

人腱细胞Smad2、Smad4基因MH2结构域的克隆和序列鉴定

近年来的研究[1][2]表明, 转化生长因子- β (TGF- β)在腱的形成及修复过程中起着重要作用。但其作用的分子机制, 即TGF- β 在腱细胞的信号转导途径及其对基因表达的调控方式一直未能阐明。Smad2是TGF- β 特异的细胞内信号转导分子, Smad4是不同TGF- β 超家族成员信号传递的中心转导分子, MH2对Smads分子间同源或异源聚合必不可少, 并具有转录激活等功能[3]。

本研究采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR), 从培养的人腱细胞中克隆Smad2和Smad4基因的功能性结构域-MH2结构域并测定其核苷酸序列, 旨在从细胞内信号转导的水平探讨TGF- β 调控腱细胞增殖及基质合成的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料及主要试剂

肌腱取自水囊引产的5月龄胎儿四肢。F-12培养基系Sigma公司产品。胎牛血清系杭州四季青生物公司产品。总RNA提取试剂盒及Thermo-ScriptTMRT-PCR试剂盒为Gibco公司产品。所用引物由上海生工公司合成并纯化(表1)。 Φ X174-Hinc II digest DNA Marker系TaKaRa公司产品, PCR仪为珠海黑马公司产品, 台式低温冷冻离心机为德国Heraeus公司产品。凝胶成像系统系第一军医大学中心实验室提供的Gel Documentation Analysis System(GDAS)。pGEM-T 载体系Promega公司产品, 实验中使用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等分别购自Gibco BRL和USB等公司。PCR及质粒纯化试剂均为德国QIAGEN公司产品。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Oligonucleotide	Sense	Antisense	Product size(bp)
Smad2	TAGGTGGGGAAGTTTTTGHCTGATG	CGTCTGCCTTCGGTATTCTG	269
Smad4	AAGGTGAAGGTGATGTTTG	GAGCTATTCCACCTACTGAT	264
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTCAACC	CAAAGTTGTCATGCATGACC	496

1.2 方法

1.2.1 肌腱细胞的培养 按分步酶消化法分离肌腱细胞。无菌条件下, 横行切断引产胎儿鞘内屈指深腱两端, 将其从近端快速抽出, 首先在手术放大镜下剪除肌腱外膜组织, D-Hanks液漂洗3次后, 用0.25%胰蛋白酶及0.1%胶原酶将整段肌腱在37 °C消化30 min, 眼科剪将肌腱剪成1 mm³大的小碎块, 再用上述浓度的胰蛋白酶及胶原酶混合液在37 °C消化1 h, 用胎牛血清终止消化后, 100目滤网过滤去除碎块, 滤液经800 r/min 离心10 min, 弃去上清液。用培养液悬浮细胞, 将细胞记数并将细胞密度调至1×10⁵ 个/L置于培养瓶中培养。以F-12培养基加入10%胎牛血清、青霉素、链霉素至终浓度为100 U/ml, 加入VitC至终浓度为 50 μg/ml制成培养液。原代细胞汇合成单层后, 37 °C恒温, 5% CO₂及饱和湿度进行传代。

1.2.2 总RNA的提取 在底面积为25 cm²的细胞培养瓶收集5×10⁵个第三代细胞。用TRIzol总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, 经紫外分光光度计(日本岛津UV2201型)测定总RNA浓度和纯度, 重复测定3次, $D_{(260)}/D_{(280)}$ (A_{260}/A_{280})之比值应在1.8~2.0之间, 计算样品总RNA浓度。

1.2.3 cDNA的合成 取总RNA 2 μg 及Oligo dT Primer 0.5 μg加DEPC液至10 μl, 于65 °C变性5 min后, 依次加入5×反转录缓冲液4 μl、10 mmol/L dNTP 2 μl、0.1 mol/L DTT 1 μl、DEPC液1 μl、RNaseout 40 U和ThermoScript反转录酶15 U, 总反应体积20 μl。于55 °C反应50 min后, 85 °C加热5 min终止反应。

1.2.4 PCR反应 根据Genebank资料应用计算机Oligo软件(6.31版)辅助设计Smad2及Smad4引物, 选用GAPDH基因作为内参照。PCR反应总体积为50 μl, 包含cDNA 2 μl、10×PCR缓冲液5 μl、10 mmol/L dNTP 1 μl, 50 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl, PlatinumTaq酶0.4 μl, Smad及GAPDH上下游引物(12.5 μmol/L)各2 μl。将反应管置于PCR仪上, 92 °C预变性2 min后进入92 °C变性1 min, 55 °C退火1 min, 72 °C延伸1.5 min的循环, 共30次, 最后72 °C充分延伸7 min。反应完成后取10 μl PCR反应液, 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 用PCR Marker作为相对分子质量标准。电泳完毕后在紫外灯下观察并经GDAS扫描成像。空白管作为空白对照。

