHA, mRNA expression of type I and type III procollagen can be inhibited by stimulation of TGF- β 1 in dose-dependent manner. **Conclusions** SAHA can inhibit TGF- β 1-induced Hydroxyproline production, I

收稿日期:2012-06-13

基金项目:衡阳市科技局课题(2011KJ48).

作者简介:谢莉,硕士,主治医师,研究方向:呼吸系统疾病的诊断与防治,E-mail:sherry502@sina.com. 通讯作者何振华,硕士,教授,研究方向:间质性肺疾病的发病机制与防治,E-mail:hezhenhua0734@163.com.

and type III procollagen expression, and this may be one of the anti-fibrosis mechanisms.

Key words: suberoylanilide hydroxamic acid; transforming growth factor- β 1; human embryonic lung fibroblast cells; collagen protein

肺纤维化是一种肺间质慢性弥漫性肺部炎症性疾病,其发病机制复杂,涉及多种细胞、细胞因子以及细胞外基质等因素间的相互作用^[1]。其中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 主要通过自分泌和旁分泌机制,在肺纤维化的发生、发展的多个环节中发挥重要作用。肺间质纤维化过程中细胞外基质的异常沉积和特征性的成纤维细胞灶存在是其共同特点^[2-3]。本研究通过体外培养人胚肺成纤维细胞 HELF, 用 TGF- β 1 诱导 HELF 向肌成纤维细胞 (myofibroblast, MF) 分化后, 研究不同浓度的辛二酰苯胺异羟肟酸 (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) 对羟脯氨酸 (Hydroxyprotein, HYP) 含量以及胶原 I 和胶原 III 表达的影响, 从而探讨 SAHA 在治疗肺纤维化中的可行性, 为肺纤维化的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SAHA (纯度 > 99%) 为 ALEXIS 公司产品。HELF 细胞购自中科院上海细胞库, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒宝购自生物工程 (大连) 有限公司, HYP 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。MEM 培养基和胎牛血清均为 Invitrogen 产品。其他试剂均为分析纯产品, 主要购自 Amresco 和上海生工生物工程公司。

1.2 细胞培养与分组

HELF 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于 5% CO₂、37℃ 条件下培养。当细胞生长密度达视野的 75% 时, 根据以下分组给予不同的处理: 空白对照组培养细胞中加入等体积 PBS; SAHA 组仅加入 5 μ mol/L SAHA; TGF- β 组加入终浓度为 5 ng/mL TGF- β 1 孵育 24 h; SAHA + TGF- β 组在加入 TGF- β 1 的同时加入 0.5 mol/L (D1)、2.0 mol/L (D2) 和 5.0 mol/L (D3) SAHA, 共孵育 24 h。

1.3 HYP 酸含量测定

按照南京建成生物技术研究所提供的羟脯氨酸检测试剂盒说明进行操作。取 200 μ L 细胞悬液 (设立标准管和空白管), 加入 5 μ L 消化液于 37℃ 水浴

消化 3 h, 随后依次加入试剂 I、II、III 并充分混匀。并按条件进行反应、显色。经冷却后, 3 000 rpm 离心 15 min, 于分光光度计下测定上清吸光度值 (λ = 550 nm, 双蒸水调零)。计算公式: 羟脯氨酸含量 (μ g/mL) = (样品管吸光度 - 空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 空白管吸光度) $\times$ 标准管含量 (5 μ g/mL) / 蛋白含量。

1.4 逆转录 - 聚合酶链反应

用 Trizol 提取处理后的 HELF 细胞总 RNA, 进行鉴定和浓度测定后按试剂盒说明合成 cDNA。其中 I 型前胶原上游引物序列为: 5' -ATC AAG GTC TAC TGC AAC AT-3', 下游引物: 5' -CAG GAT CGG AAC CTT CGC T-3', 产物长度 178 bp。III 型前胶原上游引物: 5' -CTG CCA TCC AGA ACT CAA GAG TGG-3', 下游引物: 5' -GGA TGT GTC AAG TCC TCC TAC C-3', 产物为 447 bp。内参 GAPDH 上游引物: 5' -CCT CCA GAT TGT CAG CAA T-3', 下游引物: 5' -CCA TCC ACA GTC TTC TGA GT-3', 长度 141 bp。在 PCR 仪上进行逆转录, 最后琼脂糖凝胶电泳并定量分析。反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 随后进入 30 个以下循环: 94℃ 40 s, 64℃ 45 s (III 型前胶原为 65℃ 40 s), 72℃ 35 s; 最后一循环 72℃ 延伸 5 min。

