

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001475

地塞米松对兔胆道成纤维细胞 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路表达的影响

李克跃, 石承先, 汤可立, 魏国微, 刘振华, 黎 涛, 张帅民, 徐贤刚

(贵州省人民医院肝胆外科, 贵阳 550002)

【摘要】目的:研究地塞米松(dexamethasone, DEX)对兔良性胆道狭窄(benign biliary stricture, BBS)模型胆管成纤维细胞(model fibroblast, MF)中 P311/转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/ α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)通路表达的影响。**方法:**取 2 只家兔正常胆管培养正常胆管成纤维细胞(normal bile duct fibroblasts, NF), 对 2 只家兔采用切开再吻合方法建立 BBS 模型并获取 MF, 进行细胞鉴定后分组为: NF、MF、MF+不同浓度的 DEX(0.02, 0.1 及 0.5 mg/mL)组, 各组给予对应浓度的 DEX 干预 48 h, CCK-8 细胞计数法测定各组细胞增殖水平; qRT-PCR 检测各组细胞 P311、TGF- β 1 及 α -SMA 基因 mRNA 表达水平; Western blot 检测各组细胞 TGF- β 1 及 α -SMA 蛋白表达水平。**结果:**①各组细胞 A 值: NF 为 0.331 ± 0.002 , MF 组为 0.533 ± 0.005 , MF+DEX 0.02 组为 0.487 ± 0.003 , MF+DEX 0.1 组为 0.434 ± 0.004 , MF+DEX 0.5 组为 0.381 ± 0.004 。②各组细胞 P311 mRNA 值: NF 组为 $1.000 0 \pm 0.024 8$, MF 组为 $4.146 3 \pm 0.037 1$, MF+DEX 0.02 组为 $3.789 9 \pm 0.056 8$, MF+DEX 0.1 组为 $3.566 1 \pm 0.148 1$, MF+DEX 0.5 组为 $2.945 8 \pm 0.165 4$ 。③各组细胞 TGF- β 1 mRNA 值 NF 组为 $1.000 0 \pm 0.034 6$, MF 组为 $2.647 9 \pm 0.048 5$, MF+DEX 0.02 组为 $1.929 7 \pm 0.054 8$, MF+DEX 0.1 组为 $1.678 2 \pm 0.080 2$, MF+DEX 0.5 组为 $1.676 2 \pm 0.036 9$ 。④各组细胞 α -SMA mRNA 值: NF 组为 $1.000 0 \pm 0.056 0$, MF 组为 $4.025 7 \pm 0.065 9$, MF+DEX 0.02 组为 $3.644 9 \pm 0.196 4$, MF+DEX 0.1 组为 $2.712 9 \pm 0.102 4$, MF+DEX 0.5 组为 $2.320 7 \pm 0.031 2$ 。⑤各组细胞 TGF- β 1 蛋白值: NF 组为 $0.999 6 \pm 0.046 3$, MF 组为 $2.096 3 \pm 0.029 3$, MF+DEX 0.02 组为 $1.781 8 \pm 0.040 4$, MF+DEX 0.1 组为 $1.531 4 \pm 0.032 5$, MF+DEX 0.5 组为 $1.384 0 \pm 0.035 7$ 。⑥各组细胞 α -SMA 蛋白值: NF 组为 $1.000 8 \pm 0.051 4$, MF 组为 $3.231 4 \pm 0.116 0$, MF+DEX 0.02 组为 $2.875 3 \pm 0.078 0$, MF+DEX 0.1 组为 $2.262 8 \pm 0.059 8$, MF+DEX 0.5 组为 $1.940 8 \pm 0.093 7$ 。在 DEX 干预 48 h 后, MF 增殖明显受到抑制, 细胞 P311、TGF- β 1 及 α -SMA 基因 mRNA 及蛋白表达明显下调(均 $P < 0.05$, 0.1~0.5 mg/mL), 呈现浓度依赖性。**结论:** DEX 抑制 BBS 形成的作用机制之一可能与它对 MF 中 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路的调控有关。

【关键词】良性胆道狭窄; 成纤维细胞; P311/转化生长因子- β 1/ α -平滑肌动蛋白; 地塞米松; 兔

【中图分类号】R982

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-06-08

Effect of dexamethasone on P311/TGF- β 1/ α -SMA signaling pathway in rabbit biliary fibroblasts

Li Keyue, Shi Chengxian, Tang Keli, Wei Guowei, Liu Zhenhua, Li Tao, Zhang Shuaimin, Xu Xiangang

(Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate effects of dexamethasone (DEX) on P311/transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/ α -smooth muscle actin (α -SMA) signaling pathway in benign biliary stricture (BBS) model fibroblast (MF). **Methods:** Two normal rabbits were treated with normal bile duct fibroblasts (NF), BBS model was established via discission and anastomosis of two rabbits and MF was acquired; then they were divided into five groups: NF, MF, MF plus different concentration of DEX (0.02, 0.1 and 0.5 mg/mL) groups. After respectively incubated with 48 h, cell proliferation was investigated by CCK-8; Relative mRNA expression of P311, TGF- β 1 and α -SMA were assessed by real-time PCR; Relative protein expression of TGF- β 1 and α -SMA were investigated by western blot.

