

# TGF- $\beta$ 1对大鼠肝细胞系BRL-3A凋亡和细胞周期的影响

王世美, 郑素军, 邢欣悦, 邓志华, 刘梅, 俞豪, 李长勇, 段钟平

王世美, 郑素军, 邢欣悦, 刘梅, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069

王世美, 邓志华, 山西医科大学第二医院消化内科 山西省太原市 030001

俞豪, 李长勇, 首都医科大学细胞生物教研室 北京市 100069  
王世美, 医师, 主要从事肝病基础与临床研究.

“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项课题基金资助项目, No. 2008ZX10002-005-3

国家自然科学基金资助项目, No. 30800979

北京自然科学基金资助项目, No. 7102085

北京市科技新星基金资助项目, No. 2007B055

首都医科大学基础-临床科研合作基金资助项目, No. 2007JL02; 2010JL02

北京市教育委员会科技发展计划项目基金资助项目, No. KM201010025024

作者贡献分布: 此课题由王世美与郑素军设计; 研究过程由王世美与邢欣悦操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑素军、邓志华、刘梅、俞豪、李长勇及段钟平提供; 数据分析由王世美与郑素军完成; 本文写作由王世美与郑素军完成.

通讯作者: 郑素军, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心. zhengsujun003@126.com

电话: 010-63291007

收稿日期: 2011-01-20 修回日期: 2011-03-16

接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-06-08

## Impact of exogenous TGF- $\beta$ 1 on cell cycle progression and apoptosis in rat liver cell line BRL-3A

Shi-Mei Wang, Su-Jun Zheng, Xin-Yue Xing, Zhi-Hua Deng, Mei Liu, Hao Yu, Chang-Yong Li, Zhong-Ping Duan

Shi-Mei Wang, Su-Jun Zheng, Xin-Yue Xing, Mei Liu, Zhong-Ping Duan, Artificial Liver Center, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Shi-Mei Wang, Zhi-Hua Deng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Hao Yu, Chang-Yong Li, Department of Cell Biology, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by: the National Science and Technology Key Project on “Major Infectious Diseases such as HIV/AIDS, Viral Hepatitis Prevention and Treatment”, No. 2008ZX10002-005-3; the National Natural Science Foundation of China, No. 30800979; the Beijing Municipal Natural Science Foundation, No. 7102085; the Beijing New Star Project of Science & Technology, No. 2007B055; the Basic-Clinic Scientific Research Cooperation Foundation of Capital Medical University, Nos. 2007JL02, 2010JL02; and the Science and Technology Development Project of the Beijing Municipal Education Commission, No. KM201010025024

Correspondence to: Su-Jun Zheng, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China. zhengsujun003@126.com

Received: 2011-01-20 Revised: 2011-03-16

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-06-08

## Abstract

**AIM:** To explore whether exogenous transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) affects rat liver cell line BRL-3A in terms of cell cycle progression and apoptosis.

**METHODS:** (1) BRL-3A cells were divided into six groups and exposed to different concentrations of TGF- $\beta$ 1 (0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ g/L), and cell proliferation was detected by MTT assay at 24, 36 and 48 h after treatment. (2) After BRL-3A cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (8  $\mu$ g/L) for 24, 36 or 48 h, flow cytometry was performed to measure cell cycle progression and apoptosis and real-time quantitative RT-PCR was used to quantify the mRNA expression of Cyclin E, Cdk-2, EGF, HGF, Bcl-2, c-Myc, MMP9, and NF- $\kappa$ B genes.

**RESULTS:** (1) There was no statistical difference in cell proliferation among cells treated with six different concentrations of TGF- $\beta$ 1 for 24, 36 or 48 h (all  $P > 0.05$ ). (2) Cell cycle progression and apoptosis rate also showed no statistical difference between cells treated with 8  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 1 and control cells at 24, 36 and 48 h (all  $P > 0.05$ ). Compared to control cells, the mRNA expression of Cyclin E, Cdk-2, and EGF in cells treated with 8  $\mu$ g/L TGF- $\beta$ 1 significantly decreased at 24 and 36 h but significantly increased at 48 h (all  $P < 0.05$ ); that of HGF significantly declined at all three time points (all  $P < 0.05$ ); that of Bcl-2 showed no significant changes at 24 and 36 h but increased at 48 h; and that of c-Myc, MMP9 and NF- $\kappa$ B was up-regulated at all three time points (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The insensitivity of BRL-3A cells to TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis and cell cycle arrest may be related to activation of non-SMAD pathway and up-regulation of NF- $\kappa$ B, Bcl-2, c-Myc, and MMP9 expression.

