

柚皮素对支气管上皮细胞中 Smad 介导的 TGF- β 1 通路的影响

史莹,谷伟*,孙丽华,谭焰

(南京医科大学附属南京医院呼吸科,江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:观察柚皮素对支气管上皮细胞中 Smad 介导的转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)通路的影响,并研究其可能的机制。方法:培养 HBE 细胞,分为对照组、TGF- β 1 组和柚皮素干预组。柚皮素干预组分别与 25、50 和 100 μ mol/L 的柚皮素共孵育 2 h 后,与 TGF- β 1 组一起加入 TGF- β 1。2 h 后用 real-time PCR 方法检测各组细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) mRNA 表达。另外在加入 TGF- β 1 后 30 min 时,提取对照组、TGF- β 1 组和柚皮素高剂量组细胞总蛋白,用 Western blot 方法检测 Smad2 水平及磷酸化的 Smad2 水平,同时用免疫荧光法检测 Smad2 的核转位。结果:TGF- β 1 组的 PAI-1 mRNA 水平较对照组明显增高,随着给予柚皮素剂量的增大,PAI-1 mRNA 水平明显降低。TGF- β 1 组经 TGF- β 1 刺激 30 min 后,磷酸化的 Smad2 明显增加,经柚皮素干预后则随着柚皮素剂量的增加,Smad2 磷酸化明显受抑制。各组的总 Smad2 水平无明显变化。免疫荧光实验显示 TGF- β 1 组的细胞核内 Smad2 明显增多,而柚皮素干预组(100 μ mol/L)的细胞核内 Smad2 含量明显减少。结论:柚皮素可能通过抑制 Smad2 磷酸化及减少核内 Smad2 含量来影响 TGF- β 1 在支气管上皮细胞中的生物功能。

[关键词] 柚皮素;转化生长因子 β 1;Smad2

[中图分类号] Q257

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-155-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130202

The effect of naringenin on TGF- β 1/Smad pathway in HBE cells

Shi Ying, Gu Wei*, Sun Lihua, Tan Yan

(Department of Respiratory Medicine, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of naringenin on TGF- β 1/Smad pathway in human bronchial epithelial cells. **Methods:** HBE cells were divided into the control group, the TGF- β 1 group and the naringenin group. The naringenin groups were incubated with different doses of naringenin (25, 50 and 100 mol/L) for 2 h. Then the naringenin group and the TGF- β 1 group were incubated with TGF- β 1. After 2 h, we determined the PAI-1 mRNA level by real time-PCR. After incubated with TGF- β 1 for 30 min, we detected Smad2 and Smad2 phosphorylation by Western. Smad2 nuclear translocation was analyzed by indirect immunofluorescent staining. **Results:** Compared with the control group, the expression of PAI-1 mRNA was significantly increasing in HBE cells stimulated with TGF- β 1. Naringenin has inhibitory effects on the expression of PAI-1 mRNA. The total of Smad2 was similar in different groups. Compared with the control group, phosphorylated-Smad2 was increasing in the TGF- β 1 group. Naringenin could significantly inhibit the Smad2 phosphorylation. Immunofluorescent staining showed that the nuclear content of Smad2 in the TGF- β 1 group was increased, and in the naringenin group (100 μ mol/L) was decreased. **Conclusion:** Naringenin may inhibit TGF- β 1/Smad through attenuated Smad2 phosphorylation and suppressed the nuclear content of Smad2 in human bronchial epithelial cells.

[Key words] naringenin; TGF- β 1; Smad2

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 155-159]

支气管哮喘严重危害人类健康,目前临床上最常用的治疗哮喘药物是糖皮质激素,但是长期使用会引起免疫力低下、骨质疏松、代谢紊乱等不可避免

的不良反应^[1]。柚皮素是柑橘类水果提取物,属于发现较早、研究较多的黄酮类化合物。目前已发现柚皮素具有抗炎、免疫调节、抗氧化、抗增殖、抗肿瘤等作用^[2-5]。在急性哮喘的动物实验中,柚皮素具有抑制气道炎症和气道高反应性的作用^[6]。

在哮喘病理生理过程中,转化生长因子 β 1

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81100073)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guw2001@126.com

(transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 在炎症的发生和气道重塑中起重要作用^[7]。TGF- β 1 可通过诱导大量炎性细胞趋化至肺部, 延长一些免疫炎性细胞的存活期而参与气道炎症反应^[8]。TGF- β 1 还可转录激活编码细胞外基质蛋白的基因和他们的调节蛋白, 如纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)^[9], 导致纤维沉积而引起气道重塑。

TGF- β 1 最重要的胞内效应因子是 Smads 蛋白。TGF- β 1 二聚配体与细胞膜表面的 I 型和 II 型受体结合形成异四聚体。II 型受体可将 I 型受体磷酸化, 随后使 Smad2 和 Smad3 磷酸化并与 Smad4 结合形成异三聚体或四聚体进入细胞核, 与靶基因的特异性 DNA 元件结合, 从而激活靶基因转录^[10]。

本实验以人支气管上皮细胞 (HBE 细胞) 为研究对象, 研究柚皮素对 TGF- β 1 的生物学功能的影响, 并进一步探讨其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

胎牛血清 (杭州四季青公司), TRIzol (Invivo-gen 公司, 美国), 重组人 TGF- β 1 细胞因子 (Pepro-Tech 公司, 美国), 柚皮素 (Sigma 公司, 美国), Cy3 标记羊抗兔二抗 (Sigma 公司, 美国), chemiluminescence reagents (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 蛋白酶抑制剂, cocktail (Sigma 公司, 美国), 磷酸酶抑制剂 (Sigma 公司, 美国), anti-GAPDH 抗体 (Abcam 公司, 美国), Smad2 抗体及 p-Smad2 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), HRP 标记的抗兔 IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)。PAI-1 引物序列: 上游 5'-TGCTGGTGAATGCCCTCTACT-3', 下游: 5'-CGGTCATCCCAGGTTCTCTA-3', 扩增片段为 399 bp。 β -肌动蛋白引物序列: 上游 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'; 下游 5'-CACGATG-GAGGGGCCGACTCTTC-3', 扩增片段为 241 bp。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养、柚皮素及生长因子准备

HBE 细胞由南京医科大学第一附属医院呼吸科提供。接种于 50 ml 培养瓶, 培养液为 RPMI1640 + 10% 胎牛血清, 每隔 3 d 换液一次, 当细胞融合后, 用 PBS 液洗涤 2 次, 加入适量 0.25% 胰酶消化, 显微镜下观察, 当细胞收缩成圆形后, 弃去消化液, 加入培养液, 无菌吸管吹打数次至贴壁细胞全浮起, 接种于 6 孔培养板或培养皿继续培养。初始细胞接种密度为 $(2\sim 5)\times 10^5$ 个/ml。

柚皮素用 DMSO 溶解, 终浓度 0.1 mg/ μ l (400 mmol/L), TGF- β 1 干粉加 RPMI1640 培养液溶解, 浓度 2 ng/ml, -20°C 保存。

1.2.2 细胞因子刺激及药物干预

当细胞进入对数生长期、细胞融合达 80%~90% 时分为对照组、TGF- β 1 组、柚皮素干预低剂量组、中剂量组和高剂量组。柚皮素干预组分别与 25、50 和 100 μ mol/L 的柚皮素共孵育 2 h 后, 与 TGF- β 1 组一起加入 TGF- β 1 (终浓度 50 pmol/L) 反应。2 h 后用 real-time PCR 方法检测各组细胞 PAI-1 的 mRNA 表达。另外在加入 TGF- β 1 30 min 时, 提取对照组、TGF- β 1 组和柚皮素高剂量组细胞总蛋白, 用 Western blot 方法检测 Smad2 水平及磷酸化的 Smad2 水平, 同时用免疫荧光法检测 Smad2 核转位。

1.2.3 real-time PCR 法测 HBE 细胞 PAI-1 mRNA 表达

吸去 6 孔板中培养液后, 贴壁的细胞用 PBS 液洗 2 次, 加入 1 ml TRIzol, 用细胞刮子刮下细胞, 按说明书操作步骤提取细胞 RNA。用紫外分光光度计分别测定样品在 260 nm、280 nm 吸光度比值及浓度, 使用日本 TaKaRa 公司逆转录试剂盒合成第一链, 反应条件为 37°C 15 min, 85°C 5 s, 保存 cDNA 用于 real-time PCR。使用日本 TaKaRa 公司定量 PCR 试剂盒进行 real-time PCR 反应。反应条件为 95°C 10 s 1 个循环; 95°C 5 s, 60°C 31 s, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 30 s, 95°C 15 s 1 个循环。PCR 完成后产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳。结果分析使用相对的 ΔCT 表示: ΔCT 处理组 = CT 处理组 - CT 内参处理组, ΔCT 对照组 = CT 对照组 - CT 内参对照组, $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}$ 处理组 - ΔCT 对照组, 差别倍数 = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。

