

奥曲肽对大鼠肝星状细胞胞质内游离钙及细胞增殖的影响

薛秀兰, 林菊生, 孙雪梅, 周鹤俊

薛秀兰, 林菊生, 孙雪梅, 周鹤俊, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

薛秀兰, 女, 1970-01-10 生, 山东省胶南县人, 汉族, 1999 年佳木斯大学硕士, 2003 年华中科技大学同济医院博士, 从事分子肝脏病学的临床与基础研究。

通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所。linjusheng2001@163.com

电话: 027-83662578

收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

Effect of octreotide on regulation of intracellular free Ca^{2+} concentration of hepatic stellate cells in rats

Xiu-Lan Xue, Ju-Sheng Lin, Xue-Mei Sun, He-Jun Zhou

Xiu-Lan Xue, Ju-Sheng Lin, Xue-Mei Sun, He-Jun Zhou, Institute of Liver Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. linjusheng2001@163.com

Received: 2005-06-06 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To investigate the effect of octreotide on the regulation of intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and proliferation of hepatic stellate cells (HSCs) in rats.

METHODS: Fluorescence Ca^{2+} indicator Fura-2/AM was used to observe the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of HSCs in normoxic and chronic hypoxic condition. The effects of octreotide on the proliferation of HSCs were assessed by MTT assay, and the levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were detected by radioimmunoassay.

RESULTS: The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in hypoxic condition was markedly increased as compared with that in normoxic condition (293.2 ± 12.4 nmol/L vs 137.7 ± 7.8 nmol/L, $P < 0.01$). In normoxic condition, the level of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decreased sharply after 500, 800 and 1 000 $\mu\text{g/L}$ octreotide treatment (92.52 ± 2.52 , 83.77 ± 2.30 and 76.58 ± 2.21 nmol/L, respectively, $P < 0.01$); In hypoxic condition, 500, 800 and 1 000 $\mu\text{g/L}$ octreotide caused significant reduction in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (204.28 ± 7.41 , 174.08 ± 4.77 and 156.75 ± 6.59 nmol/L, respectively, $P < 0.01$). MTT assay showed that 500, 800 and 1 000 $\mu\text{g/L}$ octreotide reduced the value of optical density (A value) in normoxic (0.173 ± 0.010 , 0.138 ± 0.009 , 0.100 ± 0.010 ,

respectively) and hypoxic (0.443 ± 0.027 , 0.320 ± 0.014 , 0.230 ± 0.014 , respectively) condition. After exposure to hypoxic condition, the level of cAMP was not significantly different from that of cGMP ($P > 0.05$). The contents of cAMP and cGMP markedly increased after 500, 800, and 1 000 $\mu\text{g/L}$ octreotide treatment in normoxic (cAMP: 1.69 ± 0.18 , 1.99 ± 0.27 , 2.48 ± 0.37 pmol/mg vs 1.10 ± 0.32 pmol/mg, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; cGMP: 1.08 ± 0.24 , 1.24 ± 0.17 , 1.31 ± 0.29 pmol/mg vs 0.86 ± 0.12 pmol/mg, $P < 0.05$ or $P < 0.01$) and hypoxic (cAMP: 1.87 ± 0.30 , 2.09 ± 0.35 , 2.24 ± 0.15 pmol/mg vs 1.37 ± 0.25 pmol/mg, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; cGMP: 1.17 ± 0.53 , 1.38 ± 0.29 , 1.46 ± 0.35 pmol/mg vs 0.89 ± 0.20 pmol/mg, $P < 0.05$ or $P < 0.01$) condition as compared with those in the corresponding control groups.

CONCLUSION: Hypoxia can promote the proliferation of HSCs through the second messenger system, while octreotide antagonizes this action in a dose-dependant manner in both hypoxic and normoxic conditions. cAMP and cGMP play certain roles in the regulation of HSCs.

