

γ 干扰素和地塞米松对 5-羟色胺刺激的正常和受 γ 辐射成纤维细胞生长的影响

高亚兵 崔玉芳 杨 红 熊呈琦 夏国伟 王德文

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 用 MTT 比色、AgNORs 银染结合图像分析以及抗Ⅲ型胶原免疫组化技术观察并证实了 γ -IFN 和地塞米松 (Dexa) 对成纤维细胞生长的抑制作用。结果如下: (1) 培养第 3d, 250×10^3 U/L 的 γ -IFN 和 100mg/L 的 Dexa 对成纤维细胞生长的抑制率分别为 43% 和 33%; (2) 照后 3、5d 两种抑制剂对正常、受照射以及 5-HT 刺激的受照成纤维细胞增殖 (OD 值示之) 均显示出明显的抑制作用; (3) 250×10^3 U/L 浓度的 γ -IFN 和 150mg/L 的 Dexa 对成纤维细胞 AgNORs 合成显示最强的抑制作用, 其 AgNORs 颗粒数在 5-HT 组分别为对照值的 58% 和 56%, 而 AgNORs3 个定量参数的均值分别为对照值的 51% 和 44%; (4) 上述浓度的两种抑制剂对 5-HT 刺激的成纤维细胞Ⅲ型胶原合成也显示明显的抑制作用, 在培养第 3d Ⅲ型胶原阳性细胞数分别为对照值的 62% 和 43%。

关键词 γ 干扰素, 地塞米松, 成纤维细胞, 5-羟色胺, 照射, Ⅲ型胶原, 增殖抑制

实验表明, 肥大细胞分泌的活性介质 5-羟色胺, 能够促进成纤维细胞生长, 这种作用有时比组胺还强 (见另文报道)。本研究进一步观察了 γ -干扰素 (γ -IFN) 和地塞米松 (Dexa) 对 5-羟色胺 (5-HT) 促成纤维细胞生长的抑制作用, 期望能从肥大细胞角度为器官纤维化的防治提供一些新的启示。

1 材料与方法

1.1 成纤维细胞培养

用无血清 DMEM 和 10%FCS+DMEM 体系对 NIH/3T3 成纤维细胞进行培养。

1.2 实验分组

分为 γ -IFN+ 正常、Dexa+ 正常、 γ -IFN+5-HT、Dexa+5-HT 和 γ -IFN 或 Dexa+5-HT+ 照射 6 个组, rh γ -IFN 和 Dexa 分别为北京四环医学生物高技术中心和上海东风制药厂生产, 5-HT 为 Sigma 公司产品。

1.3 照射

用 ^{60}Co γ 源一次性照射, 剂量 30Gy, 照射量率为 $5.26 \times 10^{-2} \text{C/kg}^{-1} \text{min}$, 样品距源 2.5m。

1.4 细胞计数和离心制片

在成纤维细胞指数生长期, 将其接种于 96 孔培养板, 细胞浓度为 2.5×10^4 / 孔。同时加入不

同浓度的 5-HT、 γ -IFN 和 Dexa 培养后第 3、5d 进行计数；并同时制备细胞离心涂片，固定后进行组织化学和免疫组化分析。

1.5 MTT 比色^[1]

加入不同浓度的 5-HT 和不同浓度的 γ -IFN 和 Dexa 于培养第 3d，每孔加 15 μ L 1% 浓度的 MTT(二甲基二苯乙基溴化四唑，华美公司)15 μ L，继续培养 4h，用 BIO-550 型酶标仪在 570nm 波长下测量 OD 值。

1.6 AgNORs 银染^[2]

将新鲜配制的 2% 明胶 1 份和 50% 硝酸银溶液 2 份均匀混和，滴加在细胞涂片上，室温避光染色 15min，冲洗、脱水、透明后，树脂封片，每个样品计数 300 个细胞，计算每个细胞平均 AgNORs 颗粒数。

1.7 AgNORs 图像分析

用 Quantimet 970 图像仪对 AgNORs 颗粒面积 (Ag-a)，积分光密度 (Ag-iod) 和颗粒面积与核面积百分比 (Ag-a/Na) 进行测量。数据直接贮存于计算机，并进行方差齐性检验和 *t* 检验。

