

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.17.002

文章编号: 1005-8982(2017)17-0007-06

## 地塞米松抑制胆管瘢痕成纤维细胞的体外研究\*

李克跃,石承先,汤可立,刘振华,黎涛,张帅民,徐贤刚

(贵州省人民医院 肝胆外科,贵州 贵阳 550002)

**摘要:目的** 研究地塞米松(DEX)对体外培养的兔胆管瘢痕模型成纤维细胞(MF)中 I 型胶原、结缔组织生长因子(CTGF)及第 10 号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(*PTEN*)表达的影响。**方法** 对家兔采用切开再吻合方法复制胆管瘢痕模型并获取 MF,经细胞鉴定后对 MF 给予不同浓度的 DEX(0.00、0.01、0.05 和 0.25 mg/ml)干预 48 h,活细胞计数法试剂盒测定各组细胞增殖水平;实时聚合酶链反应检测各组细胞 I 型胶原、CTGF 和 *PTEN* mRNA 表达水平;Western blot 检测各组细胞 I 型胶原和 *PTEN* 蛋白表达水平。**结果** 在 DEX 干预 48 h 后,MF 增殖受抑制,细胞 I 型胶原、CTGF mRNA 和蛋白表达下调,*PTEN* mRNA 和蛋白表达上调( $P < 0.05$ ),呈浓度依耐性。**结论** DEX 可能具有抑制胆管瘢痕及良性胆道狭窄形成的作用,其机制之一可能与 MF 中 I 型胶原、CTGF 及 *PTEN* 的调控有关。

**关键词:** 胆管瘢痕;成纤维细胞;抑制;体外;地塞米松

中图分类号: R575.7

文献标识码: A

## Inhibitory effect of Dexamethasone on rabbit bile duct scar fibroblasts *in vitro*\*

Ke-yue Li, Cheng-xian Shi, Ke-li Tang, Zhen-hua Liu, Tao Li,

Shuai-min Zhang, Xian-gang Xu

(Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Dexamethasone (DEX) on expressions of collagen I, connective tissue growth factor (CTGF), and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (*PTEN*) genes in rabbit bile duct scar model fibroblasts (MF) *in vitro*. **Methods** Rabbit bile duct scar model was established to culture MF. The MF were identified, and then treated by different concentrations of DEX (0, 0.01, 0.05 and 0.25 mg/ml). After respective incubation for 48 h, cell proliferation was investigated by CCK-8; relative mRNA expressions of collagen-I, CTGF and *PTEN* were assessed by qRT-PCR; relative protein expressions of collagen-I and *PTEN* were investigated by Western blot. **Results** DEX significantly inhibited cell proliferation, down-regulated both mRNA and protein expressions of collagen-I and CTGF, and significantly up-regulated both mRNA and protein expressions of *PTEN* ( $P < 0.05$ ) in the MF in a dose-dependent manner. **Conclusions** DEX may have preventive and therapeutic effect on bile duct scar and benign biliary stricture. Effect of DEX in anti-bile duct scar and benign biliary stricture may be partly through regulating collagen-I, CTGF and *PTEN* expressions in MF.

**Keywords:** bile duct scar; fibroblast; inhibitory effect; *in vitro*; Dexamethasone

良性胆道狭窄(benign biliary stricture,BBS)的直接原因是胆道增生性瘢痕的形成,其发病率逐年增高。成纤维细胞大量增殖、I 型胶原过度积聚及结缔

组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)的过高表达等是瘢痕及 BBS 的主要特征<sup>[1-4]</sup>。第 10 号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(phosphatase

收稿日期:2017-01-23

\* 基金项目:贵州省科技厅—贵州省人民医院联合基金[No:黔科合 LH 字(2016)7146]

and tensin homolog deleted on chromosome 10, *PTEN*) 可抑制皮肤瘢痕的形成<sup>5-6</sup>。地塞米松(Dexamethasone, DEX)已被用于防治皮肤瘢痕形成<sup>7-9</sup>。但 DEX 对 BBS 的作用尚不清楚。本研究对 BBS 胆管成纤维细胞使用 DEX 进行干预,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

