

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.27.014

PGD2 调控 TGF- $\beta$ 1 在慢性阻塞性肺疾病气道重塑中的作用\*

刘建英,刘代顺,刘振峰

(贵州省遵义市第一人民医院呼吸内科 563003)

**摘要:**目的 探讨前列腺素 D2(PGD2)对 L-929 小鼠肺成纤维细胞生物学特性的影响,利用其受体特异性抑制剂 Laropiprant 调控 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路。方法 按 Laropiprant 浓度梯度将细胞分为 0.3  $\mu$ mol 组、1.0  $\mu$ mol 组、3.0  $\mu$ mol 组、10.0  $\mu$ mol 组、30.0  $\mu$ mol, 每组分别加入 TGF- $\beta$ 2(2.5 ng/mL)培养 24 h 后使用相应浓度的 Laropiprant 刺激 24 h,并分别用 PCR 法和 Western blot 法检测细胞 TGF- $\beta$ 1、Smad<sub>3</sub> 以及 Smad<sub>4</sub> 的表达。分别采用不同浓度的 Laropiprant 作用于细胞不同时间(12、24、48、72 h),通过 MTT 法检测 Laropiprant 对细胞生长的抑制作用。结果 随着 Laropiprant 的浓度增加,细胞 TGF- $\beta$ 1、Smad<sub>3</sub> 以及 Smad<sub>4</sub> 的 mRNA 和蛋白的表达呈下降趋势,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。不同浓度的 Laropiprant 作用于细胞不同时间后,细胞抑制率随浓度增高和作用时间增长呈下降趋势。结论 L-929 小鼠肺成纤维细胞 PGD2-DP1 的表达可能与 TGF- $\beta$ 1/Smads 的调节相关。Laropiprant 作用于细胞后,细胞抑制率随浓度增高和作用时间增长呈下降趋势。

关键词:前列腺素 D2;TGF- $\beta$ 1;Smads

中图分类号:R329.2+8

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)27-3588-04

The role of the airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease PGD2 regulate TGF- $\beta$ 1\*

Liu Jianying, Liu Daishun, Liu Zhenfeng

(Department of Respiratory, First People's Hospital of Zunyi, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To explore PGD2 biological characteristics in L-929 mice lung fibroblasts cell by Laropiprant is a specific inhibitor of PGD2 receptor regulation of TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway. Provide further basis research to explore the molecular mechanisms of airway fibrosis. **Methods** The cells divided by Laropiprant concentration 0.3  $\mu$ mol group, 1.0  $\mu$ mol group, 3.0  $\mu$ mol group, 10.0  $\mu$ mol group, 30.0  $\mu$ mol and the control group. Each group were added TGF- $\beta$ 2 (2.5 ng/mL) were cultured for 24 h after stimulation with the corresponding concentrations of Laropiprant 24 h, TGF- $\beta$ 1 Smad<sub>3</sub> and Smad<sub>4</sub> expression were detected by PCR and WB, respectively. A randomized approach, using different concentrations of Laropiprant acts on cells at different times (12, 24, 48, 72 h) by MTT assay for cell growth Laropiprant inhibition. **Results** TGF- $\beta$ 1, Smad<sub>3</sub> and Smad<sub>4</sub> mRNA expression decreased with the addition of Laropiprant concentration increases, there was significant difference compared with the control group with ( $P < 0.05$ ). TGF- $\beta$ 1, Smad<sub>3</sub> and Smad<sub>4</sub> protein expression decreased with the addition of Laropiprant concentration increases, there was significant difference compared with the control group with ( $P < 0.05$ ). Cell growth inhibition rate decreased with Laropiprant concentration increasing and cell culture time growth, Laropiprant in concentration 1  $\mu$ mol, reaction time was 24 to 36 h, the cell growth inhibition was significantly improved. **Conclusion** PGD2-DP1 expression in L-929 mouse lung fibroblasts cell may be associated with TGF- $\beta$ 1/Smads regulation, growth inhibition rate decreased with Laropiprant concentration increasing and cell culture time growth, reaction time prolong, the cell growth inhibition was significantly improved.

