

## 柔软纤维蛋白水凝胶对活化态肝星状细胞转分化行为的影响

陈 焯<sup>1</sup>, 胡文慧<sup>2</sup>, 曾 柱<sup>2</sup>, 李 兴<sup>1</sup>, 蒋天鹏<sup>1</sup>, 王黎洲<sup>1</sup>, 周 石<sup>1</sup>, 宋 杰<sup>1</sup>  
(贵州医科大学 1. 医学影像学院, 2. 生物与工程学院, 贵州 贵阳 550004)

**摘 要:**【目的】探讨活化态肝星状细胞(HSC)在柔软细胞外基质(ECM)中重新恢复为静息态的可能性。【方法】稳定表达肌成纤维细胞(MFB)表型的HSC-T6培养于由1 mg/mL纤维蛋白水凝胶构建的二维(2D)或三维(3D)体外培养基质模型之中,利用细胞活力检测试剂盒(CCK8)测定各时间段(24 h、48 h、72 h、96 h)的细胞增殖活力,免疫荧光及明胶酶谱法检测细胞 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及MMP-9的表达,原子力显微镜(AFM)探测细胞表面形貌及其变形能力。【结果】经纤维蛋白水凝胶培养后,活化态HSC-T6的细胞增殖活力、 $\alpha$ -SMA、MMP-2和MMP-9的表达以及细胞变形能力均发生明显下调( $P<0.05$ ),而2D组纤维蛋白水凝胶对细胞增殖活力的抑制、 $\alpha$ -SMA应力纤维的形成以及细胞变形能力的影响与3D组对比亦存在不同程度的差异( $P<0.05$ )。【结论】柔软的纤维蛋白水凝胶可抑制活化态HSC转分化,但无法使其逆转为 $\alpha$ -SMA阴性的静息态表型。

**关键词:** 肝星状细胞;细胞外基质;转分化;纤维蛋白水凝胶

中图分类号:R575

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2018)01-0009-09

### Effect of Soft Fibrin Gels on Transdifferentiation Behaviour in Activated Hepatic Stellate Cell

CHEN Ye<sup>1</sup>, HU Wen-hui<sup>2</sup>, ZENG Zhu<sup>2</sup>, LI Xing<sup>1</sup>, JIANG Tian-peng<sup>1</sup>, WANG Li-zhou<sup>1</sup>, ZHOU Shi<sup>1</sup>,  
SONG Jie<sup>1</sup>

(1. College of Medical Imaging, 2. College of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Corresponding to: SONG Jie; E-mail: songjie2515@163.com

**Abstract:** 【Objective】 To determine whether activated hepatic stellate cell (HSC) become quiescent phenotype if cultured in a soft extracellular matrix (ECM). 【Methods】 HSC-T6 cells which stably expressed myofibroblast (MFB) phenotype, were cultured in the 2D and 3D in-vitro matrix culture models that were constructed by 1 mg/mL fibrin gel. The proliferation activity of HSC-T6 was determined by cell counting kit-8 (CCK8) assay at different time points (24 h, 48 h, 72 h, 96 h). Immunofluorescence and gelatin zymography analysis were performed to detect the expression of  $\alpha$ -SMA, MMP-2, and MMP-9. Moreover, the cellular surface morphology and deformability was detected by AFM. 【Results】 After cultured in the fibrin gel, the cellular proliferation activity, expression of  $\alpha$ -SMA, MMP-2 and MMP-9, and cellular deformability of activated HSC-T6 was obviously down-regulated in contrast to the control group ( $P<0.05$ ), and there were also differences in the inhibition of cellular proliferation activity, the assembly of  $\alpha$ -SMA stress fiber and the effect of cellular deformability between 2D and 3D fibrin gel cultured ( $P<0.05$ ). 【Conclusions】 Soft fibrin gel inhibited the transdifferentiation of activated HSC-T6, but could not make it revert to  $\alpha$ -SMA negative quiescent phenotype.

**Keywords:** hepatic stellate cell; transdifferentiation; extracellular matrix; fibrin gel

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(1):09-17]

收稿日期:2017-11-06

基金项目:国家自然科学基金(81460276);贵州省研究生教育创新计划项目(黔教研合KYJJ字[2016]08)

作者简介:陈焯,在读硕士研究生,研究方向:放射介入治疗,E-mail:onenine@126.com;宋杰,通信作者,主任医师、教授、硕士研究生导师,研究方向:放射介入治疗,E-mail:songjie2515@163.com

