

· 基础研究 ·

肝细胞生长因子阻抑 TGF- β 1 诱导大鼠韧带成纤维细胞 α -SMA 过表达及其机制*

姜大朋¹ 李昭铸^{1,3} 蒋志涛¹ 刘君阳² 李天竹¹ 王娜¹

摘要 目的:研究肝细胞生长因子(HGF)能否阻抑 TGF- β 1 诱导的大鼠内侧副韧带(MCL)成纤维细胞 α -SMA 过表达及其可能涉及的信号传导通路。方法:采用组织块培养法培养大鼠 MCL 成纤维细胞,培养液中加入 TGF- β 1(5ng/ml)及 HGF (10—40 ng/ml)。培养 72h 后,用 RT-PCR 检测各组 α -SMA mRNA 及 Smad3 mRNA 的变化;细胞免疫组化检测 α -SMA 蛋白的表达。结果:TGF- β 1 能显著诱导 α -SMA 及 Smad3 的表达($P<0.01$),而 HGF 则可以有效地阻抑其表达,其效应呈剂量依赖性($P<0.05$)。结论:HGF 可以通过下调 Smad3 的表达来阻抑 TGF- β 1 诱导的 α -SMA 过表达。这为利用 HGF 预防和治疗 MCL 损伤后瘢痕及纤维化在细胞和分子水平提供了依据。

关键词 肝细胞生长因子;转化生长因子- β ;内侧副韧带;成纤维细胞; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号:R686,R49 文献标识码:A 文章编号:

Hepatocyte growth factor suppresses the overproduction of α -SMA induced by TGF- β 1 in rat medial collateral ligament fibroblasts/JIANG Dapeng, LI Zhaozhu, JIANG Zhitao/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2007,22():

Abstract Objective:To examine the effectiveness of HGF in blocking TGF- β 1-induced α -SMA production in rat medial collateral ligament (MCL) fibroblasts. **Method:**Fibroblasts were obtained from rat MCL. Cell culture was supplemented with 5ng/ml of TGF- β 1 along with increasing doses of HGF (10-40 ng/ml). After 72 hours incubation, the productions of α -SMA and Smad3 mRNA were assayed by RT-PCR. Expression of α -SMA protein was assessed by immunostaining. **Result:**Treatment with TGF- β 1 significantly stimulated α -SMA and Smad3 mRNA production in MCL fibroblasts ($P<0.01$). Remarkably, the addition of HGF reduced productions of all components induced by TGF- β 1 in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion:**HGF antagonizes TGF- β 1 induced α -SMA production in MCL fibroblasts by down regulating Smad3. The findings provide a cellular and molecular basis for HGF's acting as a therapeutic agent for MCL scar and fibrosis formation.

Author's address Department of Pediatric Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150086

Key words hepatocyte growth factor;transforming growth factor- β ;medial collateral ligament;fibroblast; α -smooth muscle actin

随着我国人民生活水平的不断提高,全民健身及体育运动的职业化得到空前的发展,但随着人们体育运动的增加,韧带损伤在肌肉骨骼系统病变中所占的比例亦逐年增高,其中内侧副韧带(medial collateral ligament, MCL)损伤是常见的膝关节运动性损伤,其导致的劳动能力及运动能力的丧失给社会带来了巨大损失^[1-2]。由于韧带缺少血管成分,其愈合速度慢,多数情况下以瘢痕形式愈合,愈合后组织学、生物化学及生物力学特性均有所改变,愈合后不能恢复正常韧带的强度和弹性,受牵拉后容易再次断裂。

有多种生长因子参与韧带的愈合,研究发现:转化生长因子- β (transforming growth factor,TGF- β)在韧带修复过程中表达显著增高^[3-4]。TGF- β 对促进组

织损伤愈合起重要的作用,同时它也可导致组织纤维化、瘢痕及粘连形成^[3,5]。TGF- β 1 可以诱导成纤维细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)高表达,而 α -SMA 与组织瘢痕的形成密切相关^[6]。Ono 等^[7]发现,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)在促进皮肤伤口愈合的同时可以有效防止纤维化及瘢痕的产生。另外,HGF 可以通过阻抑 α -SMA 过表达而缓解 TGF- β 1 所诱导的肾脏纤维化^[8]。但

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D200618);国家自然科学基金青年基金项目(30901516)

