

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.018.html>

改构型酸性成纤维细胞生长因子 对体外培养肝细胞增殖活性的影响

徐雅玲¹, 黄巨恩²

摘要 目的 探讨改构型酸性成纤维细胞生长因子(MaFGF)对体外培养大鼠肝细胞增殖的影响。方法 采用“0.25%胰酶+0.1%胶原酶”消化法分离培养大鼠肝细胞并传代纯化扩增,取第3代细胞鉴定后实验:①形态学法观察在不同浓度MaFGF组中细胞的形态变化;②将实验随机分为对照组和MaFGF组,MaFGF组加入一系列浓度的MaFGF,MTT法测定不同浓度MaFGF组作用于肝细胞24、48、72 h的促增殖活性;③MTT法筛选出最适的MaFGF浓度,用此浓度和不加生长因子2种方式培养细胞,并绘制细胞生长曲线。结果 ①MaFGF对体外培养的肝细胞有一定的促增殖作用,但是与浓度不成正比;且实验表明24 h的增殖率较其它时间点显著增高($P < 0.05$);比较对照组和各组($4.68 \times 10^{-3} \sim 7.80 \times 10^{-3}$ mg/L MaFGF组)均差异有统计学意义($P < 0.05$),但各组间对肝细胞的促增殖作用的差异无统计学意义;②最适浓度(6.24×10^{-3} mg/L) MaFGF的第4天细胞数量较对照组明显增加($P < 0.05$);MaFGF组的第10天细胞数(12.4×10^4)是对照组(6×10^4)的2.1倍($P < 0.05$)。结论 在适宜浓度和时间内,MaFGF对肝细胞具有

一定的促增殖作用且不具有浓度依赖性。

关键词 改构型酸性成纤维细胞生长因子;肝细胞;细胞培养;增殖

中图分类号 R 965

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1662-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.018

改构型酸性成纤维细胞生长因子(modified acidic fibroblast growth factor, MaFGF)是通过人工改构酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)所致的变构体 aFGF。虽然这种突变体失去了促分裂的性能,但是依然能够结合成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)受体,且将 FGF 受体作为媒介,使供体转移给受体表达 c-fos 发生酪氨酸磷酸化,保留其非促分裂活性^[1]。Johnson et al^[2]证实 MaFGF 在促分裂检测中,拥有比 aFGF 更稳定的三维结构。至于 MaFGF 是否具有促增殖性尚存在疑问。刘华伟等^[3]报道在体外培养条件下, MaFGF 不能刺激脾细胞增殖;刘华钢等^[4]研究证明 MaFGF 对肾小管上皮细胞及胃癌细胞有促增殖活性,但比 aFGF 弱。对于 MaFGF 是否对肝细胞有促增殖作用,至今国内外尚未有报道。该文应用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐法(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)结合形态学观察法,探究 MaFGF 对肝细胞增殖作用的影响,为进一步探讨 MaFGF 在肝细胞增殖分化中的作用提供了实验依据。

2017-07-17 接收

基金项目: 2017 年度广西高校青年教师基础能力提升项目(编号: 2017KY0367); 2017 年广西科技大学自然科学培育计划项目; 2016 年度广西科技大学科学基金项目(编号: 校科自 174514); 2016 年广西科技大学科学基金项目培育专项基金

作者单位: ¹广西科技大学医学院健康评估教研室,柳州 545006

²广西医科大学生命科学研究院,南宁 530021

作者简介: 徐雅玲,女,讲师,硕士;

黄巨恩,男,教授,博士,硕士生导师,责任作者, E-mail:

hje5810@163.com

were measured, then the optimum preparation condition was achieved by employing the orthogonal test. The *in vitro* release characteristics of microspheres were investigated by using PBS as the release medium. **Results** The drug loaded microspheres with 400 r/min stirring rate, 2% PVA concentration and 400 mg/ml PLGA concentration had the best drug loading and encapsulation efficiency, which were 6.21×10^{-7} and 75.10%, respectively. Besides, *in vitro* release test showed that the drug loaded microspheres had a good sustained-release effect which sustained release time of 30 days. **Conclusion** The OPG-PLGA microspheres prepared by the optimized conditions has high drug loading and encapsulation efficiency, and has good sustained-release effect, which provide the basis for the study of the sustained release drugs used in alveolar ridge preservation.

