

肝素对大鼠肝星状细胞中转化生长因子 β 1和I型胶原的影响

陈益平, 卢朝升, 汪洪蛟, 徐志伟, 陈均亚, 石海矾, 狄军波

陈益平, 卢朝升, 汪洪蛟, 徐志伟, 陈均亚, 石海矾, 狄军波, 温州医学院附属育英儿童医院感染科 浙江省温州市 325027
温州市科技局基金资助项目, No. Y2004A071
通讯作者: 陈益平, 325027, 温州市学院西路183号, 温州医学院附属育英儿童医院感染科. ccyp@163.com
电话: 0577-88816153
收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-11-07

Effects of heparin on the expression of type I collagen and transforming growth factor β 1 in rat hepatic stellate cells

Yi-Ping Chen, Chao-Sheng Lu, Hong-Jiao Wang, Zhi-Wei Xu, Jun-Ya Chen, Hai-Fan Shi, Jun-Bo Di

Yi-Ping Chen, Chao-Sheng Lu, Hong-Jiao Wang, Zhi-Wei Xu, Jun-Ya Chen, Hai-Fan Shi, Jun-Bo Di, Department of Pediatrics Infectious Diseases, Yuying Affiliated Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325027, Zhejiang Province, China
Supported by: the Science and Technology Project of Wenzhou City, No. Y2004A071

Correspondence to: Yi-Ping Chen, Department of Pediatrics Infectious Diseases, Yuying Affiliated Children's Hospital of Wenzhou Medical College, 183 Xueyuan West Road, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. ccyp@163.com

Received: 2007-07-24 Revised: 2007-11-07

Abstract

AIM: To explore the effects of heparin on the expression of transforming growth factor β 1 and type collagen in rat hepatic stellate cells (HSCs).

METHODS: HSCs were seeded at a density of 1×10^5 cells/L per well in 96-well plates, and grouped as follows: heparin group (10 mg/L), group (100 mg/L), group (1000 mg/L), and NS control group. The incubation liquid was extracted after cells were cultured for 48 hours, and frozen until later use. Type collagen and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and HSC proliferation was measured by MTT assay.

RESULTS: The mean levels of TGF- β 1 in the

heparin and groups were significantly lower than those in the control group (4.59 ± 1.27 ng/L, 3.34 ± 1.13 ng/L vs 5.95 ± 1.72 ng/L, $P < 0.01$). The mean levels of type collagen in groups, and were significantly lower than those in the control group (87.20 ± 9.30 ng/L, 73.17 ± 12.04 ng/L, 63.31 ± 10.93 ng/L vs 95.61 ± 12.55 ng/L, $P < 0.05$). The mean absorbency of cells in heparin group was significantly lower than that in heparin group and the control group (0.29 ± 0.07 vs 0.42 ± 0.12 , 0.46 ± 0.17 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The heparin can decrease expression of type I collagen and TGF- β 1 in HSCs, and inhibit the proliferation of HSCs.

Key Words: Heparin; Hepatic stellate cell; Transforming growth factor β 1; Type collagen; Enzyme-linked immunosorbent assay

Chen YP, Lu CS, Wang HJ, Xu ZW, Chen JY, Shi HF, Di JB. Effects of heparin on the expression of type I collagen and transforming growth factor β 1 in rat hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3629-3632

摘要

目的: 研究肝素与大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)作用后转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)和I型胶原表达的变化及意义。

方法: 大鼠肝星状细胞以 1×10^5 /L浓度接种于96孔培养板, 每孔100 μ L。实验分组为肝素组、肝素组、肝素组, 加入肝素使各组培养液中肝素浓度分别是10, 100, 1000 mg/L, 加生理盐水为对照组(每组6孔重复3次)培养48 h。培养终止后吸取上清液-20℃冰冻保存, ELISA法检测其上清液TGF- β 1和I型胶原水平, MTT法观察细胞增殖情况。

结果: 肝素组和组HSC培养上清液TGF- β 1水平均显著低于对照组(4.59 ± 1.27 ng/L, 3.34 ± 1.13 ng/L vs 5.95 ± 1.72 ng/L, P 均

背景资料
肝星状细胞(HSC)活化并合成大量的细胞外基质(ECM)在肝内沉积是肝纤维化形成、发展的核心环节, TGF- β 1是肝纤维化病理形成中具有重要意义的细胞因子, 型胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 抗纤维化治疗的主要靶点是活化的HSC及其密切相关的细胞因子。

