

· 论 著 ·

人胚肺成纤维细胞中 HSP47 与 TGF- $\beta_1$  关系的探讨\*汤 艳,郑金旭 $\Delta$ ,黄振杰,管淑红,许 清,刘继柱

(江苏大学附属医院呼吸内科,江苏镇江 212001)

**摘要:**目的 分析在人胚肺成纤维细胞(HELFL)中热休克蛋白 47(HSP47)与转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )之间的关系。方法 将 HELFL 分为 4 组:对照组、热休克组、TGF 组及联合组。采用 WST-8 法检测 HELFL 细胞活力和 Western blot 检测各组细胞 HSP47、I 型胶原(Col I)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、波形蛋白(Vimentin)表达情况。结果 TGF- $\beta_1$  能促进 HELFL 的增殖( $P < 0.05$ );在 TGF- $\beta_1$  作用下 HELFL 中上述蛋白表达上调,在 TGF- $\beta_1$  联合热休克反应的作用下上调更明显,而单在热休克反应后细胞 HSP47 表达显著,Col I 却未见明显增强( $P > 0.05$ )。结论 HSP47 参与 TGF- $\beta_1$  促 HELFL 胶原合成,在肺纤维化中起着重要的作用。

**关键词:**HSP47 热休克蛋白质类;转化生长因子  $\beta_1$ ;人胚肺成纤维细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.27.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)27-2705-02

Relation between HSP47 and TGF- $\beta_1$  in human embryonic lung fibroblasts\*Tang Yan, Zheng Jinxu $\Delta$ , Huang Zhenjie, Guan Shuhong, Xu Qing, Liu Jizhu

(Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

**Abstract:** Objective To analyze the relationship between heat shock protein 47(HSP47) and transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) in human embryonic lung fibroblasts(HELFLS). Methods HELFLS were divided into four groups; the control group, the heat shock group, TGF group and the combination group. HELFL cell viability was measured by WST assay, the expressions of HSP47, Collagen-I,  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) and Vimentin in cells were detected by Western blot. Results The cell viability was gradually increased after HELFL being treated by TGF- $\beta_1$  ( $P < 0.05$ ); All proteins showed obvious expression in HELFL induced by TGF- $\beta_1$ , increased more obviously induced by TGF- $\beta_1$  combined with HSR. HSP47 was obviously expressed while Collagen-I was slightly expressed after HSR( $P > 0.05$ ). Conclusion HSP47 may play an important role in pulmonary fibrosis as a downstream factor regulated by TGF- $\beta_1$ .

**Key words:** HSP47 heat-shock proteins; transforming growth factor beta 1; human embryonic lung fibroblast

肺纤维化是多种原因引起的异质性疾病,其主要病理特点为早期弥漫性肺泡炎,后期大量成纤维细胞增生以及过量的基质胶原进行性积聚,并逐渐取代正常的肺组织,主要的基质胶原蛋白为 I 型胶原蛋白(collagen trpe I, Col I)<sup>[1-2]</sup>。在肺纤维化中,转化生长因子  $\beta_1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta_1$ ) 在复杂的细胞因子网络中发挥着重要作用, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、波形蛋白(vimentin)是间质细胞的标志物<sup>[3]</sup>,其中前者具有特异性。近年来研究还发现,热休克蛋白 47(heat shock protein 47, HSP47)是胶原蛋白的特异性分子伴侣,在 Col I 的形成过程中必不可少。HSP47 能明显促进肝、肾纤维化<sup>[4-5]</sup>。且国外使用反义寡核苷酸技术证实,干扰 HSP47 的表达能明显减轻肺的纤维化, HSP47 与 TGF- $\beta_1$  之间存在某种联系,但二者的具体关系尚不明确,因此,本实验对此进行了研究,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要试剂** HSP47 抗体、 $\alpha$ -SMA 抗体、波形蛋白抗体及 Col I 抗体购自美国 Santa 公司。人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELFL)细胞株购自南京凯基生物有限公司。达氏修正依氏培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)购自 Hyclone 公司。 $\beta$ -actin 多克隆抗体购自美国 R&D 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 及二氢

