

曲古抑菌素 A 抑制 TGF- β_1 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞活化的作用

李晓艳¹, 邓颖², 裴澄¹

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81470614);陕西省教育厅专项科研项目(No. 2013JK0785)

作者单位:¹(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学第一附属医院眼科;²(710077)中国陕西省西安市,西安医学院第一附属医院眼科

作者简介:李晓艳,在职硕士研究生,主治医师,研究方向:青光眼、小儿斜视与弱视。

通讯作者:裴澄,博士,副主任医师,研究方向:白内障的预防与临床研究. peich71@163.com

收稿日期:2015-06-19 修回日期:2015-09-14

Inhibition effect of trichostatin A on human Tenon fibroblasts activation induced by transforming growth factor - β_1

Xiao-Yan Li¹, Ying Deng², Cheng Pei¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81470614); Special Research Plan Project of Education Department of Shaanxi Province (No. 2013JK0785)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Cheng Pei. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. peich71@163.com

Received:2015-06-19 Accepted:2015-09-14

Abstract

• AIM: To investigate the effect of histone deacetylase inhibitor (HDACi) trichostatin A (TSA) on synthesis of collagen I and proliferation of human Tenon fibroblasts (HTFs) induced by transforming growth factor - β_1 (TGF- β_1).

• METHODS: Firstly, the effect of TSA at different concentrations (200, 400, 600 and 800nmol/L) on HTFs viability after 24h was detected using MTT proliferation assays. Then, the effect of TSA at 400nmol/L and 600nmol/L mixed with 5ng/mL TGF- β_1 on HTFs viability after 24h were investigated using MTT proliferation assays. Furthermore, the mRNA and protein expression of collagen I in HTFs after treatment with TSA at different concentrations (400, 600nmol/L) mixed with 5ng/mL TGF- β_1 as well as 600nmol/L TSA were detected by RT-PCR and Western-blot.

• RESULTS: Compared with control group, the results of

MTT showed that HTFs viability decreased significantly after treated with TSA at 400, 600 and 800nmol/L ($P < 0.05$). The HTFs proliferation induced by TGF- β_1 could be attenuated by TSA at 400 and 600nmol/L ($P < 0.05$). The results of RT-PCR and Western-blot confirmed that TSA at 400 and 600nmol/L had reversal effect on up-regulated gene transcription and protein expression levels of collagen I induced TGF- β_1 .

• CONCLUSION: TSA can inhibit the HTFs proliferation induced by TGF- β_1 and attenuate gene transcription and protein expression of collagen I.

• KEYWORDS: trichostatin A; fibroblast; transforming growth factor - β_1

Citation: Li XY, Deng Y, Pei C. Inhibition effect of trichostatin A on human Tenon fibroblasts activation induced by transforming growth factor - β_1 . *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(10): 1691-1694

摘要

目的:探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA)对 TGF- β_1 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞(human Tenon fibroblasts, HTFs)增殖及 I 型胶原纤维合成的影响。

方法:首先,将不同浓度(200、400、600、800nmol/L) TSA 作用 HTFs 共 24h 后,MTT 法检测其对细胞活力的影响;然后,不同浓度(400、600nmol/L) TSA 与 5ng/mL TGF- β_1 混合作用于 HTFs 共 24h,MTT 法检测其对细胞活力的影响;最后,RT-PCR 和 Western-blot 法分别检测不同浓度(400、600nmol/L) TSA 与 5ng/mL TGF- β_1 混合以及 600nmol/L TSA 对 HTFs I 型胶原纤维的 mRNA 及蛋白表达的影响。

结果:MTT 证实,与对照组相比,400nmol/L 及以上浓度 TSA 作用组,HTFs 活力显著下降($P < 0.05$);两种浓度(400、600nmol/L) TSA 均可减弱 TGF- β_1 促 HTFs 增殖的作用($P < 0.05$);RT-PCR 和 Western-blot 证实两种浓度(400、600nmol/L) TSA 对 TGF- β_1 诱导上调的 I 型胶原纤维在基因转录及蛋白表达水平有逆转作用。

结论:TSA 能够抑制 TGF- β_1 诱导的 HTFs 增殖,并减弱 I 型胶原纤维基因转录及蛋白表达水平。

关键词:曲古抑菌素 A;成纤维细胞;转化生长因子- β_1
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.10.04

引用:李晓艳,邓颖,裴澄.曲古抑菌素 A 抑制 TGF- β_1 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞活化的作用. *国际眼科杂志* 2015;15(10): 1691-1694

