

# IL-10对TGF- $\beta_1$ 诱导的大鼠肝星状细胞CTGF表达的影响

杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟

## ■背景资料

肝纤维化是由众多因素参与复杂的病理过程。肝星状细胞(HSC)的活化在肝纤维化过程中起核心作用, 在各种因素刺激下, HSC增殖, 移行, 表达各种细胞外信号转导通路蛋白, 产生大量以胶原为主的细胞外基质(ECM)成分和细胞因子, 促进肝纤维化的发生发展。TGF- $\beta_1$ 是强有力的致纤维化的细胞因子, 促进HSC增殖活化, 合成大量ECM, 在纤维化进程中起重要作用。目前, 抗纤维化药物仍存在其局限性, 进一步研究肝纤维化的机制, 有助于开发研究新药物控制或延缓肝纤维化的发展。

## ■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学第二医院感染科; 张明辉, 副主任医师, 河北医科大学第一医院肝病中心(传染病)

杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

**作者贡献分布:** 此实验由杨悦杰与黄芬设计; 研究过程由杨悦杰, 胡静及马力操作完成; 研究方法指导及分析工具由马力提供; 数据分析由杨悦杰, 黄芬, 胡静及李智伟完成; 本论文写作由杨悦杰, 黄芬及李智伟完成。

**通讯作者:** 黄芬, 110004, 辽宁省沈阳市, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科。

hfzyq1962@sina.com

电话: 024-83956429

收稿日期: 2008-02-28 修回日期: 2008-04-17

接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-08

## Effect of interleukin-10 on TGF- $\beta_1$ -induced CTGF expression in hepatic stellate cells

Yue-Jie Yang, Fen Huang, Jing Hu, Li Ma, Zhi-Wei Li

Yue-Jie Yang, Fen Huang, Jing Hu, Li Ma, Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Fen Huang, Department of Infectious Diseases, Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. hfzyq1962@sina.com

Received: 2008-02-28 Revised: 2008-04-17

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of interleukin-10 (IL-10) on the expression of connective tissue growth factor (CTGF) in hepatic stellate cells (HSC) and its possible antifibrogenic mechanism.

**METHODS:** Hepatic stellate cells (rHSC-99) cultured in vitro was exposed to various concentrations of IL-10 and/or TGF- $\beta_1$  for 48 h and then expression level of CTGF mRNA was measured by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** The expression level of CTGF mRNA, compared with control group, markedly increased when HSC was only exposed to TGF- $\beta_1$  ( $P < 0.05$ ); when HSC was only exposed to various concentrations of IL-10, target gene expression showed no significance; the expression level of CTGF mRNA markedly decreased when HSC was exposed to TGF- $\beta_1$  in combina-

tion with different concentrations of IL-10 ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** IL-10 remarkably inhibits TGF- $\beta_1$ -induced CTGF mRNA expression, which is thought to be one possible antifibrogenic mechanism.

**Key Words:** Interleukin-10; Transforming growth factor; Hepatic stellate cell; Connective tissue growth factor

Yang YJ, Huang F, Hu J, Ma L, Li ZW. Effect of interleukin-10 on TGF- $\beta_1$ -induced CTGF expression in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2154-2157

## 摘要

**目的:** 探讨IL-10对大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)表达CTGF的影响及其抗纤维化的可能机制。

**方法:** 体外培养大鼠肝星状细胞系rHSC-99, 分别用不同浓度的IL-10、TGF- $\beta_1$ 干预和两者共同干预48 h后, 采用半定量 RT-PCR法检测各组肝星状细胞中CTGF mRNA表达水平。

**结果:** TGF- $\beta_1$ 单独干预HSC, CTGF mRNA表达水平与对照组比较均明显增强( $P < 0.05$ ); 不同浓度的IL-10单独干预HSC, 各目的基因表达与对照组比较无明显统计学意义; 不同浓度的IL-10与TGF- $\beta_1$ 共同干预HSC, CTGF mRNA表达水平与TGF- $\beta_1$ 组比较均明显降低( $P < 0.05$ )。

**结论:** IL-10可显著抑制由TGF- $\beta_1$ 诱导的CTGF mRNA的表达, 这可能是其抗纤维化的机制之一。

**关键词:** 白介素-10; 转化生长因子; 肝星状细胞; 结缔组织生长因子

杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟. IL-10对TGF- $\beta_1$ 诱导的大鼠肝星状细胞CTGF表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2154-2157

