

· 专题报道 ·

三种抗纤维化细胞因子对 HepG2 细胞转化生长因子-β₁ 基因启动子转录活性的影响

侯丽娜, 高春芳*, 赵云鹏, 孙小娟, 陈建栋, 江筱炯
(第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科, 上海 200438)

[摘要] **目的:**观察抗纤维化细胞因子白介素 10(IL-10)、肝细胞生长因子(HGF)和干扰素 γ(IFN-γ)对含不同-509C>T 基因型的转化生长因子 β₁(TGF-β₁)基因上游启动子转录活性的影响,探讨细胞因子可能的抗纤维化机制。**方法:**以 TGF-β₁基因上游 5'侧翼区启动子(-1328 ~ +812)含有一509C>T 位点的片段作为靶序列,将其与氯霉素乙酰基转移酶(CAT)报告基因组成重组体 pHGF2.14C、pHGF2.14T,脂质体法转染至人肝癌细胞系 HepG2,应用 IL-10(4 ng/ml)、HGF(10 ng/ml)和 IFN-γ(20 ng/ml)作用于转染后 HepG2 细胞,ELISA 法测定报告基因的表达。**结果:**转染 pHGF2.14C 的 HepG2 细胞报告基因活性明显高于转染 pHGF2.14T 者(P<0.01)。IFN-γ 对转染 pHGF2.14C、pHGF2.14T 的 HepG2 细胞 TGF-β₁启动子转录活性均具有明显的抑制作用(P<0.05),HGF 对转染 pHGF2.14C HepG2 细胞的 TGF-β₁启动子转录活性具有促进作用(P<0.05),IL-10 对两种情况下 HepG2 细胞 TGF-β₁启动子转录活性调控作用均不显著。**结论:**C 等位基因可明显增强 TGF-β₁基因启动子转录活性;IFN-γ 可能通过抑制 TGF-β₁基因启动子转录活性抑制肝纤维化,而 HGF、IL-10 的抗纤维化作用可能与此途径无关。

[关键词] 多态性,单核苷酸;白介素 10;肝细胞生长因子;干扰素 γ;转化生长因子 β;转录,遗传;肝硬化

[中图分类号] R 575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1292-04

Regulatory effects of 3 kinds of antifibrotic cytokines on activity of transforming growth factor-β₁ gene promoter

HOU Li-na, GAO Chun-fang*, ZHAO Yun-peng, SUN Xiao-juan, CHEN Jian-dong, JIANG Xiao-jiong (Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] **Objective:**To study the regulatory effects of antifibrotic cytokines, interleukin 10 (IL-10), hepatocyte growth factor (HGF), and interferon-gamma (IFN-γ) on activity of transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) gene promoter, so as to assess the antifibrotic mechanism of cytokines. **Methods:** Sequence -1328+812 of TGF-β₁ gene, which contains the -509 C>T polymorphism, was selected as putative promoter. The recombinant constructions containing -1328+812 of TGF-β₁ gene and CAT reporter gene (pHGF2.14T, pHGF2.14C) were constructed and transfected into HepG2 cells with liposomal transfection method, then the transfected HepG2 cells were treated with IL-10(4 ng/ml), HGF(10 ng/ml) or IFN-γ(20 ng/ml). Reporter gene activity was analyzed by ELISA. **Results:** Reporter gene activity in cells transfected with pHGF2.14C was significantly higher than those transfected with pHGF2.14T (P<0.01). IFN-γ significantly inhibited the reporter gene activity in HepG2 cells transfected with pHGF2.14C or pHGF2.14T(P<0.05); HGF significantly increased the reporter gene activity in cells transfected with pHGF2.14C (P<0.05). IL-10 had no effects on the activities of cells transfected with pHGF2.14C or pHGF2.14T. **Conclusion:** C allele at -509 can increase the promoter activity of TGF-β₁ gene in HepG2 cells. The antifibrotic effect of IFN-γ might be related to its inhibitory effect on the putative promoter activity of TGF-β₁ gene; the antifibrotic effects of HGF and IL-10 may not be through regulation of TGF-beta₁ gene transcription.