1.2.5 PCR产物的回收、克隆 PCR产物于10 g/L低熔点琼脂糖凝胶上电泳, 用QIAGEN PCR-Pure Kit回收目的基因。EcoR I

和Xho I 分别对回收的目的基因和载体pGEM-T 进行双酶切消化，连接目的基因和载体，连接反应体积为10 μ l，含3 μ l T4 DNA 连接酶，目的基因与载体的摩尔比为5:1，4 $^{\circ}$ C水浴过夜。取相当于15 ng载体的连接液转化大肠杆菌DH 5 α ，蓝白斑筛选阳性克隆pGT/Smad，然后用PCR法、琼脂糖凝胶电泳法及EcoR I 和Xho I 酶切法进行鉴定。

1.2.6 cDNA序列测定 扩增已鉴定的阳性克隆pGT/Smad，用QIAGENE REALprep DNA Purification System提取质粒，用引物M13+及测序试剂盒在ABI 377型DNA自动测序仪(测序工作在上海联合基因公司完成)测定cDNA。

2 结果

2.1 总RNA

共提取35 μ l RNA，取5 μ l RNA，加500 μ l去离子水稀释。分光光度法测定RNA纯度和含量。 $A_{260} = 0.168$ ， $A_{280} = 0.085$ ， A_{260} 与 A_{280} 的比值为1.982。说明获得17.335 μ g纯度较高的总RNA。

2.2 RT-PCR产物

腱细胞总RNA逆转录合成cDNA，进行PCR。PCR产物于10 g/L低熔点琼脂糖凝胶电泳，可见大小分别约 263 bp和269 bp的特异扩增产物(图1)。

2.3 pGT/SMADMH2克隆的核苷酸序列测定

PE317-A型自动测序仪测定pGT/SMADMH2重组载体中插入基因的核苷酸序列并应用PCGENE软件对结果进行计算机辅助分析，与Genebank上相应已知序列(检索号为AF027964和NM_005359)进行同源性比较和分析，未发现任何突变(图2、3)。

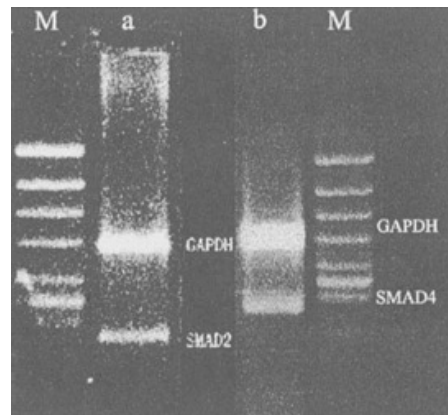


图1 PCR扩增产物

Fig.1 Amplified PCR products

M: Φ X174-Hinc II digest DNA marker;

a: Smad2 and GAPDH; b: Smad4 and GAPDH

3 讨论

TGF- β 是由多基因家族编码的一类多效能因子，其活性结构是由相对分子质量为12 500的亚单位肽链通过二硫键连接而成的同源二聚体，有5种异型肽和4种受体亚型。大量研究[4]表明，TGF- β 是调控细胞生长、分化和细胞外基质产生中的重要的分子。

```

1120      1410      1100      1390      1380      1370
af027964.gb_ AAGTTCAATCCAGCAAGGAGTACTGTACCGTCTGCCTTCGGTATTCTGCTCCCCACCC
smad2       CATGCTCCCGGCCCGCCATGGCCGCGGGATTTCGTCTGCCTTCGGTATTCTGCTCCCCACCC
10         20         30         40         50         60
1360      1350      1340      1330      1320      1310
af027964.gb_ TTTCACAAAACTCATTCTTATGGTGCACATTCTAGTTAGCTGATAGACGGCTTCAAAACC
smad2       TTTCACAAAACTCATTCTTATGGTGCACATTCTAGTTAGCTGATAGACGGCTTCAAAACC
70         80         90         100        110        120
1300      1290      1280      1270      1260      1250
af027964.gb_ CTGATTAACAGACTGAGCCAGAAGAGCAGCAAATTCCTGGTTGTTGAAGATCTTCAGATT
smad2       CTGATTAACAGACTGAGCCAGAAGAGCAGCAAATTCCTGGTTGTTGAAGATCTTCAGATT
130        140        150        160        170        180
1240      1230      1220      1210      1200      1190
af027964.gb_ ACAGCCTGGTGGAAATTTTACACACTGTTGCAGGGTGCCAGCCATATCTCTGATTACAATT
smad2       ACAGCCTGGTGGAAATTTTACACACTGTTGCAGGGTGCCAGCCATATCTCTGATTACAATT
190        200        210        220        230        240
1180      1170      1160      1150      1140      1130
af027964.gb_ GGGGCTCTGCACAAAGATTGCACTATCACTTAGGCACTCAGCAAAAACCTCCCCACCTAT
smad2       GGGGCTCTGCACAAAGATTGCACTATCACTTAGGCA-TCAGCAAAAACCTCCCCACCTAA
250        260        270        280        290        300