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2154.asp>

## 0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝纤维化时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过多产生和沉积的主要细胞来源, HSC的激活、增殖在肝纤维化过程中起核心作用. 转化生长因子 $\beta_1$ (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )是强有力的致纤维化的细胞因子, 在肝纤维化时表达明显增多, 促进HSC增殖活化, 合成大量ECM, 在纤维化进程中起重要作用<sup>[1]</sup>. 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是近年来新发现的一种细胞因子, 肝纤维化时肝组织内与血清中CTGF明显增高, 其程度与肝纤维化的病理进展水平呈平行相关关系, CTGF可能是TGF $\beta$ 的下游效应介质, 可以介导TGF $\beta$ 的促细胞外基质效应, 而不影响TGF $\beta$ 免疫抑制和抗细胞增殖效应,是具有多种生理功能的细胞因子, 近年来成为研究热点之一<sup>[2]</sup>. 白介素-10(interleukin-10, IL-10)是一种炎症抑制因子, 临床和动物实验表明, IL-10可减轻肝脏炎症, 抑制肝纤维化的发展, 可望发展为抗肝纤维化药物, 但其作用机制尚未明确. 我们用IL-10及TGF $\beta_1$ 干预和共干预体外培养的大鼠肝星状细胞系 $\gamma$ -HSC99, 采用半定量RT-PCR法检测各组CTGF mRNA表达, 进一步探讨IL-10抗肝纤维化的作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料  $\gamma$ -HSC99细胞系<sup>[3]</sup>, 为活化的大鼠肝脏星状细胞, 由北京大学附属医院人民医院肝胆外科实验室冷希圣教授惠赠; TGF $\beta_1$ 及重组大鼠IL-10购自Peprotech公司; 逆转录试剂盒和Taq酶购自大连宝生物公司; 引物由Invitrogen公司合成; 总RNA提取试剂(Trizol)购自Invitrogen公司; DEPC和琼脂糖购自Sigma公司; DNA marker购自MBI公司; DMEM培养基购自Gibco公司.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将 $\gamma$ -HSC99细胞复苏后接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 每瓶加入5 mL含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液, 置37℃、50 mL/L恒温CO<sub>2</sub>培养箱中, 细胞为贴壁生长, 每1-2 d以2.5 g/L胰蛋白酶消化传代.

1.2.2 实验分组: A: 对照组加磷酸盐缓冲液; B: TGF $\beta_1$  8  $\mu$ g/L组; C: IL-10 10  $\mu$ g/L组; D: IL-10 20  $\mu$ g/L组; E: IL-10 40  $\mu$ g/L组; F: TGF $\beta_1$  8  $\mu$ g/L+IL-10 10  $\mu$ g/L组; G: TGF $\beta_1$  8  $\mu$ g/L+IL-10 20  $\mu$ g/L组; H: TGF $\beta_1$  8  $\mu$ g/L+IL-10 40  $\mu$ g/L组.

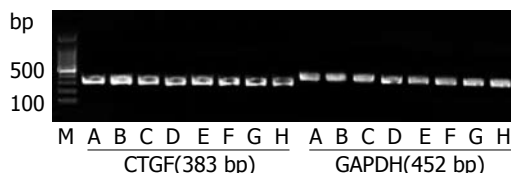


图1 HSC CTGF/GAPDH mRNA RT-PCR产物电泳图.

1.2.3 RT-PCR法检测CTGF mRNA的表达: 用TRIzol试剂提取细胞总RNA; 用分光光度法测定RNA含量及纯度,  $A_{260}:A_{280}$ 比值均在在1.8-2.0之间. 采用两步法RT-PCR技术, 设置GAPDH为内参照. 引物序列: CTGF 5'-CTAAGACCTGTGGAATGGGC-3'(上游), 5'-CTCA AAGATGTCATTGTCCCC-3'(下游); GAPDH 5'-TGGGACGATATGGAGAAGAT-3'(上游), 5'-ATTGCCGATAGTGATGACCT-3'(下游). 用RNA PCR Kit(AMV)Ver. 310试剂盒进行逆转录聚合酶链式反应, cDNA合成和预变性: 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min进行1次循环, CTGF PCR扩增条件: 94℃ 2 min进行1次循环, 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 50 s进行32次循环. 取RT-PCR产物在12 g/L琼脂糖凝胶上电泳(100 V, 30 min), 用GDS凝胶成像系统拍摄电泳结果, 各带用计算机图像分析系统扫描定量.