[KEY WORDS] polymorphism, single nucleotide; interleukin-10; hepatocyte growth factor; interferon-gamma; transforming growth factor beta; transcription, genetic; liver cirrhosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1292-1295]

肝纤维化是多种病因共同激活肝星状细胞(HSC)、产生大量细胞外基质(ECM),ECM 过度沉积而形成的。在众多的致纤维化因素中,转化生长因子-β₁(transforming growth factor-β₁, TGF-β₁)是明确的强效致纤维化因子,具有广泛生物学效应,对 ECM 相关基因表达、基质降解、细胞分化、细胞凋亡及免疫调节等都具有重要作用^[1]。目前在 TGF-β₁

基因已发现至少存在 8 个单核苷酸多态性(SNP)位点^[2]。这些多态性位点与肝脏纤维化疾病发生、发展的相关性成为目前研究的热点。我们在前期的临

[基金项目] 国家自然科学基金(30270605)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30270605)。

[作者简介] 侯丽娜,硕士。

* Corresponding author. E-mail: gaocf1115@yahoo.com

床研究发现^[3-4], 慢性肝病肝硬化患者 TGF- β_1 基因 SNP 与疾病进程有关, 并对 TGF- β_1 基因启动序列进行了系列研究。

本研究在上述研究的基础上, 观察 3 种具有抗纤维化作用的细胞因子, 即白介素 10(IL-10)、肝细胞生长因子(HGF)和干扰素 γ (IFN- γ)对包含 -509C>T 位点基因多态性的 TGF- β_1 基因上游启动子转录调控活性的影响, 为进一步在转录水平探讨这些细胞因子的抗纤维化作用机制奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 HepG2 细胞购自中国科学院细胞库, 由本实验室传代培养。培养基为含体积分数 10% 小牛血清(杭州四季青)的 DMEM 高糖培养基(吉诺生物医药), 0.25% 胰蛋白酶消化传代(博光科技)。

1.2 MTT 法筛选细胞因子作用浓度 选取细胞因子 IL-10(0, 0.04, 0.4, 4, 40 ng/ml)、HGF(0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml)、IFN- γ (0, 0.2, 2, 20, 200 ng/ml) 作用于 HepG2 细胞, 24 h 后观察各浓度细胞因子对 HepG2 细胞的作用效应, 从而为后期转染实验选取合适的作用浓度。HepG2 细胞消化制成细胞悬液, 以 5×10^4 /孔的细胞密度接种于 96 孔板。细胞密度达到 90% 时, 更换含 0.25% 小牛血清的 DMEM 培养基, 静息 8 h; 分别加上述浓度细胞因子(IL-10、HGF、IFN- γ)作用, 每组 3 个复孔; 24 h 后每孔加 5 mg/ml MTT 10 μ l, 继续培养 4 h, 终止反应, 吸弃培养基, 每孔加入 100 μ l 二甲亚砜(DMSO), 振荡 10 min, 波长为 490 nm 条件下, 读取 D 值。上述实验重复 3 次, 根据结果选择后续实验中细胞因子浓度。

1.3 构建重组质粒 载体质粒 pCAT-Enhancer Vector(Promega)不含启动子, 但含有 SV40 增强子和氯霉素乙酰基转移酶(CAT)报告基因。以特定 -509 C>T 基因型患者 DNA 为模板, 用 PCR 方法扩增得到一对长度为 2.14 kb 含有 -509 C>T 的 TGF- β_1 上游基因片段, 相应于 TGF- β_1 基因上游 -1328~+812 序列。其上游引物为: 5'-GAT TCG ACG CGT AGA TCA CTT TGG CTG CTG T-3'; 下游引物为: 5'-TAG ACC AAG CTT GAG CGC GAA CAG GGC-3'。两端引物分别含 6 个保护碱基和限制性内切酶 *Mlu* I、*Hind* III 识别位点(下划线部分), 引物由上海基康生物技术公司合成。扩增产物经割胶小量柱纯化(华舜生物公司试剂盒)回收

后, 用限制性内切酶 *Mlu* I、*Hind* III 酶切, 与具有相同粘末端的线性 pCAT3-Enhancer Vector 经 *T*₄ DNA 连接酶(Promega)连接。构建两种重组体, 分别为 pHGF2.14C、pHGF2.14T, 连接混合物转化至感受态大肠杆菌 JM109, 筛选并经小量酶切鉴定, 测序(上海基康生物技术公司)鉴定正确后, 大量扩增阳性克隆, 抽提、纯化重组质粒(plasmid midi kit, Qiagen), 紫外分光光度计测得率、纯度。