Key Words: Octreotide; Ca^{2+} ; Liver; Hepatic stellate cell; Rats; Cyclic adenosine monophosphate; Cyclic guanosine monophosphate

Xue XL, Lin JS, Sun XM, Zhou HJ. Effect of octreotide on regulation of intracellular free Ca^{2+} concentration of hepatic stellate cells in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(16):1974-1977

摘要

目的: 探讨在常氧和低氧条件下奥曲肽(octreotide)对大鼠肝星状细胞(HSC)胞内游离钙 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及增殖的调节。

方法: 采用钙荧光探针(Fura-2/AM)负载培养的大鼠 HSC, 观察常氧和低氧条件下培养 48 h 后 octreotide 对 HSC $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的调节, 同时用四唑盐(MTT)比色法比较不同浓度的 octreotide 对大鼠 HSC 增殖的影响。环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)放免分析药盒测 cAMP, cGMP 浓度。

结果: 与常氧条件相比, 低氧条件下 HSC $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著升高(293.2 ± 12.4 nmol/L vs 137.7 ± 7.8 nmol/L, $P < 0.01$)。500、800 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ octreotide 在常氧状态下可引起 HSCs $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 降低($P < 0.05$), 其值分别为 92.5 ± 2.5 、

83.8 ± 2.3 和 76.6 ± 2.2 nmol/L. 低氧时 500, 800 和 1 000 μg/L octreotide 可引起 HSCs $[Ca^{2+}]_i$ 降低 ($P < 0.01$), 其值分别为 204.3 ± 7.4、174.1 ± 4.8 和 156.6 ± 6.6 nmol/L. 常氧对照组 A 值 (0.232 ± 0.016) 明显低于低氧对照组 (0.533 ± 0.036) ($P < 0.01$); 经 500、800 和 1 000 μg/L octreotide 处理后, 无论是常氧还是低氧状态下 A 值均明显降低 ($P < 0.01$). 低氧条件下 cAMP 和 cGMP 含量不发生改变 ($P > 0.05$); 无论是常氧还是低氧状态, 经过 octreotide 500 μg/L 处理后, cAMP 和 cGMP 含量与相应对照组相比增高 (cAMP: 1.69 ± 0.18 pmol/mg vs 1.10 ± 0.32 pmol/mg, 1.87 ± 0.30 pmol/mg vs 1.37 ± 0.25 pmol/mg, $P < 0.05$; cGMP: 1.08 ± 0.24 pmol/mg vs 0.86 ± 0.12 pmol/mg, 1.17 ± 0.53 pmol/mg vs 0.89 ± 0.20 pmol/mg, $P < 0.05$), 而 Octreotide 800, 1 000 μg/L 组更高 (cAMP: 1.99 ± 0.27, 2.48 ± 0.37 pmol/mg vs 1.10 ± 0.32 pmol/mg, $P < 0.01$; 2.09 ± 0.35, 2.24 ± 0.15 pmol/mg vs 1.37 ± 0.25 pmol/mg, $P < 0.01$; cGMP: 1.24 ± 0.17, 1.31 ± 0.29 pmol/mg vs 0.86 ± 0.12 pmol/mg, $P < 0.01$; 1.38 ± 0.29, 1.46 ± 0.35 pmol/mg vs 0.89 ± 0.20 pmol/mg, $P < 0.01$).

结论: 缺氧可通过第二信使系统促进 HSC 的增生, 而 octreotide 无论常氧还是低氧条件下剂量依赖性抑制 HSCs 增殖; cAMP, cGMP 参与了对 HSC 的调节.