Results: ① optical density (A) in each group: 0.331 ± 0.002 in the NF group, 0.533 ± 0.005 in the MF group, 0.487 ± 0.003 in the MF+DEX 0.02 group, 0.434 ± 0.004 in the MF+DEX 0.1 group, 0.381 ± 0.004 in the MF+DEX 0.5 group; ② P311 mRNA in each group: $1.000 0 \pm 0.024 8$ in the NF group, $4.146 3 \pm 0.037 1$ in the MF group, $3.789 9 \pm 0.056 8$ in the MF+DEX 0.02 group, $3.566 1 \pm 0.148 1$ in the MF+DEX 0.1 group, $2.945 8 \pm$

作者介绍: 李克跃, Email: keyuelee@sohu.com,

研究方向: 肝胆胰疾病的研究及外科治疗。

通信作者: 石承先, Email: ChengxianL@aliyun.com。

基金项目: 贵州省科技厅-贵州省人民医院联合基金资助项目(编号: 黔科合 LH 字[2016]7146)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.0957.016.html>
(2018-01-09)

0.654 0 in the MF+DEX 0.5 group; ③TGF- β 1 mRNA in each group:1.000 0 $\pm$ 0.034 6 in the NF group,2.647 9 $\pm$ 0.048 5 in MF group,1.929 7 $\pm$ 0.054 8 in the MF+DEX 0.02 group,1.678 2 $\pm$ 0.080 2 in MF+DEX 0.1 group and 1.676 2 $\pm$ 0.036 9 in the MF+DEX 0.5 group;④cells α -SMA mRNA in each group:1.000 0 $\pm$ 0.056 0 in the NF group,4.025 7 $\pm$ 0.065 9 in the MF group,3.644 9 $\pm$ 0.196 4 in the MF+DEX 0.02 group,2.712 9 $\pm$ 0.102 4 in the MF+DEX 0.1 group and 2.320 7 $\pm$ 0.031 2 in the MF+DEX 0.5 group;⑤TGF- β 1 protein values in each group:0.999 6 $\pm$ 0.046 3 in the NF group,2.096 3 $\pm$ 0.029 3 in the MF group,1.781 8 $\pm$ 0.040 4 in the MF+DEX 0.02 group,1.531 4 $\pm$ 0.032 5 in the MF+DEX 0.1 group,and 1.384 0 $\pm$ 0.035 7 in the MF+DEX 0.5 group;⑥The number of α -SMA protein in each group:1.000 8 $\pm$ 0.051 4 in the NF group,3.2314 $\pm$ 0.1160 in the MF group,2.875 3 $\pm$ 0.078 0 in the MF+DEX 0.02 group,2.262 8 $\pm$ 0.059 8 in the MF+DEX 0.1 group and 1.940 8 $\pm$ 0.093 7 in the MF+DEX 0.5 group. After 48 h of DEX intervention,cell proliferation was significantly inhibited and both the mRNA and protein expression of P311, TGF- β 1 and α -SMA(all $P < 0.05$,0.1~0.5 mg/mL) were significantly regulated down,with a dose-dependent manner. **Conclusion:** Mechanism of DEX on anti-BBS may be because it is relevant to modulation of P311/TGF- β 1/ α -SMA signaling pathway.

【Key words】benign biliary stricture;fibroblasts;P311/transforming growth factor- β 1/ α -smooth muscle actin;dexamethasone;rabbit