1.4 DNA 转染及细胞因子作用 转染采用脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen)。操作按照试剂说明进行, 具体操作如下: HepG2 细胞以 10^5 /孔接种于 12 孔培养板, 待细胞 60%~80% 融合时, 换无血清培养基(Invitrogen), DNA 与 Lipofectamine 2000 reagent 以 1:2.5 的比例混合, 将混合物按每孔含重组质粒 1 μ g 加入上述细胞培养孔中, 继续培养; 同时转染 β -半乳糖苷酶表达质粒(pSV β -gal)1 μ g 作为内对照及含 CAT 的表达质粒 pCAT6.2(Promega)作阳性对照。6 h 后换含体积分数为 0.25% 小牛血清的培养基静息 8 h 后, 加质量浓度分别为 4、10、20 ng/ml 的 3 种细胞因子 IL-10、HGF、IFN- γ 干预(浓度选择参考 1.2 项下 MTT 增殖试验结果), 培养过夜。细胞因子作用 24 h 后终止培养, 留取细胞裂解液测定报告基因活性。上述实验采用 3 个复孔并重复 3 次。

1.5 CAT、 β -gal 活性测定及蛋白定量 终止培养的细胞用预冷的 PBS 洗 3 次, 以裂解缓冲液(Roche)裂解细胞后, 取细胞裂解液进行蛋白定量、 β -gal 活性测定(酶活性测定试剂盒, Promega)及 CAT 表达量测定(CAT-ELISA, Roche)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件对研究数据进行统计分析, 所有测得的 D_{490} 值及 CAT 值均采用 *t* 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 鉴定重组质粒 构建的 pHGF2.14C 和 pHGF2.14T 经酶切后电泳鉴定(图 1)。载体为 4.3 kb 的 pCAT3-enhancer, 插入的启动子长度为 2.14 kb, 经测序证实插入序列正确。

2.2 细胞因子对 HepG2 细胞增殖活性的影响 与空白组相比, IL-10(4 ng/ml)组 HepG2 细胞增殖活性显著降低, HGF(10 ng/ml)组显著升高, IFN- γ (20 ng/ml, 200 ng/ml)组显著降低($P < 0.01$) (图 2)。所以选取细胞因子 IL-10 浓度为 4 ng/ml、HGF 浓度为 10 ng/ml、IFN- γ 浓度为 20 ng/ml 进行下一步的转染实验。

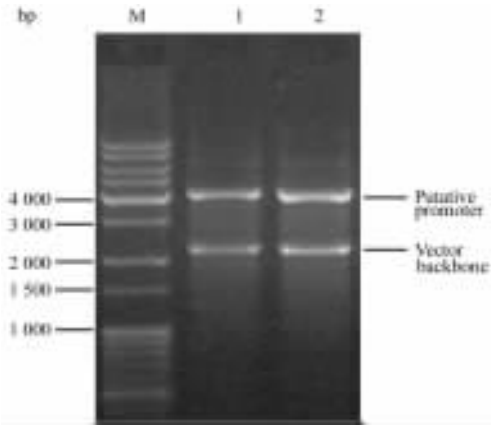


图 1 重组质粒酶切后电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of recombinant constructions containing putative promoters and -509C>T variants from TGF-β₁ gene after restriction enzyme digestion

M; Marker; 1; pHTGF2. 14T; 2; pHTGF2. 14C

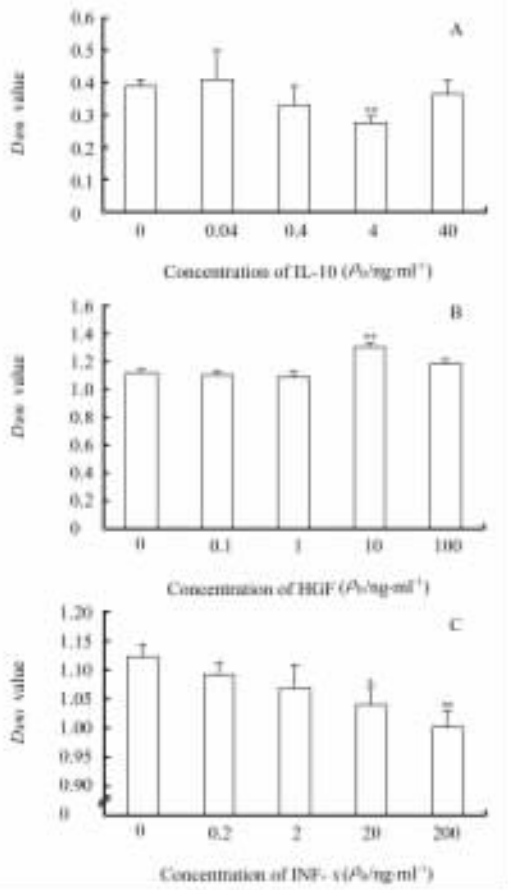


图 2 IL-10(A)、HGF(B)、INF-γ(C)