0 引言

青光眼滤过术 (glaucoma filtering surgery, GFS) 后滤过道人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon fibroblasts, HTFs) 过度活化、增殖, 促纤维化因子及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 大量分泌合成, 导致滤过道瘢痕形成, 成为手术失败的主要原因^[1]。转化生长因子- β (transforming growth factors β , TGF- β) 是诱导 HTFs 活化的重要因子, 通过与其受体结合, 促进胶原纤维表达、ECM 合成^[2-3]。研究发现, 曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 具有抑制兔角膜成纤维细胞合成和分泌 ECM 作用, 能够减轻角膜屈光术后瘢痕形成^[4]。本研究旨在探讨 TSA 对 TGF- β_1 诱导 HTFs 增殖能力的影响, 及其对 HTFs 活化后 I 型胶原纤维基因转录及蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 TSA 和 MTT (Sigma, 美国), DMEM 高糖培养基 (Gibco, 美国), TGF- β_1 (PeproTech, 美国), I 型胶原鼠抗人单克隆抗体 (博士德, 中国), 鼠抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz, 美国), BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo, 美国), ECL 检测试剂盒 (博士德, 中国), RT-PCR 试剂盒 (TaKara), 酶标光度仪和 PCR 仪 (伯乐, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取行 GFS 术患者术中 Tenon 囊组织 (4mm \times 6mm \times 1mm), 置于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中培养、传代, 倒置相差显微镜观察 HTFs 形态, 并选取 3~6 代细胞进行实验^[5-6]。

1.2.2 MTT 法检测不同浓度 TSA 对 HTFs 活力的影响 调整细胞浓度至 3×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 置于含 10% FBS 的 DMEM 中培养 24h, 去培养液, 再用 0.5% FBS 的 DMEM 培养 24h, 设置对照组及不同浓度 (200、400、600、800nmol/L) TSA 组, 培养 24h 后, 每孔加入 MTT 20 μ L, 继续培养 4h, 弃原培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 15min 后用酶标仪检测各孔在 490nm 处吸光度 A 值, 观察 TSA 对 HTFs 作用, 筛选最佳作用浓度范围, 以不同浓度 TSA 组相对于对照组的变化倍数作图。

1.2.3 MTT 法检测 TSA 对 TGF- β_1 促 HTFs 增殖能力的影响 调整细胞浓度至 3×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 置于含 10% FBS 的 DMEM 中培养 24h, 去培养液, 再用 0.5% FBS 的 DMEM 培养 24h, 设置对照组及 400nmol/L TSA+5ng/mL TGF- β_1 、600nmol/L TSA+5ng/mL TGF- β_1 、5ng/mL TGF- β_1 实验组, 培养 24h 后, 每孔加入 MTT 20 μ L, 继续培养 4h, 弃原培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 15min 后用酶标仪检测各孔在 490nm 处吸光度 A 值, 以不同实验组相对于对照组的变化倍数作图。

1.2.4 RT-PCR 检测 TSA 对 TGF- β_1 诱导 HTFs 活化后 I 型胶原纤维 mRNA 表达的影响 设置对照组及 600nmol/L TSA、5ng/mL TGF- β_1 、400nmol/L TSA+5ng/mL TGF- β_1 、600nmol/L TSA+5ng/mL TGF- β_1 实验组, 选取 3~6 代细胞, 各组作用 24h 后收集 HTFs, 提取细胞总 RNA, 逆转录后行 RT-PCR, GAPDH 为内参照。以实验组 I 型胶原纤维 mRNA 相对表达量相对于对照组的变化倍数作图。

1.2.5 Western-blot 方法检测 TSA 对 TGF- β_1 诱导 HTFs 活化后 I 型胶原纤维蛋白表达的影响 实验分组同 1.2.4, 收集作用 24h 后的 HTFs, 裂解细胞, 收集蛋白,

表 1 MTT 检查不同浓度 TSA 对 HTFs 活化的抑制作用 $\bar{x} \pm s$

组别	吸光度值	t	P
对照组	0.234 \pm 0.001	-	-
200nmol/L TSA 组	0.227 \pm 0.006	2.362	0.056
400nmol/L TSA 组	0.201 \pm 0.006	11.432	<0.001
600nmol/L TSA 组	0.185 \pm 0.005	21.218	<0.001
800nmol/L TSA 组	0.179 \pm 0.004	24.249	<0.001

