DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2018.05.010

·论著:基础医学·

烟草提取液对大鼠 II 型肺泡上皮细胞 TGF-1β/smad2 信号通路表达的影响及机制研究

高小伟,邹新中
(无锡市第三人民医院呼吸内科,江苏 无锡 214000)

摘　要: 香烟烟雾(CS)是导致慢性阻塞性肺疾病(COPD)进展的主要危险因素,目前尚无有效的治疗方法来抑制该病的进展;同时,也有研究表明吸烟能够引起肺纤维化。本实验主要研究烟草提取液对大鼠 II 型肺泡上皮细胞(ATII)的影响及对其转化生长因子-β1/smad2(TGF-1β)信号通路的影响,并探讨其可能的作用机制。大鼠 ATII 经 4%烟草提取物处理后,TUNEL assay 检测到大鼠 ATII 数量减少并存在明显的凋亡小体,同时 Western blot 检测发现,TGF-1β 蛋白表达量明显增多,p- Smad2 蛋白表达量也出现了显著的变化。烟草提取物能够促进 ATII 的凋亡,并且激活 TGF-1β/smad2 信号通路,本研究从 TGF-1β/smad2 信号通路的激活阐释了烟草提取物对 ATII 损伤的可能机制,为以后的研究奠定了一定的基础。

关键词: 烟草提取物; TGF-1β; smad2; 信号通路; 细胞凋亡; II 型肺泡上皮细胞; 机制
中图分类号:R563　　**文献标识码:**A

Effects of cigarette smoke extract on expression of TGF-1β/smad2 signaling pathway in rat type II alveolar epithelial cells and its mechanism

GAO Xiaowei, ZOU Xinzhong
(*Department of Respiratory Medicine, the Third People's Hospital of Wuxi, Wuxi* 214000, *Jiangsu, China*)

Abstract: Cigarette smoke (CS) is a major risk factor for the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), currently there is no effective treatment to prevent the progression of the disease; studies have shown that smoking can cause pulmonary fibrosis. This experiment mainly studied the effect of tobacco extract on rat type II alveolar epithelial cells (ATII) and its effect on TGF-1β / smad2 signaling pathway and explored its possible mechanism. After treated with 4% tobacco extract, ATII of rats were detected by TUNEL assay, the number of ATII was decreased and there was obvious apoptotic bodies, Western blot showed that the expression of TGF- significantly increased, p-Smad2 protein expression also showed a significant change. Tobacco extract can promote the apoptosis of ATII and activate the TGF-1β / smad2 signaling pathway, this study illustrates the possible effect of tobacco extract on ATII injury from the activation of TGF-1β / smad2 signaling pathway mechanism, which laid the foundation for future research.

Key words: cigarette smoke extract; TGF-1β; smad2; signaling pathway; apoptosis; type II alveolar epithelial cells; mechanism

香烟烟雾(Cigarette smoke ,CS)是导致慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的主要危险因素,目前尚无有效的治疗方法来抑制这种疾病的进展,研究发现 CS 中含有大量自由基,这些自由基进入人体后会引发氧化应激反应[1]。也有研究[2]表明吸烟能够引起肺纤维化,在肺纤维化进程中肺泡上皮细胞的损伤、内质网应激、凋亡情况均出现增加[3]。肺泡 II 型上皮细胞细胞(Alveolar type II epithelial cell cells, ATII)既可分化为 I 型也可通过优势分裂产生子代 II 型,当 ATII 凋亡严重时,会影响肺损伤修复。转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-1β)是启动肺成