作用后 HepG2 细胞增殖活性 MTT 法测定结果

Fig 2 MTT results of HepG2 cell proliferation after IL-10(A), HGF(B), and INF-γ(C) treatment

* P<0.05, ** P<0.01 vs 0 ng/ml group; n=9, x̄±s

2.3 转染重组体的细胞报告基因表达水平测定结果 ELISA 测定细胞 CAT 表达量,同时测定细胞

裂解液蛋白浓度。CAT 测定结果用相应蛋白含量及 β-gal 活性校正以保证在相同的细胞量及转染效率前提下比较报告基因活性。结果(图 3)表明:未加细胞因子干预,转染重组体 pHTGF2. 14C 的 HepG2 细胞 CAT 活性明显高于转染重组体 pHTGF2. 14T 的 HepG2 细胞(P<0.01)。

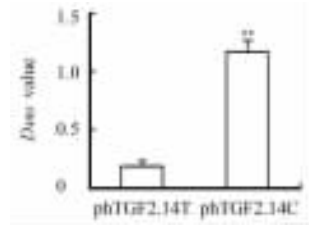


图 3 转染 pHTGF2. 14C、pHTGF2. 14T 后 HepG2 细胞 CAT 活性结果

Fig 3 CAT activities in HepG2 cells after transfection with pHTGF2. 14C and pHTGF2. 14T

** P<0.01 vs pHTGF 2. 14T; n=9, x̄±s

2.4 细胞因子对 TGF-β₁ 启动子转录活性的影响 CAT测定结果用相应蛋白含量及 β-gal 活性进行校正。结果(图 4)显示: IFN-γ 对转染 pHTGF2.14C、pHTGF2. 14T 的 HepG2 细胞 TGF-β₁启动子转录活性均具有明显的抑制作用(P<0.05); HGF 对转染 pHTGF2. 14C HepG2 细胞的 TGF-β₁启动子转录活性具有促进作用(P<0.05); IL-10 对两种情况下 HepG2 细胞 TGF-β₁启动子转录活性调控作用均不显著。

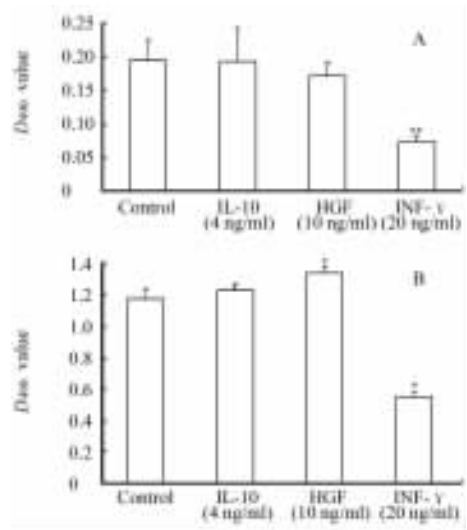


图 4 细胞因子对转染 pHTGF2. 14C(A)、pHTGF2. 14T(B)后 HepG2 细胞 CAT 表达量的影响

Fig 4 Influence of cytokines on CAT expression in HepG2 cells transfected with pHTGF2. 14C(A) and pHTGF2. 14T(B)

* P<0.05, ** P<0.01 vs control group; x̄±s, n=9

3 讨论

国内外已有部分血清学-组织学的对照研究证实,外周血 TGF- β_1 水平检测可反映慢性肝纤维化中组织炎症坏死及纤维化程度,因而具有诊断意义^[5-7]。而 TGF- β_1 在肝纤维化形成过程中,其本身表达调控的相关分子的作用机制引起研究者的特别关注。TGF- β_1 的生物合成受多种因素的影响,这些影响因子分别在转录水平和翻译后水平发挥作用^[8]。本研究选取 3 种明确具有抗纤维化作用的细胞因子 IL-10、HGF、IFN- γ , 作用于 TGF- β_1 的上游调控序列,深入探讨细胞因子对 TGF- β_1 表达调控影响的分子机制,这对于 TGF- β_1 相关性疾病的预防和治疗具有重要指导意义。