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化是导致肝纤维化及肝硬化发生的诸多因素共同的中心环节<sup>[1]</sup>。在正常的肝脏内的HSC呈静止态,富含维生素A脂滴,分泌多种胶原酶和基质降解蛋白酶,如基质金属蛋白(matrix metallo proteinase, MMP),以降解各种细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分,同时亦分泌组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metallo proteinase, TIMP)防止胶原过度降解,使肝脏ECM的合成和分解处在一个动态平衡的状态<sup>[2]</sup>。一旦出现由于病毒性感染或肝脏毒素引起的肝损伤,HSC即在受损的肝细胞或免疫细胞所分泌的细胞因子的刺激下活化,并转分化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)样表型:丢失维生素A脂滴,并获得平滑肌类细胞的特性,即高度表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA),收缩及增殖能力增强<sup>[3-4]</sup>。此外,在这种表型转变的过程中,活化态HSC分泌MMP-2和MMP-9的增加是破坏MMP与TIMP之间的动态平衡,导致肝损伤后ECM的异常积累与重构的重要因素<sup>[5-6]</sup>。研究抑制HSC转分化或逆转其活化态表型的机制是探索肝纤维化新治疗模式过程中的重点、难点问题<sup>[7]</sup>。在肝纤维化的病理进程中,HSC的持续活化直接或间接导致Disse腔中由IV、VI型胶原蛋白组成的低密度基膜样基质被I、III型胶原蛋白,纤连蛋白等纤维化胶原蛋白异常取代,ECM不断积累和重构<sup>[8-10]</sup>,利用FibroScan<sup>®</sup>技术检出正常肝脏的刚度值约2~6 kPa,肝纤维化阶段的肝脏刚度值大于8 kPa,肝硬化阶段的肝脏刚度值大于12.5 kPa<sup>[11]</sup>。有部分研究认为,HSC活化并向MFB样表型转分化的行为很大程度上取决于ECM的刚度,因为柔软的基质膜等培养基底有助于新鲜分离的HSC维持其静息态表型,转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta$ 1)等促纤维化细胞因子的刺激均不能有效地促使柔软基底上的HSC活化,而传统的塑料平板培养基底则有助于促进HSC活化并向MFB表型转分化<sup>[12-14]</sup>,但目前尚不清楚相对柔软的ECM能否使活化态HSC重新恢复为静息态表型,且上述研究均是以传统的2D体外培养模型为基础的,无论是由基质膜或是其他ECM组分构成的2D体外培养模型均由于其局限性,不能体现生理3D环境下复杂的、多细胞的生物学进程,不能重建健康或纤维化肝脏的ECM架

构,更不可避免地导致细胞出现非生理性的生物学行为。例如,当从组织中新鲜分离并置于塑料平板培养基底上培养的时候,很多种类型的细胞的形态均会变得越来越平坦,表现出异常的分裂行为并丧失其特异性的分化表型<sup>[15]</sup>。相反,当置于3D培养环境中时,某些种类的细胞却可以恢复其生理性的行为及功能:培养在3D环境中的去分化软骨细胞能够重新表达软骨标记物<sup>[16]</sup>,而培养于3D环境中的乳腺上皮细胞则会终止其失控的分裂行为,并组装成腺泡样结构<sup>[17]</sup>。因此,研究HSC转分化与ECM刚度之间的相互关系尚需从ECM维度的角度作进一步的探讨。为此,本研究利用浓度为1 mg/mL的纤维蛋白水凝胶分别构建2D及3D的体外培养基质模型,旨在通过观察活化态HSC在柔软ECM中转分化行为的改变以研究活化态HSC在柔软ECM中重新恢复为静息态的可能性,以期为基于HSC的抗纤维化治疗提供新的思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验动物及细胞来源

健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠5只,清洁级,体质量400~500 g,出生12~15周,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证编号:SCXK(沪)2017-0005。动物饲养于相对温度(22±2)℃,相对湿度60%±10%的环境中,普通大鼠饲料喂养。原代HSC-T6采用胶原酶二步原位灌注<sup>[18-19]</sup>由大鼠肝脏中分离提取,通过连续传代7代以上使细胞自发获得永生性,并稳定表达MFB表型。

### 1.2 主要试剂

三文鱼纤维蛋白原(Salmon fibrinogen)及三文鱼血凝酶(Salmon thrombin)购自Sea Run Holdings公司;CCK8检测试剂盒购自日本同仁;DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)培养基(高糖)购自Hyclone;胎牛血清购自Gibco公司;中性分散酶(Dispase II)购自Sigma-Aldrich公司;Alexa Fluor 647标记的兔抗鼠 $\alpha$ -SMA抗体购自Abcam公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、考马斯亮蓝R-250、抗荧光衰减封片剂(含DAPI)及封闭山羊血清购自北京索莱宝;预染蛋白质Marker(PageRuler<sup>®</sup> Plus Prestained Protein Ladder)及BCA蛋白浓

度测定试剂盒(Micro BCA™ Protein Assay Kit)均购自 Thermo Fisher 公司;其余生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 HSC-T6用含10%FBS的高糖DMEM培养液,在37℃,5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养,待细胞生长至约70%~80%汇合状态时,用2.5 g/L胰酶进行消化,显微镜下观察细胞质回缩,细胞间隙增大后,即加入含10%FBS的DMEM培养液终止消化,并按 $2\times 10^5\sim 3\times 10^5$ 个细胞的接种比例接种于25 cm<sup>2</sup>一次性塑料培养瓶,使用第7代的细胞进行实验。

1.3.2 2D及3D体外培养基质模型的构建及降解 三文鱼纤维蛋白原以T7 Buffer于4℃下匀速震荡溶解,配制成浓度为2 mg/mL并以1:1的比例分别与无血清DMEM培养基或HSC-T6细胞悬液混匀制得2D或3D工作液并加至24孔板或96孔板中,采用三文鱼血凝酶(0.1 U/μL)在37℃下分别与2D或3D工作液反应30 min使其聚合为纤维蛋白水凝胶。聚合完毕后于2D孔及对照组的孔中加入HSC-T6的细胞悬液后继续将孔板放置于37℃培养箱中培养使细胞贴壁,30 min后取出孔板,往各孔中加入等量的含10% FBS的DMEM培养基,37℃培养箱中培养。当需要取出水凝胶中的HSC-T6细胞进行实验时,则吸弃培养液,采用Dispase II溶液充分降解纤维蛋白水凝胶后收集细胞悬液,离心后弃去上清,以含10% FBS的DMEM培养基重悬备用。

1.3.3 CCK8法测定细胞相对增殖活力 取对数生长期的同代HSC-T6接种于96孔板的2D及3D纤维蛋白水凝胶( $1\times 10^4$ 个细胞/孔)中,37℃,5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中分别培养24、48、72、96 h后,光镜下观察各组细胞形态并拍照,每组每孔加入10 μL的CCK-8溶液,37℃孵育3 h后,用酶联免疫检测仪于450 nm波长处测出各孔吸光度(OD),并以实验组OD值/对照组OD值的计算方式计算出各组细胞的相对增值比(%)。

