

网络出版时间: 2018-11-5 15:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.005.html>

L-02 细胞上清液对 TGF- β 1 刺激 HSC 细胞 α -SMA 表达的影响

钟毓娟, 吴丹, 黄光玲, 何义, 蒋莲秀

摘要 目的 观察人正常肝细胞 L-02 上清液对转化生长因子(TGF)- β 1 刺激的体外培养人肝星状细胞株(HSC)-LX-2 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA) mRNA 和蛋白表达的影响。方法 体外培养 HSC-LX-2、L-02, 设立 HSC-LX-2 正常组、模型组、L-02 细胞上清原液组、1/2 上清液组、1/4 上清液组, 分别孵育 72 h, 噻唑蓝染色法(MTT) 检测 HSC-LX-2 细胞的抑制率, Western blot 法检测各组 α -SMA 的表达, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 法检测各组 α -SMA mRNA 的表达。结果 L-02 细胞上清原液组、1/2 上清液组 α -SMA mRNA 及 α -SMA 蛋白的表达有显著的抑制作用($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 L-02 上清液能抑制 HSC-LX-2 细胞的活化和增殖。

关键词 人肝星状细胞; α -平滑肌肌动蛋白; 转化生长因子- β 1

中图分类号 R 393

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1843-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.005

共培养体系是指将两种细胞(可以来自同一组织,也可以来自不同的组织)混合共同培养,通过两种细胞之间的相互作用,观察细胞共培养后其功能、特性、生长行为等的变化,如某一细胞的分泌物对另外一种细胞基因表达的影响等^[1]。研究^[2]表明转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1 既可通过促进人肝星状细胞(human hepatic stellate cells, HSC)合成 I 型、III 型、IV 型胶原及纤维连接蛋白等增加细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成,又可通过抑制基质金属蛋白酶合成、促进 HSC 分泌组织金属蛋白酶抑制剂而减少 ECM 降解。课题组前期通过 TGF- β 1 刺激 HSC-LX-2 建立 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)过表达的细胞模型^[3],在此基础上,该研究收集人正常肝细胞(human normal liver cell, L-02)细胞上清液与 HSC-LX-2 细胞间接共培养,以观察在 TGF- β 1

刺激下 L-02 上清液对 HSC-LX-2 细胞 α -SMA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 L-02、HSC-LX-2 均购自无锡博慧斯生物医药科技有限公司。

1.2 试剂 重组人 TGF- β 1 购自美国 Novoprotein 公司; 兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体、鼠抗 α -SMA 单克隆抗体购自上海生工生物工程股份有限公司; 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP) 标记山羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Hyclone 胎牛血清购自美国 Thermo 公司; 双抗、高糖 DMEM 培养基购自杭州赛默飞世尔仪器有限公司; 普通 ECL Plus 发光液购自北京泛博生化公司。

1.3 仪器 Model311 型 CO₂ 培养箱、酶标仪(Model450) 均购自美国 Thermo 公司; 电泳仪、半干转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司; 多通道 PCR 仪(PTC-220) 购自美国 MJ 公司; 核酸蛋白分析仪(PPSQ-31A 型) 购自日本岛津公司; 全自动凝胶成像分析系统(JS-780 型) 购自上海培清科技公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 HSC-LX-2、L-02 均置于含 10% 胎牛血清、双抗(100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素)的高糖 DMEM 培养液, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.4.2 L-02 上清液的制备 取对数生长期细胞 L-02 接种于面积为 25 cm² 的培养瓶中, 1.5 × 10⁶ 个细胞/瓶, 5 ml 10% 胎牛血清/瓶, 培养箱培养 24 h, 收集其细胞培养上清液, 1 000 r/min 离心 5 min, 取其上清液于 -20 °C 备用。临用前把此上清原液用 1.4.1 中的培养液稀释, 浓度分别为 1:2、1:4, 分为 L-02 细胞上清原液、1/2 上清液、1/4 上清液。

1.4.3 MTT 法检测 L-02 上清液对 TGF- β 1 诱导 HSC-LX-2 细胞增殖的抑制作用 取对数生长期细胞 HSC-LX-2 接种于 96 孔板, 3 × 10³ 个细胞/孔, 培养箱培养 24 h 后, 分成正常组、模型组、L-02 细胞上