**Key Words:** Transforming growth factor-beta 1; BRL-3A cells; Apoptosis; Cell cycle; Liver regeneration

Wang SM, Zheng SJ, Xing XY, Deng ZH, Liu M, Yu H, Li

## ■背景资料

如何促进肝再生是现今研究的一大热点和难题. TGF- $\beta$ 1在体内、外都能高效抑制肝细胞增殖, 可将细胞阻滞在G1期或诱导细胞凋亡, 众多研究表明阻断TGF- $\beta$ 1通路可有力地促进肝再生, 探索TGF- $\beta$ 1的具体作用机制可为以后设计基于TGF- $\beta$ 1通路、以促进肝再生为治疗目的的研究奠定基础.

## ■同行评议者

徐可树, 教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科

## ■ 研发前沿

TGF- $\beta$ 1具有多种生物学功能,可调控细胞增殖、分化和细胞外基质形成,参与血管形成、免疫调节、组织修复、胚胎发育、肿瘤发生等。但由于TGF- $\beta$ 1作用的复杂性和多样性,非选择性阻断TGF- $\beta$ 1通路可能带来严重的不良反应。用不同的方法阻断该通路中的不同分子以观察其对各种功能的影响是近年的研究热点,TGF- $\beta$ 1的具体作用机制尚未完全明确,他成为研究中的重点和难点。

CY, Duan ZP. Impact of exogenous TGF- $\beta$ 1 on cell cycle progression and apoptosis in rat liver cell line BRL-3A. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(16): 1659-1665

## 摘要

**目的:** 研究转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)对大鼠肝细胞系BRL-3A凋亡和细胞周期的影响。

**方法:** MTT法检测TGF- $\beta$ 1对细胞增殖的影响:将BRL-3A细胞分为6组,分别给予不同浓度的TGF- $\beta$ 1(0、2、4、6、8、10  $\mu$ g/L),检测各组细胞24、36、48 h时的增殖活性;进一步将BRL-3A细胞分为TGF- $\beta$ 1处理组和对照组,分别给予和不予TGF- $\beta$ 1(8  $\mu$ g/L),进行如下检测:流式细胞仪检测两组细胞24、36、48 h时的凋亡情况和细胞周期分布;实时定量RT-PCR检测两组细胞24、36、48 h时Cyclin E、Cdk-2、EGF、HGF、Bcl-2、c-Myc、MMP9、NF- $\kappa$ B基因的表达变化。

**结果:** MTT结果显示,各浓度TGF- $\beta$ 1组在24、36、48 h时的细胞增殖活性差异无统计学意义;流式细胞仪分析结果显示,TGF- $\beta$ 1处理组24、36、48 h时的细胞凋亡率和细胞周期分布与对照组间的差异均无统计学意义;实时定量RT-PCR发现,TGF- $\beta$ 1处理组相对于对照组,Cyclin E mRNA、Cdk2 mRNA、EGF mRNA在24 h时分别下调至 $0.194 \pm 0.103$ 、 $0.181 \pm 0.064$ 、 $0.634 \pm 0.116$ 倍,36 h时分别下调至 $0.379 \pm 0.173$ 、 $0.457 \pm 0.123$ 、 $0.619 \pm 0.112$ 倍,48 h时分别上调至 $1.956 \pm 0.215$ 、 $2.17 \pm 0.471$ 、 $7.66 \pm 0.437$ 倍;HGF mRNA在24、36、48 h时均明显下调,分别至 $0.152 \pm 0.068$ 、 $0.146 \pm 0.053$ 、 $0.158 \pm 0.061$ 倍;Bcl-2 mRNA在24、36 h时无统计学差异,48 h时上调至 $1.567 \pm 0.115$ 倍;c-Myc mRNA、MMP9 mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA在3个时刻均上调,24 h时分别至 $1.742 \pm 0.389$ 、 $3.484 \pm 0.411$ 、 $1.625 \pm 0.369$ 倍,36 h时分别至 $2.292 \pm 0.361$ 、 $1.563 \pm 0.323$ 、 $1.486 \pm 0.494$ 倍,48 h时分别至 $2.499 \pm 0.475$ 、 $2.233 \pm 0.493$ 、 $3.612 \pm 0.364$ 倍。以上基因表达差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:** 大鼠肝细胞系BRL-3A对TGF- $\beta$ 1促凋亡和细胞周期阻滞作用的敏感性低下,可能与非Smads途径的激活,NF- $\kappa$ B、Bcl-2、c-Myc、MMP9表达的上调有关。

**关键词:** 转化生长因子 $\beta$ 1; BRL-3A细胞; 细胞凋亡; 细胞周期; 肝再生

王世美, 郑素军, 邢欣悦, 邓志华, 刘梅, 俞豪, 李长勇, 段钟平。

TGF- $\beta$ 1对大鼠肝细胞系BRL-3A凋亡和细胞周期的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(16): 1659-1665

