

罗格列酮对癌性条件下肝星状细胞表达 PDGF-B、 α -SMA 的影响

罗波¹, 官阳², 袁静萍¹, 杨木兰², 徐惠², 石玉香¹

Effect of Rosiglitazone on Expression of PDGF-B, α -SMA in HSC Cultured under Carcinous Condition

LUO Bo¹, GUAN Yang², YUAN Jing-ping¹, YANG Mu-lan², XU Hui², SHI Yu-xiang¹

1. Department of Pathology, The Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, China; 2. Department of Pathology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology

Corresponding Author: GUAN Yang, E-mail: guany64@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To observe the effect of Rosiglitazone on the expression of PDGF-B, α -SMA in HSC cultured under carcinous condition. **Methods** HSC were at first exposed to 24h conditioned medium from HepG2 (1:1 and 1:2 dilution) and then treated with Rosiglitazone (15 μ mol/L), expression levels of PDGF-B, α -SMA in HSC was checked by IHC. Control group, only Rosiglitazone treatment group and only conditioned medium treatment group were also arranged. **Results** HSC were at first exposed to 24h conditioned medium from HepG2 and then treated with Rosiglitazone (15 μ mol/L), expression of α -SMA (0.2767 $\pm$ 0.03692, 0.2736 $\pm$ 0.0418), PDGF-B (0.2542 $\pm$ 0.03917, 0.2401 $\pm$ 0.01941) in HSC was decreased significantly ($P < 0.05$) compared with that in the control group (0.2863 $\pm$ 0.03507, 0.3150 $\pm$ 0.03435) and only conditioned medium treatment group (0.3753 $\pm$ 0.07636, 0.3512 $\pm$ 0.0345). **Conclusion** Rosiglitazone could inhibit the activation and expression of PDGF and α -SMA in HSC cultured under carcinous condition.

Key words: Rosiglitazone; Hepatic stellate cell; Platelet-derived growth factor; Alpha-smooth muscle actin

摘要:目的 观察罗格列酮对癌性条件下生长的肝星状细胞表达 PDGF-B 和 α -SMA 的影响。**方法** 肝星状细胞(HSC)经肝癌细胞(HCC)条件培养液(按 1:1、1:2 的比例稀释)处理 24h 后,再用 15 μ mol/L 罗格列酮处理 HSC 24h(另设空白对照组、单纯罗格列酮组和单纯 24h 肝癌细胞条件培养液组)。观察肝星状细胞表达 PDGF-B、 α -SMA 表达变化。**结果** 罗格列酮作用于经肝癌细胞条件培养液处理后的 HSC, α -SMA 和 PDGF-B 的表达,均有显著下降($P < 0.05$)。**结论** 罗格列酮可以抑制癌性条件下生长的 HSC 的活化和 PDGF-B 的表达。

关键词: 罗格列酮; 肝星状细胞; 血小板衍生因子; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R735.7; R975+.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)02-0141-03

0 引言

罗格列酮作为过氧化物酶体增生物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 的激动剂,除具有降糖作用外,还具有多方面的药理作用,其中包括抗脏器纤维化^[1]。已

有实验证明罗格列酮能通过抑制 HSC 的增殖与活化而发挥抗肝纤维化的作用^[2]。但罗格列酮对癌性条件下生长的 HSC 的作用较少有研究。本实验旨在研究罗格列酮对癌性条件下生长的 HSC 是否仍然存在抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

罗格列酮纯品粉剂购于浙江万马药业。所用细胞株为人肝癌细胞 HepG2(本室保存)和人肝星状细胞 HSC-T6(华中科技大学同济医学院附属同济

收稿日期:2010-01-13;修回日期:2010-07-21

作者单位:1. 430014 武汉,武汉市中心医院病理科;2. 华中科技大学同济医学院超微病理室

通信作者:官阳, E-mail: guany64@yahoo.com.cn

作者简介:罗波(1987-),男,硕士,住院医师,主要从事肝脏病理的研究

医院肝病研究所惠赠)。α-SMA、PDGF-B 抗体、SABC、DAB 试剂盒为武汉博士德生物制品有限公司产品。其他常规实验器械由华中科技大学同济医学院病理学系超微病理研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂的配制 癌性条件培养液的制备:复苏细胞株 HepG2 细胞,待其生长稳定后,培养至密度为 1×10^6 /ml(对数生长期),换液继续培养 24 h,吸取培养液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即获得 HepG2 细胞条件培养液储存液, -20℃ 保存备用。罗格列酮工作液的制备:罗格列酮粉剂 35.743mg 溶于 1ml 二甲基亚砜(DMSO)中,振荡混匀,过滤灭菌,配成 0.1 mmol/ml 的罗格列酮母液, -20℃ 保存,临用时用无血清 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