1 哈尔滨医科大学附属第二医院小儿外科,150086

2 南京军区南京总医院卫生技术干部训练中心

3 通讯作者

作者简介:姜大朋,男,博士,住院医师

收稿日期:2007-07-24

HGF在TGF- β 1诱导的MCL成纤维细胞 α -SMA表达中起何作用值得深入研究。本研究利用体外培养的方法,观察HGF对TGF- β 1诱导的大鼠MCL成纤维细胞表达 α -SMA的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HGF、TGF- β 1(美国R&D公司),DMEM(美国GIBCO公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),小鼠抗 α -SMA抗体、生物素化马抗小鼠IgG及ABC复合物(武汉博士德生物工程有限公司),GIS数码凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司),其余有关分子生物学试剂由哈尔滨医科大学附属第二医院中心实验室提供。

1.2 MCL细胞培养

选取成年雄性SD大鼠12只,体重350—375g,由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供。用1%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔内注射麻醉,无菌切取的MCL放入含100U/ml PG和100 μ g/ml SM双抗Hank's液中,反复冲洗并用解剖刀去除韧带外周组织,以眼科剪剪成1mm³大小,并将其置于培养瓶中,将组织小块摆布在培养瓶底上,轻轻翻转培养瓶,令瓶底向上,置于37 $^{\circ}$ C含5%CO₂、95%空气的CO₂培养箱内4h,然后取出培养瓶,加含15%胎牛血清的DMEM培养液后再缓慢翻转培养瓶,置培养箱内静止培养,待细胞从组织块爬出,再补加DMEM培养液。待细胞生长成单层后,以胰蛋白酶消化传代。

1.3 实验分组

收获第3代MCL细胞用于实验,当细胞达到70%融合时,将培养液换为不含血清,分5组进行实验:①无血清阴性对照组;②TGF- β 1(5ng/ml)作用组;③TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(10ng/ml)共同作用组;④TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(20ng/ml)共同作用组;⑤TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(40ng/ml)共同作用组。各组作用时间均为72h。

1.4 细胞免疫组织化学检测 α -SMA

取各组细胞玻片,以预冷的含0.1%Triton-100的2%多聚甲醛固定20min,经0.3%H₂O₂消除内源性过氧化物酶和封闭后,滴加1:250 α -SMA小鼠抗大鼠一抗4 $^{\circ}$ C过夜,PBS冲洗后依次加入1:100生物素化马抗小鼠IgG和1:100SABC液,最后DAB显色。镜下观察,胞浆呈棕黄色为阳性细胞,选择5个视野,每个视野计数100个细胞计算阳性细胞比例。

1.5 RT-PCR测定细胞 α -SMA及Smad7基因的表达

采用Trizol一步法提取总RNA,将mRNA逆转录为cDNA(3 μ gRNA/20 μ l体系,Promega Reverse Transcription System)。3 μ l cDNA/20 μ l体系进行PCR反应(Promega Taq)。使用GAPDH为检测目的基因表达的对照。引物(由上海申能博采生物技术有限公司合成)序列如下: α -SMA正义链5'-TGACGCTGAAGTATCCGATAGA-3',反义链5'-GTACGTCCAGAGGCATAGAGG-3',产物片段250bp;Smad3正义链5'-AGACATTCCACGCCTCACAG-3',反义链5'-CACTGGAACAGCGGATGCT-3',产物片段534bp;GAPDH正义链5'-GGT-CATCCCAGAGCTGAACG-3',反义链5'-TCAGT-GTTGGGGGCTGAGTT-3',产物片段451bp。反应条件:94 $^{\circ}$ C变性5min;94 $^{\circ}$ C 45s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 45s;延伸72 $^{\circ}$ C 10min,循环34次。反应产物于1.5% Agarose进行电泳,将电泳结束后的凝胶块放入紫外透射仪的暗箱内,应用天能图像分析系统进行灰度分析,目的基因条带密度相对于GAPDH的比值即为目的基因的相对密度,测量3次,取平均值分析。

1.6 统计学分析

采用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理,实验数据以均数 \pm 标准差表示,进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 HGF对TGF- β 1诱导MCL成纤维细胞 α -SMA mRNA及蛋白表达的影响

