

TGF- β III型受体在小鼠肝纤维化中的作用研究

厉歆然 孙妩弋 谷元婧 彭文婷 魏 伟

摘要 目的 建立四氯化碳(CCl_4)诱导的肝纤维化小鼠模型,观察转化生长因子 β III型受体(T β R III)在肝纤维化中的作用。方法 C57BL/6J小鼠随机分为正常对照组和 CCl_4 模型组,模型组腹腔注射10% CCl_4 油溶液(5 ml/kg)每周2次,分别在造模第2、4、6、8周处死小鼠,HE染色观察小鼠肝脏的病理学变化,检测模型进展过程中血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性,Western blot法检测肝组织中I型胶原、T β R III、p-Smad3、Smad3、p-Akt、Akt的表达情况。结果 HE染色结果显示随着造模时间的延长,小鼠肝纤维化程度逐渐加重,血清ALT、AST活性逐渐增加,Western blot结果显示I型胶原的表达逐渐增加,T β R III的表达逐步降低,p-Smad3和p-Akt的表达逐渐升高。结论 T β R III的降低可能与小鼠肝纤维化的发生发展有关。

关键词 肝纤维化;四氯化碳;T β R III;Akt

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0962-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.005

肝纤维化是各种因素所致肝脏受损,导致细胞

外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解不平衡,引起肝内结缔组织异常增生的病理过程,肝纤维化可进一步发展为肝硬化甚至肝癌,严重威胁人类健康。目前,肝纤维化的发病机制仍不清楚,因此探究其发病机制,为研发抗肝纤维化药物奠定理论基础具有重要意义。转化生长因子 β III型受体(type III TGF- β receptor, T β R III)一直以来被认为是TGF- β 超家族的辅助受体,近年来的研究^[1-4]表明,其既可以参与调控经典的Smad信号通路,又可以调控其他信号通路。研究^[5-7]表明,在肺纤维化和心肌纤维化中,T β R III的表达降低。在肝纤维化小鼠中,T β R III的表达是否发生变化,且相关信号通路是否受到影响尚未见报道。该研究通过建立四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的肝纤维化小鼠模型,观察肝纤维化进程中T β R III的表达及Smad3、Akt的信号变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 6~8周龄雄性C57BL/6J小鼠,重(20 \pm 2)g,由安徽医科大学实验动物中心提供。动物自由饮食饮水,动物房室温约25 $^{\circ}\text{C}$,光照时间随昼夜变化。50只实验动物随机分为正常对照组、 CCl_4 模型组。

1.2 主要试剂与仪器 CCl_4 (上海凌峰化学试剂有限公司);玉米油(市售);抗Collagen I抗体、抗T β R III抗体(美国Santa Cruz公司);抗p-Smad3抗

2017-02-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81300332、81330081)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥230032

作者简介:厉歆然,女,硕士研究生;

孙妩弋,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: sun-wuyi51@aliyun.com;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

well as the combination index (CI) values were detected by the MTT method. The changes of apoptosis induced by Osimertinib and metformin alone or in combination were detected by the fluorescent microscope and flow cytometry. The change of the p-AMPK and the p-p70S6K protein level were detected by Western blot. **Results** The combination therapy with Osimertinib and metformin showed a synergistic effect on proliferative inhibition compared to Osimertinib or metformin alone therapy ($P < 0.05$), which showed a synergistic effect ($CI < 1$). In addition, apoptotic rates were significantly increased in combination treatment compared to the single drug. The result of the Western blot showed that metformin may upregulate the expression of p-AMPK protein; in addition, both Osimertinib and metformin could reduce the level of p-p70S6K, the expression levels of p-p70S6K was decreased in the combination therapy compared to Osimertinib or metformin alone therapy. **Conclusion** The combination of Osimertinib and metformin could significantly inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis, and has synergistic effect.

