

奥曲肽对肝星状细胞收缩的影响

尹凤荣, 张晓岚, 王川

尹凤荣, 张晓岚, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
王川, 河北医科大学药理教研室 河北省石家庄市 050000
河北省卫生厅资助项目, No. 2004110
通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. xiaolanzh@126.com
电话: 0311-87222951
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Effect of octreotide on contraction of rat hepatic stellate cell

Feng-Rong Yin, Xiao-Lan Zhang, Chuan Wang

Feng-Rong Yin, Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Chuan Wang, Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Supported by the Fund from Department of Health of Hebei Province, No. 2004110
Correspondence to: Dr. Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To investigate the effects of octreotide (OCT) on the contraction of endothelin-1(ET-1)-stimulated hepatic stellate cell (HSC), and to explore the changes of intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$).

METHODS: The changes of fluorescence degree, cellular area, and the $[Ca^{2+}]_i$ that induced by OCT and ET-1 were observed by Fluo-3/AM method under confocal laser scanning microscope.

RESULTS: Low concentration of OCT (2.5 mg/L) had no significant effect on the contraction or the $[Ca^{2+}]_i$ in HSC. However, OCT at concentrations of 5.0 mg/L and 10.0 mg/L significantly reduced the $[Ca^{2+}]_i$ immediately with the rate of 36.59% and 39.13% at 10 min ($P < 0.05$), respectively, but it had little effect on the contraction of HSC. ET-1 (10^{-8} mol/L) caused a transitory marked increase of $[Ca^{2+}]_i$ in HSC, and a significant HSC

contraction. OCT at concentrations of 5.0 mg/L and 10.0 mg/L inhibited the ET-1-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and cell contraction in HSC ($P < 0.05$).

CONCLUSION: OCT can reduce the concentration of $[Ca^{2+}]_i$ immediately, but have little effect on the contraction of HSC. OCT can inhibit the ET-1-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and cell contraction in HSC.

Key Words: Octreotide; Endothelin-1; Hepatic stellate cell; Intracellular free calcium

Yin FR, Zhang XL, Wang C. Effect of octreotide on contraction of rat hepatic stellate cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(1):79-82

摘要

目的: 探讨奥曲肽(OCT)对内皮素-1(ET-1)刺激的肝星状细胞(HSC)收缩的影响, 以及此过程中胞质游离钙($[Ca^{2+}]_i$)的变化。

方法: 应用体外HSC培养技术, 借助激光共聚焦显微镜(LSCM), 采用第三代钙荧光探针 Fluo-3/AM观察OCT、ET-1介导的HSC $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度、细胞面积及最大长径的变化。

结果: 2.5 mg/L OCT对HSC内 Ca^{2+} 浓度及收缩无显著影响; 5.0 mg/L、10.0 mg/L组OCT能够即刻引起HSC内 Ca^{2+} 浓度显著下降, 10 min时下降率分别为36.59%、39.13%($P < 0.05$), 但对HSC收缩无显著影响。ET-1引起HSC内 Ca^{2+} 浓度短暂而明显的升高以及HSC显著的收缩。5.0 mg/L、10.0 mg/L组OCT能够抑制ET-1引起的HSC内 Ca^{2+} 浓度升高及收缩作用($P < 0.05$)。

结论: OCT可即刻引起HSC内 Ca^{2+} 浓度下降, 但对HSC收缩影响不大。OCT能够抑制ET-1引起的HSC收缩。

关键词: 奥曲肽; 内皮素-1; 肝星状细胞; 胞质游离钙

尹凤荣, 张晓岚, 王川. 奥曲肽对肝星状细胞收缩的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(1):79-82
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/79.asp>