2018-07-26 接收

基金项目: 广西高校科学技术研究项目(编号: KY2015LX282)

作者单位: 桂林医学院基础医学院实验教学中心, 桂林 541000

作者简介: 钟毓娟, 女, 硕士研究生, 实验师;

蒋莲秀, 女, 高级实验师, 责任作者, E-mail: 932008034@

qq.com

清原液组、1/2 上清液组、1/4 上清液组。正常组只含有培养液; 模型组含终质量浓度为 $5 \mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$; 上清液各组分别在加入 L-02 细胞上清原液、1/2 上清液、1/4 上清液的基础上, 加入终质量浓度为 $5 \mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 。继续培养 68 h 后, 避光加 MTT $20 \mu\text{l}$, 继续培养 4 h, 弃去上清液, 加入二甲基亚砜 $150 \mu\text{l}$, 室温下低速振荡 10 min, 酶标仪 490 nm 波长检测光密度 (optical density, OD) 值, 重复 3 次取平均值。利用公式计算细胞抑制率。细胞抑制率 (%) = (模型组 OD 值 - 上清液组 OD 值) / 模型组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.4.4 Western blot 法检测 HSC-LX-2 细胞 α -SMA 的表达 取对数生长期细胞 HSC-LX-2 细胞接种于直径 10 cm 的大皿, 2×10^6 个细胞/皿, 细胞分组、干预同 1.4.3。培养 72 h 后弃去上清液, 冰上用生理盐水清洗培养皿 3 次, 放射免疫沉淀试验 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解缓冲液裂解细胞, 收集细胞裂解物。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, BCA 法检测各组蛋白含量。取含 100 μg 总蛋白的上清液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水煮 5 min, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后把蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗脱 4 次, 每次 5 min。加入 α -SMA 一抗 (1:500) 孵育, 室温孵育 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜 (16~18 h)。第 2 天 TBST 冲洗 4 次, 每次 5 min, 再与二抗 (1:8 000) 室温作用 1 h, TBST 冲洗 4 次, 每次 5 min, 暗室用 ECL 发光液发光显色, 用自动凝胶成像分析系统定量分析印迹。GAPDH 为内参。

1.4.5 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测 HSC-LX-2 细胞 α -SMA mRNA 的表达 ① 取呈指数生长的 HSC-LX2 细胞接种于直径 10 cm 的大皿, 2×10^6 个细胞/皿, 细胞分组、干预同前; ② 用 TRIzol 法提取 HSC-LX2 中总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量和纯度; ③ 取 5 μg 总 RNA, 用 RNA 逆转录酶将其逆转录为 cDNA; ④ 根据引物说明书, 引物序列: α -SMA: F: 5'-GTCCCAGACATCAGG-GAGTAA-3'; R: TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3'; α -actin: F: 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'; R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA; ⑤ PCR 扩增, PCR 反应总体积为 20 μl , 热循环条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; ⑥ 分别取 10 μl 扩增产物和 DNA Marker 上样, 进行琼脂糖凝胶电泳, DNA 带进行观察和紫外线灯拍摄。Gel Doc XR 系

统检测 OD 值, Quantity One 软件进行分析, β -actin 为参照物。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。作图软件为 Graph-Pad Prism5。

2 结果

2.1 L-02 上清液对 TGF- $\beta 1$ 诱导 HSC-LX-2 细胞增殖的抑制作用 L-02 上清液作用 72 h 后, 对 TGF- $\beta 1$ 刺激 HSC-LX-2 细胞的增殖有一定抑制作用, 且与浓度有关, 上清原液的抑制率达到 38.90%, 1/2 上清液组抑制率为 20.82%。见表 1。

表 1 L-02 上清液对 TGF- $\beta 1$ 诱导 HSC-LX-2 细胞增殖的影响

组别	OD 值	抑制率 (%)
正常	0.805 ± 0.018	-
模型	1.394 ± 0.026	-
上清原液	0.848 ± 0.019	38.90
1/2 上清液	1.104 ± 0.029	20.82
1/4 上清液	1.301 ± 0.016	6.68

