

肝 癌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001694

TGF- β 1 通过 Jagged1/Notch 激活小鼠肝星状细胞

艾麦提·牙森, 金鑫, 王伟, 李德卫

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科、重庆医科大学第一附属医院实验研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)激活小鼠肝星状细胞(mouse hepatic stellate cells, mHSC)的具体机制。**方法:**实验选用 mHSC-T25 细胞株为实验对象, 随机分为激活组(mHSC-T25+10 ng/mL TGF- β 1)、抑制组(mHSC-T25+1 μ mol/L TGF- β -R1 抑制剂)和对照组(mHSC-T25)。qRT-PCR 检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、TGF- β 1、转化生长因子 β 受体 1(transforming growth factor β receptor1, TGF- β -R1)、Jagged1、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等的 mRNA 表达; 细胞免疫荧光法检测 α -SMA、Jagged1 等蛋白的表达; Western blot 检测 TGF- β 1、 α -SMA、TGF- β -R1、Jagged1、Smad2/3、p-Smad2/3 等蛋白的表达。**结果:**①TGF- β 1 刺激组中 α -SMA、TGF- β 1、TGF- β -R1、Jagged1、VEGF、HGF 等 mRNA 表达量均较对照组明显增加而抑制组均明显下降。 α -SMA: 激活组(315.1 ± 6.2)%, 抑制组(34.3 ± 4.5)% ($F=3291.956, P=0.000$); TGF- β 1: 激活组(524.8 ± 14.3)%, 抑制组(29.0 ± 10.7)% ($F=469.534, P=0.000$); TGF- β -R1: 激活组(235.5 ± 15.2)%, 抑制组(17.0 ± 2.8)% ($F=392.239, P=0.000$); Jagged1: 激活组(548.7 ± 16.6)%, 抑制组(17.4 ± 4.7)% ($F=364.166, P=0.000$); VEGF: 激活组(331.9 ± 19.8)%, 抑制组(19.5 ± 3.7)% ($F=278.407, P=0.000$); HGF: 激活组(376.00 ± 6.51)%, 抑制组(16.2 ± 2.7)% ($F=640.340, P=0.000$)。②激活组高表达 α -SMA、Jagged1 等蛋白, 而对照组、抑制组表达明显较少。 α -SMA: 激活组 0.880 ± 0.016 , 对照组 0.481 ± 0.007 , 抑制组 0.207 ± 0.014 ($F=2098.556, P=0.000$); Jagged1: 激活组 0.796 ± 0.015 , 对照组 0.474 ± 0.021 , 抑制组 0.167 ± 0.005 ($F=1242.556, P=0.000$)。③TGF- β 1 激活组中 TGF- β 1、 α -SMA、TGF- β -R1、Jagged1、Smad2/3、p-Smad2/3 的蛋白表达量均较对照组明显上调而抑制组均明显下调。TGF- β 1: 激活组 1.180 ± 0.138 , 对照组 0.654 ± 0.061 , 抑制组 0.359 ± 0.012 ($F=67.706, P=0.000$); α -SMA: 激活组 1.076 ± 0.063 , 对照组 0.689 ± 0.022 , 抑制组 0.374 ± 0.011 ($F=239.186, P=0.000$); TGF- β -R1: 激活组 1.192 ± 0.142 , 对照组 0.710 ± 0.380 , 抑制组 0.378 ± 0.069 ($F=57.235, P=0.000$); Jagged1: 激活组 1.582 ± 0.247 , 对照组 0.817 ± 0.116 , 抑制组 0.364 ± 0.059 ($F=43.649, P=0.000$); Smad2/3: 激活组 2.057 ± 0.114 , 对照组 1.203 ± 0.105 , 抑制组 0.664 ± 0.063 ($F=158.856, P=0.000$); p-Smad2/3: 激活组 2.088 ± 0.120 , 对照组 1.168 ± 0.107 , 抑制组 0.573 ± 0.120 ($F=136.369, P=0.000$)。上述实验结果提示, 激活组、抑制组与对照组比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**TGF- β 1 通过 Jagged1/Notch 激活小鼠肝星状细胞并调控其相关生物学活性。

【关键词】肝星状细胞; 转化生长因子- β 1; Jagged1**【中图分类号】**R572.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-08-21TGF- β 1 activates mouse hepatic stellate cells through Jagged1/Notch