1.3.4 免疫荧光化学检测 以1.3.2的方法于直径10 mm无菌圆盖玻片上构建2D及3D纤维蛋白水凝胶培养模型,盖玻片置于6孔板中,在37℃,5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养72 h后,吸弃各组培养液,40 g/L多聚甲醛溶液室温固定20 min,体积分数0.5%的Triton X-100透膜处理20 min,透膜

完毕后加入10%山羊血清封闭液37℃下封闭1.5 h。封闭完毕后,吸弃封闭液,加入1/3000稀释比的Alexa Fluor 647标记的抗α-SMA抗体100 μL,室温避光孵育2 h,回收抗体,用10%山羊血清封闭液冲洗一次,20 min,直接滴入含DAPI抗淬灭封片剂封片,置于激光共聚焦扫描显微镜(LSM 700 SYSTEM, ZEISS)下观察拍照。利用Image J图像分析软件分析各组的荧光图片的细胞平均光密度值,进行统计学分析。

1.3.5 明胶酶谱实验 取对数生长期的同代HSC-T6接种于24孔板的2D及3D纤维蛋白水凝胶( $1\times 10^5$ 个细胞/孔)中,37℃,体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养72 h后,收集各组细胞上清液,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定各样品蛋白浓度后在150 V条件下进行SDS-PAGE电泳(10%分离胶中明胶终浓度为0.1%)。电泳结束后将凝胶移至洗脱液(2.5% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCL PH 7.5, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>)中振荡洗脱。洗脱完毕后,将凝胶移至孵育液(1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCL PH 7.5, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>)中,37℃水浴锅中孵育48 h,弃去孵育液,加入考马斯亮蓝R-250染色液震荡染色8 h,吸弃染色液,加入脱色液(40%甲醇,10%乙酸)脱色1~2 h直至凝胶出现明显清晰的负染条带。凝胶用化学发光成像仪(Image Quant Las4000, GE Healthcare)观察并拍照,图片用Image J图像分析软件分析各组条带的平均光密度值,进行统计学分析。

1.3.6 原子力显微镜(Atomic Force Microscopy, AFM)实验 取对数生长期的同代HSC-T6接种于24孔板的2D及3D纤维蛋白水凝胶( $1\times 10^5$ 个细胞/孔)中,37℃,体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养72 h后,按1.3.2的方法取出水凝胶中的HSC-T6并接种于多聚赖氨酸预包被的35 mm培养皿,37℃培养箱中孵育贴壁6 h。贴壁完毕后样品置于原子力显微镜(Dimension FastScan, Bruker)载物台上,镜下确定合适的细胞后在操作界面选择接触模式(contact mode)进行样品逼近,当针尖接触细胞表面后开始30 μm×30 μm范围的细胞扫描,所有样品的扫描均是在液态室温条件下应用AFM进行扫描。本实验采用的氮化硅微悬臂的弹性系数为0.01 N/m,硅探针(Scanasyt-Fluid+, Bruker Probes)针尖曲率半径20 nm,用接触模式

成像得出细胞表面力曲线,通过 NanoScope Analysis 1.40 基于 DMT(Derjaguin-Muler-Toporov)模型分析力曲线计算出其杨氏模量以衡量细胞表面不同位置(细胞核、质、边缘)的变形能力。

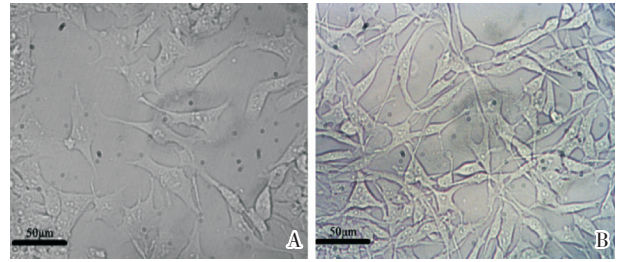
#### 1.4 统计学处理

用 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析。数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,细胞增殖活力实验数据采用两因素方差分析(Two-Way ANOVA),其余实验数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),实验数据的组间比较均采用 Tukey's 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 2D 及 3D 纤维蛋白水凝胶中 HSC-T6 细胞形态差异

HSC-T6 置于 2D 及 3D 纤维蛋白水凝胶上培养 72 h 后,置于光镜下观察细胞形态,对比普通培养皿(对照组)上培养的细胞,对照组的细胞扁平,完全伸展,形态不规则且面积较大(图 1 A);2D 组的细胞形态伸长呈不规则放射型,并有更为修长的 2~3 支分支发出(图 1 B);3D 组的细胞于纤维蛋白水凝胶中形成一种 3D 细胞群落球状体,球状



A: HSC-T6 cells were cultured for 72 h on plastic (control group); B: HSC-T6 cells were cultured for 72 h on 1 mg/mL fibrin gel (2D group). Scale bar: 50  $\mu$ m.

Fig.1A showed typical MFB-like morphology with fully extended, and flat, irregular shape; Fig.1B showed that cells on fibrin gel tended to be more slender with more branches in contrast to the control group.