1.5 统计学分析

所有实验均设 3 个复孔, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件处理数据, 多实验组之间用方差分析, 两组间差异比较采用 LSD 及 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 SAHA 对 TGF- β 1 诱导 HELF 细胞产生羟脯氨酸的影响

对照组脯氨酸表达极低, TGF- β 1 处理后, 羟脯氨酸含量显著升高 ($P < 0.01$)。同时加入 SAHA 后, 羟脯氨酸含量随着 SAHA 浓度的增加而减少 ($P < 0.05$), SAHA 浓度为 5.0 mol/L 时最为明显 (降低 78.8%) (表 1)。

表 1 SAHA 对 HELF 细胞产生羟脯氨酸的影响 (n=3)

组别	羟脯氨酸 (μg/mL)
空白对照组	1. 807 ±0. 425 ^a
SAHA 组	2. 411 ±0. 141 ^a
TGF-β 组	12. 648 ±1. 485
TGF-β +0. 5 mol/L SAHA 组	8. 371 ±1. 513 ^b
TGF-β +2. 0 mol/L SAHA 组	5. 338 ±1. 251 ^b
TGF-β +5. 0 mol/L SAHA 组	2. 221 ±1. 054 ^b

与 TGF-β 组比较,a;*P* <0. 01;b;*P* <0. 05

2.2 SAHA 对 I 型、Ⅲ型前胶原蛋白 mRNA 表达的影响

SAHA 孵育 24 h 后,TGF-β 组中 HELF 细胞 I 型和Ⅲ型前胶原蛋白 mRNA 的转录最高,空白对照组最低,SAHA + TGF-β 组中浓度为 0. 5 mol/L 时最高,而 5. 0 mol/L 时最低,但均高于空白对照组和 SAHA 组(*P* <0. 05),见图 1 和表 2。

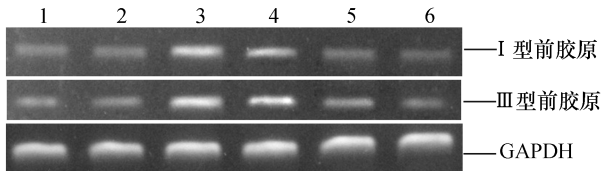


图 1 SAHA 对 HELF 细胞 I 型与Ⅲ型前胶原 mRNA 表达变化的影响 1:空白对照组;2:SAHA 组;3:TGF-β 组;4:TGF-β + 0. 5 mol/L SAHA 组;5:TGF-β + 2. 0 mol/L SAHA 组;6:TGF-β + 5. 0 mol/L SAHA 组

表 2 SAHA 对 HELF 细胞 I 型与Ⅲ型前胶原 mRNA 表达影响的灰度扫描 (n=3)

组别	I 型前胶原	Ⅲ型前胶原
	/GAPDH	/GAPDH
空白对照组	0. 208 ±0. 052 ^a	0. 178 ±0. 023 ^a
SAHA 组	0. 194 ±0. 046 ^a	0. 201 ±0. 077 ^a
TGF-β 组	1. 185 ±0. 097	0. 982 ±0. 054
TGF-β +0. 5 mol/L SAHA 组	0. 653 ±0. 064 ^b	0. 714 ±0. 072 ^b
TGF-β +2. 0 mol/L SAHA 组	0. 482 ±0. 116 ^b	0. 586 ±0. 028 ^b
TGF-β +5. 0 mol/L SAHA 组	0. 353 ±0. 084 ^b	0. 411 ±0. 069 ^b

与 TGF-β 组比较,a;*P* <0. 01;b;*P* <0. 05

3 讨 论

胶原蛋白是细胞外基质中最丰富的结构蛋白,I、Ⅱ、Ⅲ型胶原蛋白则是细胞外基质的主要成分,而 I 型胶原蛋白则是主要的结构蛋白成分。活化的成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、上皮细

