

TGF- β_2 作用于人晶状体上皮细胞后 Smad 4 与 p-Smad 2/3 的动态表达

王子蓝 盛耀华

Dynamic expression of Smad 4 and p-Smad 2/3 in human lens epithelial cells cultured with TGF- β_2

Wang Yulan, Sheng Yaohua. Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

Abstract Objective Transforming growth factor β (TGF- β) is a potent inducer of pathological states of the lens epithelial cells after surgical trauma. TGF β signals are transduced from receptors through nuclei by Smad family members. This study was designed to observe the expression of signal proteins Smad 4 and p-Smad 2/3 in cultured human lens epithelial cells (LECs) stimulated with TGF- β . **Methods** Human lens epithelial cells (HLEpiC strain) were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum. The 3rd passage of cells were treated with 10 ng/mL hTGF- β_2 as study group, and the cells without hTGF- β_2 were as control group. The expression of Smad 4 mRNA in the cells was detected by semi-quantitative RT-PCR, and p-Smad 2/3 was analyzed by Western blot and immunohistochemistry at 0.5 hours, 1 hour, 2, 8, 16 and 24 hours after addition of hTGF- β_2 . **Results** No Smad 4 mRNA was expressed in control group from 1 through 8 hours of culture. After 24 hours incubation, the expression level of Smad 4 mRNA in TGF- β_2 group (0.18 ± 0.02) was significantly higher than the control group (0.39 ± 0.04) ($P < 0.05$). The peak level of the expression of Smad 4 mRNA was 0.72 ± 0.07 at 16 hours after hTGF- β_2 treatment. At 0.5 hours through 2 hours after culture, p-Smad 2/3 was faintly expressed in cultured LECs both in TGF- β_2 group and control group. However, the expression of p-Smad 2/3 protein was significantly increased from 8 hours through 24 hours in hTGF- β_2 group compared with control group ($P < 0.05$) with the peak value at 16 hours. The immunohistochemistry showed the positive brown granulars for p-Smad 2/3 in the cytoplasm at 16 hours and in nuclear at 24 hours. **Conclusion** TGF- β_2 activates Smads through its receptor in LECs. The signal transduction mediated by TGF- β_2 affect in a time-dependent manner.

Key words transforming growth factor β ; lens epithelial cell; Smad

摘要 目的 观察转化生长因子 β_2 (TGF- β_2) 作用于人晶状体上皮细胞 (LECs) 后 2 类通路转导蛋白 Smad 4 和 p-Smad 2/3 的动态表达变化。**方法** 体外培养的人 LECs 中添加 10 ng/mL 人 TGF- β_2 , RT-PCR 方法测定不同时间点 Smad 4 mRNA 的表达, Western blot 观察 p-Smad 2/3 的表达, 免疫组织化学法观察 p-Smad 2/3 在 LECs 表达的特点。**结果** 人 LECs 添加了外源性人 TGF- β_2 后 1 h, 可出现 Smad 4 mRNA 表达增高, 16 h 时达峰值 (0.72 ± 0.07), 并持续至 24 h。与对照组比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。p-Smad 2/3 在 2 h 后逐渐增强, 与对照组比较差异明显, 16 h 达到峰值 (2.53 g/L)。16 h 有 p-Smad 2/3 颗粒胞浆表达, 24 h 向核内聚集。**结论** TGF- β_2 刺激 LECs 后, 可激活膜受体激活型 Smad 和通用型 Smad, TGF- β_2 对 Smad 通路蛋白的激活存在时效关系。TGF- β_2 可通过特异性激活 Smad 通路, 将信号传导至细胞核内。

关键词 转化生长因子 β ; 晶状体上皮细胞; Smad 蛋白

分类号 R 776.01 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0672-04

Smads 是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 与胞膜受体结合后, 将信号传导到胞

核内启动相关基因的重要蛋白。TGF- β 与受体结合后, 通过磷酸化的膜受体激活型 Smad 2/3 (p-Smad 2/3) 和通用型 Smad 4 形成复合物, 转移到核内与特异启动区域结合。晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 表达 TGF- β 受体。正常情况下, 眼内房水中

