

外源性转化生长因子 β_1 对大鼠原代肝星状细胞活化的影响

陈达凡, 李建英, 郑伟达, 陈治新, 王小众

陈达凡, 李建英, 郑伟达, 陈治新, 王小众, 福建医科大学附
属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

陈达凡, 福建医科大学附属医院2004级硕士生, 主要从事
消化系统疾病临床和研究。

福建省科技开发计划项目, No. 2005D094

通讯作者: 王小众, 350001, 福建省福州市新权路29号, 福建医
科大学附属协和医院消化内科. drwangxz@pub6.fz.fj.cn

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2006-10-17 接受日期: 2006-11-28

Effects of exogenous transforming growth factor- β_1 on the activation of primarily cultured rat hepatic stellate cells

Da-Fan Chen, Jian-Ying Li, Wei-Da Zheng,
Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang

Da-Fan Chen, Jian-Ying Li, Wei-Da Zheng, Zhi-Xin
Chen, Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterol-
ogy, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical Uni-
versity, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by the Science and Technology Development
Project of Fujian Province, No. 2005D094

Correspondence to: Xiao-Zhong Wang, Department of
Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian
Medical University, 29 Xinquan Road, Fuzhou 350001, Fu-
jian Province, China. drwangxz@pub6.fz.fj.cn

Received: 2006-10-17 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To investigate the activation of primarily
cultured hepatic stellate cells (HSCs) at
different differentiated stages after treatment
of exogenous transforming growth factor- β_1
(TGF- β_1) and the alterations of related factors
during this process.

METHODS: HSCs were isolated from normal
rats and primarily cultured in the uncoated
plastics for 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days. Then the cells
were incubated with 5 μ g/L exogenous TGF- β_1
for 24 hours. The morphological features of the
cells were observed under inverted microscope.
Western blot was used to detect the changes of
 α -smooth muscle actin (α -SMA) after TGF- β_1
treatment and the expression of transforming
growth factor β_1 receptor-II (T β R-II) during the
activation of HSCs.

RESULTS: During the process of *in vitro* culti-
vation, HSCs at different differentiated stages
showed different responses to exogenous TGF- β_1
treatment. TGF- β_1 promoted the activation of
HSCs after the cells had been cultured for 2,
3, 4, and 5 days. The cells cultured for 3 days
were the most sensitive to TGF- β_1 , and the level
of α -SMA expression was increased by 78.05%.
The changes of HSC morphology and α -SMA
expression were not significant in the cells cul-
tured for 6 and 7 days. T β R-II expression was
significantly higher in HSCs cultured for 7 days
than that in ones cultured for 3 days (3.30 ± 0.83
vs 1.55 ± 0.38 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The activation of partially-
activated HSCs can be promoted by exogenous
TGF- β_1 , while the fully-activated HSCs lose this
response. The amount of T β R-II expression is
not involved in this difference.

Key Words: Transforming growth factor- β_1 ; Liver fi-
brosis; Hepatic stellate cell; α -smooth muscle actin

Chen DF, Li JY, Zheng WD, Chen ZX, Wang XZ. Effects
of exogenous transforming growth factor- β_1 on the
activation of primarily cultured rat hepatic stellate cells.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(3):211-215

摘要

目的: 探讨大鼠原代肝星状细胞(HSC)体外
培养过程中, 不同时期外源性转化生长因子
 β_1 (TGF- β_1)对其活化的影响及相关因素的变化。

方法: 分离大鼠原代HSC, 于无包被的塑料培
养板上分别培养2, 3, 4, 5, 6, 7 d时予TGF- β_1
5 μ g/L处理24 h, 倒置显微镜下观察细胞的形
态变化, 应用Western blot法检测处理前后细
胞 α -肌动蛋白(α -SMA)的变化, 及活化过程中
TGF- β_1 II型受体(T β R-II)的表达。

结果: HSC在体外培养过程中, 不同培养时间
对TGF- β_1 的刺激活化作用反应不同。TGF- β_1
处理后, 对培养2, 3, 4, 5 d HSC的活化有促进
作用, 以对培养第3天的细胞作用最明显, 其
 α -SMA表达增加78.05%, 而培养6, 7 d的HSC

■背景资料

肝纤维化是指肝
脏细胞外基质
(ECM)特别是胶
原的过度沉积, 是
继发于肝脏炎症
或损伤后组织修
复的代偿反应。肝
星状细胞(HSC)的
激活是肝纤维化
形成的中心环节,
细胞因子与激活
过程关系密切, 其
中TGF- β_1 起关键
作用。