Key words: PGD2; transforming growth factor  $\beta$ 1; Smads

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种具有气流受限特征的可以预防和治疗的疾病,气流受限不完全可逆,呈进行性发展,且与肺部对香烟、烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关。气道重塑是 COPD 气流阻塞的主要病理基础,是 COPD 患者症状和气流阻塞的主要原因<sup>[1]</sup>。本研究将探讨前列腺素 D2(PGD2)对小鼠肺成纤维细胞生物学特性的影响,利用其受体特异性抑制剂 Laropiprant 调控 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路<sup>[2]</sup>,为进一步探讨气道纤维化形成的分子机制提供研究基础。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** L-929 小鼠肺成纤维细胞由第四军医大学提供, TGF- $\beta$ 1 细胞因子购自美国 Gibco 公司, PCR 试剂盒购自中国

大连宝生物公司, II 级鸡卵清蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司; PGD2 受体多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗均购自美国 Cst 公司, BCA 蛋白定量试剂盒、PVDF 膜购自美国 Pierce 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 MTT 比色法** 参照中国国家标准 GB/T1688615-1997 “医疗器械生物学评价第 5 部分:细胞毒性试验体外法”进行。将冻存的 L-929 细胞复苏后,生长状态良好的 L-929 细胞于实验前 1 d 传代,第 2 天用 0.25% 胰酶(pH 为 7.8)消化,用 DMEM 高糖培养基洗细胞 2 次(1 500 r/min, 8 min),用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基重悬,调整细胞数为  $2 \times 10^5$  / 个,铺于 96 孔平底板中置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 4 h,

待细胞贴壁后,即将实验细胞按照时间梯度分为 12 h 组、24 h 组、48 h 组、72 h 组,分别加入含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基稀释试验药物(各组 Laropiprant 均按 0.3、1.0、3.0、10.0、30.0  $\mu\text{mol}$  比例配置),同时设正常细胞对照组,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  试液,每个稀释度设 5 个复孔,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中孵育 24 h,加入 5 mg/mL MTT 20  $\mu\text{L}$ /孔(每毫升 PBS 中溶解 5 mg MTT,经 0.22  $\mu\text{L}$  滤膜滤过以除菌和去不溶物,低温、避光保存),37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  培养箱中继续孵育 4 h 后,用孵育箱清洗 2 遍,弃去上清,加入溶解液二甲基亚砜 100  $\mu\text{L}$ /孔,于微型振荡器上振荡 5 min,使结晶物充分溶解,使用酶联免疫检测仪在波长 490 nm 处测定各孔吸光度(A)值。根据测定的 A 值计算其相对细胞生长抑制率。同样方法测量 48 h 药物对实验细胞生长抑率。抑制率的计算公式:抑制率=[(对照组的 A 值-给药组的 A 值)/对照组的 A 值] $\times 100\%$ 。

**1.2.2 RT-PCR 检测** 将对数生长期的 L-929 细胞以  $5 \times 10^4$  个/mL 接种于 25 mL 培养瓶内,接种 24 h,按 Laropiprant 浓度梯度将细胞分为 0.3  $\mu\text{mol}$  组、1.0  $\mu\text{mol}$  组、3.0  $\mu\text{mol}$  组、10.0  $\mu\text{mol}$  组、30.0  $\mu\text{mol}$ ,每组分别加入 TGF- $\beta 2$  (2.5 ng/mL)<sup>[7]</sup>。