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1659.asp>

## 0 引言

转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta$ 1)具有多种生物学功能,可调控细胞增殖、分化和细胞外基质形成,参与血管形成、免疫调节、组织修复、胚胎发育、肿瘤发生等生理病理过程<sup>[1,2]</sup>。TGF- $\beta$ 1是肝细胞增殖的强抑制剂<sup>[3]</sup>,但其具体作用机制目前尚未完全阐明<sup>[4]</sup>。有研究显示,抑制TGF- $\beta$ 1的作用可促进肝细胞再生<sup>[5,6]</sup>,这为肝切除术后、重型肝炎肝衰竭等疾病的治疗提供了新的思路。本实验选择大鼠肝细胞系BRL-3A为研究对象,探讨TGF- $\beta$ 1对BRL-3A细胞凋亡和细胞周期的影响,并初步研究其可能的作用机制,为以后设计基于TGF- $\beta$ 1通路、以促进肝再生为治疗目的的相应研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM培养基,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Hyclone公司;大鼠肝细胞系BRL-3A购自中国科学院;TGF- $\beta$ 1购自美国Peprotech INC公司;MTT购自美国Sigma公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司;实时定量RT-PCR所需的TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0和SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup>(Perfect Real Time)购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 MTT法测定TGF- $\beta$ 1不同作用时间、不同作用浓度下对BRL-3A增殖的影响:** 接种BRL-3A入96孔板,  $4 \times 10^3$ /孔。24 h后,更换1% FBS/DMEM培养,并予TGF- $\beta$ 1梯度处理,终浓度依次为0、2、4、6、8、10  $\mu$ g/L,每个浓度设立10个复孔。孵育24 h后,换含10% MTT溶液(5 g/L)的培养基,继续培养4 h,小心弃上清,每孔加入150  $\mu$ L二甲基亚砷(DMSO)溶解结晶,测量吸光值 $A_{490}$ 。按上述操作检测予TGF- $\beta$ 1后36、48 h的细胞增殖情况。计算细胞生长抑制率(生长抑制率 =  $1 - \text{TGF-}\beta 1 \text{组} A \text{值} / \text{对照组} A \text{值}$ ),由抑制率确定后续实验适宜的TGF- $\beta$ 1作用浓度。

**1.2.2 Annexin V-FITC双染法流式细胞仪分析细胞凋亡:** 接种BRL-3A入6孔板,  $1.5 \times 10^5$ /孔,分2组,3孔/组,24 h后分别更换含或不含TGF- $\beta$ 1(8

表 1 荧光定量PCR检测的基因和所使用的引物

基因名称	扩增位置	上游引物	下游引物
c-Myc	1201-1417	5'-TGATGTGGTGTCTGTGGA-3'	5'-TGCTGATCTGTTTCAGGACC-3'
Bcl-2	171-372	5'-TGAATGAGTCTGGGCTTTGA-3'	5'-TTGCTCTCTCACAGCCAGTG-3'
Cyclin E	201-431	5'-CAAGGGAGAGGAAGGAGAGA-3'	5'-TAGGGGTGGGGATGAAAGAG-3'
Cdk-2	401-627	5'-ACCAGGACCTCAAGAGTTT-3'	5'-GTAAGTACGGACAGGGACTC-3'
EGF	1802-2047	5'-TGTGCAGCTTCAGGACCGCA-3'	5'-TGGCGTGTCTACTCCTCCG-3'
HGF	1401-1625	5'-TGGAGGATTTACACCGTCAT-3'	5'-GCAGTTGTTTTGTTTGGCA-3'
NF- $\kappa$ B	601-825	5'-GCCATTACATAGCTGTGAT-3'	5'-TCCAGCCGCTATGTGTAGAG-3'
MMP9	1001-1234	5'-CCGACGTCACTGTAAGTGGG-3'	5'-GATCTAAGCCAGCGCATGG3'
GAPDH	411-650	5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-TCCACGATGCCAAAGTTGTCAT-3'

## ■ 相关报道

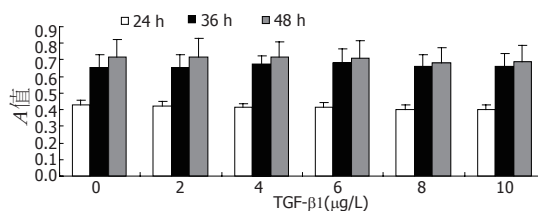
Ollie等研究报道, 敲除MMP9的小鼠与野生小鼠相比, 肝大部切除术(PH)后肝再生延迟, 并且术后2-3 d VEGF、HGF、TNF- $\alpha$ 表达明显少于野生小鼠。

$\mu$ g/L)的1% FBS/DMEM. 每隔12 h倒置显微镜下对比观察两组细胞生长状况. 于24 h时收集细胞, 按Annexin V-FITC试剂盒说明书操作, 上流式细胞仪分析细胞凋亡率. 同样, 按上述操作检测予TGF- $\beta$ 1后36、48 h的细胞凋亡率.

