

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.19.005

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190814.1118.010.html(2019-08-14)

Cthrc1 抑制 TGF- β 1 诱导成纤维细胞合成羟脯氨酸的机制研究*刘 怡,李 娟[△]

(四川省成都市第二人民医院皮肤科 610017)

[摘要] **目的** 探讨胶原三螺旋重复蛋白 1(Cthrc1)与转化生长因子- β 1(TGF- β 1)相互作用对成纤维细胞羟脯氨酸(Hyp)合成的影响。**方法** 通过干预 Cthrc1 的表达,将成纤维细胞分为空白对照(NC)组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+Cthrc1 组、TGF- β 1+si-Cthrc1 组。q-PCR 与 Western blot 检测各组 Cthrc1 与 TGF- β 1 的 mRNA 及蛋白水平;CCK-8 法检测各组细胞增殖能力和活性;Hyp 试剂盒检测各组细胞内 Hyp 水平。**结果** 与 NC 组比较,TGF- β 1 组中 Cthrc1 蛋白及 mRNA 水平升高,细胞增殖能力及活性上升,Hyp 水平升高($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+Cthrc1 组 Cthrc1 mRNA 及蛋白水平降低,细胞增殖能力及活性下降,Hyp 水平降低($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+si-Cthrc1 组 Cthrc1 mRNA 及蛋白水平降低,细胞增殖能力及活性上升,Hyp 水平升高($P<0.05$)。**结论** TGF- β 1 促进成纤维细胞中 Cthrc1 表达,促进 Hyp 合成,而 Cthrc1 抑制 TGF- β 1 的促 Hyp 合成作用。

[关键词] 胶原三螺旋重复蛋白 1;转化生长因子 β 1;成纤维细胞;羟脯氨酸

[中图分类号] R246.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)19-3257-03

Study on the mechanism of Cthrc1 inhibiting TGF- β 1 induced hydroxyproline synthesis in fibroblasts*LIU Yi,LI Juan[△]

(Department of Dermatology, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610017, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of collagen triple helix repeat protein 1 (Cthrc1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the synthesis of hydroxyproline (Hyp) in fibroblasts. **Methods** The fibroblasts were divided into the blank control (NC) group, the TGF- β 1 group, the TGF- β 1+Cthrc1 group and the TGF- β 1+si-Cthrc1 group by interfering with the expression of Cthrc1. The mRNA and protein levels of Cthrc1 and TGF- β 1 were detected by q-PCR and Western blot. The proliferation and activity were detected by CCK-8. The Hyp level was detected by Hyp kit. **Results** Compared with the NC group, the levels of Cthrc1 mRNA and protein were elevated in the TGF- β 1 group, cell proliferation ability and activity increased, and Hyp level increased ($P<0.05$). Compared with the TGF- β 1 group, the levels of Cthrc1 mRNA and protein in the TGF- β 1+Cthrc1 group decreased, cell proliferation ability and activity decreased, and Hyp level decreased ($P<0.05$). Compared with the TGF- β 1 group, the levels of Cthrc1 mRNA and protein in the TGF- β 1+si-Cthrc1 group decreased, cell proliferation and activity increased, and Hyp level increased ($P<0.05$). **Conclusion** TGF- β 1 promotes Cthrc1 expression in fibroblasts and promotes Hyp synthesis, whereas Cthrc1 inhibits TGF- β 1 promoting Hyp synthesis.

[Key words] collagen trihelix repeat protein 1; transforming growth factor beta1; fibroblasts; hydroxyproline

成纤维细胞的活化、迁移、增殖,促使了 I 型和 III 型胶原蛋白的合成从而导致其在组织中的过度沉积是纤维化疾病的主要致病机制^[1]。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)是间质纤维化的关键细胞因子之一,可直接由成纤维细胞分泌,并作用于成纤维细胞,使其转化为肌成纤维细胞,促进其增殖并合成胶原,诱导纤维连接蛋白等的产生,提高成纤维细胞细胞外基质合

成和沉积,增强细胞收缩的功能,同时抑制蛋白酶和基质酶的活性^[2-3]。若能有效抑制 TGF- β 1 对胶原蛋白的促进合成作用,则可对瘢痕等纤维化疾病有一定的治疗作用。胶原三螺旋重复蛋白 1(collagen triple helix repeat containing 1,Cthrc1)是一种表达在受损动脉外膜及内膜的分泌型蛋白^[4]。Cthrc1 基因的表达和动脉损伤的修复相关联,其表达和外膜的纤维化