收稿日期:2018-01-03;**修回日期:**2018-05-15

纤维细胞激活的关键因素,调节其增殖、迁移、转分化,TGF-β1 激活的跨膜受体信号细胞核主要通过 Smad 家族的转录因子[4]。已有报道[5]证明在特发性纤维化中,TGF-1β 会引起肺泡上皮细胞的凋亡,并且有研究[6]发现在 smad2 沉默模型中,阻断了 TGF-1β 对上皮细胞转化的进程。故本研究通过对 ATII 细胞进行烟草提取物(Cigarette smoke Extra, CSE)处理,观察烟草对其影响,并推测该过程受 TGF-1β/smad2 信号通路调节,进而诱导细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 **动物** 选择 6~7 周龄的 SD 大鼠(购自成都达硕生物技术有限公司,scxk(川)2016-030)。

1.2 **主要试剂** 使用 Dispase(BD Biosciences, Bedford, MA, USA),PBS 和低熔点(LMP)琼脂糖(International Biotechnologies Inc., New Haven, CT, USA)进行 ATII 细胞分离;CD45 MicroBeads(Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA),生物素化的抗大鼠上皮细胞粘附分子(Ep-CAM; e-Bioscience, San Diego, CA, USA),用于选择 ATII。链霉亲和素 MicroBeads,抗生物素-PEG 和 FITC 缀合的 CD45 抗体购自 Miltenyi Biotec Inc.(Auburn, CA, USA). DNase I 购买自 Sigma(St.Louis, MO, USA);兔抗鼠 TGF-β1 多克隆抗体(Santa Cruz);兔抗鼠 smad2 多克隆抗体(Santa Cruz);兔抗鼠 GAPDH 多克隆抗体(Santa Cruz);兔抗鼠磷酸化 smad2 单克隆抗体(Cell signaling technology);云烟(云南红塔集团)。

1.3 **主要仪器** 流式细胞仪(德国 Beckman Coulter 公司),紫外分光光度计(Perkin Elmer),Western blot 全能转印系统(bio-rad),低温高速离心机(Hermel),倒置显微镜(蔡司)。

1.4 **方法**

1.4.1 ATII 细胞原代培养[7] 取右下肺部组织,放入含有 1mL 分散酶的离心管内 37℃孵育 6min。将分散液放入 GentleMACS C 管中,加入 5 mL DMEM, 100 U/mL 青霉素 G,100 μg/mL 链霉素,10 μg/mL 庆大霉素,2 mM/L 谷氨酰胺,2.5μg·/mL 两性霉素 B,20mM HEPES(pH7.4)和 120 U/mL DNA 酶 I 匀浆。离心 10 min,弃去上清液。将 ATII 细胞在含有 5%RS 及 20mMHEPES 的 DMEM 中接种 1 天,在含有 20%EHS 的 DMEM 中培养 4 天,并加入 1%CS 剥离的 FBS 以及 10ng /mL KGF。

1.4.2 提取 CSE 取一支去滤嘴的云烟,将其插在进气口上,点燃后使用抽气装置在排气口匀速抽气,使烟雾均匀通过 10 mL 无血清 DMEM 培养基,每支香烟燃烧 15 min,共燃烧 10 支,调节 pH 值至 7.4,使用 0.22 μm 的滤菌网除去杂质及细菌,测定 320 nm 处 OD 值为 1.36±0.12,即为 100%CSE,使用时将其稀释至 4%浓度待用[8]。

1.4.3 CSE 处理细胞 将 4%CSE 溶液用达鼠 ATII 细胞培养 24 h。

1.4.4 TUNEL assay 将 ATII 细胞固定在含有 4%多聚甲醛(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)的 PBS 中,并用 0.2%triton X-100(Sigma Chemicals Inc。)透化,然后在潮湿室中 37℃孵育 1h。用 Superblock Blocking Buffer(Pierce, Rockford, IL, USA)和 3%正常驴血清的 1:1 混合物封闭细胞,并与抗 proSP-C(Abcam, Cambridge, MA, USA, Ab-3786)1h。将抗兔二抗 Alexa-Fluor 594(Invitrogen Corp., Carlsband, CA, USA)加入载玻片中并孵育 30min。用含有 DAPI(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)的 Vectashield 培养基装载细胞,并通过荧光显微镜(Zeiss Axioskop 2, Thornwood, NY, USA)进行分析。每 10 个高倍视野计算荧光素(荧光素-dUTP 标记的 DNA)标记的 TUNEL 阳性细胞凋亡 ATII 细胞的百分比(10~40 倍)。