**1.2.3 PI法流式细胞仪检测细胞周期:** 细胞铺板及收集同1.2.2, 用1 mL PBS重悬细胞, 逐滴加入3 mL冷无水乙醇中, 边加边震荡, -20  $^{\circ}$ C冰箱固定过夜待检. 上机前取出离心, 1 500 r/min $\times$ 5 min, 弃上清, 用5 mL PBS重悬后室温放置15 min, 然后再次离心, 1 500 r/min $\times$ 5 min, 弃上清, 依次加入100  $\mu$ L PBS, 10  $\mu$ L RNaseI(终浓度为100 mg/L), 400  $\mu$ L PI, 混匀后避光反应30 min, 上机检测.

**1.2.4 实时定量RT-PCR检测凋亡和细胞周期相关基因的表达变化:** 细胞分组及处理方法同1.2.2, 用TRIzol法提取两组细胞总RNA. 用琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检测RNA的纯度及浓度后按RT-PCR试剂盒说明书进行反转录. 将所得的cDNA进行实时定量PCR, 每组设立3个复孔, 反应体系为20  $\mu$ L, 各组分为: SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu$ L, 上下游引物(序列见表1)各0.4  $\mu$ L, ROX Reverse Dye II 0.4  $\mu$ L, cDNA 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L. 按两步法扩增: 预变性: 95  $^{\circ}$ C 30 s; PCR反应: 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 循环40次, 反应结束后确认扩增曲线和溶解曲线, 以GAPDH为内参, 相对于对照组, TGF- $\beta$ 1处理组中靶基因的表达相对于内参的改变倍数(RQ)为分析值.

**统计学处理** 以上所有实验均重复3次, 结果取平均值. 计量数据以mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS16.0统计软件进行统计处理, 统计方法同一时刻多组间的比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 $t$ 检验. 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义.

图 1 不同浓度TGF- $\beta$ 1在不同作用时间对BRL-3A增殖的影响.

## 2 结果

**2.1 TGF- $\beta$ 1对BRL-3A细胞增殖活性影响** MTT结果表明24、36、48 h时TGF- $\beta$ 1各浓度组之间无明显差异( $F = 1.399$ 、 $2.111$ 、 $0.240$ ,  $P = 0.262$ 、 $0.078$ 、 $0.943$ , 图1). 虽然从MTT结果尚不能认为TGF- $\beta$ 1对BRL-3A增殖有抑制作用, 但8  $\mu$ g/L组在3个时刻与其他浓度组相比细胞活性略低, 故选择该浓度进行后续实验.

## 2.2 流式细胞仪检测结果

**2.2.1 Annexin V-FITC双染法检测细胞凋亡结果:** TGF- $\beta$ 1处理组与对照组细胞在24、36、48 h时均有部分细胞发生了凋亡(图2), 24 h时的凋亡率分别为 $9.00\% \pm 1.03\%$ 和 $7.18\% \pm 0.85\%$ ( $t = -2.357$ ,  $P = 0.08$ ), 36 h时为 $11.43\% \pm 1.29\%$ 和 $8.94\% \pm 1.12\%$ ( $t = -2.529$ ,  $P = 0.066$ ), 48 h时为 $13.8\% \pm 1.25\%$ 和 $10.55\% \pm 1.81\%$ ( $t = -2.555$ ,  $P = 0.063$ ).

**2.2.2 PI法检测细胞周期结果:** 两组细胞在3个时刻各期细胞所占比例差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图3, 表2).

**2.3 实时定量RT-PCR检测结果** TGF- $\beta$ 1处理组较对照组相比, Cyclin E mRNA、Cdk-2 mRNA、EGF mRNA在24、36 h均下调, 48 h上调; HGF mRNA在3个时刻均明显下调; Bcl-2 mRNA在24、36 h时无明显变化, 48 h上调; c-Myc mRNA、MMP9 mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA在3个时

### ■创新盘点

本文首次以大鼠正常肝细胞系BRL-3A作为TGF- $\beta$ 1体外作用的研究对象,用MTT、流式细胞仪测凋亡和细胞周期的方法,充分证明了BRL-3A对TGF- $\beta$ 1的不敏感性,初步研究该特性的机制发现非Smads途径的激活, NF- $\kappa$ B、Bcl-2、c-Myc、MMP9表达的上调是其可能的原因.用正常的肝细胞系和从不敏感机制的角度进行研究是创新点.