良性胆道狭窄(benign biliary stricture,BBS)是由于肝移植、胆道损伤、胆管炎反复发作等疾病引起的胆管腔瘢痕性缩窄,由于病因的不同而具有不同的特点^[1]。有报道显示肝移植及腹腔镜胆囊切除引起的 BBS 发病率分别为 3%~13%及 0.2%~0.7%^[2-4]。一般认为增生性瘢痕(hypertrophic scar,HS)的形成是导致 BBS 的直接原因,胆管瘢痕修复的过程就是 BBS 形成的过程。研究发现成纤维细胞大量增殖并转化为肌成纤维细胞是形成胆道瘢痕及 BBS 的主要原因,肌成纤维细胞的特点是阳性表达 α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA);转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1,TGF- β 1)在瘢痕及 BBS 形成过程中发挥了关键作用^[5-7]。报道显示 P311 基因可能通过 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路在 BBS 形成过程中发挥了重要作用^[8]。药物是治疗瘢痕的方式之一,但目前尚未有一种特效及可靠的药物用于临床^[9]。地塞米松(dexamethasone,DEX)已被用于治疗皮肤瘢痕性疾病^[10-12]。本课题组前期研究结果也提示 DEX 对兔 BBS 胆管成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 通路有调控作用^[13],但 DEX 对 BBS 模型成纤维细胞 P311/TGF- β 1/ α -SMA 的作用尚不清楚。本研究对 BBS 模型胆管成纤维细胞使用 DEX 干预,观察细胞内 P311、TGF- β 1、 α -SMA 表达及细胞增殖水平的变化,结果如下。

1 材料与方法

1.1 材料

抗-TGF- β 1 单克隆抗体(ab99562)及抗- α -SMA 单克隆

抗体(ab7817)购自英国 Abcam 公司;抗-细胞角蛋白单克隆抗体(C-1801)、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜及抗-波形蛋白单克隆抗体(V2258)购自美国 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的第二抗体及抗- β -Actin 单克隆抗体购自北京全式金生物技术有限公司;SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)购自大连宝生物工程有限公司;电化学发光试剂盒购自美国 Millipore 公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)购自瑞士 Roche 公司;全蛋白提取试剂盒、反转录试剂盒、UNIQ-10 柱式 TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒、 β -Actin 引物、 α -SMA 引物、Trizol、胰酶(0.25%)、青霉素-链霉素溶液、细胞计数法-8(cell counting kit-8,CCK-8)细胞计数盒、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、达尔伯克改良伊格培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)、氯仿购自上海生工生物工程有限公司;TGF- β 1 及 P311 引物购自上海 Introgen 公司;TGF- β 1 上游引物序列为:5'-GGCTCAC-CTTCTGCCCGTCT-3',下游引物序列为:5'-GTCTCGGTAT-CCCACGAAAGAAACG-3'; α -SMA 上游引物序列为:5'-GCTGTCCCTCTATGCCTCTG-3',下游引物序列为:5'-TAG-CCACGCTCAGTCAGGAT-3';P311 上游引物序列为:5'-TAATAAATGCCCTCTGAAAAAGCCA-3',下游引物序列为:5'-GGAGCAAGGACAAAAGTGTAATC-3'; β -actin 上游引物序列:5'-CTCTCCACCTTCCAGCAGAT-3',下游引物序列:5'-TGGCTCTAACAGTCCGCCTA-3';地塞米松磷酸钠注射液购自武汉华中药业有限公司(批号:20150204);清洁级家兔 4 只购自贵州医科大学实验动物中心。

1.2 动物模型的建立、细胞的获取及鉴定

家兔 4 只,其中 2 只用于建立 BBS 模型,2 只用于正常对照组,动物的饲养在贵州医科大学实验动物中心进行,分笼饲养,术前 12 h 禁食,动物未出现死亡、胆瘘等并发症。使用 2.5%戊巴比妥钠溶液(35~45 mg/kg)静脉麻醉,上腹部正中

4~6 cm 长切口,切开皮肤皮下组织,暴露胆总管,BBS 模型组在近十二指肠处游离一段长约 1 cm 的胆总管,横向切开胆总管到胆总管周径的约 1/3,用 Dexon 线缝合胆总管,逐层关腹,手术完毕^[6]。对照组开腹后就关腹,不打开胆总管,术后禁食 12 h 后正常进食。取 BBS 模型组及正常胆管对照组术后 1 周胆管壁^[6],取材时见切开缝合部位的胆管充血水肿明显,近端胆管明显扩张,肝脏呈轻度淤胆表现,与以前文献报道一致^[14]。胆管经无菌磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution,PBS)清洗 3 次,然后修剪为 2~3 mm³ 大小。转移组织到细胞培养瓶中,放入体积分数为 5% CO₂、37 °C 的培养箱中干燥贴壁 4 h,加入少量含有 100 mg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素及 20%(v/v)FBS 的 DMEM 培养液进行培养^[8,15]。分离纯化成纤维细胞,细胞生长至 80% 左右时传代。细胞免疫荧光法检测细胞波形蛋白及角蛋白抗体的表达进行细胞鉴定^[8,13]。实验所用细胞为第 3~5 代成纤维细胞。