1.2.4 Western blot 法测定 HBE 细胞 Smad2 蛋白表达及 p-Smad2 表达

在加入 TGF- β 1 后 30 min 时弃去培养液, 贴壁的细胞用 PBS 液洗 2 次, 加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液 400 μ l (检测 p-Smad2 时, 裂解液中另加入磷酸酶抑制剂)。用细胞刮子刮下细胞, 将细胞悬液转移至 1.5 ml 离心管, 提取全蛋白。用 Bradford 法测蛋白浓度。在玻璃板夹槽中依次加入分离胶和浓缩胶, 待其凝固; 取适量待测蛋白煮沸 5 min 后, 加入上样孔中; 浸于 $1\times$ 电泳缓冲液, 电泳 1~3 h。裁切与凝胶同样大小的 PVDF 膜和滤纸, PVDF 膜预浸入甲醇, ddH₂O 漂洗再置于 $1\times$ 转膜缓冲液 15 min 以上。制作三明治夹心, 浸于 $1\times$ 转膜缓冲液, 恒压 (100 V) 转膜 1 h。PVDF 膜浸入 $1\times$ 封闭液, 室温缓

慢摇动 1 h。在 1 \times 封闭液中加入一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜 3 次,每次 5 min。加入二抗室温孵育 1 h。洗膜同前。加入 ECL 发光液,显色 5~15 min。

1.2.5 免疫荧光检测 p-Smad2 核转位情况

HBE 细胞传代时,以 2×10^5 个/ml 细胞浓度接种到预先放有处理好盖玻片的 6 孔板中,待细胞融合达 80%~90% 时进行分组处理,方法同 1.2.2 节, TGF- β 1 刺激 30 min 后进行细胞免疫荧光染色。

吸去上层培养液, HBE 细胞用 PBS 冲洗 3 次, 弃去 PBS, 用含 4% 多聚甲醛及 0.03% 的 TritonX-100 室温固定 30 min。固定后, 10% 羊血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 用兔抗 p-Smad2 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 用 FITC 标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h。PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 置于 Hoechst 染液中室温下复染 3 min。漂洗过后取出盖玻片固定于载玻片上避光放置, 及时在自动荧光显微镜下观察并拍照。结果以 p-Smad2 核阳性的细胞数与总细胞的相对百分比表示(每张切片计算 100~200 个总细胞), p-Smad2 核阳性细胞为与阴参(不加一抗)及 Hoechst 核染色组对比而得出。

1.3 统计学方法

同一刺激和干预时间的样本重复 3 次, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.5 统计学软件, 使用单因素方差分析和 LSD 法(最小差异性检验)进行数据统计。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

