

IFN- γ 对奶牛乳腺上皮细胞转分化的影响

孙俊若男, 李海明, 苏韵, 屈利娜, 党涵, 杨磊* (湖南农业大学东方科技学院, 湖南长沙 410128)

摘要 [目的]用转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导奶牛乳腺上皮细胞-肌纤维母细胞转分化(EMT),以不同浓度的IFN- γ 为阻断剂,探讨干扰素- γ (IFN- γ)对奶牛乳腺上皮细胞(BMEC)表型重塑的作用。[方法]将原代培养的BMEC分为对照组、诱导组(TGF- β_1 10 ng/mL)、药物组(IFN- γ 20 ng/mL)及阻断组(TGF- β_1 10 ng/mL+IFN- γ 10、20、50、100 ng/mL)。培养72 h后,观察 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、结缔组织生长因子(CTGF)和胶原I(COL I α_1)的mRNA相对表达量。[结果]诱导组 α -SMA、CTGF和胶原I mRNA相对表达量显著增加($P < 0.05$);药物组CTGF的mRNA相对表达量与对照组相比无显著差异($P > 0.05$), α -SMA和COL I α_1 mRNA相对表达量显著下降($P < 0.05$);阻断组IFN- γ 明显抑制了TGF- β_1 诱导的转分化。[结论]IFN- γ 能够负性调控TGF- β_1 诱导的奶牛乳腺上皮细胞-肌纤维母细胞转分化(EMT),减少COL I α_1 分泌。

关键词 TGF- β_1 ; IFN- γ ; 奶牛乳腺上皮细胞; α -SMA; CTGF; 胶原 I

中图分类号 S823.9⁺1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)04-0099-03

Effects of Interferon- γ (IFN- γ) on the Transdifferentiation of Mammary Epithelial Cells in Dairy Cows

SUN Junruonan, LI Hai-ming, SU Yun, YANG Lei* et al (Orient Science & Technology College of Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract [Objective] Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) was used to induce the transdifferentiation of mammary epithelial cells-myofibroblast cells of dairy cows. Taking different concentrations of IFN- γ as blocking agent, the effects of interferon- γ (IFN- γ) on the phenotypic remodeling of mammary epithelial cells of dairy cows were discussed. [Method] The mammary gland epithelial cells of primary culture were divided into control group, induced group (TGF- β_1 10 ng/mL), drug administration group (IFN- γ 20 ng/mL) and blocking groups (TGF- β_1 10 ng/mL + IFN- γ 10, 20, 50, 100 ng/mL) and cultured for 72 hours. mRNA expressions of α -SMA, CTGF and collagen I α_1 were observed. [Result] mRNA relative expression quantity of α -SMA, CTGF and collagen I in induced group significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group, mRNA relative expression quantity of CTGF in drug administration group had no significant difference ($P > 0.05$), mRNA relative expression quantity of α -SMA and COL I α_1 significantly decreased ($P < 0.05$). IFN- γ obviously inhibited the transdifferentiation induced by TGF- β_1 in blocking group. [Conclusion] IFN- γ can negatively regulate EMT induced by TGF- β_1 , and reduce the secretion of COL I α_1 .

Key words TGF- β_1 ; IFN- γ ; Mammary epithelial cells of dairy cows; α -SMA; CTGF; Collagen I

IFN- γ 是一种Th1型细胞因子,是由抗原、有丝分裂素等刺激,由活化的CD4+Th1、CD8+T细胞及自然杀伤细胞所分泌的一类可溶性糖蛋白,主要在单核细胞源树突状细胞和外周血单核细胞等抗原提呈细胞中表达。IFN- γ 具有广泛的免疫调节作用,包括对巨噬细胞、NK细胞、B细胞的膜分子表达、活化和分化的影响。