TGF β_2 活性很低。白内障手术中发现房水中 TGF- β 质量浓度为 2.3 ~ 8.1 ng/mL, 其中 61% 为有活性的 TGF- β_2 ^[1]。本研究在体外培养的人 LECs 中添加人 TGF- β_2 , 测定不同时间点 Smad 4 和 p-Smad-2/3 的表达, 动态观察这些指标的变化, 比对分析在人 LECs 中 TGF- β_2 对 2 类 Smad 激活的特点。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及仪器

HLEpiC 人 LECs 株、人 TGF- β_2 (美国 Scien Cell 公司); 胰蛋白酶、DMEM 细胞培养液 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); Trizol, RNAsin (美国 Invitrogen 公司); Taq 聚合酶 (5 U/ μ L) (上海博彩生物技术公司); 引物合成 (上海生工生物工程技术有限公司); 山羊抗人多克隆 P-Smad 2/3 (美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗人多克隆 GAPDH (北京博奥森公司); HRP 标记兔抗山羊单克隆抗体、HRP 标记山羊抗小鼠单克隆抗体 (北京中山公司); Envision 即用型试剂 (丹麦 Dako 公司); PCR 基因扩增仪 (9600 型, PE 公司); 计算机图像分析系统 (FR-2000 型, 上海复日科技有限公司)。

1.2 RT-PCR 检测 Smad 4 基因 mRNA 的表达

1.2.1 细胞分组 10% 胎牛血清的 DMEM 培养细胞至近 90% 融合时进行传代。取第 3 代近融合的 LECs, 分为实验组和对照组。当细胞生长近融合时转入无血清的 DMEM 培养基培养 24 h, 使细胞同步化。实验组培养基中添加 10 ng/mL TGF- β_2 , 对照组不添加。继续培养 30 min, 1、2、8、16、24 h。在各个时间点应用 RT-PCR 方法测定 Smad 4 基因的 mRNA 表达。

1.2.2 总 RNA 的抽提及定量 收集各组各时间点细胞, Trizol 法提取总 RNA, 电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度法测定 RNA 浓度, 根据 A₂₆₀/A₂₈₀ 检测纯度。

1.2.3 PCR 反应及扩增 软件设计目标基因的检测引物, 各基因的检测引物序列和扩增片段大小: Smad 4 (产物长度 243 bp): 上游: 5'-ATGTGATCTATGCCCGTCTC-3', 下游: 3'-ACAACGATGGCTGTCCCT-5'; β -actin (产物长度 285 bp): 上游: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 下游: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'。反应体系 20 μ L。扩增电泳后用 Quantity One 4.3.1 软件对图像进行光密度扫描分析。以目的基因光密度值与对应样品 β -actin 内参基因光密度值的比值作为该样品中目的基因的相对转录量。以目的基因的相对转录量为参数进行统计学分析。

1.2.4 Western blot 法检测 p-Smad 2/3 蛋白的表达

细胞分组方法同前。将细胞消化离心后, 用 RIPA 缓冲液溶解细胞沉淀, 置于冰上孵育 30 min 后以 10 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 提取上清。利用考马斯亮蓝法测定样品的蛋白质浓度。用样品缓冲液调整样品质量浓度为 1 g/L, 沸水浴 3 min 后, 每孔 20 μ L 样品进行 SDS-PAGE 电泳。电泳分离后采用半干转印技术进行转印。用 50 g/L 脱脂牛奶封闭过夜后, 加入一抗, 室温孵育 2 h, PBST 洗膜后加入稀释后的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜后进行 ECL 显色。Quantity One 4.3.1 软件对照片进行分析。

1.2.5 免疫组织化学法检测 p-Smad 2/3 蛋白的表达 制作细胞爬片, 纯丙酮固定。10% 的正常山羊血清室温下封闭 20 min, 加适当稀释一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。加 Envision 试剂置于 37 $^{\circ}$ C, 30 min。DAB 显色。水洗复染, 树脂封片。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。所有测试指标的数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各时间点人 TGF- β_2 处理组和对照组间的 Smad 4 mRNA 和 p-Smad 2/3 在培养的 LECs 中的表达比较采用独立样本的 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 检测不同时间点 TGF- β_2 作用于体外培养的人 LECs 后 Smad 4 mRNA 结果显示, 实验组添加了外源性人 TGF- β_2 后 1 h 可见与 243 bp (Smad 4) 相一致的扩增片段, 并在此后的 2、8、16、24 h 均出现表达, 16 h 时达高峰。对照组在 16 h 时出现 243 bp (Smad 4) 条带。1、2、8 h 时 2 组平均 Smad 4 mRNA 转录强度的比较, 差异均有统计学意义 (表 1)。