1.8 Ⅲ型胶原染色

用 ABC 免疫组化法，计数 300 个细胞 / 样品，计算阳性率。

1.9 统计学处理

用 *t* 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 γ -IFN 和 Dexa 对正常成纤维细胞生长的影响

从表 1 可看出，加入 250 $\times 10^3$ U/L 浓度的 γ -IFN 和 100 mg/L 的 Dexa 培养后第 3、5d，成纤维细胞生长均出现明显抑制，尤以第 3d 更为明显，两者分别为对照值的 43% 和 33%。

Tab.1 The effects of γ -IFN and Dexa on growth of normal fibroblasts ($\bar{x} \pm s$, *n*=9)

Days culture after	No. of fibroblast/ 10^8 L ⁻¹		
	Control	γ -IFN	Dexa
5	15.8 $\pm$ 3.23	6.8 $\pm$ 0.75 <i>p</i> < 0.01	5.2 $\pm$ 0.75 <i>p</i> < 0.01
3	25.6 $\pm$ 4.87	15.1 $\pm$ 1.43	9.7 $\pm$ 3.73 <i>p</i> < 0.01

2.2 γ -IFN 和 Dexa 对照射成纤维细胞增殖的影响

应用能较好反映细胞增殖活性的 MTT 比色法，测定了 γ -IFN 和 Dexa 对正常和受照射成纤维细胞增殖的影响 (表 2)，结果指出，照后 5d 与对照组相比，两种抑制剂对正常和受照射成纤维细胞均显示明显的抑制作用；值得提出的是照射组成纤维细胞的增殖活性明显高于正常组。

Tab.2 The effects of γ -IFN and Dexa on growth of normal and irradiated fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Inhibitors γ -IFN/ 10^3 U L ⁻¹	MTT(OD)		Inhibitors Dexa/mg L ⁻¹	MTT(OD)	
	Control	Irradiation		Control	Irradiation
0	0.258 $\pm$ 0.020	0.582 $\pm$ 0.030	0	0.258 $\pm$ 0.020	0.582 $\pm$ 0.030
250	0.222 $\pm$ 0.020 ⁽²⁾	0.517 $\pm$ 0.018 ⁽²⁾	50	0.215 $\pm$ 0.043 ⁽¹⁾	0.473 $\pm$ 0.094 ⁽²⁾
500	0.198 $\pm$ 0.022 ⁽²⁾	0.519 $\pm$ 0.032 ⁽²⁾	100	0.174 $\pm$ 0.038 ⁽²⁾	0.496 $\pm$ 0.041 ⁽²⁾
750	0.160 $\pm$ 0.016 ⁽²⁾	0.454 $\pm$ 0.040 ⁽²⁾	150	0.173 $\pm$ 0.006 ⁽²⁾	0.498 $\pm$ 0.035 ⁽²⁾

n = 9 ⁽¹⁾*p* < 0.05 ⁽²⁾*p* < 0.01

2.3 对 5-HT 刺激的受照成纤维细胞增殖的影响

以往研究发现, $(0.251\sim4.0)\times10^{-6}\text{mol/L}$ 的 5-HT 对正常和受照成纤维细胞增殖均显示一定程度的促进作用, 因而实验中选用上述浓度的 5-HT, 观察 $250\times10^3\text{U/L}$ $\gamma\text{-IFN}$ 和 100mg/L Dexa 对 5-HT 刺激的受照射成纤维细胞增殖的影响 (表 3)。表 3 数据表明, 照射后 3d 与照射对照组比较, 两种抑制剂对 0.50×10^{-6} 和 $1.0\times10^{-6}\text{mol/L}$ 5-HT 刺激的受照成纤维细胞增殖显示出较强的抑制作用, 在 $\gamma\text{-IFN}$ 组, 分别为对照值的 72% 和 70%; 在 Dexa 组分别为对照值的 65% 和 69%。

Tab.3 Effects of $\gamma\text{-IFN}$ and Dexa on growth of 5-HT stimulated and irradiated fibroblasts $(\bar{x}\pm s)$