α -SMA基因在电泳图上的条带位置与设计的扩增片段长度相符。电泳示TGF- β 1作用的MCL成纤维细胞 α -SMA mRNA表达显著高于阴性对照组($P<0.01$)。随HGF的同时加入, α -SMA mRNA表达则明显受抑制($P<0.05$),且随HGF浓度的升高其抑制作用呈逐渐增强趋势(表1及图1)。细胞免疫组织化学检测结果发现,各实验组 α -SMA蛋白水平表达的变化趋势与基因水平变化表现一致,经TGF- β 1刺激后, α -SMA蛋白表达阳性细胞数增加($P<0.01$),着色主要在细胞浆。而随HGF的同时加入,阳性细胞数逐渐减少($P<0.05$),细胞着色变淡。见表2。

2.2 HGF及TGF- β 1对MCL成纤维细胞Smad3 mRNA表达的影响

Smad3基因在电泳图上的条带位置与设计的扩增片段长度相符。如图2所示,在TGF- β 1刺激后,Smad3 mRNA水平上升($P<0.01$),随HGF的同时加入,Smad3 mRNA表达水平下降($P<0.05$),随HGF浓

度升高其表达水平逐渐下降。

表 1 HGF 及 TGF- β 1 对 MCL 成纤维细胞 α -SMA、Smad3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	α -SMA	Smad3 mRNA
阴性对照组	3	0.60 \pm 0.01	0.31 \pm 0.01
TGF- β 1(5ng/ml)组	3	1.09 \pm 0.03 ^①	0.59 \pm 0.03 ^①
TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(10ng/ml)组	3	0.81 \pm 0.03 ^②	0.52 \pm 0.02
TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(20ng/ml)组	3	0.62 \pm 0.02 ^②	0.44 \pm 0.02 ^②
TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(40ng/ml)组	3	0.53 \pm 0.01 ^②	0.35 \pm 0.01 ^②

①与阴性对照组比较 $P<0.01$;②与 TGF- β 1(5ng/ml)组比较 $P<0.05$

表 2 各实验组 MCL 成纤维细胞 α -SMA 免疫组织化学染色阳性率 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	例数	阳性率
阴性对照组	5	6.4 \pm 1.2
TGF- β 1(5ng/ml)组	5	70.1 \pm 1.9 ^①
TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(10ng/ml)组	5	67.2 \pm 2.7 ^②
TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(20ng/ml)组	5	61.5 \pm 1.5 ^②
TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(40ng/ml)组	5	49.2 \pm 1.8 ^②

①与阴性对照组比较 $P<0.01$;②与 TGF- β 1(5ng/ml)组比较 $P<0.05$

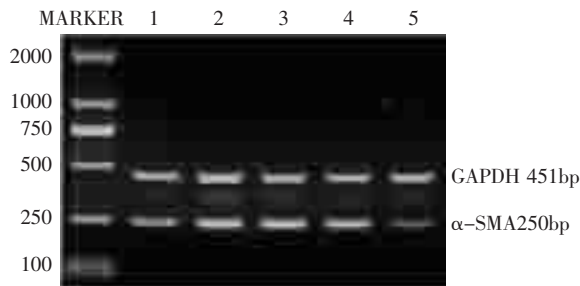


图 1 不同处理组 α -SMA mRNA 表达

1: 阴性对照组; 2: TGF- β 1(5ng/ml)作用组; 3: TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(10ng/ml)共同作用组; 4: TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(20ng/ml)共同作用组; 5: TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(40ng/ml)共同作用组。

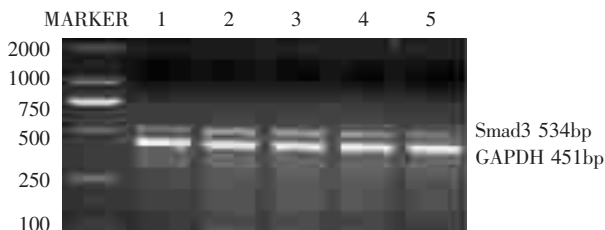


图 2 不同处理组 Smad3 mRNA 表达

1: 阴性对照组; 2: 代表 TGF- β 1(5ng/ml)作用组; 3: TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(10ng/ml)共同作用组; 4: TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(20ng/ml)共同作用组; 5: TGF- β 1(5ng/ml)+HGF(40ng/ml)共同作用组。