基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。重组人 TGF- $\beta_1$  购自美国 PeproTech 公司。

**1.2 HELFL 细胞培养** 用含 10% 小牛血清、100  $\mu$ g/mL 链霉素及 100  $\mu$ g/mL 氨苄西林的高糖 DMEM, 将 HELFL 细胞浓度调整为  $1 \times 10^6$  个/mL, 接种于细胞培养瓶中, 置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 每 3 天左右换液, 0.2% 的胰蛋白酶消化, 5 d 左右传代。细胞培养 24 h 后用于实验。

**1.3 水溶性四唑盐-8 (water soluble tetrazolium-8, WST-8) 检测** 取对数生长期 HELFL 细胞接种于 96 孔板, 每孔接种 2 000 个细胞, 在含 10% 的小牛血清的 DMEM 培养基中培养 12 h, 加入 5 ng/mL TGF- $\beta_1$ , 实验按加入 TGF- $\beta_1$  后的培养时间分为 0、12、24 h 及 48 h 组(0 h 为对照), 各组细胞在 TGF- $\beta_1$  处理后, 分别加入 5 mg/mL WST-8 20  $\mu$ L 继续培养 4 h 后终止实验。每组设 5 个复孔, 以仅有培养基而无细胞的孔作为空白对照, 采用酶标仪以波长 630 nm 为参考, 在 450 nm 处记录吸光度值(optical density, OD)作细胞生长曲线。

**1.4 HELFL 细胞分组** 将对数生长期的 HELFL 细胞分为 4 组。对照组、细胞常规培养 48 h; 热休克组、将细胞进行热休克反应(即 42  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 37  $^{\circ}$ C 恢复 48 h); TGF 组、5 ng/mL TGF- $\beta_1$  作用细胞 48 h; 联合组, 将细胞进行热休克反应后, 再用 5 ng/mL 的 TGF- $\beta_1$  刺激细胞 48 h。

\* 基金项目: 卫生部科研基金资助项目(wkj2006-2-026); 江苏省“333 工程”基金资助项目(苏人才办 2007-16-09)。  $\Delta$  通讯作者, Tel: 13338812088; E-mail: jxuzh135@163.com。

**1.5 Western blot 检测** 检测以上各组 HELF 细胞的 HSP47、 $\alpha$ -SMA、波形蛋白、Col I 表达情况:加入 1 mL 放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 细胞裂解液 (碧云天 P0013B) 冰上裂解 20 min, 离心半径 8 cm, 13 000 r/min 离心 5 min, 取细胞裂解蛋白 50  $\mu$ g, 经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 后, 电转移至二氟化树脂 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜; 3% 脱脂奶粉封闭聚偏氟乙烯膜 2 h, 加入一抗 (1:200 稀释) 后 4  $^{\circ}$ C 过夜; 洗膜后加辣根过氧化物酶标记的二抗 (以 1:5 000 稀释), 37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h; 洗膜后滴加增强化学发光试剂, 然后将 PVDF 膜放入 X 线片暗盒显影, 并对 Western blot 条带进行定量分析, 确定条带的 OD 值。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS16.0 软件进行统计学数据分析, 数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HELF 细胞的形态学观察** 倒置相差显微镜下观察发现对照组 HELF 细胞呈梭形生长, 加入 TGF- $\beta_1$  刺激后, 随着刺激时间的增加, 细胞数量增多 (封 2 图 1)。

**2.2 TGF- $\beta_1$  对 HELF 细胞增殖的影响** 在 5 ng/mL TGF- $\beta_1$  作用下, 各时间点的 OD 值均高于对照组, 且随着时间延长, 细胞 OD<sub>450</sub> 值逐渐增高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

