

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.01.028

# 炎症因子在组织纤维化中介导组织型转谷氨酰胺酶的表达

宿丹梅, 韩源平

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘要:** 本研究在肝硬化病人的标本中,发现 tTG 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, alpha-SMA)共位表达,表明 tTG 与肝星状细胞(hepatic stellate cells)的激活/转分化有关,与肝硬化的程度相关. 烧伤病人的增生性瘢痕皮肤中 tTG 含量也相对于正常皮肤增加明显,并且分布于细胞外胶原蛋白之中,于 alpha-SMA 阳性细胞的周围. 经体外星状细胞实验,白细胞介素 1(interleukin 1, IL-1)能够诱导肝星状细胞在蛋白水平和 mRNA 水平表达 tTG. 同样,肿瘤坏死因子  $\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )也能诱导表皮细胞(Hacat)表达 tTG. 表明,在组织损伤过程中,炎症反应可能引发细胞外基质的交联,促进纤维化.

**关键词:** 组织型转谷氨酰胺酶; 组织纤维化; 炎症因子

**中图分类号:** Q81      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)01-0167-06

## Inflammatory cytokine mediated expression of tissue transglutaminase in tissue fibrosis

SU Dan-Mei, HAN Yuan-Ping

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

**Abstract:** The expression of tTG in human fibrotic tissues was assessed, and addressed how tTG is induced in fibrotic tissues. Through immunofluorescent staining we found that exclusive expression of tTG in fibrotic septa of human cirrhotic liver, co-localized with the alpha-smooth muscle (alpha-SMA) positive cells, implying hepatic stellate cells for tTG expression. Absence from normal skin, tTG was highly expressed in the human hypertrophic scar, which was also intimately associated with the alpha-SMA positive cells. *In vitro* experiment showed that interleukin-1 could induce tTG expression by rat primary hepatic stellate cells (HSCs). Likewise, TNF- $\alpha$  could induce tTG expression by skin epithelial cells. Thus, our work indicates that inflammatory cytokines may play a critical role in induction of tTG in fibrosis formation.

**Keywords:** Tissue transglutaminase; Tissue fibrosis; Inflammation cytokines

## 1 引言

转谷氨酰胺酶家族中各个成员都具有催化蛋

白质交联的作用,既催化蛋白质的谷氨酰胺残基与赖氨酸残基之间通过转氨作用形成 $\epsilon$ -谷氨酰胺- $\epsilon$ -赖氨酸,其酶活性有赖于  $Ca^{2+}$  离子<sup>[1]</sup>. 组织型转谷

收稿日期: 2015-05-15

基金项目: 四川大学海外人才启动基金; 四川省科技厅科技支撑项目(2014SZ0194)

作者简介: 宿丹梅(1989-), 女, 四川眉山人, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究. E-mail: 635139052@qq.com

通讯作者: 韩源平. E-mail: hanyup@scu.edu.cn

氨酰胺酶(tissue transglutaminase, tTG, tGM2, EC2.3.2.13)是哺乳动物中一种广泛表达的转谷氨酰胺酶,基本上各个组织都有相对的表达,其作用广泛. tTG 在人类许多疾病中发挥着许多重要的作用,比如,神经退行性疾病、自身免疫病、肝纤维化、肺纤维化、肾纤维化等疾病<sup>[2]</sup>.

人 tTG 基因的 13 个外显子编码了 687 个氨基酸,分子量为 77kD. 催化核心区域包含着一个催化活性三联体位点(Cys277, His335 和 Asp358),一个 GTP 结合位点(丝氨酸 171, 赖氨酸 173),一个钙离子结合位点<sup>[3]</sup>. tTG 在行使转氨活性的是一个钙离子依赖性的酶,钙离子结合到酶上时,可以削弱 GTP 的结合能力,使得酶的三维构象发生改变,从而底物易于跟催化位点结合,促使反应发生<sup>[4]</sup>.

组织损伤修复过程中必然要经历炎症反应,而长期的慢性炎症可能导致组织的纤维化和癌症<sup>[5]</sup>. 研究表明, tTG 在炎症阶段受到细胞因子的调节作用,转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )通过与转录起始位点上游的反应元件顺式调节 tTG 的表达;而肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tissue necrosis factor- $\alpha$ )也可以调节 tTG 的表达<sup>[6]</sup>.

