

激活素 A 对 LX-2 分泌细胞外基质的影响

汪涌¹ 方胜英¹ 朱励² 祝剑方² 曾令兰¹

[摘要] 目的:了解激活素 A(ACTA)对体外培养的人肝星状细胞(HSC)系 LX-2 细胞分泌细胞外基质(ECM)的影响。方法:将培养的 LX-2 细胞分成 5 组,除正常对照组外,其余 4 组分别加入浓度为 10、20、100、200 $\mu\text{g/L}$ ACTA,作用 24、48 和 72 h 后取培养上清,用化学免疫发光法检测Ⅲ型前胶原 N 端肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-COL)、透明质酸(HA)及层粘连蛋白(LN)的含量。结果:ACTA 刺激后的 PⅢNP、Ⅳ-COL 和 HA 表达水平均呈上升趋势,表现出与时间和剂量较强的依赖关系(成正比);而 LH 仅在后期(72 h)将 ACTA 上调到 200 $\mu\text{g/L}$ 时,与正常对照组比才出现统计性差异。结论:ACTA 能成功诱导 HSC 分泌 ECM;PⅢNP 等 4 项指标均能反映 ACTA 参与了肝纤维化的发生发展过程以及肝纤维化病理程度;如何阻断 ACTA 途径,为今后预防和治疗肝纤维化提供了新思路。

[关键词] 激活素 A;肝星状细胞;细胞外基质;肝纤维化

[中图分类号] R329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)10-0633-03

Effects of activin A on extracellular matrix secretion of LX-2

WANG Yong¹ FANG Shengying¹ ZHU Li² ZHU Jianfang² ZENG Linglan¹

(¹The Department of Infections Diseases Laboratory, Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Center Laboratory, Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology) Corresponding author: ZENG Linglan, E-mail: xhyerck@163.com

Abstract Objective: To learn the effects of activin A on the secretion of extracellular matrix(ECM) in vitro cultured LX-2 cell. **Method:** Cultured LX-2 cells were divided into five groups. In addition to the normal control group, the rest four groups were added different concentrations of activin A 10, 20, 100 and 200 $\mu\text{g/L}$, respectively. The contents of amino-terminal peptide of procollagen type Ⅲ (PⅢNP), collagen type Ⅳ (Ⅳ-COL), hyaluronic acid(HA) and laminin(LN) in culture supernatants were detected by chemiluminescence after 24, 48 and 72 h, respectively. **Result:** The secretion of PⅢNP, Ⅳ-COL and HA in HSC were enhanced by activin A according to its concentration(10-200 $\mu\text{g/L}$) in a time dose-dependent manner. Activin A had no effect on LN at 10-100 $\mu\text{g/L}$ ($P > 0.05$), while significant difference was presented after 72 h in the 200 $\mu\text{g/L}$ activin A intervention group than that in the normal control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** ACTA could induce HSC secrete ECM successfully. PⅢNP et al four indexes could reflect that ACTA might participate the occurrence and developing process of liver fibrosis and pathological degree. How to block ACTA way in the prevention and treatment of liver fibrosis provides us some new ideas.

Key words activin A; hepatic stellate cell; extracellular matrix; hepatic fibrosis

激活素 A(ACTA)是近期发现参与肝纤维化形成又一新型的细胞因子,与目前已知的促肝纤维化细胞因子 TGF- β 属同一超家族成员^[1],其不同之处,ACTA 在细胞内直接加工成具有活性的二聚体,一旦分泌不需要细胞外激活就可以发挥作用。因此,在肝纤维化等慢性疾病中,活化的 HSC 中 ACTA 表达明显增高^[2]。本实验拟观察 ACTA 与人 HSC 系 LX-2 细胞分泌 ECM 的相关性,进一步探讨 ACTA 在肝纤维化形成和发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肝星状细胞(HSC)系 LX-2 细胞购自中南大学湘雅中心实验室,表型为活化的 HSC;基因重

