

肝细胞生长因子对过氧化氢诱导肝细胞凋亡的影响

沈广海¹, 高爽², 沈兆亮³, 田丽敏¹, 唐博⁴

Effects of hepatocyte growth factors on H₂O₂-induced hepatocyte apoptosis

Shen Guang-Hai¹, Gao Shuang², Shen Zhao-liang², Tian Li-min¹, Tang Bo⁴

Abstract

BACKGROUND: Hepatocyte growth factors exhibit protective effects on many cells.

OBJECTIVE: To investigate the protective effects of hepatocyte growth factors on H₂O₂-induced hepatocyte apoptosis of liver cells as well we the possible mechanism.

METHODS: LO2 liver cell lines were randomly divided into three groups: normal control group: LO2 cells were conventionally cultured; model group: LO2 cells were treated with 100 mmol/L H₂O₂ for 4 hours; hepatocyte growth factor group: LO2 cells were pretreated with 50 mg/L hepatocyte growth factors for 24 hours and then further cultured with 100 mmol/L H₂O₂ for 4 hours.

RESULTS AND CONCLUSION: After 4-hour treatment with 100 mmol/L H₂O₂, *in vitro* cultured LO2 cells showed obvious apoptosis, presenting with decreased cell survival rate ($P < 0.01$), increased caspase-3 protein expression ($P < 0.01$), and decreased Bcl-2 protein expression ($P < 0.01$). After 24-hour pretreatment with hepatocyte growth factors and subsequent 4-hour culture with 100 mmol/L H₂O₂, LO2 cell apoptosis was significantly inhibited ($P < 0.01$). These findings suggest that hepatocyte growth factors can inhibit H₂O₂-induced LO2 cell apoptosis by increasing Bcl-2 expression in LO2 cells.

Shen GH, Gao S, Shen ZL, Tian LM, Tang B. Effects of hepatocyte growth factors on H₂O₂-induced hepatocyte apoptosis.

Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(28): 5225-5228.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 肝细胞生长因子对多种细胞具有保护作用。

目的: 观察肝细胞生长因子对过氧化氢诱导肝细胞凋亡的保护作用及其机制。

方法: 采用人 LO2 肝细胞系, 随机分成 3 组: 正常对照组为正常培养的 LO2 细胞; 模型组加入 100 mmol/L 过氧化氢作用 LO2 细胞 4 h; 肝细胞生长因子组加入 50 mg/L 肝细胞生长因子预处理 LO2 细胞 24 h, 再加入 100 mmol/L 过氧化氢继续培养 4 h 后处理细胞。

结果与结论: 体外培养的 LO2 细胞经 100 mmol/L 过氧化氢作用 4 h 后, LO2 细胞可出现明显的凋亡现象, 表现为细胞存活率降低($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白表达增加($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.01$)。给予质量浓度 50 mg/L 肝细胞生长因子预处理 24 h 后再加入 100 mmol/L 过氧化氢继续培养 4 h, LO2 细胞的凋亡被显著抑制($P < 0.01$), 说明肝细胞生长因子可通过增加 LO2 细胞 Bcl-2 的表达来抑制过氧化氢诱导的 LO2 细胞凋亡。

关键词: 肝细胞生长因子; 细胞凋亡; Bcl-2; Caspase-3; 过氧化氢; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.28.024

沈广海, 高爽, 沈兆亮, 田丽敏, 唐博. 肝细胞生长因子对过氧化氢诱导肝细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5225-5228. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Hepatology, Jinzhou Infection Hospital, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of General Surgery, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ³Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ⁴Third Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China

Shen Guang-hai, Associate professor, Department of Hepatology, Jinzhou Infection Hospital, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China
dyltangbo@163.com

Received: 2011-03-05
Accepted: 2011-06-01

0 引言

细胞凋亡, 是由Kerr等^[1]于1972年首次提出。肝细胞凋亡是肝脏疾病中最重要的影响因素之一, 在正常肝脏发育及多种肝脏疾病的发生过程中起着重要作用^[2-4]。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是间质细胞衍生的多功能生长因子, 具有促细胞增殖、迁移和形态发生的作用, 在组织形成和组织器官修复中亦发挥重要作用^[5-6]。研究证实, 肝细胞生长因子对肝细胞以及多种细胞具有保护作用^[7-8]。

实验应用HGF对人LO2细胞进行干预, 旨在观察HGF在过氧化氢(H₂O₂)诱导肝细胞凋亡中的保护作用及其机制。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2010-01/05在辽宁医学院附属第一医院中心实验室完成。

