

论著·实验研究

## TGF- $\beta$ 1 影响肺成纤维细胞结缔组织生长因子基因表达的研究

富建华<sup>1</sup> 杨海萍<sup>1</sup> 潘丽<sup>1</sup> 薛辛东<sup>1</sup> 高红<sup>2</sup>

(中国医科大学附属盛京医院,1. 儿科; 2. 中心实验室, 辽宁 沈阳 110004)

**[摘要]** 目的 研究转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 对体外培养早产鼠的肺成纤维细胞 (LFs) 结缔组织生长因子 (CTGF) 基因表达的影响。方法 以孕 19 d Wistar 大鼠剖宫取出的仔鼠为对象, 原代培养 LFs, 实验组分别采用不同浓度 (1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL) 和不同作用时间 (12 h, 24 h, 48 h) TGF- $\beta$ 1 刺激 LFs, 对照组无血清培养基培养 (即 0 ng/mL)。应用 RT-PCR 方法检测 LFs 的 CTGF mRNA 表达。结果 与对照组比较, 实验组 LFs 的 CTGF mRNA 水平增高 ( $P < 0.05$ ), 且随 TGF- $\beta$ 1 作用浓度的增加、作用时间的延长 CTGF mRNA 表达逐渐上升, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 TGF- $\beta$ 1 能刺激肺成纤维细胞中 CTGF 基因表达, 并且以剂量和时间依赖方式上调 CTGF 基因表达。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13(1): 36-39]

**[关键词]** 转化生长因子- $\beta$ 1; 结缔组织生长因子; 肺成纤维细胞; 大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)01-0036-04

### Effects of TGF- $\beta$ 1 on gene expression of connective tissue growth factor in lung fibroblasts

FU Jian-Hua, YANG Hai-Ping, PAN Li, XUE Xin-Dong, GAO Hong. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: fujh@sj-hospital.org)

**Abstract: Objective** To study the effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) on the gene expression of connective tissue growth factor (CTGF) in cultured lung fibroblasts of embryonic rats *in vitro*. **Methods** Wistar rats of embryonic 19 days were used for primary culture of lung fibroblasts (LFs). The cells in the experimental group were treated by different concentrations (1, 5 or 10 ng/mL) and different durations (12, 24 or 48 hrs) of TGF- $\beta$ 1 to stimulate the LFs. The cells in the control group were cultured in serum-free medium. RT-PCR method was applied to detect CTGF mRNA expression in LFs. **Results** Compared with the control group, the levels of CTGF mRNA in LFs in the experimental group increased significantly ( $P < 0.05$ ). CTGF mRNA expression gradually increased with increasing concentration and duration of TGF- $\beta$ 1 treatment ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** TGF- $\beta$ 1 can stimulate CTGF gene expression in LFs and increase CTGF gene expression in a dose-and time-dependent manner.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(1): 36-39]

**Key words:** Transforming growth factor- $\beta$ 1; Connective tissue growth factor; Lung fibroblasts; Rats

近年来,随着超低出生体重儿的增加,早产儿慢性肺疾病 (chronic lung disease, CLD) 的发生亦在逐年上升<sup>[1]</sup>。该病死亡率高,即使幸存也需长时间依赖氧气,生后反复发生肺内感染,与日后儿童哮喘发生密切相关,严重者伴有神经发育异常,甚至发生脑瘫<sup>[2]</sup>。尽管 CLD 发病机制尚未完全清楚,但肺间质纤维化的最终病理结局已被公认。目前大量研究已表明,转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 与肺纤维化发生密切相关。但由于 TGF- $\beta$ 1 作用的靶细胞种类繁

多,生物学效应复杂,单纯阻断其表达尽管可达到抗纤维化的目的,但其他不良后果也难以避免,如生长失控、免疫失调及严重感染等。尽管理论上阐明结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 是 TGF- $\beta$ 1 促纤维化作用的一个重要的下游因子,但在 CLD 发病中的作用尚未被直接证实。因此,本研究在以往研究基础上<sup>[3-4]</sup>,以早产儿 CLD 肺纤维化发生的效应细胞——肺成纤维细胞 (lung fibroblasts, LFs) 为对象,研究 TGF- $\beta$ 1 影响其 CTGF

[收稿日期] 2010-03-10; [修回日期] 2010-05-05

[基金项目] 国家自然科学基金 (No. 30872781)。

[作者简介] 富建华, 博士, 教授。

mRNA表达作用,从而为探索 CLD 新的治疗途径奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Wistar 大鼠由中国医科大学盛京医院实验动物中心提供。重组人 TGF- $\beta$ 1 购自英国 Peprotech 公司。RT-PCR 试剂盒购自 Taraka 公司。抗波形蛋白单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