图 1 HSC-T6 于塑料培养皿及 2D 纤维蛋白水凝胶培养 72 h 后的细胞图

Fig.1 Photomicrograph of HSC-T6 cells cultured for 72 h on plastic and 2D fibrin gel

体形态较规则,球状体大小随培养天数的增加而增加,光镜下观察培养 24 h、48 h、72 h 后的细胞球状体无伸展的趋势,但 96 h 后水凝胶开始失去维持细胞球状体的能力,球状体形态变得不规则,表现出向外伸展的趋势(图 2)。

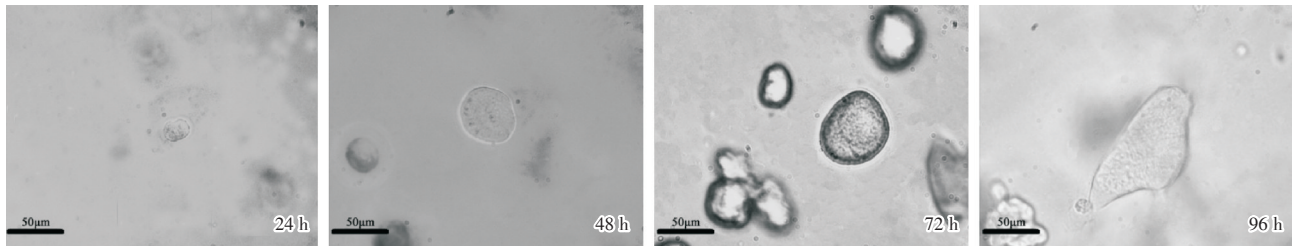


Fig.2 showed that cells grew into multicellular spheroid in 1 mg/mL fibrin gel (3D group) and were maintained a regular form during the culture course from 24-72 h, but exhibited extensional trend after cultured for 96 h. The colony size of the multicellular spheroid increased over time. Scale bar: 50  $\mu$ m.

图 2 HSC-T6 于 3D 纤维蛋白水凝胶培养 96 h 的细胞图

Fig.2 Photomicrograph of HSC-T6 cultured in 3D fibrin gel during 96 h

### 2.2 1 mg/mL 纤维蛋白水凝胶对 HSC-T6 细胞增殖活力的影响

通过 CCK8 试剂盒检测出的 OD 值以实验组 OD 值/对照组 OD 值的计算方式得出不同时间段 2D 及 3D 纤维蛋白水凝胶培养条件下 HSC-T6 的相对增殖比(%), $1 \times 10^4$  个细胞/孔的 HSC-T6 培养于 2D 及 3D 纤维蛋白水凝胶中 24 h 后的相对增殖

率分别为 $(28.3 \pm 19.8)\%$ 、 $(74.0 \pm 13.7)\%$ ;48 h 后的相对增殖率分别为 $(42.3 \pm 7.6)\%$ 、 $(55.7 \pm 10.3)\%$ ;72 h 后的相对增殖率分别为 $(86.2 \pm 10.2)\%$ 、 $(62.8 \pm 3.1)\%$ ;96 h 后的相对增殖率分别为 $(102.7 \pm 5.6)\%$ 、 $(83.9 \pm 5.5)\%$ 。以 HSC-T6 的细胞相对增殖比(%)作为应变变量,将细胞培养条件(普通培养皿及 2D、3D 纤维蛋白水凝胶)与培养时间作为两个因素,

经 Two-Way ANOVA 分析结果见表 1。细胞培养条件分组与培养时间分组的效应差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且两组之间存在交互 ( $P < 0.05$ ), 提示细胞培养条件及细胞培养时间两个因素协同作用于细胞增殖。进一步采用 Tukey's 检验分析, 如图 3 所示, 在培养 24~72 h 的时间段里, 2D 纤维蛋白水凝胶明显抑制 HSC-T6 的增殖, 其相对增殖率与对照组之间差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 96 h 后两组相对增殖率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而 3D 纤维蛋白水凝胶在 24~96 h 的任何时间段里均表现出对 HSC-T6 增殖的有效抑制能力, 其相对增殖率与对照组之间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**表 1 1 mg/mL 纤维蛋白水凝胶对 HSC-T6 增殖活力影响的 Two-Way ANOVA 分析 (应变量: 细胞相对增殖比)**  
**Table 1 Two-Way ANOVA analysis of the effect of 1mg/mL fibrin gel on the proliferation in HSC-T6 (Dependent variable: cell viability)**

Source of variations	SS	DF	MS
Treatment <sup>1)</sup>	28 445	2	14 222
Time <sup>2)</sup>	16 342	3	5 447
Interaction <sup>3)</sup>	22 832	6	3 805
Residual	7 507	99	75.83

Treatment: Plastic, 2D or 3D fibrin gel cultured; Time: Cultured for 24 h, 48 h, 72 h or 96 h; Interaction: Treatment×Time; SS: Sum of Square; DF: Degrees of Freedom; MS: Mean square. 1) Treatment factor accounts for approximately 37.08 % of the total variance.  $F = 187.55$ ,  $P < 0.0001$ ; 2) Time factor accounts for approximately 21.30 % of the total variance.  $F = 71.84$ ,  $P < 0.0001$ ; 3) Interaction accounts for approximately 29.77 % of the total variance.  $F = 50.18$ ,  $P < 0.0001$ ;  $n = 9$ .

### 2.3 1 mg/mL 纤维蛋白水凝胶对 HSC-T6 细胞 $\alpha$ -SMA 应力纤维及表达的影响

如图 4 所示, 培养 72 h 后, 对照组的 HSC-T6 高度表达  $\alpha$ -SMA, 平均荧光强度为  $4.9 \pm 0.4$ ,  $\alpha$ -SMA 应力纤维紧密; 2D 及 3D 组 HSC-T6 的  $\alpha$ -SMA 表达均较对照组下降, 其中 2D 组  $\alpha$ -SMA 平均荧光强度为  $3.3 \pm 0.4$  ( $P < 0.05$ ), 3D 组  $\alpha$ -SMA 平均荧光强度为  $3.8 \pm 0.4$  ( $P < 0.05$ ), 2D 及 3D 组两组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与对照组比较, 2D 组细胞的  $\alpha$ -SMA 应力纤维较松散, 而 3D 组中“细胞群落球状体”则仅在球状体外围一层的细胞形成较紧密的  $\alpha$ -SMA 应力纤维, 而其内部的  $\alpha$ -SMA 应力纤