注: t 值和 P 值是 TSA 组与对照组对比得出。

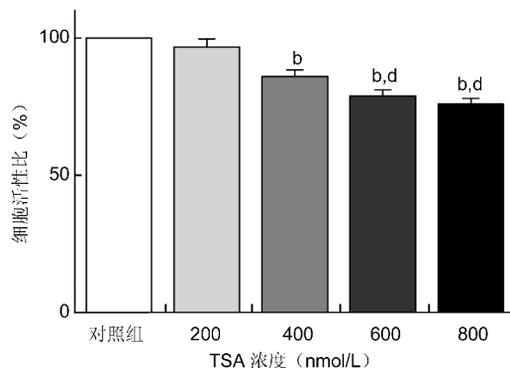


图 1 MTT 法检测不同浓度 TSA 对 HTFs 活力的影响 ^bP<0.01 vs 对照组; ^dP<0.01 vs 400nmol/L TSA 组。

BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度, 上样后行凝胶电泳, 转膜, 加入 I 型胶原鼠抗人单克隆抗体 (1:200)、 β -actin 抗体 (1:1000) 孵育过夜, 复温后清洗加入羊抗鼠 IgG (1:5000) 孵育 2h, ECL 显色, 曝光胶片, 分析条带光密度值, 以实验组条带光密度值与内参照 β -actin 光密度值变化倍数作图。

统计学分析: 应用 SPSS 17.0 及 Prism5 软件进行数据处理, 所有实验结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异性比较采用独立样本 t 检验和单因素方差分析, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TSA 抑制 HTFs 增殖 将不同浓度 (200、400、600、800nmol/L) TSA 分别加入 HTFs 中, 应用 MTT 法测定其吸光度 A 值, 并以对照组变化倍数作图。实验结果发现: 200nmol/L TSA 组与对照组比较无统计学差异 (P>0.05); 400nmol/L 及以上浓度实验组与对照组比较存在显著统计学差异 (P<0.01); 600nmol/L TSA 与 800nmol/L TSA 组间比较无明显统计学差异, 两组与 400nmol/L TSA 组比较存在显著统计学差异 (P<0.01)。HTFs 对 200nmol/L TSA 有良好耐受, 400nmol/L 及以上浓度 TSA 能够抑制 HTFs 增殖, 细胞活力明显下降, 并呈浓度依赖关系, 400nmol/L 可能是 TSA 起始作用浓度, 600nmol/L 可能是 TSA 最适作用浓度 (表 1, 图 1)。

2.2 TSA 对 TGF- β_1 促 HTFs 增殖能力的影响 应用 MTT 法比较 400nmol/L TSA+5ng/mL TGF- β_1 、600nmol/L TSA+5ng/mL TGF- β_1 、5ng/mL TGF- β_1 实验组作用于 HTFs 的吸光度值, 以各组与对照组的变化倍数作图。实验结果发现: 与对照组相比, 400nmol/L、600nmol/L TSA 对 TGF- β_1 促 HTFs 增殖有抑制作用, 有显著统计学差异 (P<0.01, 图 2), 且随药物作用浓度增加细胞活力逐渐下降。

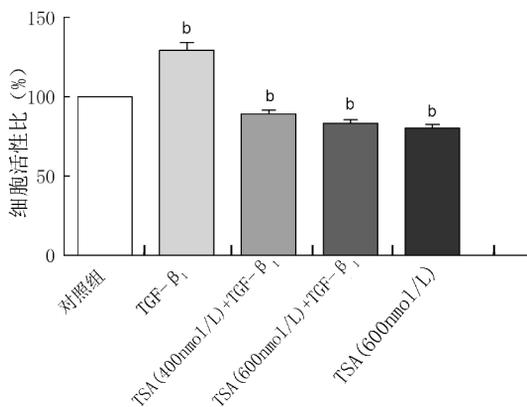


图2 MTT法检测400nmol/L和600nmol/L TSA对TGF-β₁促HTFs增殖的影响 ^bP<0.01 vs 对照组。

2.3 TSA对TGF-β₁诱导HTFs活化后I型胶原纤维mRNA表达的影响 RT-PCR结果显示5ng/mL TGF-β₁加入HTFs后,可上调I型胶原纤维mRNA表达。TGF-β₁促进I型胶原纤维基因表达的作用可被400nmol/L和600nmol/L TSA逆转,其作用后I型胶原纤维mRNA相对表达量与对照组相比差异有统计学意义(P<0.05,图3)。