3 讨论

MCL 损伤常可导致膝关节不稳定及继发性关节炎,其逐渐被创伤外科所重视。通常,韧带愈合以瘢痕形式完成,这导致了韧带结构及生物力学特性的改变。在多种生长因子中,TGF- β 与组织损伤愈合关系紧密,其促进损伤处细胞增殖、分化的同时也可诱发组织纤维化及瘢痕形成,在韧带损伤后纤维化及瘢痕发生中同样起着重要的作用^[3-5]。损伤后组织愈合时多表现为过度收缩,而这种过度收缩是由损伤部位大量表达 α -SMA 的肌成纤维细胞导致,

最终诱发瘢痕的形成^[9-10]。本实验发现 TGF- β 1 可以诱导 MCL 成纤维细胞 α -SMA mRNA 及蛋白大量表达,该结果与 Meaney^[11]的发现一致。

鉴于 α -SMA 在组织愈合过程中的生物学特性,能降低其过表达的物质可能对韧带瘢痕性愈合的治疗及预防有利。近年来,多项研究证实 HGF 对多种器官具有很强的抗瘢痕、抗纤维化生物活性^[12-13]。Anitua 等^[14]也提出增加韧带损伤局部 HGF 的产生可能是一种对抗 TGF- β 诱导的损伤肌腱纤维化有效的方法。本研究结果显示,HGF 能显著减少 TGF- β 1 诱导的 MCL 成纤维细胞 α -SMA mRNA 及蛋白表达,并且这种抑制作用呈浓度依赖性,同时,HGF 能阻抑 Smad3 mRNA 表达。Smads 蛋白是 TGF- β 受体复合物的下游信号调节蛋白,它包括受体调节性 Smad(R-Smad,包括 Smad2 和 Smad3)、共同性 Smad(Co-Smad,Smad4)和抑制性 Smad(I-Smad, Smad6 和 Smad7)三个亚型。TGF- β 的众多生物学效应均由 Smads 信号通路所介导。其中,Smad3 作为 TGF- β /Smads 信号通路的下游信号分子,在 TGF- β 信号转导中起着重要的作用^[15]。阻抑 Smad3 的表达就可能部分阻断了 TGF- β 致瘢痕及纤维化的生物学活性。HGF 经实验被证实可以有效对抗 TGF- β 1 诱导的肾脏、心脏及皮肤纤维化及瘢痕^[7,8,13],而本实验提示 HGF 对 MCL 损伤后 TGF- β 1 诱发的瘢痕及纤维化也有一定的作用,为将来的实验及临床研究提供了有利的理论依据,为 MCL 愈合后瘢痕及纤维化的防治提供了新的思路和方法。

4 结论

TGF- β 1 能诱导体外培养的 MCL 成纤维细胞 α -SMA 的表达,而 HGF 可以阻抑 TGF- β 1 这一生物学效应,HGF 的阻抑作用与 Smad3 表达下调有关。但 Smad2、Smad4 和抑制性 Snad7 等信号蛋白是否也参与了上述过程?能否通过上调 Smad7 的表达来抑制 Smad3 的表达?这些问题仍有待研究。

参考文献

- [1] 姜大朋,李昭铸.膝部韧带损伤愈合机制及其组织工程学治疗进展[J].中国康复医学杂志,2006,21(10):941-943.
- [2] Phisitkul P, James SL, Wolf BR, et al. MCL injuries of the knee: current concepts review[J]. Iowa Orthop J, 2006, 26:77-90.
- [3] Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing [J]. Sports Med, 2003, 33(5):381-394.
- [4] Natsu-ume T, Nakamura N, Shino K, et al. Temporal and spatial expression of transforming growth factor-beta in the