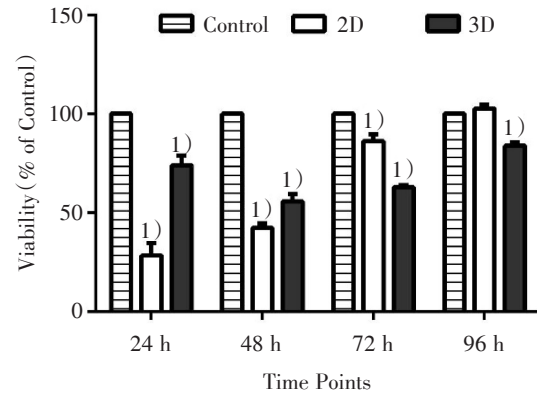


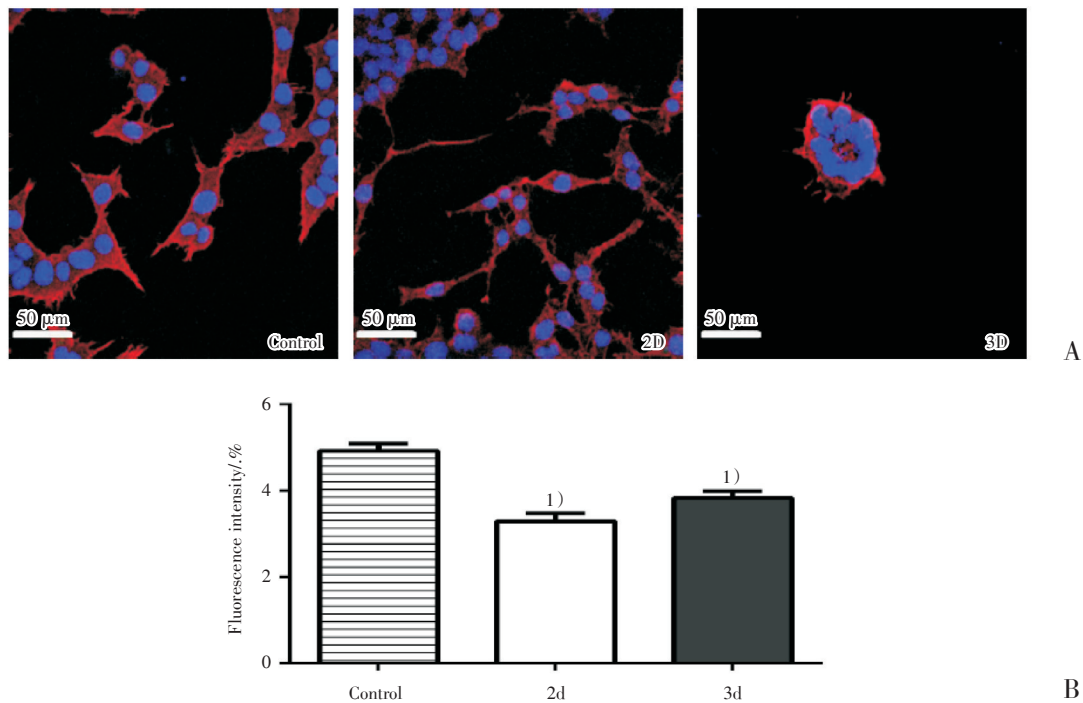
Fig.3 showed that soft fibrin inhibited the proliferation of HSC-T6 cells. CCK-8 was carried out to identify the cell viability of HSC-T6 treated with 1 mg/mL 2D and 3D fibrin gel and plastic (control) at different time points (24 h, 48 h, 72 h, 96 h). The data was expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=9$ ). 1)  $P < 0.05$  vs control (Tukey's multiple comparisons test after Two-Way ANOVA).  $P_{\text{control vs 2D; 24-48 h}} < 0.001$ ,  $P_{\text{control vs 2D; 72 h}} < 0.05$ ,  $P_{\text{control vs 2D; 96 h}} > 0.05$ ,  $P_{\text{control vs 3D; 24-96 h}} < 0.001$ .

**图 3 1 mg/mL 纤维蛋白水凝胶抑制 HSC-T6 增殖活力**  
**Fig.3 1 mg/mL fibrin gel inhibited the proliferation of HSC-T6**

维较松散。

### 2.4 1 mg/mL 纤维蛋白水凝胶对 HSC-T6 细胞变形能力的影响

AFM 三维成像显示: 对照组 HSC-T6 呈星形伸展, 胞体扁平, 表面粗糙并分布多处大小不等凸起及凹陷; 2D 组 HSC-T6 呈纺锤形, 胞体较对照组饱满, 表面仍可见多处凸起及凹陷, 但整体较对照组表面平整; 3D 组 HSC-T6 细胞则较 2D 组胞体更为饱满, 表面更为平整, 胞核高度远远高于胞质 (图 5A)。进一步利用细胞成像得出每组 3~5 个细胞不同部位 (核、质、边缘) 各 40 条力-距离曲线并计算其杨氏模量以表征细胞变形能力, 结果显示: 对照组 HSC-T6 杨氏模量分别为: ( $12.8 \pm 2.8$ ) kPa (胞核)、( $285.9 \pm 67.7$ ) kPa (胞质)、( $556.1 \pm 101.3$ ) kPa (边缘); 2D 组 HSC-T6 杨氏模量分别为 ( $9.2 \pm 3.0$ ) kPa (胞核)、( $81.1 \pm 20.5$ ) kPa (胞质)、( $443.7 \pm 137.7$ ) kPa (边缘); 3D 组 HSC-T6 杨氏模量分别为 ( $8.3 \pm 2.6$ ) kPa (胞核)、( $184.8 \pm 76.6$ ) kPa (胞质)、( $471.7 \pm 135.2$ ) kPa (边缘)。经柔软纤维蛋白水凝胶培养后, HSC-T6 各部位的变形能力均较对照组下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 3D 组 HSC-T6 胞质明显较 2D 组变形能力更强 ( $P < 0.05$ ), 而在胞核及细胞边缘部位, 两者变形能力差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 图 5B)。