1.4.5 Western blot 检测蛋白表达水平 从组织中提取蛋白质,使用 BCA 蛋白测定试剂盒(Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc)测定蛋白质浓度,将等量的蛋白质(20 μg/泳道)进行 10~12%SDS-PAGE 胶电泳分离目标蛋白,将分离好的蛋白并转移到聚偏二氟乙烯膜上(EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。然后用 5%的脱脂牛奶封闭膜 2 h,用 PBS 洗涤,并在 4 ℃下与以下一抗一起孵育过夜:TGF-β1 抗体(目录号:sc-130348, 1∶1000 稀释),抗 smad2 抗体(目录号:sc-393312, 1∶1000 稀释)和抗 p- smad2 抗体(目录号 8828s, 1∶1000 稀释)。使用抗 GAPDH 抗体(目录号:sc-32233; 1∶2000 稀释)作为内参对照。随后,将膜与山羊抗兔辣根过氧化物酶缀合的二抗(cat. no. ab6721; 1∶2000 稀释; Abcam)在室温下孵育 2h,并通过增强化学发光系统(Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc.)检测目的蛋白表达情况。蛋白质印迹分析重复至少三次。

1.4.6 RT-PCR 检测目的因子 mRNA 表达水平 使用 RNeasy Mini 试剂盒(Qiagen, Germantown, MD, USA)从 ATII 细胞中分离总 RNA。测定 TGF-β1、smad2 探针购自 Life Technologies。在逆转录之前,使用 Nanodrop 1000 分光光度计评估分离的 RNA 的量和质量,0.5 mg RNA 以使用 qScript cDNA

Supermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA)合成 cDNA,总样品体积为 30mL。RT-PCR 的循环条件如下:25 ℃ 5 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min。使用 C1000 Thermocycler(Bio-Rad, Hercules, CA,USA),将基因表达水平计算为目标因子与参考基因 GAPDH(Life Technologies)的表达比值。使用 ΔΔCt 方法分析数据。

1.5 **统计学分析** 本文数据分析采用 SPSS19.0 统计软件进行,计量资料用均数±标准差表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两差异用 student's *t* 检验进行统计检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 **TUNEL assay 检测细胞凋亡情况** 通过 TUNEL assay 检测发现,相同放大视野(100×)中,对照组细胞生长良好,结构清晰,细胞密度大,其相对凋亡量为(5.96±3.74)%;4%烟草提取物处理组的大鼠 ATII 结构模糊,数量减少,并在其中观察到了明显的凋亡小体,其凋亡量(17.43±7.42)%与对照组相比具有显著差异($P<0.05$),详见图 1。

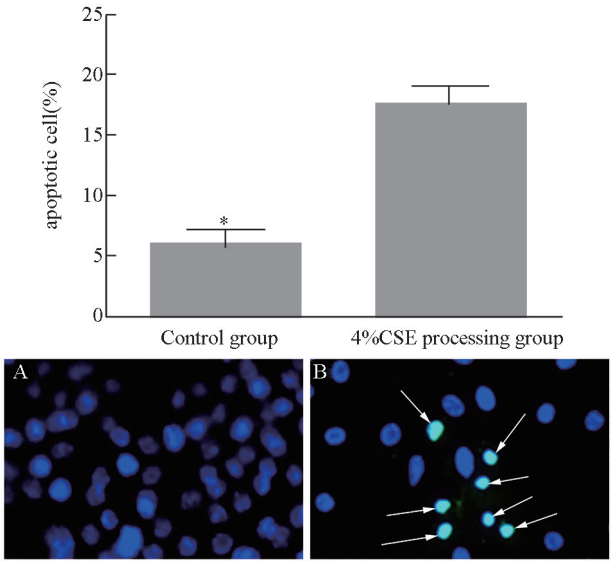

图 1 细胞凋亡情况

a: 凋亡细胞百分数比较; b:荧光显微镜观察细胞凋亡情况(100×) A:Control group;B:4% CSE processing group,白色箭头所指为凋亡小体。与 4% CSE processing group 比较, * $P<0.05$