Key words osteoprotegerin; poly lactic acid glycolic acid; drug loading; encapsulation efficiency; preparation process

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 Wistar 大鼠 4 只, 约 60 g, 由广西医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 DMEM-HG、胎牛血清、胰蛋白酶、胶原酶(美国 Gibco 公司); MaFGF(批号: 20050618, 暨南大学生物工程研究所); MTT(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分离、消化肝组织 无菌提取 Wistar 大鼠肝脏于盛装 PBS 平衡盐溶液的培养皿中, 剥离肝被膜后将肝脏剪成大约 1 mm^3 的组织块。先用 0.25% 胰酶消化 3 min, 再用 0.1% 胶原酶消化 10 min, 而后用 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 终止消化, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 培养基洗涤, 用吸管轻柔吹打 2~3 min 促使消化后的组织分散呈絮状, 此过程避免产生气泡, 减少分离消化下来肝细胞的损伤。自然沉淀 5 min, 弃上清液, 取中下 2/3 细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 重悬洗涤 2 次, 弃上清液, 下层即为肝细胞。

1.2.2 培养肝细胞 将上述离心管中分离获取的肝细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 培养液 5 ml 重悬, 轻柔吹打至细胞悬液。采用台盼蓝活细胞计数, 活细胞率在 85% 以上, 而后将细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中, 使细胞密度大约为 1×10^7 个/L, 静置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱培养。

1.2.3 鉴定肝细胞 肝细胞的鉴定采用糖原染色法即过碘酸-雪夫染色法(periodic acid-schiff stain, PAS)。随机分为两组: 对照组(预处理: 1% 淀粉酶液在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温下消化 1 h)和 MaFGF 组。分别取对照组和 MaFGF 组贴壁率达 $>85\%$ 的 96 孔板, 依次用 PBS 清洗、4% 多聚甲醛浸泡、固定各 15 min; 预处理对照组后在两组中同时加入 0.5% 高碘酸水溶液, 使其发生氧化反应 5~8 min。而后滴入无色品红液(Schiff 试剂)遮光加盖染色约 20 min; 再用 0.5% 偏重亚硫酸钠液、流水冲洗各 2 min。着色后用 0.25% 胰酶消化 2~3 min, 再用含 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 培养基重悬细胞, 并吸取 20 μl 计数。

1.2.4 MTT 法分组 将实验随机分为对照组(不含 MaFGF)和 MaFGF 组(含有不同浓度的 MaFGF)。依次是含有不同浓度的 MaFGF (0 、 3.12×10^{-3} 、

4.68×10^{-3} 、 6.24×10^{-3} 、 7.80×10^{-3} mg/L) 共 5 组 ($n=12$), 此 5 组分别培养 24、48、72 h 后加入 MTT 试剂检测其吸光度值(optical density, OD)。以上各组均取自原代培养 3 d 的细胞。重复实验 3 次。

1.2.5 生长曲线法检测肝细胞增殖活性 将细胞重悬液接种于 24 孔培养板中(2×10^4 个/孔), 静置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱培养 6 h 至细胞完全贴壁。吸弃培养基, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 的培养液继续培养 24 h。随机分为两组: ① 对照组用含 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 培养液培养; ② MaFGF 组: 用 6.24×10^{-3} mg/L MaFGF 培养。于第 2、4、6、8、10 d 分别对 MaFGF 组和对照组的细胞用血细胞的计数板计数并绘制其生长曲线。