A: Immunofluorescence staining of  $\alpha$ -SMA (red) in HSC-T6 treated by plastic and 1 mg/mL 2D and 3D fibrin gel for 72 h. Scale bar: 50  $\mu$ m; B: Fluorescence intensity of  $\alpha$ -SMA in HSC-T6. Fig.4A showed that the HSC-T6 cells in the control group and the periphery of multicellular spheroid in the 3D group had a denser  $\alpha$ -SMA stress fiber than the 2D group; Fig.4B showed that the fluorescence intensity signals of  $\alpha$ -SMA were reduced when treated with 1 mg/mL fibrin gel. The data was expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=9$ ). 1)  $P < 0.05$  vs control (One-Way ANOVA).  $F=23.61$ ,  $P_{\text{control vs 2D}} < 0.001$ ,  $P_{\text{control vs 3D}} < 0.05$ ,  $P_{2D \text{ vs } 3D} > 0.05$ .

图4 1 mg/mL纤维蛋白水凝胶对HSC-T6的 $\alpha$ -SMA应力纤维形成及表达的影响

Fig.4 The effect of 1 mg/mL fibrin gel on the assembly of  $\alpha$ -SMA stress fiber and expression in HSC-T6

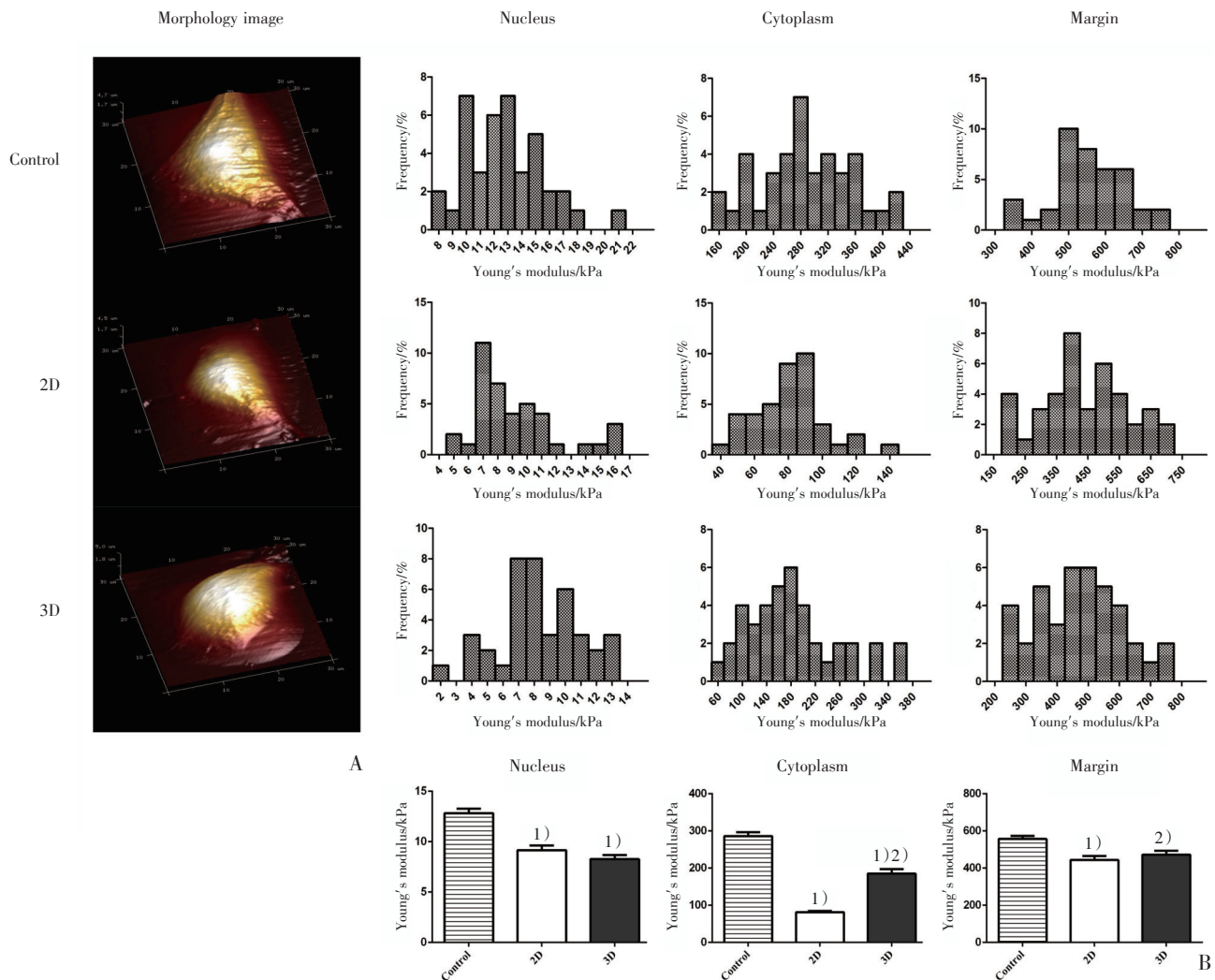
### 2.5 1 mg/mL纤维蛋白水凝胶对HSC-T6细胞MMP-2及MMP-9表达的影响