■背景资料

近来研究表明, HSCs同时参与肝脏微循环和门脉高压的调节, 活化的HSCs对许多血管活性物质具有收缩或舒张的功能。由于HSCs在肝纤维化及门脉高压中均发挥重要作用, 一般认为HSCs是防治慢性肝病的重要靶细胞。奥曲肽(octreotide)虽已应用于临床治疗门脉高压食管静脉曲张破裂出血多年, 但其作用机制尚不完全清楚。

■同行评价
研究符合伦理学
要求。

0 引言

近年研究表明,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化后收缩能力增强,对许多血管活性物质具有收缩或舒张功能,参与了肝脏微循环的调节及门脉高压(portal hypertension, PHT)的形成^[1]。奥曲肽(octreotide, OCT)虽已应用于临床治疗PTH食管静脉曲张破裂出血多年,但其作用机制尚不完全清楚。我们应用激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)技术,研究奥曲肽对活化的HSCs收缩能力的影响,旨在探讨奥曲肽治疗PTH并发症的可能机制,为奥曲肽的临床应用提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 RMPI-1640培养基为美国Gibco公司产品;内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司;奥曲肽为瑞士诺华制药有限公司产品;Fluo-3/AM购自美国Biotium公司。主要仪器有二氧化碳培养箱、激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)。

1.2 方法

1.2.1 细胞株的培养、细胞爬片 肝星状细胞株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠,其表型为活化的HSCs。细胞置于含100 g/L胎牛血清的RMPI-1640培养液中,37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养。将2 cm×2 cm盖玻片预先放置在35 mm培养皿内,细胞消化后以1.0×10⁴/mL的密度接种2 mL制备爬片,培养箱中孵育至细胞80%融合时,弃培养液,换不含胎牛血清的细胞培养液继续培养24 h,使细胞基本同步化于G₀期后再进行实验。

1.2.2 钙荧光探针的负载 钙荧光探针Fluo-3/AM用纯DMSO配成1 mmol/L的储备液,-20℃避光保存备用。实验前以37℃预温Hank's液1 mL取代原培养液,加入以DMSO溶解的Fluo-3/AM 5 μL,放回培养箱中避光孵育30 min。

1.2.3 LSCM检测HSCs[Ca²⁺]_i 将负载好的细胞爬片吸去负载液,再用Hank's液漂洗2次,将其用镊子裁剪成适宜大小,放置于倒置显微镜上的浴槽中,加入500 μL或1 mL Hank's液,放于LSCM的载物台上,调节焦距使图像清晰度达到最佳状态,选取生长良好的2-3个细胞处于最佳观察视野,激发波长488 nm,发射波长530 nm,40倍物镜,xyt扫描方式,计算机分析参数完全一致,对细胞进行连续动态扫描。根据细胞对药物反

应的预实验结果,扫描时间间隔5 s,用药后观察10 min,测量细胞长度、面积变化时观察时间延长至25 min,每组实验重复10次,每个被染细胞只用1次。ET-1终浓度为10⁻⁸ mol/L;奥曲肽终浓度分别为2.5, 5, 10 mg/L。

HSCs[Ca²⁺]_i的计算方法:利用LSCM所配备的计算与图像软件(Leica confocal software, TCS SP2)计算荧光强度相对值,荧光强度越大,[Ca²⁺]_i越高。[Ca²⁺]_i的变化用Fluo-3/AM与Ca²⁺结合后荧光强度变化百分数表示。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i \text{ 荧光强度变化百分数}(\%) = (F - F_0) / F_0 \times 100\%$$