保持一致^[5]。本研究发现在成纤维细胞中 Cthrc1 呈 TGF- β 1 依赖性升高, Cthrc1 特异性地抑制 TGF- β 1 的促胶原蛋白合成作用。通过阐释 Cthrc1 与 TGF- β 1 相互之间的关系对成纤维细胞胶原蛋白合成的影响,将对治疗纤维化相关疾病提供一定的治疗思路,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 人成纤维细胞株购自中国科学院昆明细胞库。CCK-8 试剂盒购自欣博盛生物有限公司。羟脯氨酸(Hyp)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Cthrc1 正向引物:5'-CAA GGA AGC CCT GAA ATG A-3',反向引物:5'-TCC ACT AAT CCA GCA CCA A-3'; β -actin 正向引物:5'-AAG GCC AAC CGC GAG AA-3',反向引物:5'-CCT CGT AGA TGG GCA CA-3',均购自大连宝生物工程有限公司。重组人 TGF- β 1 因子购自美国 PePro-Tech 公司。Cthrc1-siRNA 单基因套装购自广州锐博生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 成纤维细胞分别接种在 RIMP 1640 完全培养基(10%胎牛血清,100 mg/mL 的链霉素、 1×10^4 U/L 青霉素)常规培养(37 °C、5% CO₂)。按照实验设定分为空白对照(NC)组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+Cthrc1 组、TGF- β 1+si-Cthrc1 组。

1.2.2 质粒转染干扰成纤维细胞 Cthrc1 的表达 成纤维细胞铺板长至 30%左右密度后,取 0.67 μ g (50 pmol)的 PCMV6-XL4-Cthrc1 或 siRNA-Cthrc1,用无血清稀释液适量稀释,充分混匀,制成 RNA 稀释液。取 1 μ L 的 Entranster-R4000,加入 24 μ L 无血清稀释液后制成 Entranster-R4000 稀释液,终体积为 25 μ L,室温静置 5 min。将 Entranster-R4000 稀释液和 RNA 稀释液混匀,室温静置 15 min。至此,转染复合物制备完成。将 50 μ L 转染复合物滴加到有 0.45 mL 全培养基的细胞上,前后移动培养皿,混合均匀。转染后 6 h 观察细胞状态,若转染效果良好则用于后续实验。

1.2.3 TGF- β 1 刺激成纤维细胞 成纤维细胞状态符合实验要求后,TGF- β 1 组加入浓度为 10^3 ng/mL TGF- β 1 因子溶液 100~1 900 μ L 完全培养基,培养 24 h。

1.2.4 qRT-PCR 检测各组 Cthrc1 mRNA 表达 各组加入 TGF- β 1 培养 24 h 后,Triol 法提取总 RNA,紫外分光光度仪测定浓度及纯度,琼脂糖凝胶电泳检测完整性。根据 Takara RNA PCRTM KIT(AMV) Ver. 3.0 说明书反转录合成 cDNA 第 1 条链,应用 SYBR Green qPCR SuperMIX-UDG 试剂盒进行 qRT-PCR 反应。反应条件:95 °C 3 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环,然后 95 °C 1 min,60 °C 30 s,95 °C 30 s 进行熔解曲线分析。每份

样品设 3 个复孔,每组样品重复检测 5 次。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因相对表达水平。

1.2.5 Western blot 检测各组 Cthrc1 蛋白表达 各组加入 TGF- β 1 培养 24 h 后,提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定各组蛋白水平后,以 50 μ g 为上样量进行凝胶电泳。按照目的蛋白分子量选取不同浓度的分离胶分离蛋白并电转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,对应一抗(1:1 000 稀释)4 °C 孵育过夜,相应二抗(1:8 000 稀释)孵育 1 h。新配制电化学发光(ECL)超敏化学发光液进行显影,使用 BIO-RAD 凝胶成像仪进行成像并进行分析,用目的蛋白 Cthrc1 与内参蛋白 β -actin 的光密度比值,计算目的蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.6 CCK-8 法检测各组细胞增殖能力的变化 按照实验分组建群后,收集各组细胞,在加入 TGF- β 1 后 24、48、72、96 h 依次加入 CCK-8 原液 10 μ L,37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 2.5 h,酶标仪测定 450 nm 处吸光度(OD)值。实验重复 5 次,取平均值绘制细胞生长曲线。

1.2.7 测定细胞上清液中 Hyp 表达水平 根据实验设计分别处理各组细胞后,收集各组 TGF- β 1 刺激 24 h 后的细胞上清液,并按照 Hyp 测定试剂盒说明书进行操作。计算公式:Hyp 表达水平(pg/mL)=(测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白 A 管吸光度) $\times$ 标准管浓度(5 pg/mL) $\times$ 样品测试前稀释倍数。