统计学处理 数据以mean $\pm$ SD表示, 各组之间是否存在显著性差异分析采用One-way ANOVA分析. 进一步各实验组与对照组的比较采用最小显著差值法LSD-*t*检验.  $P<0.05$ 确定差异有无显著意义.

## 2 结果

2.1 目的基因PCR扩增结果 以细胞总RNA为模板, 进行RT-PCR反应, 扩增产物经凝胶电泳可见分别于383 bp(CTGF)及452 bp(GAPDH)处的清晰扩增条带(图1).

2.2 灰度分析结果 A-H组CTGF/GAPDH分别为1.02 $\pm$ 0.12, 1.38 $\pm$ 0.07, 1.05 $\pm$ 0.09, 1.01 $\pm$ 0.10, 1.01 $\pm$ 0.11, 0.82 $\pm$ 0.03, 0.72 $\pm$ 0.04, 0.62 $\pm$ 0.06. TGF $\beta_1$ 组HSC细胞CTGF mRNA表达明显升高, 与空白对照组(A组)比较, 差别有统计学意义( $P<0.05$ ); IL-10各浓度组(C-E组)与空白对照组比较, 基因表达差别无明显统计学意义; 同时加入TGF $\beta_1$ 及不同浓度的IL-10(F-H组)与TGF $\beta_1$ 组(B组)比较, CTGF mRNA表达均明显降低, 差别有统计学意义( $P<0.05$ ), 并呈剂量依赖效应, 说明IL-10对TGF $\beta_1$ 诱导的CTGF表达有明显的抑制作用(图2).

### ■ 研发前沿

采用CCl<sub>4</sub>构建肝纤维化模型, IL-10基因敲除小鼠较野生型小鼠肝纤维化程度明显加重, 提示内源性IL-10对肝纤维化起抑制作用. 临床试验显示外源性IL-10可减轻患者及动物模型的肝纤维化程度, 但其作用机制尚不明确.

### ■ 相关报道

最近研究显示, IL-10与慢性肝损害发生发展关系密切, 且具有抗纤维化效应, 可望成为治疗肝纤维化的药物, 但其作用机制尚不明确. CTGF是近年来新发现的一种细胞因子, 可能是TGF- $\beta$ 下游信号效应分子, 特异地介导TGF- $\beta$ 促纤维化效应, 而不影响TGF- $\beta$ 免疫抑制和抗细胞增殖效应. 因此, 作为组织器官纤维化形成过程中的重要介质, CTGF的发现可能为防治肝纤维化提供一个新的靶标.

## ■应用要点

本研究发现IL-10可显著抑制由TGF- $\beta_1$ 诱导的CTGF mRNA的表达,这可能是IL-10抗纤维化作用机制之一,有助于进一步指导IL-10的临床应用。

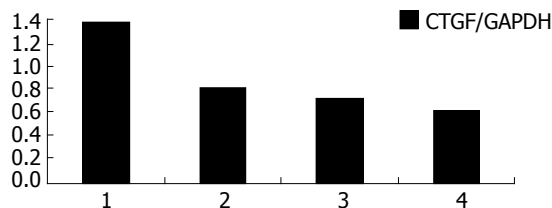


图2 IL-10对CTGF表达抑制作用. 1: TGF $\beta_1$ ; 2: TGF $\beta_1$  + IL-10 10  $\mu$ g/L; 3: TGF $\beta_1$  + IL-10 20  $\mu$ g/L; 4: TGF $\beta_1$  + IL-10 40  $\mu$ g/L;