其中F为LSCM测量时整个细胞的平均荧光强度,F₀为用药前的[Ca²⁺]_i荧光强度。

1.2.4 HSCs收缩的测量 细胞收缩通过测量细胞长度(细胞的最长轴线)与细胞面积的改变来评估。在测细胞内Ca²⁺浓度时,利用激光共聚焦显微镜微尺,测量基础条件下和加入药物后单个细胞影像的长度、面积变化。测量结果用同一细胞相对于基础状态下长度、面积的百分变化表示。细胞长度、面积减少≥8%可认为收缩^[2]。

$$\text{面积(长度)变化的百分数}(\%) = [S_0(L_0) - S(L)] / S_0(L_0) \times 100\%$$

其中S₀(L₀)为给药前的细胞面积(长度),S(L)为给药后的细胞面积(长度)。

统计学处理 数据均以均数±标准差(mean±SD)表示,利用SPSS 10.0软件进行统计分析。多组间均数差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及q检验。P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 HSCs的Ca²⁺成像 LSCM下Ca²⁺成像的HSCs仍可见普通倒置显微镜下的形态特征,[Ca²⁺]_i浓度的高低由细胞被激发的荧光强弱表示,荧光强度越强表示[Ca²⁺]_i浓度越高,反之则越低。本实验HSCs与Fluo-3/AM孵育后,所有细胞均被染色,且各细胞间的荧光强度基本一致(图A1, A2)。

2.2 奥曲肽对HSCs内Ca²⁺浓度及收缩的影响 2.5 mg/L组奥曲肽对HSCs内Ca²⁺浓度、细胞面积及最大长度无显著影响。5.0, 10.0 mg/L组能够即刻引起HSCs内Ca²⁺浓度显著下降,10 min时分别下降36.59%和39.13%(P<0.05);对HSCs面积、长度则无显著影响(表1)。

2.3 ET-1对HSCs内Ca²⁺浓度及收缩的影响 ET-1能引起HSCs内[Ca²⁺]_i短暂而明显的升高,使得

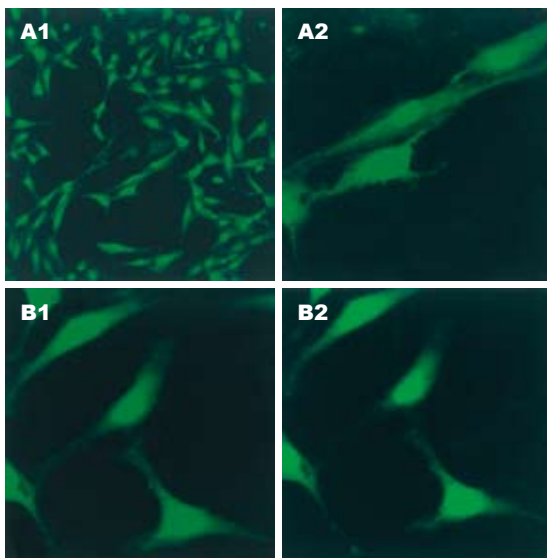


图 1 HSCs的 Ca^{2+} 浓度变化和收缩. A: 负载Fluo-3的HSCs形态. A1: 1 zoom; A2: 4 zoom; B: HSCs的收缩. B1: 对照组; B2: ET-1刺激后2 min.

HSCs面积及最大直径显著减小(表2, 图B1, B2).

2.4 奥曲肽对ET-1刺激的HSCs收缩的影响 奥曲肽预先作用一段时间后, 再加入ET-1, 使得HSCs内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度峰值减低, 面积及最大长度变化减小(表2). 奥曲肽能够抑制ET-1对HSCs的收缩作用.

3 讨论

肝硬化PHT的主要并发症——食管、胃底静脉曲张破裂出血严重威胁着患者的生命. PHT由肝内血管阻力增加及门脉血流量增多引起, 其病理生理的始动因素是肝内血管阻力增加, 主要由压迫门静脉和中央静脉的纤维化瘢痕、再生结节组织结构变化引起. 过去几年的研究表明, 不仅组织结构变化等固定因素, 而且一些可变因素对肝内血管阻力增加也起一定作用: 肝内血管阻力可被某些药物降低20-30%, 说明肝内血管阻力是可调节的, 肝内血管阻力增加部分由肝内血管壁张力增加引起.