如图6所示,对照、2D及3D组HSC-T6的细胞培养上清用明胶酶谱法均能检测出MMP-2和MMP-9的活性条带,其中MMP-2(72kDa)的平均光密度值分别为 $48.2 \pm 1.2$ (对照组)、 $43.8 \pm 2.0$ (2D组)、 $35.1 \pm 1.0$ (3D组);MMP-9(92 ku)的平均光密度值分别为 $66.6 \pm 1.2$ (对照组)、 $61.4 \pm 1.1$ (2D组)、 $57.1 \pm 1.8$ (3D组)。对比对照组,1 mg/mL纤维蛋白水凝胶明显抑制HSC-T6细胞MMP-2及MMP-9的表达,其中3D纤维蛋白水凝胶对HSC-T6细胞MMP-2及MMP-9表达的抑制能力较2D组更高,各组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

纤维蛋白具备优秀的生物相容性,被广泛用于生物组织工程的研究中<sup>[20]</sup>,本研究利用三文鱼

纤维蛋白原聚合浓度为1 mg/mL的纤维蛋白水凝胶,其对应刚度约为90 Pa<sup>[21]</sup>,为活化态HSC-T6构建一个相对柔软的ECM环境以研究活化态HSC-T6在纤维化逆转过程中重新恢复为静息态的可能性。本研究发现,柔软的纤维蛋白水凝胶能在一定程度上抑制活化态HSC-T6的转分化行为,这主要体现在几个方面:①HSC向MFB表型转分化的重要标记物 $\alpha$ -SMA的表达在2D及3D纤维蛋白水凝胶构建的细胞外环境下均有明显的下降。有研究认为HSC的转分化更多依赖基底刚度并需要HSC黏附基质蛋白产生机械张力<sup>[13]</sup>,而根据免疫荧光结果显示,培养在柔软纤维蛋白水凝胶上的2D组细胞 $\alpha$ -SMA应力纤维明显较于僵硬塑料培养皿上培养的对照组细胞松散,从而不能产生强而有力的机械张力促进HSC-T6的转分化。另外,虽然2D及3D组细胞 $\alpha$ -SMA的表达无明显差异,但3D组细胞球状体外围 $\alpha$ -SMA应力纤维明显亦较2D组细胞紧密,3D组球状体内部



A: The morphological image of HSC-T6 after treated with plastic and 1 mg/mL 2D and 3D fibrin gel for 72 h; B: Young's modulus of HSC-T6 after treated with plastic and 1 mg/mL 2D and 3D fibrin gel for 72 h determined by AFM and live cell imaging measurements.

Fig.5A showed that the morphological changes of HSC-T6 after treated with plastic and 1 mg/mL 2D and 3D fibrin gel for 72 h; Fig.5B showed that 2D and 3D fibrin gel had a different effect on the cellular deformability of different cellular regions. The data was expressed as the ( $n=40$ ). 1)  $P<0.05$  vs control; 2)  $P<0.05$ , 2D vs 3D (One-Way ANOVA).  $F_{\text{nucleus}} = 29.97$ ,  $P_{\text{control vs 2D}} <0.001$ ,  $P_{\text{control vs 3D}} <0.001$ ,  $P_{2D \text{ vs } 3D} >0.05$ ;  $F_{\text{cytoplasm}} = 115.8$ ,  $P_{\text{control vs 2D}} <0.001$ ,  $P_{\text{control vs 3D}} <0.001$ ,  $P_{2D \text{ vs } 3D} <0.001$ ;  $F_{\text{margin}} = 8.727$ ,  $P_{\text{control vs 2D}} <0.001$ ,  $P_{\text{control vs 3D}} <0.05$ ,  $P_{2D \text{ vs } 3D} >0.05$ .

图5 1 mg/mL 纤维蛋白水凝胶对HSC-T6的细胞形态及变形能力的影响

Fig.5 The effect of 1 mg/mL fibrin gel on the cellular morphology and deformability in HSC-T6 cells

则仅仅可见松散的 $\alpha$ -SMA应力纤维形成,我们推测这是由于3D ECM有限的生长空间对细胞产生“束缚力”所致,细胞球状体随着细胞的增殖不断增大,而球状体外围的细胞被球状体内部的细胞不断推挤,以致外围的细胞所能感受到的基质作用力明显高于内部的细胞,因此形成相对球状体内部较紧密的 $\alpha$ -SMA应力纤维形成。本研究通过AFM测量各组HSC-T6细胞的不同部位的杨氏模量,结果显示对照组细胞各部位的变形能力均高于2D及3D组,而3D组的细胞质部位的变形能

力高于2D组,这从一定程度上验证了我们对免疫荧光结果的推测。②通过CCK-8实验,柔软的纤维蛋白水凝胶能明显抑制活化态HSC-T6细胞的增殖活力,但3D基质比2D基质对HSC-T6细胞增殖活力的抑制更持久,这可能是由于3D基质对细胞生长的限制性所致。③活化的HSC是可降解基膜样基质成分I、IV型胶原蛋白的MMP-2和MMP-9的主要来源<sup>[22-23]</sup>。在早期肝损伤进程中及活动性纤维发生的瘢痕区域均可发现MMP-2和MMP-9表达的增加,亦有越来越多研究认为这两