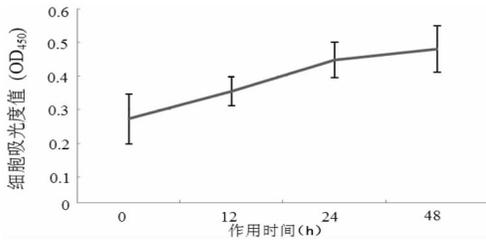
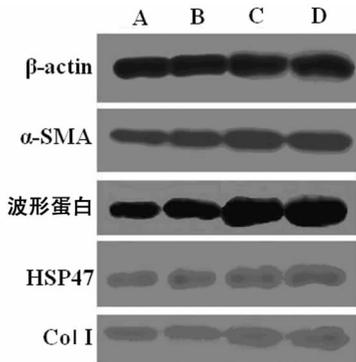


图 2 TGF- $\beta_1$  对 HELF 细胞增殖的影响

**2.3 HELF 细胞  $\alpha$ -SMA、波形蛋白、HSP47 及 Col I 蛋白的表达**  $\alpha$ -SMA 及波形蛋白在 TGF 组和联合组中的表达明显高于对照组和热休克组 ( $P < 0.05$ ); HSP47 及 Col I 在对照组、TGF 组和联合组细胞中的依次增加; 热休克组细胞中 HSP47 的表达与对照组比较有明显上调 ( $P < 0.05$ )。见图 3。



A: 对照组; B: 热休克组; C: TGF 组; D: 联合组。

图 3  $\alpha$ -SMA、波形蛋白、HSP47 及 Col I 蛋白表达电泳图

## 3 讨论

肺纤维化是以炎症起病, 肺泡结构进行性损害及细胞外基质胶原蛋白沉积为特征的慢性炎症性疾病, 其发病机制尚未完

全阐明, 治疗困难, 5 年生存率较低<sup>[6-7]</sup>。在肺纤维化的发生、发展过程中, 细胞因子之间相互作用, 形成复杂的细胞因子网络, TGF- $\beta_1$  被认为是这个细胞因子网络的重要因子<sup>[8]</sup>, 它能激活成纤维细胞<sup>[9-10]</sup>。Hagiwara 等<sup>[11]</sup>证实, 下调 HSP47 可改善博来霉素诱导的大鼠肺纤维化。

HSR 为生物机体在热应激 (或其他应激) 状态下所表现的以基因表达变化为特征的防御适应反应, 在热应激 (或其他应激) 时, 新合成或合成增多的一组蛋白质称为 HSP。热休克反应是细胞应激反应的一种<sup>[12]</sup>。近年来有研究发现, HSP47 是胶原蛋白的特异性分子伴侣, 主要为 Col I 蛋白, 它存在于胶原蛋白分泌细胞的内质网中, 与前胶原肽链特异性结合, 参与前胶原在内质网中的折叠、装配、修饰及转运等过程, 在胶原合成及肺纤维化过程中发挥着重要作用。

本研究表明, 根据细胞形态以及 WST-8 检测结果显示, TGF- $\beta_1$  对 HELF 细胞有明显增殖促进作用, 且随着作用时间的延长, 细胞增殖更明显。肺纤维化模型中, 细胞因子 TGF- $\beta_1$  通过促进成纤维细胞增殖, 使细胞外基质分泌增多, 最终形成肺纤维化。王昱等<sup>[13]</sup>研究结果表明, 随着 TGF- $\beta_1$  作用时间延长, 肺纤维化程度越明显。

本研究结果显示, 与对照组比较, TGF 组  $\alpha$ -SMA、波形蛋白表达上调。在 TGF- $\beta_1$  作用下, HELF 细胞不仅显著增殖, 且能向肌成纤维细胞转化, 成为成纤维细胞的活化状态<sup>[14]</sup>,  $\alpha$ -SMA、波形蛋白为成纤维细胞活化状态的主要标志<sup>[15]</sup>。与对照组比较, 热休克组中的细胞标志物  $\alpha$ -SMA、波形蛋白的表达未见明显增加, HSP47 的表达上调, 提示无 TGF- $\beta_1$  刺激时, 仅 HSP47 对 HELF 细胞无促进增殖作用。TGF- $\beta_1$  在肺间质纤维化的启动, 进行性恶化的过程中起到轴心作用。TGF- $\beta_1$  除了能促进细胞外基质的合成外, 还能诱导间质中的成纤维细胞转分化活化为肌成纤维细胞, 肌成纤维细胞的出现以及持续存在是肺纤维化发生以及进展的重要事件。肌成纤维细胞的超微结构及功能与成纤维细胞和平滑肌细胞均有不同的细胞特征性表达。