2.4 TSA对TGF-β₁诱导HTFs活化后I型胶原纤维蛋白表达的影响 应用Western-blot法检测600nmol/L TSA,5ng/mL TGF-β₁,400nmol/L TSA+5ng/mL TGF-β₁和600nmol/L TSA+5ng/mL TGF-β₁各实验组对I型胶原纤维蛋白的表达。结果显示,不同浓度TSA可以抑制TGF-β₁诱导上调的I型胶原纤维蛋白(图4)。

3 讨论

青光眼滤过术是目前治疗青光眼主要的手术方法^[7],术后术区HTFs活化、增殖,大量细胞外基质及胶原合成,导致滤过道瘢痕形成、通道闭合,阻碍了房水外引流,是手术失败、眼压再次升高的主要原因^[8-9]。抗代谢药物丝裂霉素C(mitomycin C,MMC)作为滤过术后抑制成纤维细胞增殖、防止瘢痕形成的辅助用药,已被广泛应用于临床,但存在如伤口愈合不良、滤过泡渗漏等严重并发症。

生理状态下,组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase,HAT)与组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)共同调控组蛋白乙酰化水平处于平衡状态,从而实现对细胞周期控制、细胞增殖、凋亡、血管生成等多种基因的转录调控。研究发现,HDAC过度表达与多种组织和器官纤维化的发生和发展密切相关^[10],能促进成纤维细胞增殖并合成分泌大量ECM^[11],从而发挥促纤维化作用^[10]。以改变表观遗传为作用机制的HDAC抑制剂可以通过TGF-β₁/Smad途径抑制多种纤维化动物模型体内器官纤维化进展。HDAC抑制剂TSA,作用于I型HDAC^[12],可以特异性地抑制HDAC的活性,引起多种哺乳动物细胞乙酰化组蛋白聚集,对细胞增殖和凋亡起调控作用。Sharma等^[4]研究发现将TSA作用于体外培养的兔角膜成纤维细胞,结果表明TSA能够抑制角膜成纤维细胞合成。本研究中,我们将不同浓度(200、400、600、800nmol/L)TSA加入HTFs中,应用MTT法测定其吸光度值。实验证实,HTFs对200nmol/L TSA有良好的耐受,400nmol/L及以上浓度TSA能够抑制HTFs增殖,随药物浓度增加细胞活力逐渐下降,400nmol/L可能

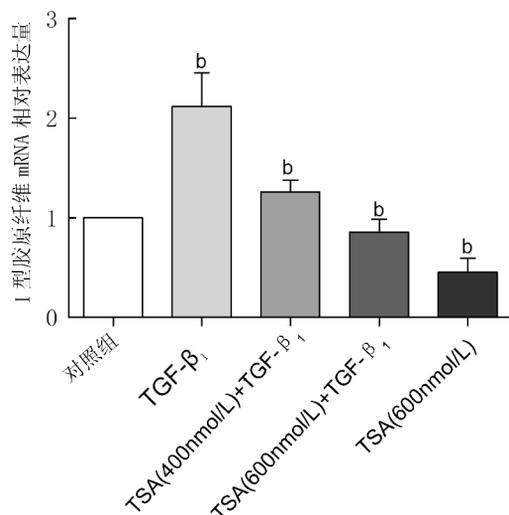


图3 RT-PCR检测I型胶原纤维mRNA表达 ^bP<0.01 vs 对照组。

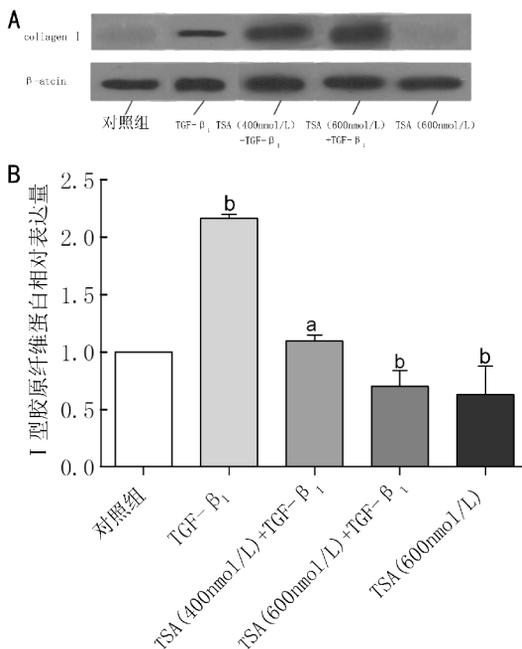


图4 Western-blot检测I型胶原纤维蛋白表达 A:以β-actin为内参照的Western-blot图;B:以目的蛋白/β-actin灰度值作半定量统计分析,显示TSA对TGF-β₁诱导I型胶原纤维蛋白合成有抑制作用(^aP<0.05,^bP<0.01 vs 对照组)。

