

血管紧张素II对肝星状细胞迁移和增殖的影响

杨玲, 朱清静, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐

■背景资料

肝星状细胞(HSC)是肝纤维化发生、发展的关键环节, ANG II在肝纤维化的进展过程中发挥了重要作用。

杨玲, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
朱清静, 湖北省中医院肝病中心 湖北省武汉市 430061
国家自然科学基金青年基金资助项目, No. 30500658
中国博士后科学基金资助项目, No. 2004035198
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2004ABA236
通讯作者: 侯晓华, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. houxh@public.wh.hb.cn
电话: 027-85726930
收稿日期: 2006-12-25 接受日期: 2007-01-20

Effect of angiotensin II on the proliferation and migration of hepatic stellate cells

Ling Yang, Qing-Jing Zhu, Xiao-Hua Hou, Sheng-Jun Hu, Min Xu, Rui Zhu

Ling Yang, Xiao-Hua Hou, Sheng-Jun Hu, Min Xu, Rui Zhu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Qing-Jing Zhu, Center of Liver Diseases, Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation (Youth Foundation) of China, No. 30500658, the Postdoctoral Science Foundation of China, No. 2004035198, and the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2004ABA236
Correspondence to: Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. houxh@public.wh.hb.cn
Received: 2006-12-25 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To explore the changes of the proliferation and migration ability of hepatic stellate cells (HSCs) induced by angiotensin II (ANG II).

METHODS: HSCs were incubated *in vitro*. The proliferation and migration ability of HSCs induced by ANG II at different concentration were observed with MTT assay and Transwell chamber assay, respectively.

RESULTS: The proliferation of HSCs was significantly increased when ANG II was used at the concentrations of 1, 2, 4, 8 and 10 $\mu\text{mol/L}$ in comparison with that in the control cells ($F = 2.305$, $P < 0.05$; $F = 4.003$, 6.833, 8.855, 21.066, $P < 0.01$). With the increasing of ANG II concen-

tration, the proliferative activity was increased, showing a positive correlation ($r = 0.917$, $P < 0.01$). ANG II at the concentrations of 10, 8 and 4 $\mu\text{mol/L}$ markedly induced the migration of HSCs ($F = 22.084$, 15.155, 10.392, $P < 0.01$). The migration ability of HSCs was also positively correlated with the concentrations of ANG II ($r = 0.952$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: ANG II can significantly induce the proliferation and migration of HSCs in a dose-dependent manner.

Key Words: Angiotensin II; Hepatic stellate cell; Migration; Proliferation; MTT assay

Yang L, Zhu QJ, Hou XH, Hu SJ, Xu M, Zhu R. Effect of angiotensin II on the proliferation and migration of hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1004-1007

摘要

目的: 探讨血管紧张素II (ANG II)对肝星状细胞(HSC)增殖、迁移活性的影响。

方法: 体外培养HSC, 在不同浓度的ANG II作用下, 观察HSCs生长情况并绘制生长曲线, 采用MTT法测定细胞增殖、Transwell小室检测细胞迁移。

结果: 1, 2, 4, 8, 10 $\mu\text{mol/L}$ ANG II可显著促进HSC增殖, 与空白对照组相比有显著差异($F = 2.305$, $P < 0.05$; $F = 4.003$, 6.833, 8.855, 21.066, $P < 0.01$)。随作用浓度的增加, 细胞增殖活性显著提高, 相关分析显示呈正相关($r = 0.917$, $P < 0.01$)。10, 8, 4 $\mu\text{mol/L}$ 的ANG II可显著诱导HSC迁移, 与空白对照组相比差异显著($F = 22.084$, 15.155, 10.392, $P < 0.01$)。随ANG II浓度的增加, 细胞迁移率显著升高, 相关分析显示呈正相关($r = 0.952$, $P < 0.01$)。

结论: ANG II可显著诱导HSC增殖与迁移, 并随剂量的增加作用加强。

关键词: 血管紧张素II; 肝星状细胞; 细胞迁移; 增殖; MTT法

杨玲, 朱清静, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐. 血管紧张素II对肝星状细胞迁移和增殖的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1004-1007
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1004.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)位于Disse间隙, 紧贴肝窦内皮细胞和肝细胞, 正常肝脏中HSC的数目很少, 约占肝细胞总数的5%-8%, 富含VitA脂滴, 参与VitA代谢和合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[1-2]. 当肝脏受到各种损伤时, HSC被活化并向肌纤维母细胞转化, 主要表现为细胞增殖、游动、收缩能力增强及细胞因子(TGF- β , TGF- α , FGF, IGF-1等)和ECM的大量合成, 从而对自身增殖、ECM的合成和静止期HSC的增生、转化及蛋白多糖合成进行调控. 因此目前认为HSC活化是肝纤维化发生、发展的关键环节.