肝纤维化主要是由肝星状细胞介导的<sup>[7]</sup>. 当肝脏经历慢性炎症的作用,比如持续受到外界病毒、毒素、酒精等的刺激,造成细胞外基质过度沉积,形成肝脏中的“疤痕”. 肝脏在受到外界刺激时,首先通过炎症反应,产生细胞因子激活肝星状细胞,后者经过转分化成为肌成纤维细胞(myofibroblasts),在细胞内大量表达 alpha-SMA,在细胞外产生大量的胞外基质(extracellular matrix, ECM)<sup>[8-12]</sup>. 有研究表明,通过 RNAi 技术下调 tTG 的表达,可以抑制大鼠肝星状细胞的增殖与 I 型胶原的分泌,从而可以缓解肝纤维化<sup>[13]</sup>. 另外在慢性丙型肝炎诱导的肝纤维化病人肝切片中,发现 tTG 的表达也与肝纤维化的程度有相关性,说明在肝纤维化过程中, tTG 起到一个十分关键的作用<sup>[14]</sup>.

增生性瘢痕是皮肤大面积创伤愈合后所形成的过度生长的异常瘢痕组织, tTG 是皮肤创面愈合过程中的关键因素之一. tTG 的表达有可能增加创面愈合加速,它的减低说明创面愈合的延迟<sup>[15,16]</sup>. Linge 等<sup>[17]</sup>研究发现,瘢痕成纤维细胞在体内和体外均过度表达 tTG,促进纤维化.

在丙型肝炎引发的肝硬化以及烧伤病人的增生性瘢痕中, tTG 都大量表达,并集聚在肌成纤维细胞的纤维桥(fibrotic septa)周围,表明与 ECM 的交联强化有关. 另一方面,通过体外实验表明在

肝星状细胞以及皮肤表皮细胞中,炎症因子能够诱导 tTG 的表达,从而解释了慢性炎症到纤维化转化的部分机理.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

Hacat 细胞系购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),肝星状细胞分离于大鼠肝脏<sup>[18,19]</sup>,培养基使用 DMEM (Hyclone),其中加入 10% 胎牛血清(Hyclone)和 1% 青霉素-链霉素双抗(Life Technologies). 鼠抗人 alpha-SMA 来自于 Sigma 公司,兔抗人 tTG 抗体来自于 Epitomics 公司, FITC 与 Cy3 偶联的荧光二抗来自于 Sigma 公司, HRP 偶联二抗购于 Santa Cruz. RNA 提取试剂来自于 Invitrogen, 反转录试剂盒购于 Takara 公司, 荧光定量试剂购于 BIO-RAD 公司. 肝硬化肝组织来自于丙型肝炎患者,而增生性瘢痕组织以及正常皮肤组织来自于烧伤病人以及整容病人[美国南加利福尼亚州大学/University of Southern California, 获得内部审查委员会(IRB)的许可].

### 2.2 方法

2.2.1 免疫荧光染色 肝硬化肝组织与增生性瘢痕组织冰冻切片后,用冷甲醇固定 20min, PBS 洗三次后,用 0.12% Triton X-100 穿孔 10min, PBS 洗三次,每次 5min;然后,4%的 BSA 室温封闭 1h;按抗体说明书浓度配置好一抗,4℃孵育过夜, PBS 洗三次;荧光二抗孵育 1h, PBS 洗三次; DAPI 使用 0.1  $\mu$ g/mL 的浓度染细胞核 10min, PBS 洗后,用抗淬灭封片剂封片,荧光显微镜照相.

2.2.2 细胞培养与处理 大鼠肝星状细胞和 Hacat 细胞接种于六孔板中,用 DMEM 培养基于 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中 37℃培养 24h,准备刺激, HSCs 用 10ng/mL 的 IL-1 刺激 3d,然后收取培养基进行 Western blot 检测 tTG 的蛋白表达,细胞收集后, qRT-PCR 检测基因表达. Hacat 细胞用 10ng/mL TNF- $\alpha$  刺激 24h, 收集细胞,检测 tTG mRNA 的表达.