2.2 **Real-timePCR 检测 TGF-1βmRNA 表达情况** 通过 Real-time PCR 检测发现,与对照组比较,TGF-1βmRNA 的表达量在 4%烟草提取物处理组中其表达量明显增多(0.11±0.049 *vs* 0.15±0.031)(见图 2)($P<0.05$);而 Smad2 的 mRNA 表达量各组未见显著改变(0.12±0.049 *vs* 0.11±0.036)($P>0.05$),详见图 3。

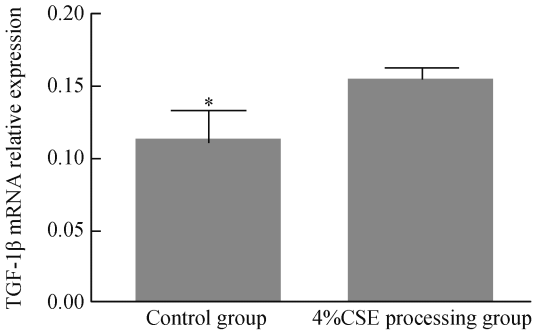

图 2 不同处理组 TGF-1β 表达量

与 4% CSE processing group 比较, * $P<0.05$

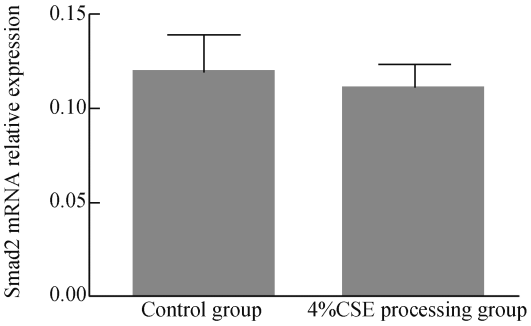

图 3 不同处理组 smad2 表达量

2.3 **Western blot 检测 TGF-1β 及 Smad2 蛋白表达情况** 通过 Western blot 检测发现,TGF-1β 蛋白的表达量在不同处理组显示出了不同,其中 4%烟草提取物处理组中其蛋白表达量明显增多,且与照组相比具有显著差异(图 4)($P<0.05$);Smad2 的总蛋白表达量在各组未见显著改变,但其磷酸化形式出现了显著的变化,其中 4%烟草提取物处理组中蛋白表达量明显增多,且与对照组相比具有显著差异($P<0.05$),详见图 5。