Ai Maiti · Ya Sen, Jin Xin, Wang Wei, Li Dewei

(Department of Hepatobiliary Surgery, Laboratory Research Center,

The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study specific mechanisms of activation of mouse hepatic stellate cells(mHSCs) by transforming growth factor β 1(TGF- β 1). **Methods:** mHSC-T25 cell line was selected as experimental subject, and randomly divided into activation group(mHSC-T25+10 ng/mL TGF- β 1), inhibition group(mHSC-T25+1 μ mol/L TGF- β -R1 inhibitor) and control group(mHSC-T25). mRNA expression of α -SMA, TGF- β 1, TGF- β -R1, Jagged1, VEGF, HGF were detected by qRT-PCR. Expressions of α -SMA, Jagged1 were measured by immunocytochemistry. Protein expressions of TGF- β 1, α -SMA, TGF- β -R1, Jagged1, Smad2/3, p-Smad2/3 were tested by Western blot. **Results:** ①mRNA expressions of α -SMA, TGF- β 1, TGF- β -R1, Jagged1, VEGF, HGF were significantly higher in activation group than in control group, but significantly lower in inhibition group. Activation group: (315.1 ± 6.2)%, (524.8 ± 14.3)%, (235.5 ± 15.2)%, (548.7 ± 16.6)%, (331.9 ± 19.8)%, (376.00 ± 6.51)%; inhibition group: (34.3 ± 4.5)%, (29.0 ± 10.7)%, (17.0 ± 2.8)%, (17.4 ± 4.7)%, (19.5 ± 3.7)%, (16.2 ± 2.7)% ($P=0.000$). ②Expressions of α -SMA, Jagged1 were significantly higher in activation group than in control group and inhibition group. Activation group: 0.880 ± 0.016 , 0.796 ± 0.015 ; control group:

作者介绍: 艾麦提·牙森, Email: 1205739931@qq.com,

研究方向: 干细胞移植及血管化的研究。

通信作者: 李德卫, Email: lidewei406@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81470898)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180511.1728.005.html>

(2018-05-14)

$0.481 \pm 0.007, 0.474 \pm 0.021$; inhibition group: $0.207 \pm 0.014, 0.167 \pm 0.005$ ($P=0.000$). ③Protein expressions of TGF- $\beta 1$, α -SMA, TGF- β -R1, Jagged1, Smad2/3, p-Smad2/3 were significantly upregulated in activation group and significantly downregulated in inhibition group. Activation group: $1.076 \pm 0.063, 1.180 \pm 0.138, 1.192 \pm 0.142, 1.582 \pm 0.247, 2.057 \pm 0.114, 2.088 \pm 0.120$; control group: $0.689 \pm 0.022, 0.654 \pm 0.061, 0.710 \pm 0.380, 0.817 \pm 0.116, 1.203 \pm 0.105, 1.168 \pm 0.107$; inhibition group: $0.374 \pm 0.011, 0.359 \pm 0.012, 0.378 \pm 0.069, 0.364 \pm 0.059, 0.664 \pm 0.063, 0.573 \pm 0.120$ ($P=0.000$). The results above showed that there was significantly statistical difference between three groups ($P<0.05$). **Conclusion:** TGF- $\beta 1$ activates mouse hepatic stellate cells and regulate their biological activities via Jagged1/Notch.

[Key words] hepatic stellate cells; transforming growth factor $\beta 1$; Jagged1

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝脏的一种间质细胞,定居在窦间隙内,一般处于静止状态。在各种因素刺激下,HSC 表型发生改变,从静态细胞表型转化为具有增殖性、成纤维性和收缩性的肌成纤维细胞表型,即活化的 HSC 而发挥作用^[1]。激活肝星状细胞诱导因子包括转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、Notch、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、内皮肽-1(endothelin-1, ET-1)等,其中 TGF- $\beta 1$ 最为明显^[2]。已有实验证明,Notch 通路对 HSC 表达 α -SMA 具有调节作用^[3]。由于目前 TGF- $\beta 1$ 激活肝星状细胞的具体机制尚未明确,本文探讨 TGF- $\beta 1$ 、Jagged1/Notch 在 HSC 活化中的相互作用及小鼠肝星状细胞激活的具体机制。