HSCs的特殊解剖部位及其具有的收缩和舒张特性, 决定了其对肝脏微循环的调节作用. 首先, HSCs位于窦内皮细胞形成的窦壁下Disse间隙, 多分支的细胞突起包绕着窦内皮细胞, 形成第二层窦壁, HSCs的立体分布和伸展足以覆盖整个肝窦微循环, 这种解剖位置使其有可能调节肝脏微循环. 其次, 活化的HSCs在超微结构上出现大量的收缩结构, 内质网增多增大, 微丝丰富, 出现黏着斑; 并且, 活化的HSCs表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle action, α -SMA)和结蛋白丝, 二者也存在于分支突起中, 三维

表 1 奥曲肽对HSCs内 Ca^{2+} 浓度的影响 (mean \pm SD)

分组 ($\mu\text{g/mL}$)	Ca^{2+} 浓度	细胞面积变化百分数 (%)	细胞长度变化百分数 (%)
对照组	63.41 \pm 8.09		
奥曲肽组			
2.5	56.19 \pm 5.23	2.20 \pm 1.23	4.32 \pm 2.21
5.0	42.62 \pm 6.54 ^a	5.96 \pm 1.31	6.42 \pm 1.30
10.0	40.21 \pm 5.35 ^a	4.43 \pm 1.52	7.25 \pm 2.14

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

表 2 奥曲肽对ET-1刺激的HSCs Ca^{2+} 浓度和收缩的影响 (mean \pm SD)

分组	Ca^{2+} 浓度峰值	细胞面积变化百分数 (%)	细胞长度变化百分数 (%)
对照组	63.41 \pm 8.09		
ET-1组 (10^{-8} mol/L)	135.97 \pm 6.12	20.30 \pm 5.21	20.52 \pm 5.17
奥曲肽组 ($\mu\text{g/mL}$)			
2.5	130.34 \pm 5.03	18.28 \pm 6.12	18.40 \pm 2.36
5.0	90.24 \pm 5.63 ^b	12.08 \pm 2.64 ^b	12.38 \pm 5.20 ^b
10.0	85.72 \pm 3.65 ^b	10.45 \pm 1.72 ^b	12.45 \pm 1.71 ^b

^b $P < 0.05$ vs ET组.

结构和超显微结构特性类似于其他器官中调节血流量的外膜细胞, HSCs被认为在肝窦中发挥外膜细胞样作用. 再次, 研究证明, 活化的HSCs对多种血管活性物质, 如ET-1、血管紧张素II (angiotensin II, Ang II)、心房利钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、一氧化氮(nitric oxide, NO)等产生收缩或舒张反应, 其中ET-1是最有效的, 也是研究最多的血管收缩因素^[1]. 肝硬化时, 肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cell, SEC)合成NO、ET-1减少, 而活化的HSCs使NO、ET-1代偿性合成分泌不均衡, ET-1增加更为明显, 导致HSCs收缩性增强. 此种NO、ET-1生理平衡被破坏, 在肝硬化微循环障碍发生发展中具有重要作用^[3]. 由于ET-1特殊的病理作用及对HSCs显著的收缩效果, 所以, 我们仍选用其作为刺激因素.

研究表明, HSCs的活化过程伴随着细胞膜上L型电压依赖性 Ca^{2+} 通道(L-type voltage-operated calcium channels, L-VOCC)的上调^[4], Ca^{2+} 信号途径与HSCs收缩密切相关^[2,5,6], 在HSCs的收缩调节中, Ca^{2+} 信号转导通路可能比rho信号通路发挥更大作用^[7]. 本次实验中, ET-1引起HSCs显著的收缩以及HSCs内的 Ca^{2+} 浓度短暂而显著的升高, 与先前实验结果一致^[3].