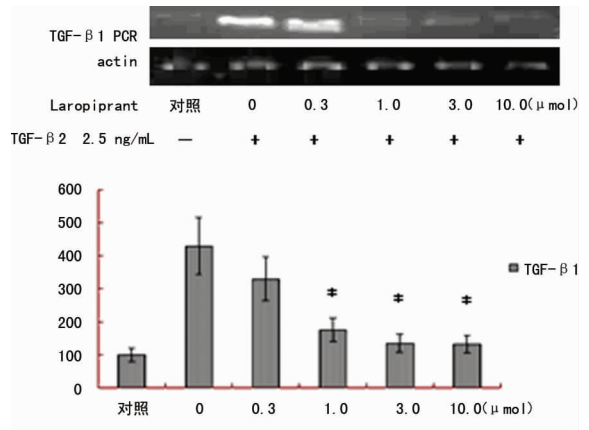
引物序列,PGD2:上游 5'-CGG AAT TCA TGG TCC ACA GCA TTC CGC TG-3',下游 5'-CGG GAT CCC TAA TTG ATC CCG CTG CTC A-3'; TGF:上游 5'-CCA GAT CCT GTC CAA ACT AAG G-3',下游 5'-CAT GTT GCT CCA CAC TTG ATT T-3'; Smad<sub>3</sub>:上游 5'-TGA ACA CCA AGT GCA TTA CCA-3',下游 5'-GGA GGT AGA ACT GGC GTC TCT-3'; Smad<sub>4</sub>:上游 5'-ACA TTG GAT GGA CGA CTT CAG-3',下游 5'-TCA ATT CCA GGT GAG ACA ACC-3'。细胞总 RNA 提取,加药后继续培养 24 h 后加入适量的 Trizol,将细胞收入 EP 管中。每个 EP 管中加入 0.05  $\mu\text{g}$ /L 三氯甲烷 0.2 mL,加盖,振摇 15 s,室温静置 3 min,12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液移至另一 EP 管内,加入等体积的异丙醇,混匀,静置 10 min,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 75% 乙醇 1 mL,7 500 r/min 离心 5 min,弃上清,空气中干燥 5~10 min,加入焦碳酸二乙酯(DEPC)水 30  $\mu\text{L}$  溶解 RNA,-80  $^{\circ}\text{C}$  保存。逆转录反应体系:10 $\times$ RNA PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ ,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu\text{L}$ ,10 mmol/L dNTP 1  $\mu\text{L}$ ,Oligo dT50 pmol,Rnasin 20 U,AMV 5 U,cDNA 10  $\mu\text{L}$ ,补加 DEPC 处理水至 20  $\mu\text{L}$ 。于热循环仪中 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,再进行 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,57  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 35 个循环。PCR 产物用 1.2% 糖凝胶电泳,HE 染色后拍照。通过 Potoshop 图像分析系统分析各条带灰度。

**1.2.3 Western blot 检测 TGF 量** 提取总蛋白,BCA 法测定浓度。以每孔 40 mg 上样,用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,半干法转移至 PVDF 膜上,与小鼠抗兔的 GATA-3(1:1 000)和 13-actin(1:1 000)单克隆抗体孵育 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,洗膜后,用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠的 IgG 抗体(1:1 000)孵育 6 h,用发光试剂盒显示蛋白条带,使用 Gensnap 凝胶成像系统拍照。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。各组均值进行线性和差异性检验,研究实验组与对照组的差异性及其数据是否有线性相关。以  $\alpha=0.05$  为检验水准,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

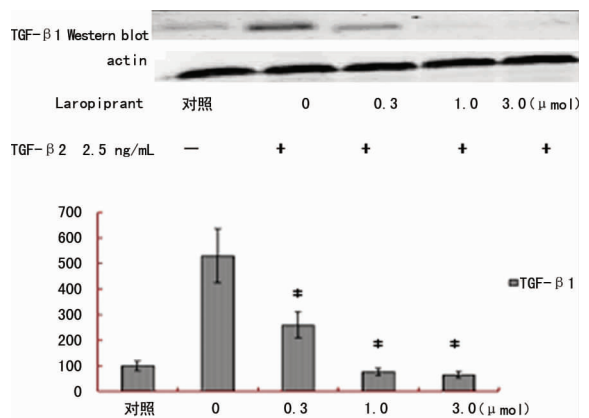
## 2 结 果

**2.1 PGD2-DP1 抑制后 TGF- $\beta 1$ 、Smad<sub>3</sub>、Smad<sub>4</sub> 信号改变** 随着 Laropiprant 的浓度增加,细胞 TGF- $\beta 1$ 、Smad<sub>3</sub> 以及 Smad<sub>4</sub> 的表达呈下降趋势,与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),图 1~6。