2.2.3 qRT-PCR 检测 tTG 基因的表达 将细胞用 RAN 提取试剂 Trizol (Invitrogen)进行 RNA 提取,按照 Takara 反转录试剂盒提供的步骤取 1g 的 RAN 进行反转录,反转录后的 cDNA 稀释 5 倍后,使用 BIO-RAD 提供的荧光定量试剂进行 qRT-PCR 检测 tTG 的表达,使用的引物序列为 rat tTG F-AGATTCAGAGGCGGAGCG, R-

CATCCTCAAACCTGCCCAAAG; human tTG F-ACAAATCCATCAACCGTTCCC, R-ATCCCTGTCTCCTCCTTCTCG; rat beta actin F-ACGT TGACATCCGTAAAGACCTC, R-TGGAAGGTGGACAGTGAGGC; human beta actin F-CTGGGCATGGAGTCCTGTG, R-TTGATCTTCATTGTGCTGGGTG.

**2.2.4 Western blot 检测蛋白表达** 收集培养的 HSCs 细胞的培养基, 等体积加入  $2 \times$  上样缓冲液 (125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% 甘油, 0.005% 溴酚蓝 和 0.2mol/L DTT) 于沸水中煮沸 10min, 冷却后, 14,000 r/min 离心 10min. 取上清于新的离心管中, 进行 SDS-PAGE 跑胶. 4 摄氏度转膜, 使用 4% 的脱脂牛奶室温封闭 1h, 然后使用 tTG 抗体室温孵育 1h, 抗体浓度按照说明书配制; TBST 洗三次 10min, HRP 偶联二抗室温孵育 1h; TBST 洗三次, 通过 ECL 显色, 凝胶成像系统成像.

### 3 结 果

#### 3.1 tTG 在肝硬化中大量表达

肝硬化是肝纤维化的后期症状, 肝纤维化是指

当肝脏受到慢性炎症的作用, 类似外界病毒、毒素、酒精等的刺激, 造成细胞外基质大量集聚沉积, 形成肝脏中的“疤痕”. 当肝脏在受到外界刺激时, 首先产生炎症反应, 细胞因子激活肝星状细胞、成纤维细胞等分化形成大量表达 alpha-SMA 的肌成纤维细胞, 通过活化的细胞产生过度的胞外基质<sup>[8-12]</sup>. 而这些过多的胞外基质作为底物被交联形成难于被降解的纤维结构.

通过免疫荧光染色检测肝硬化组织中 tTG 的表达与分布, 发现四个肝硬化患者的肝脏中, tTG 大量表达 (图 1). 共染 alpha-SMA 显示, tTG 大量集聚在 alpha-SMA 阳性细胞区域. 这也就证实了肝脏中, 肝星状细胞确实是被激活形成肌成纤维样细胞, 然后分泌基质, tTG 催化交联, 形成纤维化.

#### 3.2 tTG 在皮肤增生性瘢痕中过量表达

增生性瘢痕是皮肤损伤愈合后所形成的过度生长的异常瘢痕组织, tTG 的作用需要表皮真皮新合成的内聚物, 再过分的交联形成病理情况, 主要呈现创面异常愈合, 即纤维化形成<sup>[16]</sup>. Linge 等<sup>[17]</sup>研究发现: 瘢痕成纤维细胞在体内和体外均过度表达 tTG.