表 1 实验组和对照组 Smad 4 mRNA 半定量转录强度 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The relative value of Smad 4 mRNA expression in different time after culture in two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Smad 4 mRNA expression in different time					
	0.5 h	1 h	2 h	8 h	16 h	24 h
hTGF- β_2	0	0.18 \pm 0.02	0.55 \pm 0.16	0.44 \pm 0.05	0.72 \pm 0.07	0.39 \pm 0.04
Control	0	0	0	0	0.67 \pm 0.16	0.58 \pm 0.03
<i>t</i>		19.00	5.85	14.16	0.49	-6.02
<i>P</i>		< 0.01	0.03	< 0.01	0.67	0.01

(Student's *t* test)

2.2 Western blot 法检测结果

加入 TGF- β_2 后 30 min, 即可检测到 p-Smad 2/3

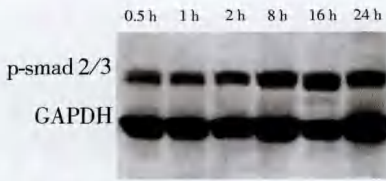


图1 TGF-β₂作用后不同时间点 p-Smad 2/3 蛋白的表达电泳结果

Fig.1 Expression of p-Smad 2/3 in LECs stimulated by 10 ng/ml TGF-β₂ at different time points

的相对分子质量为 6 000 目标蛋白条带显影,并在 2 h 后逐渐增强,16 h 达到高峰,24 h 开始回落(图 1)。根据相对 OD 值计算蛋白相对含量。结果显示,在 0.5、1、2 h 实

验组和对照组均有 p-Smad 2/3 相对蛋白含量表达,但在 8、16、24 h 实验组明显高于对照组(表 2),表达峰值出现在 16 h。

表 2 实验组和对照组 p-Smad 2/3 的相对蛋白含量($\bar{x} \pm s$)
Table 2 p-Smad 2/3 protein concentrations in two groups at different time points

Group	p-Smad 2/3 protein level in different time					
	0.5 h	1 h	2 h	8 h	16 h	24 h
hTGF-β ₂	1.31 ± 0.12	1.27 ± 0.21	1.23 ± 0.22	1.73 ± 0.31	2.53 ± 0.43	1.80 ± 0.28
Control	1.42 ± 0.15	1.27 ± 0.19	1.04 ± 0.17	1.08 ± 0.27	0.89 ± 0.13	1.04 ± 0.16
t	-2.08	-1.01	0.47	3.51	8.68	2.41
P	0.11	0.37	0.66	0.03	<0.01	0.02

(Student's t test)

2.3 免疫组织化学检测结果

未添加 TGF-β₂ 时人 LECs 的 p-Smad 2/3 表达阴性(图 2),TGF-β₂ 作用后,细胞膜表达阳性 p-Smad 2/3 颗粒,随时间推移阳性颗粒逐渐向胞核内转移(图 3,4)



图 2 对照组人 LECs p-Smad 2/3 表达阴性(Envision × 400) 图 3 TGF-β₂作用 16 h 后,人 LECs p-Smad 2/3 的表达阳性,胞浆上可见均匀的抗原抗体复合物棕黄色阳性染色(Envision × 400) 图 4 TGF-β₂作用 24 h 后,人 LECs 的 p-Smad 2/3 表达阳性,胞核上可见聚集的颗粒状抗原抗体复合物棕黄色阳性染色(Envision × 400)

Fig.2 LECs show the absent staining for p-Smad 2/3 in negative control group (Envision × 400) Fig.3 LECs present the positive staining for p-Smad 2/3 in cytoplasm at 16 hours after TGF-β₂ stimulation (Envision × 400) Fig.4 The nuclei of LECs show the positive staining for p-Smad 2/3 at 24 hours after TGF-β₂ stimulation (Envision × 400)