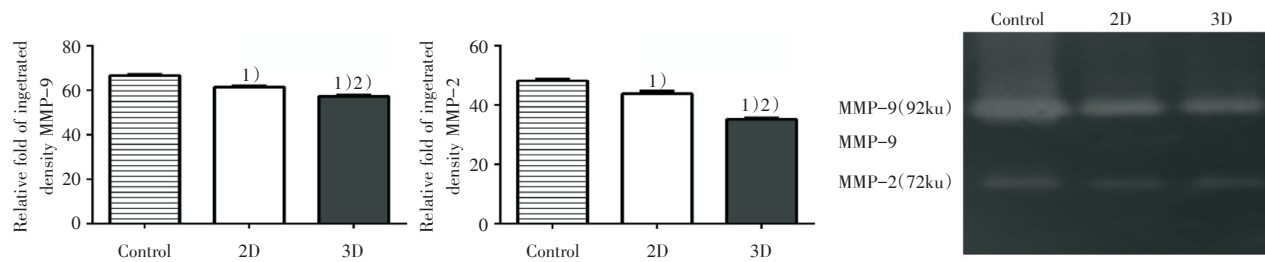


Fig.6 showed that the expression of MMP-2 and MMP-9 inhibited by 1 mg/mL 2D and 3D fibrin gel. SDS-PAGE gelatin zymography was performed to determine the expression of MMP-2 and MMP-9 by using the conditioned media which was harvested after 72 h fibrin gel treatment. The data was expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=6$ ). 1)  $P < 0.05$  vs control; 2)  $P < 0.05$ , 2D vs 3D (One-Way ANOVA).  $F_{MMP-2}=94.22$ ,  $P_{control vs 2D} < 0.05$ ,  $P_{control vs 3D} < 0.001$ ,  $P_{2D vs 3D} < 0.001$ ;  $F_{MMP-9}=58.51$ ,  $P_{control vs 2D} < 0.001$ ,  $P_{control vs 3D} < 0.001$ ,  $P_{2D vs 3D} < 0.001$ .

图6 1 mg/mL 纤维蛋白水凝胶抑制 HSC-T6 细胞 MMP-2 及 MMP-9 的表达

Fig.6 Inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression by 1 mg/mL fibrin gel treatment in HSC-T6

者是肝纤维化进程中导致正常基膜样基质降解, ECM 重构, 促进 HSC 活化的重要角色<sup>[24-25]</sup>。本研究明胶酶谱实验显示, 柔软的纤维蛋白水凝胶能够抑制 HSC-T6 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达, 但 2D 和 3D 基质对 MMP-2 和 MMP-9 表达的抑制程度存在差异性。

本研究通过观察 HSC-T6 细胞  $\alpha$ -SMA、MMP-2 和 MMP-9 的表达、细胞变形能力及增殖活力等几个方面证明柔软的 ECM 能够抑制活化态 HSC-T6 的转分化, 但尚不能使其恢复至  $\alpha$ -SMA 阴性的静息态表型, 同时发现 HSC-T6 细胞在 2D 及 3D 细

胞外环境中的细胞行为存在较大的差异。其中 3D ECM 的拓扑学结构如何改变细胞形状和细胞骨架, 进而影响细胞信号通路和功能, 3D ECM 中被动和主动的机械力转导与普通组织培养皿或 2D ECM 的刚性或线性弹性力学, 以及 ECM 的化学和物理结构如何影响可溶性因子的转运和利用率。对于这些问题的研究对深入探索抑制 HSC 转分化或逆转其活化态表型的机制有着深远的意义, 为基于 HSC 的抗纤维化及肝硬化治疗提供新的思路和治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] Yin C, Evason KJ, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer [J]. J Clin Invest, 2013, 123 (5): 1902-1910.
- [2] Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: Strategies for development and validation of antifibrotic therapies [J]. Hepatology, 2009, 50 (4): 1294-1306.
- [3] Wang YG, Xu L, Wang T, et al. Givinostat inhibition of hepatic stellate cell proliferation and protein acetylation [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21 (27): 8326-8339.
- [4] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story [J]. Gut, 2015, 64 (5): 830-841.
- [5] Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (23): 7312-7324.
- [6] Elpek GO. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7260-7276.
- [7] De Oliveira DSB, Ramos LF, Moraes K. Molecular interplays in hepatic stellate cells: Apoptosis, senescence, and phenotype reversion as cellular connections that modulate liver fibrosis [J]. Cell Biol Int, 2017, 41 (9): 946-959.
- [8] Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, et al. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells [J]. J Clin Invest, 2001, 108(9): 1369-1378.
- [9] Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells [J]. J Hepatol, 1995, 22(2 Suppl): 28-36.
- [10] Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2): 195-206.

- [11] Mueller S, Sandrin L. Liver stiffness: A novel parameter for the diagnosis of liver disease [J]. *Hepat Med*, 2010, 2: 49–67.
- [12] Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, et al. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(18): 10756–10762.
- [13] Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 301(1): G110–G118.
- [14] Wells RG. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39(4 Suppl 2): S158–S161.
- [15] Von Der Mark K, Gauss V, Von Der Mark H, et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture [J]. *Nature*, 1977, 267(5611): 531–532.
- [16] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels [J]. *Cell*, 1982, 30(1): 215–224.
- [17] Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, et al. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(19): 9064–9068.
- [18] Riccalton-Banks L, Bhandari R, Fry J, et al. A simple method for the simultaneous isolation of stellate cells and hepatocytes from rat liver tissue [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 248(1–2): 97–102.
- [19] Liu W, Hou Y, Chen H, et al. Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies [J]. *Proteomics*, 2011, 11(17): 3556–3564.
- [20] Schense JC, Bloch J, Aebischer P, et al. Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 415–419.
- [21] Liu J, Tan Y, Zhang H, et al. Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells [J]. *Nat Mater*, 2012, 11(8): 734–741.
- [22] Trojanek J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors [J]. *Postepy Biochem*, 2012, 58(3): 353–362.
- [23] Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21 Suppl 3: S88–S91.
- [24] Knittel T, Mehde M, Kobold D, et al. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: Regulation by TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 [J]. *J Hepatol*, 1999, 30(1): 48–60.
- [25] Han YP, Zhou L, Wang J, et al. Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 4820–4828.

(编辑 孙慧兰)