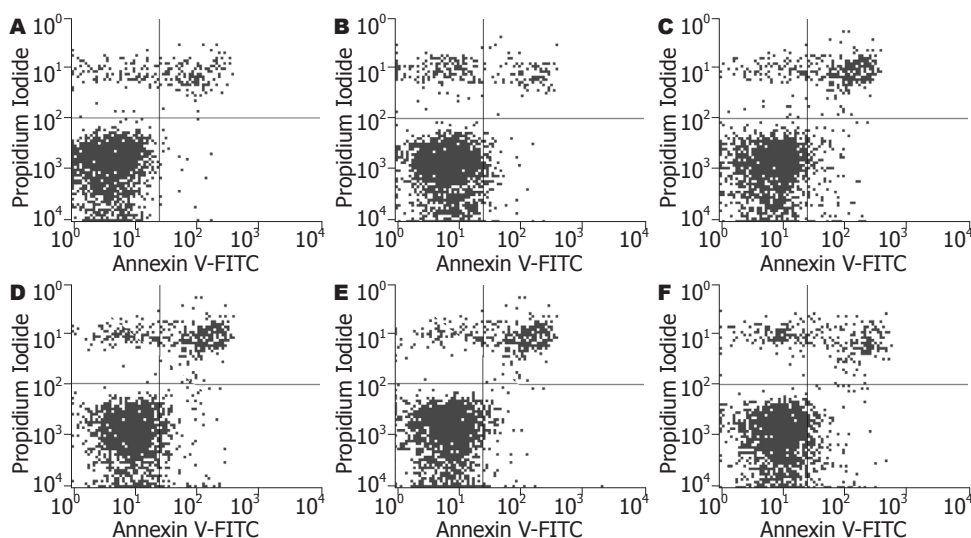


图2 24、36、48 h对照组和TGF- $\beta$ 1处理组的细胞凋亡率. A: 24 h对照组; B: 24 h TGF- $\beta$ 1组; C: 36 h对照组; D: 36 h TGF- $\beta$ 1组; E: 48 h对照组; F: 48 h TGF- $\beta$ 1组.

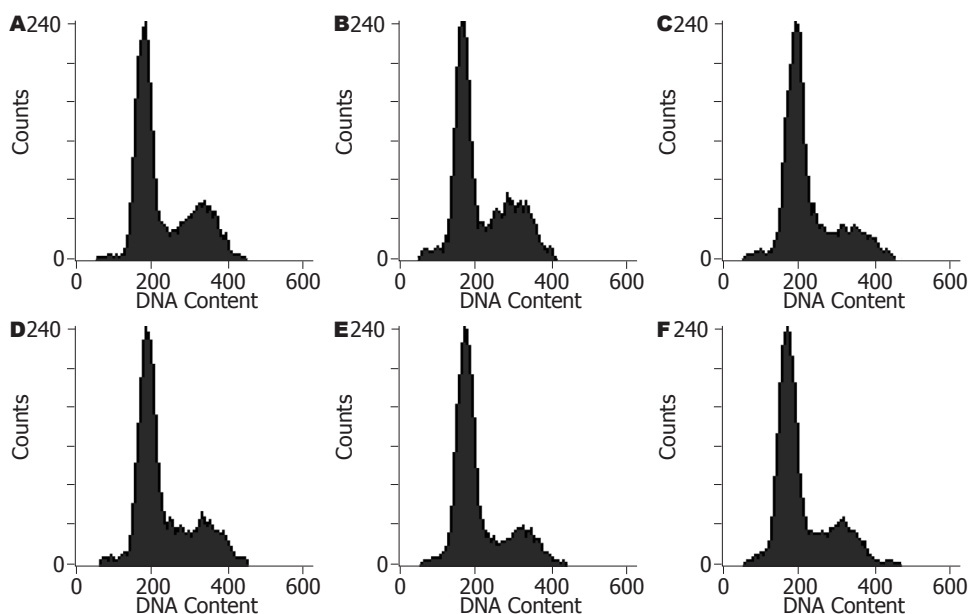


图3 24、36、48 h对照组和TGF- $\beta$ 1处理组的细胞周期分布. A: 24 h对照组; B: 24 h TGF- $\beta$ 1组; C: 36 h对照组; D: 36 h TGF- $\beta$ 1组; E: 48 h对照组; F: 48 h TGF- $\beta$ 1组.

刻均上调,以上基因表达改变均有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图4).

### 3 讨论

如何促进肝再生是现今研究的一大热点和难题.众多研究表明阻断TGF- $\beta$ 1通路可有力地促进肝再生<sup>[5,7,8]</sup>,但由于TGF- $\beta$ 1的多功能性,完全阻断则可能造成严重的不良反应<sup>[9]</sup>.要实现有效阻断TGF- $\beta$ 1以促进肝再生,并减小其可能附带的不良反应这一目标,明确TGF- $\beta$ 1抑制肝再生的具体机制成为必要解决的问题.