1.3 实验分组及其处理

实验分组:正常成纤维细胞组(normal fibroblasts,NF)即空白对照组;BBS 模型成纤维细胞组(model fibroblasts,MF);MF+不同浓度的 DEX 组(DEX 浓度分别为 0.02、0.10、0.50 mg/mL);消化细胞后,转移到 6 孔/96 孔(细胞增殖测定用)板,细胞密度为 2×10^5 个/孔(6 孔板)或 2×10^4 个/孔(96 孔板),含 10%FBS 的完全培养基培养 4 h 后用无 FBS 的培养基饥饿过夜,根据分组的不同使用含有对应浓度药物的培养基在 37 °C 及体积分数为 5%CO₂ 培养箱内分别培养 48 h。

1.4 观察指标及测定方法

1.4.1 细胞免疫荧光法鉴定成纤维细胞 取胰酶消化的第 3 代细胞, 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后进行检测,步骤为:用 PBS 将盖玻片上的细胞快速清洗 3 次;4%多聚甲醛室温下固定 15 min;0.1%Triton-100 室温孵育 10 min;10%山羊血清室温封闭 30 min;第一抗体(用 PBS 1:200 稀释)4 °C 孵育过夜;第二抗体室温孵育 30 min;加 1:100 稀释的 DAPI;封片,荧光显微镜观察、拍照;阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.4.2 CCK-8 法测定成纤维细胞的增殖水平 按照 2×10^4 个/孔接种细胞于 96 孔板,每孔 100 μ L,做 5 个复孔。在 37 °C 及 5%CO₂ 条件下培养 24 h,根据分组的不同加入对应浓度的地塞米松培养 48 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 培养 2.5 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度(absorbance,A)值,采用扣除本底的策略来消除误差。

1.4.3 qRT-PCR 方法检测各组细胞中 P311、TGF- β 1 及 α -SMA mRNA 的表达 提取各组细胞总 RNA,将纯度好及完整性高的 RNA 合成 cDNA。real-time PCR 反应体系为 20 μ L,2 $\times$ SYBR Premix 10 μ L,上、下游引物各 0.8 μ L,cDNA 2 μ L,双蒸水 6 μ L,ROX Reference Dye(50 $\times$)0.4 μ L,重复 4 次。PCR 反应条件:95 °C、30 s,40 个扩增循环(95 °C、5 s,60 °C、30 s)。ABI Stepone real-time PCR 系统采集及分析结果, β -

actin 为内参,溶解曲线为单峰表示引物特异性好, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

1.4.4 Western-blot 方法检测各组细胞中 TGF- β 1 及 α -SMA 蛋白的表达 提取各组细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法测定蛋白浓度,在聚丙烯酰胺凝胶中进行蛋白电泳,进行 PVDF 转膜后给予封闭,在 4 °C 冰箱内孵育一抗(1:5 000 稀释)过夜,TBST(Tris Buffered Saline,with Tween-20)洗 PVDF 膜 3 次。室温下振荡孵育二抗 2 h(1:5 000 稀释),TBST 洗 PVDF 膜 3 次。电化学发光,显影、定影后拍照及扫描胶片, β -actin 为内参,用 Quantity one 系统分析蛋白条带灰度值。

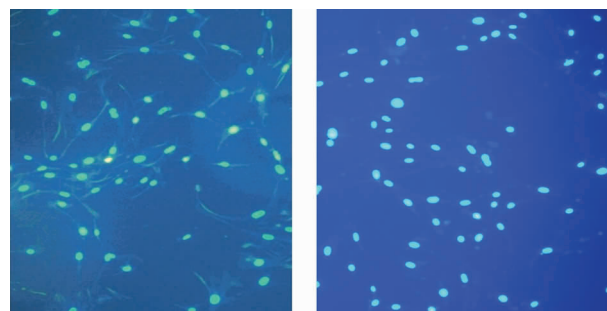
1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,实验数据表达用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析进行多组间数据比较,组间两两比较采用 Bonferroni 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 成纤维细胞的鉴定

原代培养的成纤维细胞呈不规则三角形,胞质淡而透明,折光性弱,细胞核较大,呈椭圆形,通常含 2~3 个核,随后逐渐变为梭形的成纤维样细胞。第 3 代成纤维样细胞免疫荧光后波形蛋白阳性染色,角蛋白阴性染色,符合成纤维细胞的特点,如图 1 所示。