近些年,在肝脏组织的纤维化研究中发现IFN- γ 能够抑制肝脏星状细胞(HSC)增殖,对抗ECM的合成,从而抑制肝脏纤维化^[1-3]。在特发性肺损伤(Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)的研究中发现,IFN- γ 能够通过多种机制发挥抗肺纤维化作用。TGF- β 的过量表达,是导致纤维化的主要诱因。在口腔黏膜瘢痕组织的研究中发现,IFN- γ 在低剂量时能够促进成纤维细胞增殖,在高剂量时主要起抑制作用。然而,关于在乳腺纤维化的进程中IFN- γ 的作用则鲜见报道。

细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的沉积、分解以及细胞凋亡等是组织器官发生纤维化的主要决定因素。ECM的合成与分泌主要由活化的成纤维细胞转化为肌纤维母细胞(Myofibroblast, MFB)完成,而 α -SMA是MFB的标志性抗

原^[4-6];CTGF是TGF- β_1 的重要下游因子,胶原蓄积是ECM沉积的重要表现。因此, α -SMA、CTGF及COL I α_1 mRNA的表达能够在一定程度上反映细胞发生转分化及IFN- γ 对转分化细胞表型重塑过程中起到的作用。笔者以TGF- β_1 为诱导剂,诱导奶牛乳腺上皮细胞-肌纤维母细胞转分化(EMT),以不同浓度的IFN- γ 为阻断剂,探讨干扰素- γ (IFN- γ)对奶牛乳腺上皮细胞(BMEC)表型重塑的作用,以期对奶牛乳腺组织重塑的机理研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 重组人TGF- β_1 和IFN- γ ,均购自Peprotech公司;SYBR Primescript real-time RT-PCR Kit、RNA iso plus、DNA Marker,购自TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养。奶牛乳腺上皮细胞由内蒙古农业大学病理学教研室提供,试验所用细胞为原代培养6~8代冻存细胞。复苏后待细胞长满培养瓶底壁80%时,用0.25%胰酶于37℃条件下消化4~8 min,以含10% FBS的培养液中止消化,重悬细胞液后进行细胞计数,按 5×10^5 个/mL的细胞浓度接种于6孔细胞培养板,待细胞长满底壁达90%融合时,加入含有0.1% FBS培养液处理24 h后,加入药物。

1.2.2 试验分组。试验分为空白对照组(无血清培养基)、诱导组(TGF- β_1 10 ng/mL)、药物组(IFN- γ 20 ng/mL)及阻断组(TGF- β_1 10 ng/mL+IFN- γ 10、20、50、100 ng/mL)。每组设3个重复,分别加药物处理72 h。

基金项目 湖南农业大学东方科技学院大学生科技创新项目(DFCXY201445)。

作者简介 孙俊若男(1993—),女,湖南怀化人,本科生,专业:动物医学。*通讯作者,讲师,博士,从事动物传染病及免疫病理研究。

收稿日期 2016-12-21

1.2.3 RT-PCR 方法检测 α -SMA、CTGF 和 COL1 α 1 mRNA 的相对表达量。根据 GenBank 数据库中 α -SMA、CTGF、COL1 α 1 和 β -actin 的序列,利用 Primer 5.0 软件设计引物(表 1),由上海生工生物工程技术有限公司合成,用反转录试剂中的 EASY Dilution 对 cDNA(500 ng/ μ L)进行 10 倍稀释,做 8 个稀释倍数,然后将分别以各稀释倍数的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 检测,反应体系为:SYBR Primer EX Taq™ II (2 \times) 12.5 μ L,PCR 正向引物(10 μ mol/L)1 μ L,PCR 反向引物(10 μ mol/L)1 μ L,cDNA 2,ddH₂O 8.5 μ L;RT-PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;绘制溶解曲线。选取线性较好的 4~6 个点制作标准曲线;以 β -actin 为内参,以等量相应的 cDNA 为模板,分别平行扩增 α -SMA、CTGF 和 COL1 α 1。