材料: 人肝LO2细胞购自中科院上海细胞库。

试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|-----------------|-------------------|
| HGF | Sigma 公司 |
| 结晶紫 | 北京华美公司 |
| Caspase-3 单克隆抗体 | Cell Signaling 公司 |
| Bcl-2 多克隆抗体 | Santa Cruz 公司 |
| 鼠抗兔 IgG 抗体 | 北京中山金桥生物有限公司 |
| 分光光度计 | 上海分析仪器总厂 |

¹ 锦州市传染病医院肝病科, 辽宁省锦州市121000; ² 锦州市中心医院普外科, 辽宁省锦州市121000; ³ 辽宁医学院附属第一医院普外科, 辽宁省锦州市121001; ⁴ 大连医科大学附属第二医院普外三科, 辽宁省大连市116023

第一作者并通讯作者: 沈广海, 男, 1954年生, 1980年哈尔滨医科大学毕业, 辽宁省庄河市人, 汉族, 副教授, 主要从事肝脏疾病的临床诊治及预后工作。
dytangbo@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)28-05225-04

收稿日期: 2011-03-05
修回日期: 2011-06-01
(20101215005/WJ-S)

实验方法

体外肝细胞培养及分组: LO2细胞第4代于含体积分数10%小牛血清的DMEM培养液在37℃, 体积分数为5%的CO₂培养箱培养。取对数生长期细胞, 按细胞生长密度为1×10⁶/孔接种于24孔培养板中培养。随机分为正常对照组: LO2细胞在37℃, 体积分数5%的CO₂培养箱中培养。模型组: LO2细胞培养基中加入100 mmol/L H₂O₂, 继续培养4 h, 建立肝细胞凋亡模型。HGF组: LO2细胞培养基中加入质量浓度50 mg/L的HGF预处理24 h, 再加入100 mmol/L H₂O₂继续培养4 h。各组进行相应指标的测定。

结晶紫法检测肝细胞活力: 分组处理后, 吸出各组培养板各孔中的培养液, 加入5%戊二醛液0.5 mL固定细胞15 min, 去离子水冲洗3遍后, 用新配制的0.1%结晶紫液染色20 min^[9]。用去离子水冲洗3遍后, 每孔加入0.5 mL 体积分数1% Triton X-100以提取被细胞核吸收的结晶紫液。用分光光度计在波长570 nm处测量每个培养孔的吸光度(A_{570nm})值。A_{570nm}值与细胞数目成正比。

细胞DNA断裂百分率的测定: Burton法测定肝细胞DNA断裂百分率。将制备好的肝细胞悬液离心(1 000 g, 5 min), 收集细胞。重悬细胞, 加等量的低张细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 20 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100), 充分混匀致细胞膜破裂, 离心15 000 g, 20 min, 分离上清和沉淀, 分别测定上清液和沉淀物中的DNA的含量, 计算肝细胞DNA断裂百分率。

$$\text{DNA 断裂百分率} = \frac{\text{上清液 DNA 含量}}{\text{上清液 DNA 含量} + \text{沉淀 DNA 含量}} \times 100\%$$

Western blot检测Caspase-3及Bcl-2蛋白表达: 收集各组LO2细胞, 将细胞放置于-70℃冰箱中, 测定指标时, 每份样品取样50 μg, 变性的10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳, 电压浓缩胶80 V, 分离胶100 V, 半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 恒压电泳100 V, 室温1 h, 4℃封闭过夜, 加入的一抗(1:200稀释的兔抗Caspase-3单克隆抗体, 1:500稀释的兔抗Bcl-2多克隆抗体)杂交1 h, 封闭液漂洗后加入1:5 000稀释的二抗(鼠抗兔IgG抗体, 购自北京中山金桥生物有限公司), 室温下摇床杂交1 h, 漂洗后ECL化学发光, X射线片曝光显影, 利用凝胶成像仪灰度分析软件Quantity One进行吸光度值分析目的条带和内参(β-actin)的吸