A. 波形蛋白阳性

B. 角蛋白阴性

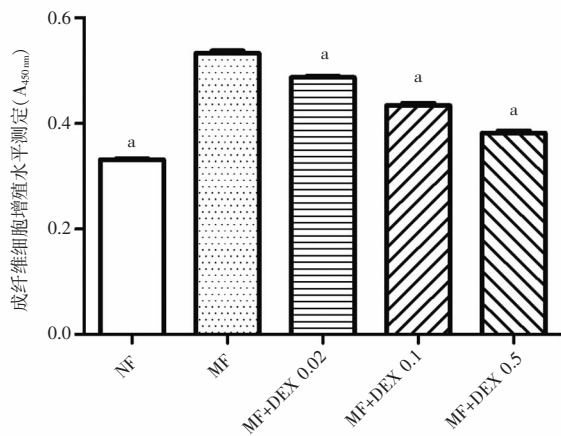
成纤维细胞在免疫荧光染色后表现为波形蛋白阳性(A)和细胞角蛋白阴性(B),符合成纤维细胞的特点(100 $\times$)

图 1 兔胆管成纤维细胞的鉴定

Fig.1 Identification of rabbit bile duct fibroblasts

2.2 各组细胞增殖水平的测定及地塞米松的干预作用

NF 的 A 值为 0.331 ± 0.002 ,MF 组 A 值为 0.533 ± 0.005 ,MF+DEX 0.02 组 A 值为 0.487 ± 0.003 ,MF+DEX 0.1 组 A 值为 0.434 ± 0.004 ,MF+DEX 0.5 组 A 值为 0.381 ± 0.004 ,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F=417.100, P=0.000$);MF 的 A 值较 NF 的 A 值高($P=0.000$),MF 联合不同浓度的 DEX 组 A 值较 MF 组 A 值低(均 $P=0.000$,DEX 0.02~0.50 mg/mL),如图 2 所示。



DEX(地塞米松),a 表示与 MF(BBS 模型胆管成纤维细胞)组相比较, $P<0.05$

图 2 不同浓度的地塞米松对兔 BBS 模型胆管成纤维细胞增殖水平的影响

Fig.2 DEX effect on rabbit BBS model bile duct fibroblasts proliferation

2.3 各细胞 P311、TGF- β 1 及 α -SMA 基因 mRNA 表达水平的测定及地塞米松的干预作用

各组细胞 P311 mRNA 的相对表达量:经单因素方差分析,各组细胞 P311 mRNA 相对表达量的差异有统计学意义($F=142.624, P=0.000$);MF 组的 P311 mRNA 表达较 NF 组的高($P=0.000$),MF 联合不同浓度的 DEX 组 P311 mRNA 表达较 MF 组低(MF+DEX 0.02 组与 MF 组比较, $P=0.291$,MF+DEX 0.1 组与 MF 组比较, $P=0.013$,MF+DEX 0.5 组与 MF 组比较, $P=0.000$),见表 1。

表 1 DEX 对 BBS 模型胆管成纤维细胞 P311、TGF- β 1 及 α -SMA 基因 mRNA 表达的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 DEX effect on BBS model fibroblasts of P311, TGF- β 1 and α -SMA mRNA expression ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	P311	TGF- β 1	α -SMA
NF	1.000 0 $\pm$ 0.024 8 ^a	1.000 0 $\pm$ 0.034 6 ^a	1.000 0 $\pm$ 0.056 0 ^a
MF	4.146 3 $\pm$ 0.037 1	2.647 9 $\pm$ 0.048 5	4.025 7 $\pm$ 0.065 9
MF+DEX 0.02	3.789 9 $\pm$ 0.056 8	1.929 7 $\pm$ 0.054 8 ^a	3.644 9 $\pm$ 0.196 4
MF+DEX 0.1	3.566 1 $\pm$ 0.148 1 ^a	1.678 2 $\pm$ 0.080 2 ^a	2.712 9 $\pm$ 0.102 4 ^a
MF+DEX 0.5	2.945 8 $\pm$ 0.165 4 ^a	1.676 2 $\pm$ 0.036 9 ^a	2.320 7 $\pm$ 0.031 2 ^a
F 值	142.624	122.403	123.352
P 值	0.000	0.000	0.000

注:Nf 为正常胆管成纤维细胞,MF 为 BBS 模型胆管成纤维细胞,DEX 为地塞米松;a:与 MF 组相比, $P<0.05$

各组细胞 TGF- β 1 基因 mRNA 的相对表达量:经单因素方差分析,各组细胞 TGF- β 1 基因 mRNA 相对表达量的差异有统计学意义($F=122.403, P=0.000$);MF 组 TGF- β 1 基因的 mRNA 表达较 NF 组的高($P=0.000$),MF 联合不同浓度的 DEX 组 TGF- β 1 基因 mRNA 表达较 MF 组低(均 $P=0.000$,