1 材料和方法

1.1 材料

mHSC-T25 小鼠肝星状细胞由北京北纳创联生物技术公司 BNCC 细胞库提供。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素购自美国 Gibco 公司。KnockOut™ Serum Replacement(KSR)购自美国 Invitrogen 公司。TGF- β -R1 抑制剂 SB525334 购自美国 TRC 公司。小鼠 TGF- $\beta 1$ 重组蛋白购自美国 R&D 公司。Trizole、RNA 逆转录试剂盒、SYBR 购自日本 Takara 公司。小鼠抗小鼠 TGF- $\beta 1$ 单克隆抗体、兔抗小鼠 α -SMA 多克隆抗体购自 Abcam 公司。兔抗小鼠 TGF- β -R1 多克隆抗体、兔抗小鼠 Jagged1 多克隆抗体购自美国 Santacruz 公司。兔抗小鼠 Smad2/3 单克

隆抗体、兔抗小鼠 p-Smad2/3 单克隆抗体购自美国 Cell signaling Technology (CST) 公司。Dylight 488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Abbkine 公司, CY3 标记亲和纯化的山羊抗兔 IgG(H+L)二抗购自美国 PeproTech 公司。低温高速离心机购自美国 Sigma 公司; 荧光定量 PCR 仪 FTC200 购自 Canada 公司; CellDoc200 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; 激光扫描共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组 以 10% 胎牛血清+1% 双抗(青霉素、链霉素)DMEM 培养基培养细胞, CO₂ 培养箱(5% CO₂, 37 °C), 1~2 d 换液, 2~3 d 细胞传代, 0.25% 胰酶消化细胞 2~3 min, DMEM 培养基终止反应。肝星状细胞无血清饥饿培养 24 h 后换 15% KSR+1% 双抗(青霉素、链霉素)DMEM 培养基, 加入 TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL)、TGF- β -R1 抑制剂 SB525334 (1 μ mol/L) 处理 48 h, 分为激活组(mHSC-T25+10 ng/mL TGF- $\beta 1$)、抑制组(mHSC-T25+1 μ mol/L TGF- β -R1 抑制剂)和对照组(mHSC-T25)。

1.3.2 qRT-PCR 用 Trizol 试剂提取 mHSC 总 mRNA, 按照 Western Biotechnology 反转录试剂盒说明书操作反转录为 cDNA, 引物设计见表 1。反转录条件: 25 °C 10 min, 42 °C 50 min, 85 °C 5 min。按照 Western Biotechnology 荧光定量 PCR 扩增试剂盒说明书操作。扩增条件设置: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次, 72 °C 检测信号。使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算相对 mRNA 含量, $\Delta C_t = C_t$ 目的基因 - C_t 管家基因 GAPDH, $\Delta C_t = \Delta C_t$ 实验组 - ΔC_t 对照组, 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 表示实验组目的基因 mRNA 的含量相对对照组所改变的倍数。

1.3.3 细胞免疫荧光 肝星状细胞以 2×10^3 个细胞密度种于 96 孔板并且无血清培养 24 h 后加 10 ng/mL TGF- $\beta 1$, 1 μ mol/L TGF- β -R1 抑制剂 SB525334 处理 48 h。吸弃培养基, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 用 4% 多聚甲醛(PBS 配制)常温固定 30 min, PBS 洗 3 次, 0.1% Triton(PBS 配制)4 °C 透膜 10 min, 山羊血清室温封闭 1.5 h, 加足够量的稀释好的一抗(Anti α -SMA, 兔来源, 1:800; Anti Jagged1, 兔来源, 1:500)4 °C 孵育过夜。第 2 天, 37 °C 复温 45 min, PBS 洗 3 次, 加入适量加稀释好的荧光二抗(Dylight 488, 1:1 000; CY3, 1:1 000), 37 °C 孵育 60 min(从此步起后面所有步骤均在暗室中进行)。PBS 洗 3 次, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 对标本进行染核, 洗去多余的 DAPI, 最后在激光共聚焦显微镜下观察采集图像。使用 Image-Pro Plus 计数每个视野中染上 DAPI、目的蛋白的

细胞数, 染上目的蛋白细胞数/DAPI 的细胞数表示表达强度。

1.3.4 Western blot 按照蛋白提取试剂盒说明书步骤提取用 TGF- β 1 (10 ng/mL)、TGF- β -R1 抑制剂 SB525334 (1 μ mol/L) 处理 48 h 肝星状细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度并调整蛋白浓度为 40 mg/mL。蛋白样品与 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液 4:1 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转移到 PVDF 膜上, 5% 高钙脱脂奶粉摇床上封闭 2 h, 加入特异性一抗 TGF- β 1、 α -SMA、TGF- β -R1、Jagged1、Smad2/3、p-Smad2/3 后 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 加入特异性二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 最后经 ECL 发光显影。定影后所得免疫印迹图谱用 Fusion 软件分析, 用每个目的蛋白条带灰度扫描值对比相应的内参 GAPDH 条带的灰度值, 得到目的蛋白灰度的标准化值。实验重复 3 次, 取 3 次实验的平均值。