TGF- $\beta$ 1在体内、外都能高效抑制肝细胞增

殖<sup>[3]</sup>,可将细胞阻滞在G1期或诱导细胞凋亡<sup>[10-13]</sup>. Smads通路是TGF- $\beta$ 1发挥抗增殖和促凋亡作用的主要途径<sup>[12,14]</sup>.除此之外,TGF- $\beta$ 1还存在非Smads途径,包括MAPK通路的分支如Erk、TRAF6-TAK1-JNK/p38,以及Rho-like GTPase, PI3K/Akt通路等. TGF- $\beta$ 受体可通过磷酸化或直接作用激活非Smads途径,发挥增强或减弱Smads途径以及其他的调节作用<sup>[2]</sup>.细胞对TGF- $\beta$ 的应答效应是Smads和非Smads途径共同作用的结果<sup>[2]</sup>.目前大多数该方面的体外研究都是以原代培养的肝细胞为主,由于细胞分离培养工作的繁琐和细胞生长时限的制约,进行长

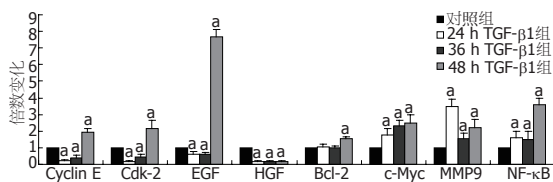


图4 实时定量RT-PCR检测凋亡和细胞周期相关基因mRNA变化。\* $P < 0.05$  vs 对照组。

表2 TGF- $\beta$ 1给药不同时间后的细胞周期分布(%)

分组	G0-G1期	S期	G2-M期
24 h			
对照组	53.30 $\pm$ 7.02	26.53 $\pm$ 6.21	20.17 $\pm$ 1.19
TGF- $\beta$ 1组	51.27 $\pm$ 5.37	26.90 $\pm$ 5.05	21.83 $\pm$ 1.89
36 h			
对照组	65.53 $\pm$ 1.17	20.60 $\pm$ 2.36	13.87 $\pm$ 3.40
TGF- $\beta$ 1组	64.67 $\pm$ 2.99	23.80 $\pm$ 4.16	11.53 $\pm$ 1.27
48 h			
对照组	66.80 $\pm$ 3.82	21.47 $\pm$ 2.49	11.73 $\pm$ 1.50
TGF- $\beta$ 1组	66.20 $\pm$ 4.10	21.40 $\pm$ 2.04	12.40 $\pm$ 2.23

久而深入地研究有很大的困难,寻找对TGF- $\beta$ 1敏感或耐受的细胞株并将其作为深入研究的对象有重要意义。本实验选择大鼠正常肝细胞系BRL-3A为研究对象,从细胞凋亡和细胞周期两方面来探索其对TGF- $\beta$ 1的敏感性,并初步探索其作用机制,为以后深入的体外实验研究奠定基础。

该实验中发现BRL-3A不能耐受无血清培养,根据研究TGF- $\beta$ 1体外作用文献提示的低血清含量范围(0.3%-2%)<sup>[15-17]</sup>,我们用0.2%、0.4%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0% FBS/DMEM进行了探索,通过Annexin V-FITC双染法流式细胞仪分析发现1.0% FBS/DMEM培养BRL-3A 48 h细胞没有明显死亡,故选择该血清含量进行后续实验。本实验通过MTT法检测细胞增殖活性、流式细胞仪检测细胞凋亡和周期分布,所得结果从统计学来说尚不能认为存在差异,证明BRL-3A对TGF- $\beta$ 1敏感性低下。为初步探索BRL-3A对TGF- $\beta$ 1敏感性低下的机制,我们检测了一些与细胞增殖或凋亡相关的基因表达变化。

本研究发现TGF- $\beta$ 1处理组在没有表现出明显的增殖受抑或凋亡现象的同时,伴随着NF- $\kappa$ B mRNA表达的上调。转录因子NF- $\kappa$ B是肝再生中的一个抗凋亡剂<sup>[18-21]</sup>,可诱导IAPs、Caspase 8-FLICE等大量抗凋亡分子的基因表达<sup>[22]</sup>;同时,