抗-I型胶原蛋白抗体(SAB2100463)、抗-PTEN 蛋白抗体(PLA0133)、抗-波形蛋白单克隆抗体(V2258)、抗-细胞角蛋白单克隆抗体(C-1801)及聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自美国 Sigma 公司,抗- $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的第二抗体购自北京全式金生物技术有限公司,电化学发光(electrochemical luminescence, ECL)试剂盒(美国 Millipore 公司),SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus)(大连宝生生物工程公司),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-di-amidino-2-phenylindole, DAPI)(瑞士 Roche 公司),全蛋白提取试剂盒、UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、 $\beta$ -actin 引物、Trizol、胰酶(0.25%)、活细胞计数法试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、达尔伯克改良伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自上海生工生物工程股份有限公司, I 型胶原、CTGF、PTEN 引物购自上海 Introgen 公司, I 型胶原正向引物:5'-AGAACGGAGATGACGG AGAA-3',反向引物:5'-CCAAACCACTGAAACCTC TGT-3';CTGF 正向引物:5'-GGCTAAGTTCTGCGGA GTATG-3',反向引物:5'-CAGGCACAGGTCTTGATG AA-3';PTEN 正向引物:5'-AAACAGTAGAGGAGCC ATCAAATC-3',反向引物:5'-TCAGAGTCAGTGGTG TCAGAAT-3'; $\beta$ -actin 正向引物:5'-CTCTCCACCT TCCAGCAGAT-3',反向引物:5'-TGGCTCTAACAGT CCGCTA-3'。地塞米松磷酸钠注射液(武汉华中药业有限公司,批号:20150204),家兔 4 只购自贵州医科大学实验动物中心。

### 1.2 动物模型的复制、细胞的获取及细胞鉴定

清洁级家兔 4 只,其中 2 只用于正常对照组,2 只用于复制 BBS 模型,术前 12 h 禁食,分笼饲养,动物的饲养在贵州医科大学实验动物中心进行。动物未出现死亡、胆瘘等并发症。采用 2.5%戊巴比妥钠溶

液(40~45 mg/kg 体重)静脉注射麻醉,取上腹部正中切口,切开皮肤及皮下组织,暴露胆总管,BBS 模型组在近十二指肠处游离长约 1 cm 的胆总管,横向切开胆总管,长约其周径的 1/3,用 Dexon 线缝合胆总管,逐层关腹<sup>10</sup>。正常对照组开腹后就关腹,不打开胆总管。各组术后禁食 12 h 后正常进食。取 BBS 模型组及正常对照组术后 1 周胆管壁<sup>11</sup>,胆管组织用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)清洗 3 次后剪为 2~3 mm<sup>3</sup> 大小,转移至 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,放入 37℃、5%二氧化碳 CO<sub>2</sub> 培养箱中贴壁 4 h,加入少许含 20%(v/v)FBS、100 u/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 DMEM 培养液进行培养<sup>10</sup>。使用差速贴壁法分离,纯化成纤维细胞,细胞生长至 80%~90%融合时传代。选择第 3 代成纤维细胞进行细胞鉴定。使用细胞免疫荧光法检测波形蛋白和细胞角蛋白抗体的表达,进行成纤维细胞的鉴定<sup>10</sup>。实验所用细胞为第 3~5 代成纤维细胞。

### 1.3 分组及各组细胞的处理

实验分组如下:正常胆管成纤维细胞(normal bile duct fibroblasts, NF)组;BBS 模型胆管成纤维细胞(model fibroblasts, MF)组;MF+ 不同浓度的 DEX 组(DEX 浓度分别为 0.01、0.05 和 0.25 mg/ml)。细胞经消化后,转移到 6 孔板(细胞增殖测定用 96 孔板),细胞密度为 2×10<sup>5</sup> 个/孔(细胞增殖测定 2×10<sup>4</sup> 个/孔)。含 10% FBS 的培养基培养 4 h 后改为不含 FBS 的培养基饥饿过夜,根据分组的不同加用含对应浓度药物的培养基在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱分别培养 48 h。