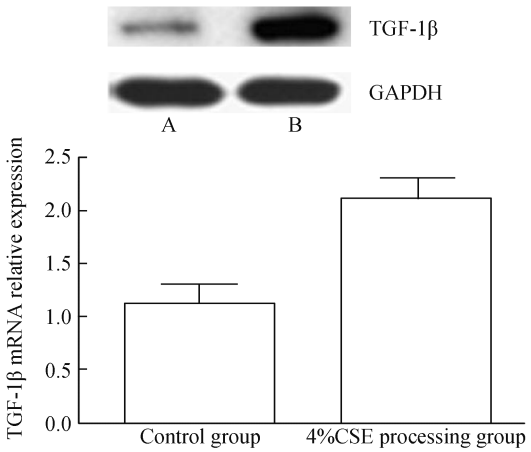

图 4 TGF1-β 蛋白相对表达量

A:Control group;B:4% CSE processing group。

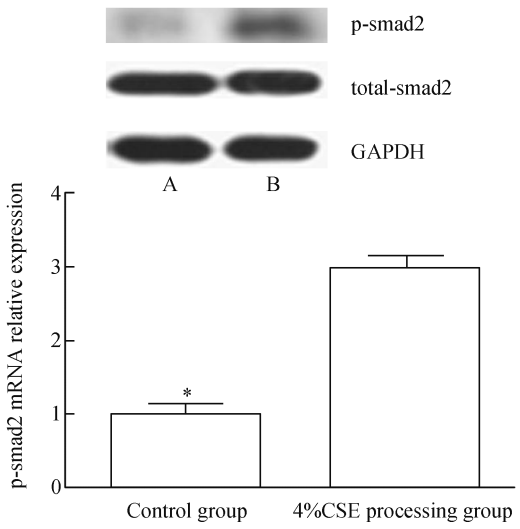

图 5 p-amsd2 蛋白相对表达量

A:Control group;B:4% CSE processing group;
与 4% CSE processing group 比较,* $P<0.05$

3 讨 论

凋亡是细胞程序性死亡的过程,在正常情况下,机体细胞凋亡与增殖维持着动态平衡,当机体应激状态时,体内外的理化因素会引起细胞的过度凋亡,从而打破机体平衡导致组织、器官功能障碍[9]。国内外的研究[10]表明,长期吸烟会引起肺组织细胞的凋亡,并且,长期吸烟的 COPD 患者肺组织细胞有大量凋亡细胞出现。本实验通过 TUNEL assay 发现了烟草提取物的确能增加 ATII 的凋亡。

TGF-β 是一种多功能蛋白,最近的研究[11]表明,TGF-β1 参与了细胞的凋亡过程,其活化能够影响细胞的生长、分化等功能。Smad 家族蛋白是 TGF-β 信号转导的关键因子,当 TGF-β 被激活后,可使胞浆内的 smads 活化转位入核,从而调控靶基因的转录。研究发现[12],smad2 的活性抑制后,可逆转非甾体类抗炎药诱导的胶质细胞的凋亡,即起到抗凋亡的作用。同时也有实验报道[13],前列腺上皮细胞的凋亡中,TGF-β1/smad2 信号通路起到了重要作用。由此可见,TGF-β1/smad2 信号通路在调控细胞凋亡进程起到了重要作用。本研究通过测定 TGF-β1、smad2 的表达量,发现该信号通路在 CSE 影响的 ATII 细胞凋亡中出现了明显的改变,明确了该通路在诱导凋亡中的作用。

烟草提取物引起的氧化应激在许多肺部疾病的发病机理中起着关键作用,其毒性作用主要归因于凋亡和坏死[14]。研究发现 ATI 样细胞对 CSE 的敏感性比 ATII 细胞更高[15]。细胞应对 CSE 产生的活性氧(active oxygen species,ROS)有两种方式。第一个通过激活红系衍生的核转录相关因子 2(Nuclear factor (erythroid-derived2)-like protein, Nrf2)提供抗氧化清除系统能力[16]。第二,细胞在不可修复的 DNA 损伤的情况下,通过 smad2 介导的细胞凋亡对 ROS 诱导的 DNA 损伤作出响应。本研究将 ATII 细胞暴露于 4% CSE 中,发现 TGF-β1 激活诱导暴露于 CSE 的 ATII 细胞凋亡。由于条件限制,本实验未从整体研究 CSE 对肺组织的影响及机制,也未进一步明确 TGF-β1/smad2 信号通路在 CSE 损伤的作用。但本研究是将为是下一步研究打下了坚实基础。

综上所述,CSE 中的有害物质可能通过诱导 ATII 细胞凋亡引发肺组织损伤及功能障碍。其机制可能是 CSE 通过诱导 TGF-β1/smad2 信号通路激活,进而引起凋亡的发生。本研究通过研究 TGF-β1/smad2 在诱导 ATII 凋亡的作用,可为临床防治吸烟引起的肺损伤提供治疗依据。

参考文献:

[1] PAN WY, HUANG CC, LIN TT, et al. Synergistic antibacterial effects of localized heat and oxidative stress caused by hydroxyl radicals mediated by graphene/iron oxide-based nanocomosites [J]. Nanomedicine, 2016, 12(2):431-8.