光度值(A), 结果以目的条带A值/内参A值表示。

主要观察指标: 结晶紫法测定细胞存活率, Burton法测定细胞DNA断裂百分率, Western blot分析Caspase-3及Bcl-2蛋白表达。

统计学分析: 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 11.0统计学软件进行数据处理, 组间数据差异比较采用方差分析及SNK-q检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 HGF对LO2细胞存活率的影响 各组加入H₂O₂及HGF+H₂O₂培养4 h后, 结晶紫法测定LO2细胞存活率。结果显示, 与正常对照组相比, 模型组LO2细胞的存活率明显降低(P < 0.01)。经HGF预处理24 h后, LO2细胞存活率比模型组明显增高(P < 0.01)。说明HGF对H₂O₂诱导的LO2细胞凋亡具有抑制作用。见表1。

| Group | A _{570nm} | Percentage of DNA break (%) |
|----------------|------------------------|-----------------------------|
| Normal control | 0.73±0.03 | 5.81±0.48 |
| Model | 0.36±0.02 ^a | 17.16±0.28 ^a |
| HGF | 0.63±0.02 ^b | 8.97±0.15 ^b |

^aP < 0.01, vs. normal control group; ^bP < 0.01, vs. model group. HGF: hepatocyte growth factor

2.2 HGF对LO2细胞DNA断裂百分率的影响 Burton法测定LO2细胞DNA断裂百分率结果显示, 与正常对照组相比, 加入100 mmol/L H₂O₂培养4 h后, 模型组LO2细胞的DNA断裂百分率明显升高(P < 0.01)。给予HGF预处理24 h后, 再用H₂O₂作用的LO2细胞的DNA断裂百分率比模型组明显下降(P < 0.01)。见表1。

2.3 HGF对H₂O₂诱导LO2细胞的Caspase-3表达的影响 经Western blot分析结果显示, 模型组LO2细胞经100 mmol/L H₂O₂作用4 h后出现了相对分子质量17 000的带谱, 且表达量(0.64±0.11)明显高于正常对照组(0.18±0.02, P < 0.01)。

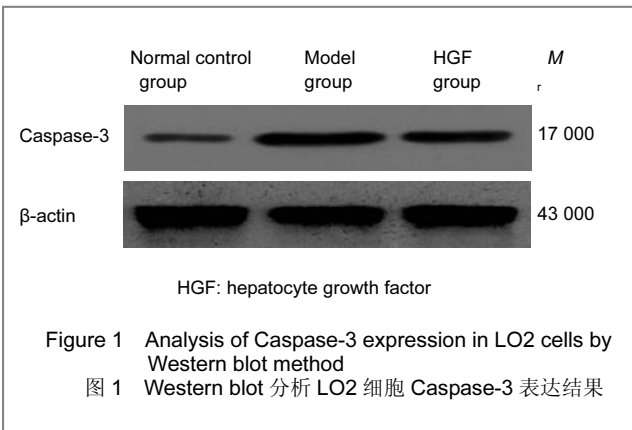
给予质量浓度50 mg/L HGF作用后Caspase-3表达量(0.43±0.04)明显低于模型组(0.64±0.11, P < 0.01), 表明HGF可显著下调Caspase-3的表达。见表2, 图1。

表2 肝细胞生长因子对 LO2 细胞 Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

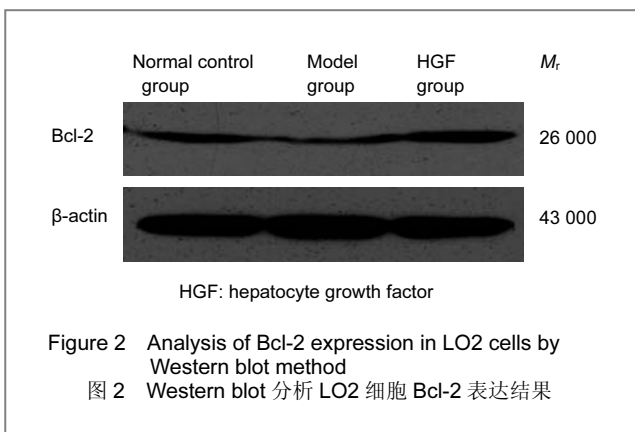
Table 2 Effect of hepatocyte growth factor on the protein expression of the Caspase-3 and Bcl-2 in LO2 cells

| Group | Caspase-3/ β -actin | Bcl-2/ β -actin |
|----------------|------------------------------|------------------------------|
| Normal control | 0.18 \pm 0.02 | 0.63 \pm 0.05 |
| Model | 0.64 \pm 0.11 ^a | 0.41 \pm 0.08 ^a |
| HGF | 0.43 \pm 0.04 ^b | 0.68 \pm 0.15 ^b |

^a $P < 0.01$, vs. normal control group; ^b $P < 0.01$, vs. model group. HGF: hepatocyte growth factor