### 3 讨论

肝纤维化是肝组织内ECM过度增生和沉积,降解相对不足的病理过程, HSC的激活和增殖在肝纤维化过程中起核心作用,以HSC为靶向的研究是近年来抗纤维化机制方面的研究热点. 多项研究表明, TGF $\beta_1$ 是强有力的致纤维化细胞因子,在肝纤维化是表达明显增多,可促进HSC的增殖和活化,使ECM成分合成增多,降解减少,并存在正反馈放大效应,促进肝纤维化的进程<sup>[4-7]</sup>. CTGF是近年来新发现的一种细胞因子,是具有高度保守性的即刻早期基因CNN家族成员之一. CTGF与肝纤维化有密切的关系<sup>[8]</sup>. 人类慢性肝病、肝纤维化及实验性肝纤维化发生发展过程中均与CTGF表达有关,主要是HSC-CTGF mRNA的表达上调, Crean *et al*<sup>[9]</sup>用抗CTGF的中和抗体可阻断TGF $\beta_1$ 引起的促纤维化效应. Mori *et al*<sup>[10]</sup>在小鼠皮肤纤维化模型中, TGF $\beta_1$ 可引起短期纤维组织增生,若同时注射CTGF则可引起持续稳定的纤维组织增生. 进一步研究发现, CTGF启动子中存在TGF- $\beta$ 反应元件,提示这可能是TGF- $\beta$ 选择性上调CTGF基因表达的分子基础. CTGF可能是TGF- $\beta$ 下游信号效应分子,特异地介导TGF- $\beta$ 促纤维化效应<sup>[11-12]</sup>,而不影响TGF- $\beta_1$ 免疫抑制和抗细胞增殖效应. 因此,作为组织器官纤维化形成过程中的重要介质, CTGF的发现可能为防治肝纤维化提供一个新的靶标. 目前,抗纤维化药物仍存在其局限性,进一步研究肝纤维化的机制,有助于开发研究新药物控制或延缓肝纤维化的发展. 最近文献资料显示, IL-10与慢性肝损害发生发展关系密切,且具有抗纤维化效应,可望成为治疗肝纤维化的药物. IL-10是由Th2细胞、巨噬细胞和活化的B细胞产生一种细胞因子. 是一类抑制性免疫调节因子,具有强大的抑制炎症和巨噬细胞功能的作用. 采用CCl<sub>4</sub>构建肝纤维化模型, IL-10基因敲除小鼠较野生型小鼠肝纤维化程度明显加重<sup>[13-14]</sup>,提示内源性IL-10对肝纤维

化起抑制作用. Nelson *et al*<sup>[15]</sup>临床试验显示外源性IL-10可减轻患者及动物模型的肝纤维化程度,但其作用机制尚不明确. 我们建立了TGF $\beta_1$ 与IL-10干预和共干预体外培养的HSC细胞模型,采用半定量RT-PCR法检测CTGF mRNA的表达,结果显示HSC经TGF $\beta_1$ 进一步诱导活化,表达CTGF mRNA明显增多,这与以往的研究结果一致; IL-10单独干预, IL-10各浓度组与空白对照组比较,差别无统计学意义,说明单用IL-10对HSC CTGF mRNA表达无明显作用; IL-10与TGF $\beta_1$ 共同干预,与TGF $\beta_1$ 组比较, CTGF mRNA表达明显减少,且以IL-10 40  $\mu$ g/L+TGF $\beta_1$  8  $\mu$ g/L组抑制作用最明显,差别有统计学意义,说明IL-10对TGF $\beta_1$ 诱导的CTGF mRNA表达有明显的抑制作用. 因此我们推断, IL-10可通过抑制TGF $\beta_1$ 诱导的CTGF基因表达而发挥抗纤维化效应,这可能是IL-10抗纤维化机制之一.

### 4 参考文献

- 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
- Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takehara K. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 2005; 203: 447-456
- 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: 272-277
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2572-2576
- Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-G1068
- Schnur J, Olah J, Szepesi A, Nagy P, Thorgeirsson SS. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 127-133
- Hayashi N, Kakimura T, Soma Y, Grotendorst GR, Tamaki K, Harada M, Igarashi A. Connective tissue growth factor is directly related to liver fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 133-135
- Crean JK, Finlay D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR. The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor

- induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 44187-44194
- 10 Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999; 181: 153-159
- 11 Williams EJ, Gaca MD, Brigstock DR, Arthur MJ, Benyon RC. Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 32: 754-761
- 12 Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2002; 82: 767-774
- 13 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615
- 14 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. *Hepatology* 1998; 28: 1518-1524
- 15 Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; 118: 655-660

#### ■同行评价

本研究方法合理可行, 结果有价值, 对临床基础研究的突破有意义。如果进一步探讨IL-10与TGF $\beta_1$ 的最佳搭配浓度, 结合机体本身病例状态下观察则更有价值。

编辑 潘伯荣 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志修回稿须知

**本刊讯** 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下。

#### 1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

#### 2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

#### 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2008-07-08)