血管紧张素II(angiotensin II, ANG II)为肾素-血管紧张素系统(RAS)最主要的生物活性肽, ANG II在肝纤维化的进展过程中发挥了重要作用. 研究显示, ANG II可诱导HSC增殖、收缩^[3]、分泌细胞外基质, 调节肝窦微循环^[4]; 同时HSC可表达AT1R^[5], 并能分泌ANG II^[6]. ANG II参与组织损伤修复, 而损伤肝组织局部ANG II分泌增加是否与ANG II促进HSC向损伤部位迁移有关, 尚较少有报道. 本文观察了ANG II对HSC增殖、迁移的影响, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 HSC系(HSC-T6)由上海中医药大学徐列明教授惠赠. DMEM培养基购自Gibco公司, TRIzol试剂盒为罗氏公司产品, RNA酶抑制剂、M-MLV逆转录酶及PCR扩增试剂均购自Promega公司. MTT, ANG II购自Sigma公司. Transwell小室购自Corning公司.

1.2 方法

1.2.1 HSC的培养及增殖的测定 HSC-T6于37℃、50 mL/L CO₂的含100 mL/L小牛血清、10⁵ U/L青霉素、100 g/L链霉素、10 g/L L-谷氨酰胺的DMEM培养液中培养, 24 h后去培养基, 加入含0, 1, 2, 4, 8, 10 μ mol/L ANG II的50 mL/L小牛血清DMEM继续培养48 h后进行MTT实验, 每组3复孔. 去培养基(翻板), 每孔加20 μ L 5 g/L MTT溶液, 孵育4 h, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 100 μ L, 在微型混合器上振荡2 min, 10 min后于全自动酶标仪上测定A₄₉₀值.

1.2.2 细胞迁移实验 采用Transwell法, Transwell小室滤膜为8 μ m孔径的聚碳酸脂微孔滤膜. Transwell小室下室中分别加入0.6 mL含4, 8, 10 μ mol/L ANG II的DMEM培养液(含50 mL/L小牛血清)作为化学趋化物, 取对数生长期HSC-T6用EDTA消化后, DMEM培养基调成单细胞悬液, 细胞浓度为1.0 \times 10⁹/L, 加入0.2 mL于上室, 37℃培养24 h后取出滤膜, 棉签拭去上室滤膜内表面残存细胞, 对迁移至滤膜外表面的细胞用20 g/L多聚甲醛固定, PBS洗涤, 苏木素染色. 显微镜下计数, 每张滤膜随机取5个视野(\times 200)计穿膜细胞数并取均值.

统计学处理 结果用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 用SPSS11.5软件进行单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 不同浓度ANG II对HSC增殖的影响 与空白组比较, 1, 2, 4, 8, 10 μ mol/L ANG II可显著促进HSC增殖, F 值分别为2.305($P<0.05$), 4.003($P<0.01$), 6.833($P<0.01$), 8.855($P<0.01$), 21.066($P<0.01$). 随作用浓度的增加, 细胞增殖活性显著提高, 相关分析显示相关系数 $r = 0.917$, $P<0.01$ (表1).

2.2 不同浓度ANG II对HSC迁移的影响 与空白对照组比较, 10, 8, 4 μ mol/L ANG II组 F 值分别为22.084, 15.155, 10.392, 均 $P<0.01$, 表明经ANG II诱导后HSC的迁移能力显著增加, 随ANG II浓度的增加, 细胞迁移率显著升高, 相关分析显示相关系数 $r = 0.952$, 差异有显著性($P<0.01$, 表2).