1.4 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 数据资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 样本均数比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

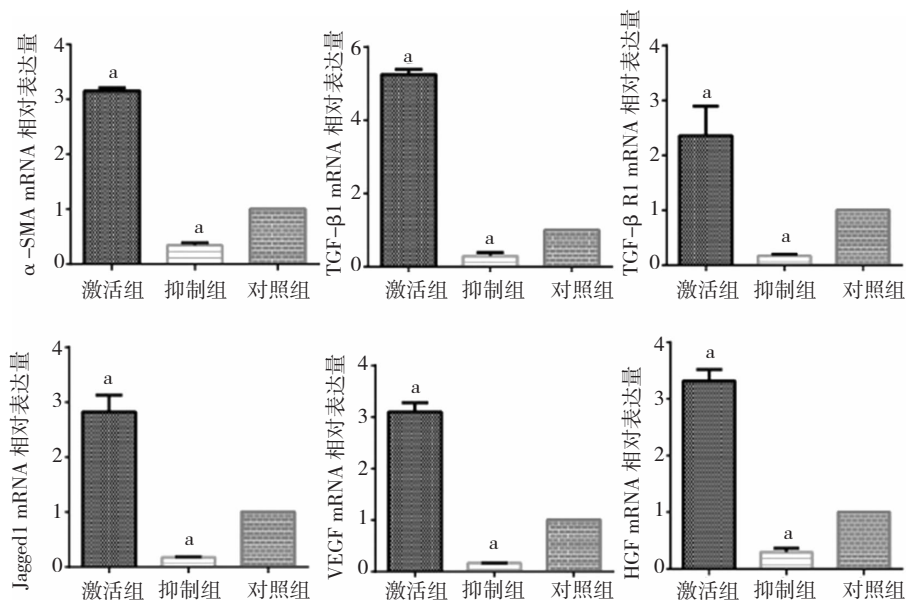
2.1 qRT-PCR 检测结果

以 2^{- $\Delta\Delta$} 比较 α -SMA、TGF- β 1、TGF- β -R1、Jagged1、VEGF、HGF mRNA 水平定量检测结果, 以对照组中 α -SMA、TGF- β 1、TGF- β -R1、Jagged1、VEGF、HGF mRNA 水平为对照 (即 100%)。激活组: (315.1 $\pm$ 6.2)%、(524.8 $\pm$ 14.3)%、(235.5 $\pm$ 15.2)%、(548.7 $\pm$ 16.6)%、(376.00 $\pm$ 6.51)%、(331.9 $\pm$ 19.8)%; 抑制组: (34.3 $\pm$ 4.5)%、(29.0 $\pm$ 10.7)%、(17.0 $\pm$ 2.8)%、(17.4 $\pm$ 4.7)%、(16.2 $\pm$ 2.7)%、(19.5 $\pm$ 3.7)%。方差分析 3 组各目的 mRNA 表达水平的差异均具有统计学意义。 α -SMA: $F=3291.956$, $P=0.000$; TGF- β 1: $F=469.534$, $P=0.000$; TGF- β -R1: $F=392.239$, $P=0.000$; Jagged1: $F=364.166$, $P=0.000$; VEGF: $F=278.407$, $P=0.000$; HGF: $F=640.340$, $P=0.000$ 。两两比较结果显示激活组目的 mRNA 表达量均较对照组明显增加 ($P=0.000$); 而抑制组表达量均较对照组明显减少 ($P=0.000$)。如图 1 所示。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 qRT-PCR primer sequences