1.2.6 观察检测目标 ① 在倒置相差显微镜下分别观察培养不同时间的肝细胞、PAS 染色后以及 MTT 法处理后的肝细胞形态; ② MTT 检测法: 用含有不同浓度的 MaFGF 处理细胞后, 滴入 20 μl 的 MTT 培养 3 h, 置于酶标仪(检测波长 490 nm)进行检测并记录 OD 值; ③ 应用 EXCEL 绘制并比较各组的生长曲线图。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。不同浓度不同时间的 MaFGF 作用于各组肝细胞所得计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用单因素方差分析比较多组样本间均值; 运用独立样本 t 检验比较两组样本间均值。 $\alpha=0.05$ 为检验标准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态观察 培养 5 d 的原代肝细胞(不含 MaFGF)形态呈铺路石样, 体积较大、折光性强、透明度高(图 1A); 低浓度(3.12×10^{-3} mg/L) MaFGF 组培养 24 h(总时间仍然为 5 d, 下同), 观察到细胞数量增多不明显(图 1B); 中浓度(4.68×10^{-3} mg/L) MaFGF 组培养 24 h 可显示肝细胞呈多角型上皮样且似岛屿状, 向周围逐渐扩增, 数量增多较明显, 且细胞与细胞之间紧密相连, 轮廓也比较清晰(图 1C); 高浓度(6.24×10^{-3} mg/L) MaFGF 组培养 24 h 后可观察到多角型上皮样细胞互相衔接、紧密相连, 几乎铺满整个视野, 并融合成片出现复层生长(图 1D)。

2.2 肝细胞鉴定 采用 PAS 法对体外原代肝细胞

鉴定可见: 阳性细胞的胞质被着色, 呈现出粉红色糖原颗粒, 其细胞核呈空泡状且没有被着色 (图 2A); 阴性细胞的胞质不显色呈无色 (图 2B)。经计数其阳性细胞约占 95%, 符合实验要求。可用于实验。

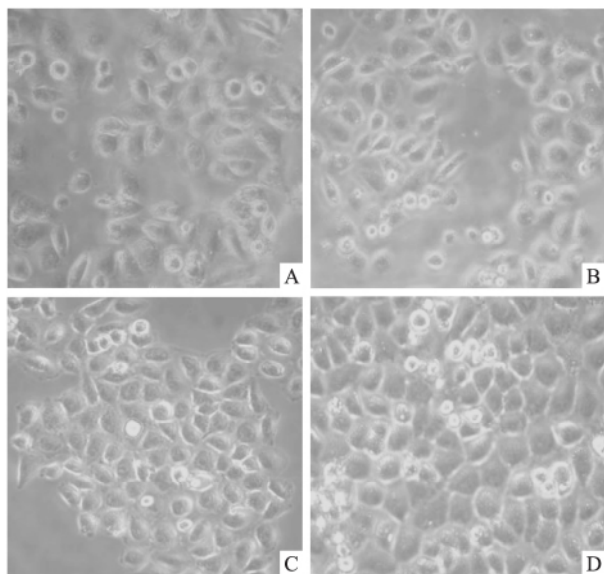


图1 不同浓度的 MaFGF 作用肝细胞 24 后的形态变化 ×200

A: 对照组; B: 3.12×10^{-3} mg/L MaFGF 组; C: 4.68×10^{-3} mg/L MaFGF 组; D: 6.24×10^{-3} mg/L MaFGF 组

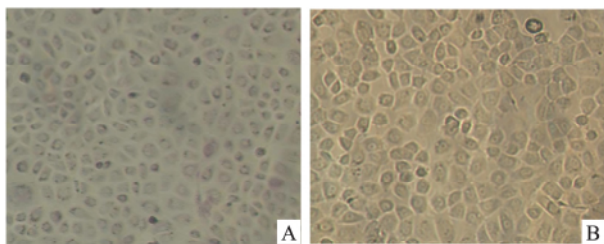


图2 肝细胞经 PAS 染色法后在倒置相差显微镜下的变化 ×200

A: 阳性细胞; B: 阴性细胞

2.3 MaFGF 的促增殖作用 不同浓度 MaFGF 组对体外培养正常肝细胞作用后的 OD 值及细胞增殖

率测定结果见表 1。MTT 结果显示: MaFGF 在一定范围内可以促进肝细胞的增殖, 但其促增殖作用不具有浓度-效应特性。与对照组相比, 3.12×10^{-3} mg/L MaFGF 组在各时间段对体外培养的肝细胞增殖的效果均不明显, 差异无统计学意义。随着 MaFGF 浓度的增高, 对肝细胞增殖的作用效果增强 ($P < 0.01$)。其中, 6.24×10^{-3} mg/L MaFGF 组作用 24 h 时促增殖作用达到峰值, 半数抑制浓度值为 6.24×10^{-3} mg/L, 因此选用浓度为 6.24×10^{-3} mg/L 的 MaFGF 用于后续实验。各组作用 48、72 h 后, 增殖率较 24 h 减少, 即 24 h 的增殖率明显高于其它时间点 ($P < 0.05$)。