2.2 L-02 上清液对 HSC-LX-2 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响 L-02 细胞上清液与 HSC-LX-2 细胞共培养后, 上清原液组、1/2 上清液组 HSC-LX-2 细胞 α -SMA 蛋白的表达明显降低 ($F = 44.125$, $P < 0.01$)。见图 1。

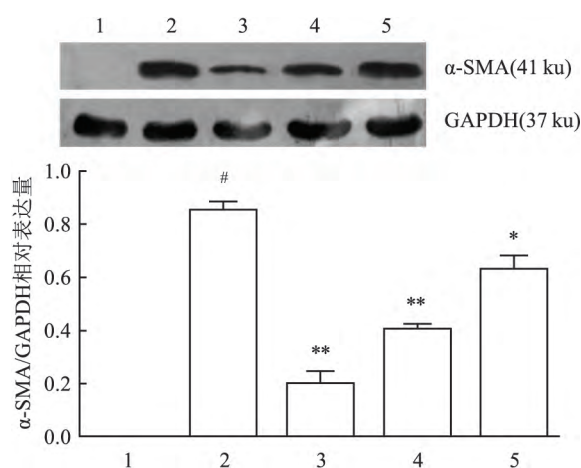


图 1 L-02 上清液对 HSC-LX2 细胞 α -SMA 表达的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 上清原液组; 4: 1/2 上清液组; 5: 1/4 上清液组; 与正常组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 对 HSC-LX-2 细胞 α -SMA mRNA 的表达 L-02 细胞上清液与 HSC-LX-2 细胞共培养后, 上清

原液组、1/2 上清液组中 HSC-LX-2 细胞 α -SMA mRNA 的表达降低 ($F=45.231, P<0.01$)。见图 2。

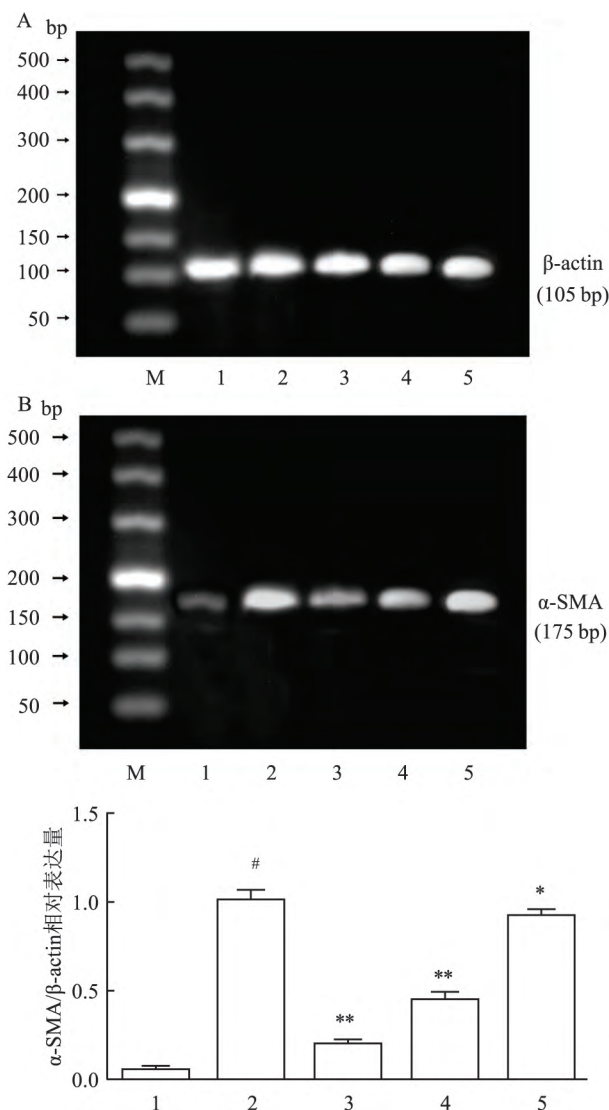


图2 L-02 上清液对 HSC-LX-2 细胞 α -SMA mRNA 表达的影响

A: β -actin; B: α -SMA; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 上清原液组; 4: 1/2 上清液组; 5: 1/4 上清液组; 与正常组比较: # $P<0.05$; 与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