基因	上引物序列 (5'→3')	下引物序列 (5'→3')
α -SMA	GGCATCCACGAAACCACCTA	CGTCGTATTCCTGTTTCTGAT
TGF- β 1	GAGGCGGTGCTCGCTTTGTA	CGTTGTTGCGGTCCACCATTA
TGF- β -R1	TTATGAGAGAATGCTGCTATGCC	CCTTCCTGTTGGCTGAGTTGT
Jagged1	AGTGGCTTGGGTCTCTTGTCTT	ACCGTGTGTGGCTCCGTGTT
HGF	GAGGCGAGGAGAAACGCAAC	TATCCAGGATTGCAGGGCGA
VEGF	TGTTTCAGAGCGAGAAAGCAT	ACGTTCTGTTAACTCAAGCTGC
GAPDH	GTGCTGACTATGTCCTGGAGTCT	AGTCTTCTGGGTGGCACTGAT



a: 与对照组比较, $P=0.000$

图 1 qRT-PCR 检测 3 组 mHSC 中各个基因 mRNA 的转录水平

Fig.1 Target gene mRNA expression detected by qRT-PCR

2.2 免疫荧光染色检测结果

3 组 mHSC 处理 48 h 后进行 α -SMA 与 Jagged1 的免疫荧光染色。结果显示激活组 mHSC 中 α -SMA、Jagged1 表达量较多,主要阳性表达部位在细胞质,对照组和抑制组中仅有少量表达。激活组、对照组、抑制组中 α -SMA、Jagged1 的荧光强度分别为如下。激活组: 0.880 ± 0.016 , 0.796 ± 0.015 ; 对照组: 0.481 ± 0.007 , 0.474 ± 0.021 ; 抑制组: 0.207 ± 0.014 ,

0.167 ± 0.005 。3 组 mHSC 中目的蛋白表达水平的差异均有统计学意义(α -SMA: $F=2\,098.556$, $P=0.000$; Jagged1: $F=1\,242.556$, $P=0.000$)。两两比较结果显示激活组中 α -SMA、Jagged1 蛋白的表达量均较对照组、抑制组明显增加($P=0.000$),抑制组中 α -SMA、Jagged1 蛋白的表达量均较对照组明显减少($P=0.000$)(图 2,图 3,表 2)。

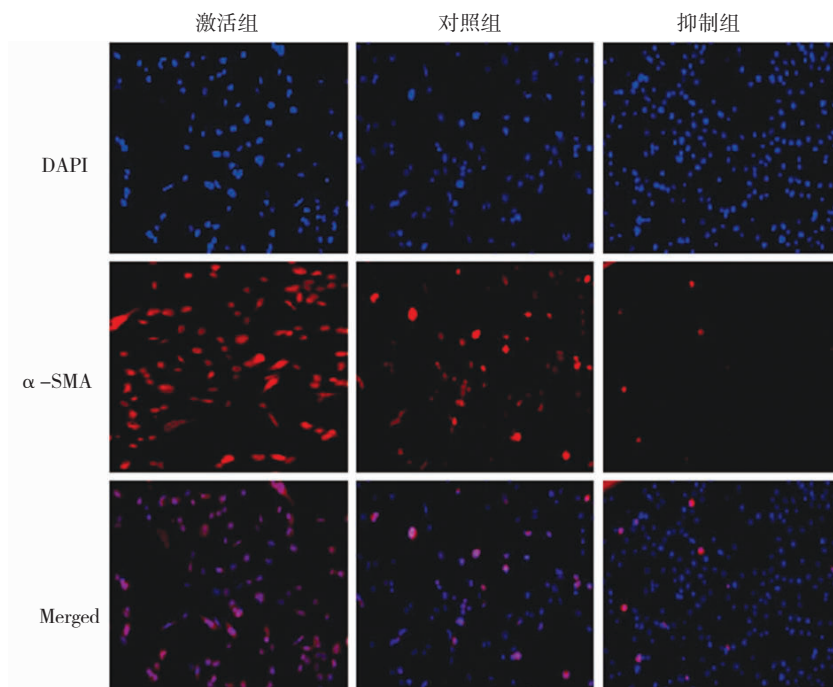
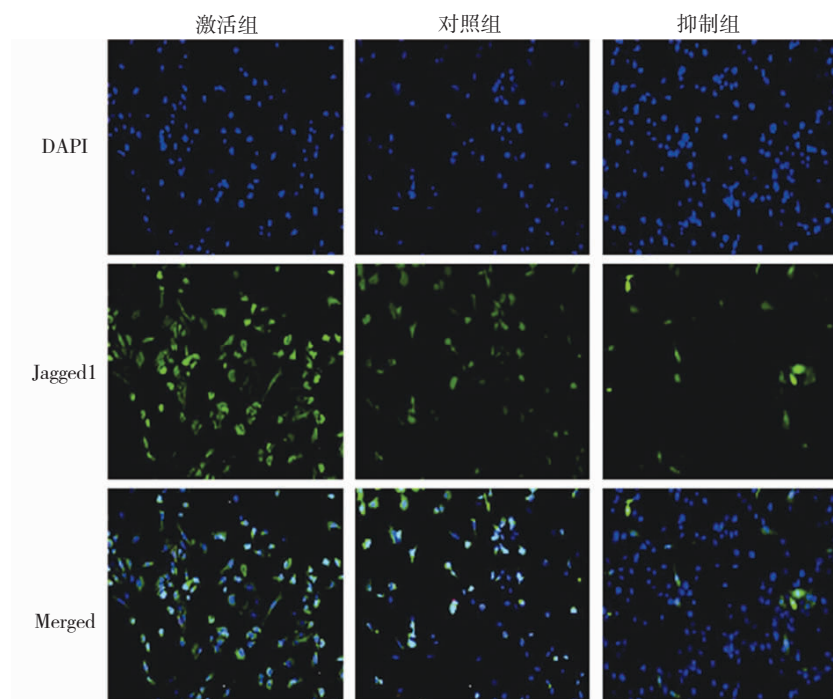
图 2 免疫荧光染色法检测 α -SMA 的表达情况 (200 $\times$)Fig.2 α -SMA protein expression detected by immunocytochemistry (200 $\times$)图 3 免疫荧光染色法检测 Jagged1 的表达情况 (200 $\times$)Fig.3 Jagged1 protein expression detected by immunocytochemistry (200 $\times$)

