

## TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在大鼠间充质干细胞机械牵张中的表达

朱晓文<sup>1</sup> 周昊<sup>2</sup> 戚孟春<sup>1</sup> 赵闯<sup>1</sup> 邹淑娟<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学口腔疾病研究国家重点实验室 四川 成都 610041;

2. 四川省医学科学院·四川省人民医院口腔颌面外科)

**[摘要]** 目的:了解 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)加载牵张中的作用。方法:分离培养大鼠骨髓 MSCs,应用四点弯曲加力系统对细胞施加单一一周期的机械张应力刺激(2000  $\mu\text{E}$ , 60 min)。用实时荧光定量 RT-PCR 与 western blot 检测 TGF- $\beta$ 、Smad4 的表达,同时检测 MSCs 细胞增殖及骨向分化标志物 ALP 的变化情况。结果:在张应力的作用下,TGF- $\beta$ 、Smad4 的表达显著增强( $P < 0.01$ )。MSCs 的增殖、ALP 活性也在加力后增强( $P < 0.01$ )。结论:TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的激活与细胞受张应力刺激密切相关,并与 MSCs 增殖与骨向分化趋势一致。表明 TGF- $\beta$ /Smad 通路参与了细胞力学信号向生物化学信号的转化。

**[关键词]** 间充质干细胞 机械牵张 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路

**[中图分类号]** R782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2013)08-0704-03

**Expression of TGF- $\beta$ /Smad Signal Pathway in the Stretched Rat MSCs.** ZHU Xiao-wen, ZHOU Hao, QI Meng-chun, et al. State key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041

**[Abstract]** **Objective:** To observe the role of TGF- $\beta$ /Smad signal pathway in the stretched rat mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods:** Bone marrow MSCs were isolated from SD rats and cultured in vitro. A four-point bending apparatus were used to perform a single period of mechanical stretch (2000  $\mu\text{E}$ , 60min) on MSCs. mRNA and protein expression of TGF- $\beta$  and Smad4 were detected by RT-PCR and western blot analysis. Cellular proliferation and ALP activity of MSCs were also examined. **Results:** Under the mechanical stimulation, cell proliferation, ALP activity and expression of TGF- $\beta$  and Smad4 were all significantly up-regulated in stretched MSCs when compared with their controls ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The activation of TGF- $\beta$ /Smad signal pathway is related to the mechanical stimulation on MSCs. The mechanical stretch can promote MSCs proliferation, up-regulate its ALP activity and induce a time-dependent expression of TGF- $\beta$ /Smad which in turn result in osteogenic differentiation of MSCs.

**[Key words]** Mesenchymal stem cells Mechanical stretch TGF- $\beta$ /Smad signal pathway

骨缝牵张成骨(suture distraction osteogenesis, SDO)是通过特定装置对骨缝施加适当牵张力,刺激骨缝内细胞增殖分化,使逐渐增宽的骨缝边缘新骨再生与改建,进而改变受力部位的生长趋势,此技术常用于正畸腭中缝扩大或上颌骨前牵引。

骨缝与骨髓间充质干细胞(MSCs)对机械力刺激敏感,受力后向牵张区募集,增殖和分化为成骨细胞<sup>[1]</sup>。笔者前期研究显示,骨髓间充质干细胞对力学刺激较成骨细胞敏感,可能是骨组织与骨缝牵张

的主要效应细胞<sup>[2]</sup>。但关于 MSCs 是如何将力学信号转化为生化信号进而引发一系列细胞增殖分化和蛋白合成、分泌直至成骨的分子机制尚不清楚。

Smad 分子是 TGF- $\beta$  超家族信号分子在细胞内信号转导的始动因子,在将 TGF- $\beta$ 、BMP 信号从细胞表面膜受体传导至细胞核的过程中起关键作用。Smad4 又是 TGF- $\beta$  超家族信号传导的中心分子,决定着 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在细胞中的传导<sup>[3]</sup>。因此本研究重点检测 TGF- $\beta$ /Smad4 在 MSCs 受张应力作用后的表达变化以期对骨缝与骨牵张分子机制的探索提供一些参考依据。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 实验用 SD 大鼠购自四川大学华西医学动物中心。LG-DMEM、

基金项目 国家自然科学基金(编号:81070859)