- healing patellar ligament of the rat [J]. *J Orthop Res*, 1997, 15(6):837—843.
- [5] Smith CA, Stauber F, Waters C, et al. Transforming growth factor-beta following skeletal muscle strain injury in rats [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(2):755—761.
- [6] Xu G, Bochaton-Piallat ML, Andreutti D, et al. Regulation of α -smooth muscle actin and CRBP-1 expression by retinoic acid and TGF-beta in cultured fibroblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 187(3): 315—325.
- [7] Ono I, Yamashita T, Hida T, et al. Local administration of hepatocyte growth factor gene enhances the regeneration of dermis in acute incisional wounds[J]. *J Surg Res*, 2004, 120(1): 47—55.
- [8] Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(6):1402—1412.
- [9] Agarwal C, Britton ZT, Alaseirli DA, et al. Healing and normal fibroblasts exhibit differential proliferation, collagen production, α -SMA expression, and contraction [J]. *Ann Biomed Eng*. 2006, 34(4):653—659.
- [10] Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, et al. Control of wound contraction. Basic and clinical features [J]. *Hand Clin*, 2000, 16(2):289—302.
- [11] Meaney Murray M, Rice K, Wright RJ, et al. The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(2):238—244.
- [12] Hirano S, Bless D, Heisey D, et al. Roles of hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 in production of extracellular matrix by canine vocal fold fibroblasts[J]. *Laryngoscope*, 2003, 113(1):144—148.
- [13] Nakamura T, Matsumoto K, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(5):H2131—H139.
- [14] Anita E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2007, 119(3):950—959.
- [15] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958):577—584.

(上接 905 页)

两组中有 3 位患者疗效差, A 组中 1 例曾行经皮激光腰椎间盘减压(percutaneous laser disc decompression, PLDD)术后复发, 剩余椎间盘再次突出; 另一例患者年老腰椎退变明显椎体不稳, 多节间盘突出伴侧隐窝狭窄且病程长。B 组一例为单节间盘突出物巨大, 行椎间盘内射频微创术后患者。虽然上述患者硬膜外镇痛术后症状减轻, 但中后期随访效果不佳。故本法需对 LDH 适应证进行选择, 年长体弱、腰椎退变明显伴椎体不稳, 突出间盘巨大、多节间盘突出、椎管狭窄及微创术后患者会对疗效有一定影响。

综上所述, 连续硬膜外腔镇痛联合突出物胶原酶溶解治疗腰椎间盘突出症, 能迅速减轻患者根性神经痛症状, 和胶原酶能永久溶解突出物, 彻底解除突出物对神经根的挤压, 同时实现对 LDH 的多模式治疗^[12]。此法安全性高, 近期疗效显著, 远期疗效好, 值得临床推广。

参考文献

- [1] Macnab I. Negative disc exploration an analysis of the causes of nerve root involvement in 68 patients [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1971, 53(5): 891—903.
- [2] 倪家骧. 胶原酶化学溶解术应重视椎间盘源性炎症的治疗[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2006, 12(2):128.
- [3] Muto M, Ambrosiano G, Guarnieri G, et al. Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O(2)-O(3) injection[J]. *Radiol Med*, 2008, 113(5):695—706.
- [4] 王达建, 张雷, 王春亭. 臭氧与胶原酶盘内联合注射治疗腰椎间盘突出症的研究[J]. *实用疼痛医学杂志*, 2008, 4(2):86—92.
- [5] Buttermann GR. Treatment of lumbar disc herniation: epidural steroid injection compared with discectomy. A prospective randomized study [J]. *J Bone Joint Surg Am* Regressi, 2004, 86-A(4):670—679.
- [6] Sussman BJ, Bromley JW, Gomez JC. Injection of collagenase in the treatment of herniated lumbar disk. Initial clinical report[J]. *JAMA*, 1981, 245(7):730—732.
- [7] 藤蔚然, 杜宁. 盘外置管法注射胶原酶溶解髓核的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2006, 19(2):94—95.
- [8] 宋海, 谭大林, 王良才, 等. 硬膜外腔注药联合胶原酶溶解术治疗腰椎间盘突出症[J]. *颈腰痛杂志*, 2008, 29(1):51—53.
- [9] 张震霖. 胶原酶溶核术后加硬膜外镇痛治疗腰椎间盘突出症 40 例[J]. *中国中医骨伤科学杂志*, 2007, 15(10):26—27.
- [10] 张斌, 戴闽, 唐亚敏. 胶原酶溶核术后早期神经根病损的实验研究[J]. *江西医学院学报*, 2007, 47(2):7—12.
- [11] Antoniou J, Mwale F, Demers CN, et al. Quantitative magnetic resonance imaging of enzymatically induced degradation of the nucleus pulposus of intervertebral discs [J]. *Spine*, 2006, 31(14): 1547—1554.
- [12] 郑宝森. 用新理念完善胶原蛋白酶治疗椎间盘突出症[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2008, 14(1): 64—65.