表 1 引物序列及产物长度

Table 1 The sequence of primers and their product size

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小 Product size bp
β -actin 正向引物 β -actin forward primer	GACATCCGCAAGGACCTCTAC	344
β -actin 反向引物 β -actin reserve primer	CCATGCCAATCTCATCTCGTT	
α -SMA 正向引物 α -SMA forward primer	CCGAGATCTCACCGACTACCTCA	144
α -SMA 反向引物 α -SMA reserve primer	GCAGTGGCCATCTCATTCTCAA	
CTGF 正向引物 CTGF forward primer	GGGTTACCAATGACAACGCATTG	183
CTGF 反向引物 CTGF reserve primer	CTCGGTATGTCTTCATGCTGGTG	
胶原 I 正向引物 Collagen I forward primer	AGGAATGCCTGGTGAACGA	77
胶原 I 反向引物 Collagen I reserve primer	CACCTTTGGGACCAGCATC	

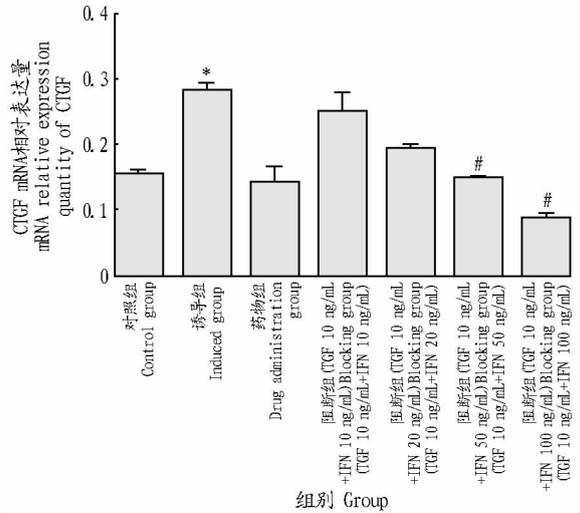
1.2.4 数据处理。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对试验数据进行处理,每个样品取 2 次测定的平均值,然后使用 SAS 9.0 统计软件进行统计与分析,各组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 CTGF mRNA 的相对表达量比较 从图 1 可以看出,与对照组相比,诱导组(TGF- β ₁ 10 ng/mL)CTGF mRNA 相对表达量明显升高($P < 0.05$);与对照组相比,药物组(IFN- γ 20 ng/mL)CTGF mRNA 相对表达量受到抑制,但差异并不显著($P > 0.05$);与诱导组相比,阻断组(TGF- β ₁ 10 ng/mL + IFN- γ 10、20、50、100 ng/mL)CTGF mRNA 的表达受到明显抑制,并呈剂量依赖。

2.2 α -SMA mRNA 的相对表达量比较 从图 2 可以看出,与对照组相比,诱导组(TGF- β ₁ 10 ng/mL) α -SMA mRNA 相对表达量明显升高($P < 0.05$);与对照组相比,药物组(IFN- γ 20 ng/mL) α -SMA mRNA 相对表达量受到明显抑制($P < 0.05$);与诱导组相比,阻断组 α -SMA mRNA 的表达量受到明显抑制,并呈剂量依赖。

2.3 COL1 α 1 mRNA 的相对表达量比较 从图 3 可以看

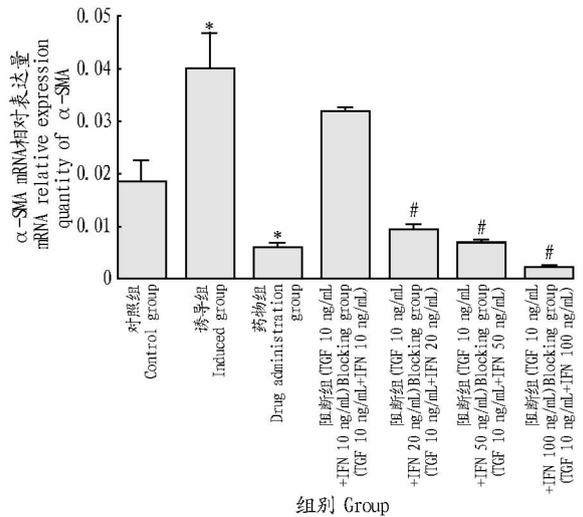


注: * 表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$),#表示与诱导组相比差异显著($P < 0.05$)