作者简介 朱晓文(1987~),女,湖北人,硕士,主要从事口腔生物学的研究工作。

\*通讯作者 邹淑娟,电话:028-85501474

FBS (Hyclone); Percoll 分离液 (PHAMACIA); TRIzolTMRNA Isolation Reagent, 低熔点琼脂糖 (Gibco); RT-PCR 试剂盒, IQ SYBR Green supermix (Bio-Rad); PCR 试剂盒, Taq 聚合酶, dNTP (MBI); 碱性磷酸酶染色及活力试剂盒 (Sigma); 引物 (上海生工)。四点弯曲加力装置由四川大学华西口腔医学院正畸科与电子科技大学联合研制。

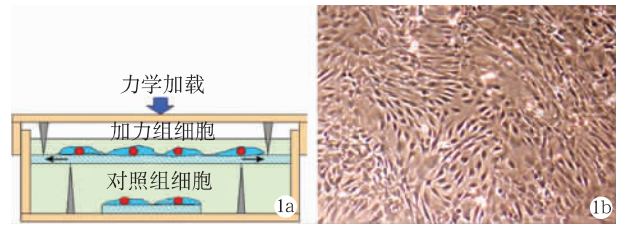
1.2 大鼠骨髓 MSCs 的分离和培养 选用 2 月龄雌性 SD 大鼠, MSCs 的分离采用密度梯度离心法<sup>[4]</sup>。无菌条件下取出双侧股骨和胫骨, 剪去骨髓端, 用 LG-DMEM 培养基冲出骨髓, 离心弃去脂肪层; 细胞重新制成细胞悬液并小心加入 Percoll 分离液的试管内; 800×g 离心 25 min, 吸取界面细胞层, 重新制成细胞悬液后离心; 所获细胞用含 10% (v/v) FBS 的 LG-DMEM 培养基接种于培养瓶内, 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。3 d 后更换培养基, 细胞达 70%~80% 融合时用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞, 并按 1:2~1:3 的比例传代。

1.3 细胞加力 采用四点弯曲加力系统对间充质干细胞进行加载<sup>[2]</sup>。以 1.5×10<sup>5</sup> 密度将第 3 代 MSCs 接种于特制塑料培养板上, 继续培养 48 h 后在加力培养皿内加力。加力参数为位移 1 mm, 频率 0.5 Hz, 此时细胞受力为 2000 μe, 加力时间为 60 min (图 1)。并于加力后 0、2、4、8 和 16 h 收获细胞, TRIzol 裂解细胞, -70 °C 冻存以备后续实验。

1.4 RT-PCR 检测 TGF-β 和 Smad4 mRNA 水平 提取细胞总 RNA。用 RevertAidTM 试剂盒 (Femerltas, Lihuania) 逆转录成 cDNA。取逆转录产物进行实时荧光定量 RT-PCR (ABI Prism 7700, USA)。引物如下: 1) TGF-β: 上游引物 5'-gacttactgcaggagaaggca-3' 下游引物 5'-ctggcgacagcagtttcgga-3'; Smad-4: 上游引物 5'-aggcagccatagtgaaggactgtt-3' 下游引物 5'-tagctggctgagcagtgaaatcat-3'。以 GAPDH 为内对照: 上游引物 5'-tgggtgtgaaccacagagaa-3', 下游引物 5'-ggcatggactgtggtcatga-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 2 min; 53 °C 20 s, 60 °C 40 s, 共 45 个循环。GAPDH 的 cDNA 经倍比稀释后进行同期 PCR, 用于回归分析。反应结束后在 PCR 仪上自动读取阈值 Ct。

1.5 TGF-β/Smad4 的 Western Blot 检测 分别于加力的 0、2、4、8 和 16 h 收获细胞, 提取细胞总蛋白。用 BCA 法蛋白检测试剂盒 (Pierce, USA) 测定蛋白浓度, 总蛋白的上清液和上样缓冲液混合煮沸变性, 冷却后上样, 凝胶电泳半干法转入 PVDF 膜

(Millipore, Bedford, MA)。将 PVDF 膜放入封闭缓冲液室温摇床振荡 1 h, 分别加入抗大鼠单克隆 TGF-β、Smad-4 和 GAPDH 抗体 (封闭缓冲液稀释一抗至工作浓度 1:1000) (Cell Signaling Technology, USA), 4 °C 孵育过夜。TBS/T 洗涤后孵育辣根过氧化物酶结合二抗, ECL 显影条带 (Millipore, Bedford, USA)。



1a: 加力装置; 1b: 间充质干细胞 (第 3 代)