在正常肝组织中,各种细胞及 ECM 有着精确的相对比例和特定的相对空间位置,通过细胞之间、细胞与 ECM 之间的信号传递精确地调控着结构、功能和代谢状态,成为一个相对稳定的微生态系统^[5]。肝纤维化(hepatic fibrosis HF)是多种原因引起的慢性肝损害所致的病理改变,而 HSC 活化、增殖及转分化为肌成纤维细胞则被认为是 HF 发生发展的核心机制^[6]。TGF- β 1 具有细胞黏附、迁移、抑制大多数细胞的增殖、诱导细胞分化、调节免疫细胞的增殖

与分化、免疫应答以及促进 ECM 与胶原生成等多重的生物学作用^[7],是最主要的促纤维化因子,与 HF 发生、发展密切相关^[8]。TGF- β 1 可刺激纤维黏连蛋白、胶原等 ECM 成分的合成与分泌,降低 ECM 蛋白酶的活性,减少 ECM 降解^[9],刺激 HSC 活化。HSC 激活后产生大量的肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor HGF),HGF 可以通过减少 TGF- β 1 合成并抑制其信号转导、抑制 HSC 活化和增殖,使其具有抗纤维化效应^[10]。L-02 具有分泌 HGF 等多种细胞生长因子^[11]的功能。但由肝实质细胞直接产生 HGF 的量很少,主要由肝间质细胞产生^[12]。本实验中,HSC-LX-2 细胞被 TGF- β 1 激活,模型组 HSC-LX-2 细胞自身分泌的 HGF 不能抑制 α -SMA 蛋白的表达,加入 L-02 细胞上清液后,随着上清液浓度的增加,HSC-LX-2 细胞的 α -SMA 及 α -SMA mRNA 的表达逐渐降低,表明 HSC-LX-2 细胞自身产生的 HGF 单独作用于 TGF- β 1 时,对 HSC-LX-2 细胞的 α -SMA 及 α -SMA mRNA 的表达没有影响,提示 HSC-LX-2 细胞自身分泌的 HGF 需要通过不同细胞的分泌因子、分泌因子和细胞的相互作用等才能发挥抑制 HSC 活化和增殖的功能,从而抑制蛋白 α -SMA 的表达。但 L-02 细胞上清液成分及激活 HGF 的机制尚待进一步的研究。

参考文献

- 常艳,魏伟. 细胞共培养及其应用的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学,2009,14(7): 827-32.
- 赵慧慧,吕文良. TGF- β 1 及其信号通路对话在肝纤维化中的研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2013,22(10): 955-8.
- 杨成芳,李勇文,钟毓娟,等. 白花丹酊对 TGF- β 1 刺激 HSC-LX2 建立 α -SMA 过表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(13): 114-7.
- 宋伟. TGF- β 1 对肝星状细胞的活化作用及机制 [D]. 遵义: 遵义医学院,2012.
- 林晓华. 甘利欣联合多烯磷脂酰胆碱抗肝纤维化的疗效观察 [J]. 中国现代药物应用,2012,6(9): 74-5.
- 颜小明,张立婷,李敏,等. TGF- β 1/Smad 信号通路在肝纤维化中的研究进展 [J]. 现代生物医学进展,2016,16(9): 1778-81.
- 李仙. 肝纤维化中 TGF- β 的研究进展 [J]. 宜春学院学报,2015,37(3): 88-90.
- 石永萍,黄志宝,初彦辉. TGF- β 与肝纤维化的研究进展 [J]. 牡丹江医学院学报,2016,37(3): 114-6.
- 黄莹莹,孙剑勇. 肝细胞生长因子与肝纤维化关系研究进展 [J]. 医学综述,2011,17(6): 825-7.
- 张义,申元英. LO-2 细胞上清诱导人脐血干细胞向类肝细胞分化 [J]. 中国应用生理学杂志,2014,30(2): 177-9.
- 王立生,吴祖泽,刘福陆. 肝细胞生长因子 [J]. 生理科学进展,1993,15(4): 345-7.