SNP 是最近发现的第 3 代遗传标志,个体基因组 DNA 中的少数甚至个别碱基多态性,可导致特定基因疾病状态下的特征性改变。SNP 对于研究基因多态性以及识别、定位疾病位点、分析多基因疾病的主基因及个体对药物的不同反应性差异、个体化用药等均具有重要价值^[3]。目前已明确人 TGF- β_1 基因在染色体的定位是 19q13, 存在至少 8 个 SNPs 位点,它们分别是 -988C>A、-800G>A、-509C>T、+72 插入 C、第 4 个内含子缺失 C、condon10T>C、condon25G>C、condon263C>T^[2]。若 TGF- β_1 基因序列 SNP 存在一定规律,特定 SNP 基因型则可通过影响该基因启动转录活性或对多种调节因子的反应性差异,改变 TGF- β_1 基因的转录活性,成为一种影响疾病转归和疗效的遗传因素。通过前期研究^[3-4] 发现:在中国人群中不存在 -988(C>A)、-800(G>A)、condon 25 (Arg>Pro)、condon 263 (Thr>Ile) 的变异,仅存在 -509C>T、condon10 (Leu>Pro) 的变异。连锁不平衡分析进一步提示,-509C>T 和 condon10T>C 之间存在连锁不平衡;而 -509C>T 多态性与血浆中的 TGF- β_1 浓度有明显的相关性,且与肝纤维化的进度呈正相关。

本研究以人 TGF- β_1 基因上游 5' 侧翼区 (-1328 ~ +812) 片段作为启动子并与报告基因载体组成重组体后,在经过细胞增殖实验选取合适作用浓度后,将重组体转染 HepG2 细胞,用 IL-10、HGF、IFN- γ 对其进行干预,通过检测报告基因活性探讨细胞因子对 TGF- β_1 启动序列的启动活性的影响,同时比较重组体 pH-TGF2.14C 与 pH-TGF2.14T 对报告基因活性的影响。结果表明:细胞因子 IFN- γ 对 TGF- β_1 启动活性具有显著的抑制作用,表明在 TGF- β_1 的 5'

侧翼区 (-1328 ~ +812) 片段中可能存在 IFN- γ 作用反应元件,且 -509C>T 不影响 IFN- γ 作用反应元件的作用,为进一步明确 IFN- γ 抗纤维化机制提供了有益的依据。细胞因子 IL-10 在 2.14 kb (-1328 ~ +812) 区域内对 TGF- β_1 基因上游启动调控序列的作用不显著。本实验还发现 HGF 具有促进 TGF- β_1 基因 -1328 ~ +812 上游启动调控的作用。这提示 IL-10 及 HGF 的抗纤维化作用反应元件可能不在我们选取的这一段调控序列中或通过其他途径发挥作用。-509 位点基因型 C 表达 TGF- β_1 的活性明显高于基因型 T,表明 C 等位基因可明显增强 TGF- β_1 基因上游调控序列的转录活性,与我们前期的临床研究发现 -509C 等位基因频率与肝纤维化的进展有关相一致(另文发表)。这提示 -509C>T 可影响 TGF- β_1 基因上游的基础调控转录活性。

本研究有助于我们进一步深入认识抗纤维化细胞因子的作用机制以及 TGF- β_1 基因中特定位点基因多态性对 TGF- β_1 转录调控影响,从而有利于理解 TGF- β_1 基因多态性与疾病的相关性,为阐明纤维化的形成机制及逆转治疗提供新思路。

[参考文献]

- [1] Mauviel A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 117: 69-80.
- [2] Shah R, Hurley C K, Posch P E. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF-beta1 expression due to the common SNP -509C-T (c. -1347C > T) [J]. *Hum Genet*, 2006, 120: 461-469.
- [3] Su Z G, Wen F Q, Feng Y L, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms associated with chronic obstructive pulmonary disease in Chinese population [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26: 714-720.
- [4] Wang H, Mengsteab S, Tag C G, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 1929-1936.
- [5] Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, et al. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2345-2349.
- [6] Braley-Mullen H, Chen K, Wei Y, et al. Role of TGF beta in development of spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD. H-2h4 mice [J]. *J Immunol*, 2001, 167: 7111-7118.
- [7] Ray S, Broor S L, Vaishnav Y, et al. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: *in vivo* and *in vitro* findings [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18: 393-403.
- [8] Shah R, Rahaman B, Hurley C K, et al. Allelic diversity in the TGF beta 1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms [J]. *Hum Genet*, 2006, 119(1-2): 61-74.

[收稿日期] 2007-09-18

[修回日期] 2007-11-12

[本文编辑] 贾泽军