研发前沿
在抗纤维化的实验研究中 TGF- β 1、细胞外基质的变化及相关机制仍是学者们探讨和研究的重点。

创新盘点
肝素在抗肝纤维化作用在临床与动物实验研究得到证实, 本实验是通过肝素作用体外培养的星状细胞观察相应变化, 进一步探讨分子生物学机制。

<0.01), 肝素各组 I 型胶原水平均低于对照组 (87.20±9.30 ng/L, 73.17±12.04 ng/L vs 95.61±12.55 ng/L, 63.31±10.93 ng/L vs 95.61±12.55 ng/L, P 均<0.05), 肝素 I 组平均吸光度低于肝素 II 组和对照组 (0.29±0.07 vs 0.42±0.12, 0.46±0.17, P 均<0.05)。

结论: 大鼠肝星状细胞在肝素作用下 TGF- β 1 和 I 型胶原分泌受抑制, 其增殖减少。

关键词: 肝素; 肝星状细胞; 转化生长因子 β 1; I 型胶原; 酶联免疫吸附测定

陈益平, 卢朝升, 汪洪蛟, 徐志伟, 陈均亚, 石海斌, 狄军波. 肝素对大鼠肝星状细胞中转化生长因子 β 1和 I 型胶原的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3629-3632

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3629.asp>

0 引言

近年研究证实, 肝素除了公认的抗凝血和抗血栓作用外, 还具有抗炎、免疫调节、调节多肽生长因子和抑制细胞增殖等多种生物学活性, 并在抗肝纤维化方面有一定作用^[1-2]。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 活化并合成大量的细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 在肝内沉积导致肝纤维化形成。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 是肝纤维化病理形成中具有重要意义的细胞因子, I 型胶原蛋白是细胞外基质的主要成分。我们用肝素作用于大鼠 HSC, 观察对其 TGF- β 1 与 I 型胶原分泌的变化, 初步探讨肝素抗纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞系 rHSC-99 由北京大学人民医院肝胆外科中心冷希圣教授惠赠^[3]。Rat Type I collagen ELISA 检测试剂盒为 Biomol Research labs Inc. 公司产品, TGF- β 1 ELISA 试剂盒为美国 TPI 公司产品, 胰蛋白酶 (Trypsin) 为美国 Gibco 产品, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 及二甲亚砜 (DMSO) 购于 Sigma 公司, 胎牛血清为杭州四季清产品, D-Hank's 液自配。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝星状细胞的培养: 大鼠肝星状细胞复苏后接种在 100 mL 塑料培养瓶中, 于 50 mL/L 二氧化碳, 95% 湿度空气的培养箱里培养, 24 h 细胞完全贴壁后换液, 以后每 2 d 换 1 次培养液。

1.2.2 ELISA 法检测: TGF- β 1 与 I 型胶原培养瓶

中细胞长成单层后, 弃去培养液, 加入 2.5 mL/L 胰蛋白酶的消化液, 收集消化液, 2200 r/min, 离心 7 min, 弃上清液, 再用 DMEM 培养液离心洗涤一次, 细胞团块用含 200 mL/L 胎牛血清 DMEM 培养液悬浮并计数。用含 DMEM 培养液稀释细胞悬液, 以 1×10^5 /L 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L。24 h 后吸去培养液再用含 10 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养液同步化细胞, 使细胞同步化于静止期。实验分为对照组 (生理盐水), 肝素 I 组、肝素 II 组、肝素 III 组, 加入肝素使得各组培养液中肝素浓度分别是 10, 100, 1000 mg/L (每组 6 孔重复 3 次), 培养 48 h。作用 48 h 后吸取上清液 -20℃ 冰冻保存待检。ELISA 检测 TGF- β 1 和 I 型胶原。

1.2.3 MTT 法检测肝素对 rHSC-99 增殖: 上述在培养 48 h 时终止培养的标本, 分别在每孔加入 5 mg/L MTT 20 μ L, 再培养 4 h, 加入 DMSO 150 μ L 振荡 10 min, 用酶标仪 (波长 570 nm) 测定 HSC 吸光度。

统计学处理 统计数据以 mean±SD 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。数据经 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析 (Oneway ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 和 Dunnett T3 检验。