```

图2 人腱细胞Smad2基因MH2结构域与AF027964的同源性比较
 Fig.2 The comparison of homogenous analysis between AF027964 and MH2 domain of Smad2 cloned from human tenocytes

```

330      320      310      300      290      280
smad4     TGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATTAAGGTGAAGGTGATGTTTGGGTCAGGTG
005359.txt GCACATAGGCAAAGGTGTGCAGTTGGAATGTAAAGGTGAAGGTGATGTTTGGGTCAGGTG
1280      1290      1300      1310      1320      1330
270      260      250      240      230      220
smad4     CCTTAGTGACCACGCGGTCTTTGTACAGAGTTACTACTTAGACAGAGAAGCTGGGCGTGC
005359.txt CCTTAGTGACCACGCGGTCTTTGTACAGAGTTACTACTTAGACAGAGAAGCTGGGCGTGC
1340      1350      1360      1370      1380      1390
210      200      190      180      170      160
smad4     ACCTGGAGATGCTGTTTCATAAGATCTACCCAAGTGCATATATAAAGGTCTTTGATTTCGG
005359.txt ACCTGGAGATGCTGTTTCATAAGATCTACCCAAGTGCATATATAAAGGTCTTTGATTTCGG
1400      1410      1420      1430      1440      1450
150      140      130      120      110      100
smad4     TCAGTGTTCATCGACAGATGCAGCAGCAGGCGGCTACTGCACAAGCTGCAGCAGCTGCCCA
005359.txt TCAGTGTTCATCGACAGATGCAGCAGCAGGCGGCTACTGCACAAGCTGCAGCAGCTGCCCA
1460      1470      1480      1490      1500      1510
90       80       70       60       50       40
smad4     GGCAGCAGCCGTGGCAGGAAACATCCCTGGCCCAGGATCAGTAGGTGGAATAGCTCAATC
005359.txt GGCAGCAGCCGTGGCAGGAAACATCCCTGGCCCAGGATCAGTAGGTGGAATAGCTCCAGC
1520      1530      1540      1550      1560      1570

```


图3 人腱细胞Smad4基因MH2结构域与NM_005359的同源性比较

Fig.3 The comparison of homogenous analysis between NM_005359 and MH2 domain of Smad4 cloned from human tenocytes

Yamashita等[5]研究提示TGF- β 信号受体是T β R_I、T β R_{II}复合物,是由两分子T β R_I和两分子T β R_{II}形成的四聚体与一个活化的TGF- β 二聚体结合形成,形成T β R_{II}-TGF- β -T β R_I复合体,复合体中的T β R_I被T β R_{II}磷酸化从而激活SMAD产生生物学效应[6]。激活的SMAD或各种含SMAD的转录因子作用于靶基因反应元件,调节了靶基因的转录水平,最终表现为TGF- β 对细胞生长分化的调控。

Raftery[7]等在进行果蝇遗传学系统的筛选中发现了能补救dpp缺失突变的分子,称为Mad(Mothers against dpp),并证实Mad是dpp(一种果蝇体内属于TGF- β 超家族的细胞因子)信号传递必需的下游分子。由于Mad相关蛋白与其它任何已知蛋白结构上无相似性,所以被定为S蛋白家族,此家族基因编码的蛋白相对分子质量约为50 000,由保守的氨基酸和羧基端结构域(也称MH1和MH2)和中间富含脯氨酸高变连接区组成。MH2对SMADs分子间同源或异源聚合必不可少,通过GAL4的DNA结合结构域与DNA结合具有转录激活功能,并与转录因子FAST1和转录共刺激物质p300/CREB结合蛋白发生作用[8]。这表明,MH2是SMADs的功能性结构域。