5-HT / 10^{-6}mol L^{-1}	MTT(OD)		
	Control	Irradiation + $\gamma\text{-IFN}$	Iadiation + Dexa
0.25	0.137 ± 0.004	$0.118\pm0.003^{(2)}$	$0.116\pm0.016^{(1)}$
0.5	0.159 ± 0.004	$0.114\pm0.012^{(2)}$	$0.104\pm0.011^{(2)}$
1.0	0.157 ± 0.001	$0.110\pm0.013^{(2)}$	$0.109\pm0.016^{(2)}$
2.0	0.140 ± 0.020	$0.106\pm0.004^{(1)}$	$0.118\pm0.013^{(2)}$
4.0	0.140 ± 0.020	$0.103\pm0.004^{(2)}$	$0.111\pm0.007^{(1)}$

$n=9$ ⁽¹⁾ $p<0.05$ ⁽²⁾ $p<0.01$

2.4 对成纤维细胞 AgNORs 的影响

2.4.1 对 AgNORs 颗粒数的影响 表 4 进一步观察了不同浓度 $\gamma\text{-IFN}$ 和 Dexa 对正常和 5-HT 刺激的成纤维细胞 AgNORs 颗粒合成的影响, 结果表明, 在培养第 3d, $\gamma\text{-IFN}$ 对正常和最佳浓度 $2.0\times10^{-6}\text{mol/L}$ 5-HT 刺激的 AgNORs 合成均显示明显的抑制作用, 尤以 $250\times10^3\text{U/L}$ 浓度 $\gamma\text{-IFN}$ 抑制作用最强, 分别为对照值的 46% 和 58%。从 Dexa 组可以看出, 只有 750mg/L 浓度的 Dexa 对两组成纤维细胞 AgNORs 合成均显示明显的抗增殖作用, 其 AgNORs 颗粒数分别为对照值的 65% 和 58%。

Tab.4 Effects of $\gamma\text{-IFN}$ and Dexa on number of AgNORs granules in cultured fibroblasts $(\bar{x}\pm s)$

Inhibitors $\gamma\text{-IFN}/10^3\text{U L}^{-1}$	No. of AgNORs granules per cell		Inhibitors Dexa/ mg L^{-1}	No. of AgNORs granules per cell	
	Control	5-HT		Control	5-HT
0	5.2 ± 0.67	5.2 ± 0.67	0	5.2 ± 0.67	5.2 ± 0.67
250	$2.4\pm0.02^{(2)}$	$3.0\pm0.22^{(2)}$	50	3.6 ± 1.86	$3.44\pm0.15^{(2)}$
500	$3.2\pm0.36^{(2)}$	$4.2\pm0.30^{(1)}$	100	4.14 ± 1.22	$3.74\pm0.45^{(1)}$
750	$3.4\pm0.08^{(2)}$	$3.3\pm0.08^{(2)}$	150	$3.4\pm0.37^{(2)}$	$2.9\pm0.64^{(2)}$

$n=9$ ⁽¹⁾ $p<0.05$ ⁽²⁾ $p<0.01$

2.4.2 AgNORs 的定量分析 从表 5 看出, 3 种浓度的 $\gamma\text{-IFN}$ 和 Dexa 对最佳浓度 $(2.0\times10^{-6}\text{mol/L})$ 5-HT 刺激的成纤维细胞 AgNORs 3 个定量参数均显示出明显的抑制作用, 其中以 $250\times10^3\text{U/L}$ 浓度的 $\gamma\text{-IFN}$ 和 150mg/L 浓度的 Dexa 所显示出的作用最强, 在培养第 3d, AgNORs 3 个参数的均值分别为对照值的 51% 和 44%。

2.5 $\gamma\text{-IFN}$ 和 Dexa 对成纤维细胞Ⅲ型胶原的影响

从表 6 数据看出, 在正常组, 只有 $250\times10^3\text{U/L}$ 浓度的 $\gamma\text{-IFN}$ 和 3 种浓度的 Dexa 对成纤维细胞Ⅲ型胶原的合成显示出明显的抑制作用; 而在 5-HT 组, 两种抑制剂均显示明显的抑制作用, 其中以 $250\times10^3\text{U/L}$ 浓度的 $\gamma\text{-IFN}$ 和 100mg/L 浓度的 Dexa 显示出最强的抑制作用, 其Ⅲ型胶原阳性细胞数分别为对照值的 62% 和 43%。