图 1 细胞加力示意图

Fig. 1 Diagrams of cell stretching

1.6 细胞增殖及 ALP 活性检测 于加力后 1~4 d 每天收获两组细胞进行细胞计数, 分析细胞增殖能力。用加力后 0、16 h 的细胞进行碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测。ALP 活力检测采用生物化学分析法: 细胞加力后用 Hank's 液冲洗 3 次, 每培养板上的细胞用 100 μL Triton X-100 裂解; 取 50 μL 裂解液加入含 4 mmol/L 对硝基苯酯二钠的底物液 50 μL, 37 °C 孵育 30 min, 加入 1 mol/L 的氢氧化钠液 50 μL 终止反应, 在 410 nm 波长下测 A 值。

1.7 统计学处理 用 SPSS10.0 软件对每一时间点的加力组和对照组细胞检测指标进行配对 t 检验, P≤0.05 差异具有显著性。

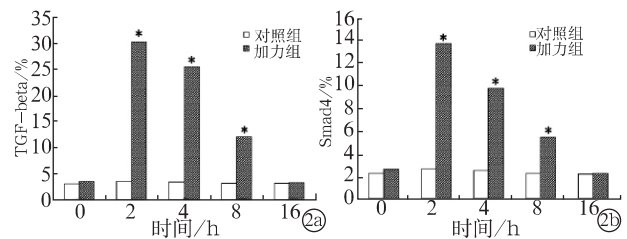


图 2 机械牵张后 TGF-β (左) 和 Smad4 (右) 在 MSCs 中的表达

Fig. 2 Expression of TGFβ (left) and Smad4 (right) in MSCs after mechanical stretch

2 结果

2.1 TGF-β 和 Smad4 的 mRNA 水平检测 大鼠 MSCs 经牵张力作用后, 在各时间点均有 TGF-β 和 Smad4 表达。但 mRNA 增高水平略有差异 (图 2)。2 种基因在施加牵张力后 2 h 迅速达到最高转录水平, 并显著高于对照组 (P<0.01)。随时间延长, 2 个基因的 mRNA 水平下降, 但在 8 h 内仍显著高于对照组 (P<0.01); 至牵张后 16 h, TGF-β 和

Smad4 的 mRNA 表达均恢复到对照组水平。

2.2 TGF- $\beta$  和 Smad4 的 Western Blot 检测 通过 Western blotting 检测 TGF- $\beta$  和 Smad4 的蛋白表达水平,其结果与 TGF- $\beta$  和 Smad4 的 mRNA 表达水平与变化趋势类似(图 3)。

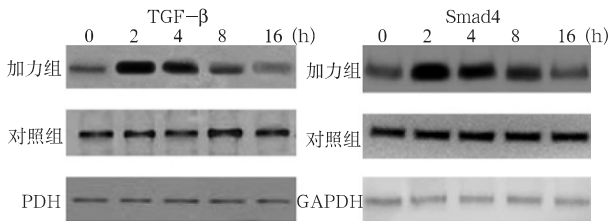


图 3 TGF- $\beta$  和 Smad4 的 Western blot 检测结果

Fig. 3 The detection of TGF- $\beta$  and Smad4 by Western blot

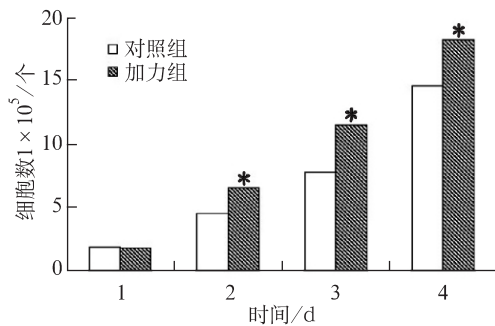


图 4 力学刺激后细胞增殖情况

Fig. 4 Cell proliferation after mechanical strain

2.3 细胞增殖及 ALP 活性检测 加力组和对照组细胞在加力后均呈指数方式生长,在加力后 2、3 和 4 d,加力组细胞数均显著高于对照组细胞(图 4)。ALP 活性检测结果见表 1。加力结束 0 h,两组细胞 ALP 活性比较差异无显著性,而加力结束后 16 h,加力组 ALP 活性显著高于对照组( $P < 0.01$ )。

表 1 ALP 活性生物化学法检测(A 值)

