

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000174

基质金属蛋白酶抑制剂 1 和 2 siRNA 对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠 Smad7 蛋白表达的影响

张 敏, 江宇杰, 石小枫, 刘 杞, 孙 航

(重庆医科大学附属第二医院感染科、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室, 重庆 400010)

【摘要】目的:研究基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)1 和 2 的 siRNA 对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠 Smad7 蛋白表达的影响。**方法:**采用前期构建的 TIMP-1 siRNA、TIMP-2 siRNA 治疗肝纤维化大鼠的肝脏组织作为研究对象,分为正常组、模型组、阴性对照组(0.25 mg/kg 非特异性靶序列)、TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组和 TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组。Real-time PCR 法检测 Smad7 的 mRNA 表达;免疫组织化学、Western blot 检测 Smad7 的蛋白表达。**结果:**Real-time PCR 结果显示 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组(59.7 ± 3.3)%、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组(60.2 ± 3.4)% Smad7 的 mRNA 表达量均较模型组(28.0 ± 1.6)%、阴性对照组(28.6 ± 1.7)%明显增加($P=0.000$);免疫组织化学结果显示 TIMP-1 siRNA 0.25mg/kg 组(8.55 ± 0.67)、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组(8.23 ± 0.85)Smad7 的蛋白表达量均较模型组(4.25 ± 0.53)、阴性对照组(4.19 ± 0.55)明显增加($P=0.000$)。Western blot 结果显示 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组(0.706 ± 0.039)、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组(0.698 ± 0.038) Smad7 的蛋白表达量均较模型组(0.278 ± 0.013)、阴性对照组(0.285 ± 0.014)明显增加($P=0.000$)。**结论:**TIMP-1 siRNA、TIMP-2 siRNA 对于肝纤维化 Smad7 的表达有促进作用。

【关键词】siRNA;肝纤维化;Smad7;基质金属蛋白酶抑制剂**【中图分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-07-02

Effect of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 siRNA on the expression of Smad7 protein in hepatic fibrosis rats

Zhang Min, Jiang Yujie, Shi Xiaofeng, Liu Qi, Sun Hang

(Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the expression of Smad7 protein in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis rats treated with TIMP-1 short interference RNA (siRNA) and TIMP-2 siRNA. **Methods:** The hepatic tissues collected from hepatic fibrosis rats were divided into 5 groups: normal group, model group, negative control group, TIMP-1 siRNA 0.250 mg/kg group and TIMP-2 siRNA 0.250 mg/kg group. The expression of Smad7 was detected by real-time PCR, immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Real-time PCR analysis showed that mRNA expression of Smad7 was significantly higher in TIMP-1 siRNA 0.250 mg/kg group (59.7 ± 3.3)% and TIMP-2 siRNA 0.250 mg/kg group (60.2 ± 3.4)% than in model group (28.0 ± 1.6)% and negative control group (28.6 ± 1.7)% ($P=0.000$). Immunohistochemistry showed that protein expression of Smad7 was significantly higher in TIMP-1 siRNA 0.250 mg/kg group (8.55 ± 0.67) and TIMP-2 siRNA 0.250 mg/kg group (8.23 ± 0.85) than in model group (4.25 ± 0.53) and negative control group (4.19 ± 0.55) ($P=0.000$). Western blot showed that protein expression of Smad7 was significantly higher in TIMP-1 siRNA 0.250 mg/kg group (0.706 ± 0.039) and TIMP-2 siRNA 0.250 mg/kg group (0.698 ± 0.038) than in the model group (0.278 ± 0.013) and negative control group (0.285 ± 0.014) ($P=0.000$). **Conclusion:** Silencing the TIMP-1 and TIMP-2 with siRNA could be involved in the improvement of the hepatic fibrosis in rats.