NF- $\kappa$ B激活后还可诱导Smad7的表达<sup>[23]</sup>,后者可通过抑制R-Smads磷酸化而抑制其发挥作用。一些研究显示,TGF- $\beta$ 1可通过非Smads途径,例如通过ROS依赖方式激活ERK1/2-NF- $\kappa$ B和JNK-NF- $\kappa$ B通路<sup>[24]</sup>,或通过TAK1/IKK激酶途径短暂激活NF- $\kappa$ B<sup>[25]</sup>,使细胞逃逸TGF- $\beta$ 1诱导的凋亡。由上可见,BRL-3A对TGF- $\beta$ 1作用敏感性低下考虑与TGF- $\beta$ 1可能通过非Smads途径,导致NF- $\kappa$ B表达上调有关。由于NF- $\kappa$ B可上调Bcl-2表达<sup>[26,27]</sup>,并参与c-Myc转录的调控<sup>[28]</sup>,本实验中Bcl-2 mRNA在48 h的上调和c-Myc mRNA在3个时刻的上调可能是NF- $\kappa$ B表达上调后的直接后果;而Bcl-2、c-Myc表达上调,进一步发挥了抗细胞凋亡作用。

MMP9介导的基质重建为肝细胞再生提供了周围环境调节作用<sup>[29,30]</sup>。Olle等<sup>[30]</sup>研究报道,敲除MMP9的小鼠与野生小鼠相比,肝大部切除术后肝再生延迟,并且术后2-3 d VEGF、HGF、TNF- $\alpha$ 表达明显少于野生小鼠。本研究发现TGF- $\beta$ 1处理组MMP9 mRNA在3个时刻均上调,由于NF- $\kappa$ B可通过直接作用于MMP9启动子5'端的顺式作用元件来上调MMP9的表达<sup>[24,31,32]</sup>,考虑TGF- $\beta$ 1通过非Smads途径上调NF- $\kappa$ B,再通过NF- $\kappa$ B上调MMP9,MMP9在该实验中可能发挥了促细胞增殖、抗凋亡作用。

细胞增殖是通过细胞周期实现的,Cyclin E/Cdk-2复合体对细胞周期转录因子E2F的活化及G<sub>1</sub>期向S期的转换起着至关重要的作用,TGF- $\beta$ 1可诱导CDI如P15、P12、P27的表达<sup>[33]</sup>来降低Cyclin E/Cdk-2复合体的活性,在一些细胞中也可直接下调Cyclin E、Cdk2的表达<sup>[34]</sup>,发挥周期阻滞作用。与此理论相应,本实验发现,TGF- $\beta$ 1给药24、36 h后,诱导了Cyclin E、Cdk-2 mRNA表达下调。但由于c-Myc可上调Cyclin E/Cdk-2,c-Myc过表达可克服TGF- $\beta$ 1诱导的周期阻滞<sup>[35]</sup>,本实验中,由NF- $\kappa$ B表达增高引起的c-Myc表达上调,是Cyclin E、Cdk-2 mRNA在48 h上调的可能原因,细胞并没有发生明显的细胞周期抑制。

HGF和EGF具有促进肝细胞DNA合成的作用。给予TGF- $\beta$ 1后,HGF mRNA、EGF mRNA的表达下调并未引起BRL-3A增殖的明显改变,表明BRL-3A细胞与原代培养肝细胞不同,细胞内NF- $\kappa$ B、Bcl-2、c-Myc、MMP9等因子上调后产生的促细胞增殖作用,抵消了因HGF和EGF表达下降而产生的抗增殖作用,最终抗增殖与促增殖力量得到新的平衡。

总之,大鼠肝细胞系BRL-3A对TGF- $\beta$ 1促

#### 应用要点

BRL-3A对TGF- $\beta$ 1不敏感机制的深入研究将为促进肝再生的研究扩展更多的方向,有利于为肝大部分切除术后、重型肝炎肝衰竭等疾病寻找更为特异、有效的治疗靶点。

# 同行评价

本文内容丰富, 数据详实, 结果可信, 有一定的创新性, 研究参考价值。

凋亡和细胞周期阻滞作用的敏感性低下, 这可能与非Smads途径的激活, NF- $\kappa$ B、Bcl-2、c-Myc、MMP9表达的上调有关; 而进一步深入研究该机制将为促进肝再生的研究扩展更多的方向, 有利于为肝大部分切除术后、重型肝炎肝衰竭等疾病寻找到更为特异、有效的治疗靶点。