3 讨论

手术等创伤条件下,TGF-β 质量浓度增高,特异性结合细胞表面高亲和力受体^[2]。TGF-β 通过作用受

体,激活 Smad 受体复合物^[3],进入细胞核与基因调节蛋白结合,作用于胞内 TGF 反应元件,启动基因转录^[4]。在 Smads 家族中膜受体激活型、通用型、抑制型 3 类受体中,只有膜受体激活型 Smad 能被受体直接磷酸化激活,其中 Smad 2、Smad 3 转导 TGF-β 信号,Smad 1、5、8 转导 BMP 信号。抑制型 Smad 中,Smad 6 抑制 BMP 信号转导,而 Smad 7 则对 TGF-β 和 BMP 的转导均有抑制作用。通用型 Smad 4 可以与胞浆中的 p-Smad 2/3 形成活性复合体,转移到细胞核内直接与 DNA 或其他转录因子结合,共同调节转录反应。动物模型在创伤后 3 ~ 24 h,出现 Smad 4 的活化表达和核内移位,TGF-β₂ 的特异性抑制剂可阻断该过程^[5-6]。

在正常晶状体前囊,Smad 3/Smad 4 复合物的表达仅限于胞浆,而在 Sommerring 环周围单层细胞中,可表达于胞核^[7]。LECs 具有发育、再生和转化的多项潜能,但是受到各种信号传导系统的精确控制^[8]。TGF-β 信号转导存在严密的调控,在各个转导环节,如受体结合、Smad 蛋白活化、配体受体结合、受体与 Smad 蛋白结合、Smad 复合物与 DNA 结合、转录启动等均存在调节因素。TGF-β 信号通路本身以及与其他信号通路间都存在正性和负性调节因素^[9]。

在 TGF-β 与 LECs 的研究中,发现 LECs 存在 TGF-β I 型和 II 型受体。LECs 可以产生 TGF-β,TGF-β 对 LECs 的增生具有调节作用。TGF-β 能够通过作用受体,激活 Smad 受体复合物。同时 TGF-β 作用于 LECs 后,膜受体激活型和通用型 2 类 Smad 的表达进行测量和比较的研究对于进一步深入研究调控干预时

间点和位点的选择具有重要意义^[10]。本研究方法为在体外培养的人 LECs 中添加人 TGF-β₂,采用 RT-PCR 法测定不同时间点 Smad 4 mRNA 的动态表达,采用免疫组织化学方法观察不同时间点 p-Smad 2/3 的表达。选择人 TGF-β₂,是

由于它是在白内障术后房水中 TGF-β 升高时的主要活性形式^[11]。在以往 TGF-β 与晶状体上皮相关的研究中,关于人 TGF-β₂ 报道较少。选择的人 TGF-β₂ 质

量浓度为 10 ng/mL, 高于术后房水中测得的 TGF- β 质量浓度。本研究结果显示添加了外源性人 TGF- β_2 后 1 h, 即可出现 Smad 4 的表达转录水平增高, 并至少持续 24 h。对照组则在 16 h 后才出现 Smad 4 的部分表达。24 h Smad 4 的 mRNA 表达出现下降, 可能与抑制型 Smad 7 受体随时间推移, 也被激活参与调控有关。TGF- β_2 对体外培养的人 LECs 的 Smad 4 mRNA 的表达具有显著的增强效应。在细胞转导过程中, 信号转导蛋白接受上游信号后可迅速被活化, 在活化状态下完成信号向下游的传递, 蛋白本身被灭活, 恢复非活化状态, 以接受新一次的上游信号。Smad 蛋白的这种“分子开关”特性是磷酸化-去磷酸化型的。在激酶作用下磷酸化活化, 完成转导后, 在蛋白磷酸酶的作用下去磷酸化降解。因此, p-Smad 2/3 是通路中信号从胞膜导入胞内的重要活化功能性传递蛋白^[12]。在 TGF- β_2 添加后, p-Smad 2/3 的活性形式蛋白在人 LECs 中表达的动态变化以往未见报道。本研究结果表明在正常体外培养的人 LECs 中, Western blot 蛋白质印迹法可检测出有低水平的磷酸化 Smad 2/3 表达。TGF- β_2 添加 2 h 之后, 检测出的蛋白表达含量逐渐增高, 16 h 时表达量达到峰值。免疫组织化学染色也显示在 16 h 时, 有胞浆表达, 而此时也是检测到 Smad 4 mRNA 转录强度最高的时间点。24 h 时, p-Smad 2/3 细胞内定位发生变化, 从胞浆转移到核内聚集, Western blot 测得的蛋白表达量也开始回落。表明受到 TGF- β_2 刺激活化后, Smad 2/3 发生磷酸化, 介导了晶状体上皮胞内信号转移, 与 Smad 4 的转录活性存在关联, 具有时间依赖性。Smads 信号的表达根据种属的不同、组织和细胞的不同可能存在不同的转导特点, 这一点可能与内源性 TGF- β_2 的活化过程以及受体亲和力差异有关^[13]。同时, 膜受体激活型 Smad 与通用型 Smad 在其末端具有高度相似的氨基酸序列, 分别称为 MH1 和 MH2 结构域。不同种属组织细胞 Smad 的 MH1 结构域差异很大, 这也可能决定了其信号传导的特异性。