组人 ACTA 购自 peprotech 公司;PⅢNP、Ⅳ-COL、HA 和 LN 化学发光定量测定试剂盒购自北京源德生物医学工程有限公司;胰蛋白酶及 PBS 购自武汉博士德生物工程有限公司;高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 LX-2 细胞的培养 LX-2 细胞在 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 的条件下,培养于含 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、12% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液的无菌培养瓶中,隔天换液,3~4 d 后细胞 80%~90% 铺满瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化,按 1:3 传代,传代 3~4 次待细胞生长稳定后取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 取对数生长期的 HSC,0.25% 胰蛋白酶消化后,用含 12% 胎牛血清的高糖 DMEM 制成细胞悬液,以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 3 个 6 孔板,每孔 2 ml。放置在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿

¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科实验室(武汉,430022)

² 华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室
通信作者:曾令兰, E-mail: xhyerck@163.com

度的培养箱中培养 24 h。换含 8% 胎牛血清的高糖 DMEM, 将细胞分为 5 组: A 空白对照; B 组 ACTA 10 μg/L; C 组 ACTA 20 μg/L; D 组 ACTA 100 μg/L; E 组 ACTA 200 μg/L。分别干预 24、48、72 h 后, 收集培养液, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清备用。

1.2.3 各项测定 III 型前胶原 N 端肽(P III NP)、IV 型胶原(IV-COL)、透明质酸(HA)及层粘连蛋白(LN)含量测定采用化学发光法, 具体分别按试剂盒使用说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据的分析处理, 测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组均数的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 经 ACTA 作用 24 h

LX-2 分泌 P III NP、IV-COL、HA 及 LN 较正常对照组没有显著升高(图 1~4; $P > 0.05$)。

2.2 经 ACTA 作用 48 h

ACTA 促进 LX-2 分泌 P III NP、IV-COL 及 HA, 并且 ACTA 浓度越高, 上清液中 P III NP、IV-COL 及 HA 含量也越高(表 1), 但 ACTA 对 LN 的分泌没有明显促进作用($P > 0.05$)。

2.3 经 ACTA 作用 72 h

ACTA 促进 LX-2 分泌 P III NP、IV-COL 及

HA 较 48 h 时更为明显, 200 μg/L ACTA 对 LN 的分泌呈现出明显促进作用(表 2)。

3 讨论

HSC 是肝脏 ECM 的主要来源细胞^[3], ECM 的合成增加和降解减少导致胶原过度沉积是肝纤维化主要病理学基础。在正常情况下, 肝内 Dissee 腔内皮下 ECM(如 P III NP、IV-COL、HA、LH 等) 通过此腔间相互作用, 使 HSC 保持非增殖静止状态。当肝脏受损时, 促进了 HSC 的增殖与活化, LX-2 分泌 ECM 增强。因此 P III NP 等胶原、胶原代谢产物、蛋白多糖以及非胶原粘连蛋白水平高低可直接反映肝脏纤维化程度, 也是当前临床诊断和评估肝纤维化手段之一^[4-5]。

我们的研究选用 HSC 系中 LX-2 为细胞模型, 采用不同浓度 ACTA 刺激来动态观察不同时段 P III NP、IV-COL、HA 和 LN 的变化。结果表明, 这 4 项指标在刺激早期(24 h)与正常组相比无明显差异, 这可能与细胞贴壁不全处于非对数生长期有关, 这与我们的前期增殖实验相一致。但随着实验时间延长和 ACTA 刺激浓度增加, P III NP、IV-COL 和 HA 的表达水平也逐渐上升, 起初 48 h、20 μg/L 时以 IV-COL 最为敏感。当 ACTA 调至 100~200 μg/L 时, 无论 48 h 或 72 h 均反映出与刺激浓度较强的依赖关系; 尤其到后期(72 h)高浓度时以 P III NP 升高明显($P < 0.01$)。Wada 等^[6]