Key words non-small cell lung cancer; Osimertinib; metformin; combination

体、抗 Smad3 抗体、抗 p-Akt 抗体、抗 Akt 抗体(美国 Cell Signaling 公司);抗 β -actin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)和谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);RIPA 蛋白裂解液、苯甲基磺酰氯(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)(江苏碧云天生物技术公司);BIO-RAD powerpac164-5070 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);LAS4000Mini 型化学发光成像分析仪(美国 GE 公司);Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);BX53 正置显微镜(日本 Olympus 光学工业株式会社)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立及处理 领取动物后适应性饲养 3 d,待动物状态稳定后,腹腔注射 10% CCl_4 油溶液(5 ml/kg),每周注射 2 次,共注射 8 周,正常对照组小鼠腹腔注射等量等次的油溶液。分别在造模第 2、4、6、8 周结束时眼眶后静脉丛取血,处死小鼠,4 000 r/min 离心,吸取血清,冻存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱待测。

1.3.2 肝组织病理学检查 留取肝脏右叶,用生理盐水洗去浮血,立即用 10% 甲醛溶液固定 24 h,再置于 70%、80%、90%、100% 乙醇溶液中梯度脱水,透明,石蜡包埋,切片,常规脱蜡,HE 染色,中性树脂封片后,显微镜下观察肝脏病理组织学变化。

1.3.3 血清转氨酶水平的检测 ALT 和 AST 分别能使丙氨酸和天门冬氨酸与 α -酮戊二酸发生氨基转换,生成丙酮酸,再与 2,4-二硝基苯肼作用,生成在碱性溶液中呈红棕色的物质,通过检测吸光度值,确定酶的活性,具体步骤按照试剂盒说明书。

1.3.4 肝组织蛋白的提取 称取 50 mg 肝脏组织,剪碎后加入玻璃研磨器,再加入 700 μl 的裂解液(RIPA:PMSF=100:1),研磨至完全匀浆,转入离心管中,14 000 r/min 离心 20 min,吸上清液即总蛋

白。

1.3.5 Western blot 法检测肝脏 I 型胶原、T β R III、p-Smad3、Smad3、p-Akt、Akt 的表达 提取肝组织总蛋白,并测定蛋白的浓度。上样行 10% SDS-PAGE 电泳,后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加相应一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,次日用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,加入相应的二抗,室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min。PBS 洗 10 min,化学发光成像分析仪扫膜并采集图像,Image J 软件分析目的条带灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。相关性分析使用双变量 Pearson 分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般状况 正常对照组小鼠毛色光鲜,反应机灵,活动频繁。模型组小鼠随着造模时间的延长,毛色渐变灰暗无光泽,蓬乱无序,反应迟钝。

2.2 小鼠肝脏组织病理学变化 HE 染色观察正常对照组和 CCl_4 造模第 2、4、8 周时小鼠肝脏的病理学变化(图 1)。正常对照组肝细胞排列整齐紧密,肝索呈放射状,无炎细胞浸润。造模 2 周后,肝细胞肿胀,出现炎细胞浸润。造模第 4 周时,炎细胞浸润增多,胶原由中央静脉或汇管区周围向外延生,形成不完全间隔。造模第 8 周时,肝细胞肿大,排列紊乱,肝组织被大量的胶原纤维分隔成大小不等的假小叶。

2.3 CCl_4 诱导的肝纤维化小鼠血清转氨酶活性的变化 应用转氨酶测定试剂盒检测 CCl_4 造模第 2、4、6、8 周时,小鼠血清中转氨酶活性的变化。随着造模时间的延长,转氨酶活性均逐渐增加,与正常对照组相比,ALT 和 AST 活性从 2 周时开始升高($F=158.61, 177.60, P<0.05$)。见表 1。