Table 1 Detection of activity of ALP  $\bar{x} \pm s$

组别	0 h	16 h
加力组	0.217 $\pm$ 0.021	0.694 $\pm$ 0.037*
对照组	0.209 $\pm$ 0.019	0.241 $\pm$ 0.026

注: \*  $P < 0.01$

### 3 讨论

近年来的研究证实作用于骨缝的张应力能够促进细胞增殖、分化,蛋白合成进而加速新骨沉积。笔者前期研究显示,骨髓间充质干细胞(BMMSCs)对力学刺激较成骨细胞敏感,并且可特征性的表达 Cbfa1、ALP、bFGF、IGF-I 等因子<sup>[2]</sup>。然而,关于 MSCs 是如何将力学信号转化为生化信号进而引发一系列增殖分化和蛋白合成的生物机制并不清楚。因此,对细胞加力的信号传导通路的研究是一个新

的课题<sup>[5]</sup>。

Smad 蛋白家族不仅参与 TGF- $\beta$  超家族信号通路的传导,同时还与 Wnt 与 BMP 等信号通路存在交叉<sup>[3,6]</sup>。明确 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在骨缝与骨牵张成骨中的调控机制,不仅能够有助于了解 TGF- $\beta$  超家族信号传导对牵张成骨的调节作用,同时也对探寻其他信号通路在细胞生物力学中的角色有重要研究价值。

本实验通过对 MSCs 施加张应力刺激,用 RT-PCR 与 western blot 检测 TGF- $\beta$ 、Smad4 的 mRNA 与蛋白的表达水平,同时检测 MSCs 细胞增殖及 ALP 活性的变化情况。结果显示 TGF- $\beta$  和 Smad4 显著提高,MSCs 的增殖、ALP 活性也明显增强。说明细胞受机械力刺激诱导了 TGF- $\beta$ /Smad4 基因与蛋白的表达,而这些因子水平的提高又会调控 MSCs 增殖并向成骨细胞分化,为最终形成新骨储备细胞基础。

TGF- $\beta$  是一种多肽转化生长因子,可由多种细胞合成,在骨组织中含丰富,其对成骨细胞的作用有多种效应。一般认为,通过其自身以及与其它信号分子的相互作用,TGF- $\beta$  在早期主要是促进细胞增殖;而到了晚期,其主要是促进成骨细胞的分化,刺激细胞外基质分子的合成和骨再生。

Smad 分子是 TGF- $\beta$  超家族信号分子在细胞内信号转导的始动因子,在将 TGF- $\beta$ 、BMP 信号从细胞表面膜受体传导至细胞核的过程中起到关键性作用,而且不同的 Smad 介导不同的 TGF- $\beta$  家族成员的信号转导。Smad 家族至少包括 9 种 Smad 蛋白。根据功能,Smad 蛋白分为受体活化性(R-Smad),共同通路型(Co-Smad)和抑制性(I-Smad)3 个亚家族。R-Smad 又分为两类:由 TGF- $\beta$  激活的 Smad2、Smad3;由 BMP 激活的 Smad1、Smad5、Smad8。Co-Smad 中的 Smad4 是 TGF- $\beta$  超家族各类信号转导过程中共同需要的介质<sup>[3,7]</sup>。可以认为 Smad4 是 TGF- $\beta$  超家族信号传导的中心分子,决定着 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在细胞中的传导。因此如果对以 Smad4 为代表的 Smad 信号关键分子进行干预和调控,能够影响 TGF- $\beta$  超家族分子信号传导,进而影响受体间充质干细胞骨向分化的状况<sup>[8]</sup>,可以预见将来也许能通过一些措施干预 TGF- $\beta$ /Smad 通路来提高骨缝或颌骨的牵张成骨效果。

(下转 709 页)