表 2 免疫荧光法检测 3 组 mHSC 中各个目的蛋白细胞数/DAPI 细胞数值的平均值

Tab.2 Average cell number of each target protein/DAPI in three groups

组别	α -SMA	Jagged1
激活组	0.880 ± 0.016	0.796 ± 0.015
对照组	0.481 ± 0.007	0.474 ± 0.021
抑制组	0.207 ± 0.014	0.167 ± 0.005
<i>F</i> 值	2 098.556	1 242.556
<i>P</i> 值	0.000	0.000

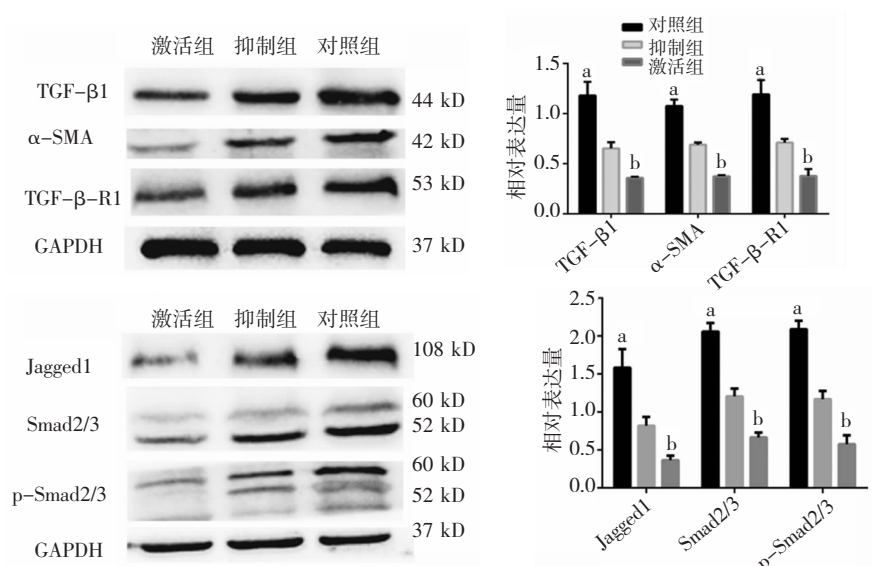
2.3 Western blot 检测结果

以 GAPDH 为内参,采用 Fusion 软件定量分析 3 组 mHSC 中效应蛋白 TGF- β 1、 α -SMA、TGF- β -R1、Jagged1、Smad2/3、p-Smad2/3 的表达水平。激活组、对照组、抑制组中效应蛋白 TGF- β 1、 α -SMA、TGF- β -R1、Jagged1、Smad2/3、p-Smad2/3 表达量分别如下。激活组: 1.076 ± 0.063 , 1.180 ± 0.138 , 1.192 ± 0.142 , 1.582 ± 0.247 , 2.057 ± 0.114 , 2.088 ± 0.120 ; 对照组: 0.689 ± 0.022 , 0.654 ± 0.061 , 0.710 ± 0.380 , 0.817 ± 0.116 , 1.203 ± 0.105 , 1.168 ± 0.107 ; 抑制组: 0.374 ± 0.011 , 0.359 ± 0.012 , 0.378 ± 0.069 , 0.364 ± 0.059 , 0.664 ± 0.063 , 0.573 ± 0.120 。方