关键词: 奥曲肽; 钙; 肝; 星状细胞; 大鼠; cAMP; cGMP

薛秀兰, 林菊生, 孙雪梅, 周鹤俊. 奥曲肽对大鼠肝星状细胞胞质内游离钙及细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(16):1974-1977
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1974.asp>

0 引言

肝硬化主要的特征是假小叶的形成、血管结构发生紊乱和门静脉高压. 许多研究表明肝星状细胞在肝纤维化中起着重要作用. 而在这一过程中, Ca^{2+} 作为最重要的信使物质, 无疑起着举足轻重的作用^[1]. 生长抑素类似物奥曲肽能抑制多种肿瘤细胞的生长^[2]. 现研究奥曲肽对常氧和低氧状态下 HSC $[Ca^{2+}]_i$ 的调节及细胞增殖的影响, 旨在探讨其抗肝纤维化机制.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠的肝星状细胞由美国 Scott L. Friedman 教授惠赠, 其表型为活化的 HSC. 100 mL/L 胎牛血清 (GIBCO) DMEM. 常氧 (37℃, 50 mL/L CO_2 , 210 mL/L O_2 , 740 mL/L N_2) 和低氧 (37℃, 50 mL/L CO_2 , 50 mL/L O_2 , 900 mL/L N_2) 培养箱 (常氧培养箱: FPRMA 311 CO_2 Incubator 美国制造; 低氧培养箱: Galaxy R CO_2 Incubator, 英国制造). 奥曲肽 (octreotide 北京诺华制药有限公司. Fura-2/AM (Sigma, 美国).

1.2 方法 HSC 铺满瓶底 (80-90)% 后 1:2 传代, 待第 2 代细胞长至 60% 左右融合时, 换无血清培养基 24 h

同步化后, 常氧 (N) 及低氧 (H) 组均分别分为 4 组, 用含有下列 3 种不同浓度的 octreotide 的无血清培养基处理: 对照组 (N_c, H_c); 500 μg/L octreotide 组 (N_{oct1}, H_{oct1}); 800 μg/L octreotide 组 (N_{oct2}, H_{oct2}); 1 000 μg/L octreotide 组 (N_{oct3}, H_{oct3}) 组. 每组 HSC 分别进行常氧和缺氧培养.

1.2.1 HSC 的 $[Ca^{2+}]_i$ 测定 取汇合成单层的 HSCs, 弃培养基, Hanks 液洗涤 3 次, 用含 2 mmol/L EDTA 的 D-Hanks 37℃ 温育 5 min, 轻柔吹打, 离心, Hanks 液洗涤 3 次并制成细胞悬液. 台盼蓝排斥实验检查, 细胞存活率在 95% 以上, 调整细胞密度为 $10^9/L$, 将悬液分装管. 向细胞悬液内加入终浓度为 5 μmol/L Fura-2/AM (Sigma, 美国), 37℃ 恒温避光震荡 30 min, 离心弃上清后将细胞重新悬浮于 Hanks 液中, 于 2 h 内测定. 另备未负载 Fura-2 的细胞以测定自身荧光. 采用 RF-5301PC 荧光分光光度计 (Shimadzu, 日本) 进行 $[Ca^{2+}]_i$ 的荧光测定, 激发波长 340 nm, 380 nm, 发射波长 480 nm, 分别加入 Triton 和 EGTA 测量最大和最小值. 按照 Grynkiewicz *et al* 的方法计算, 每次平行检测 8 个样品. 测定液用超纯水配制, 并在测定缺氧细胞时用缺氧气体预平衡.

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 收集对数生长期的细胞, 调整密度为 $1 \times 10^4/$ 孔接种于 96 孔培养板, 继续培养 24 h 后加入 500, 800 和 1 000 μg/L octreotide 分别在常氧、低氧培养箱培养 48 h 吸出培养液, 加入 0.5 g/L 的 MTT 10 μL 作用 4 h, 吸出培养液加入二甲基亚砷 150 μL 并混合. 测吸光度值计算细胞存活率. 选择细胞存活 90% 以上的作为试验主要药物浓度. 每组平行检测 8 孔, 设 1 孔只加 DMSO 不加 MTT 为空白对照, 用酶标仪在 570 nm 处测各孔吸光度 A 值以反映活细胞数目.