HSP47 在对照组细胞中少量表达, TGF 组及热休克组中表达增强, 在联合组中表达最明显, 说明 TGF- $\beta_1$  及热休克反应均对 HSP47 的表达有促进作用。Col I 在对照组细胞中少量表达, TGF 中表达上调, 热休克组表达与对照组无明显差异, 联合组表达上调。TGF 组细胞中 HSP47 与 Col I 同步上调, 证实 HSP47 与 Col I 关系密切, HSP47 主要功能是作为前胶原的分子伴侣参与胶原的合成, 是胶原成熟的必要条件。有人将包含人 HSP47cDNA 的逆转录病毒转染平滑肌细胞, 过表达 HSP47 的平滑肌细胞 I 型前胶原表达、合成、分泌速度明显加快, 细胞内外 I 型前胶原明显增多, 本研究结果与这一表现一致。在热休克组中, HSP47 表达上调, 而 Col I 表达未见同步上调; 联合组中, 经热休克反应致 HSP47 表达上调后, 在 TGF- $\beta_1$  的作用下, Col I 表达增加更明显, 这提示了 HSP47 促进 Col I 的生成可能需 TGF- $\beta_1$  的诱导。因此, HSP47 在肺纤维化中起着重要的作用。

因此, 在肺纤维化中, HSP47 参与 TGF- $\beta_1$  促 HELF 胶原合成。在 TGF- $\beta_1$  的诱导下, HELF 大量分泌 Col I, 在肺纤维化中起着重要的作用。TGF- $\beta_1$  是肺纤维化中细胞因子的中枢连接点, 抑制其表达会带来很多不良反应, 而 HSP47 是其下游的一个细胞因子, 人们可通过阻断其表达来抑制肺纤维化, HSP47 有望成为新的、更安全的治疗靶点。 (下转第 2708 页)

表 3 PPD 试验结果与病变性质的关系[n(%)]

PPD 试验	病变性质			
	干酪样坏死	渗出性	增殖性	纤维化
-	10(37.44)	12(44.44)	4(14.81)	1(3.70)
+	3(21.00)	7(46.67)	2(13.33)	3(20.00)
++	27(26.47)	57(55.88)	13(12.75)	5(4.90)
+++	15(28.30)	31(58.49)	7(13.21)	0(0.00)

### 3 讨论

PPD 试验是基于Ⅳ型变态反应原理的一种皮肤试验,用来检测机体有无感染过结核杆菌。凡感染过结核杆菌的机体,会产生相应的致敏淋巴细胞,具有对结核杆菌的识别能力。当再次遇到少量的结核杆菌或结核菌素时,致敏 T 淋巴细胞受相同抗原再次刺激会释放出多种可溶性淋巴因子,导致血管通透性增加,巨噬细胞在局部集聚。约在 48~72 h 内,局部出现红肿、硬节的阳性反应。若受试者未感染过结核杆菌,则注射局部无变态反应发生<sup>[3]</sup>。

本研究 197 例涂阴肺结核患者中,有 27 例(13.71%)为 PPD 试验阴性。有研究指出,从细菌进入人体到开始产生免疫力,有一段间隔(敏感前期),约为 3~12 周,平均为 6 周<sup>[3]</sup>。因此,首先考虑这部分患者的免疫反应尚未建立,但也不排除因技术原因引起的假阴性,应在临床上引起重视。有报道采用 1 IU 单位的 PPD 进行试验可减少漏诊和误诊<sup>[4]</sup>。还有研究报道,中国属结核病高发地区,实行卡介苗(bacillus calmette-guerin vaccine, BCG)普遍接种的策略,使 PPD 试验出现了较