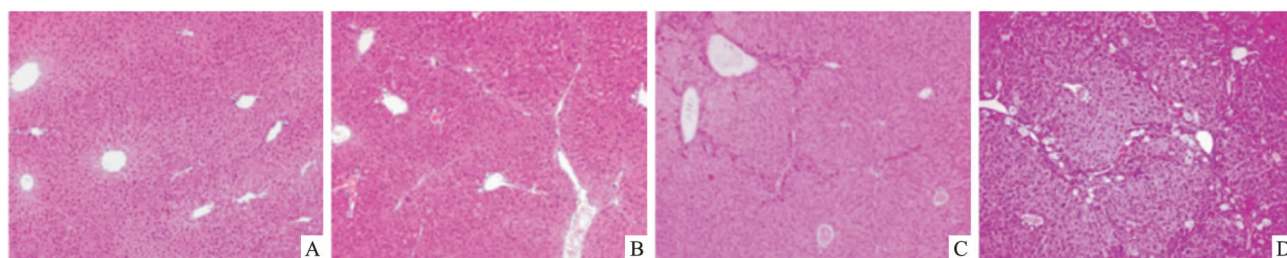


图 1 小鼠肝脏组织病理学改变 HE \times 100

A: 正常对照组; B: CCl_4 造模 2 周; C: CCl_4 造模 4 周; D: CCl_4 造模 8 周

表1 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠造模进程中转氨酶活性的变化($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常对照	17.24±1.95	16.30±2.01
CCl ₄ 造模 2 周	39.25±2.60 [#]	32.41±3.79 ^{##}
CCl ₄ 造模 4 周	71.87±6.50 ^{##}	72.74±4.74 ^{##}
CCl ₄ 造模 6 周	120.70±4.42 ^{##}	113.01±8.03 ^{##}
CCl ₄ 造模 8 周	142.36±8.77 ^{##}	176.75±11.96 ^{##}

与正常对照组比较: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

2.4 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝组织中 I 型胶原表达的变化 Western blot 法检测 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠造模第 2、4、6、8 周不同时间点肝脏中 I 型胶原表达量的变化。随着造模时间的延长, I 型胶原表达量不断增加 ($F=24.43, P<0.05$)。相比于正常对照组, I 型胶原的表达量从第 2 周开始明显增加 ($P<0.01$)。见图 2。

2.5 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝组织中 TβR III 表达的变化及与 I 型胶原的相关性 Western blot 法检测 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠造模不同时间点肝脏中 TβR III 表达量的变化。随着造模时间的延长, TβR III 表达量不断减少 ($F=224.374, P<0.05$)。相比于正常对照组, TβR III 的表达量从第 2 周开始明显降低 ($P<0.05$)。见图 3。相关性分析结果显示, 肝纤维化中 TβR III 与 I 型胶原的表达呈负相关性 ($r=-0.982, P=0.01$)。见图 4。

2.6 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝组织中 p-Smad3、Smad3 表达的变化 Western blot 法检测

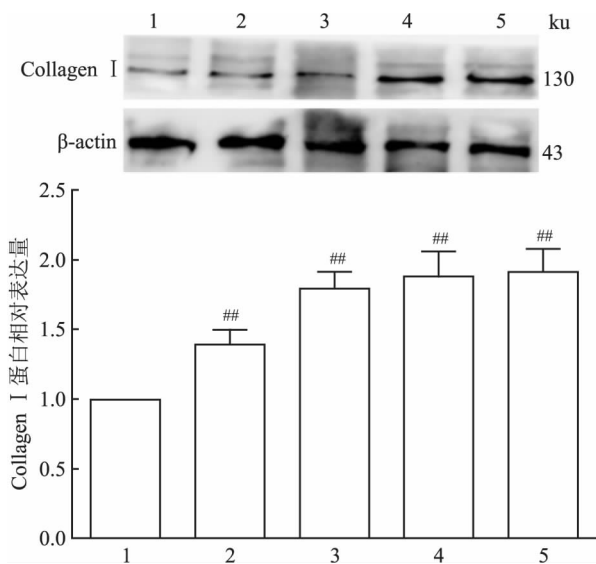


图2 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型造模不同时间点小鼠肝组织中 I 型胶原表达的变化

1:正常对照组;2:CCl₄ 造模 2 周;3:CCl₄ 造模 4 周;4:CCl₄ 造模 6 周;5:CCl₄ 造模 8 周;与正常对照组比较: ^{##} $P<0.01$