1.2.3 cAMP, cGMP 含量测定 各组弃培养液, 立刻加入冰冷的 0.24 mol/L 高氯酸 1 mL, 刮取收集细胞, 冰浴下超声破碎, 离心取上清以 3 mol/L KOH 中和至 pH 6.3 左右, 离心除去高氯酸钾沉淀, -20℃ 贮存备测. cAMP, cGMP 测定按上海中医学院药盒说明进行.

统计学处理 所有结果均以均数 ± 标准误表示, 多组间的比较采用 F 检验, 组间的两两比较采用 q 检验. 用 Sigmaplα 2000 软件处理数据并作图.

2 结果

2.1 octreotide 对 HSC $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 低氧培养后 HSC $[Ca^{2+}]_i$ 显著高于常氧状态 ($P < 0.01$); 常氧状态下分别经过 octreotide 500, 800 和 1 000 μg/L 处理后, $[Ca^{2+}]_i$ 降低 ($P < 0.05$), 而低氧培养后 $[Ca^{2+}]_i$ 明显降低 ($P < 0.01$) (表 1).

表1 Octreotide 对 HSC[Ca²⁺]_i (nmol/L)的影响

	Control	Octreotide 500 μg/L	Octreotide 800 μg/L	Octreotide 1 000 μg/L
Normoxia(N)	137.7 ± 7.8	92.5 ± 2.5 ^a	83.8 ± 2.3 ^a	76.6 ± 2.2 ^a
Hypoxia(H)	293.2 ± 12.4 ^b	204.3 ± 7.4 ^b	174.1 ± 4.8 ^b	156.8 ± 6.6 ^b

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs常氧对照组.

表2 Octreotide 对 HSC 增殖的影响

	Control	Oct1(500 μg/L)	Oct2(800 μg/L)	Oct3(1 000 μg/L)
Normoxia(N)	0.232 ± 0.016	0.1 725 ± 0.010 ^a	0.138 ± 0.009 ^a	0.100 ± 0.010 ^a
Hypoxia(H)	0.533 ± 0.036 ^b	0.443 ± 0.027 ^b	0.320 ± 0.014 ^b	0.230 ± 0.014 ^b

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs常氧对照组.

2.2 octreotide 对 HSCs 增殖的影响 低氧对照组 *A* 值明显高于常氧对照组 (*P*<0.01); 500, 800, 和 1 000 μg/L octreotide 处理组无论是常氧还是低氧状态下 *A* 值均明显降低 (*P*<0.01, 表 2).

2.3 缺氧对 HSC cAMP, cGMP 的含量的影响 缺氧时 HSCs cAMP, cGMP 含量不发生改变 (*P*>0.05); 无论是常氧还是低氧状态下经 octreotide 500 μg/L 处理后, cAMP 和 cGMP 含量增高 (*P*<0.05), 而 octreotide 800, 1 000 μg/L 组更高 (*P*<0.01, 表 3, 4).

3 讨论

HSC 的激活增殖是纤维化发生发展的中心环节^[3]. 肝纤维化恢复期, 激活的 HSC 减少使胞外基质 (ECM) 分泌减少, 促进 ECM 的降解, 因此在肝纤维化中有重要作用. Ca²⁺ 在细胞增殖中起重要作用. Ca²⁺ 升高一方面激活胞质中的收缩蛋白, 另一方面激活丝裂原活化的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和胞核 Ca²⁺ 迅速增加^[4]. 这些因素共同作用的结果使静止期的细胞进入细胞周期, 从而引起细胞的

增殖. 缺氧可能通过激活 HSC, 释放血小板源生长因子和内皮素、Ca²⁺ 等来直接促进 HSC 的增殖.