高的假阳率<sup>[5]</sup>。本研究认为,涂阴肺结核患者的诊断仍应综合分析,以避免引起漏诊。

目前对皮肤变态反应和深部组织的变态反应之间的关联性仍未明确阐明<sup>[3]</sup>。本研究对 197 例确诊的涂阴肺结核患者 PPD 试验结果进行分析发现,PPD 试验结果(-、+、++、+++与肺部病变的范围、性质、痰培养阳性之间无统计学意义( $P>0.05$ )。PPD 试验反应阳性对判断是否感染结核菌有重要价值,但它不能诊断肺部有无结核病和确定病变的性质。在涂阴肺结核的诊断中仅是辅助诊断指标,对涂阴肺结核的诊断仍应综合分析。

### 参考文献:

(上接第 2706 页)

### 参考文献:

- [1] 张燕萍,樊茂蓉,王书臣,等.肺纤平对博莱霉素所致肺纤维化大鼠 I、III 型胶原的影响[J].中国中西医结合杂志,2007,27(11):1013-1015.
- [2] Ishida Y, Kubota H, Yamamoto A, et al. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(5): 2346-2355.
- [3] Schietke R, Bröhl D, Wedig T, et al. Mutations in vimentin disrupt the cytoskeleton in fibroblasts and delay execution of apoptosis[J]. Eur J Cell Biol, 2006, 85(1): 1-10.
- [4] 李异,吴畏,蒋永芳,等. HSP47 在 TGF- $\beta_1$  诱导肝星形细胞合成 I 型胶原蛋白中的作用[J].中南大学学报:医学版,2007,32(4):650-655.
- [5] 邓剑波,王代红,张耀全,等.慢性肾脏病患者肾组织热休克蛋白 47 的表达及意义[J].重庆医学,2005,34(7):1029-1031.
- [6] Daniels CE, Yi ES, Ryu JH. Autopsy findings in 42 consecutive patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Eur Respir J, 2008, 32(1):170-174.
- [7] 张晓梅,姜良铎,张伟,等.肺纤纤抗大鼠肺纤维化的实验研究[J].中华中医药杂志,2007,22(6):407-409.

- [1] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组.2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告[J].中国防痨杂志,2002,24(2):3-46.
- [2] 卫生部疾控司.中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版)[M].北京:中国协和医科大学出版社,2009:27.
- [3] 马琦,朱莉贞,潘毓萱.结核病学[M].北京:人民卫生出版社,2006.
- [4] 丁玉江,赵新国,夏光进,等.1 U PPD 试验对菌阴肺结核的诊断价值[J].临床肺科杂志,2005,10(4):426.
- [5] 谢莉.结核菌素试验和体外  $\gamma$ -干扰素检测在结核诊断中的作用及比较[J].中国全科医学:医学读者版,2010,12(5):57-58.

(收稿日期:2011-04-10 修回日期:2011-05-15)

- [8] 徐宁,石小枫. TGF- $\beta_1$  与肝纤维化的关系再探讨[J].重庆医学,2008,37(20):2356-2357.
- [9] 高丽,马国强,杨敬平,等.转化生长因子  $\beta_1$  和结缔组织生长因子在大鼠肺纤维化中的表达[J].临床肺科杂志,2009,14(8):1038-1040.
- [10] 喻婷,夏永良.肺纤维化中细胞因子作用机制的研究进展[J].河南中医学院学报,2008,23(3):77-79.
- [11] Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, et al. An anti-sense oligonucleotide to HSP47 inhibits paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Toxicology, 2007, 236(3): 199-207.
- [12] Totan S, Echo A, Yuksel E. Heat shock proteins modulate keloid formation[J]. Eplasty, 2011, 11: 21.
- [13] 王昱,泮峰,朱宇熹,等. PPAR $\gamma$  与肺纤维化[J].重庆医学,2009,38(8):987-988.
- [14] Agarwal C, Britton ZT, AlaseirlisDA, et al. Healing and normal fibroblasts exhibit differential proliferation, collagen production, alpha-SMA expression, and contraction[J]. Ann Biomed Eng, 2006, 34(4): 653-659.
- [15] 周娟,张悦,陆海英,等.波形蛋白在实验性肾间质纤维化上皮-间充质转化中的表达及意义[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2009,18(1):9-14.

(收稿日期:2011-04-20 修回日期:2011-05-17)