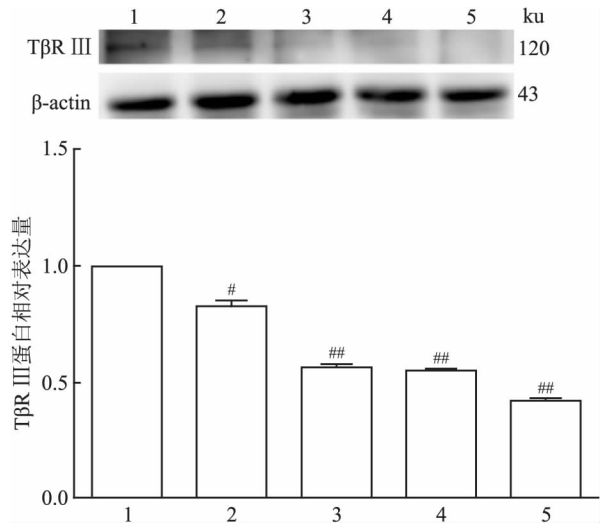


图3 造模不同时间点小鼠肝组织中 TβR III 表达的变化

1:正常对照组;2:CCl₄ 造模 2 周;3:CCl₄ 造模 4 周;4:CCl₄ 造模 6 周;5:CCl₄ 造模 8 周;与正常对照组比较: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

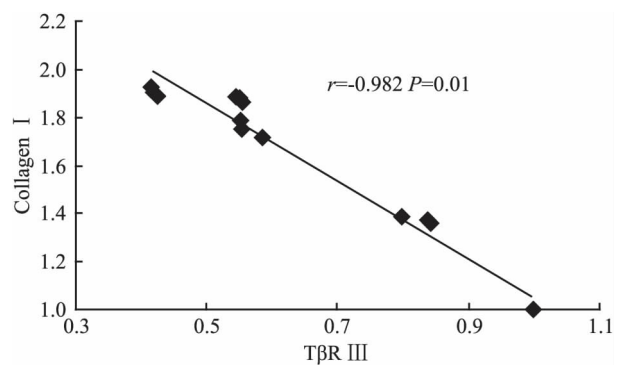


图4 TβR III 表达与 I 型胶原表达的相关性分析

CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠造模第 2、4、6、8 周不同时间点肝脏中 p-Smad3、Smad3 表达量的变化。随着造模时间的延长, p-Smad3 表达量不断增加 ($F=44.03, P<0.05$) 而 Smad3 的表达量没有明显变化。相比于正常对照组, p-Smad3 的表达量从第 4 周开始明显增加 ($P<0.05$)。见图 5。

2.7 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝组织中 p-Akt、Akt 表达的变化 Western blot 法检测 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠造模不同时间点肝脏中 p-Akt、Akt 表达量的变化(图 6)。随着造模时间的延长, p-Akt 表达量不断增加 ($F=59.05, P<0.05$) 而 Akt 的表达无明显变化。相比于正常对照组, p-Akt 的表达量从第 2 周开始明显增加 ($P<0.05$)。

3 讨论

肝纤维化动物模型的建立是探究肝纤维化发病

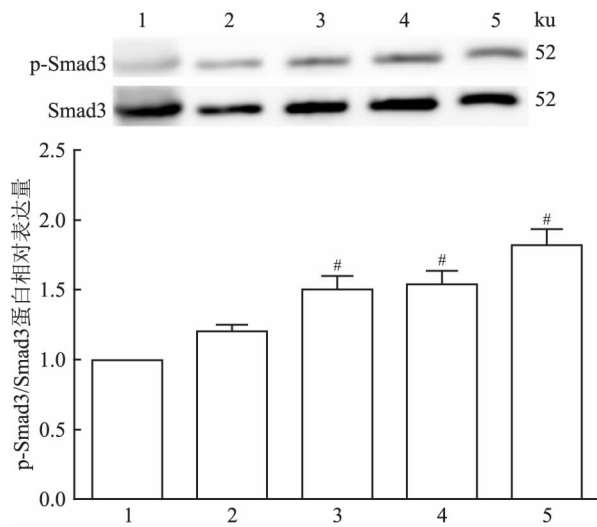


图5 造模不同时间点小鼠肝组织中 p-Smad3、Smad3 表达的变化
1:正常对照组;2:CCl₄造模2周;3:CCl₄造模4周;4:CCl₄造模6周;5:CCl₄造模8周;与正常对照组比较: #*P*<0.05