Tab.5 Effects of γ -IFN and Dexa on morphometric parameters of 5-HT stimulated fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Inhibitors	n	AgNORs parameters of fibroblast		
		Ag-a	Ag-iod	Ag-a/Na
γ -IFN/ 10^3 U L ⁻¹				
0	50	35.4±11.3	639±210	24.2±7.92
250	30	18.4±6.13 ⁽²⁾	298±106 ⁽²⁾	13.3±3.76 ⁽²⁾
500	30	27.3±14.5 ⁽¹⁾	434±246 ⁽²⁾	16.9±6.04 ⁽²⁾
750	30	21.8±6.01 ⁽²⁾	375±110 ⁽²⁾	18.7±5.70
Dexa/mg L ⁻¹				
0	50	35.4±11.3	639±210	24.2±7.92
50	30	16.5±7.79 ⁽²⁾	262±134 ⁽²⁾	13.9±5.40 ⁽²⁾
100	30	21.8±8.20 ⁽²⁾	307±125 ⁽²⁾	16.8±5.34 ⁽²⁾
150	30	14.4±6.08 ⁽²⁾	219±96 ⁽²⁾	14.0±6.28 ⁽²⁾

⁽¹⁾ $p < 0.05$ ⁽²⁾ $p < 0.01$

Tab.6 Effects of γ -IFN and Dexa on the synthesis of type III collagen in normal and 5-HT stimulated fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Inhibitors	MTT(OD)	
	Control	5-HT
γ -IFN/ 10^3 U L ⁻¹		
0	58±5.85	58±0.67
250	46±4.00 ⁽¹⁾	36±5.51 ⁽²⁾
500	50±17.0	41±3.60 ⁽²⁾
750	56±7.57	45±3.78 ⁽¹⁾
Dexa/mg L ⁻¹		
0	58±5.85	58±5.85
50	41±9.64 ⁽¹⁾	31±6.43 ⁽²⁾
100	33±6.11 ⁽²⁾	25±11.6 ⁽²⁾
150	34±6.11 ⁽²⁾	34±15.0 ⁽²⁾

⁽¹⁾ $p < 0.05$ ⁽²⁾ $p < 0.01$ $n=9$

3 讨 论

实验进一步证实在 Me 分泌的诸种活性介质, 5-HT 促成纤维细胞生长的作用最强, 因而, 本实验着重观察 γ -IFN 和地塞米松对 5-HT 刺激的正常的受照成纤维细胞生长的影响。有资料表明, IFN 除了具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节活性外, γ -IFN 在抗纤维化方面也具有重要作用, 甚至有人认为它可能是阻断纤维化反应的生理调节因子^[3]。本研究结果显示, γ -IFN 不仅能抑制成纤维细胞生长、增殖, 而且能抑制其胶原合成。 γ -IFN 究竟是通过哪些环节抑制成纤维细胞增生, 其作用机制又是如何? 目前尚不明确。有学者认为以 5-HT 为主的级联反应环路是硬皮病发生的重要机制^[4]。研究发现, 由肥大细胞或其它细胞分泌的 5-HT 能激活巨噬细胞合成和分泌白介素-1(IL-1), 后者能诱导成纤维细胞分泌血小板衍生的生长因子(PDGF-AA), PDGF 不仅能直接刺激成纤维细胞增殖, 而且还可上调成纤维细胞表面 IL-1 受体, 以此级联反应加速成纤维细胞增殖^[5], 而 γ -IFN 能直接抑制 PDGF 对成纤维细胞的双重作用, 进而减少成纤维细胞的丝裂活性^[5]。由上述分析不难看出, γ -IFN 主要是通过阻止细胞因子与靶细胞受体作用, 进而达到抑制成纤维细胞增殖之目的, 这可能是 γ -IFN 作为生理调节因子终止纤维化反应的机制之一。此外有人还报道了 γ -IFN 能抑制成纤维细胞胶原合成, 其机理尚不清楚, 本实验结果看出, 可能与抑制成纤维细胞核仁相关嗜银蛋白(AgNORs)的合成有关。