### 1.2 细胞培养

将孕 19 d Wistar 大鼠剖宫取出仔鼠,无菌分离肺组织,按 Kelleher 等<sup>[5]</sup>建立的方法分离培养 LFs: Hank's 溶液冲洗后,将其剪成 1 mm<sup>3</sup> 碎块,用含 0.2% 胰酶的 DMEM 培养液消化 25 min 后,加入 10% 胎牛血清终止消化,吸出细胞悬浮液,过滤、离心后将细胞沉淀再悬浮于含 10% 胎牛血清培养液中,以后每 2~3 d 换液,贴壁细胞即为原代 LFs。待细胞生长呈融合状态(75~85%)时,按 1:3 进行传代。传代时调整细胞浓度为 2.5~5 × 10<sup>5</sup>/mL。本实验用 2~3 代 LFs。

### 1.3 LFs 鉴定

分别采用形态学观察和波形蛋白检测。取 2~3 代成纤维细胞,经胰酶消化后,接种于含盖玻片的六孔板中,培养 4~6 h 后取出细胞爬片,冲洗、固定后,按试剂盒的说明进行免疫细胞的化学染色。胞浆内棕黄色颗粒沉积为阳性细胞。

### 1.4 实验分组

实验前 24 h 将细胞培养液更换为无血清 DMEM。

1.4.1 观察 TGF- $\beta$ 1 不同作用浓度的影响 实验组分别将 1,5 及 10 ng/mL 的 TGF- $\beta$ 1 和对照组 0 ng/mL TGF- $\beta$ 1 (无血清培养液),加入体外培养 LFs,作用 24 h 收集细胞,用于 RT-PCR 检测。

1.4.2 观察 TGF- $\beta$ 1 不同作用时间的影响 实验组将 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 加入体外培养 LFs 细胞,对照组加入 0 ng/mL (即无血清培养液),分别作用 12 h、24 h、48 h 收集细胞,用于 RT-PCR 检测。

### 1.5 RT-PCR 测定 CTGF mRNA 表达

CTGF 引物(499 bp),上游:5'-CCT GAC CCA ACT ATG AGC-3',下游:5'-CCC TTA CTC CCT GGC TTT-3'。 $\beta$ -actin 引物(690 bp)上游:5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3',下游:5'-CAA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3'。以 Trizol 提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,然后进行 PCR 扩增。

PCR 反应条件:94℃ 3 min,94℃ 40 s,54℃ 1 min,72℃ 1 min,共 35 个循环。取扩增产物置于 2% 琼脂糖凝胶电泳后,溴化乙锭染色,用 Kodak1D 型凝胶成像分析系统进行电泳条带分析。以 CTGF 与  $\beta$ -actin 电泳带吸光度的比值表示 CTGF mRNA 的相对表达含量。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,所有数据均以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外培养 LFs 鉴定

倒置显微镜下,可见细胞呈梭形,有较长突起,胞核呈卵圆形,位于细胞中央,呈放射状或栅栏状排列;免疫细胞化学染色可见胞浆内波形蛋白呈棕黄色(图 1)。

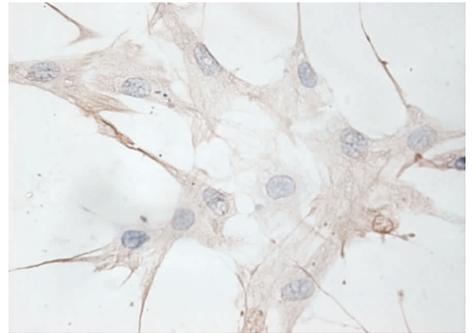
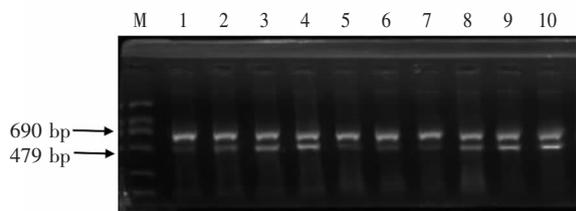


图 1 波形蛋白免疫细胞化学染色(×400) 胞浆内棕黄色颗粒为波形蛋白阳性表达。

### 2.2 TGF- $\beta$ 1 诱导 LFs CTGF mRNA 表达

2.2.1 TGF- $\beta$ 1 不同作用浓度的影响 用不同浓度 TGF- $\beta$ 1(1,5 及 10 ng/mL)刺激 LFs,作用 24 h 后,CTGF mRNA 平均值分别为 0.29 ± 0.03,0.62 ± 0.09 及 0.88 ± 0.02。与对照组(0.26 ± 0.02)比较,CTGF mRNA 增加,且随刺激浓度加大,表达水平明显增高,差异有统计学意义( $F = 141.6, P < 0.05$ ) (图 2)。