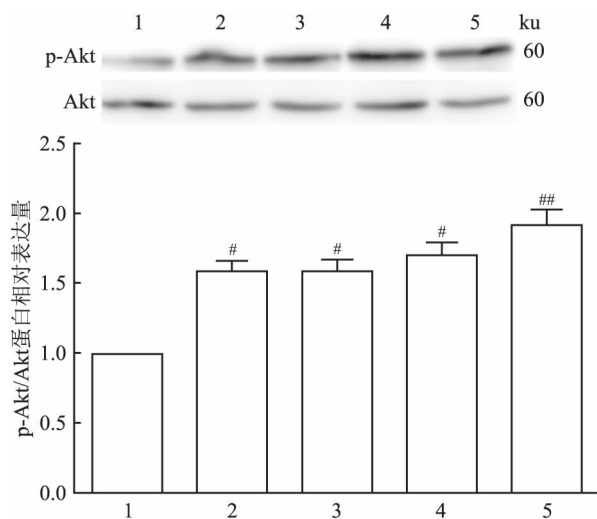


图6 造模不同时间点小鼠肝组织中 p-Akt、Akt 表达的变化
1:正常对照组;2:CCl₄造模2周;3:CCl₄造模4周;4:CCl₄造模6周;5:CCl₄造模8周;与正常对照组比较: #*P*<0.05, ##*P*<0.01

机制、研发抗纤维化药物的模型基础。目前已有的小鼠肝纤维化模型大多存在死亡率高、成模率低、造模时间长等问题。本研究采用了腹腔注射 10% CCl₄ 油溶液 (5 ml/kg), 每周 2 次的造模方式, 注射浓度低、容量小, 对小鼠的伤害较小, 造模过程中无小鼠死亡, 且造模效果较好, 成模迅速, 4~6 周即可形成肝纤维化, 是理想的肝纤维化小鼠造模方法。

肝纤维化是由于致病因子在肝脏中引起的损伤和炎症, 导致 ECM 大量合成和沉积的过程。胶原是 ECM 的重要成分, 在肝纤维化和肝硬化时, 胶原含

量可成倍增加, 尤其是具有典型结构的 I 型胶原^[8]。ALT、AST 是反映肝实质损害的指标, 当肝细胞受损时, ALT 和 AST 释放入血, 则血清中此两种酶的活性会升高。本研究中, HE 染色结果显示, 随着造模时间的延长, 肝细胞逐渐肿大, 排列紊乱, 炎细胞浸润, 胶原纤维逐步增加, 形成假小叶。另外, Western blot 检测结果也显示 I 型胶原的表达量不断增加。血清学结果显示, ALT、AST 活性成倍增加。上述结果表明本研究已成功构建了小鼠肝纤维化模型。

TβR III 的异常表达参与了一些纤维化疾病的发生发展。研究^[6]表明, 在小鼠肺纤维化细胞中, TβR III 的表达减少, 而外源性增加 TβR III 的表达可以抑制 α-平滑肌肌动蛋白和 I 型前胶原的表达。在由心肌梗死引起的心肌纤维化中, TβR III 表达明显降低, 且向心肌纤维母细胞中转染 TβR III 可以抑制胶原的生成^[5]。向原发性高血压大鼠腹腔注射来源于 TβR III 的短肽 P144, 表现出抗心肌纤维化和肾纤维化的作用, 能够显著减少各型胶原和结缔组织生长因子的表达^[9-10]。本研究中, 随着小鼠肝纤维化的加重, TβR III 的表达逐渐减少, 相关性分析结果表明, TβR III 的表达与 I 型胶原的表达呈负相关性, 提示在肝纤维化中 TβR III 可能具有抑制胶原产生的作用。

TβR III 可通过 TGF-β 经典信号通路和非经典通路在一些纤维化疾病中发挥作用。有研究^[6]报道, 在 TGF-β1 介导的肺纤维母细胞分化过程中, 过表达 TβR III, 能够抑制 Smad2/3、ERK、Akt 信号分子的磷酸化。向心肌纤维母细胞中转染 TβR III 可以抑制胶原的生成, 进一步的研究显示其是通过减少 p-Smad3 的表达, 降低 TGF-β 信号通路的活性发挥作用的^[5]。可以看出, TβR III 抑制纤维母细胞的分化及胶原的产生, 既通过 TGF-β1 介导的 Smad 依赖途径, 也通过非 Smad 依赖途径。有研究^[11]表明, 在肺纤维化细胞中过表达 Smad3 能够显著增加 α-平滑肌肌动蛋白的表达, 而 Smad2 没有这种作用。说明 Smad3 较 Smad2 在纤维化的发生发展中可能更为关键。本研究显示, 在小鼠肝纤维化造模进程中 TβR III 的表达逐渐减少, p-Smad3、p-Akt 的表达逐渐升高, 提示 p-Smad3、p-Akt 表达的增加可能与 TβR III 表达减少导致对 Smad 和 Akt 信号通路抑制作用减弱有关, 即 TβR III 可能既通过抑制 Smad3 信号通路, 也通过抑制 Akt 信号通路减轻肝纤维化的程度。