2 结果

肝素组与对照组的 rHSC-99 培养 48 h, 测定上清液的 TGF- β 1 与 I 型胶原结果见表 1。对照组与肝素 I, II, III 组测定的 TGF- β 1 水平组间变异 F 值为 12.86, $P < 0.01$, 说明四组之间比较有显著差异, 组内两两比较: 肝素 II, III 组的 TGF- β 1 显著低于对照组 ($P < 0.01$), 肝素 III 组 TGF- β 1 浓度显著低于肝素 II, I 组 ($P < 0.01$)。对照组与肝素 I, II, III 组测定的 I 型胶原水平组间变异 F 值为 29.30, $P < 0.01$, 说明四组之间比较有显著差异; 组内两两比较: 肝素 I, II, III 组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

肝素组与对照组的 rHSC-99 培养 48 h, 测定的平均吸光度变化结果见表 1。对照组与肝素 I, II, III 组测定的平均吸光度水平组间变异 F 值为 6.11, $P < 0.01$, 说明四组之间比较有显著差异。

3 讨论

肝素基本结构是带有硫酸基团和乙酰化基团的高度硫酸化的蛋白多糖。近年研究证实, 肝素除了公认的抗凝血和抗血栓作用外, 还具有抗炎、免疫调节、调节多肽生长因子和抑制细胞增殖等多种生物学活性^[1-2]。石军 *et al* 临床用肝

表 1 肝素对rHSC-99 I 型胶原TGF- β 1水平以及增殖的影响($n = 18$, mean \pm SD)

分组	肝素浓度(mg/L)	TGF- β 1 (ng/L)	I 型胶原浓度(ng/L)	平均吸光度
对照组	0	5.95 \pm 1.72	95.61 \pm 12.55	0.46 \pm 0.17
肝素 组	10	5.49 \pm 1.23	87.20 \pm 9.30 ^a	0.42 \pm 0.12
肝素 组	100	4.59 \pm 1.27 ^b	73.17 \pm 12.04 ^a	0.33 \pm 0.14
肝素 组	1000	3.34 \pm 1.13 ^{bd}	63.31 \pm 10.93 ^{ac}	0.29 \pm 0.07 ^a
<i>F</i>		12.86	29.30	6.11
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 肝素 组、肝素 组。

素治疗乙型肝炎患者后,发现肝素可显著降低慢性乙型肝炎患者血清透明质酸型IV型胶原水平,治疗后肝组织胶原纤维增生减轻,肝星状细胞恢复正常,显示肝素有抗肝纤维化的效果^[2]。但肝素抗纤维化作用机理目前尚未完全明了,认为可能与其影响HSC及一些细胞因子有关^[1,4]。在肝纤维化时HSC是TGF- β 1产生的主要细胞,TGF- β 1是促进肝纤维化重要的细胞因子^[5]。各种致病因素作用于肝脏引起的损伤时,可即刻诱导TGF- β 1的表达。在TGF- β 1的作用下激活的HSC向损伤部位迁移和产生胶原,并促进自分泌TGF- β 1,形成正反馈效应,导致=Extra cellular matrix, ECM不断的产生,同时抑制ECM的降解,导致肝纤维化的发生发展^[5-7]。我们发现HSC在体外培养48 h后,在其培养的上清液中可以检测到TGF- β 1,肝素作用48 h后,除低浓度肝素组外,HSC分泌TGF- β 1水平明显低于对照组,说明一定浓度肝素可以抑制HSC的TGF- β 1的分泌。

肝纤维化是一种对坏死脱落的肝组织进行修复的代偿反应。HSC可分泌 I, III, IV型胶原,层黏蛋白(laminin, LN)、纤维连接素(fibronectin, FN)、透明质酸等多种ECM成分,用以修补坏死脱落的肝组织缺损空间,并最终导致肝纤维化。其中 I 型胶原是ECM的主要成分。Stefanovic *et al*^[8]发现HSC活化时 I 型胶原mRNA为静止时的60-70倍,本实验发现, HSC在肝素作用48 h后,其分泌 I 型胶原水平明显低于对照组,说明肝素可以抑制HSC的 I 型胶原的产生,呈现一定浓度依赖性。肝素抑制HSC的 I 型胶原分泌的机制与HSC的增殖受抑制有关^[9]。我们通过MTT比色法测定吸光度的变化反应肝素对培养的肝星状细胞增殖情况。结果发现加入肝素48 h,随着肝素浓度的增加,平均每孔的吸光度随之下降,说明肝素对HSC增殖有抑制作用。HSC增殖抑制,促进其凋亡可减慢或停止纤维化的发展。本实验发