2.4 HGF对H₂O₂诱导LO2细胞的Bcl-2表达的影响
Western blot分析结果显示, 经100mmol/L H₂O₂作用LO2细胞4 h后, LO2细胞的Bcl-2表达(0.41 \pm 0.08)较正常对照组(0.63 \pm 0.05)降低($P < 0.05$)。与模型组相比, 给予质量浓度50 mg/L HGF后Bcl-2蛋白(0.68 \pm 0.15)表达升高($P < 0.05$)。说明HGF可能通过上调Bcl-2发挥其抗凋亡的作用。见表2, 图2。



3 讨论

既往研究认为, 肝细胞坏死是肝脏疾病的主要病理改变, 随着分子生物学及细胞生物学的研究进展, 近年来国内外大量的研究证明, 肝细胞凋亡在这一病理过程中发挥了主要的作用^[2, 10-12]。肝细胞凋亡是肝脏手术及

肝脏疾病中不可避免的病理过程, 最终可导致肝脏损伤甚至肝功能衰竭^[13]。如何减轻肝细胞凋亡的发生已经成为临床上肝脏外科研究的重要课题之一。

肝细胞生长因子是一种具有多种生物学活性的细胞因子, 是由间质细胞分泌的异二聚体多糖蛋白。其主要功能有促细胞有丝分裂、扩散运动及细胞营养作用等。可促进损伤组织修复和器官再生。对急性损伤的修复、防止纤维化及预防某些慢性疾病所致器官功能不全有潜在的治疗作用^[14-15]。近年来, HGF的抗凋亡作用逐渐受到重视, 研究表明, HGF能阻滞肝功能衰竭^[16], 在肝脏肿瘤中亦发挥着重要的作用^[17-18]。进一步的研究显示, 它还能通过提高DNA修复能力起到细胞保护作用。但HGF如何发挥抗凋亡作用的机制仍不太清楚。原癌基因Bcl-2是目前公认的促进细胞生存抑制细胞凋亡的基因^[19], 正常情况下, Bcl-2在肝细胞中不表达, 当肝细胞受到损伤时, Bcl-2立即启动, 其基因产物的表达可抑制或逆转细胞凋亡的发生^[20]。实验发现, 给予HGF后能够显著增加肝细胞原癌基因Bcl-2的表达, 说明HGF是通过促进Bcl-2的表达来减少LO2细胞凋亡的。

本实验结果证明, 体外培养的LO2细胞加入100 mmol/L H₂O₂作用4h后, 可见明显的细胞凋亡现象的发生, 表现为细胞存活率降低、Caspase-3蛋白表达显著升高而Bcl-2蛋白表达明显降低。给予质量浓度50 mg/L HGF预处理24 h后, 再加入100 mmol/L H₂O₂继续培养4 h, 可明显逆转上述细胞凋亡现象的发生, 增加细胞存活率, 提示HGF对H₂O₂诱导的LO2细胞凋亡具有抑制作用。同时, 给予HGF后, LO2细胞的Bcl-2蛋白表达显著升高。以上说明, HGF抑制H₂O₂诱导的细胞凋亡作用是通过增高Bcl-2表达实现的, 其作用机制与Bcl-2途径相关, 从而促进肝细胞再生。

总之, 肝细胞生长因子对H₂O₂诱导的LO2细胞凋亡有着重要保护的意义, 其调控机制是通过提高LO2细胞内的Bcl-2的表达实现的。但是肝细胞生长因子作用于Bcl-2调控途径是否与下游的其他途径相关, 还需要进一步研究探讨。

4 参考文献

- [1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-257.
- [2] Kiliçarslan A, Kahraman A, Akkiz H, et al. Apoptosis in selected liver diseases. *Turk J Gastroenterol*. 2009;20(3):171-179.
- [3] Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths. *Hepatology*. 2006;43(2):S31-44.
- [4] Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin Liver Dis*. 2010;30(4):402-410.
- [5] Tokunou M, Niki T, Eguchi K, et al. c-MET expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2001;158(4):1451-1463.
- [6] Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(1):188-202.

[7] Li Z, Mizuno S, Nakamura T. Antinecrotic and antiapoptotic effects of hepatocyte growth factor on cholestatic hepatitis in a mouse model of bile-obstructive diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(2):G639-646.

[8] Santangelo C, Matarrese P, Masella R, et al. Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. *J Mol Endocrinol.* 2007;38(1-2):147-158.

[9] Pereira-Caro G, Sarriá B, Madrona A, et al. Alkyl Hydroxytyrosyl Ethers Show Protective Effects Against Oxidative Stress in HepG2 Cells. *J Agric Food Chem.* 2011.

[10] Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev.* 2010;90(3):1165-1194.

[11] Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1641-1654.