2.2.2 TGF- $\beta$ 1 不同作用时间的影响 在实验组,用相同浓度(10 ng/mL)刺激 LFs,作用不同时间(12、24 及 48 h),与对照组比较,CTGF mRNA 水平明显升高,差异有统计学意义( $F = 468, P < 0.05$ ),随作用时间延长,CTGF mRNA 水平增加(表 1,图 2)。



**图2 TGF-β1 不同作用浓度及作用时间下的 CTGF mRNA 表达** 1~4 泳道分别为浓度 0、1、5 及 10 ng/mL TGF-β1 组,5~7 泳道分别为对照组作用后 12、24 及 48 h,8~10 泳道分别为 10 ng/mL TGF-β1 作用后 12、24 及 48 h。

**表1 TGF-β1 不同作用时间 LFs CTGF mRNA 表达**  
( $\bar{x} \pm s$ )

	n	12 h	24 h	48 h
对照组(0 ng/mL)	4	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.02
实验组(10 ng/mL)	4	0.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.04 <sup>a,b</sup>	0.96 ± 0.03 <sup>a,b,c</sup>
t 值		7.39	31.6	40
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与实验组 12 h 比较,  $P < 0.05$ ; c: 与实验组 24 h 比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

目前高氧致早产儿肺损伤晚期肺间质纤维化的病理变化已被大量临床和动物实验研究所证实。因此,探索高氧致早产儿肺纤维化的发生机制及其干预策略已成为当今的热点研究。

越来越多的研究发现,在器官纤维化和创伤愈合中,尽管 TGF-β1 是一个公认的促纤维化因子,如刺激成纤维细胞增殖、诱导细胞外基质合成,抑制基质金属蛋白酶的活性等等,但通过应用 CTGF 抗体或反义寡核苷酸等阻断 CTGF,可阻断 TGF-β 促进成纤维细胞增殖及分泌胶原等作用,如 Lai 等<sup>[6]</sup>报道,小分子 RNA 干扰 TGF-β1 mRNA,可抑制石棉诱导成纤维细胞的 CTGF 表达。上述研究表明,TGF-β1 是通过 CTGF 来完成促纤维化作用的。因此,若 CTGF 被证实与高氧致肺纤维化的发生有直接的关系,那么有望为早产儿 CLD 有效防治途径的重新设计打开新的突破口。

CTGF 是 Bradham 等<sup>[7]</sup>1991 年首次于人的脐静脉内皮细胞中发现的细胞因子,属即刻早期基因 CCN 家族成员,可由成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞合成分泌,参与胚胎发育及分化、软骨生成、骨骼发育等。在生理状态下,机体组织不表达或仅有基础量的 CTGF 分泌,但在许多纤维化性疾病如系统性硬化症、肺纤维化、肝硬化及肾病等的病变区

域都发现有 CTGF 基因和蛋白的异常表达<sup>[8-12]</sup>,许多基于转基因动物的实验研究,也证实了 CTGF 与器官纤维化的关系<sup>[13]</sup>。

在以往的研究中,也有一些实验报道了 CTGF 与高氧致肺纤维化发生有一定的关系。如本课题组前期研究中,以高氧诱导早产鼠肺纤维化模型为研究对象,分别应用免疫组化和 RT-PCR 技术证实,TGF-β1 于暴露于高氧后 7 d 表达升高,而 CTGF 于 14 d 表达升高,21 d 达高峰,且 CTGF 表达水平恰与 CLD 肺纤维化程度呈正相关,该研究结果表明,TGF-β1 先于 CTGF 表达,CTGF 持续高表达期恰是肺纤维化形成的关键阶段<sup>[3-4]</sup>。Yokoi 等<sup>[14]</sup>也曾报道,TGF-β1 主要在组织纤维化的早期表达,而 CTGF 的持续表达被认为是纤维化病变缓慢进展的关键因素,Chen 等<sup>[15]</sup>报道,将鼠仔生后暴露于高氧中,最初 7 d 氧浓度 >95%,继之更换为 60%,继续暴露 3 周,结果发现,CTGF 基因及蛋白表达于高氧暴露后的 7 d 和 14 d 明显增高,而肺组织的胶原沉积却在 21 d 和 28 d 最为明显,表明高氧暴露下,CTGF 基因及蛋白上调先于肺纤维化的发生。