1.2.2 实验分组与处理过程 因前期实验证明 15 μmol/L 的罗格列酮工作液对肝星状细胞具有比较稳定的抑制作用,所以本实验中所用的罗格列酮工作液均采用 15 μmol/L 的浓度。实验分组如下:A 组:1:1 稀释的 HepG2 细胞条件培养液处理 24h 后加 15 μmol/L 罗格列酮工作液组。B 组:1:2 稀释的 HepG2 细胞条件培养液处理 24h 后加 15 μmol/L 罗格列酮工作液组。C 组:对照组为无血清培养液组。D 组:单纯 HepG2 细胞条件培养液组。E 组:单纯 15 μmol/L 罗格列酮工作液组。

处理过程如下:1)吸弃原培养液,PBS 漂洗;2)0.25%胰酶适度消化;3)用滴管轻轻吹打 3~5 min,制成 3×10^4 /ml 细胞悬液;4)接种于 6 孔培养板(内置处理盖玻片),培养至对数生长期;5)无血清

培养液培养 12h 使细胞同步化;6)PBS 漂洗 2 次;7)按设计好的方案向板孔中加入 HepG2 细胞条件培养液,继续培养 24 h 后,PBS 漂洗 2 次;8)按设计好的方案向板孔中加入罗格列酮工作液,培养 24 h 后 PBS 漂洗;9)多聚甲醛固定;10)PBS 漂洗;11)取出盖玻片晾干,粘于载玻片上。

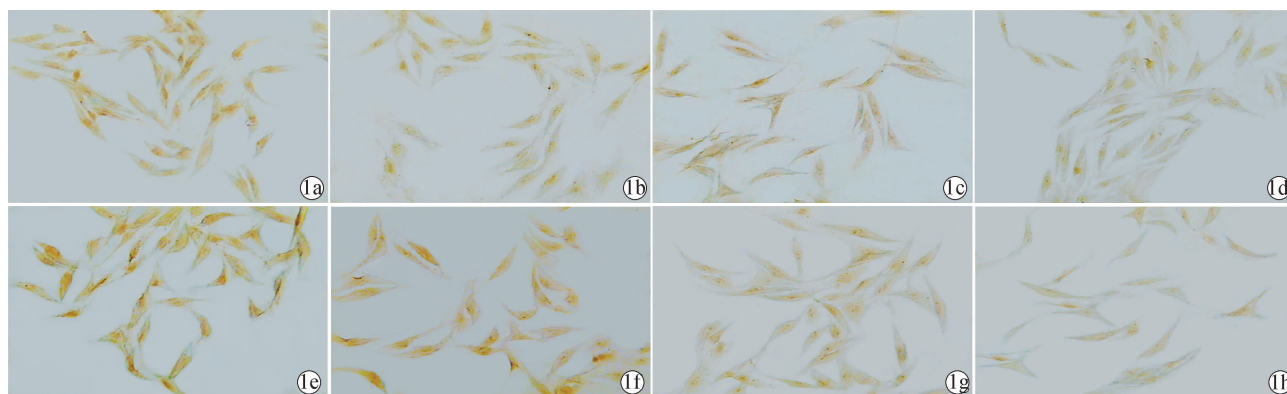
1.2.3 免疫组织化学观察 α-SMA、PDGF-B 的表达 1)新鲜双蒸水漂洗细胞爬片;2)3% H_2O_2 处理 10min;3)PBS 漂洗;4)微波修复;5)PBS 漂洗;6)山羊血清封闭;7)滴加 α-SMA 一抗,PDGF-B 一抗(滴度 1:50)50 μl/片,4℃ 过夜;8)PBS 漂洗;9)生物素化羊抗兔 IgG(二抗)37℃,30min;10)PBS 漂洗;11)DAB 显色;12)终止显色;13)脱水,晾干;14)封片。

1.3 统计学方法

采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对免疫组织化学阳性信号进行图像分析,计算平均吸光度,并进行统计计算。采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

肝癌细胞条件培养液作用 HSC-T6 细胞 24h 后加 15 μmol/L 罗格列酮组(A、B 组)与空白对照组(C 组)相比,HSC-T6 的 α-SMA 和 PDGF-B 的表达水平显著下降($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);与单纯肝癌细胞条件培养液组(D 组)相比,α-SMA、PDGF-B 的表达均呈非常显著下降($P < 0.01$),见表 1、图 1。



1a: group administered with conditioned medium of HepG2 only; 1b: blank group; 1c: group administered with conditioned medium of HepG2 and Rosiglitazone; 1d: group administered with Rosiglitazone only

1e: group administered with conditioned medium of HepG2 only; 1f: blank group; 1g: group administered with conditioned medium of HepG2 and Rosiglitazone; 1h: group administered with Rosiglitazone only

图 1 HSC-T6 中 α-SMA 和 PDGF-B 的表达情况

Figure 1 Expression of α-SMA and PDGF-B in HSC-T6

表 1 罗格列酮对肝癌条件培养液作用 24h 后的 HSC-T6 表达 α -SMA、PDGF-B 的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The effect of Rosiglitazone on expression of PDGF-B, α -SMA in HSC-T6 cultured under carcinous condition for 24h($\bar{x} \pm s$)