[12] Schaff Z, Nagy P. Novel factors playing a role in the pathomechanism of diffuse liver diseases: apoptosis and hepatic stem cells. *Orv Hetil.* 2004;145(35):1787-1793.

[13] Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003;74(2):86-93.

[14] Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol.* 1995;129(5):1177-1180.

[15] Liu H, Chen JL, Xiang GA. Signal transduction pathway in liver fibrosis regulated by human hepatocyte growth factor. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010;30(3):431-434.

[16] Jin SZ, Meng XW, Sun X, et al. Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration induced by transfusion of bone marrow mononuclear cells in a murine acute liver failure model. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2011;18(3):397-405.

[17] Piscaglia AC, Shupe TD, Pani G, et al. Establishment of cancer cell lines from rat hepatocellular carcinoma and assessment of the role of granulocyte-colony stimulating factor and hepatocyte growth factor in their growth, motility and survival. *J Hepatol.* 2009;51(1):77-92.

[18] Grotegut S, Kappler R, Tarimoradi S, et al. Hepatocyte growth factor protects hepatoblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis by AKT activation. *Int J Oncol.* 2010;36(5):1261-1267.

[19] Cox AG, Hampton MB. Bcl-2 over-expression promotes genomic instability by inhibiting apoptosis of cells exposed to hydrogen peroxide. *Carcinogenesis.* 2007;28(10):2166-2171.

[20] Hossini AM, Eberle J. Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(11): 1612-1619.

来自本文课题的更多信息一

作者贡献: 沈广海进行实验设计, 实验实施为高爽, 实验评估为唐博, 资料收集为田丽敏, 沈兆亮成文, 沈广海审核, 沈广海对文章负责。

致谢: 本次实验得到辽宁医学院附属第一医院中心实验室各位老师帮助, 在此一并表示感谢。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: 肝细胞生长因子促进细胞增殖、迁移及对组织器官的保护作用已众所周知, 但是干细胞生长因子对正常肝细胞凋亡的作用及机制目前尚不清楚。实验以正常人 LO2 肝细胞为对象, 观察肝细胞生长因子对 LO2 细胞凋亡的作用并探索其机制。为逆转肝细胞凋亡提供新的方向, 丰富了临床治疗肝脏疾病的方法。

本刊组织构建栏目已出版“心肌损伤动物模型”研究的相关文章: 本刊学术部

- 微创法构建猪急性心肌梗死模型 (2007C243M) 2007, 11(25): 5042-5043
陶四明, 郭涛, 普顺华, 等. [关键词]心肌梗死; 猪; 球囊封堵 [关键词]水通道蛋白2; 酶联免疫吸附测定; 充血性心力衰竭; 低钠血症
- 冠状动脉堵塞法与栓塞法制备小型猪心肌梗死模型的对比 2009, 13(50): 9913-9916
孙帅, 郭涛 [基金]云南省社会攻关资助项目(2006SG10) [关键词]冠状动脉堵塞法; 冠状动脉球囊堵塞法; 心肌梗死; 小型猪; 模型
- 定量组织速度成像技术评价阿霉素心肌病模型大鼠心功能的价值 2007, 11(40): 8086-8089
刘洪智, 高传玉, 曹林生, 等. [关键词]大鼠; 阿霉素; 心肌病; 定量组织速度成像技术
- 腹主动脉部分缩窄大鼠模型体外心脏的电生理特点 2007, 11(8): 1469-1472, 1476
倪量, 王硕仁 [关键词]腹主动脉部分缩窄; 大鼠; 心脏; 电生理
- 构建心肌梗死后充血性心力衰竭大鼠模型 2007, 11(37): 7318-7321
王彤, 万智, 符岳, 等. [关键词]模型; 动物; 心力衰竭; 充血性; 心肌梗塞; 大鼠; 组织构建
- 超选左前降支微栓剂混悬液分次灌注构建小型猪急性心肌梗死后缺血性心力衰竭组织工程学模型 2010, 14(20): 3691-3695
张晶, 傅向华, 贾辛未, 等. [基金]国家自然科学基金资助(30871086) [关键词]小型猪; 急性心肌梗死; 缺血性心力衰竭; 微栓剂混悬液; 心肺组织工程
- 以球囊封堵法建立猪心肌梗死模型的可行性研究 2009, 13(46): 9032-9036
孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. [基金]云南省应用基础研究面上项目基金资助
- 酶联免疫吸附法检测心力衰竭模型大鼠尿液水通道蛋白2的变化及意义 卢武生, 许顶立, 孟素荣, 等.