生长抑素类似物 octreotide 能抑制多种肿瘤细胞的生长^[2]; 也可以引起 HSC 舒张, 从而降低降低门静脉血流^[5]; 还助于抗纤维化^[6], 而关于此方面的体外研究未见报道. 因此我们采用体外培养 HSC, 观察了 octreotide 在常氧, 低氧培养下 [Ca²⁺]_i 及细胞增殖的调节及其 cAMP, cGMP 的含量变化. 结果提示 octreotide 在 HSC 激活、增殖这一致纤维化的中心环节中起重要作用, 这种作用主要通过 HSC 内 [Ca²⁺]_i, cAMP 和 cGMP 实现的. 可能是 octreotide 可以激活可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylyl cyclase, SGC), 调节 cGMP 的合成, 而 cGMP 在许多组织特别是平滑肌中起着重要的调节作用. 实验证明, 外源性 octreotide 既可以通过调节 HSC 内的 cAMP 和 cGMP 水平, 也可以通过调节细胞内 [Ca²⁺]_i 水平来发挥作用, 因此使 HSC 增殖受到抑制. 结果表明 octreotide 在 HSC 激活、增殖这一致纤维化的中心环节中起重要作用, octreotide 可能成为防治肝纤维化的重要途

表3 Octreotide 对 HSC cAMP(pmol/mg)影响

	Control	Octreotide 500 μg/L	Octreotide 800 μg/L	Octreotide 1 000 μg/L
Normoxia(N)	1.10 ± 0.32	1.69 ± 0.18 ^a	1.99 ± 0.27 ^b	2.48 ± 0.37 ^b
Hypoxia(H)	1.37 ± 0.25	1.87 ± 0.30 ^c	2.09 ± 0.35 ^d	2.24 ± 0.15 ^d

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs常氧对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs低氧对照组.

表4 Octreotide 对 HSC cGMP(pmol/mg)的影响

	Control	Octreotide 500 μg/L	Octreotide 800 μg/L	Octreotide 1 000 μg/L
Normoxia(N)	0.86 ± 0.12	1.08 ± 0.24 ^a	1.24 ± 0.17 ^b	1.31 ± 0.29 ^b
Hypoxia(H)	0.89 ± 0.20	1.17 ± 0.53 ^c	1.38 ± 0.29 ^d	1.46 ± 0.35 ^d

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs常氧对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs低氧对照组.

径. 同时也应该注意到octreotide抗纤维化内在机制是多方面的, 也是非常复杂的, 其具体的机制尚待深入研究.

总之, 生长抑素类似物 octreotide 在常氧、低氧状态下对HSC cAMP, cGMP 和 $[Ca^{2+}]_i$ 的调节及其增殖的影响, 为octreotide在肝硬化的治疗提供新的靶点.

4 参考文献

- 1 Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemans K, Gorbign MN, Nicolas JM, Sancho-Bru P, De Las Heras D, Gual A, Geerts A, Arroyo V, Rodes J. In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology* 2001;33:956-962
- 2 Wang CH, Tang CW, Liu CL, Tang LP. Inhibitory effect of octreotide on gastric cancer growth via MAPK pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1904-1908
- 3 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:618-633
- 4 Nowycky MC, Thomas AP. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci* 2002;115:3715-3716
- 5 Reynaert H, Vaeyens F, Qin H, Hellemans K, Chatterjee N, Winand D, Quartier E, Schuit F, Urbain D, Kumar U, Patel YC, Geerts A. Somatostatin suppresses endothelin-1-induced rat hepatic stellate cell contraction via somatostatin receptor subtype 1. *Gastroenterology* 2001;121:915-930
- 6 Fort J, Oberti F, Pilette C, Veal N, Gallois Y, Douay O, Rousselet MC, Rosenbaum J, Cales P. Antifibrotic and hemodynamic effects of the early and chronic administration of octreotide in two models of liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1998;28:1525-1531

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版). 本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”. 该书定于2004-07由北京大学出版社出版.

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响. 图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书. 为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况. 本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种. 本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类日. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关部门的百余名专家和期刊工作参加了研究.(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)