

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.011

文章编号: 1005-8982(2016)15-0060-05

论著

Notch1 在肌成纤维细胞转化中的作用及表达变化*

于秀文¹, 曾林祥²

(1. 浙江省杭州市萧山区第一人民医院 呼吸科, 浙江 杭州 311200;

2. 南昌大学第二附属医院 呼吸科, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 探讨在成纤维细胞转化为肌成纤维细胞过程中, Notch1 表达的变化规律, 以及 γ -分泌酶抑制剂(DAPT)抑制 Notch 信号后, 对细胞转化的影响。**方法** 取新生 2~3 d SD 大鼠的肺组织, 用胰酶消化法分离肺成纤维细胞, 再将培养至第 3 代的细胞分为 3 组: 对照组、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)组、TGF- β_1 +DAPT 组。对照组为空白对照, TGF- β_1 组加入 5 ng/ml TGF- β_1 , TGF- β_1 +DAPT 组同时加入 5 ng/ml TGF- β_1 及 5 μ mol/L DAPT。采用免疫细胞化学法对 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达变化进行检测。同时通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及 Western blot 检测 Notch1 mRNA 和蛋白的表达变化。**结果** α -SMA 免疫细胞化学结果表明, 对照组大部分细胞无染色, 而 TGF- β_1 组则可见大部分细胞内有黄色和棕黄色颗粒及条纹, DAPT 组和对照组无明显差异。对照组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +DAPT 组 Notch1 mRNA 表达量分别为(0.278 \pm 0.022)、(0.783 \pm 0.018)和(0.313 \pm 0.029), 对照组与 TGF- β_1 组、TGF- β_1 组与 TGF- β_1 +DAPT 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 对照组与 TGF- β_1 +DAPT 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +DAPT 组 Notch1 蛋白表达量分别为(0.312 \pm 0.019)、(0.701 \pm 0.026)和(0.345 \pm 0.022), 组间比较结果同 Notch1 mRNA。**结论** Notch1 可以促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化, 进而促进肺纤维化。

关键词: Notch1; α -平滑肌肌动蛋白; 肌成纤维细胞; 肺纤维化

中图分类号: R363

文献标识码: A

Function and expressive change of Notch1 during transformation of myofibroblasts*

Xiu-wen Yu¹, Lin-xiang Zeng²

(1. Department of Respiratory Diseases, the First People's Hospital of Xiaoshan, Hangzhou,

Zhejiang 311200, China; 2. Department of Respiratory Diseases, the Second Affiliated

Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To study the law of changes of Notch1 expression in the transformative procession from fibroblasts to myofibroblasts and the effect of DAPT inhibition of Notch signal on cell transformation. **Methods** The lung tissue was taken from new-born 2 or 3 day Sprague-Dawley rats. Fibroblasts were separated with pancreatin digestion method. The third-generation cultivated cells were divided into three groups: comparison group, TGF- β_1 group and TGF- β_1 +DAPT group. The comparison group was labeled as the control group, the TGF- β_1 group was added with 5 ng/ml TGF- β_1 , and the TGF- β_1 +DAPT group was added with 5 ng/ml TGF- β_1 and 5 μ mol/L DAPT. Immunocytochemistry was used to assess change of α -smooth muscle actin (α -SMA) expression. RT-PCR was used to assess change of Notch1 mRNA expression. Western blot was used to assess change of Notch1 protein expression. Statistical software SPSS 18.0 was used for the data

收稿日期: 2015-09-16

* 基金项目: 江西省自然科学基金(No: 20132BAB205014)

[通信作者] 曾林祥. E-mail: zenglinxiang@sohu.com; Tel: 13037209570

analysis with *t*-test. **Results** α -SMA immunocytochemistry demonstrated the majority of cells in the control group were not stained, the majority of cells in the TGF- β_1 group had yellow and brown-yellow granules and stripes, and there was no obvious difference between the DAPT group and the control group. The *Notch1* mRNA expressive value of the control group, the TGF- β_1 group and the TGF- β_1 +DAPT group was (0.278 ± 0.022) , (0.783 ± 0.018) and (0.313 ± 0.029) respectively; the *Notch1* protein expressive value of the control group, the TGF- β_1 group and the TGF- β_1 +DAPT group was (0.312 ± 0.019) , (0.701 ± 0.026) and (0.345 ± 0.022) respectively; there were significant differences in the mRNA and protein levels of *Notch1* between the TGF- β_1 group and both the control and the TGF- β_1 +DAPT groups ($P < 0.05$), while the control group and the TGF- β_1 +DAPT group had no statistical differences ($P > 0.05$). **Conclusions** *Notch1* can promote transformation of fibroblasts into myofibroblasts, and then promote pulmonary fibrosis.