2.4 绘制肝细胞的生长曲线 第 4 天开始, 加入 6.24×10^{-3} mg/L MaFGF 组细胞数量比对照组的细胞数量明显增多 ($P < 0.05$); 细胞培养至第 10 天, MaFGF 组的细胞是对照组的 2.1 倍 ($P < 0.05$), 表明 MaFGF 可有效促进肝细胞增殖。见图 3。

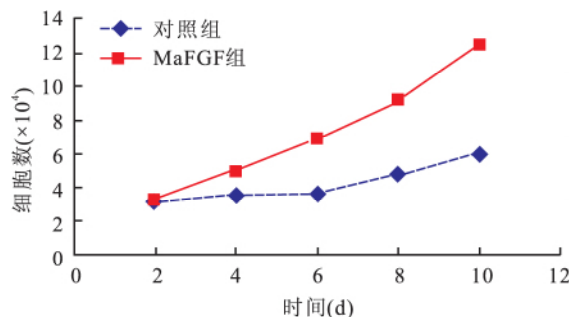


图3 在对照组和 MaFGF 组中肝细胞的生长曲线

3 讨论

本课题组前期采用 WST-8 法检测不同浓度的 MaFGF 分别作用于肾小管上皮细胞、胃癌细胞 48 h 后的促增殖活性, 以往的实验显示 MaFGF 对肾小管上皮细胞及胃癌细胞有较弱的促分裂活性。研

表1 不同浓度不同时间 MaFGF 作用于肝细胞 OD 值、增殖率 ($n = 12$)

组别	24 h		48 h		72 h		F 值	P 值
	OD ($\bar{x} \pm s$)	增殖率 (%)	OD ($\bar{x} \pm s$)	增殖率 (%)	OD ($\bar{x} \pm s$)	增殖率 (%)		
对照	0.731 ± 0.202	—	0.721 ± 0.118	—	0.729 ± 0.197	—	179.268	0.03
MaFGF (mg/L)								
3.12×10^{-3}	0.733 ± 0.163	10.41	0.543 ± 0.118	-9.97	0.724 ± 0.136	-7.08	382.962	0.00
4.68×10^{-3}	0.737 ± 0.138*	18.56	0.624 ± 0.145*	15.60	0.796 ± 0.110*	16.71	257.935	0.02
6.24×10^{-3}	0.825 ± 0.109*	50.02**	0.731 ± 0.169*	41.81	0.863 ± 0.149*	43.48	412.012	0.00
7.80×10^{-3}	0.799 ± 0.132*	48.61**	0.679 ± 0.161*	37.53	0.945 ± 0.182*	46.25	438.147	0.00

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 48、72 h 比较: ** $P < 0.01$

究^[6]表明,虽然 MaFGF 经过改构去除了促分裂活性,但其仍然保留有一定的促分裂性。然而,亦有研究报道 MaFGF 对某些细胞失去了促分裂活性,比如 Johnson et al^[7]就曾报道了 MaFGF 不能刺激体外培养的脾细胞增殖。但是 MaFGF 是否能够促进体外培养的肝细胞增殖的研究目前仍为空白。本研究采用形态学观察法、MTT 法和生长曲线绘制法揭示了 MaFGF 对外体培养的肝细胞有一定的促增殖活性作用,但是其作用不呈浓度-效应特点。在 24 h,随着 MaFGF 浓度的增高,尤其是在 6.24×10^{-3} mg/L 时,增殖作用强,这与形态学观察结果是一致的。超过 48 h 则作用减弱,可能与 MaFGF 浓度的衰减有关。推测 MaFGF 的促增殖活性可能具有一定的选择性。