综上所述, 本造模方法可以成功诱导出肝纤维

化小鼠模型 随着造模进程的发展, T β R III 表达的降低可能与肝纤维化的发生发展相关, 其机制可能与调节 Smad3、Akt 信号通路有关。

参考文献

- [1] Bernabeu C, Lopez-Novoa J M, Quintanilla M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1792(10):954-73.
- [2] Tazat K, Hector-Greene M, Blobe G C, et al. T β R III independently binds type I and type II TGF- β receptors to inhibit TGF- β signaling [J]. *Mol Biol Cell* 2015, 26(19):3535-45.
- [3] Chu W, Li X, Li C, et al. TGFBR3, a potential negative regulator of TGF- β signaling, protects cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis [J]. *J Cell Physiol* 2011, 226(10):2586-94.
- [4] Lee N Y, Blobe G C. The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells [J]. *J Biol Chem* 2007, 282(29):21507-17.
- [5] Liang H, Zhang C, Ban T, et al. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGFBR III is involved in cardiac fibrosis [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2012, 44(12):2152-60.
- [6] Ahn J Y, Park S, Yun Y S, et al. Inhibition of type III TGF- β receptor aggravates lung fibrotic process [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(7):472-6.
- [7] Sun F, Duan W, Zhang Y, et al. Simvastatin alleviates cardiac fibrosis induced by infarction via up-regulation of TGF- β receptor III expression [J]. *Br J Pharmacol* 2015, 172(15):3779-92.
- [8] Nielsen M J, Karsdal M A, Kazankov K, et al. Fibrosis is not just fibrosis - basement membrane modelling and collagen metabolism differs between hepatitis B- and C-induced injury [J]. *Aliment Pharmacol Ther* 2016, 44(11-12):1242-52.
- [9] Hermida N, López B, González A, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. *Cardiovasc Res* 2009, 81(3):601-9.
- [10] Baltanás A, Miguel-Carrasco J L, San José G, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor- β 1 type III receptor inhibits NADPH oxidase and prevents oxidative stress in the kidney of spontaneously hypertensive rats [J]. *Antioxid Redox Signal* 2013, 19(14):1607-18.
- [11] Gu L, Zhu Y J, Yang X, et al. Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2007, 28(3):382-91.

The effect of type III TGF- β receptor in hepatic fibrosis mice

Li Xinran, Sun Wuyi, Gu Yuanjing, et al

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,

Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education,

Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicines, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate effects of type III TGF- β receptor (T β R III) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into normal control group and CCl₄-induced liver fibrosis model group. Mice in model group were treated twice weekly with i.p. injections of 5 ml/kg CCl₄ diluted in nine volumes of oil for 8 weeks. Mice were sacrificed at 2, 4, 6, 8 weeks. The liver histopathological change was examined by HE staining. Serum transaminase (ALT, AST) activities were detected by commercial kit. The expressions of collagen I, T β R III, p-Smad3, Smad3, p-Akt, Akt in the liver were measured by Western blot. **Results** The results of HE staining showed that the liver fibrosis gradually increased with the prolongation of time, as well as serum ALT and AST activities. Western blot showed that the collagen I expression was gradually increased, T β R III expression was decreased with the aggravation of hepatic fibrosis. Moreover, T β R III expression was negatively correlated with the collagen I expression. Furthermore, p-Smad3, p-Akt expression in liver tissues were gradually increased. **Conclusion** The decrease of T β R III may associates with the development of hepatic fibrosis.

Key words hepatic fibrosis; carbon tetrachloride; T β R III; Akt