是TSA起始作用浓度,600nmol/L可能是TSA最适作用浓度,并将此作为进一步实验选择干预药物浓度的依据。

转化生长因子-β是具有多种生物学功能的细胞因子,能够刺激创伤局部ECM产生、抑制ECM降解、促使ECM沉积;促进成纤维细胞增殖,刺激胶原纤维和纤维连接蛋白合成^[13],TGF-β₁是促进组织纤维化的重要生长因子。GFS术后血-房水屏障破坏使致包括TGF-β₁及其受体等的多种促成纤维细胞增殖、瘢痕形成的细胞因子过度表达。研究发现用TGF-β₁刺激HTF后,能促进HTF增生,同时诱导I型胶原纤维表达,促进HTF纤维化^[14]。TGF-β₁通过胞内信号分子Smads蛋白来转导信号,调控细胞胶原等效应基因的表达,从而抑制胶原的合成^[15]。本研究中我们选取400、600nmol/L TSA分别作用于TGF-β₁诱导活化的HTFs。MTT法检测TSA对TGF-β₁

促 HTFs 增殖能力的影响,RT-PCR 和 Western-blot 检测 TSA 对 TGF- β_1 诱导 HTFs 活化后 I 型胶原纤维 mRNA 及蛋白表达的影响。实验发现,不同浓度(400nmol/L、600nmol/L)TSA 对 TGF- β_1 促 HTFs 增殖有抑制作用,并且可以逆转 TGF- β_1 诱导 I 型胶原纤维基因转录及蛋白水平上调作用,其作用机制可能是通过 TGF- β /Smads 信号通路实现。

本实验从细胞分子水平研究 TSA 对于 HTFs 及 TGF- β_1 诱导 HTFs 增殖和 I 型胶原纤维合成的影响,进一步探讨 TSA 成为抑制 GFS 术后滤过道增殖的临床用药提供理论依据。

参考文献

- 1 Fan F, Li Y, Duan X, et al. Rosiglitazone attenuates activation of human Tenon's fibroblasts induced by transforming growth factor - β_1 . *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250(8):1213-1220
- 2 Corderio MF. Beyond mitomycin: TGF- β and wound healing. *Prog Reyn Eye Res* 2002;21(1):75-89
- 3 Werner S, Grose R, Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83(3):835-870
- 4 Sharma A, Mehan MM, Sinha S, et al. Trichostatin a inhibits corneal haze *in vitro* and *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2695-2701
- 5 景娇娜,张美莎,刘和忠.人 Tenon 囊成纤维细胞的体外培养及增殖能力研究. *国际眼科杂志* 2011;11(10):1710-1712
- 6 朱晓燕,李磊,鲜光军,等.人眼 Tenon 囊成纤维细胞体外培养及生长特性的比较. *局解手术学杂志* 2012;21(3):233-235

- 7 Foster A, Resnikoff S. The impact of vision 2020 on global blindness. *Eye* 2005;19(10):1133-1135
- 8 Chung EJ, Lee HK, Jung SA, et al. Transduction of pten proteins using the tat domain modulates TGF- β_1 -mediated signaling pathways and transdifferentiation in subconjunctival fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(1):379-386
- 9 Fuchshofer R, Kottler UB, Ohlmann AV, et al. SPARC is expressed in scars of the Tenon's capsule and mediates scarring properties of human Tenon's fibroblasts *in vitro*. *Mol Vis* 2011;17:177-185
- 10 Pang M, Zhuang S. Histone deacetylase: a potential therapeutic target for fibrotic disorders. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335(2):266-272
- 11 Diao JS, Xia WS, Yi CG, et al. Trichostatin A inhibits collagen synthesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2011;303(8):572-580
- 12 Hu E, Dul E, Sung CM, et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(2):720-728
- 13 Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal* 2013;25(1):264-268
- 14 盘如刚,陈晓明,李茅,等. TGF- β_1 对 Tenon 囊成纤维细胞增生和 HSP47 表达的影响. *眼科研究* 2007;12(25):933-936
- 15 Hoffmann A, Preobrazhenska O, Wodarczyk C, et al. Transforming growth factor- β activated kinase-1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2005;280(29):27271-27283