为 CAFs<sup>[8]</sup>,提示该类细胞因子可能是诱导成纤维细胞发生平滑肌转分化的重要因素。对口腔癌的研究中也发现:癌上皮细胞正是通过分泌 TGF- $\beta$ 1 细胞因子来促使其周围的 NFs 转分化为 CAFs<sup>[9]</sup>。课题组前期实验已证实,TGF- $\beta$ 1 浓度为 10  $\mu$ g/L 时对 CAFs 的诱导分化能力最明显,因此在本实验采用 10  $\mu$ g/L 的 TGF- $\beta$ 1 细胞因子进行刺激。结果显示,CAFs 细胞与 NFs 细胞相比,具有较强迁移能力,而一定浓度 TGF- $\beta$ 1 可明显增强 CAFs 的迁移能力。作者推测在肿瘤微环境内,癌上皮细胞和 CAFs 细胞间存在局部反馈的旁分泌系统,TGF- $\beta$ 1 细胞因子在两者间起着关键的桥梁作用。一方面某些致癌因素可促进上皮细胞分泌 TGF- $\beta$ 1 来诱导间质中正常成纤维细胞发生平滑肌的转化,转变为 CAFs;另一方面,发生转分化的 CAFs 细胞自身也具备了分泌 TGF- $\beta$ 1 能力,从而促进自身向远处转移,使其更能方便地反作用于上皮细胞,从而促使上皮细胞恶变。

综上所述,TGF- $\beta$ 1 不仅具有诱导正常成纤维细胞转分化为 CAFs 的能力,同样具有促进 CAFs 迁移的能力,这一结果为进一步研究 TGF- $\beta$ 1 调控 CAFs 的生成奠定了基础,并为通过干预 TGF- $\beta$ 1 的表达影响 CAFs 的生物学特性,从而干预肿瘤的发生提供了实验依据。

#### 参考文献

- [1] 徐冬贵,陈仲伟.口腔颌面部恶性肿瘤微转移的研究进展[J].口腔医学研究,2012,28(4):385-387
- [2] Hui P, Shintaniy S, Kim Y, et al. Loss of p12CDK2-AP1

Expression in human oral squamous cell carcinoma with disrupted transforming growth factor- $\beta$ -Smad signaling pathway [J]. Neoplasia, 2006, 8: 1028-1036

- [3] Dunkern TR, Feurstein D, Rossi GA, et al. Inhibition of TGF- $\beta$  induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 572(1): 12-22
- [4] Meng WX, Xia QJ, Wu LY, et al. Downregulation of TGF- $\beta$  receptor types II and III in oral squamous cell carcinoma and oral carcinoma-associated fibroblasts [J]. BMC cancer, 2011, 11: 88
- [5] Liu Y, Hu T, Shen J, et al. Separation, cultivation and biological characteristics of oral carcinoma-associated fibroblasts [J]. Oral Dis, 2006, 12: 375-380
- [6] Mollevi DG, Aytes A, Berdiel M, et al. PRL-3 overexpression in epithelial cells is induced by surrounding stromal fibroblasts [J]. Molecular Cancer, 2009, 8: 46
- [7] Franco OE, Jiang M, Strand DW, et al. Altered TGF- $\beta$  signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis [J]. Cancer Res, 2011, 71: 1272-1281
- [8] Gordon KJ, Mei D, Chislock EM, et al. Loss of type III transforming growth factor b receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression [J]. Carcinogenesis, 2008, 29: 252-262
- [9] Picard O, Rolland Y, Poupon MF. Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice: implication for implantation of metastases [J]. Cancer Res, 1986, 46(7): 3290-3294

[收稿日期:2013-01-14]

(本文编辑 李四群)

(上接 706 页)

#### 参考文献

- [1] Mao JJ. Mechanobiology of craniofacial sutures [J]. J Dent Res, 2002, 81(): 810-816
- [2] Qi MC, Hu J, Zou SJ, et al. Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells [J]. Int Oral Maxillofac Surg, 2008, 37(): 453-458
- [3] Kloos DU, Choi C, Wingender E. The TGF- $\beta$ -Smad network; introducing bioinformatic tools [J]. Trends Genet, 2002, 18(): 96-103
- [4] 韩立赤,胡静,戚孟春,等.大鼠骨髓 MSCs 体外分离培养及多向分化的实验研究[J].口腔医学研究,2004,20(2):142-145
- [5] Ai-Aql Zs, Alagl As, Graves DT, et al. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and

distracted osteogenesis [J]. J Dent Res, 2008, 87(): 107-118

- [6] Costessi A, Pines A, D'Andrea P, et al. Extracellular nucleotides activate Runx2 in the osteoblast-like HOBIT cell line: a possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response [J]. Bone, 2005, 36(3): 418-432
- [7] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF- $\beta$  superfamily [J]. Science, 2002, 296(): 1646-1647
- [8] Itoh F, Asao H, Sugamura K, et al. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads [J]. Eur Mol Biol Org J, 2001, 20(): 4132-4142

[收稿日期:2013-01-14]

(本文编辑 李四群)