【Key words】siRNA; liver fibrosis; Smad7; tissue inhibitor of metalloproteinases

作者介绍: 张 敏, Email: 164167402@qq.com,

研究方向: 病毒性肝炎及肝硬化的研究和治疗。

通信作者: 石小枫, Email: sxf7776@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81270503)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000174.html>

肝纤维化是肝细胞外基质产生大于降解的病理过程,肝星状细胞的激活和转化是肝纤维化形成的中心环节和必要条件^[1]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是目前公认的强效致纤维化细胞因子之一,可通过激活肝星状细胞,促进细胞外基质产生而促进肝纤维化的发生发展。Smad7 是 TGF- β /Smad 信号通路中最主要的负反馈抑制蛋白,因此,对 Smad7 表达调控成为近年来研究的热点。Song 等^[2]对中国传统复方汤剂(金三莪)研究显示,金三莪可能是通过抑制 TGF- β 、T β R II 和 Smad3 的表达,上调 Smad7 的表达来发挥抗肝纤维化的作用。依那普利可通过上调 Smad7 的表达和抑制 TGF- β 1、结缔组织因子和 α -SMA 的表达显著减轻肾间质纤维化^[3]。在前期研究工作中成功构建了基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)-1 和 TIMP-2 的 siRNA,在体外实验中验证了其转染效率,并对肝星状细胞表达 TIMP-1 和 TIMP-2 有明显的抑制作用^[4]。胡迎宾等的研究^[5]表明化学合成经修饰抗 TIMP-2 siRNA 能够抑制胆总管结扎大鼠肝纤维化形成,有可能成为肝纤维化治疗的新策略。本研究是在体外实验的基础之上,进一步探讨 TIMP-1 siRNA 和 TIMP-2 siRNA 对 Smad7 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 肝组织 来源于前期研究工作中石蜡包埋的肝组织及液氮中冻存的肝组织。

1.1.2 实验试剂 RNA 提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司;RNA 逆转录试剂盒和 real-time PCR 试剂盒购于大连 TaKaRa 公司;兔/鼠通用型 Streptavidin-HRP 购于北京康为世纪生物科技有限公司;抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体和山羊抗兔-HRP 二抗购于武汉博士德生物工程有限公司;Smad7 兔抗鼠多克隆抗体购于宜百康生物科技股份有限公司;RIPA 裂解液购于北京百泰克生物技术有限公司;ECL 化学发光液购自南京凯基生物科技有限公司;DAB 显色试剂盒购于碧云天生物技术研究。

1.2 实验方法

1.2.1 Real-time PCR 将保存于液氮的肝脏组织按照百泰克 RNA 提取试剂盒提取肝组织总 RNA,紫外线分光光度计测定 RNA 浓度。按 real-time PCR 试剂盒说明书取 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA,然后以 Sybr Green 作为荧光标记物,在 ABI7300 荧光实时定量 PCR 仪(Roche 公司,德国)上进行

PCR 反应。PCR 引物如下:Smad7 上游 5'-TGCTGTGCAAAGT-GTTCAGGTG-3';下游 5'-CCATCGGGTATCTGGAGTAAG-GA-3';GAPDH 上游 5'-TGATTCTACCCACGGCAAGTT-3';下游 5'-TGATGGGTTTCCCATTTGATGA-3';反应条件如下:预变性(95 $^{\circ}$ C 10 s);PCR 反应(40 个循环;95 $^{\circ}$ C 5 s;60 $^{\circ}$ C 31 s)。并增加溶解曲线步骤:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法来计算相对 mRNA 的含量, $\Delta CT=CT(\text{目的基因})-CT(\text{管家基因 GAPDH})$, $\Delta\Delta CT=\Delta CT(\text{实验组})-\Delta CT(\text{正常组})$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示实验组目的基因 mRNA 的含量相对对照组所改变的倍数。

1.2.2 免疫组织化学检测 将石蜡包埋的肝组织,3~5 μ m 连续切片,采用 SP 法作免疫组织化学染色,按照试剂盒说明书步骤进行,DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,封片。对照实验:省略一抗用 PBS 缓冲液代替一抗,检测结果为阴性,证实此免疫组织化学检测结果是特异性的。Smad7 工作浓度为 1:100 免疫组化半定量分析,采用 IPP 16.0 软件检测阳性组织平均吸光度值。

1.2.3 Western blot 印迹检测 按照蛋白提取试剂盒说明书步骤提取大鼠肝组织蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度并调整蛋白浓度为 20 mg/ml。蛋白样品与 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液等体积混合后 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min 使蛋白变性,在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,完毕后采用湿转法将凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h,先后加入特异性一抗和相对应的二抗,最后经 ECL 发光显影或 DAB 显色。采用特异性基因光密度/管家基因光密度(β -actin)相对定量。Quantity One4.6.2 图像分析软件分析。