DEX 0.02~0.5 mg/mL),见表 1。

各组细胞 α -SMA 基因 mRNA 的相对表达量:经单因素方差分析,各组细胞 α -SMA 基因 mRNA 相对表达量的差异有统计学意义($F=123.352, P=0.000$);MF 组的 α -SMA 基因 mRNA 表达较 NF 组的高($P=0.000$),MF 联合不同浓度的 DEX 组 α -SMA 基因 mRNA 表达较 MF 组低(MF+DEX 0.02 组与 MF 组比较, $P=0.240$,MF+DEX 0.1 组及 MF+DEX 0.5 组与 MF 组比较,均 $P=0.000$),见表 1。

2.4 各组细胞 TGF- β 1 及 α -SMA 蛋白表达水平的测定及地塞米松的干预作用

各组细胞 TGF- β 1 蛋白的相对表达量:经单因素方差分析,各组细胞 TGF- β 1 蛋白相对表达量的差异有统计学意义($F=122.559, P=0.000$);MF 组的 TGF- β 1 蛋白表达较 NF 组的高($P=0.000$),MF 联合不同浓度的 DEX 组 TGF- β 1 蛋白表达较 MF 组低,DEX 为 0.02~0.5 mg/mL,均 $P=0.000$,如表 2 及图 3 所示。

各组细胞 α -SMA 蛋白的相对表达量:经单因素方差分析,各组细胞 α -SMA 蛋白相对表达量的差异有统计学意义($F=108.974, P=0.000$);MF 组的 α -SMA 蛋白表达较 NF 组的高($P=0.000$),MF 联合不同浓度的 DEX 组 α -SMA 蛋白表达较 MF 组低(MF+DEX 0.1 组及 MF+DEX 0.5 组与 MF 组比较,均 $P=0.000$,MF+DEX 0.02 组与 MF 组比较, $P=0.084$),如表 2 及图 3 所示。

表 2 DEX 对 BBS 模型胆管成纤维细胞 TGF- β 1 及 α -SMA 蛋白表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 DEX effect on BBS model fibroblasts of TGF- β 1 and α -SMA protein expression ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	TGF- β 1	α -SMA
NF	0.999 6 $\pm$ 0.046 3 ^a	1.000 8 $\pm$ 0.051 4 ^a
MF	2.096 3 $\pm$ 0.029 3	3.231 4 $\pm$ 0.116 0
MF+DEX 0.02	1.781 8 $\pm$ 0.040 4 ^a	2.875 3 $\pm$ 0.078 0
MF+DEX 0.1	1.531 4 $\pm$ 0.032 5 ^a	2.262 8 $\pm$ 0.059 8 ^a
MF+DEX 0.5	1.384 0 $\pm$ 0.035 7 ^a	1.940 8 $\pm$ 0.093 7 ^a
F 值	122.559	108.974
P 值	0.000	0.000

注:Nf 为正常胆管成纤维细胞,MF 为 BBS 模型胆管成纤维细胞,DEX 为地塞米松;a:与 MF 组相比, $P<0.05$

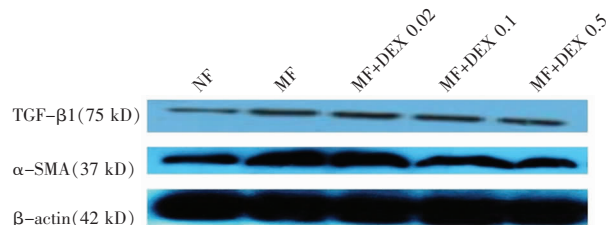


图 3 不同浓度的地塞米松对兔 BBS 模型胆管成纤维细胞 TGF- β 1 及 α -SMA 蛋白表达的影响

Fig.3 DEX effect on BBS model fibroblasts of TGF- β 1 and α -SMA protein expression

3 讨论

损伤修复过程中不可避免地会形成增生性瘢痕,而增生性瘢痕又形成不同程度的瘢痕^[6]。组织通过塑形可纠正轻微的瘢痕,但组织塑形难以消除过多的瘢痕。增生性瘢痕在胆道的形成伴随着较高的 BBS 发病率。

成纤维细胞在组织损伤修复过程中发挥了重要作用。组织损伤后,成纤维细胞一方面大量增殖,另一方面又转化为 α -SMA 阳性表达的肌成纤维细胞,分泌大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)促进组织修复。肌成纤维细胞具有成纤维细胞及平滑肌细胞的特点。一般情况下,一旦创面完全表皮化,肌成纤维细胞及成纤维细胞等组织修复细胞就放缓增殖,细胞外基质的分泌同时也减少,组织修复趋于停止;然而,如果成纤维细胞及肌成纤维细胞过度增殖,细胞外基质过多积聚,则形成增生性瘢痕^[7]。成纤维细胞也是胆管瘢痕修复及 BBS 形成的主要效应细胞^[6-7]。而 TGF- β 1 是调控胆管瘢痕成纤维细胞及肌成纤维细胞中 α -SMA 表达的主要因素^[5]。