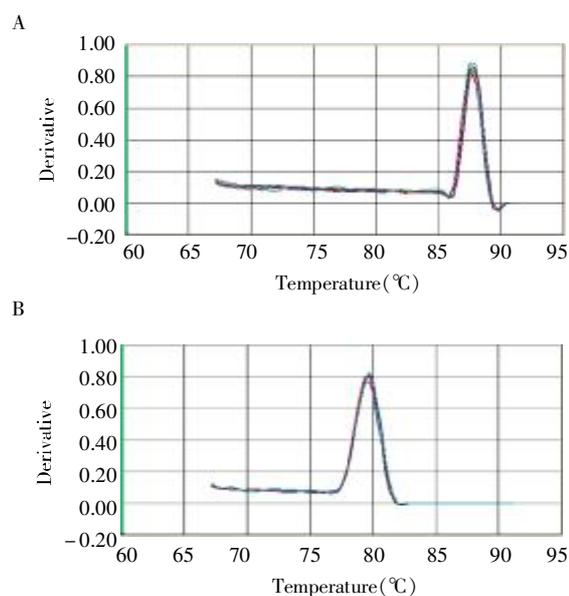
2.1 柚皮素对 TGF- β 1 诱导 HBE 细胞 PAI-1 表达的影响

2.1.1 PAI-1 及 β -肌动蛋白产物的溶解曲线

各溶解曲线溶解温度均一, 各峰的形状比较锐利, 具有一定的特异性。经 2% 琼脂糖凝胶电泳所得的产物均一(图 1)。

2.1.2 柚皮素干预对 TGF- β 1 诱导 HBE 细胞 PAI-1 表达的影响

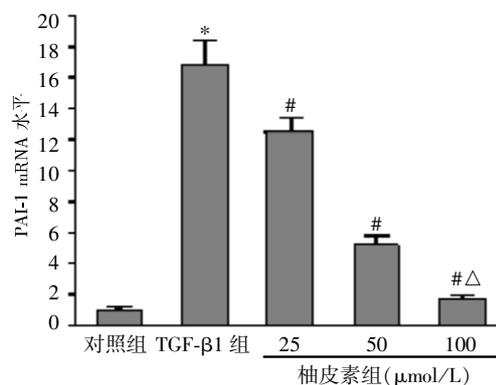
用 TGF- β 1 刺激 HBE 细胞, 2 h 后 PAI-1 的 mRNA 表达较对照组明显升高 ($P < 0.05$), 若 HBE 细胞先与柚皮素共孵育, 则发现经 TGF- β 1 刺激后, 柚皮素干预组 PAI-1 的 mRNA 表达较 TGF- β 1 组(仅 TGF- β 1 刺激组)有明显降低 ($P < 0.05$), 柚皮素剂量越大, 降低越明显。100 μ mol/L 柚皮素干预后基本下降至正常水平(图 2)。



A: PAI-1; B: β -肌动蛋白。

图 1 PAI-1 及 β -肌动蛋白产物的溶解曲线

Figure 1 Dissociation curves of the production of PAI-1 and β -actin



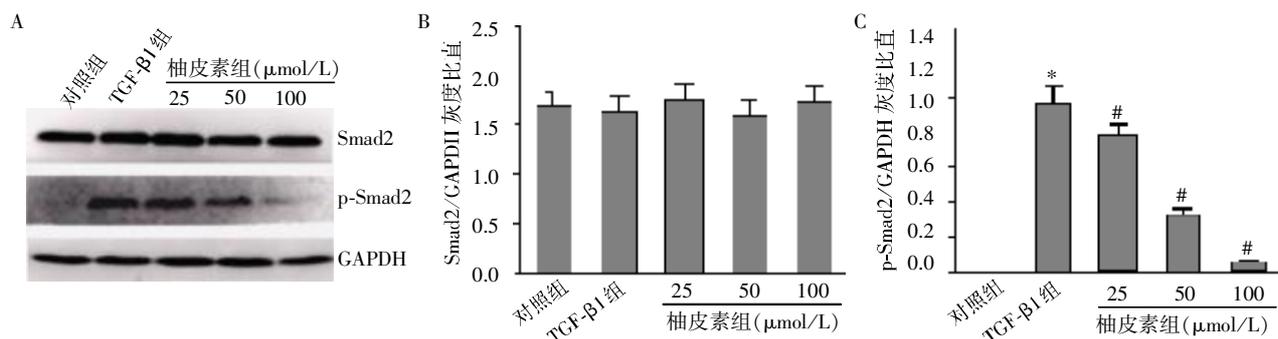
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 组比较, # $P < 0.05$, 与柚皮素 50 μ mol/L 组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

图 2 柚皮素干预对 TGF- β 1 诱导 HBE 细胞 PAI-1 表达的影响

Figure 2 The effect of naringenin on PAI-1 induced by TGF- β 1

2.2 柚皮素干预对 TGF- β 1 诱导的 Smad2 磷酸化的影响

用 TGF- β 1 刺激 HBE 细胞, 30 min 后提取蛋白质检测细胞 Smad2 磷酸化情况。对照组和 TGF- β 1 组 Smad2 的表达总量无明显差异 ($P > 0.05$), 对照组细胞内检测不出 p-Smad2, 而 TGF- β 1 组 p-Smad2 明显增加 ($P < 0.05$), 然而, 若 HBE 细胞先与柚皮素共孵育, 再经 TGF- β 1 刺激 30 min 后, 柚皮素干预组 Smad2 的表达总量较 TGF- β 1 组相比无明显差异, 而 p-Smad2 含量较 TGF- β 1 组逐渐降低 ($P < 0.05$), 柚皮素剂量越大, 降低越明显(图 3)。