奥曲肽为八肽生长抑素(somatostatin, SST)类似物, Corley *et al*^[8]进行的Meta分析表明, 在治疗食管静脉曲张出血方面, 无论是疗效还是安全性奥曲肽均优于加压素/特利加压素; 而且支持奥曲肽作为硬化剂/结扎疗法的辅助治疗。但奥曲肽降低PHT的作用机制尚不完全清楚。Escorsell *et al*^[9]就奥曲肽对血液动力学的影响进行了系列研究, 静脉注射奥曲肽可引起肝静脉压力梯度、奇静脉血流量快速降低, 但有关奥曲肽对HSCs收缩影响的细胞水平上的研究较少。

Ding *et al*^[10]发现奥曲肽能够降低HSCs内Ca²⁺浓度, 但不能阻断氯化钾、ET-1刺激的Ca²⁺浓度增加, 提示奥曲肽既不能阻断HSCs膜上L-VOCC, 也不能阻断HSCs膜上特异性ET-1受体。

本次研究同样发现奥曲肽能够即刻降低HSCs内Ca²⁺浓度, 5.0, 10.0 mg/L组分别降低了32.78%, 36.59%。但奥曲肽对HSCs面积及长度影响不大; 预先加入奥曲肽作用一定时间后, 抑制了ET-1对HSCs的收缩作用, 使得HSCs的Ca²⁺浓度、收缩面积、最大长度变化减小。

研究表明, 鼠HSCs活化后表达生长抑素受体(somatostatin receptors, SSTRs)1, 2, 3或2, 3, 5^[11,12]。而人类肝损伤后, HSCs膜上SSTRs亦上调, 来自人硬化肝脏的HSCs膜上1-5型SSTRs均有表达^[13]。并且SST能够通过SSTR1抑制ET-1刺激HSCs的收缩^[11]。奥曲肽对SSTR2, 3, 5均有亲和力^[14,15], 有可能通过HSCs膜上的SSTRs降低HSCs内Ca²⁺浓度, 从而抑制ET-1刺激的HSCs的收缩, 降低肝内阻力及门脉压力。

总之, 本次研究证实奥曲肽能够抑制ET-1引起的HSCs收缩作用, 这将为奥曲肽的临床应用提供新的理论依据。

4 参考文献

- 1 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 2 Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Esteve A, Nieves Gorbis M, Garcia-Ramallo E, Pinzani M, Ros J, Jimenez W, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 615-624
- 3 Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 534-548
- 4 Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemans K, Gorbis 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
- 5 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156
- 6 Bataller R, Nicolas JM, Ginees P, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Lario S, Tobias E, Pinzani M, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Contraction of human hepatic stellate cells activated in culture: a role for voltage-operated calcium channels. *J Hepatol* 1998; 29: 398-408
- 7 Yee HF Jr. Ca²⁺ and rho signaling pathways: two paths to hepatic stellate cell contraction. *Hepatology* 2001; 33: 1007-1008
- 8 Corley DA, Cello JP, Adkisson W, Ko WF, Kerlikowske K. Octreotide for acute esophageal variceal bleeding: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2001; 120: 946-954
- 9 Escorsell A, Bandi JC, Andreu V, Moitinho E, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Rodes J. Desensitization to the effects of intravenous octreotide in cirrhotic patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 2001; 120: 161-169
- 10 Ding HG, Wang BE, Jia JD, Xia HX, Wong CY, Zhao CH, Xu YL. Effects of octreotide on expression of L-type voltage-operated calcium channels and on intracellular Ca²⁺ in activated hepatic stellate cells. *Chin Med J* 2004; 117: 913-916
- 11 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
- 12 Song SH, Leng XS, Li T, Qin ZZ, Peng JR, Zhao L, Wei YH, Yu X. Expression of subtypes of somatostatin receptors in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1663-1665
- 13 Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, Urbain D, Kumar U, Bioulac-Sage P, Pinzani M, Rosenbaum J, Geerts A. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 1180-1189
- 14 Pawlikowski M, Melen-Mucha G. Perspectives of new potential therapeutic applications of somatostatin analogs. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24: 21-27
- 15 Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10: 163-176

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