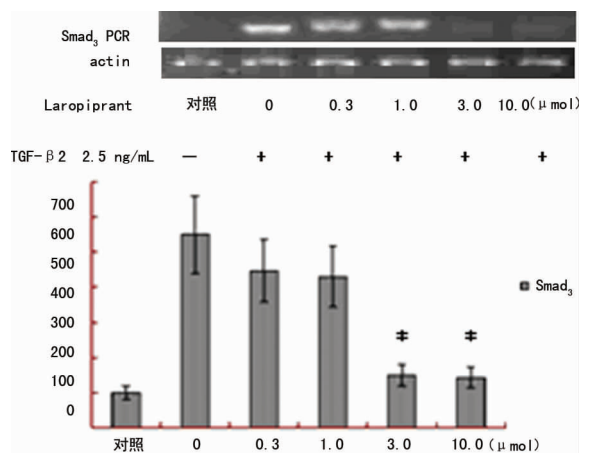
+; 阳性;-; 阴性。#:  $P<0.05$ , Laropiprant 处理组(1.0、3.0、10.0  $\mu\text{mol}$  组)与对照组比较。

图 1 TGF- $\beta 1$  mRNA 的表达(PCR 法)



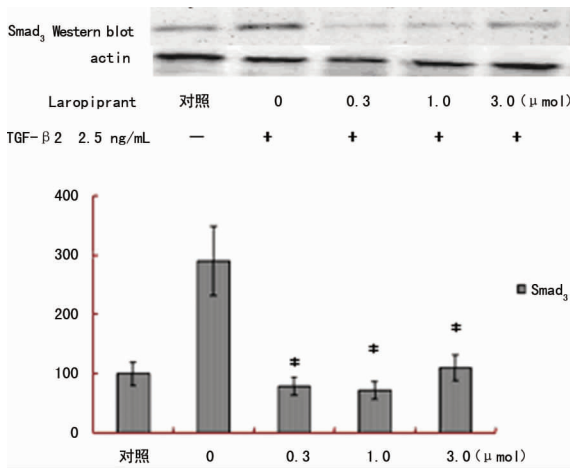
+; 阳性;-; 阴性。#:  $P<0.05$ , Laropiprant 处理组(0.3、1.0、3.0  $\mu\text{mol}$  组)与对照组比较。

图 2 TGF- $\beta 1$  蛋白的表达(Western blot 法)



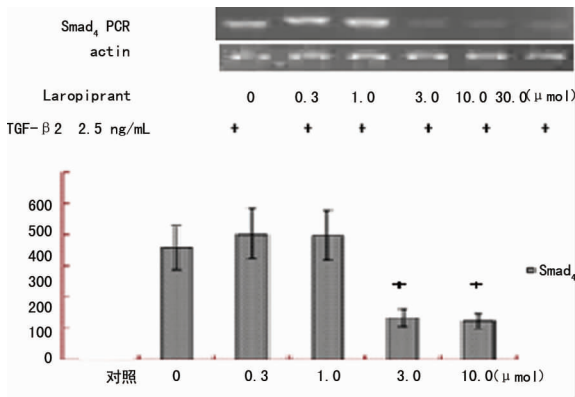
+; 阳性;-; 阴性。#:  $P<0.05$ , Laropiprant 处理组(3.0、10.0、30.0  $\mu\text{mol}$  组)与对照组比较。

图 3 Smad<sub>3</sub> mRNA 的表达(PCR 法)



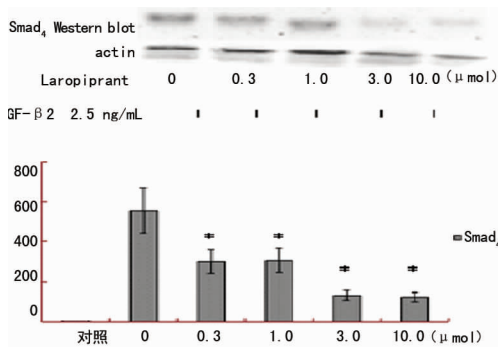
+: 阳性; -: 阴性。#: Laropiprant 处理组 (0.3、1.0、3.0 μmol 组) 与对照组比较  $P < 0.05$ 。

图 4 Smad<sub>3</sub> 蛋白的表达 (Western blot 法)