■研究前沿

肝纤维化的发生与细胞因子的关系是研究热点,在肝纤维化治疗实验中,有不少针对TGF- β_1 或其通路蛋白的研究。

的形态和 α -SMA变化不明显。培养第7天的HSC比培养第3天的细胞T β R- II表达增高(3.30 ± 0.83 vs 1.55 ± 0.38 , $P < 0.05$)。

结论: TGF- β_1 对处部分活化状态中某阶段细胞的活化具有促进作用。完全活化的细胞对TGF- β_1 的刺激活化作用不敏感,原因与T β R- II的表达量无关。

关键词: 转化生长因子 β_1 ; 肝纤维化; 肝星状细胞; α 肌动蛋白

陈达凡, 李建英, 郑伟达, 陈治新, 王小众. 外源性转化生长因子 β_1 对大鼠原代肝星状细胞活化的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(3):211-215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/211.asp>

0 引言

肝纤维化是指肝脏细胞外基质(ECM)特别是胶原的过度沉积,是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应^[1]。肝星状细胞(HSC)的激活是肝纤维化形成的中心环节^[2-4],细胞因子与激活过程关系密切^[5],其中TGF- β_1 起关键作用^[3,6]。但HSC从静止状态转化为活化状态的动态变化过程中,细胞对外源性TGF- β_1 的刺激反应如何,鲜见系统报道。本文拟分离大鼠HSC,观察在原始培养的不同时期外源性TGF- β_1 刺激对细胞的形态、 α -SMA表达的影响,及HSC活化过程中T β R- II的变化,以探讨原始HSC体外培养活化过程中对TGF- β_1 刺激的反应及相关因素的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley大鼠,体质量450-500 g,中国科学院上海实验动物中心提供,普通饲料喂养,自由进食;IV型胶原酶(209 kU/g)购自Invitrogen公司;Nycodenz购自Sigma公司;PronaseE(4000 nU/g)购自Merck公司;DNA酶I(Dnase I, 10^6 kU/g)购自北京华美生物公司;DMEM培养基干粉购自Gibco公司;胎牛血清购自奥地利PAA公司;鼠抗人结蛋白(desmin) mAb购自DAKO公司;免疫细胞化学SP染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;人重组TGF- β_1 购自R&D公司;小鼠抗大鼠 α -肌动蛋白(α -SMA) mAb购自Sigma公司;兔抗大鼠T β R- II多克隆抗体及兔抗 β -tubulin多克隆抗体购自Santa Cruz公司;二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法 大鼠HSC的分离方法参考文献[7]。细胞

分离后,应用台盼蓝染色排斥法鉴定细胞活率,desmin免疫细胞化学染色法鉴定HSC纯度。以200 mL/L胎牛血清/DMEM培养液调整细胞浓度为 2×10^8 /L,接种于无包被的6孔塑料培养板上。实验所用细胞来自同一大鼠,每项实验重复5次。细胞分6组,每组再分别设立干预组和对照组。6组干预组细胞分别相对于培养2, 3, 4, 5, 6, 7 d后加用TGF- β_1 处理。

TGF- β_1 用含1 g/L牛血清白蛋白的4 mmol/L的HCl溶液激活。TGF- β_1 加用前24 h,细胞用无血清的DMEM溶液洗涤2次后,改用20 mL/L的胎牛血清/DMEM培养液继续培养,继而按预定时间换用含5 μ g/L TGF- β_1 的20 mL/L胎牛血清/DMEM培养液培养、处理24 h后进行下游实验。

1.2.1 应用相差倒置显微镜观察细胞的形态变化 细胞分离后,每隔24 h观察其形态变化,同时进行干预组和对照组之间的比较。

1.2.2 Western blot法分析细胞 α -SMA, T β R- II及 β -tubulin的表达 按预定时间,用预冷的PBS洗涤细胞2次,直接加用适当量的细胞裂解液(50 mmol/L的Tris-HCl, pH值6.8, 100 mmol/L二硫苏糖醇, 20 g/L十二烷基硫酸钠, 100 mL/L甘油),所得溶液在沸水中煮10 min,而后离心(15 000 g)10 min,取上清即为细胞总蛋白溶液。同时测定蛋白浓度。取含8 μ g总蛋白的细胞裂解液进行100 g/L SDS-PAGE电泳,经硝酸纤维素膜转移,用含50 g/L脱脂奶粉的TBS-T溶液(TBS+1 mL/L Tween-20)封闭后,分别与 α -SMA mAb(1:400)、T β R- II多克隆抗体(1:200)、 β -tubulin多克隆抗体(1:300)室温下孵育2 h,洗涤后再分别与山羊抗小鼠二抗(1:2500)和山羊抗兔二抗(1:3000)作用,经ECL底物化学发光显影,测量胶片条带灰度值。