## 参考文献

- Feagins LA. Role of transforming growth factor- $\beta$  in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1963-1968
- Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res* 2009; 19: 128-139
- Turányi E, Dezso K, Bugyik E, Szurián K, Paku S, Nagy P. The primary mitogen (TCPOBOP)-induced hepatocyte proliferation is resistant to transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibition. *Liver Int* 2010; 30: 1505-1510
- 陈鹏, 郑素军, 段钟平, 张建军. TGF- $\beta$ 1在肝再生中作用的研究进展. *北京医学* 2010; 32: 469-472
- Zhong Z, Tsukada S, Rehman H, Parsons CJ, Theruvath TP, Rippe RA, Brenner DA, Lemasters JJ. Inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling improves regeneration of small-for-size rat liver grafts. *Liver Transpl* 2010; 16: 181-190
- Ohara K, Kusano M. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody improves survival rate following partial hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatol Res* 2002; 24: 174
- Mayoral R, Valverde AM, Llorente Izquierdo C, González-Rodríguez A, Boscá L, Martín-Sanz P. Impairment of transforming growth factor beta signaling in caveolin-1-deficient hepatocytes: role in liver regeneration. *J Biol Chem* 2010; 285: 3633-3642
- Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, Russell WE, Whitehead R, Parks WT, Holdren MS, Her MF, Gautam S, Magnuson M, Moses HL, Grady WM. Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* 2005; 24: 3028-3041
- Yang YA, Zhang GM, Feigenbaum L, Zhang YE. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2. *Cancer Cell* 2006; 9: 445-457
- Díez-Fernández C, Andrés D, Cascales M. Attenuating effects of heat shock against TGF-beta1-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 835-846
- Kim KS, Jung HS, Chung YJ, Jung TS, Jang HW, Lee MS, Kim KW, Chung JH. Overexpression of USF increases TGF-beta1 protein levels, but G1 phase arrest was not induced in FRTL-5 cells. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 870-876
- Lee KY, Bae SC. TGF-beta-dependent cell growth arrest and apoptosis. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 47-53
- Schuster N, Kriegstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 1-14
- Heldin CH, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 166-176
- Nam HJ, Park YY, Yoon G, Cho H, Lee JH. Co-treatment with hepatocyte growth factor and TGF-beta1 enhances migration of HaCaT cells through NADPH oxidase-dependent ROS generation. *Exp Mol Med* 2010; 42: 270-279
- Piscaglia F, Dudás J, Knittel T, Di Rocco P, Kobold D, Saile B, Zocco MA, Timpl R, Ramadori G. Expression of ECM proteins fibulin-1 and -2 in acute and chronic liver disease and in cultured rat liver cells. *Cell Tissue Res* 2009; 337: 449-462
- 陈源文, 徐雷鸣, 董国芳, 吴建新, 汪余勤, 李定国. 粉防己碱对大鼠静止期肝星状细胞细胞周期的影响. *胃肠病学和肝病杂志* 2009; 18: 800-803
- Cavin LG, Romieu-Mourez R, Panta GR, Sun J, Factor VM, Thorgeirsson SS, Sonenshein GE, Arsura M. Inhibition of CK2 activity by TGF-beta1 promotes IkappaB-alpha protein stabilization and apoptosis of immortalized hepatocytes. *Hepatology* 2003; 38: 1540-1551
- Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, Brenner DA. NF-kappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998; 101: 802-811
- Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 2002; 110: 193-202
- Iimuro Y, Fujimoto J. TLRs, NF- $\kappa$ B, JNK, and Liver Regeneration. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010: pii: 598109
- Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 22-25
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425: 577-584
- Hsieh HL, Wang HH, Wu WB, Chu PJ, Yang CM. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF- $\kappa$ B pathways. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 88
- Arsura M, Panta GR, Bilyeu JD, Cavin LG, Sovak MA, Oliver AA, Factor V, Heuchel R, Mercurio F, Thorgeirsson SS, Sonenshein GE. Transient activation of NF-kappaB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-beta1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation. *Oncogene* 2003; 22: 412-425
- Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, Yamaguchi A, Tohyama M. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *J Neurochem* 2000; 75: 683-693
- Luqman S, Pezzuto JM. NF-kappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res* 2010; 24: 949-963
- Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Luo J, Wang BC, Tian SF, Xu K. [Expression of NF-kappaB p65 and its target genes in gastric cancer and precancerous lesions]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004; 26: 551-553
- Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000; 31: 75-82
- Olle EW, Ren X, McClintock SD, Warner RL, Deogracias MP, Johnson KJ, Colletti LM. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2006; 44: 540-549

- 31 Shin M, Yan C, Boyd D. An inhibitor of c-jun aminoterminal kinase (SP600125) represses c-Jun activation, DNA-binding and PMA-inducible 92-kDa type IV collagenase expression. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1589: 311-316
- 32 Zhou L, Yan C, Gieling RG, Kida Y, Garner W, Li W, Han YP. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1. *BMC Immunol* 2009; 10: 15
- 33 Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309
- 34 Ye L, Zhang HY, Wang H, Yang GH, Bu H, Zhang L, Wang SL. Effects of transforming growth factor beta 1 on the growth of rhabdomyosarcoma cell line RD. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 678-686
- 35 Claassen GF, Hann SR. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9498-9503

编辑 李军亮 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》外文字符标准

**本刊讯** 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T<sub>1/2</sub><sup>1</sup>, V<sub>max</sub>不能V<sub>max</sub>,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\varphi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.