### 1.4 观察指标及测定方法

**1.4.1 成纤维细胞** 采用细胞免疫荧光法,胰酶消化细胞,按照 2×10<sup>5</sup> 个/孔均匀接种至带有玻璃片的 6 孔板中,24 h 后进行免疫荧光操作,具体步骤如下:PBS 清洗细胞,4%多聚甲醛室温固定 15 min;PBS 清洗后加入 0.1% Triton-100 室温孵育 10 min, PBS 清洗后加入 10%山羊血清室温封闭 30 min,吸取 150  $\mu$ l 第一抗体(波形蛋白和细胞角蛋白稀释至 1:200)滴在封口膜上,将盖玻片倒扣于封口膜,4℃孵育过夜。将盖玻片放入 6 孔板中, PBS 清洗后加入含山羊抗小鼠的 Alexia 第二抗体室温孵育 30 min, PBS 清洗后滴加稀释的 DAPI (1:100);封片剂封片,荧光显微镜下观察并拍照。阴性对照以 PBS 代替第一抗体,排除非特异性的第二抗体结合。

**1.4.2 成纤维细胞增殖的测定** 按 CCK-8 说明书进

行操作。将成纤维细胞按照  $2 \times 10^4$  个 / 孔接种于 96 孔板,  $100 \mu\text{l}$  / 孔, 重复 5 次 / 孔。细胞在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h 后根据分组的不同, 加入对应浓度的 DEX 分别培养 48 h, 加入 CCK-8 试剂  $10 \mu\text{l}$  / 孔培养 2.5 h, 在酶标仪上 450 nm 波长处测定每孔的光密度(optical density, OD)值, 采用扣除本底策略来消除误差。

#### 1.4.3 各组细胞中 I 型胶原、CTGF 及 PTEN mRNA 表达的检测

采用荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分别提取各组细胞总 RNA, 将纯度好、完整性高的 RNA 合成 cDNA。qRT-PCR 反应体系为  $20 \mu\text{l}$ , 其中正反向引物各  $0.8 \mu\text{l}$ , 样品 cDNA  $2 \mu\text{l}$ , 双蒸水  $6 \mu\text{l}$ ,  $2 \times \text{SYBR}$  Premix  $10 \mu\text{l}$ , ROX Reference Dye ( $50 \times$ )  $0.4 \mu\text{l}$ , 每个样品重复 4 次。PCR 反应条件为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 30 s,  $95^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $60^\circ\text{C}$  退火 30 s, 共 40 个循环。使用 ABI Stepone software v 2.3 qRT-PCR 系统采集数据并分析结果, 熔解曲线为单峰表示引物特异性好,  $\beta$ -actin 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法计算目的基因的相对表达量。

#### 1.5 各组细胞中 I 型胶原及 PTEN 蛋白表达的检测

采用 Western blot 检测分别提取各组细胞总蛋白, 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度, 用聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳, PVDF 转膜后给予封闭, 按 1 : 5 000 稀释目的蛋白的一抗, 在  $4^\circ\text{C}$  冰箱内孵育过夜, 以三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20, TBST)在摇床上洗 PVDF 膜 3 次。按 1 : 5 000 稀释二抗, 在室温下振荡孵育 2 h, 以 TBST 清洗 PVDF 膜 3 次, 10 min / 次。电化学发光后用显影和定影方法对胶片进行拍照和扫描,  $\beta$ -actin 蛋白为内参, 以 Quantity One 系统分析目的条带的相对灰度值。