统计学处理 采用SPSS11.0统计分析软件进行成组 t 检验或单因素方差分析。当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

成功分离大鼠HSC,细胞活力大于90%,细胞纯度达90%-95%。

2.1 体外培养过程中HSC表型改变及TGF- β_1 对其的影响 初分离的HSC呈折光性很强的圆球形,约为肝细胞的1/3到1/4,24 h后细胞基本贴壁,胞质内含有大量高折光性的颗粒。此后细胞逐渐伸展,第3天时细胞体较大,胞质内仍含有较多高折光性的颗粒,伸出较多伪足,处部分活化状

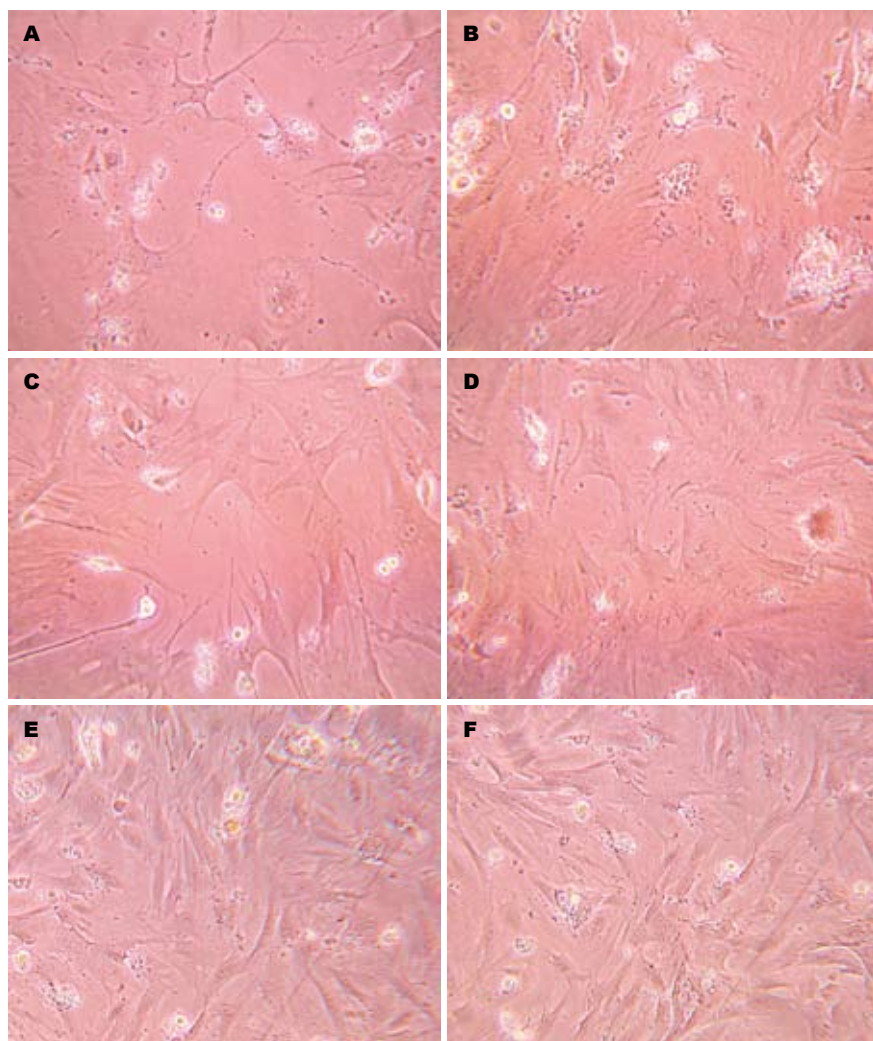


图 1 体外培养过程中HSC表型改变及TGF- β_1 的影响($\times 100$). A: 第3天对照组; B: 第3天加TGF- β_1 处理; C: 第5天对照组; D: 第5天加TGF- β_1 处理; E: 第7天对照组; F: 第7天加TGF- β_1 处理.

■应用要点

在目前的抗肝纤维化实验中,有不少针对TGF- β_1 或其通路蛋白的研究,本实验可为实验药物干预时机的选择提供参考.

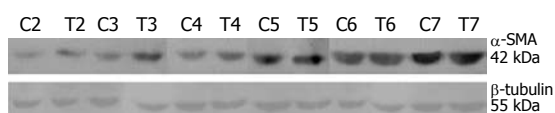


图 2 Western blot检测 α -SMA和相应 β -tubulin的表达. T2-T7: 培养第2-7天时加TGF- β_1 处理; C2-C7: 相应的对照组.