Keywords: *Notch1*; α -smooth muscle actin; myofibroblast; lung fibrosis

Notch 信号通路是一个调节细胞分化的经典信号通路,1917 年首次在果蝇体内发现,在多种动物中都有其同源分子的存在,脊椎动物细胞主要是对于 4 种 *Notch* 受体及 5 种 *Notch* 配体有相应的表达^[1]。*Notch* 信号通路生物学作用的发挥需要经过 3 步酶切作用,以及多种信号分子的连锁反应,而 γ -分泌酶复合体的酶切作用则是其中最关键的环节,用 γ -分泌酶抑制剂{N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]- (S)-phenylglycine- butylester, DAPT} 能够对于 γ -分泌酶复合体进行抑制,也就阻断 *Notch* 信号通路。

Notch 信号通路在多种组织器官的发育和动态平衡中发挥重要作用,可以通过控制呼吸系统中多种细胞的功能和分化的方式,来调节肺的发育和维持成人体内呼吸道细胞种类的平衡^[2],同时在慢性肺部疾病,如慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化、肺动脉高压、哮喘和肺癌中发挥重要作用^[3]。近年来,有关 *Notch* 信号通路在肺损伤及肺纤维化中的作用机制亦是研究的热点,但仍然不甚明确。本研究旨在探讨成纤维细胞转化为肌成纤维细胞过程中,*Notch1* 的作用及表达变化,为临床治疗肺纤维化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

兔抗山羊 *Notch1* 多克隆二抗(美国 Santa cruz 公司),山羊抗鼠 *Notch1* 多克隆一抗(美国 Santa cruz 公司),免疫组织化学法试剂(北京中衫金桥生物技术有限公司),鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体(武汉博士德公司),鼠 β -肌动蛋白多克隆抗体、蛋白抽提试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量试

剂盒(美国 Pierce 公司),彩色预染蛋白质分子量标准(上海碧云天生物技术研究所),DNA Marker(北京天根生物科学技术有限公司),逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(大连宝生生物工程有限公司),转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)(美国 PeproTech 公司),DAPT(美国 Sigma 公司),总 RNA 提取试剂。

1.2 细胞分组

试验动物为江西中医学院动物房所提供的出生 2~3 d 的 SD 大鼠乳鼠(批号:JZDWNO;2011-0093)。取其肺组织培养为肺成纤维细胞,具体培养方法参照文献并加以改进^[4]。取第 3 代成纤维细胞,接种于 6 孔板,细胞密度达到 85%~90%时,无血清同步 24 h。把细胞分为对照组、TGF- β_1 组和 TGF- β_1 +DAPT 组。其中,对照组为空白对照,在 TGF- β_1 组中, TGF- β_1 的量为 5 ng/ml, TGF- β_1 +DAPT 组先加入终浓度为 5 μ mol/l 的 DAPT, 30 min 后再加入终浓度为 5 ng/ml 的 TGF- β_1 , 每组复孔 3 个,观察 24 h 后,分别用于提取细胞总 RNA 及总蛋白。实验重复 3 次。

1.3 α -SMA 免疫细胞化学实验

将 18 mm \times 18 mm 盖玻片置于 6 孔板内,同时在六孔板中进行第 3 代成纤维细胞的接种,其密度为每孔约 1×10^5 个细胞,按上述方法将细胞分为 3 组,每组复孔 3 个,观察 24 h 后取出盖玻片,4%多聚甲醛固定细胞,再用 3%双氧水 H_2O_2 处理细胞 10 min,封闭内源性过氧化物酶活性,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗 3 次,10%动物血清封闭 10 min,降低非特异性结合,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗 3 次,室温下孵育二抗 1 h,链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)

复合物室温下 30 min,二氨基联苯胺显色,苏木素复染,中性树胶封片后,光镜下观察各组染色变化, α -SMA 阳性标准以出现棕黄色颗粒或条纹为依据,随机观察 10 个高倍视野,计算阳性率。