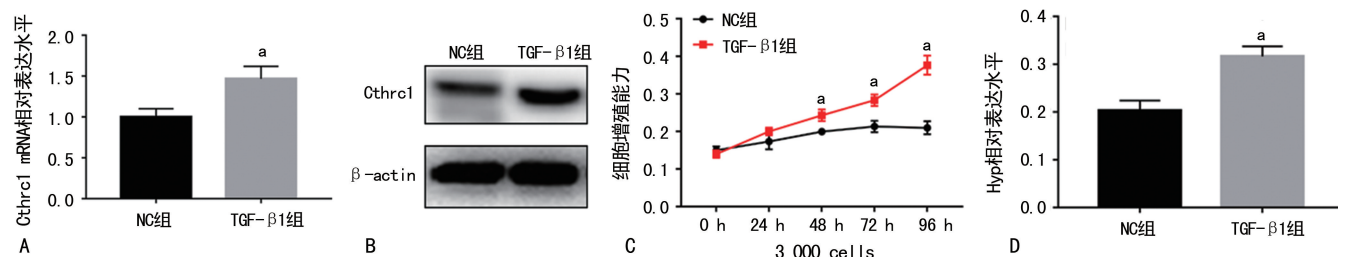
1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 1 促进成纤维细胞 Hyp 合成 TGF- β 1 组 Cthrc1 mRNA 水平高于 NC 组[(1.48 $\pm$ 0.34) vs. (1.01 $\pm$ 0.22)],差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGF- β 1 组的细胞增殖能力于 48 h 后开始明显高于 NC 组,并于 96 h 达到峰值,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGF- β 1 组 Hyp 水平明显高于 NC 组[(0.31 $\pm$ 0.03) vs. (0.20 $\pm$ 0.02)],差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

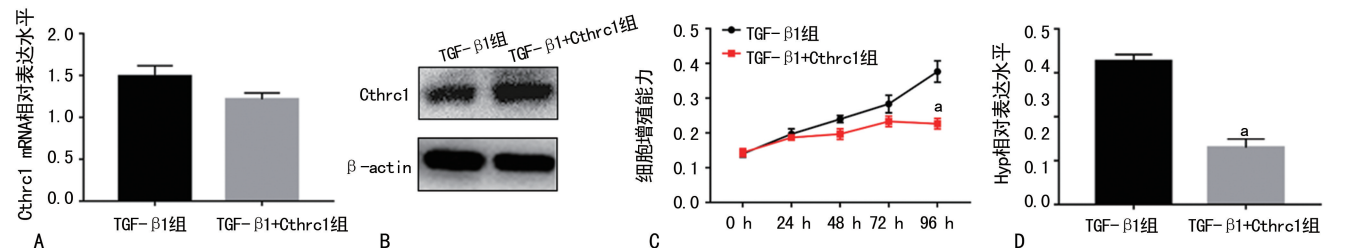
2.2 Cthrc1 抑制 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞 Hyp 合成 与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+Cthrc1 组细胞增殖能力在 96 h 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGF- β 1+Cthrc1 组 Hyp 水平明显低于 TGF- β 1 组[(0.13 $\pm$ 0.02) vs. (0.32 $\pm$ 0.01)],差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 Cthrc1 的缺乏增强 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞 Hyp 合成 TGF- β 1+si-Cthrc1 组的细胞增殖能力在 48、96 h 明显高于 TGF- β 1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);TGF- β 1+si-Cthrc1 组的 Hyp 水平



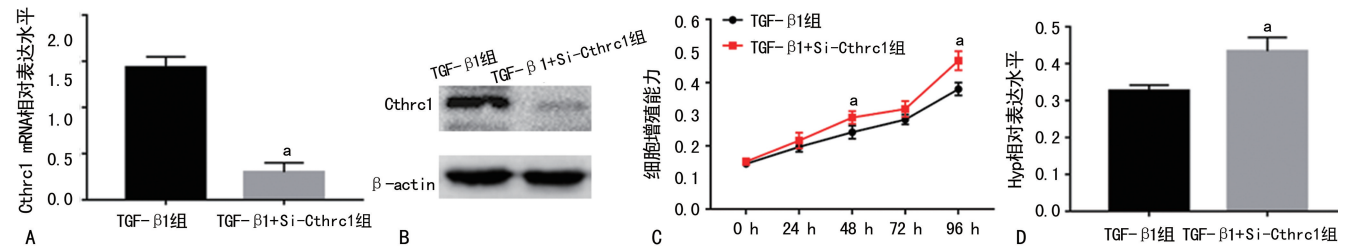
A: Cthrc1 mRNA 表达情况; B: Cthrc1 蛋白表达情况; C: 细胞生长曲线; D: Hyp 相对表达水平; ^a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较