TGF- β 1 是由上皮细胞、成纤维细胞及造血细胞等细胞分泌的,有多种生物学活性的细胞因子,在细胞的免疫调节、增殖、分化及瘢痕形成、器官纤维化、肿瘤进展等过程中均发挥了重要作用^[18]。组织创伤后,肌成纤维细胞及成纤维细胞中的 TGF- β 1 表达显著上调,同时,TGF- β 1 反过来又刺激成纤维细胞、肌成纤维细胞增殖及组织修复。持续过表达或过度作用的 TGF- β 1 将引起成纤维细胞、肌成纤维细胞过度增殖及细胞外基质过度分泌,从而形成增生性瘢痕。在形成瘢痕及胆管瘢痕过程中,TGF- β 1 是最重要的细胞因子^[5-7]。TGF- β 1 主要通过与其相应受体 T β R I、T β R II、T β R III 结合形成复合物后调控 Smad2/Smad3、Smad4、Smad6/Smad7 等蛋白形成 TGF- β 1/Smads 信号传导通路发挥作用,该通路可自行通过正反馈及负反馈进行调节^[18]。报道显示在胆管瘢痕组织中,TGF- β 1、T β R I、T β R II、Smad4 等 TGF- β 1/Smads 通路的主要成分均明显增高,提示 TGF- β 1/Smads 信号传导通路在胆管瘢痕修复及 BBS 形成过程中发挥重要作用^[9]。抑制瘢痕组织及

瘢痕成纤维细胞中 TGF- β 1/Smads 通路的表达是目前治疗瘢痕的重要措施之一^[19-20]。本实验结果提示在 BBS 模型胆管成纤维细胞中,TGF- β 1 的表达较正常胆管成纤维细胞中 TGF- β 1 的表达明显上调 ($P<0.05$),提示 TGF- β 1 在胆道瘢痕修复及 BBS 形成过程中发挥了重要作用。

P311(neuronal regeneration related protein,NREP)基因含有在人等物种间高度保守的泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin/proteasome pathway)的结合位点 PEST 域(1 个富含脯氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸及丝氨酸的约 10 个氨基酸组成的序列),该位点在调节细胞内蛋白质代谢过程中发挥重要作用。如前所述,TGF- β 1 通过 TGF- β 1/Smads 信号传导通路在胆管瘢痕及 BBS 形成过程中发挥关键作用,为维持 Smad 通路信号的正常传导,Smads 在转录表达后通过泛素-蛋白酶体通路进行降解^[21]。正常皮肤成纤维细胞转染 P311 基因后 TGF- β 1 及 α -SMA 的表达明显上调,且 P311 基因在皮肤瘢痕组织成纤维细胞及肌成纤维细胞中高度表达,提示成纤维细胞中 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路在调控增生性瘢痕的形成过程中可能发挥重要作用^[22]。本课题组前期研究也提示 P311 基因在 BBS 模型胆管成纤维细胞及 TNF- α 处理的胆管成纤维细胞中的表达均明显增高,提示 P311 基因在 BBS 形成过程中可能发挥重要作用^[8,15]。

地塞米松是临床常用的糖皮质类激素,具有较强的抗炎、免疫抑制等作用。报道显示地塞米松有抑制瘢痕成纤维细胞增殖、抑制瘢痕形成等作用,其机制可能与调控 TGF- β 1/Smads 信号转导通路等因素有关^[10-12]。本课题组前期研究结果也提示地塞米松可能通过对兔 BBS 胆管成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 通路及 I 型胶原、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)、第 10 号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10,PTEN)的调控抑制胆管瘢痕的形成^[13,23],也能通过调控白细胞介素-13(interleukin-13)干预的胆管成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 通路的表达抑制胆管瘢痕的形成^[24]。本实验结果提示适当浓度的地塞米松能下调 BBS 模型胆管成纤维细胞(DEX 0.1~0.5 mg/mL, $P<0.05$)P311、TGF- β 1、 α -SMA 基因 mRNA 及蛋白的表达,从而抑

制 BBS 模型胆管成纤维细胞(DEX 0.02~0.5 mg/mL, $P<0.05$)的增殖,且浓度越高,抑制作用越强(DEX 0.02~0.5 mg/mL)。提示 DEX 抑制 BBS 形成的作用机制之一可能与它对 MF 中 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路的调控有关。