网络出版时间: 2018-11-5 15:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.006.html>

沉默精子相关抗原 9 对膀胱癌细胞的影响

邢家伟¹, 许长宝¹, 赵兴华¹, 赵永立¹, 吕 远¹, 王红丹²

摘要 目的 探究精子相关抗原 9 (SPAG9) 在膀胱癌细胞中的表达量以及与细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移的关系和作用机制。方法 以人膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 为对照, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 法检测 SPAG9 在膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞系的表达量; 转染 siRNA 沉默膀胱癌 T24 细胞中 SPAG9 基因的表达, 细胞分为对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组, MTT 实验检测干扰 SPAG9 基因表达对细胞增殖的影响, 流式细胞术检测细胞的凋亡率, Transwell 法检测细胞的迁移、侵袭能力; Western blot 检测增殖细胞核抗原 (PCNA)、细胞核相关抗原 Ki-67 (Ki-67)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的蛋白水平。结果 与正常上皮细胞 SV-HUC-1 比较, SPAG9 在膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞中的表达量显著上调, 其中以 T24 细胞最为明显; 与对照组比较, siRNA-SPAG9 组细胞中 SPAG9 的表

达量显著降低 ($P < 0.05$)。沉默 SPAG9 表达显著抑制细胞的增殖 ($P < 0.05$), 促进其凋亡 ($P < 0.05$), 抑制细胞的侵袭、迁移能力 ($P < 0.05$), 显著下调 PCNA、Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 的蛋白水平 ($P < 0.05$), 显著上调 Bax 蛋白表达量 ($P < 0.05$)。结论 SPAG9 在膀胱癌细胞中高表达; 沉默 SPAG9 可能通过调控细胞恶性表型相关蛋白的表达, 参与膀胱癌细胞生物学特性的调节过程, 为膀胱癌的治疗提供新的靶点。

关键词 精子相关抗原 9; PCNA; MMP-2; 膀胱癌

中图分类号 R 737

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1846-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.006

膀胱癌是一种恶性肿瘤, 部分患者可通过手术治疗的方法得以控制, 但目前对于膀胱癌患者预后复发率高、转移率高的问题依然缺少高效的控制方法^[1]。研究^[2]表明, 精子相关抗原 9 (sperm associated antigen 9, SPAG9) 在正常机体曲细精管的精子中特异性表达。研究^[3-5]显示, 在乳腺癌、宫颈癌、肺癌等组织或血清中表达量均异常, 表明 SPAG9 参与肿瘤的发生、发展。但 SPAG9 在膀胱癌细胞中的表达量以及具体作用机制的相关研究较为少见。该

2018-07-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81501336)

作者单位: ¹ 郑州大学第二附属医院泌尿外科, 郑州 450000

² 郑州大学人民医院, 郑州 450000

作者简介: 邢家伟, 男, 住院医师;

许长宝, 男, 博士, 主任医师, 责任作者, E-mail: xuesn00@163.com

Effect of L-02 cells' supernatant liquid on α -SMA expressions in HSC cells stimulated by TGF- β 1

Zhong Yujuan, Wu Dan, Huang Guangling, et al

(Experimental Teaching Center, School of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541000)

Abstract **Objective** To observe the effect of human normal liver cell (LO2) cells' supernatant liquid on the mRNA and protein expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) in human hepatic stellate cell (HSC-LX-2) cells stimulated by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) *in vitro*. **Methods** HSC-LX2 cells and L-02 cells were cultured *in vitro* and divided into the blank group, model group, original L-02 cells' supernatant group, 1/2 supernatant group and 1/4 supernatant group. After being incubated with each concentration of the L-02 cells' supernatant liquid for 72 h, the mRNA expression of α -SMA was assayed by RT-PCR and the protein expression of α -SMA was assayed by Western blot. **Results** There was a significant inhibitory effect on the expression of α -SMA mRNA and α -SMA protein on the original L-02 cells' supernatant group and the 1/2 supernatant group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** LO2 cells' supernatant liquid can inhibit the activation and proliferation of HSC-LX-2 cells.

Key words human hepatic stellate cell; α -smooth muscle actin; transforming growth factor- β 1