图1 TGF-β1 促进成纤维细胞 Hyp 合成



A: Cthrc1 mRNA 表达情况; B: Cthrc1 蛋白表达情况; C: 细胞生长曲线; D: Hyp 相对表达水平; ^a: $P < 0.05$, 与 TGF-β1 组比较

图2 Cthrc1 抑制 TGF-β1 诱导的成纤维细胞 Hyp 合成



A: Cthrc1 mRNA 表达情况; B: Cthrc1 蛋白表达情况; C: 细胞生长曲线; D: Hyp 相对表达水平; ^a: $P < 0.05$, 与 TGF-β1 组比较

图3 Cthrc1 的缺乏增强 TGF-β1 诱导的成纤维细胞 Hyp 合成

明显高于 TGF-β1 组 $[(0.43 \pm 0.03) \text{ vs. } (0.31 \pm 0.01)]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

3 讨论

纤维化是各种原因引起的炎症导致的组织器官实质细胞的坏死, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 异常增多, 并在组织中过度沉积^[6]。目前认为成纤维细胞合成胶原蛋白增多是许多纤维化疾病的主要特点^[7]。在其发病机制中促纤维化和抗纤维化因子在调节胶原蛋白合成上起着关键的作用^[8]。Hyp 是一种非必需氨基酸, 在胶原蛋白中表达水平高且恒定, 其水平能客观反映纤维发生的程度和演变过程^[9]。本研究通过调节 Cthrc1 的表达, 发现 Cthrc1 可以影响 TGF-β1 诱导下成纤维细胞 Hyp 的合成, 在纤维化疾病中有一定的调节作用。

TGF-β1 是目前发现的能促进成纤维细胞增殖并促进其合成胶原, 同时抑制蛋白酶和基质酶的活性, 也是促进 ECM 沉积的主要调控因子^[10]。本研究发现 TGF-β1 在促进成纤维细胞合成 Hyp 的同时, 也增加了 Cthrc1 蛋白的表达。Cthrc1 是 TGF-β1 特异性的抑制剂, 可以抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路的激活, 在免疫相关性肝病和特发性肺纤维化等疾病中有着重要作用^[11-12]。本研究通过改变成纤维细胞

Cthrc1 的表达水平, 发现补充 Cthrc1 可以抑制 TGF-β1 诱导的 Hyp 合成, 而干扰 Cthrc1 则能增强 TGF-β1 对 Hyp 合成的促进作用。在博来霉素诱导的肺纤维化研究中也发现, Cthrc1 可以通过抑制 Hyp 的合成来保护肺功能^[13]。但并非过度分泌的 Cthrc1 则有利于纤维化疾病的治疗, 有研究报道 Cthrc1 也可激活肝星状细胞, 促进肝纤维化的发生与发展^[14]。

综上所述, 笔者认为 TGF-β1 与 Cthrc1 之间存在相互调节作用, TGF-β1 的表达可以诱导 Cthrc1 的表达, 而 Cthrc1 则反馈性抑制 TGF-β1 的过度激活, 该平衡机制在纤维化疾病中有着重要调控作用。在后续的研究中, 笔者将进一步探讨 Cthrc1 抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞分化的合理表达丰度值, 若能有效调节 Cthrc1 的表达, 则可为临床纤维化相关性疾病的治疗提供一些理论依据。

参考文献

[1] 郭文轩, 王菲, 常露, 等. 纤维细胞在纤维化疾病中的作用[J]. 河北医科大学学报, 2016, 37(9): 1105-1110.
[2] 宋菲, 原博. 脂肪干细胞来源的条件培养基对 TGF-β1 共同干预下的真皮成纤维细胞致纤维化能力的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(5): 588-594. (下转第 3264 页)

back to virchow? [J]. *Lancet*, 2001, 357(9255): 539-545.