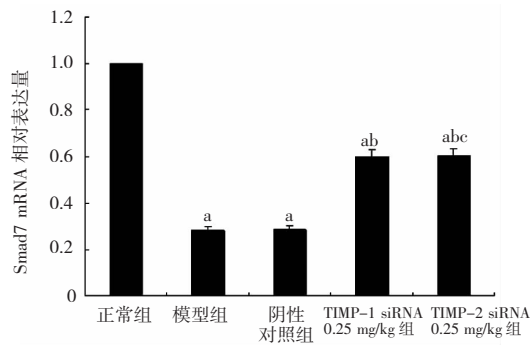
1.3 统计学处理

所有资料采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行处理,所得到的数值均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD- t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Real-time PCR 检测结果

以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 比较 Smad7 mRNA 水平定量检测结果,以正常组的组织中 Smad7 的 mRNA 水平为对照(即 100%),图 1 结果显示,模型组、阴性对照组、TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组和 TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组的组织中表达量为正常组的 $(28.0 \pm 1.6)\%$ 、 $(28.6 \pm 1.7)\%$ 、 $(59.7 \pm 3.3)\%$ 和 $(60.2 \pm 3.4)\%$ 。方差分析 5 组 Smad7 mRNA 表达水平的差异具有统计学意义($F=768.814$, $P=0.000$)。两两比较结果显示 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组 Smad7 的 mRNA 表达量均较模型组、阴性对照组明显增加($P=0.000$),TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组 Smad7 的 mRNA 表达量均较正常组明显减少($P=0.000$);而 TIMP-1 治疗组和 TIMP-2 治疗组之间没有明显差异($P=0.744$)。见图 1。



a. 与正常组比较 $P=0.000$; b. 与模型组及阴性对照组比较 $P=0.000$;
c. 与 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组比较 $P=0.744$

图 1 Real-time PCR 检测大鼠 Smad7 mRNA 表达水平
Fig.1 Smad7 mRNA expression in rats detected by real-time PCR

2.2 免疫组织化学检测

正常组大鼠肝组织中 Smad7 表达量较多,呈棕黄色的颗粒,着色较深,主要阳性表达部位在汇管区和中央静脉周围的细胞胞浆。模型组和阴性对照组仅有少量表达,且着色较浅;表 1 所示:正常组、模型组、阴性对照组、TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组的平均吸光度值分别为 11.27 ± 1.15 、 4.25 ± 0.53 、 4.19 ± 0.55 、 8.55 ± 0.67 、 8.23 ± 0.85 。5 组 Smad7 蛋白表达水平的差异具有统计学意义 ($F=75.625$, $P=0.000$)。两两比较结果显示 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组 Smad7 的蛋白表达量均较模型组、阴性对照组明显增加 ($P=0.000$), TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组 Smad7 的蛋白表达量均较正常组明显减少 ($P=0.000$) 而 TIMP-1 治疗组和 TIMP-2 治疗组之间没有明显差异 ($P=0.528$)。见图 2, 表 1。

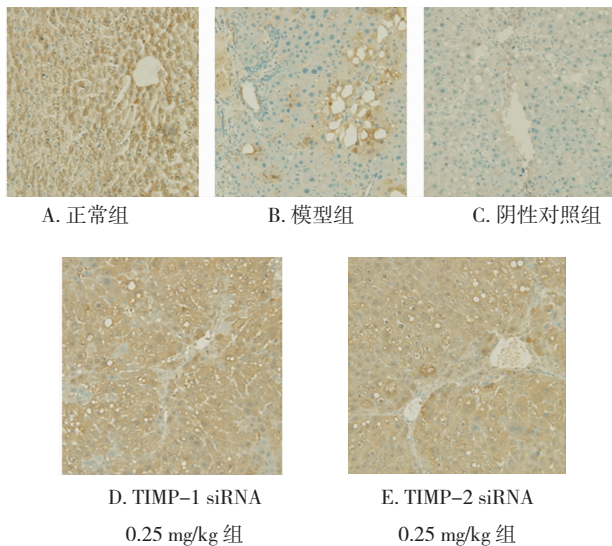


图 2 免疫组化检测大鼠肝脏组织 Smad7 蛋白的表达 (200 ×)
Fig.2 Smad7 protein expression detected by immunohistochemistry (200 ×)