曹定国等^[8]研究发现 MaFGF 即使不能通过细胞核发挥促分裂活性,但是仍然能进入细胞质并发动 FGF 受体激活胞内信号级联反应。揭示了 MaFGF 需要依赖 FGF 受体,只是和未改构前与 FGF 受体的结合方式可能发生了变化,其将 FGF 受体作为媒介,将供体转移给受体表达 c-fos; 并使之发生酪氨酸磷酸化,从而能够开启其它的信号途径或者转化信号强度,这或许就是致使 MaFGF 与原型 aFGF 效能不同的原因所在^[7-8]。此外,这种效能差异除了与 FGF 受体激活胞内信号级联反应有关外,也可能与 MaFGF 自身能够进入细胞质,并且能够聚积在细胞质中且能够改变细胞质内的功能相关^[9]。据查阅文献^[10]得知,目前研究者在 MaFGF 的 FGF 受体结合和有关信号级联反应方面只停留在研究的初级阶段。因此,有关于 MaFGF 在如何改变信号转导途径或者转化信号强度等方面需要进一步深入进行探索和研究。

MaFGF 是通过人工改构 aFGF 所致的变构体 aFGF,其采用基因工程技术剔除了关于分裂活性的核转位序列,虽然失去了促进细胞分裂的活性,但是仍然还具有非促分裂的活性,发挥其对细胞的损伤保护作用。从而, MaFGF 才能够避开促分裂活性带来的肿瘤发生的危险,可以帮助人类解决在体内用药时所担心的毒副作用,因而可以发挥其临床用药的价值^[11]。已有研究揭示 MaFGF 能够发挥其对细胞损伤的保护作用,胡文娟等^[12]通过建立大鼠肾缺血/再灌注致急性肾衰竭模型,初步探讨了 MaF-

GF 对肾缺血/再灌注损伤的保护作用及量效关系;徐雅玲等^[13]通过建立白花丹素致体外培养肝细胞的损伤模型,证实了 MaFGF 对白花丹素损伤的原代培养肝细胞有一定的保护作用。MaFGF 是多功能生长因子,具有多种生物活性作用。为此,深入开展 MaFGF 对肝细胞增殖分化的作用,对于阐明肝细胞增殖分化的调节机制,以及对以后的体内用药具有深远的意义。

参考文献

- [1] 刘海燕,黄巨恩,刘丽敏,等. MaFGF 对急性染顺铂小鼠肾损害的保护作用研究 [J]. 毒理学杂志, 2015, 29(2): 127-30.
- [2] Johnson D E, Williams L T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family [J]. Adv Cancer Res, 1993, 60: 1-41.
- [3] 刘华伟,赵 勇,李贵生,等. FGF-1 改构体对小鼠脾细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(6): 45-50.
- [4] 刘华钢,刘丽敏,黄巨恩,等. 改构型酸性成纤维细胞生长因子对细胞增殖活性的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(10): 1448-50.
- [5] 林 媛,李校坤,徐锦堂,等. 改构 aFGF 在角膜内皮细胞中的分泌表达及意义 [J]. 眼科研究, 2005, 23(2): 113-8.
- [6] 曹定国,李校坤,付小兵,等. 改构酸性成纤维细胞生长因子对小鼠胸腺细胞凋亡的影响 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(9): 80-3.
- [7] 沈宇腾,张羽飞,顾冬雪,等. FGF-4 对 TGF- β 1 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及机制研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2017, 38(1): 4-7.
- [8] 黄太萍,黄巨恩,李校堃. 酸性成纤维细胞生长因子对庆大霉素诱导的海马星形胶质细胞凋亡的影响 [J]. 广东医学, 2016, 37(2): 204-7.
- [9] 徐雅玲,黄巨恩,梁 菁,等. 改构型酸性成纤维细胞生长因子对紫杉醇诱导体外大鼠肝细胞损伤保护作用的体外实验研究 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2016, 37(1): 44-8.
- [10] 韩 冬,宋 涛,杨 光. 成纤维细胞生长因子在肿瘤中的研究现状 [J]. 医学综述, 2017, 23(2): 257-61.
- [11] 王 通,李校堃. 生长因子的新面孔——国家十重大科技攻关项目概览 [J]. 中国处方药, 2003, 2(2): 27-8.
- [12] 胡文娟,黄巨恩,李校堃,等. 改构型酸性成纤维细胞生长因子对大鼠肾缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(2): 166-9.
- [13] 徐雅玲,黄巨恩,刘华钢. 白花丹素致体外培养肝细胞的损伤及改构型酸性成纤维细胞生长因子对肝细胞的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(6): 786-90.