Note: * indicated significant difference with control group($P < 0.05$) and # indicated significant difference with induced group($P < 0.05$)

图 1 CTGF mRNA 相对表达量的变化

Fig. 1 The changes of mRNA relative expression quantity of CTGF



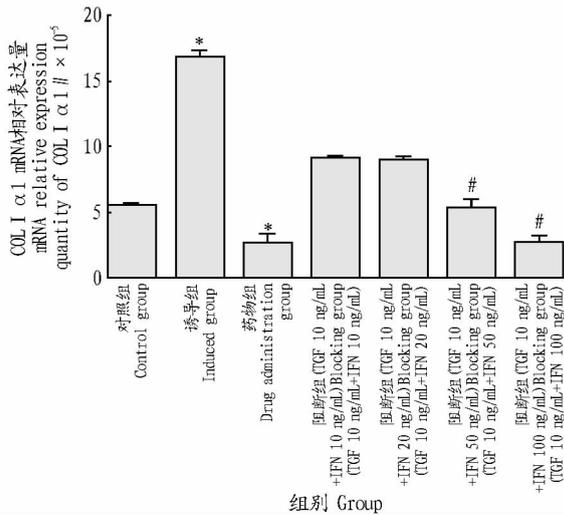
注: * 表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$),#表示与诱导组相比差异显著($P < 0.05$)

Note: * indicated significant difference with control group($P < 0.05$) and # indicated significant difference with induced group($P < 0.05$)

图 2 α -SMA mRNA 相对表达量的变化

Fig. 2 The changes of mRNA relative expression quantity of α -SMA

出,与对照组相比,诱导组(TGF- β ₁ 10 ng/mL)COL1 α 1 mRNA 相对表达量明显升高($P < 0.05$);对照组与处理组(IFN- γ 20 ng/mL)BMEC COL1 α 1 mRNA 相对表达量均较低,且差异不显著($P < 0.05$);与诱导组相比,阻断组 COL1 α 1 mRNA 的相对表达量受到明显抑制,并呈剂量依赖。



注: * 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), # 表示与诱导组相比差异显著 ($P < 0.05$)

Note: * indicated significant difference with control group ($P < 0.05$) and # indicated significant difference with induced group ($P < 0.05$)

图3 COL1 α_1 mRNA 相对表达量的变化

Fig.3 The changes of mRNA relative expression quantity of COL1 α_1

3 讨论与结论

BMEC 参与奶牛乳腺泌乳调控且在乳房炎发病过程中是病原损伤的主要细胞。乳腺纤维化是奶牛乳腺炎重要的病理表现,患病奶牛最终因泌乳功能下降或丧失被淘汰。目前,人类医学研究表明在多种组织器官纤维化进程中 IFN- γ 在不同程度上均能起到抑制纤维化的作用。在肝纤维化过程中,IFN- γ 能够降低肝脏星状细胞(HSC)的活化和细胞外基质的沉积^[7-8];在肺脏纤维化研究中同样发现,IFN- γ 能够改善肺纤维化的程度,缓解肺脏纤维化进程^[9]。纤维化的发生与细胞外基质(ECM)的沉积密切相关,ECM的沉积的主要因素是间质细胞的超量表达和增生,而造成其超量表达的因素目前认为是由间质细胞原发性增殖和实质细胞发生转分化(EMT)引起。

该试验用 TGF- β_1 诱导 BMEC 发生转分化,探讨在 IFN- γ 作为药物逆转 EMT 的可能性。结果表明,诱导组(TGF- β_1 10 ng/mL) BMEC α -SMA、COL1 α_1 及 CTGF 的 mRNA 相对表达量明显升高,说明诱导试验是成功的;药物