+: 阳性; -: 阴性。#: Laropiprant 处理组 (3.0、10.0、30.0 μmol 组) 与对照组比较  $P < 0.05$ 。

图 5 Smad<sub>4</sub> mRNA 的表达 (PCR 法)



+: 阳性; -: 阴性。#: Laropiprant 处理组 (0.3、1.0、3.0、10.0 μmol) 与对照组比较  $P < 0.05$ 。

图 6 Smad<sub>4</sub> 蛋白的表达 (Western blot 法)

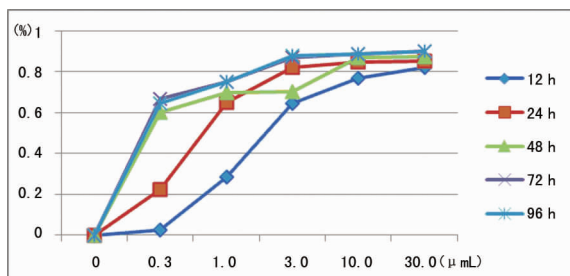


图 7 细胞活力曲线图

2.2 Laropiprant 抑制 PGD<sub>2</sub>-DP1 对小鼠肺成纤维细胞细胞活力的影响 使用 Excel 统计软件将酶标仪测得的 A 值结果转变为抑制率图标。细胞抑制率随浓度增高和作用时间增长呈下降趋势, Laropiprant 在浓度达到 1.0 μmol, 作用时间为 24~36 h 时, 细胞生长抑制率明显提高, 如图 7。

### 3 讨论

已经公认 COPD 的主要临床特点为气道阻塞和呼吸障碍。近年来, COPD 的发病率明显增加, 病因不十分清楚, 但受遗传因素和环境因素的双重影响<sup>[3]</sup>。该病的病程较长, 病死率较高<sup>[4]</sup>。气道炎症与重塑在 COPD 发生、发展中起重要作用。气道炎症的持续发展是 COPD 气道重建的关键因素<sup>[5]</sup>。总之, 支气管、肺组织的炎症、损伤、修复和重塑是 COPD 不断进展的病理过程, 气道重塑是 COPD 者症状和气流阻塞的主要原因。

近年来关于气道重构的研究说法不一<sup>[6]</sup>, 而学者普遍认为 TGF-β1 在气道炎症和纤维化中发挥了重要作用。TGF-β1 是刺激成纤维细胞增殖及胶原分泌的主要细胞因子<sup>[7]</sup>。使用 ELISA 法检测稳定期支气管哮喘患者支气管肺泡灌洗液中的 TGF-β1 后发现, 其含量显著高于健康对照组, 变应原刺激 24 h 后的 TGF-β1 浓度更高<sup>[8]</sup>。原位杂交和免疫细胞化学检测患者的哮喘气道黏膜的表达 TGF-β1 和免疫反应的显著增加, 增加量和疾病的严重程度直接相关。本实验以 L-929 小鼠肺成纤维细胞为研究对象, 通过应用 TGF-β2 刺激细胞产生 PGD<sub>2</sub>, 运用 RT-PCR 和 Western blot 来检测 TGF-β1、Smad<sub>3</sub>、Smad<sub>4</sub> 的表达, 结果发现随着 PGD<sub>2</sub> 的浓度增加, 细胞 TGF-β1、Smad<sub>3</sub>、Smad<sub>4</sub> 的表达呈下降趋势, 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示在小鼠气道慢性炎症过程中, PGD<sub>2</sub> 受体可能对细胞 TGF-β1、Smad<sub>3</sub>、Smad<sub>4</sub> 的表达具有调控机制, 这种机制在慢性气道炎症引起的气道重构中发挥了至关重要的作用。但 Schwartz 等<sup>[9]</sup>研究证实的 PGD<sub>2</sub>/DP 信号转导途径, 不仅能抑制成纤维细胞的迁移, 也可以调整成纤维细胞介导前胶原纤维的收缩反应, 这个结论提示了新的支气管哮喘气道重构的发生机制。