地塞米松(Dexa)是一种较强的免疫抑制剂, 有关其抗纤维化作用的研究仅见个别治疗全身性硬化症的报道^[6]。本实验从 4 个方面明确了 Dexa 对成纤维细胞生长和Ⅲ型胶原合成的抑制作用。所得结果可以认为, Dexa 可能通过抑制 AgNORs 合成进而达到抑制成纤维细胞增殖的目的。已知 AgNORs 与细胞核 DNA 合成及转录有关的蛋白质合成均有密切关系^[7], 因而 AgNORs 合成的减少必然会影 DNA 复制, 不仅会影响成纤维细胞增生活性, 而且也降低其胶原蛋白的合成能力。从上述分析可看出, 通过抑制成纤维细胞 AgNORs 合成进而达到抑制成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成, 是 γ -IFN 和 Dexa 抑制成纤维细胞生长的共同作用之一。此外有资料表明, Dexa 还可以通过胶原基因启动子和转录机制影响胶原基因 mRNA 合成, 也可通过降低胶原合成酶减少成纤维细胞胶原合成^[8]。

参 考 文 献

- 1 Hansen M B, Nielsen S E, Berk K. J Immunol Meth, 1989, 119:203~210
- 2 Egan M J, Reafat F, Crocker J. J Clin Pathol, 1988, 41:31~33
- 3 何 威, 叶庆伦. 国外医学 生理、病理科学与临床分册, 1995, 15(3):207~209
- 4 Sternberg E M. Surv Immunol Res, 1985, 4:69~80
- 5 Rains E W, Dower S K, Ross R. Science, 1989, 243:393~396
- 6 Dai B S, Srinis C R, Sabitha L *et al.* Pharmacol Ther, 1995, 34:726~728
- 7 Cabrini R L, Shwint A E, Mendez A *et al.* J Oral Pathol Med, 1992, 21:275~279
- 8 Weiner F R, Czaja M J, Jefferson D M. J Biol Chem, 1987, 262:6955~6958

EFFECTS OF INTERFERON- γ AND DEXAMETHASONE ON GROWTH OF NORMAL AND STIMULATED FIBROBLASTS BY 5-HYDROXYTRAPTAMINE

GAO Yabing CUI Yufang YANG Hong XIONG Chengqi XIA Guowei WANG Dewen
(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

ABSTRACT Inhibitory effects of interferon- γ (γ -INF) and dexamethasone (Dexa) on growth of cultured fibroblasts were observed by MTT colorimetry, silver colloid technique of nucleolar of orgnizer regions associated protein (AgNORs) combined with image analysis and immunohistochemistry for type III collagen. The results showed that, (1) when γ -INF of 250×10^3 U/L and Dexa of 100mg/L were used, the inhibitory percentages of them on normal fibroblasts 3 days after culture were 43% and 33% respectively; (2) Above mentioned two inhibitors showed evident inhibitory effects on proliferation of normal, irradiated (on 3 or 5 days after irradiation) and 5-HT stimulated fibroblasts; (3) The third day after culture, the strongest inhibitory effects on fibroblasts AgNORs were observed when 250×10^3 U/L of γ -INF and 150mg/L of Dexa were delivered, the number of AgNORs granules in 5-HT stimulated fibroblasts decreased to 58% and 56% of normal control values; while the mean values of three quantitative parameters of AgNORs were also lower than those of control values; (4) The two inhibitors of above mentioned concentrations also demonstrated obvious restrained effect on the synthesis of type III collagen in 5-HT stimulated fibroblasts on day 3 after culture, the percentage of type III collagen positive fibroblasts were about 62% and 43% of control values.

KEYWORDS Interferon- γ , Dexamethasone, Fibroblasts, 5-Hydroxytraptamine, Irradiation, Type III collagen, Proliferation inhibition