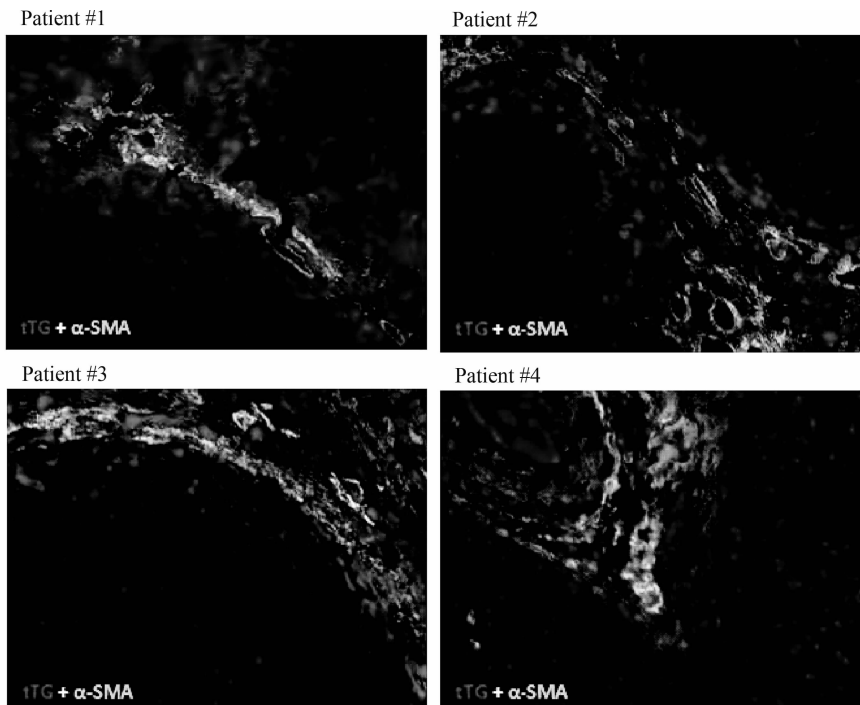


图 1 tTG 和 alpha-SMA 蛋白在肝硬化患者肝脏中的表达

Fig. 1 Expression of tTG and alpha-SMA in fibrotic zones of human cirrhotic liver

免疫荧光共染 tTG 和 alpha-SMA 的结果显示皮肤增生性瘢痕中,同肝硬化是一致的结果. tTG 大量表达于增生性瘢痕中(图 2B~D),而正常皮肤中,几乎没有表达(图 2A、C). 另外,在增生性

瘢痕组织中,表皮中的 tTG 表达量极高(图 2B). 在真皮中,大量皮肤成纤维细胞表达 alpha-SMA, 排列成纤维条索状,大量 tTG 在这些区域分布(图 2D).

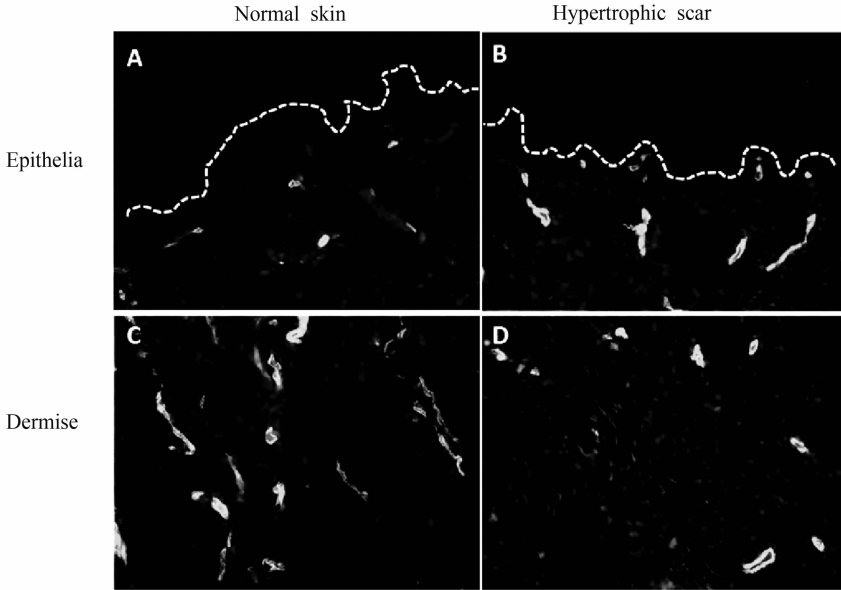


图 2 tTG 和 alpha-SMA 蛋白在正常皮肤和增生性瘢痕中的表达  
Fig. 2 Expression of tTG and alpha-SMA in normal skin and hypertrophic scar

### 3.3 IL-1 诱导肝星状细胞表达 tTG

肝纤维化的过程中,肝星状细胞受到慢性炎症因子刺激,激活,从静止的状态变为激活的状态,进而大量表达胶原等细胞外基质,构成纤维化的原料,然而,这些底物又需要 tTG 等大量交联作用的酶的催化形成纤维化,这些酶在肝纤维化的过程中,是怎样产生的. 利用大鼠肝星状细胞在体外用炎症因子 IL-1 刺激 3 天,收集培养基,Western blot 检测分泌的 tTG 的表达,发现 IL-1 可以诱导肝星状细胞表达 tTG 分泌到细胞外(图 3A). qRT-PCR 检测细胞中 tTG 基因的表达,也发现 IL-1 可以诱导 tTG mRNA 水平的表达(图 3B). 因此,可以推测,在肝纤维化的过程中,由于会产生大量的炎症因子,这些炎症因子激活 HSCs 后,除了大量表达胶原等胞外基质,还表达交联这些胞外基质的酶.

