

促肝细胞生长素对人皮肤成纤维细胞及大鼠肝星状细胞产生细胞外基质的影响

Effect of hepatocyte growth-promoting factor on extracellular matrix production by human skin fibroblasts and rat hepatic stellate cells

周长林¹, 王 皓², 殷仁富¹

(1. 第二军医大学长征医院贵宾诊疗科, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

[关键词] 促肝细胞生长素; 人皮肤成纤维细胞; 肝星状细胞; 细胞外基质

[中图分类号] R 575.2 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2007)06-0688-02

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过量沉积是形成肝纤维化的主要病理基础, ECM成分复杂, 主要含胶原蛋白、结构糖蛋白、多糖类物质等。在胶原蛋白中, I、Ⅲ型胶原是纤维化肝脏的主要成分, 蛋白多糖中透明质酸(hyaluronic acid, HA)是肝纤维化中研究较多的大分子物质之一, 在肝纤维化致病过程中的作用已得到广泛认同^[1]。促肝细胞生长素(pHGF)是从乳猪肝中提取的活性物质, 临床已用于治疗肝病多年^[2]。本实验拟以I型胶原(collagen I, Col I)和HA为代表探讨pHGF对人皮肤成纤维细胞(HSF)、大鼠肝星状细胞HSC-T₆产生ECM的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 大鼠肝星状细胞HSC-T₆从德国亚琛RWTH大学医院中心实验室引进。pHGF购自广州阳江制药厂, 20 mg/支, 批号2005.6, DMEM培养基购自Gibco公司, 小牛血清(FCS)购自Hyclone公司, 胰蛋白酶、DMSO均购自Amersco公司。

1.2 细胞培养 HSF细胞取自一3岁幼儿因烧伤后瘢痕形成而手术切除的皮肤组织。按常规组织贴块法, 在5%CO₂、90%湿度培养箱中培养。培养液RPMI 1640中含10%FCS、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素。培养细胞均贴壁生长, 细胞密度为(0.1~1)×10⁵/ml, 每2~3 d传代1次。取第3~8代细胞用于实验。

HCS-T₆细胞采用含胰岛素及谷氨酰胺的DMEM培养基, 加10%FCS、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素。取生长状态良好的细胞用于实验。

1.3 药物处理 接种培养细胞24 h后, 加药处理。pHGF浓度分别为200、400 μg/ml, 继续培养24 h, 并取细胞上清液, -20℃保存, 待检。每组浓度设3个复孔, 实验重复2次, 设未加药组为对照。

1.4 Col I、HA水平检测 分别采用芬兰Orion公司提供的¹²⁵I标记PICP放免分析试剂盒、上海海军医学研究所提供的¹²⁵I标记HA放免分析试剂盒检测细胞上清液中Col I和HA水平, 严格按操作说明进行, 结果均以ng/ml表示。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析和t检验。

2 结果

2.1 pHGF对HSF细胞产生ECM的影响 pHGF在200 μg/ml、400 μg/ml浓度下, 对HSF细胞产生HA均具有明显的抑制作用, HA浓度分别为(607.80±92.33)、(349.80±33.49) ng/ml, 与对照组的(758.50±49.32) ng/ml相比, 差异非常显著(P<0.01); pHGF在200 μg/ml浓度下对HSF细胞产生Col I的抑制作用不明显, Col I浓度为(70.97±7.52) ng/ml, 当浓度增加至400 μg/ml时, 抑制Col I产生的作用明显, Col I浓度为(35.50±2.60) ng/ml, 与对照组的(90.56±56.84) ng/ml比较差异显著(P<0.05)。

2.2 pHGF对大鼠HSC-T₆细胞产生ECM的影响 pHGF在200 μg/ml浓度下对HSC-T₆细胞产生HA的抑制作用不明显, HA浓度为(177.00±21.65) ng/ml, 与对照组的(206.33±42.09) ng/ml比较, 无明显差异, 当增加浓度至400 μg/ml时对HA产生的抑制作用明显增加, HA浓度为(148.17±27.76) ng/ml, 与对照组比较差异显著(P<0.05)。因检测试剂的种属特异性, HSC-T₆细胞上清未检出Col I。

3 讨论

ECM的过量沉积是肝纤维化形成的前提和基础。血清学检测纤维化指标仍是较为常用的, 其中有HA、PCⅢ、Col I、ColⅣ、LN、TGFβ₁等^[3]。pHGF是从乳猪肝中提取的混合多肽类活性物质, 相对分子质量为10 000~70 000不等, 国内已经应用于肝病治疗。其制取源自LaBrecque^[4]从乳鼠和再生肝中提取“肝细胞刺激因子(hepatic stimulator substance, HSS)”的方法。已有报道其对体外培养的成纤维细胞及大鼠肝星状细胞HSC-T₆有增殖抑制作用, 对Col I基因启动子活性也具有负性调控作用。

肝纤维化形成过程中ECM在Disse间隙内的沉积是一个复杂的动态过程, 最终引起肝脏结构及肝细胞功能的改变。胶原蛋白、结构糖蛋白、糖胺多糖、弹性蛋白是ECM的主要成分。胶原蛋白存在于人体的各种组织结构中, I、Ⅲ

[作者简介] 周长林, 博士, 主治医师。
E-mail: charleychou65@yahoo.com.cn

型胶原在正常肝脏中含量相近,各占约 33%,当发生肝纤维化或肝硬化时,I 型胶原明显增多,约占硬化肝的 60%。在纤维化大鼠肝脏中,I、Ⅲ型胶原除分布于血管壁,胆管壁外,还分布于从汇管区向肝实质内伸展的纤维隔,参与假小叶形成。HA 是 ECM 中最重要的糖胺多糖,HA 广泛分布于细胞外间隙,主要由间质细胞合成,肝纤维化时,肝星状细胞合成 HA 水平大大升高,HA 是目前肝纤维化诊断中较为常用的实验指标^[5]。

本实验以 HSF 细胞及大鼠肝星状细胞为体外细胞模型,分析 pHGF 对其产生 ECM(Col I、HA)的影响。实验观察到 pHGF 在不同浓度下对 HSF、HSC-T₆ 两种体外细胞株产生 ECM(Col I、HA)均具有不同程度的抑制作用(因检测试剂的种属特异性,HSC-T₆ 细胞上清液中未检出 Col I)。从以往报道^[6]及本实验中了解到 pHGF 不仅可以抑制 HSF 和 HSC-T₆ 的细胞增殖,而且对细胞产生 ECM 也存在抑制作用。这种抑制调控的机制与已有报道 pHGF 在启动转录水平上对人 $\alpha_1(I)$ 前胶原基因具有负性调控作用是一致的。推测 pHGF 可以通过降低胶原基因启动子的活性,减少 mR-

NA 的转录、从而降低胶原蛋白的合成。

[参 考 文 献]

[1] 曾民德. 肝纤维化治疗对策[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9: 68-69.

[2] 徐道振 主编. 病毒性肝炎临床实践[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 125-127.

[3] 吴孟超. 中华肝病专家论坛[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 339-347.

[4] LaBrecque D R. Purification and physical-chemical characterization of hepatic stimulator substance[J]. Hepatology, 1981, 7: 100-106.

[5] 孔宪涛. 重视肝纤维化血清学诊断的研究[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21: 701-702.

[6] 周长林, 高春芳, 朱 樑, 等. 促肝细胞生长素对大鼠肝星状细胞增殖及 $\alpha_1(I)$ 胶原启动子活性的影响[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24: 1316-1319.

[收稿日期] 2007-03-15 [修回日期] 2007-06-04
[本文编辑] 曹 静