表 1 检测各组 Smad7 的平均吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

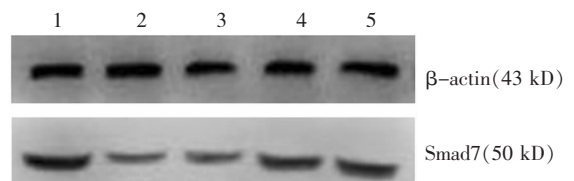
Tab.1 Average positive absorbance of Smad7 in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	免疫组化法 Smad7 表达	Western blot 法 Smad7 表达
正常组	11.27 ± 1.15	0.853 ± 0.045
模型组	4.25 ± 0.53^a	0.278 ± 0.013^d
阴性对照组	4.19 ± 0.55^a	0.285 ± 0.014^d
TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组	8.55 ± 0.67^{ab}	0.706 ± 0.039^{de}
TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组	8.23 ± 0.85^{abc}	0.698 ± 0.038^{de}
F 值	75.625	323.650
P 值	0.000	0.000

注: a. 与正常组比较 $P=0.000$; b. 与模型组及阴性对照组比较 $P=0.000$;
c. 与 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组比较 $P=0.528$; d. 与正常组比较 $P=0.000$;
e. 与模型组及阴性对照组比较 $P=0.000$; f. 与 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组比较 $P=0.705$

2.3 Western blot 检测结果

Western blot 结果示: 以蛋白 Marker 为参照, 各组均在 50 kD 处显示条带, 说明各组均有 Smad7 的表达。β-actin 表达位于 43 kD 处, 以 β-actin 作为内参, 采用 Quantity One4.6.2 软件定量分析各组 Smad7 的蛋白表达水平。表 2 所示: 正常组、模型组、阴性对照组、TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组分别为: 0.853 ± 0.045 、 0.278 ± 0.013 、 0.285 ± 0.014 、 0.706 ± 0.039 、 0.698 ± 0.038 。方差分析 5 组 Smad7 蛋白表达水平的差异, 差异具有统计学意义 ($F=323.656$, $P=0.000$)。两两比较结果显示 TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组 Smad7 的蛋白表达量均较模型组、阴性对照组明显增加 ($P=0.000$), TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组、TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组 Smad7 的蛋白表达量均较正常组明显减少 ($P=0.000$); 而 TIMP-1 治疗组和 TIMP-2 治疗组之间没有明显差异 ($P=0.705$)。见图 3, 表 1。



1. 正常组; 2. 模型组; 3. 阴性对照组; 4. TIMP-1 siRNA 0.25 mg/kg 组; 5. TIMP-2 siRNA 0.25 mg/kg 组

图 3 Western blot 检测大鼠肝脏组织 Smad7 蛋白的表达
Fig.3 Smad7 protein expression detected by Western blot

3 讨论

肝纤维化是大多数慢性肝病共有的病理特征, 是慢性肝炎向肝硬化发展的必经病理过程^[6]。CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化模型是一个经典模型, 在肝纤维化

模型成功后,停止用 CCl_4 诱导,大鼠肝纤维化也有类似的逆转恢复期,然而其逆转恢复期的机制尚不清楚^[7-8]。各种损伤因子作用于肝脏,激活 HSC, MMPs 及其抑制物 TIMPs 的复合物是由 HSC 分泌表达的。在肝损伤的早期阶段, HSC 短暂的表达 MMP-3、MMP-1 (人) 或 MMP-13 (鼠), 而 TIMP-1、TIMP-2 表达较少, 呈现一种基质降解为主的表现型^[9]。随着肝纤维化的进一步发展, 在人类的慢性肝病及鼠的肝纤维化的模型中都观察到 MMP-1/MMP-13 并无明显的变化, 但 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达却显著增加^[10], 从而抑制了基质的降解, 加速肝纤维化进展。Smad7 蛋白由氨基末端和羧基末端的 MH2 结构域以及连接区(包括 PY 模序)构成, smurf1 和 smurf2 都是 E3 泛素连接酶的成员, smurf1 含有 2 个 ww、氨基端的 C2 及羧基末端的 HECT 结构域, smurf2 则含有 3 个 ww 结构域。Smad7 能通过 PY 结构域与 smurf1 结合, 形成复合物后一起从核内转入胞浆, 随后 smurf1 的 C2 结构域与 T β RI 相互作用结合, 介导 Smad7 和 T β RI 泛素化, 再由蛋白酶降解, 从而中止 TGF- β 信号转导^[11]。卢凤关等^[12]研究结果表明, 红景天通过抑制 Smad4、促进 Smad7 的表达, 保护纤维化肝组织内包括 HSC 在内的细胞周围正常的基底膜样细胞间质, 抑制 HSC 的活化与肝纤维化的发展, 从而有效地干预了 TGF- β 介导的肝纤维化信号转导过程。因此, 既抑制 TIMPs 又促进 Smad7 的表达, 比单独作用于其中一条通路抗纤维化效果更强^[13]。