表 3 检测 3 组 mHSC 中各个目的蛋白/内参灰度值的平均值

Tab.3 Average gray value of target protein/reference in each group

组别	α -SMA	TGF- β 1	TGF- β -R1	Jagged1	Smad2/3	p-Smad2/3
激活组	1.076 ± 0.063	1.180 ± 0.138	1.192 ± 0.142	1.582 ± 0.247	2.057 ± 0.114	2.088 ± 0.120
对照组	0.689 ± 0.022	0.654 ± 0.061	0.710 ± 0.380	0.817 ± 0.116	1.203 ± 0.105	1.168 ± 0.107
抑制组	0.374 ± 0.011	0.359 ± 0.012	0.378 ± 0.069	0.364 ± 0.059	0.664 ± 0.063	0.573 ± 0.120
<i>F</i> 值	239.186	67.706	57.235	43.649	158.856	136.369
<i>P</i> 值	0.004	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001



a: 与对照组比较, $P=0.000$; b: 与对照组比较, $P<0.005$

图 4 Western blot 检测 3 组 mHSC 中各个蛋白的表达量

Fig.4 Target proteins expression detected by Western blot

差分析 3 组各效应蛋白表达水平的差异,差异均具有统计学意义(TGF- β 1: $F=67.706$, $P=0.000$; α -SMA: $F=239.186$, $P=0.000$; TGF- β -R1: $F=57.235$, $P=0.000$; Jagged1: $F=43.649$, $P=0.000$; Smad2/3: $F=158.856$, $P=0.000$; p-Smad2/3: $F=136.369$, $P=0.000$)。两两比较结果显示激活组中效应蛋白表达量均较对照组明显增加($P=0.000$);而抑制组中效应蛋白表达量均较对照组明显减少($P=0.000$)(图 4,表 3)。

3 讨论

肝星状细胞是肝脏的一种间质细胞,正常肝脏的 HSC 占肝细胞总量的 5%~10%。在各种刺激因素作用下,HSC 激活并转变成具有增生活性的、具有收缩特性的肌成纤维细胞,表达 α -SMA 并合成大量细胞外基质细胞因子^[4];促进肝纤维化、肝硬化、门脉高压形成以及胚胎肝细胞的发育、分化^[5-7]。这些病理生理过程有逆转恢复期,然而其逆转恢复期的机制尚不清楚^[8],因此研究肝星状细胞的激活机制以及逆转此过程非常重要。肝星状细胞激活是非常复杂的,瀑布样激活的过程需要很多细胞因子及生

长因子的共同参与^[9]。TGF- β 1 是激活 HSC 的关键因子,TGF- β 1 激活 HSC 的信号转导经过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体及其下游效应 Smads 蛋白家族启动相关基因表达。Jagged1/Notch 信号通路调控细胞的存活、增殖和凋亡,促进组织修复和中枢神经系统的再生^[10]。在癌症发展中,TGF- β 1 信号通路通过 Jagged1/Notch 促进上皮间质转化及癌细胞溶骨性骨转移^[11-12]。

本研究观察了加入 TGF- β 1 (10 ng/mL)、TGF- β -R1 抑制剂 SB525334 (1 μ mol/L)处理 48 h 后^[13-14]对 mHSC 表达激活标志物 α -SMA 及 Jagged1 的影响,以及进一步多方面验证 TGF- β 1、Jagged1/Notch 在 mHSC 激活中的相互作用。本课题组采用无血清饥饿培养 mHSC 来排除血清中少量 TGF- β 1 对实验结果的影响。本实验对 mHSC 激活过程中的关键基因 α -SMA、Jagged1 进行了研究,用 qRT-PCR、细胞免疫荧光、Western blot 方法检测,结果均显示在激活组中 α -SMA、Jagged1 表达明显增加而抑制组中明显减少,与对照组比较差异均具有统计学意义。Western blot 结果中,TGF- β 1 激活组 Smad2/3、p-Smad2/3 蛋白表达量明显上调而抑制组明显下调,进一步说明 mHSC 激活中 TGF- β 1 信号将 Smad2/3 磷酸化并转移到细胞核中调节 HSC 的分化转化。qRT-PCR 结果提示,激活组中 TGF- β 1、HGF、VEGF mRNA 表达量明显增加而抑制剂处理后明显降低,这可能是 TGF- β 1 刺激 HSC 后通过正反馈旁分泌途径分泌更多的 TGF- β 1 共同参与生理及病理状态下 HSC 的生物学效应^[15]。因此,以上结果综合说明 TGF- β 1/Smads 信号主要通过 Jagged1/Notch 激活肝星状细胞。