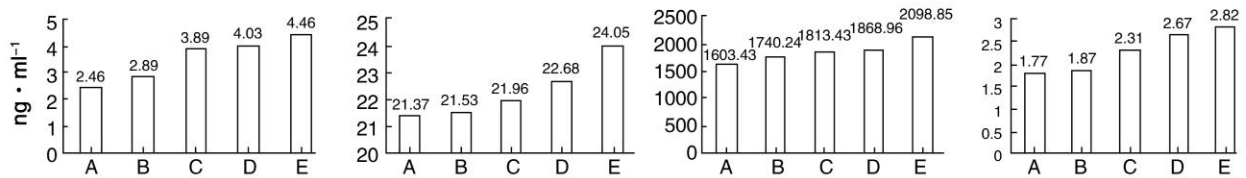


图 1 P III NP; 图 2 IV-COL; 图 3 HA; 图 4 LN

表 1 不同浓度激活素 A 作用 48h 对 LX-2 胶原分泌的影响

分组	P III NP	IV-COL	HA	LN
A 组	5.65 ± 0.39	54.91 ± 2.97	1 882.69 ± 195.59	3.29 ± 0.02
B 组	6.22 ± 0.52	62.11 ± 3.09	2 292.53 ± 361.03	3.35 ± 0.06
C 组	6.94 ± 0.70	83.21 ± 4.99 ¹⁾	2 492.11 ± 343.29	3.36 ± 0.07
D 组	7.56 ± 0.46 ¹⁾	90.38 ± 4.23 ¹⁾	3 039.78 ± 264.12 ¹⁾	3.40 ± 0.09
E 组	8.57 ± 0.21 ¹⁾	95.22 ± 5.58 ¹⁾	3 536.08 ± 326.97 ¹⁾	3.57 ± 0.28

与 A 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度 ACTA 作用 72h 对 LX-2 胶原分泌的影响

分组	P III NP	IV-COL	HA	LN
A 组	6.64 ± 0.55	86.61 ± 5.47	2 163.65 ± 216.07	3.34 ± 0.31
B 组	7.29 ± 0.50	92.55 ± 7.47	2 330.89 ± 274.29	3.48 ± 0.30
C 组	9.35 ± 0.66 ¹⁾	112.42 ± 5.61 ¹⁾	2 796.49 ± 312.77	3.65 ± 0.37
D 组	10.09 ± 0.75 ¹⁾	116.64 ± 6.76 ¹⁾	3 643.34 ± 338.82 ¹⁾	3.69 ± 0.33
E 组	13.44 ± 0.62 ²⁾	142.49 ± 8.18 ¹⁾	3 981.77 ± 342.18 ¹⁾	4.82 ± 0.36 ¹⁾

与 A 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

在体外培养的大鼠 HSC;李芙蓉等^[7-8]在体外培养大鼠肾间质细胞,都加入外源性的 ACTA,他们的报道中均观察了胶原及胶原代谢产物等指标,与我们实验结果基本相一致。此外,我们观察中还发现 LN 在刺激早中期表达并不明显,只是在 72h ACTA 为 200 $\mu\text{g/L}$ 时才显示出正常组的差异($P < 0.05$),这可能与试验模型和干预因子不尽相同所致个别数据偏差;也有学者认为 LN 滞后的原因,还可能与肝纤维化病理改变性质有关,当肝窦通透性下降,影响肝细胞间或肝细胞与血液间的物质交换,形成肝内阻力时 LN 才出现表达。但总体都表明,ACTA 能够刺激 HSC 系中 LX-2 细胞分泌 ECM,ACTA 浓度高低直接影响 ECM 表达水平,呈剂量依赖关系(正比),以胶原蛋白为显著,提示 PⅢ NP、Ⅳ-COL、HA 和 LN 等指标可直接反映 ACTA 参与了肝纤维化的发生发展过程,以及肝纤维化的病理程度;ACTA 的主要效应是促进 ECM 的合成和分泌^[9],使胶原产物分解和代谢不平衡造成胶原过度沉积。