3 讨论

HSC是肝纤维化形成的主要效应细胞, 致纤维化因子激活HSC, 使其获得肌成纤维细胞表型, 表现为细胞增殖, 合成大量的细胞外基质, 分泌趋化因子、细胞因子, 并获得细胞运动和收缩功能, 向损伤部位迁移聚集, 直接参与损伤修复, 加速胶原沉积, 促进纤维化进程.

ANG II是由内皮细胞及循环中血管紧张素转换酶作用产生的, 为经典的内分泌激素, 在调节血压及钠稳态方面发挥了重要作用. ANG II尚具有独立于调节血压以外的其他作用, 如促进细胞有丝分裂增殖等. ANG II作为一种强烈的有丝分裂原, 最近有证据显示ANG II可能是促肝纤维化重要的介质: 在肝硬化患者通常伴

■研究前沿

ANG II可诱导HSC增殖、收缩、分泌细胞外基质, 调节肝窦微循环; 同时HSC可表达AT1R, 并能分泌ANG II. ANG II参与组织损伤修复, 而损伤肝组织局部ANG II分泌增加是否与ANG II促进HSC向损伤部位迁移有关, 尚较少有报道.

■应用要点

本文观察了ANG II对HSC增殖、迁移的影响,发现活化的HSC经ANG II诱导后,迁移能力显著增强,并随ANG II诱导浓度的增加,HSC迁移能力也随之提高,说明ANG II作为一种趋化因子,可通过诱导HSC迁移,促进肝纤维化的发生。有效阻止HSC向损伤部位的迁移,则有利于阻止肝纤维化的进展。

表 1 不同浓度ANG II对HSC增殖的影响(mean ± SD, n = 3)

分组	A ₄₉₀ 吸光值	F值
0 μmol/L	0.1097 ± 0.0020	—
1 μmol/L	0.1287 ± 0.0035 ^a	2.305
2 μmol/L	0.1427 ± 0.0158 ^a	4.003
4 μmol/L	0.1660 ± 0.0122 ^b	6.833
8 μmol/L	0.1827 ± 0.0038 ^b	8.855
10 μmol/L	0.2833 ± 0.0136 ^b	21.066

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs ANG II 0 μmol/L组。

有血清ANG II水平的升高和肝组织中血管紧张素转化酶及ANG II 1型受体的表达增强^[7];在实验性肝纤维化动物模型中也发现肝组织局部的肾素血管紧张素系统是上调表达的^[8];ANG II水平呈进展性升高,与肝纤维化程度及肝功能减退密切相关^[9];应用ANG II进行全身灌注则可显著加速实验大鼠肝纤维化的进程^[10]。临床上具有ANG II遗传多态性并伴有ANG II合成增加的丙型肝炎患者,常更易发展为重度的肝纤维化^[11];在非酒精性脂肪性肝炎患者,应用ANG II受体拮抗剂则可显著抑制HSC的活化^[12]。而且动物实验显示,抑制ANG II的合成和/或阻断ANG II受体的作用,则可显著减轻肝脏炎症反应及纤维化程度^[13]。因此有效抑制ANG II的生物学效应,为肝纤维化防治的重要策略。进一步研究显示,ANG II可促进肝脏细胞外基质增生,直接刺激细胞内Ca²⁺内流,诱导HSC收缩活化、促使静息性HSC向活化性HSC转化,并导致静息性HSC的进一步激活,启动肝纤维化进程^[3];通过其受体AT1R可刺激TGF-β₁分泌,增强TGF-β₁的致纤维化作用;通过上调间质α-肌动蛋白的表达,促进成纤维细胞的表型转化或增加成纤维细胞数目,促进间质增生及结构基质蛋白(胶原及FN)合成^[14]。本研究亦证实ANG II可显著诱导HSC增殖,随剂量的增加作用加强,但在药物作用浓度上与其他研究存在一定差异^[15],这可能与实验条件及所用的细胞不同有关。

细胞迁移是机体正常生长发育必不可少的重要环节,在组织损伤或感染过程中,通常伴有特定细胞向损伤部位的迁移。肝纤维化是肝脏对各种因素所致的慢性损伤的一种修复反应^[16]。活化的HSC向损伤部位迁移,分泌细胞外基质,促进瘢痕的形成,从而促进肝纤维化的发生和肝窦微循环的障碍。因此有效阻止HSC向损伤