组(IFN- γ 20 ng/mL) BMEC 分泌 α -SMA 和 COL1 α_1 及 TGF- β_1 下游因子 CTGF 具有较为明显的抑制;阻断组(TGF- β_1 10 ng/mL + IFN- γ 10、20、50、100 ng/mL) 诱导后 BMEC α -SMA、COL1 α_1 及 CTGF 的 mRNA 相对表达量均受到不同程度抑制,且随药物(IFN- γ) 添加剂量的增大明显下降,具有剂量依赖性。这表明 IFN- γ 能够抑制肌纤维母细胞(MFB)标志因子 α -SMA mRNA 的表达,具有对 BMEC 表型重塑的促进作用;同时,间质细胞蓄积标志 COL1 α_1 ^[10] mRNA 表达量的下降,表明 IFN- γ 能够阻止间质细胞蓄积及胶原的成熟,其作用途径可能是通过降低 TGF- β_1 的活性,或是抑制 TGF- β_1 下游因子 CTGF 的合成,或是通过抑制细胞转分化,减少肌纤维母细胞的数量间接抑制胶原的合成,或是直接抑制胶原的生成,其机理有待进一步验证。

综上所述,IFN- γ 能够抑制 TGF- β_1 诱导的 EMT,还可抑制细胞外基质成分的产生,其机制可能与 IFN- γ 参与下调 TGF- β_1 下游因子 CTGF 的表达有关。该试验结果可为奶牛乳腺纤维化进程的改善及乳腺纤维化的治疗提供新的思路和借鉴。

参考文献

- [1] IREDALE J P, BENYON R C, PICKERING J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors[J]. J Clin Invest, 1998, 102(3): 538-548.
- [2] BARONI G S, D'AMBROSIO L, CURTO P, et al. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis[J]. Hepatology, 1996, 23(5): 1189-1199.
- [3] ROCKEY D C, MAHER J J, JARNAGIN W R, et al. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma[J]. Hepatology, 1992, 16(3): 776-784.
- [4] 张勉之. TNF- α 对肾间质纤维化细胞表型变化的作用及补肾活血法中药对肾小管上皮细胞转分化的抑制作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2004.
- [5] 陈晓红, 何有成, 姚集鲁. 细胞因子对肝纤维化形成的影响[J]. 国外医学(内科学分册), 2001, 28(1): 21-24.
- [6] 周俊英, 甄真, 姚树坤. 肝星状细胞凋亡与肝纤维化逆转[J]. 国外医学(内科分册), 2004, 31(9): 403-406.
- [7] 白玉, 冷静. 肝星形细胞及相关细胞因子 IFN, TNF 在肝纤维化形成中的作用[J]. 医学综述, 2009, 15(3): 392-394.
- [8] LI Q H, YAN Z Q, LI F, et al. The improving effects on hepatic fibrosis of interferon- γ liposomes targeted to hepatic stellate cells[J]. Nanotechnology, 2012, 23(26): 265101.
- [9] 刘涛, 谢敏, 王浩凌, 等. 苦参碱、 γ 干扰素对大鼠肺纤维化干预作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2008, 28(5): 592-596.
- [10] ATTALLAH A M, MOSA T E, OMRAN M M, et al. Immunodetection of collagen types I, II, III, and IV for differentiation of liver fibrosis stages in patients with chronic HCV[J]. J Immunoassay Inununochem, 2007, 28(2): 155-168.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献,序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下:(1)期刊——作者(不超过3人者全部写出,超过者只写前3位,后加“等”)。文章题名[J]。期刊名,年份,卷(期):起止页码。(2)图书——编著者.书名[M]。版次(第一版不写)。出版地:出版者,出版年:起止页码。(3)论文集——析出文献作者.题名[C]//。主编.论文集名.出版地:出版者,出版年:起止页码。