本研究观察了抑制 TIMP-1 和 TIMP-2 表达后对 Smad7 蛋白表达的影响, 以进一步多方面验证 TIMP-1 siRNA 和 TIMP-2 siRNA 的作用效应。本课题组对 Smad 家族中的 Smad7 进行了研究, 结果显示经过干扰大鼠 TIMP-1 和 TIMP-2 表达后, 用免疫组织化学、Western blot 及 real-time PCR 方法检查, 检查结果均显示抗肝纤维化因子 Smad7 表达量明显增加, 和模型组及空质粒组比较, 差异具有统计学意义; 而 TIMP-1 治疗组和 TIMP-2 治疗组之间没有明显差异。TIMP-1 siRNA 和 TIMP-2 siRNA 一方面减少了促进肝纤维化发展的 TIMP-1 和 TIMP-2, 另一方面又增强了抑制肝纤维化进展的 Smad7 的表达, 从 2 个方面发挥抗肝纤维化作用。

参 考 文 献

- [1] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 76-99.
- [2] Song SL, Gong ZJ, Zhang QR, et al. Effects of Chinese traditional compound, JinSanE, on expression of TGF- β 1 and TGF- β 1 type II receptor mRNA, Smad3 and Smad7 on experimental hepatic fibrosis in vivo[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(15): 2269-2276.
- [3] 王琳娜, 宁旺斌, 陶立坚, 等. 动态观察依那普利对单侧输尿管梗阻大鼠 TGF- β 1, CTGF, Smad7 和 α -SMA 的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2009, 34(3): 252-258.
- [4] 钱克莉, 徐宁, 郎清, 等. 转化生长因子 β 1 及基质金属蛋白酶抑制剂 1, 2siRNA 真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中华肝病杂志, 2011, 19(4): 291-296.
- [5] 胡迎宾, 田德安, 刘年华, 等. 化学合成经修饰抗 TIMP-2 小干扰 RNA 抑制胆总管结扎大鼠肝纤维化形成[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(6): 470-474.
- [6] Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2): 305-317.
- [7] Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors[J]. J Clin Invest, 1998, 102(3): 538-549.
- [8] Issa R, Zhou X, Trim N, et al. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl_4 -induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration[J]. FASEB J, 2003, 17(1): 47-49.
- [9] Knittel T, Mehde M, Grundmann A, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat[J]. Histochem Cell Biol, 2000, 113(6): 443-453.
- [10] Koulentaki M, Valatas V, Xidakis K, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in acute viral hepatitis[J]. J Viral Hepat, 2002, 9(3): 189-193.
- [11] Tajima Y, Goto K, Yoshida M, et al. Chromosomal region maintenance 1(CRM1)-dependent nuclear export of smad ubiquitin regulatory factor-1(Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor- β signaling by Smad7[J]. J Biol Chem, 2003, 278(12): 10716-10721.
- [12] 卢凤关, 刘东璞, 王明富, 等. 红景天对大鼠肝纤维化肝脏组织 Smad4、Smad7 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(6): 1314-1316.
- [13] 陈燕, 郑勇, 李睿, 等. Smad-7 与 Timp-1 siRNA 质粒联合作用对大鼠肝纤维化的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(8): 703-707.

(责任编辑: 冉明会)