1.4 RT-PCR 反应检测 Notch1 mRNA

通过胰酶消化法实现对于六孔板内细胞的提取,Trizol 法提取细胞总 RNA 并逆转录成 cDNA。Notch1 引物由美国 Invitrogen 生命技术公司设计并合成,正向引物为:5'-GAAGGAACGAGCCTGGGTGCCTGTA-3',反向引物为:5'-TGGCTGGGAGCATCTCAAGCCT-3',扩增引物 268 bp。反应条件:95℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 次循环,总时间 8 min。在进行电泳时,取 6 μ l PCR 产物进行琼脂糖电泳,对于结果通过凝胶成像分析系统的紫外分光成像进行相应分析,对于积分吸光度进行记录。

1.5 Western blot 检测 Notch1 蛋白

使用单去污细胞裂解液提取 6 孔板内细胞总蛋白,沸水煮 10 min 使蛋白变性,冷却至室温后,置入 -20℃冰箱冷冻保存备用。BCA 法进行蛋白定量,取变性后的蛋白质样品行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis,SDS-PAGE)电泳,每个泳道上样量为 30 μ g,用垂直电泳仪进行电泳后取下凝胶,将蛋白转移至 0.45 mm 醋酸纤维膜上,依次进行封闭、洗膜,加一抗在 4℃孵育过夜(稀释至 1:200),二抗室

温孵育 2 h(稀释至 1:5 000)。通过化学发光法进行显影,将 Notch1 和 β -肌动蛋白的灰度值进行相应的标准化后,计算 Notch1 蛋白表达的相对半定量比值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量分析用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较用单因素方差分析,组间比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -SMA 免疫细胞化学

在对照组中,染色的细胞只占一小部分,能够看到少部分细胞中有淡黄色的颗粒或者是条纹,但是黄色以及棕黄色的颗粒和条纹却是极少的。但是 TGF- β_1 组出现黄色以及棕黄色颗粒及条纹的细胞占据大多数。对照组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +DAPT 组的 α -SMA 免疫细胞化学阳性率分别为(0.314 \pm 0.019)%、(0.704 \pm 0.022)%和(0.339 \pm 0.026)%,经方差分析,差异有统计学意义($F = 10.172, P = 0.072$)。TGF- β_1 组与对照组和 TGF- β_1 +DAPT 组比较,经 LSD-*t* 检验,差异有统计学意义($t = 23.176$ 和 $18.354, P = 0.023$ 和 0.034),TGF- β_1 组较对照组和 TGF- β_1 +DAPT 组的 α -SMA 表达增加。TGF- β_1 +DAPT 组与对照组比较,经 LSD-*t* 检验,差异无统计学意义($t = 2.573, P = 0.112$)。见图 1。

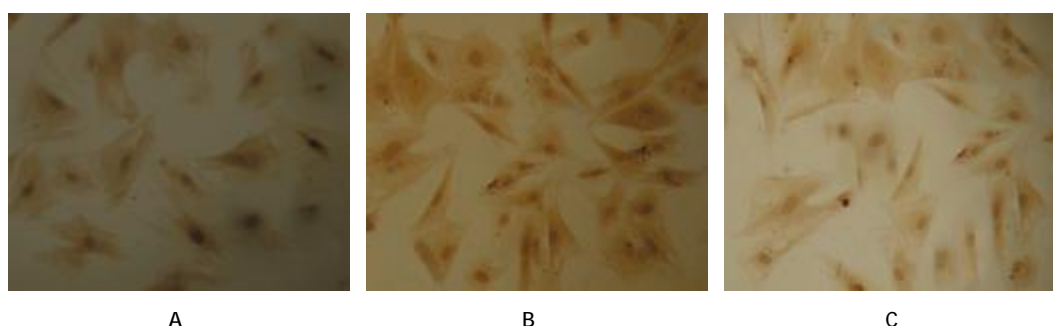


图 1 α -SMA 细胞免疫化学电镜图 ($\times 30$)
A: 对照组细胞中少部分细胞内有淡黄色颗粒及条纹;B: TGF- β_1 组大部分细胞内有黄色和棕黄色颗粒及条纹;C: TGF- β_1 +DAPT 组部分细胞内有淡黄色颗粒及条纹

图 1 α -SMA 细胞免疫化学电镜图 ($\times 30$)

