

# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Apoptosis of Hepatic Stellate Cells and Changes of Extracellular Matrix Metabolism after Apoptosis

Feng Hong

Department of Gastroenterology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi, 030000, China

## Abstract

**Objective:** To explore the pathological process of hepatic fibrosis and to clarify the proliferation, contraction and secretion of extracellular matrix (ECM) by activated hepatic stellate cells, at the same time, to further analyze the induction pathway, apoptosis and post-apoptotic ECM metabolism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on hepatic stellate cells (HSC). **Methods:** HSC-T6 was cultured in fetal bovine serum DMEM with a concentration of 10% in a research institute in April 2019, Fetal bovine serum was cultured in serum-free medium after passage. They were divided into two groups, the control group was divided into three groups, and the control group 1 was normal HSC-T6, which was harvested at 8h after culture; control group 2 was normal HSC-T6 and harvested in culture for 24h; the control group 3 was normal HSC-T6, and was harvested after changing fresh medium for 24h; the model components were three groups, and the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added in the model group 1 was 100 nmol/L, and harvested in the culture for 8h; the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added in the model 2 group was 100 nmol/L, and harvested in the culture for 24h; the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added in the model 3 group was 100 nmol/L, and harvested after replacing the fresh medium for 24h in the culture for 8h. **Results:** In the control group, the early apoptotic cells harvested at 8 h were 1.96%, the late apoptosis and death cells were 3.6%, and the apoptotic rate was 5.56%. In the control group 2, the early apoptotic cells cultured for 24 hours were 7.52%, the late apoptosis and death cells were 6.23%, and the apoptotic rate was 13.75%. In the control group, the early apoptotic cells harvested 6.29% after 24 hours of fresh medium exchange, the late apoptosis and death cells were 6.29%, and the apoptotic rate was 12.58%. Group B TIMP-1>A group TIMP-1>C group TIMP-1. Group A MMP-2≈B group MMP-2>C group MMP-2. Group B MMP-2≈C group MMP-2>A group MMP-2. Group B MMP9≈C group MMP9>A group MMP9. Group A COLIA> Group B COLIA> Group C COLIA. Group A COLIII> Group B COLIII> Group C COLIII. The COLI variation gradient exceeds COLIII. **Conclusion:** During HSC-T6 culture, the apoptotic rate is proportional to time, and the replacement of fresh medium has no effect on apoptosis. In the early stage of apoptosis: TIMP-1 increased significantly, COLI and COLIII were highly expressed, MMP-2 and MMP-9 were less, HSC apoptosis increased, TIMP-1 increased, and HSC had strong anti-apoptotic ability. In the late stage of apoptosis: TIMP-1, COLI, COLIII expression decreased, MMP-2, MMP-9 expression increased, and apoptosis ability increased.

## Keywords

hepatic stellate cells; apoptosis; extracellular matrix

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝星状细胞凋亡以及凋亡后细胞外基质代谢的变化

洪峰

山西医科大学第二医院消化内科, 中国·山西太原 030000

## 摘要

**目的:** 探索肝纤维化的病理过程, 明确活化的肝星状细胞对细胞外基质 (ECM) 的增殖、收缩和分泌作用, 同时进一步分析 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对肝星状细胞 (HSC) 凋亡的诱导途径、凋亡情况、凋亡后 ECM 代谢的变化情况。 **方法:** 选取 2019 年 4 月某研究院浓度为 10% 的胎牛血清 DMEM 培养 HSC-T6 作为研究对象。胎牛血清在传代后, 换无血清培养基培养。将其分为两组, 对照组分为三组, 对照 1 组为正常的 HSC-T6, 于培养 8h 收获; 对照 2 组为正常 HSC-T6, 于培养 24h 收获; 对照 3 组为正常 HSC-T6, 于培养 8h 更换新鲜培养基 24h 后收获。模型组分为三组, 模型 1 组加入的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 100nmol/L, 于培养 8h 收获; 模型 2 组加入的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 100nmol/L, 于培养 24h 收获; 模型 3 组加入的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 100nmol/L, 于培养 8h 更换新鲜培养基 24h 后收获。 **结果:** 对照组 1 组, 培养 8h 收获的早期凋亡细胞 1.96%, 晚期凋亡、死亡细胞 3.6%, 凋亡率为 5.56%。对照组 2 组, 培养 24h 的早期凋亡细胞 7.52%, 晚期凋亡、死亡细胞 6.23%, 凋亡率为 13.75%。对照组 3 组, 培养 8h 更换新鲜培养基 24h 后收获的早期凋亡细胞 6.29%, 晚期凋亡、死亡细胞 6.29%, 凋亡率为 12.58%。B 组 TIMP-1 > A 组 TIMP-1 > C 组 TIMP-1。A 组 MMP-2 ≈ B 组 MMP-2 > C 组 MMP-2。B 组 MMP-2 ≈ C 组 MMP-2 > A 组 MMP-2。B 组 MMP9 ≈ C 组 MMP9 > A 组 MMP9。A 组 COL I A > B 组 COL I A > C 组 COL I A。A 组 COL III > B 组 COL III > C 组 COL III。COL I 变化梯度超过 COL III。 **结论:** HSC-T6 培养期间, 凋亡率与时间成正比, 更换新鲜培养基对凋亡无影响。在凋亡早期: TIMP-1 上升明显, COL I、COL III 高表达, MMP-2、MMP-9 较少, HSC 凋亡数量增加、TIMP-1 升高, HSC 抗凋亡能力强。在凋亡晚期: TIMP-1、COL I、COL III 表达减少, MMP-2、MMP-9 表达增高, 凋亡能力增加。