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.019.html>

PAF 通过 PKC β 途径对系膜细胞分泌细胞外基质的影响

肖艳华¹, 何笑云¹, 韩 晴¹, 胡小文², 周素娴¹

摘要 目的 探讨血小板活化因子(PAF)是否通过高糖可激活蛋白激酶 C- β (PKC β)途径调节高糖高脂环境下细胞外基质(ECM)的分泌。方法 将人肾小球系膜细胞分成6组:正常对照组、PAF组、PAF+LY333531组、高糖高脂组、高糖高脂+PAF组、高糖高脂+PAF+LY333531组;ELISA法测定各组中纤维连接蛋白(Fn)及IV型胶原(Col IV)含量,实时定量PCR测定PKC β I mRNA表达水平。结果 与正常对照组比较,其他5组Fn、Col IV、PKC β I mRNA表达增加

($P < 0.05$);与PAF组比较,PAF+LY333531组Fn、Col IV、PKC β I mRNA表达减少($P < 0.05$);与高糖高脂+PAF+LY333531组比较,高糖高脂组、高糖高脂+PAF组Fn、Col IV、PKC β I mRNA表达显著增加($P < 0.05$)。结论 高糖高脂环境下PAF通过促进PKC β I表达刺激Fn、Col IV分泌;当加入LY333531时,ECM分泌减少,PKC β I抑制剂对肾脏可能具有一定的保护作用。

关键词 血小板活化因子;细胞外基质;高糖高脂;PKC β I

中图分类号 R 692.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1666-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.019

2017-06-19 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号:81560148、81260134)

作者单位 桂林医学院附属医院¹ 内分泌科、² 呼吸内科,桂林 541000

作者简介 肖艳华,女,硕士研究生;

周素娴,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zoe_doctor@163.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿

Effects of modified acidic fibroblast growth factor on the proliferation activity cultured hepatocytes *in vitro*

Xu Yaling¹, Huang Ju'en²

(¹Dept of Health Assessment of Medical College, Guangxi University of Science and Technology, Lizhou 545006;

²College of Life Science, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

Abstract Objective To explore effects of modified acidic fibroblast growth factor (MaFGF) on the growth of hepatocytes cultured *in vitro*. **Methods** Hepatocytes of SD rats were isolated, cultured *in vitro* and subculture for three generations. After being identified, the cells were used in the experiment: ① Hepatocytes was observed by inverted phase contrast microscope; ② The experiment were randomly divided into control and experimental group, MaFGF with different concentration were added into the culture medium of hepatocytes, after 24, 48, 72 h, the mitogenic effects were measured by the MTT test; ③ The MTT test was used to detect the effects of MaFGF on the proliferation of the hepatocytes in 24 h. The growth curve was plotted. **Results** ① MaFGF potentiated the proliferation of hepatocytes, which was no significant effect with dose increased. The proliferative rate of 24 h were higher than that of the other time points ($P < 0.05$). there was statistical difference between the MaFGF group($4.68 \times 10^{-3} \sim 7.80 \times 10^{-3}$ mg/L) and the control group ($P < 0.05$). However, the mitogeic activities of each MaFGF group were insignificant; ② Four days after MaFGF(6.24×10^{-3} mg/L) added into the medium, the population of the hepatocytes was larger than that of the control ($P < 0.05$). The number of the hepatocytes incubated with MaFGF (12.4×10^4) was 2.1 times as large as the control(6×10^4) in the 10th day($P < 0.05$). **Conclusion** MaFGF has a certain role in promoting the proliferation of the hepatocytes at the appropriate concentration and time. However, the effects don't have concentration dependent manner.

Key words MaFGF; hepatocytes; cell culture; proliferation