李娜等^[10]应用 CCL₄ 制备小鼠肝纤维化模型,加入 ACTA 中和抗体干预,结果显示可抑制 TGF- β 1、 α -SMA 的表达及 ECM 表达。在我们后续研究中可尝试着用拮抗剂来干预 ACTA 的表达,抑制 HSC 功能,使之不能从表型转化为成纤维细胞,降低 ECM 的合成和分泌,达到阻断和逆转肝纤维化效应,这为临床治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] SCHULZ R, VOGEL T, DRESSEL R, et al. TGF- β superfamily members, ActivinA and TGF- β 1, induce apoptosis in oligodendrocytes by different pathways

[J]. Cell Tissue Res, 2008, 334: 327-338.

- [2] WERNER S, ALZHEIMER C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease[J]. Cytokine Growth Factor, 2006, 17: 157-171.
- [3] SAREM M, ZNAIDAK R, MACIAS M, et al. Hepatic stellate cell: it's role in normal and pathological conditions[J]. Gastroenterol Hepatol, 2006, 29: 93-101.
- [4] MANNING D S, AFDHAL N H. Diagnosis and quantitation of fibrosis[J]. Gastroenterology, 2008, 134: 1670-1681.
- [5] GUHA I N, ROSENBERG W M. Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis: Serum Markers, Imaging, and Other Modalities[J]. Clinics in Liver Disease, 2008, 12: 883-900.
- [6] WADA W, KUWANO H, HASEGAWA Y, et al. The Dependence of Transforming Growth Factor- β -Induced Collagen Production on Autocrine Factor Activin A in Hepatic Stellate Cells[J]. Endocrinology, 2004, 145: 2753-2759.
- [7] 李芙蓉, 杨成, 张莹. 激活素 A 及卵泡抑素对大鼠肾间质成纤维细胞分泌羟脯氨酸及Ⅳ型胶原的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 238-240.
- [8] 李芙蓉, 程悦, 张莹, 等. 激活素 A 及卵泡抑素对大鼠肾间质成纤维细胞 I 型胶原的影响[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(7): 861-864.
- [9] 沈健, 李光明. 激活素 A 与肝脏疾病[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(4): 210-213.
- [10] 李娜, 李定国, 陈源文等. 激活素 A 中和抗体对小鼠肝组织细胞因子表达影响[J]. 胃肠病和肝病学杂志, 2005, 14(2): 153-155.

(收稿日期: 2012-6-26)

(上接第 632 页)

B*2705 亚型是鲁西南地区 AS 患者的主要易感基因,与鲁西南地区汉族人群 AS 的发病呈强相关,与国内其他研究的结论相一致^[5-7]。B*27 亚型的分布呈高度偏态且有明显的种族差异,除 B*2704 和 B*2705 亚型外,其他亚型检出数偏少,受到样本数量的限制,尚需进行更大样本和多人群的调查分析。

参考文献

- [1] BREWERTON D A, HART F D, NICHOLLS A, et al. Ankylosing spondylitis and HL-A 27[J]. Lancet, 1973, 1: 904-907.
- [2] VAN DER LINDEN S, VALKENBURG H A, CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria[J]. Arth Rheu, 1984, 27: 361-368.
- [3] KHAN M A. HLA-B27 polymorphism and associa-

tion with disease[J]. J rheumatol, 2000, 27: 1110-1114.

- [4] GONZALEZ-ROCES S, ALVAREZ M, GONZALEZ S, et al. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis[J]. Tissue Antigens, 1997, 49: 116-123.
- [5] 林剑浩, 吕厚山. 中国汉族正常人群 HLA-B27 亚型的分布调查[J]. 中华医学遗传学杂志, 1995, 12(4): 212-214.
- [6] 黄霞, 毛伟, 王芳, 等. 重庆造血干细胞资料分库汉族人群 HLA-B27 亚型分布调查[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(4): 321-322.
- [7] 周峰, 郁超, 张克霞. 南通地区 HLA-B27 基因亚型分布及其与 AS 相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 14(4): 135-136.

(收稿日期: 2012-03-21)