## 关键词

肝星状细胞; 凋亡; 细胞外基质

## 1 引言

肝纤维化是临床常见病与多发病<sup>[1]</sup>。近年来,随着肝纤维化患者数量的增多,临床开始加强对肝纤维化的研究。研究指出,肝纤维化属于HSC的一部分,肝损伤后会增加患者体内HSC的含量<sup>[2]</sup>。为了进一步明确H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HSC凋亡及其ECM代谢情况,本研究展开探析。

## 2 资料与方法

### 2.1 一般资料

选取2019年4月某研究院浓度为10%的胎牛血清DMEM培养HSC-T6作为研究对象。胎牛血清在传代后,换无血清培养基培养。将其分为两组,对照组分为三组,对照1组为正常的HSC-T6,于培养8h收获;对照2组为正常HSC-T6,于培养24h收获;对照3组为正常HSC-T6,于培养8h更换新鲜培养基24h后收获。模型组分为三组,模型1组加入的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为100nmol/L,于培养8h收获;模型2组加入的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为100nmol/L,于培养24h收获;模型3组加入的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为100nmol/L,于培养8h更换新鲜培养基24h后收获。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 仪器设备选择方法

仪器设备:台式高速冷冻离心机(北京四环科学仪器厂)、电热恒温水浴箱(北京医疗设备长HW1型)、电子精密天平(上海天平仪器厂)、细胞培养箱(德国 Heraeus 公司)、紫外-可见光分光光度计(德国 Heraeus 公司)、流式细胞仪(美国 BD 公司)。

#### 2.2.2 材料选择方法

肝星状细胞的选择,由纽约西奈山医院肝病科Friedman教授所赠,为HSC-T6。该细胞是由SV40转染SD大鼠星状细胞形成的,Anexin V-FITC(晶美生物工程有限公司);DMEM培养基(Gibco公司)。RNA提取试剂(Gibco公司)。TIMP-1抗体(Santa Cruz公司产品)、羊抗大鼠IgG(Santa Cruz公司产品)。PVDF膜(Hyclone公司)。

#### 2.2.3 细胞培养与分析方法

细胞培养方法:在复苏HSC-T6后,将其放置于塑料细胞培养瓶中进行接种,采用浓度为10%的胎牛血清DMEM培

培养基,放置于浓度为5%的CO<sub>2</sub>中进行培养。传代后继续放置于无血清培养基,持续培养。流式细胞仪凋亡分析方法:依据Anexin V-FITC试剂盒中关于凋亡检测的相关说明与指示,当胰酶消化完成后,将细胞放置于浓度10%的FBS培养基进行中和,保持适宜的室温和800rpm,离心处理5min。放弃对原液的提取,取新培养基重悬,对体积进行调整,至4ml。取1ml细胞进行重新离心处理,其余3ml细胞提取RNA、蛋白。将准备好的预冷PBS细胞冲洗2次,选取浓度250ul的结合缓冲液,对悬浮细胞重新提取,浓度为1×10<sup>6</sup>/ml,在5ml的流式管中,加入浓度为100ul的细胞悬液、碘化丙锭溶液,混合后孵育至少15min。在此基础上,于反应管中加入浓度为400ul的PBS,进行流式细胞仪分析。设置不同HSC凋亡水平组,将凋亡5%的HSC设为A组;将凋亡58%的HSC设为B组;将凋亡7%的HSC设为C组。提取A、B、C组细胞的RNA,采用紫外分光光度计对上述细胞中的浓度进行测定,其中A组浓度为1266ng/ul, B组浓度为1198ng/ul, C组浓度为162ng/ul。

### 2.3 统计学处理

使用SPSS19.0统计软件对统计数据进行处理,计数资料使用( $\chi^2$ )检验,计量资料使用配对t对检验, P < 0.05表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 ECM、TIMPs、MMPs与HSC凋亡的关系