A: Smad2 和 p-Smad2 电泳图; B: Smad2 与 GAPDH 灰度比值, 各组无明显差异; C: p-Smad2 与 GAPDH 灰度比值, 与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 TGF- β 1 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 柚皮素对 TGF- β 1 引起的 HBE 细胞中 Smad2 含量及其磷酸化的影响

Figure 3 The effect of naringenin on the content of Smad2 and p-Smad induced by TGF- β 1

2.3 柚皮素干预后对 TGF- β 1 引起的细胞核内 p-Smad2 含量变化的影响

柚皮素干预后, 用 TGF- β 1 刺激 HBE 细胞, 30 min 后用免疫荧光法检测细胞中的 Smad2 磷酸化后核转位情况 (图 4), TGF- β 1 组相对于对照组有明显的核内 p-Smad2 增多现象, 若 HBE 细胞预先与

100 μ mol/L 柚皮素孵育, 则发现核内的 p-Smad2 明显减少 (表 1)。

3 讨论

TGF- β 1/Smad 通路在哮喘病程中起重要的生物调节作用, 包括刺激气道和血管的平滑肌细胞增

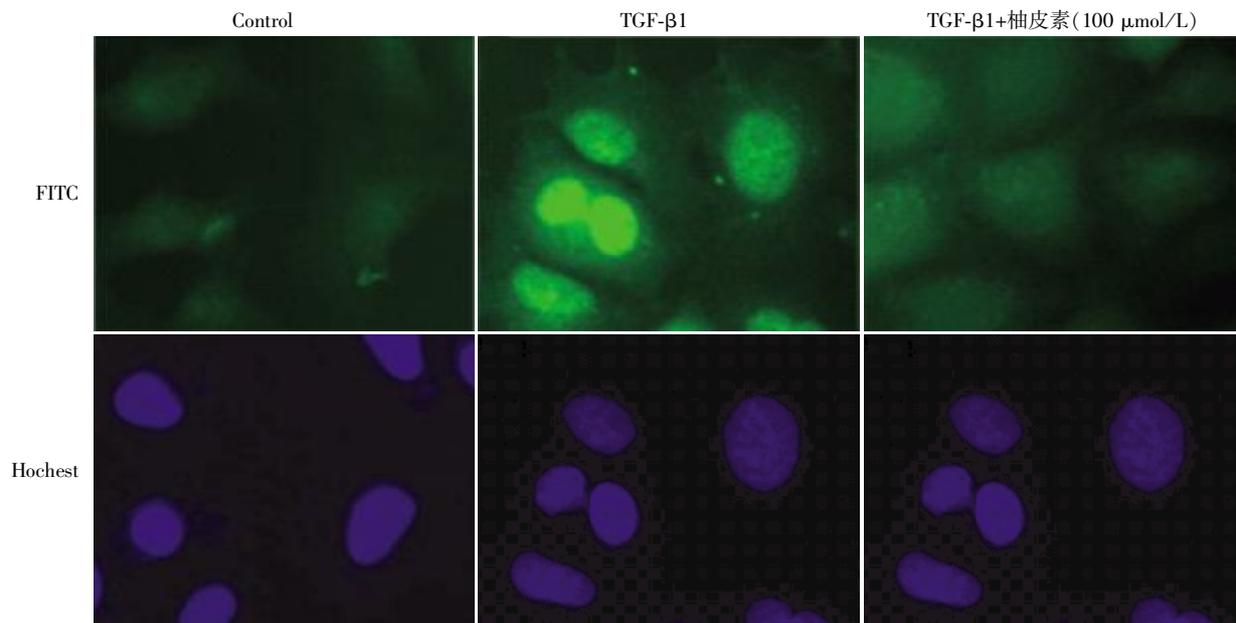


图 4 柚皮素干预后对细胞核内 p-Smad2 含量变化的影响

Figure 4 The effect of naringenin on the content of p-Smad2 in nuclei

表 1 柚皮素对 HBE 细胞核内 p-Smad2 的影响

Table 1 The effect of naringenin on p-Smad2 in nuclei
($n=3$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	核内 p-Smad2 阳性细胞百分比
Control 组	1.25 \pm 0.47
TGF- β 1 组	97.86 \pm 1.25*
TGF- β 1+柚皮素(100 μ mol/L)组	1.30 \pm 0.37#