[2] 李燕飞, 胡长平, 李峰. 肺纤维化动物模型研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(2): 211-5.

[3] XIE T, LIANG J, GENG Y, et al. MicroRNA-29c prevents pulmonary fibrosis by regulating epithelial cell renewal and apoptosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017,57(8):721-32.

[4] LUCARINI L, DURANTE M, LANZI C, et al. HYDAMTIQ, a selective PARP-1 inhibitor, improves bleomycin-induced lung fibrosis by dampening the TGF-β/SMAD signalling pathway[J]. J Cell Mol Medic, 2017, 21(2):324-35.

[5] AGASSANDIAN M, TEDROW JR, SEMBRAT J, et al. VCAM-1 is a TGF-β1 inducible gene upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Cell Signal, 2015, 27(12):2467-73.

[6] HIROSE T, OGURA T, TANAKA K, et al. Comparative study of dermal components and plasma TGF-β1 levels inSlc39a13/Zip13-KO mice[J]. J Vet Med Sci, 2015, 77(11):1385-9.

[7] MESSIER EM, MASON RJ, KOSMIDER B. Efficient and rapid isolation and purification of mouse alveolar type II epithelial cells [J]. Exp Lung Res, 2012, 38(7):363-73.

[8] KOSMIDER B, MESSIER EM, CHU HW, et al. Human alveolar epithelial cell injury induced by cigarette smoke[J]. Plos One, 2011, 6(12): e26059.

[9] 张凡, 强 丽霞, 樊迪, 等.细胞凋亡和凋亡细胞清除与慢性阻塞性肺疾病[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(4): 722-5.

(下转第 504 页)

医,2016,34(7):122-4.
[2] 李庆军,张秀杰,高建瑶.盐酸左氧氟沙星在盆腔炎治疗中的应用价值及安全性分析[J].中国医药指南,2017,15(5):75-6.
[3] 强烈应,史小四,徐 丽,等.盐酸左氧氟沙星用于妇科盆腔炎疗效观察及安全性评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(32):3939-40.
[4] 何晓臣.替硝唑联合盐酸左氧氟沙星治疗 86 例慢性盆腔炎中的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(2):105-6.
[5] 薛丽霞.黄藤素分散片联合替硝唑治疗慢性盆腔炎的临床研究[J].现代药物与临床,2017,32(6):1081-4.
[6] 乐杰.妇产科学[M]. 第 7 版.北京:人民卫生出版社,2008:249-50.
[7] 陈玥,张乃舒,王佩娟.急性盆腔炎患者血小板参数检测的临床意义[J].江苏大学学报(医学版),2015,25(6):546-8.
[8] 郝霞,牛明明,郑伟,等.张氏腹三针与传统针刺治疗慢性盆腔炎的临床疗效对比分析[J].中华中医药学刊,2016,34(8):2016-8.
[9] 周春霞.盐酸左氧氟沙星治疗盆腔炎的临床效果及其安全性分析[J].海峡药学,2013,25(8):131-3.
[10] 郑跃,刘丽.针药联合治疗气滞血瘀型慢性盆腔炎的临床疗效观察[J].针灸临床杂志,2017,33(3):9-12.
[11] 薛丽霞. 黄藤素分散片联合替硝唑治疗慢性盆腔炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(6):1081-4.
[12] 陈琪珍,田淑娜,陈雄.丹黄祛瘀胶囊联合克林霉素治疗慢性盆腔炎的临床研究[J].现代药物与临床,2017,32(5):844-7.
[13] 刘素先.中西医结合治疗慢性盆腔炎的临床研究[J].中医临床研究,2013,5(16):82-4.
[14] 王莉, 吕耀凤, 姚丽娟. 慢性盆腔炎患者促炎因子与抗炎因子的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(33):5292-4.
[15] 刘春娥,刘光金.少腹逐瘀汤合桂枝茯苓汤治疗慢性盆腔炎临床研究[J].四川中医,2016,34(8):139-41.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 490 页)