PGD<sub>2</sub> 对哮喘免疫反应的双向调节能力, 可作为炎症介质产生致炎作用。Song 等<sup>[10]</sup>在支气管哮喘患者吸入尘螨后, 对其支气管肺泡灌洗液进行检测, 发现其中的 PGD<sub>2</sub> 的浓度可增加 15 倍。PGD<sub>2</sub> 不仅诱导了支气管收缩, 并且其促使支气管收缩的效应强于组胺 30 倍。在支气管哮喘患者受到抗原的刺激后, 其气道内存在大量 PGD<sub>2</sub>。

实验发现, 在给予环氧合酶抑制剂后, 可部分抑制速发性哮喘反应的严重程度, 这证明了 PGD<sub>2</sub> 在慢性气道炎症中起到了重要的调节作用。Sedej 等<sup>[11]</sup>通过培养人胎儿肺成纤维细胞 (HFL-1) 进行体外实验, 证明 PGD<sub>2</sub> 不仅可抑制 HFL-1 对人纤连蛋白 (HFN) 的趋化作用, 而且还可以减缓成纤维细胞的迁移。以上都是通过 Ca<sup>2+</sup> 依赖 PKA 信号通路来发挥作用的<sup>[12]</sup>。这种作用体现在气道炎症损伤后修复过程中, 成纤维细胞聚集太少不利于损伤的修复, 而成纤维细胞过多则会发生变形, 使组织丧失功能结构。

本实验研究结果表明在 L-929 小鼠肺成纤维细胞中, 其 PGD<sub>2</sub>-DP1 受体可能与 TGF-β1/Smads 的调节相关, 两者之间为正相关关系, 这与过去许多其他标本中的相关研究结果和猜

测相符。但是本实验仍未涉及其具体调控机制的研究,而其他相关受体的作用也未曾可知。此外,在活体复杂环境下,PGD2 对 TGF- $\beta$ 1/Smads 的调控规律也有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Eastell R, Nagase S, Ohyama M, et al. Safety and efficacy of the cathepsin K inhibitor ONO-5334 in postmenopausal osteoporosis: the OCEAN study[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(6):1303-1312.

[2] Bone HG, Mcclung MR, Roux C, et al. A cathepsin-K-inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(5):937-947.

[3] Logue CA, Peak IR, Beacham IR. Facile construction of unmarked deletion mutants in Burkholderia pseudomallei using sacB counter-selection in sucrose-resistant and sucrose-sensitive isolates[J]. J Microbiol Methods, 2009, 76(3):320-323.

[4] Matsumoto K, Yokote H, Arai T, et al. N-Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor[J]. Cancer Sci, 2008, 99(8):1611-1617.

[5] Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, et al. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core; their functions and target proteins[J]. Carbohydr Res, 2009, 344(12):1387-1390.

[6] Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, et al. Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(13):5205-5210.

[7] Goldman R, Ransom HW, Varghese RS, et al. Detection of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis[J]. Clinical Cancer Research, 2009, 15(5):1808-1813.

[8] Newsom-Davis TE, Wang D, Steinman L, et al. Enhanced immune recognition of cryptic glycan markers in human tumors[J]. Cancer Res, 2009, 69(5):2018-2025.

[9] Schwartz JI, Liu F, Wang YH, et al. Effect of laropiprant, a PGD2 receptor 1 antagonist, on estradiol and norgestimate pharmacokinetics after oral contraceptive administration in women[J]. Am J Ther, 2009, 16(6):487-495.

[10] Song WL, Stubbe J, Ricciotti E, et al. Niacin and biosynthesis of PGD<sub>2</sub> by platelet COX-1 in mice and humans[J]. J Clin Invest, 2012, 122(4):1459-1468.

[11] Sedej M, Schrde R, Bell K, et al. D-type prostanoid receptor enhances the signaling of chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T(H)2 cells[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(2):492-500.

[12] Deng H, Hershenson MB, Lei J, et al. Pulmonary artery smooth muscle hypertrophy: roles of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and p70 ribosomal S6 kinase[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 298(6):L793-L803.

(收稿日期:2014-03-26 修回日期:2014-06-07)

## 《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用 M(QR)表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$  等);在用不等式表示  $P$  值的情况下,一般情况下选用  $P>0.05, P<0.05$  和  $P<0.01$  三种表达方式,无须再细分为  $P<0.001$  或  $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(CI)。