目前 TGF- β 1/Smads 信号通路激活 HSC 的具体机制尚不清楚,由于 TGF- β 1 及其胞内信号分子 Smads 作用广泛,单纯抑制引起严重后果,长期直接干预 TGF- β 1 及其下游分子 Smads 可出现严重不良反应^[16]。另外,TGF- β 及 Smads 治疗仅阻断纤维化、肝硬化起始及过程,不能逆转,而且会影响 HSC 正常生理功能的发挥^[17]。本研究可为后续试验中进一步探讨肝纤维化、门脉高压形成的药物靶点打下基础。

参 考 文 献

- [1] Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells[J]. Semin Liver Dis, 2001, 21(3): 311-336.
- [2] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines,

- LX-1 and LX-2; new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54: 142-151.
- [3] 肖 斌, 陈川宁, 陶忠桦, 等. Notch 通路对乙醛激活大鼠肝星状细胞株的增殖及转分化的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(3): 1005-9202.
- [4] Jotzu C, Alt E, Welte G, et al. Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors[J]. Cell Oncol (Dordr), 2011, 34(1): 55-67.
- [5] Miyazaki T, Bouscarel B, Ikegami T, et al. The protective effect of taurine against hepatic damage in a model of liver disease and hepatic stellate cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2009, 643: 293-303.
- [6] 展玉涛. 肝星状细胞活化的功能改变[J]. 国外医学(消化系疾病分册), 1999, 19(1): 1001-1153.
- [7] Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver[J]. Hepatology, 2005, 41(5): 956-967.
- [8] Issa R, Zhou XY, Trim N, et al. Mutation in collagen-I that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration[J]. FASEB J, 2003, 17(1): 47-49.
- [9] Sapitro J, Dunmire JJ, Scott SE, et al. Suppression of transforming growth factor- β effects in rabbit subconjunctival fibroblasts by activin receptor-like kinase 5 inhibitor[J]. Mol Vis, 2010, 16: 1880-1892.
- [10] Bai S, Kopan R, Zou W, et al. NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(10): 6509-6518.
- [11] Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, et al. Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. EMBO J, 2004, 23(5): 55-65.
- [12] Hu KF, Kong XY, Zhong MC, et al. Brucine inhibits bone metastasis of breast cancer cells by suppressing Jagged1/Notch1 signaling pathways[J]. Chin J Integr, 2017, 23(2): 110-116.
- [13] Thomas M, Docx C, Alan M, et al. Activin-like kinase 5 (ALK5) mediates abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells from patients with familial pulmonary arterial hypertension and is involved in the progression of experimental pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline[J]. Am J Pathol, 2009, 174(2): 380-389.
- [14] Shah R, Reyes-Gordillo K, Arellanes-Robledo J, et al. TGF- β 1 up-regulates the expression of PDGF- β receptor mRNA and induces a delayed PI3K-, AKT-, and p70(S6K)-dependent proliferative response in activated hepatic stellate cells[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2013, 37(11): 1838-1848.
- [15] Du W, Xie Y, Li D, et al. CBRH-7919 cell supernate promotes fibroblasts to express cyclooxygenase-2 and hepatocyte growth factor[J]. Transplant Proc, 2014, 46(4): 1237-1239.
- [16] Wahdan-Alaswad RS, Song K, Krebs TL, et al. Insulin-like growth factor I suppresses bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cells by activating mTOR signaling[J]. Cancer Res, 2010, 70(22): 9106-9117.
- [17] Connolly MK, Bedrosian AS, Malhotra A, et al. In hepatic fibrosis, liver sinusoidal endothelial cells acquire enhanced immunogenicity[J]. J Immunol, 2010, 185(4): 2200-2208.

(责任编辑:张辉洁)