#### 1.6 统计学方法

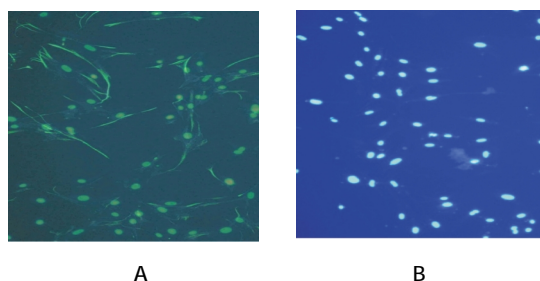
数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较用方差分析, 两两比较用 Bonferroni 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成纤维细胞的鉴定

镜下可见原代培养的胆管成纤维细胞部分呈不规则三角形, 胞质淡而透明, 折光弱, 细胞核较大, 呈椭圆形, 通常含 2 或 3 个核, 随后逐渐变为梭形的单

个核细胞, 为成纤维样细胞。第 3 代成纤维细胞波形蛋白细胞免疫荧光阳性, 细胞角蛋白细胞免疫荧光阴性, 符合成纤维细胞的特点。见图 1。



A: 波形蛋白阳性成纤维样细胞; B: 细胞角蛋白阴性成纤维样细胞  
图 1 兔胆管成纤维细胞的鉴定 (荧光显微镜  $\times 100$ )

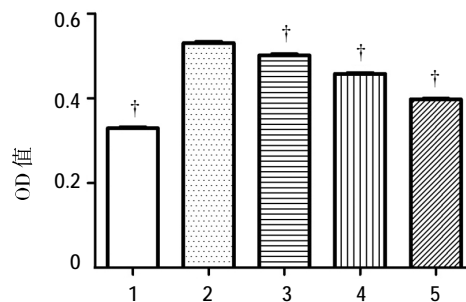
### 2.2 各组增殖水平的比较

NF 组 OD 值为  $(0.329 \pm 0.005)$ , MF 组 OD 值为  $(0.531 \pm 0.007)$ , MF+DEX 0.01 mg/ml 组 OD 值为  $(0.501 \pm 0.007)$ , MF+DEX 0.05 mg/ml 组 OD 值为  $(0.458 \pm 0.004)$ , MF+DEX 0.25 mg/ml 组 OD 值为  $(0.398 \pm 0.004)$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=1\ 120.000, P=0.000$ ); MF 组的 OD 值较 NF 组的高, MF+DEX 组 OD 值较 MF 组低。见图 2。

### 2.3 各组 I 型胶原、CTGF 及 PTEN mRNA 表达的比较

各组细胞 I 型胶原 mRNA 的相对表达量: NF 组为  $(1.000 \pm 0.002)$ , MF 组为  $(2.957 \pm 0.023)$ , MF+DEX 0.01 mg/ml 组为  $(2.718 \pm 0.054)$ , MF+DEX 0.05 mg/ml 组为  $(2.453 \pm 0.053)$ , MF+DEX 0.25 mg/ml 组为  $(2.182 \pm 0.036)$ , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=1\ 629.000, P=0.000$ ); MF 组的 I 型胶原 mRNA 表达较 NF 组高, MF+DEX 组的 I 型胶原 mRNA 表达较 MF 组低。见表 1。

各组细胞 CTGF mRNA 的相对表达量: NF 组为



1: NF 组; 2: MF 组; 3: MF+DEX 0.01 mg/ml 组; 4: MF+DEX 0.05 mg/ml 组; 5: MF+DEX 0.25 mg/ml 组

† 与 MF 组比较,  $P < 0.05$

图 2 不同组别细胞增殖水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

( $1.000 \pm 0.003$ ), MF 组为 ( $3.365 \pm 0.009$ ), MF+DEX 0.01 mg/ml 组为 ( $2.952 \pm 0.035$ ), MF+DEX 0.05 mg/ml 组为 ( $2.542 \pm 0.047$ ), MF+DEX 0.25 mg/ml 组为 ( $2.007 \pm 0.045$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=3\ 026.000, P=0.000$ ); MF 组 CTGF mRNA 表达较 NF 组高, MF+DEX 组 CTGF mRNA 表达较 MF 组低。见表 1。