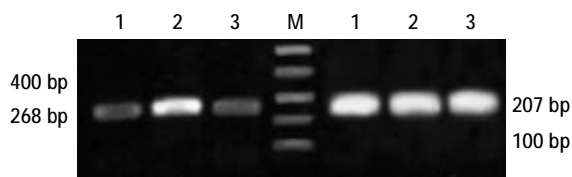
2.2 Notch1 mRNA 的表达

在对于 RT-PCR 产物进行电泳时,在 268 和 207bp 处,Notch1 与 β -肌动蛋白有着一定的表达条带。对照组、TGF- β_1 +DAPT 组、TGF- β_1 组的 Notch1 mRNA 表达量分别为(0.278 \pm 0.022)、(0.313 \pm 0.029)

和(0.783 \pm 0.018),差异有统计学意义,TGF- β_1 组 Notch1 mRNA 表达量升高,而对照组与 DAPT 组比较差异无统计学意义。见附表和图 2。

2.3 Notch1 蛋白的表达

Notch1 蛋白在 120 kD 处表达,在对照组(0.312 \pm



M:标志物:左侧 1~3:Notch1,右侧 1~3:β-肌动蛋白;1:对照组;2:TGF-β₁组;3:TGF-β₁+DAPT 组

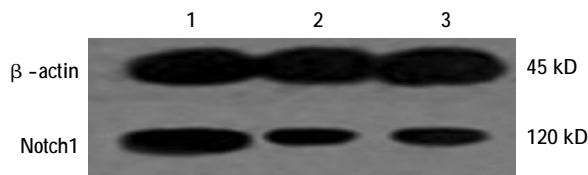
图 2 RT-PCR 反应检测各组细胞中 Notch1 mRNA 表达的变化

0.019) 仅有少量 Notch1 表达。TGF-β₁+DAPT 组 (0.345 ± 0.022) 与对照组的 Notch1 蛋白表达比较, 差异无统计学意义。TGF-β₁ 组 (0.701 ± 0.026) 较对照组及 TGF-β₁+DAPT 组中 Notch1 表达升高, 差异有统计学意义。见附表和图 3。

附表 Notch1 mRNA 积分吸光度值比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	mRNA	蛋白
对照组	0.278 ± 0.022	0.312 ± 0.019
TGF-β ₁ 组	0.783 ± 0.018	0.701 ± 0.026
TGF-β ₁ +DAPT 组	0.313 ± 0.029	0.345 ± 0.022
F 值	12.829	9.754
P 值	0.069	0.080
t ₁ 值	27.670	21.344
P ₁ 值	0.015	0.028
t ₂ 值	1.813	1.917
P ₂ 值	0.202	0.187
t ₃ 值	25.743	19.512
P ₃ 值	0.017	0.030

注: t₁、P₁ 值: 对照组与 TGF-β₁ 组比较; t₂、P₂ 值: 对照组与 TGF-β₁+DAPT 组比较; t₃、P₃ 值: TGF-β₁ 组与 TGF-β₁+DAPT 组比较



1: TGF-β₁ 组; 2: 对照组; 3: TGF-β₁+DAPT 组

图 3 Western blot 检测各组细胞中 Notch1 蛋白表达的变化

3 讨论

肺纤维化是多种肺部疾病的共同结局, 其主要病理特征是细胞外基质的沉积, 以及肺泡结构的破坏, 如肺泡囊肿的形成。而细胞外基质的主要成分是 I 型胶原蛋白。研究表明, 肌成纤维细胞是产生 I 型

胶原蛋白的主要细胞, 也是肺纤维化的责任细胞^[5], 而对于肌成纤维细胞来说, 其表型的标志就是 α-平滑肌肌动蛋白。而 TGF-β₁ 主要的作用是能够促进肺内成纤维细胞的转化, 将其转化为肌成纤维细胞^[6], 这在本研究中亦得到证实。α-SMA 免疫细胞化学结果显示, TGF-β₁ 组可见大部分细胞内有黄色和棕黄色颗粒及条纹, α-SMA 表达较对照组明显增加, 电镜下细胞内亦可见大量微丝束, 提示 TGF-β₁ 可以促使成纤维细胞转化为肌成纤维细胞。