[10] LEE H, PARK JR, KIM EJ, et al. Cigarette smoke-mediated oxidative stress induces apoptosis via the MAPKs/STAT1 pathway in mouse lung fibroblasts[J]. Toxicol Lett, 2016, 240(1): 140-8.
[11] LIN Z, SONG D, WEI H, et al. TGF-β1-induced miR-202 mediates drug resistance by inhibiting apoptosis in human osteosarcoma[J].J Ca Res Clinic Oncol, 2016, 142(1):239-46.
[12] ZhANG Z, WU L, WANG J, et al. Opposing effects of PI3K/Akt and Smad-dependent signaling pathways in NAG-1-induced glioblastoma cell apoptosis[J]. Plos One, 2014, 9(4): e96283.
[13] MILES FL, KURTOGLU S, AHMER C, et al. Transforming growth factor-β signaling induced during prostate cancer cell death and neuroendocrine differentiation is mediated by bone marrow stromal cells[J]. Prostate, 2015, 75(15):1802-13.
[14] TIAN J, CHENG Y, KONG X, et al. Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidxse in hyperhydricity of garlic plantlets in vitro[J]. Protoplasma, 2017, 254(1): 379-88.
[15] JANSING NL, MCCLENDON J, HENSON PM, et al. Unbiased quantitation of ATII to ATI cell transdifferentiation during repair after lung injury in mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 57(5):519-26.
[16] KOVAC S, ANGELOVA PR, HOLMSTROM KM, et al. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2015, 1850(4):794-801.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 500 页)

[7] 淳林,黄蔓,苏新良,等. 纳米碳在甲状腺癌手术中的应用进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014,21(5): 646-9.
[8] 叶轲,李新营,常实,等. 纳米碳在腔镜下甲状腺癌手术中的临床应用[J]. 中国普通外科杂志, 2016,25(5): 653-8.
[9] 白彦宏,张群伟,高全强,等. 纳米炭注射剂在甲状腺癌行甲状腺全切加双侧中央区清扫中的效果[J]. 中国生化药物杂志, 2016,36(3): 151-3.
[10] 陈万志,吕云霞,谢嵘,等. 纳米碳在甲状腺癌手术中甲状旁腺保护的应用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(24): 1918-20.
[11] 冯凌飞,贺曾.纳米碳在甲状腺癌手术中的应用价值[J]. 肿瘤基础与临床,2015,28(1): 39-40.
[12] 张惠灏,朱有志,吴坤琳,等. 纳米碳在 cN0 分化型甲状腺癌术中的应用价值[J]. 武汉大学学报(医学版),2015,36(2): 270-3.
[13] 杨浚沨,李海,胡波,等. 纳米碳在甲状腺全切除加中央区淋巴结清扫术中对甲状旁腺的保护作用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(18):1382-4.
[14] 贾中明,刘艳. 纳米碳在甲状腺癌淋巴结清扫中的应用分析[J]. 中国生化药物杂志,2014,34(4): 142-4.
[15] 杨志芳,岳瑞雪,朱智,等. 纳米碳在 cN0 期甲状腺乳头状癌中央区淋巴结清扫手术中的应用[J]. 中国普外基础与临床杂志,2013,20(9): 976-80.
[16] 杨晓晖,王勇,王平,等.纳米碳在腔镜甲状腺癌手术中的应用[J]. 腹腔镜外科杂志,2013,18(4): 262-5.

(本文编辑:秦旭平)