态. 第5-6天, 胞质内颗粒逐渐减少, 细胞继续伸展, 开始融合成小片状. 第7天时, 折光性的颗粒明显减少, 绝大多数的细胞呈星形、梭形, 融合成片, 呈完全活化状态. 加入TGF- β_1 后, 与对照组相比, 明显促进培养第2-5天的细胞活化, 以培养第3天的最显著, 细胞更为伸展, 折光性颗粒减少(图1).

2.2 TGF- β_1 对HSC α -SMA表达的影响 随细胞培养时间的延长, HSC的 α -SMA表达逐渐升高. 与对照组相比, TGF- β_1 促进体外培养2-5 d HSC的 α -SMA合成, 以第3天最为显著, 干预组的表达量是对照组的1.7805倍. 培养6, 7 d的HSC, 对

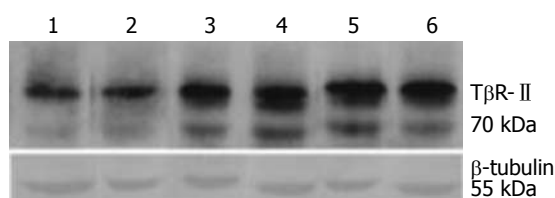


图 3 Western blot检测T β R-II和相应 β -tubulin的表达. 1-6: 第3-8天的T β R-II和相应 β -tubulin的表达.

照组和干预组 α -SMA表达无明显差异. 内参照 β -tubulin的表达基本一致(图2, 表1).

2.4 T β R-II的变化及TGF- β_1 的影响 在培养过程中, 第5, 6, 7, 8天HSC的T β R-II表达比第3, 4天高($F = 14.02$, $P < 0.05$), 但第5, 6, 7, 8天间的表达无明显差异(图3).

3 讨论

HSC的激活是肝纤维化形成的中心环节, 是指肝脏损伤时, HSC受到各种致病因子的刺激, 从静息状态转化为具有增生性、纤维原性和可收

■名词解释

HSC活化: 是指肝脏损伤时, HSC受到各种致病因子的刺激, 从静息状态转化为具有增生性、纤维原性和可收缩性的肌成纤维细胞。其中 α -SMA的表达为其激活的标志, 表达量的大小可用来衡量HSC的激活程度。

表 1 Western blot结果灰度值分析(mean \pm SD, $n = 5$)

	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
对照组	0.83 \pm 0.18	1.23 \pm 0.37	1.57 \pm 0.44	2.18 \pm 0.29	2.90 \pm 0.43	3.14 \pm 0.53
干预组	1.11 \pm 0.14 ^a	2.19 \pm 0.49 ^b	2.25 \pm 0.25 ^a	2.84 \pm 0.51 ^a	3.19 \pm 0.55	3.60 \pm 0.39

数据以 α -SMA和 β -tubulin的灰度比值表示。^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

缩性的肌成纤维细胞^[8]。静止状态的HSC在无包被的塑料培养皿上培养, 可自发激活, 7 d呈完全活化状态, 与体内肝纤维化过程相似^[2], 其中 α -SMA的表达为其激活的标志, 表达量的大小可用来衡量HSC的激活程度^[4]。TGF- β_1 在肝纤维化的大鼠中表达明显增高^[9], 他可激活HSC, 有促进HSC合成、分泌细胞外基质, 减少细胞外基质的降解, 抑制细胞增殖等作用, 以自分泌与旁分泌两种方式促进HSC活化^[10]。

实验发现, 在HSC的活化过程中, 不同阶段加入外源性TGF- β_1 刺激, 反应不同, 对处部分活化状态中某阶段的细胞促活化作用较明显, 以分离培养第3天的HSC α -SMA增殖最大, 而完全活化的细胞其活化状态变化不明显, 同时测得在体外培养中, 完全活化的HSC T β R- II的表达比部分活化的细胞(培养第3, 4天)升高。T β R- II是TGF- β_1 在HSC内信号传导过程的起始结合物, 有研究表明^[11], 刚分离的HSC T β R- II的表达很低, 而后渐升高, 这可能引起处静止及部分活化状态的细胞在某阶段对TGF- β_1 的反应渐升高。但完全活化的细胞T β R- II表达仍较高, 而对TGF- β_1 的刺激活化作用反应却下降, 因此我们考虑完全活化的HSC的反应能力下降与T β R- II的表达量无关, 其反应能力下降的可能原因如下: (1)有研究发现^[12], 应用¹²⁵I标志TGF- β_1 受体, 发现完全活化的HSC表面的TGF- β_1 I, II, III型受体均明显下降, 认为可能与细胞的内摄作用有关。(2)smads通路是TGF- β_1 刺激HSC后的主要信号传导通路^[13-14], 有学者认为完全活化的HSC smads通路的活性明显下降, 他们分别提取正常大鼠及用胆管结扎造模的肝硬化大鼠的HSC, 发现smads蛋白的表达量无明显差异, 但应用TGF- β_1 处理后, 造模组细胞smad2/3的磷酸化不明显, 而正常组却显著升高^[14]。另有学者应用TGF- β_1 体外刺激HSC后, 部分活化(培养第3天)的HSC smad4与DNA中的CAGA盒的结合明显增高, 但完全活化的HSC及其用TGF- β_1 刺激后, 均未发现smad4与CAGA盒的结合。而目前认为