尽管上述研究从组织学角度阐明了 TGF-β1、CTGF 与高氧肺纤维化的发生、发展有一定的联系,但尚缺乏直接的实验证据。研究已证实,肺纤维化的根源是胶原组织的沉积,而导致其异常变化的效应细胞则为 LFs。有文献报道,在苦参碱干预人 LFs TGF-β1 信号转导途径的体外实验中,1 ng/mL TGF-β1 即可诱导 CTGF 的表达<sup>[16]</sup>,Tung 等<sup>[17]</sup>也发现,百草枯可通过激活血管紧张素信号通路诱导体外培养人 LFs CTGF 及胶原的表达。本研究以高氧肺纤维化的效应细胞(LFs)为研究对象,按 Kelleher 等<sup>[5]</sup>的方法,原代培养了孕 19 d 鼠仔 LFs,分别通过 TGF-β1 不同作用浓度(1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL)及不同作用时间(12 h、24 h、48 h)刺激体外培养的成纤维细胞,结果表明,TGF-β1 能够刺激 LFs 的 CTGF 基因表达,并且以剂量和时间依赖方式上调 CTGF 基因表达,提示高氧首先诱导 TGF-β1 的过度表达,继之通过刺激 LFs CTGF 的分泌,使之持续表达,最终导致肺组织纤维化的形成,进一步证实 CTGF 可能是早产儿 CLD 肺纤维化的主要效应因子。

综上所述,CTGF 作为 TGF-β1 的下游因子在高氧致早产儿 CLD 肺纤维化的形成中发挥重要作用。由于正常情况下体内 CTGF 表达水平低,生物学作用也相对特异,阻断 CTGF 的致纤维化作用又不影响 TGF-β1 的其他功能,因此,CTGF 有望成为今后

预防和治疗早产儿 CLD 肺纤维化的重要靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Stenmark KR, Balasubramaniam V. Angiogenic therapy for bronchopulmonary dysplasia; rationale and promise[J]. *Circulation*, 2005, 112(16): 2383-2385.
- [2] Smith J. An update on bronchopulmonary dysplasia; is there a relationship to the development of childhood asthma? [J]. *Med Hypotheses*, 2003, 61(4): 495-502.
- [3] 富建华, 薛辛东. 高氧诱导早产鼠肺纤维化中结缔组织生长因子的表达及其意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(5): 449-452.
- [4] 潘丽, 富建华, 薛辛东. 结缔组织生长因子在高氧致早产鼠慢性肺疾病中表达及其作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(5): 417-420.
- [5] Kelleher MD, Naureckas ET, Solway J, Hershenson MB. In vivo hyperoxic exposure increases cultured lung fibroblast proliferation and c-Ha-ras expression[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, 12(1): 19-26.
- [6] Lai TC, Pociask DA, Ferris M, Nguyen HT, Miller CA 3rd, Brody A, et al. Small interfering RNAs (siRNAs) targeting TGF-beta1 mRNA suppress asbestos-induced expression of TGF-beta1 and CTGF in fibroblasts[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2009, 28(2): 109-119.
- [7] Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10[J]. *J Cell Biol*, 1991, 114(6): 1285-1294.
- [8] Dziadzio M, Usinger W, Leask A, Abraham D, Black CM, Denton C, et al. N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma[J]. *QJM*, 2005, 98(7): 485-492.
- [9] Bonniaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, et al. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in "fibrosis resistant" BALB/c mouse lungs[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(5): 510-516.
- [10] Ogawa E, Elliott WM, Hughes F, Eichholtz TJ, Hogg JC, Hayashi S. Latent adenoviral infection induces production of growth factor relevant to airway remodeling in COPD[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(1): L189-L197.
- [11] Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, et al. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis[J]. *Liver*, 2000, 20(4): 296-304.
- [12] Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(6): 2033-2043.
- [13] Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals[J]. *J Cell Commun Signal*, 2010, 4(1): 1-4.
- [14] Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282(5): F933-F942.
- [15] Chen CM, Wang LF, Chou HC, Lang YD, Lai YP. Up-regulation of connective tissue growth factor in hyperoxia-induced lung fibrosis [J]. *Pediatr Res*, 2007, 62(2): 128-133.
- [16] 凌伟, 谢敏, 石俊清. 苦参碱对肺成纤维细胞 TGF-β1 信号转导途径的干预[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2009, 40(6): 994-999.
- [17] Tung JN, Lang YD, Wang LF, Chen CM. Paraquat increases connective tissue growth factor and collagen expression via angiotensin signaling pathway in human lung fibroblasts[J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(3): 803-808.

(本文编辑:王霞)