Notch 信号通路与肺纤维化的发生、发展密切相关^[7], 其通过多种途径干预肺纤维化的病理生理过程, 同时可以直接促进 I 型胶原蛋白的表达。在肺纤维化患者的肺组织中, 可见明显呈蜂巢样改变的肺泡囊肿, 同时可以检测到 Notch 信号的过度表达。肺损伤后的结局是自我修复, 还是发展为肺纤维化, 可能部分取决于谱系阴性上皮干 / 祖细胞中的 Notch 信号通路^[8]。PAUL 等^[9]证实活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 通过转录因子 Nrf2 依赖的方式激活 Notch 信号通路, 从而促进气道基底干细胞的自我更新, 启动清除细胞内活性氧的抗氧化程序。而这种氧化还原机制对肺内干细胞的生物学功能具有重要意义, 比如肺损伤、肺纤维化、肺癌等。HU 等^[10]利用基因敲除及报告基因等方法证实小鼠 L929 细胞及人胚肺成纤维细胞 (Human lung fibroblasts, MRC-5) 中, Notch 信号通过 Hes1 依赖方式调控成纤维细胞表达 Col1 α1 及 Col1 α2, 从而上调 I 型胶原蛋白的表达, 促进肺纤维化。

Notch 信号通路可以促进肌成纤维细胞的表达。AOYAGI- IKEDA 等^[11]用免疫组织化学法证实, 不管是在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中, 还是在特发性肺纤维化的患者肺组织样本中, Notch 信号在肌成纤维细胞中的表达都明显增强。研究还表明, Notch 通过 TGF-β-Smad3 的途径激活在肺泡上皮细胞中辐射敏感启动子 (radiation sensitive promoter, CarG) 依赖性和 T 淋巴细胞抗原表位 (T lymphocyte epitope, TCE) 依赖性的平滑肌肌动蛋白基因转录, 以此来诱导肌成纤维细胞的分化^[11]。本研究结果提示, 在 TGF-β₁ 诱导生成的肌成纤维细胞中, Notch1 表达较对照组明显增加, 差异有统计学意义, 说明 Notch1 与肌成纤维细胞的生成相关。同时当 DAPT 抑制 Notch1 后, 肌成纤维细胞表型标志 α-SMA 表达明显降低, 提示抑制 Notch1 可以抑制

肌成纤维细胞的生成。进而笔者推测, TGF- β_1 可能通过活化 Notch 信号促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化, 阻断 Notch 信号可以抑制这种转化, 即抑制肺纤维化的形成。

综上所述, TGF- β_1 可以促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化, 在肌成纤维细胞中, Notch1 表达升高, DAPT 阻断 Notch 后, 可以抑制肌成纤维细胞的生成, 其表型标志物 α -SMA 明显降低。由此可见, Notch 信号通路在肌成纤维细胞生成以及肺纤维化中发挥着重要作用, 阻断 Notch 信号可能成为治疗肺纤维化的新靶点。

参 考 文 献:

- [1] THIBAUT Q, JULIE D, STEPHANIE C, et al. Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: Implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80: 2032-2041.
- [2] ZHANG S, LOCH A J, RADTKE F, et al. Jagged1 is the major regulator of Notch-dependent cell fate in proximal airways[J]. *Dev Dyn*, 2013, 242(6): 678-686.
- [3] XU K, MOGHAL N, EGAN SE. Notch signaling in lung development and disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 727: 89-98.
- [4] 于秀文, 曾林祥. Notch 信号通路对肌成纤维细胞转化中 α -SMA 表达变化的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(13): 11-14.
- [5] EMBLOM-CALLAHAN M C, CHHINA M K, SHLOBIN O A, et al. Genomic phenotype of non-cultured pulmonary fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Genomics*, 2010, 96: 134-145.
- [6] CONTE E, FRUCIANO M, FAGONE E, et al. Inhibition of PI3K prevents the proliferation and differentiation of human lung fibroblasts into myofibroblasts: the role of class I P110 isoforms[J]. *PLoS One*, 2011, 6: 1-10.
- [7] KAVIAN N, SERVETTAZ A, MONGARET C, et al. Targeting ADAM-17/Notch signaling abrogates the development of systemic sclerosis in a murine model [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62: 3477-3487.
- [8] VAUGHAN A E, BRUMWELL A N, XI Y L, et al. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 621-625.
- [9] PAUL M K, BISHT B, DARMAWAN D O, et al. Dynamic changes in intracellular ROS levels regulate airway basal stem cell homeostasis through Nrf2-dependent Notch signaling[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2): 199-214.
- [10] HU M, OUYANG H F, WU C G, et al. Notch signaling regulates col1 α 1 and col1 α 2 expression in airway fibroblasts [J]. *Exp Biol Med*, 2014, 239(12): 1589-1596.
- [11] AOYAGI-IKEDA K, MAENO T, MATSUI H, et al. Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor- β -Smad3 pathway[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(1): 136-144.

(童颖丹 编辑)