根据SMADs蛋白结构和功能相似性,将其分为三组[9]:MAD、SMAD1~3、SMAD5为第一组;SMAD4为第二组;SMAD6,7为第三组。第一组分子C末端具有特征性丝氨酸基序,可被活化的T β R_I磷酸化,决定了配体信号转导的特异性,SMAD2,3是TGF- β 的效应分子。第二组是不同TGF- β 超家族成员信号传递的中心转导分子。磷酸化激活的第一组SMADs分子与第二组SMADs三聚体结合成异源性六聚体转移至核内作为转录因子单独或与其他DNA结合蛋白结合后激活特定靶基因[10]。第三组对TGF- β 超家族成员信号转导起负调控作用。

本研究采用RT-PCR方法从人腱细胞中成功克隆Smad2和Smad4基因的功能性结构域-MH2结构域。所得基因序列与Genebank上相应已知序列进行了同源性比较和分析,未发现任何突变。这一结果证实,人腱细胞内存在Smad2和Smad4基因。所获得的MH2结构域将有助于进一步研究Smad分子调控肌腱修复的功能,为探索组织工程化肌腱构建中调控种子细胞增殖分化提供基础。

参考文献:

- [1] D'Souza D, Patel K. Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development [J]. *Anat Embryol Berl*, 1999, 200(4):367-75.
- [2] Cromack DT, Porrás-Reyes B, Purdy JA, et al. Acceleration of tissue repair by transforming growth factor beta 1: identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits[J]. *Surgery*, 1993, 113(1): 36-42.
- [3] Meersseman G, Verschuere K, Nelles L. The C-terminal domain of Mad-like signal transducers is sufficient for biological activity in the *Xenopus* embryo and transcriptional activation[J]. *Mech Dev*, 1997, 61(1-2): 127-40.
- [4] Massague J. TGF-beta signal transduction[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 753-91.
- [5] Yamashita H, ten Dijke PT, Franzen P, et al. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(31):20172-8.
- [6] Massague J, Hata A, Liu F. TGF-Beta signalling through the Smad pathway[J]. *Trends Cell Biol*, 1997, 7(1):187-92.
- [7] Raftery LA, Twombly V, Wharton K, et al. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*[J]. *Genetics*, 1995, 139(1): 241-54.
- [8] Nishihara A, Hanai JI, Okamoto N. Role of p300, a transcriptional activator, in signalling of TGF-beta[J]. *Genes Cells*, 1998, 3(9): 613-23.
- [9] Maduzia LL, Padgett RW. *Drosophila* MAD, a member of the Smad family, translocates to the nucleus upon stimulation of the dpp pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(2):595-8.
- [10] Shi Y, Hata A, Lo RS. A structural basis for mutational inactivation of the tumor suppressor Smad4[J]. *Nature*, 1997, 388(6637):87-93.

参考文献:

- [1] D'Souza D, Patel K. Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development [J]. *Anat Embryol Berl*, 1999, 200(4):367-75.
- [2] Cromack DT, Porrás-Reyes B, Purdy JA, et al. Acceleration of tissue repair by transforming growth factor beta 1: identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits[J]. *Surgery*, 1993, 113(1): 36-42.
- [3] Meersseman G, Verschuere K, Nelles L. The C-terminal domain of Mad-like signal transducers is sufficient for biological activity in the *Xenopus* embryo and transcriptional activation[J]. *Mech Dev*, 1997, 61(1-2): 127-40.
- [4] Massague J. TGF-beta signal transduction[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 753-91.

- [5] Yamashita H, ten Dijke PT, Franzen P, et al. Formation of hetero- oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β [J]. J Biol Chem, 1994, 269(31):20172-8.
- [6] Massague J, Hata A, Liu F. TGF-Beta signalling through the Smad pathway[J]. Trends Cell Biol, 1997, 7(1):187-92.
- [7] Raftery LA, Twombly V, Wharton K, et al. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila[J]. Genetics, 1995, 139(1): 241-54.
- [8] Nishihara A, Hanai JI, Okamoto N. Role of p300, a transcriptional activator, in signalling of TGF-beta [J]. Genes Cells, 1998, 3 (9): 613-23.
- [9] Maduzia LL, Padgett RW. Drosophila MAD, a member of the Smad family, translocates to the nucleus upon stimulation of the dpp pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238 (2):595-8.
- [10] Shi Y, Hata A, Lo RS. A structural basis for mutational inactivation of the tumor suppressor Smad4[J]. Nature, 1997, 388 (6637):87-93.

[回结果列表](#)