本研究对添加 TGF- β_2 后 0.5、1、2、8、16、24 h 的 2 类 Smad 受体通路, Smad 4 mRNA 转录水平以及 p-Smad 2/3 蛋白表达进行平行观察, 其意义在于, 研究 2 类 Smad 受体在人 LECs 中受到激活后的动态表达特点, 通过相互参照, 印证两者在不同时相的表达具

有可比性, 两者存在协同作用。同时, 对通路蛋白转录表达的出现、高峰、消退的观察, 反应了特定细胞的受体反应灵敏性和强度。对干预和调节的时机等相关研究提供重要信息。目前对 TGF- β 通路的干预方式有选择 TGF- β 特异性抑制剂、构建转染抑制型 Smad 7 片段等。针对术后以 TGF- β_2 为主介导的转导反应, 抑制 Smad 4 的转录和蛋白活性是否更简洁有效; 对已暴露于 TGF- β 环境中的 LECs, 介入的最迟有效时间? 均需深入研究。

参考文献

- Jampel HD, Roche N, Stark WJ, et al. Transforming growth factor-beta in human aqueous humor[J]. *Curr Eye Res*, 1990, 9(10): 963-969
- Saika S, Kono-Saika S, Ohinishi Y, et al. Smad 3 signaling is required for epithelial mesenchymal transition of lens epithelium after injury[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(2): 651-663
- Wormston IM, Tamiya S, Eldred JA, et al. Characterisation of TGF- β_2 signalling and function in a human lens cell line[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(3): 705-714
- Dawes LJ, Elliott RM, Reddan JR, et al. Oligonucleotide microarray analysis of human lens epithelial cells: TGFbeta regulated gene expression[J]. *Mol Vis*, 2007, 17(13): 1181-1197
- Saika S, Okada Y, Miyamoto T, et al. Smad translocation and growth suppression in lens epithelial cells by endogenous TGF- β_2 during wound repair[J]. *Exp Eye Res*, 2002, 72: 679-686
- 曹晓光, 鲍永珍, 胡建信, 等. 紫外辐射诱导人晶状体上皮细胞凋亡机制中 TGF- β_2 /Smad-4 细胞信号传导通路的作用[J]. *眼科研究*, 2007, 25(8): 584-588
- Saika S, Miyamoto T, Ishida I, et al. TGFbeta-Smad signaling in postoperative human lens epithelial cells[J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(12): 1428-1433
- Tsonis PA, Rio-Tsonis KA. Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical application[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78: 161-172
- 郭海科, 黄明海, 刘毅, 等. TGF- β -1 对晶状体上皮细胞增生和诱导其表达 CTGF 的作用[J]. *眼科研究*, 2006, 24(5): 488-491
- Yamashita H, Tobar I, Sawa M, et al. Functions of the transforming growth factor-beta superfamily in eyes[J]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1997, 101(12): 927-947
- Maier P, Broszinski A, Heizmann U, et al. Determination of active TGF-beta2 in aqueous humor prior to and following cryopreservation[J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 1477-1482
- Sauer B, Vogler R, von Wenckstern H, et al. Involvement of Smad signaling in sphingosine 1-phosphate-mediated biological responses of keratinocytes[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38471-38479
- Nonaka M, Pawankar R, Fukumoto A. Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta1[J]. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(5): 812-821

(收稿: 2008-10-10 修回: 2009-03-20)

(本文编辑: 王莉红)