### 3.4 TNF-α 诱导人表皮细胞系 Hacat 细胞表达 tTG

由于染色结果(图 2)表明,在增生性瘢痕组织中的表皮中有大量的 tTG 表达,而增生性瘢痕也是由于皮肤受到长期的慢性炎症导致的. 所以为了验证炎症因子是否可以诱导表皮细胞产生 tTG 的表达. 利用 Hacat 细胞系,用 TNF-α 刺激 24h,收

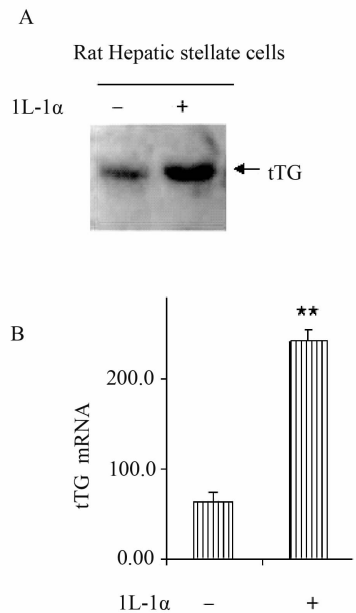


图 3 IL-1 诱导大鼠肝星状细胞 tTG 的表达  
Fig. 3 IL-1 induce tTG expression in rat hepatic stellate cells

集细胞,提取 RNA, 经过反转录,用特异引物,通过 qPCR 检测基因的表达. 利用基质金属蛋白酶 9 (MMP9)作为一个阳性对照,说明 TNF-α 引起了炎症通路的作用(图 4A). 结果表明,在表皮细胞

中, TNF- $\alpha$  可以直接诱导 tTG 在 mRNA 水平的表达(图 4B).

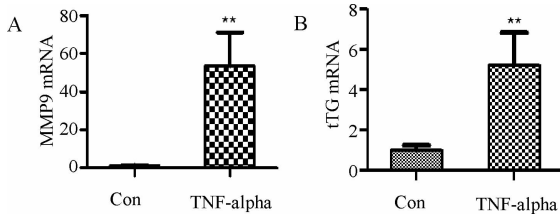


图 4 TNF- $\alpha$  诱导 Hacat 细胞 tTG mRNA 的表达。  
Fig. 4 TNF- $\alpha$  induce tTG mRNA expression in Hacat cells.

## 4 讨 论

tTG 广泛分布于组织,但是主要分布于细胞浆中,细胞核内含有的量很少,tTG 聚集在终末分化的细胞及损伤炎症反应部位<sup>[20]</sup>. 我们的结果也显示出这一点,在慢性炎症以及损伤修复的作用下,tTG 的表达是受到激活的. Johnson 等<sup>[21]</sup>的研究表明,tTG 的表达与分布与肌成纤维细胞以及胞外基质的沉积一致,这就表明了,在机体损伤时,炎症反应发生,从而诱导细胞激活形成肌成纤维细胞,产生胞外基质堆积与交联.

许多研究表明在炎症起始阶段,tTG 就受到许多细胞因子的调节作用,转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )可以通过与转录起始位点上游的反应元件顺式调节 tTG 的表达,肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )经过 NF- $\kappa$ B 也可以调节 tTG 的表达. 在应对皮肤损伤的反应中,tTG 的表达与活性都是增高的,还有骨骼肌细胞以及巨噬细胞都会浸入损伤部位<sup>[6]</sup>. 在肝星状细胞中,炎症因子的刺激作用下,tTG 的表达是增加的趋势,这就符合在肝纤维化的过程中,由于大量的细胞因子包含炎症因子的刺激作用下,激活星状细胞,从而造成胞外基质的沉积. 在 Hacat 细胞中,炎症因子的刺激可以诱导 tTG 的表达,这也就符合皮肤损伤后,炎症因子激活表皮细胞,产生大量 tTG,促进纤维化的一条路径. 另外,TGF- $\beta$  等生长因子可以促进 EMT 现象的发生,也有研究表明 EMT 和 tTG 在乳腺癌细胞中与耐药性和细胞迁移有相关性<sup>[22]</sup>. 在 TGF- $\beta$  诱导的 EMT 现象中,TGF- $\beta$  是依赖 tTG 的存在发挥作用的<sup>[23]</sup>. 所以,tTG 不仅可以作为治疗纤维化的一个靶标,也可以作为治疗肿瘤的一个靶点.