现同样有肝素的作用,但肝素浓度较低的II组、I 组的吸光度和对照组比较无显著差异,而这两组分泌 I 型胶原水平明显低于对照组,说明肝素抑制HSC的 I 型胶原分泌除了引起HSC增殖抑制外可能还有其他的因素。文献[5,10]认为TGF- β 1与HSC I 型胶原表达关系密切。TGF- β 1通过活化Smad信号途径能诱导ECM基因的表达上调,刺激ECM的合成,而促进肝纤维化进程。如果阻断TGF- β 1合成和(或)信号途径显著降低动物纤维化。实验证明用TGF- β 1抑制物可抑制HSC的活化及其功能^[11]。本实验中对对照组HSC的TGF- β 1浓度较高,检测到 I 型胶原也相应较高。加入肝素作用后,随着肝素的浓度增加,TGF- β 1下降同时 I 型胶原随之减少,且剂量越大,抑制作用越强。因此HSC在肝素的作用下TGF- β 1的分泌下降进而抑制HSC I 型胶原的表达。

肝纤维化过程中,细胞与细胞间(激活的Kupffer细胞、损伤的肝细胞、内皮细胞、血小板等与HSC之间),基质与HSC间除TGF- β 1外还有多种细胞因子如结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、TNF- α 、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、IL-6、IL-1等构成复杂的调节网络。HSC活化的信号传导、HSC凋亡的启动因素、凋亡信号的传递途径、凋亡因子之间的相互作用及细胞因子网络在HSC活化和凋亡中的调控等也参与肝纤维化过程^[12-14]。因此抗肝纤维化的药物也是多途径、多靶点、多靶位的作用结果。肝素抗肝纤维化作用机制比较复杂^[15]。本实验发现肝素可能参与影响HSC的TGF- β 1等细胞因子的分泌和胶原的合成而产生抗肝纤维化作用。这只是其中错综复杂的机制的一小部分,其更深层次的作用及相关机制有待探索和研究。明确肝素抗纤维化机

应用要点
肝素抗纤维化临床有效。本实验通过体外细胞深入研究,为肝素抗肝纤维化的分子生物学机制提供了理论参考。

同行评价
本文设计合理, 方法可行, 结果可靠, 具有一定的价值.

制, 对肝纤维化的治疗有重要指导意义.

致谢: 感谢北京大学人民医院肝胆外科中心冷希圣教授对本课题的支持.

4 参考文献

- 1 Xie X, Rivier AS, Zakrzewicz A, Bernimoulin M, Zeng XL, Wessel HP, Schapira M, Spertini O. Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. Studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and with trestatin a sulfate. *J Biol Chem* 2000; 275: 34818-34825
- 2 石军, 郝菁华, 朱菊人, 任万华. 肝素抗肝纤维化作用机制及临床疗效评价. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 215-216
- 3 冷希圣, 翁山耕, 李涛, 魏玉华, 彭吉润, 杜如昱. 大鼠肝星状细胞系的建立及其生物学特性的研究. *解剖学报* 2003; 34: 269-274
- 4 郝菁华, 朱菊人, 石军, 任万华, 孔祥辉. 肝素对肝纤维化大鼠模型作用的疗效观察. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 461-463, 467
- 5 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 6 Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 211-215
- 7 Nepomnyashchikh GI, Aidagulova SV, Nepomnyashchikh DL, Kapustina VI, Postnikova OA. Ultrastructural and immunohistochemical study of hepatic stellate cells over the course of infectious viral fibrosis and cirrhosis of the liver. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142: 723-728
- 8 Stefanovic B, Hellerbrand C, Holcik M, Briendl M, Aliebbhaber S, Brenner DA. Posttranscriptional regulation of collagen alpha1(I) mRNA in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5201-5209
- 9 李文才, 张锦生, 黄光存, 朱虹光, 张秀荣, 张月娥. 肝素对大鼠肝星状细胞生长、细胞外基质和基质金属蛋白酶基因表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 200-202
- 10 Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224
- 11 Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int* 2006; 26: 1283-1290
- 12 Cheng Y, Ping J, Xu LM. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 794-801
- 13 Uchio K, Graham M, Dean NM, Rosenbaum J, Desmouliere A. Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 60-66
- 14 Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen AM, Reker-Smit C, Meijer DK, Lacombe M, Opdam F, Keri G, Orfi L, Poelstra K, Kok RJ. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 856-865
- 15 Abe W, Ikejima K, Lang T, Okumura K, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 2007; 46: 286-294

编辑 李军亮 电编 马文华