- [4] HORN F, HENZE C, HEIDRICH K. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function[J]. *Immunobiology*, 2000, 202(2): 151-167.
- [5] JUNG M R, PARK Y K, JEONG O, et al. Elevated pre-operative neutrophil to lymphocyte ratio predicts poor survival following resection in late stage gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104(5): 504-510.
- [6] TAN Y G, EU E, LAU KAM O W, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts worse survival outcomes and advanced tumor staging in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer[J]. *Asian J Urol*, 2017, 4(4): 239-246.
- [7] SUZUKI R, LIN S H, WEI X, et al. Prognostic significance of pretreatment total lymphocyte count and neutrophil-to-lymphocyte ratio in extensive-stage small-cell lung cancer[J]. *Radiother Oncol*, 2018, 126(3): 499-505.
- [8] YANG J, XU H, GUO X, et al. Pretreatment inflammatory indexes as prognostic predictors for survival in colorectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3044.
- [9] MIYAMOTO R, INAGAWA S, SANO N, et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) predicts short-term and long-term outcomes in gastric cancer patients[J]. *EJ-SO*, 2018, 44(5): 607-612.

- [10] LIAO L J, HSU W L, WANG C T, et al. Prognostic impact of pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in nasopharyngeal carcinoma: a retrospective study of 180 Taiwanese patients[J]. *Clin Otolaryngol*, 2018, 43(6): 1644.
- [11] WANG Y, CHEN G. Identifying pretreatment baseline factors predictive of distant metastasis in patients with nasopharyngeal carcinoma after radiotherapy[J]. *Medicine*, 2017, 96(17): e6692.
- [12] LU A, LI H, ZHENG Y, et al. Prognostic significance of neutrophil to lymphocyte ratio, lymphocyte to monocyte ratio, and platelet to lymphocyte ratio in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 3047802.
- [13] NAKAYA A, KURATA T, YOSHIOKA H, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an early marker of outcomes in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with nivolumab[J]. *Int J Clin Oncol*, 2018, 23(4): 634-640.
- [14] JIN Y, YE X, HE C, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as predictor of survival for patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma [J]. *Head Neck*, 2015, 37(1): 69-75.

(收稿日期: 2019-03-16 修回日期: 2019-06-12)

(上接第 3259 页)

- [3] TOD J, HANLEY C J, MORGAN M R, et al. Pro-migratory and TGF- β -activating functions of $\alpha v \beta 6$ integrin in pancreatic cancer are differentially regulated via an Eps8-dependent GTPase switch[J]. *J Pathol*, 2017, 243(1): 37-50.
- [4] 韩乐, 张玲玲, 魏伟. 胶原三螺旋重复蛋白-1 参与疾病作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(7): 904-907.
- [5] APRA C, RICHARD L, COULPIER F, et al. Cthrc1 is a negative regulator of myelination in schwann cells[J]. *Glia*, 2012; 60: 393-403.
- [6] TAN R J, ZHOU D, LIU Y. Signaling crosstalk between tubular epithelial cells and interstitial fibroblasts after kidney injury[J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2016, 2(3): 136-144.
- [7] ZHANG B, LIU P, ZHOU Y, et al. Dihydroartemisinin attenuates renal fibrosis through regulation of fibroblast proliferation and differentiation[J]. *Life Sci*, 2019, 223: 29-37.
- [8] CUI L H, LI C X, ZHUO Y Z, et al. Saikosaponin d ameliorates pancreatic fibrosis by inhibiting autophagy of pancreatic stellate cells via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 300: 18-26.
- [9] 韩桂香, 刘嘉, 朱萱萱, 等. 姜黄素微乳凝胶抗皮肤纤维化

作用的实验研究[J]. *江苏中医药*, 2018, 50(8): 75-78.

- [10] WOODS I, BLACK A, JOCKENHOEVEL S, et al. Harnessing topographical & biochemical cues to enhance elastogenesis by paediatric cells for cardiovascular tissue engineering applications[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(2): 156-162.
- [11] BIAN Z, MIAO Q, ZHONG W, et al. Treatment of cholestatic fibrosis by altering gene expression of Cthrc1: implications for autoimmune and non-autoimmune liver disease[J]. *J Autoimmun*, 2015, 63: 76-87.
- [12] BAUER Y, TEDROW J, DE BERNARD S, et al. A novel genomic signature with translational significance for human idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 52(2): 217-231.
- [13] BINKS A P, BEYER M, MILLER R, et al. Cthrc1 lowers pulmonary collagen associated with bleomycin-induced fibrosis and protects lung function[J]. *Physiol Rep*, 2017, 5(5): e13115.
- [14] LI J, WANG Y, MA M, et al. Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF- β signaling[J]. *EBio Medicine*, 2019, 40: 43-55.

(收稿日期: 2019-02-06 修回日期: 2019-05-27)