综上所述,通过这一部分实验,得出在肝硬化与增生性瘢痕中,tTG 大量表达,并集聚在 alpha-SMA 阳性细胞周围,另外,肝星状细胞与皮肤表皮

细胞受到炎症因子刺激时,能够诱导 tTG 的表达,从而解释了慢性炎症到纤维化产生的一部分机理.

## 参考文献:

- [1] Lorand L, Graham R M. Transglutaminases: cross linking enzymes with pleiotropic functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 140.
- [2] Lorand L. Crosslinks in blood: transglutaminase and beyond [J]. *FASEB J*, 2007, 21: 1627.
- [3] Grenard P, Bates M K, Aeschlimann D. Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 33066.
- [4] Mariani P, Carsughi F, Spinuzzi F, *et al.* Ligand-induced conformational changes in tissue transglutaminase: Monte Carlo analysis of small-angle scattering data [J]. *Biophys*, 2000, 78: 3240.
- [5] Iismaa S E, Mearns B M, Lorand L, *et al.* Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89: 991.
- [6] Haroon Z A, Hettasch J M, Lai T S, *et al.* Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis [J]. *FASEB*, 1999, 13(13): 1787.
- [7] Reeves H L, Friedman S L. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d808.
- [8] Reynaert H, Thompson M G, Thomas T, *et al.* Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension [J]. *Gut*, 2002, 50: 571.
- [9] Wells R G. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39: S158.
- [10] Kisseleva T, Brenner D A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(Suppl 1): 73.
- [11] Rockey D C, Weisiger R A. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance [J]. *Hepatology*, 1996, 24:233.
- [12] Parsons C J, Takashima M, Rippe R A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22 (Suppl 1): S79.
- [13] Zhao G, Zhang Z Q, Zhang B, *et al.* Down-regula-

- tion of TGM2 expression by RNAi inhibits HSC proliferation and attenuates liver fibrosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011, 4(5): 513.
- [14] Nardacci R, Ciccocanti F, Falasca L, *et al.* Tissue transglutaminase in HCV infection [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(Suppl. 1): 79.
- [15] Hung W S, Lai W F, Leu B, *et al.* Effect of SACCHACHITIN on keratinocyte proliferation and the expressions of type I collagen and tissue transglutaminase during skin wound healing [J]. *Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2004, 70(1): 122.
- [16] Verderio E A, Johnson T, Griffin M. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing; review article [J]. *Amino Acids*, 2004, 26(4): 387.
- [17] Linge C, Richardson J, Vigor C, *et al.* Hypertrophic scar cells fail to undergo a form of apoptosis specific to contractile collagen—the role of tissue transglutaminase [J]. *Invest Dermatol*, 2005, 125(1): 72.
- [18] Friedman S L, Rockey D C, McGuire R F, *et al.* Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture [J]. *Hepatology*, 1992, 15: 234 .
- [19] Tsukamoto H, Cheng S, Blaner W S. Effects of dietary polyunsaturated fat on ethanol-induced Ito cell activation [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270: G581.
- [20] Akimov S S, Krylov D, Fleischman L F, *et al.* Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin [J]. *Cell Biol*, 2000, 148(4): 825.
- [21] Johnson T S, El-Koraie A F, Skill N J, *et al.* Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring [J]. *Am Soc Nephrol*, 2003, 14(8): 2052.
- [22] Agnihotri N, Kumar S, Mehta K. Tissue transglutaminase as a central mediator in inflammation-induced progression of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(1): 202.
- [23] Kumar A, Xu J, Brady S, *et al.* Tissue transglutaminase promotes drug resistance and invasion by inducing mesenchymal transition in mammary epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e13390.