表 2 不同浓度ANG II对HSC迁移的影响(mean ± SD, n = 3)

分组	细胞迁移数	F值
0 μmol/L	1.600 ± 0.547	—
4 μmol/L	9.000 ± 1.581 ^b	10.392
8 μmol/L	12.600 ± 1.140 ^b	15.155
10 μmol/L	17.400 ± 2.073 ^b	22.084

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs ANG II 0 μmol/L组。

部位的迁移,则可阻止肝纤维化的进展。ANG II作为一种致炎因子,可显著诱导血管平滑肌细胞、成纤维细胞及肾小球系膜细胞迁移^[17-19],在心肌纤维化、肾脏纤维化及皮肤斑痕形成方面发挥了重要作用。肝损伤时,活化的HSC可分泌多种致纤维化细胞因子,ANG II作为主要的致纤维化介质是否参与了活化HSC的迁移呢?我们采用Transwell小室在体外观察了ANG II对HSC迁移的影响,发现活化的HSC经ANG II诱导后,迁移能力显著增强,并随ANG II诱导浓度的增加,HSC迁移能力也随之提高,说明ANG II作为一种趋化因子,可通过诱导HSC向损伤局部组织迁移,促进损伤部位细胞外基质的合成,加速肝纤维化的进程。而如何在体内模型中证实ANG II在肝损伤后细胞迁移中的作用及ANG II调控HSC迁移的机制则是今后进一步研究的重点。

4 参考文献

- 1 张锦生. 肝星状细胞激活的内在机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 831-834
- 2 饶慧琪, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 671-674
- 3 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
- 4 张芝军, 杨希山, 吴平生, 张晓峰, 陈晓清, 曾建英. 血管紧张素II和洛沙坦对肝星状细胞合成胶原的影响. 中国病理生理杂志 2004; 20: 1842-1845
- 5 Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl₄. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 583-587
- 6 Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, Gutierrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodes J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125: 117-125
- 7 Ikura Y, Ohsawa M, Shirai N, Sugama Y, Fukushima H, Suekane T, Hirayama M, Ehara

- S, Naruko T, Ueda M. Expression of angiotensin II type 1 receptor in human cirrhotic livers: Its relation to fibrosis and portal hypertension. *Hepatol Res* 2005; 32: 107-116
- 8 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl₄(4). *World J Gastroenterol* 2000; 6: 824-828
- 9 Pereira RM, Dos Santos RA, Teixeira MM, Leite VH, Costa LP, da Costa Dias FL, Barcelos LS, Collares GB, Simoes E Silva AC. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J Hepatol* 2006
- 10 Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA, Rippe RA. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology* 2005; 41: 1046-1055
- 11 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31: 828-833
- 12 Yokohama S, Tokusashi Y, Nakamura K, Tamaki Y, Okamoto S, Okada M, Aso K, Hasegawa T, Aoshima M, Miyokawa N, Haneda M, Yoneda M. Inhibitory effect of angiotensin II receptor antagonist on hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 322-326
- 13 Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Iwai M, Horiuchi M, Chayama K. Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl₄-induced liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 658-664
- 14 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750
- 15 张艺军, 杨希山, 吴平生, 李旭, 张晓峰, 陈晓清, 余中逊. 血管紧张素II和洛沙坦对肝星状细胞生长、增殖的影响. 第一军医大学学报 2003; 23: 219-227
- 16 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 17 Takeuchi Y, Yamauchi K, Nakamura J, Shigematsu S, Hashizume K. Angiotensin II regulates migration in mouse cultured mesangial cells: evidence for the presence of receptor subtype-specific regulation. *J Endocrinol* 2006; 191: 361-367
- 18 Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Tohyama M, Tsuda T, Sayama K, Iwai M, Horiuchi M, Hashimoto K. A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J Biol Chem* 2006; 281: 13209-13216
- 19 Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells* 2005; 20: 263-270

■同行评价

本文研究了血管紧张素II对HSC迁移、增殖的影响, 文章内容较新颖, 有较高研究意义。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6。[中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心]。