smad2/3磷酸化后与smad4结合, 转位入核内, 与CAGA盒的结合在TGF- β_1 的信号传导中起重要作用^[12]。(3)完全活化的HSC内源性的TGF- β_1 表达较高, 可能致细胞表面与外源性TGF- β_1 的结合位点减少。以上几点可能引起完全活化的HSC对外界刺激的生物学应答能力下降。但TGF- β_1 亦可通过MAPK等通路影响胶原的表达^[15], 且各种细胞信号转导途径并非各自独立、互不相干, 而是纵横交错、相互影响, 构成一个复杂的细胞信号通路网络^[16], 因此在活化过程中, 是否有其他通路蛋白的表达量、活性或受体空间结构的变化和通路间的相互作用, 及不依赖于受体的调节机制, 有待进一步的研究。

目前, 在肝纤维化治疗实验中, 有不少针对抗TGF- β_1 或其通路蛋白的研究。有发现, 在肝纤维化的大鼠模型中, 抑制TGF- β_1 的合成和通路传导可明显改善肝纤维化^[17], 另外阻断TGF- β_1 的受体对肝纤维化也有逆转作用^[18]。但由于TGF- β_1 在体内的作用广泛, 包括有促进HSC活化、抑制HSC的增殖等, 对肝纤维化的进程作用不一致, 且HSC活化过程中不同阶段对TGF- β_1 刺激的应答有差异, 及活化过程和细胞外基质合成的机制亦可能有不同^[19], 因此在适当的时候减少或扩大TGF- β_1 的作用显得尤为重要, 本实验可为实验药物干预时机的选择提供参考。

4 参考文献

- 1 Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-53
- 2 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 3 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2345-2349
- 4 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-826
- 5 Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d1899-1914
- 6 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*

- 2002; 7: d793-807
- 7 郑伟达, 王小众, 张莉娟, 史美娜. 分离肝星形细胞的简便方法. 福建医科大学学报 2004; 38: 71-73
- 8 Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 1999; 31: 1120-1130
- 9 Shi MN, Huang YH, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Relationship between transforming growth factor beta1 and anti-fibrotic effect of interleukin-10. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2357-2362
- 10 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867
- 11 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4-10
- 12 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 13 Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992; 89: 19-27
- 14 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
- 15 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
- 16 吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 王丕龙. 肝纤维化的信号转导通路. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2223-2228
- 17 Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 123-126
- 18 Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1634-1638
- 19 Lindert S, Wickert L, Sawitza I, Wiercinska E, Gressner AM, Dooley S, Breitkopf K. Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathways leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2. *Matrix Biol* 2005; 24: 198-207

■同行评价

HSC的激活是肝纤维化形成的中心环节, 细胞因子与其激活过程关系密切, 其中内源性TGF- β_1 起关键作用. 但HSC从静止状态转化为活化状态过程中, 对外源性TGF- β_1 的刺激反应如何, 鲜见系统报道. 本实验结果表明TGF- β_1 对部分活化状态中的HSC的活化具有促进作用, 对完全活化HSC的刺激活化作用不敏感, 原因与T β R- II 的表达量无关. 文章结构清晰, 统计分析合理.

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平, 《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐市召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”, 邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告. 会议将出论文汇编, 并授予继续教育 I 类学分, 《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术; 内镜外科的临床应用及进展; 食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等); 消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展; 消化内镜消毒及护理技术, 消化系统疾病的急诊护理.

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印, 并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份; 已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件, 请注明稿号. 应征文章经单位推荐盖章后, 寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收. 邮编: 210003. 信封左下脚注“征文”字样, 同时汇寄审稿费10元. 请自留底稿, 恕不退稿. 截稿日期2007-05-31. 有关会议的具体事项另行通知. 联系电话: 025-83472831, 86086091.