Antibody	Groups				
	A	B	C	D	E
α -SMA	0.2767 $\pm$ 0.03692	0.2736 $\pm$ 0.0418	0.2863 $\pm$ 0.03507 ^a	0.3512 $\pm$ 0.0345 ^b	0.2568 $\pm$ 0.04189
PDGF-B	0.2542 $\pm$ 0.03917	0.2401 $\pm$ 0.01941	0.3150 $\pm$ 0.03435 ^b	0.3753 $\pm$ 0.07636 ^b	0.2334 $\pm$ 0.01989

Note: compare with group A and B; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

3 讨论

HSC 的活化和增殖是肝纤维化发生机制的中心环节^[3]。其作用主要体现在以下几个方面:(1)随着 HSC 的活化,细胞数量增加;(2)HSC 通过自分泌和旁分泌产生大量促纤维化细胞因子;(3)HSC 是肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要来源和阻滞 ECM 降解的主要因素^[4]。所以活化的 HSC 目前已成为抗纤维化治疗的细胞学靶点。罗格列酮是胰岛素增敏剂^[3,5],主要通过激活 PPAR- γ 而发挥作用。钟朝辉等^[2]的研究表明,罗格列酮可以通过增加 PPAR- γ 表达,减少 I 型胶原表达,显著降低 HSC 的增殖活性,并能促进其凋亡。

近来,人们对肝癌细胞和 HSC 之间的相互作用日趋重视。Faouzi 等^[6]研究表明,肝癌细胞可以诱导离体 HSC 的活化,且肝癌细胞对 HSC 作用时不用直接接触 HSC,可通过分泌一些可溶性成份调控 HSC 的生物学活性。

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是一种多功能肽类物质,主要来源于血小板,具有较强促进细胞分裂和增殖的活性。PDGF 是 HSC 最强的有丝分裂原,尤其是 PDGF-B^[7-8]。PDGF 除自身的致纤维化作用外,又是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)等促纤维化因子的上游调控因子,可通过促进 TGF- β 、CTGF 表达,间接促进 HSC 增生,促进 ECM 沉积和抑制 ECM 降解^[9]。活化的 HSC 高表达 PDGF,以自分泌方式直接或间接促进 HSC 的活化与增殖。PDGF 与肝癌的发生、发展和转移密切相关,活化的 HSC 分泌的 PDGF 以旁分泌的形式作用于肝癌细胞诱导其增殖^[10]。PDGF 可能在肝癌细胞和 HSC 之间的相互作用起重要的桥梁作用。

静息状态下的 HSC 表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)水平较低,而活化的 HSC 高表达 α -SMA,因此 α -SMA 可作为 HSC 活化的指标^[6]。

我们的实验研究显示:肝癌细胞条件培养液作用于 HSC 后,PDGF-B 和作为 HSC 活化指标的 α -

SMA 表达进一步增高,而当加入罗格列酮后 α -SMA 和 PDGF-B 的表达均减少。说明罗格列酮能抑制癌性条件下 HSC 的活化和 PDGF-B 的表达。证实了罗格列酮在癌性条件下亦可以发挥抗纤维化的作用,其机制可能与降低 HSC PDGF-B 的表达有关,从而为临床上用罗格列酮治疗肝纤维化和综合治疗肝癌提供了相关实验依据。

参考文献:

[1] Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, et al. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells [J]. Gut, 2002, 50(5):6581.

[2] 钟朝辉, 郭晏同, 周迈, 等. 过氧化物酶体增殖物活化的受体 γ 对肝星状细胞作用机制的研究[J]. 中华普通外科杂志, 2006, 21(11):776-779.

[3] Jokelainen K, Reinke LA, Nanji AA. NF-kappaB activation is associated with free radical generation and endotoxemia and proceeds pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease [J]. Cytokine, 2001, 16(1):36-39.

[4] Kawada N. Human hepatic stellate cells are resistant to apoptosis; implications for human fibrogenic liver disease [J]. Gut, 2006, 55(8):1073-1074.

[5] Waris G, Huh K W, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT3 and NF-kappa B via oxidative stress [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21 (22):7721-7730.

[6] Faouzi S, Lepreuxs, Bedin C, et al. Activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes[J]. Lab invest, 1999, 79:485-493.

[7] Iwamoto H, Malamute M, Tada S, et al. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase Inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth [J]. Lab Clin Med 2000, 135(5):406-412.

[8] Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis [J]. Semin Liver Dis 2001, 21: 437-451.

[9] Donald Fraser, Nigel Brunskill, Takafumi Ito, et al. Long-Term Exposure of Proximal Tubular Epithelial Cells to Glucose Induces Transforming growth factor-beta 1 Synthesis via an Autocrine PDGF Loop[J]. Am J Pathol, 2003, 163 (6): 2565-2574.

[10] 黄竹英, 聂新民. 血小板源性生长因子在肝细胞肝癌中的表达[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(21):3167-3169.

[编辑:刘红武;校对:朱宇泽]