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 组比较, # $P < 0.05$ 。

生和肥大, 诱导气道成纤维细胞的分裂增殖, 促进肌成纤维细胞向成肌纤维细胞转化, 增加胶原的合成以及减少胶原的降解, 从而在参与组织修复的同时也诱发了气道重塑^[11]。

TGF- β 1 可转录激活 PAI-1, 因此我们选择检测 PAI-1 以研究 TGF- β 1 的生物功能。本实验显示, 用 TGF- β 1 刺激 HBE 细胞 2 h 后, PAI-1 的 mRNA 水平较对照组增高明显, 柚皮素可抑制此过程中 PAI1

mRNA 表达,因此我们推测柚皮素可抑制 TGF- β 1 的生物活性。已有证据显示 TGF- β 1 引起的 PAI-1 转录是 Smad2/3 介导的,假设柚皮素能影响 TGF- β 1 的胞内效应蛋白 Smads,并以 Smad2 蛋白为代表,根据目前已知的 Smad2 的生物功能进行设计和研究。Smads 蛋白若要行使生物学功能,需先磷酸化,于是我们检测了 TGF- β 1 刺激后 p-Smad2 的表达情况,HBE 细胞在 TGF- β 1 刺激 30 min 后,总的 Smad2 量不变,p-Smad2 明显增加。但若细胞事先与柚皮素孵育再与 TGF- β 1 反应,随柚皮素剂量增大,p-Smad2 水平明显减弱,总的 Smad2 量不受影响。因此推测柚皮素可能是通过抑制 Smad2 磷酸化而使 TGF- β 1 的信号无法正常转导,从而影响了 TGF- β 1 的生物功能。

由于 p-Smad2 需与 Smad3 及 Smad4 结合进入细胞核方可激活靶基因转录,我们用免疫荧光法观察了 p-Smad2 在 HBE 细胞内的定位情况。有趣的是,TGF- β 1 组的 p-Smad2 主要集中在细胞核内,而经柚皮素干预组细胞核内的 p-Smad2 明显减少,推测可能与柚皮素抑制 Smad2 磷酸化导致入核的 p-Smad2 相应减少有关,从而进一步证实了柚皮素可通过抑制 Smad2 影响 TGF- β 1 的生物功能。

TGF- β 的信号转导绝大部分是通过 Smad 蛋白实现的,但是,TGF- β 已被证实可激活信号调节激酶 ERK-1、ERK-2、p38 或 MAPK 而完成信号转导,此过程可不依靠 Smad 蛋白的参与^[12]。目前,TGF- β 激活这些激酶的确切方式尚不完全清楚,因此柚皮素是否可以抑制这些通路的转导尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Adcock IM, Ford PA, Bhavsar P, et al. Steroid resistance in asthma; mechanisms and treatment options [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2008, 8(2): 171-178
- [2] Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, et al. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages [J]. *Mediators Inflamm*, 2007, 2007: 45673
- [3] Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, et al. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(3): 527-530
- [4] Zielińska-Przyjemska M, Ignatowicz E. Citrus fruit flavonoids influence on neutrophil apoptosis and oxidative metabolism [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(12): 1557-1562
- [5] Hsiao YC, Kuo WH, Chen PN, et al. Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 167(3): 193-206
- [6] Shi Y, Dai J, Liu H, et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF- κ B activity in a murine model of asthma [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87(9): 729-735
- [7] Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(5): 348-356
- [8] Black PN, Young PG, Skinner SJ. Response of airway smooth muscle cells to TGF-beta 1; effects on growth and synthesis of glycosaminoglycans [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(6 Pt 1): L910-917
- [9] Samarakoon R, Higgins PJ. Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(6): 976-983
- [10] Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- β receptor activity [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2): 283-294
- [11] Shi Y, Dai J, Liu H, et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF- κ B activity in a murine model of asthma [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87(9): 729-735
- [12] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584

[收稿日期] 2012-06-07