胞等在一定条件的刺激下也能产生致纤维化的细胞因子,在肺泡炎阶段或肺纤维化早期主要以Ⅲ型胶原大量生成为主,此期属于可逆期。当其转变为慢性后,则以 I 型胶原沉积为主,此时病理变化属于不可逆改变期^[4-5]。前胶原是成熟胶原的前体,通过检测其含量可以反应组织内胶原的活性。此外,HYP 是结缔组织蛋白质水解所得的一种氨基酸,约占胶原重量的 14%,对胶原蛋白的稳定性起关键作用。胶原是唯一含 HYP 最多的蛋白质,因此,观察组织中 HYP 含量的高低和变化,是反映肺纤维化程度的重要指标^[6]。

SAHA 是一种能抑制组蛋白去乙酰化酶 HDAC 活性的抗肿瘤药物^[7]。最新研究表明,组蛋白去乙酰化酶抑制剂也会抑制成纤维细胞不同类型胶原蛋白的生产成,但其确切作用还存在争议^[8]。在本研究当中,HELF 细胞静息状态下,HYP 表达极低,TGF-β1 处理后,HYP 含量显著增高,I 型和Ⅲ型前胶原蛋白的 mRNA 水平也显著高于对照组。而 SAHA 不但能有效降低 HYP 的含量,也能从 mRNA 水平直接影响到 I、Ⅲ型胶原蛋白的合成。因此从这种意义上讲,SAHA 能在炎症、纤维化早期阶段延缓肺纤维化的进程。

SAHA 抗纤维化的机制尚未明了。生理条件下,肺成纤维细胞产生的细胞外基质受多重调控以维持动态平衡。在此过程中,前列腺素 E2 (PGE2) 及环氧化酶 2 (COX-2) 可能发挥重要作用。肺成纤维细胞-COX-2-PGE2-肺成纤维细胞形成了一个负反馈的自分泌机制,防止肺成纤维细胞的过度激活。而肺纤维化患者体内 COX-2-PGE2-肺成纤维细胞这个负反馈自分泌机制具有不同程度缺陷^[9-10]。而 SAHA 是细胞重新获得 COX-2-PGE2-肺成纤维细胞的平衡反馈机制,从而抑制 MF 的形成以及有效改善胶原蛋白的产生。肺纤维化的发生是一个相当复杂的过程,涉及多种细胞因子、生长因子的调控。各种调节因素之间并非孤立存在^[11-13]。因此,SAHA 对抑制肺成纤维细胞分化过程中的一系列分子事件还有待进一步阐明。

参考文献:

[1] Wang ZL. Advances in understanding of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122 (7): 844-857.
[2] Gharaee-Kermani M, Hu B, Phan SH, et al. Recent ad-

- vances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGFbeta signaling and the myofibroblast [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16 (11) : 1400-1417.
- [3] Uhal BD, Kim JK, Li X, et al. Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(12) :1247-1256.
- [4] Kliment CR, Oury TD. Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(5) :707-717.
- [5] Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2008, 3:8.
- [6] Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, et al. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172 (3) : 583-591.
- [7] Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (16) :4561-4572.
- [8] Rishikof DC, Ricupero DA, Liu H, et al. Phenylbutyrate decreases type I collagen production in human lung fibroblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91(4) :740-748.
- [9] Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, et al. Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(15) :4325-4339.
- [10] Cu A, Ye Q, Sarria R, et al. N-acetylcysteine inhibits TNF-alpha, sTNFR, and TGF-beta1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis in vitro [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2009, 26(2) : 147-154.
- [11] 陈伟, 欧阳劲, 唐双阳, 等. 肺纤维化鼠细胞凋亡及 Fas/Bcl-2 动态变化[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(2) :139-143.
- [12] Homer RJ, Elias JA, Lee CG, et al. Modern concepts on the role of inflammation in pulmonary fibrosis[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135(6) :780-788.
- [13] Spagnolo P, Del GC, Luppi F, et al. Non-steroid agents for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, (9) :CD003134.

(此文编辑:朱雯霞)