综上所述,BBS 胆管成纤维细胞增殖较 NF 细胞明显加快,该细胞中 P311、TGF- β 1、 α -SMA 基因 mRNA 及蛋白质的表达较 NF 细胞明显上调,提示 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路在 BBS 形成过程中可能发挥重要作用,而 DEX 抑制 BBS 形成的作用机制之一可能与它对 MF 中 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路的调控有关。

参 考 文 献

- [1] Shimada H, Endo I, Shimada K, et al. The current diagnosis and treatment of benign biliary stricture[J]. Surg Today, 2012, 42(12): 1143-1153.
- [2] MacFadyen BV Jr, Vecchio R, Ricardo AE, et al. Bile duct injury after laparoscopic cholecystectomy. The United States experience[J]. Surg Endosc, 1998, 12(4): 315-321.
- [3] Pascher A, Neuhaus P. Bile duct complications after liver transplantation[J]. Transpl Int, 2005, 18(6): 627-642.
- [4] Windsor JA, Pong J. Laparoscopic biliary injury: more than a learning curve problem[J]. Aust N Z J Surg, 1998, 68(3): 186-189.
- [5] Geng ZM, Zheng JB, Zhang XX, et al. Role of transforming growth factor-beta signaling pathway in pathogenesis of benign biliary stricture[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(31): 4949-4954.
- [6] Geng ZM, Yao YM, Liu QG, et al. Mechanism of benign biliary stricture: a morphological and immunohistochemical study[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(2): 293-295.
- [7] Xu J, Geng ZM, Ma QY. Microstructural and ultrastructural changes in the healing process of bile duct trauma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 2(2): 295-299.
- [8] Li KY, Shi CX, Huang JZ, et al. Tetramethylpyrazine effects on the expression of scar-related genes in rabbit benign biliary stricture fibroblasts[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2016, 26(10): 813-817.
- [9] Huang C, Ogawa R. Pharmacological treatment for keloids[J]. Expert Opin Pharmacother, 2013, 14(15): 2087-2100.
- [10] Syed F, Bayat A. Superior effect of combination vs. single steroid therapy in keloid disease: a comparative in vitro analysis of glucocorticoids[J]. Wound Repair Regen, 2013, 21(1): 88-102.
- [11] Wrzeszcz A, Dittrich B, Haamann D, et al. Dexamethasone released from cochlear implant coatings combined with a protein repellent hydrogel layer inhibits fibroblast proliferation[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(2): 442-454.
- [12] Schwartze JT, Becker S, Sakkas E, et al. Glucocorticoids recruit Tgfb β 3 and Smad1 to shift transforming growth factor-beta signaling from the Tgfb β 1/Smad2/3 axis to the Acvr11/Smad1 axis in lung fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2014, 289(6): 3262-3275.
- [13] Li K, Shi C, Huang J, et al. Dexamethasone effect on the expression of transforming growth factor-beta/Smads signaling pathway in benign biliary stricture fibroblasts in rodent[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2017, 27(3): 131-134.
- [14] 战孝光, 崔乃强, 李忠廉, 等. 丹参酮 II A 对兔胆管成纤维细胞的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2010, 16(3): 326-330.
- [15] 李克跃, 石承先, 汤可立, 等. TNF- α 对兔胆管成纤维细胞 P311/TGF- β 1/ α -SMA 通路的影响及川芎嗪的干预作用[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(2): 172-178.
- [16] Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies[J]. Mol Med, 2011, 17(1-2): 113-125.
- [17] Hu B, Phan SH. Myofibroblasts[J]. Curr Opin Rheumatol, 2013, 25(1): 71-77.
- [18] Gerard C, Blobel WP, Lodish HF. Correction: role of transforming growth factor (beta) in human disease[J]. N Engl J Med, 2000, 343(3): 228.
- [19] Zhou P, Shi L, Li Q, et al. Overexpression of RACK1 inhibits collagen synthesis in keloid fibroblasts via inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 15262-15268.
- [20] Wu C, Jiang J, Boye A, et al. Compound astragalus and salvia miltiorrhiza extract suppresses rabbits' hypertrophic scar by modulating the TGF-beta/Smad signal[J]. Dermatology, 2014, 229(4): 363-368.
- [21] Liu W, Wang DR, Cao YL. TGF-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2004, 4(1): 123-136.
- [22] Tan J, Peng X, Luo G, et al. Investigating the role of P311 in the hypertrophic scar[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e9995.
- [23] 李克跃, 石承先, 汤可立, 等. 地塞米松抑制胆管瘢痕成纤维细胞的体外研究[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(17): 7-12.
- [24] 李克跃, 石承先, 汤可立, 等. 白细胞介素 13 对胆管成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 通路表达的影响及地塞米松的干预作用[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(8): 987-992.

(责任编辑: 冉明会)