对照组1组,培养8h收获的早期凋亡细胞1.96%,晚期凋亡、死亡细胞3.6%,凋亡率为5.56%。对照组2组,培养24h的早期凋亡细胞7.52%,晚期凋亡、死亡细胞6.23%,凋亡率为13.75%。对照组3组,培养8h更换新鲜培养基24h后收获的早期凋亡细胞6.29%,晚期凋亡、死亡细胞6.29%,凋亡率为12.58%。

### 3.2 不同HSC凋亡水平下COL I、COL III、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2、MMP-9变化

结合分组,对不同HSC凋亡组别进行分析时,TIMPs、MMPs、及胶原改变的研究表明: B组TIMP-1含量> A组TIMP-1含量> C组TIMP-1含量。A组MMP-2含量≈ B组MMP-2含量> C组MMP-2含量。B组MMP-2含量≈ C组MMP-2含量> A组MMP-2含量。B组MMP9含量

≈ C组 MMP9 含量 > A组 MMP9 含量。A组 COL I A 含量 > B组 COL I A 含量 > C组 COL I A 含量。A组 COL III 含量 > B组 COL III 含量 > C组 COL III 含量。COL I 变化梯度超过 COL III。

## 4 讨论

肝纤维化,是肝硬化形成的必经病阶段,也是慢性肝病的病理基础<sup>[3]</sup>。根据对肝纤维化形成机理的分析,普遍认为肝细胞损伤是致病因子,激活干细胞,分泌出能够促进血小板分泌的细胞因子,作用于 HSC,促使 HSC 被激活,转化成肝纤维细胞,合成 ECM。大量 ECM 在肝内沉积,长时间将形成肝纤维化<sup>[4]</sup>。与其他组织纤维化的差异,HSC 的玻璃样瘢痕较少,肝纤维化逆转的可能性要明显高于其他组织纤维化。曾有研究指出,肝纤维化细胞学的基础是 HSC 活化,其活化也是 ECM 细胞合成基地<sup>[5]</sup>。因而,从理论学角度来说,肝纤维化与 HSC 的活化有十分密切的关系。为了进一步明确 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HSC 凋亡、凋亡后 ECM 代谢变化情况,本次研究展开重点分析。

本次研究结果显示:培养 8h 收获的早期凋亡细胞 1.96%,晚期凋亡、死亡细胞 3.6%,凋亡率为 5.56%。对照组 2 组,培养 24h 的早期凋亡细胞 7.52%,晚期凋亡、死亡细胞 6.23%,凋亡率为 13.75%。对照组 3 组,培养 8h 更换新鲜培养基 24h 后收获的早期凋亡细胞 6.29%,晚期凋亡、死亡细胞 6.29%,凋亡率为 12.58%。通过对该研究结果的分析,可明确 TIMPs、MMPs 与 ECM 含量降低,能够在一定程度上实现对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HSC 凋亡诱导的抑制。此外,分析 SC 不同凋亡水平下的 ECM 代谢变化时,认为在肝纤维化发生后,HSC 在细

胞因子激活与活化的影响下,形成了肌纤维细胞,分泌了大量的 ECM。其中,在 ECM 中最为丰富的结构成分,就是胶原。通过实验研究与分析,在培养 HSC 过程中,胶原的不同类型占比明显不同,其中变化最为明显的是 I 型。说明在最初活化时,胶原的增多以 III 型为主,活化后期的胶原以 I 型为主。最终研究结果表明,在凋亡早期:TIMP-1 上升明显,COL I、COL III 高表达,MMP-2、MMP-9 较少,HSC 凋亡数量增加、TIMP-1 升高,HSC 抗凋亡能力强。在凋亡晚期:TIMP-1、COL I、COL III 表达减少,MMP-2、MMP-9 表达增高,凋亡能力增加。

综上所述,能够从上述研究中明确,HSC-T6 培养期间,凋亡率与时间成正比,更换新鲜培养基对凋亡无影响,且 HSC 的活化与凋亡有密切关系。

## 参考文献

- [1] 钟鸣,张宝璟,王超,等.排钱草生物碱对乙醛刺激的人源肝星状细胞增殖及细胞外基质的影响[J].中国现代应用药学,2017,24(01):8-11.
- [2] 朱海燕,吴雄健,曾斌,等.神经生长因子及其低亲和力受体诱导肝星状细胞凋亡的初步研究[J].中国当代医药,2018,25(29):14-16.
- [3] 曹杰,林丽馨,覃桂金,等.荔枝核总黄酮对 TGF-β1 诱导人肝星状细胞凋亡的影响及机制[J].山东医药,2018,26(5):13-16.
- [4] 刘幸,田甜,余蕾,等.辛二酰苯胺异羟肟酸诱导大鼠原代肝星状细胞凋亡[J].中国病理生理杂志,2017,23(5):55-56.
- [5] 王振,胡峻铮,范卫民.脂联素通过 AMPK/mTOR 通路抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠髓核细胞凋亡及细胞外基质退变[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(07):72-77.