各组细胞 PTEN mRNA 的相对表达量: NF 组为 ( $1.000 \pm 0.006$ ), MF 组为 ( $0.416 \pm 0.024$ ), MF+DEX 0.01 mg/ml 组为 ( $0.448 \pm 0.009$ ), MF+DEX 0.05 mg/ml 组为 ( $0.537 \pm 0.053$ ), MF+DEX 0.25 mg/ml 组为 ( $0.620 \pm 0.029$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=304.179, P=0.000$ ); MF 组 PTEN mRNA 表达较 NF 组低, MF+DEX 组 PTEN mRNA 表达较 MF 组高。见表 1。

2.4 各组 I 型胶原和 PTEN 蛋白表达水平的比较

各组细胞 I 型胶原蛋白的相对表达量: NF 组为 ( $1.000 \pm 0.021$ ), MF 组为 ( $2.706 \pm 0.032$ ), MF+DEX 0.01 mg/ml 组为 ( $2.643 \pm 0.043$ ), MF+DEX 0.05 mg/ml 组为 ( $2.175 \pm 0.060$ ), MF+DEX 0.25 mg/ml 组为 ( $1.847 \pm 0.028$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=1\ 256.000, P=0.000$ ); MF 组 I 型胶原蛋白表达较 NF 组高, MF+DEX 组 I 型胶原蛋白表达较 MF 组低。见表 2 和图 3。

各组细胞 PTEN 蛋白的相对表达量: NF 组为 ( $1.000 \pm 0.044$ ), MF 组为 ( $0.494 \pm 0.049$ ), MF+DEX 0.01 mg/ml 组为 ( $0.535 \pm 0.038$ ), MF+DEX 0.05 mg/ml 组为 ( $0.623 \pm 0.028$ ), MF+DEX 0.25 mg/ml 组为 ( $0.680 \pm 0.015$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=116.637, P=0.000$ ); MF 组 PTEN 蛋白表达较 NF 组低, MF+DEX 组 PTEN 蛋白表达较 MF 组

表 1 各组 I 型胶原、CTGF 及 PTEN mRNA 表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	I 型胶原	CTGF	PTEN
NF 组	$1.000 \pm 0.002^\dagger$	$1.000 \pm 0.003^\dagger$	$1.000 \pm 0.006^\dagger$
MF 组	$2.957 \pm 0.023$	$3.365 \pm 0.009$	$0.416 \pm 0.024$
MF+DEX 0.01 mg/ml 组	$2.718 \pm 0.054^\dagger$	$2.952 \pm 0.035^\dagger$	$0.448 \pm 0.009$
MF+DEX 0.05 mg/ml 组	$2.453 \pm 0.053^\dagger$	$2.542 \pm 0.047^\dagger$	$0.537 \pm 0.053^\dagger$
MF+DEX 0.25 mg/ml 组	$2.182 \pm 0.036^\dagger$	$2.007 \pm 0.045^\dagger$	$0.620 \pm 0.029^\dagger$
F 值	1 629.00	3 026.00	304.179
P 值	0.000	0.000	0.000

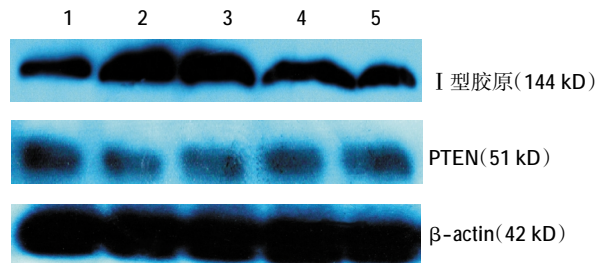
注:  $\dagger$  与 MF 组比较,  $P < 0.05$

高。见表 2 和图 3。

表 2 各组 I 型胶原和 PTEN 蛋白表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	I 型胶原	PTEN
NF 组	$1.000 \pm 0.021^\dagger$	$1.000 \pm 0.044^\dagger$
MF 组	$2.706 \pm 0.032$	$0.494 \pm 0.049$
MF+DEX 0.01mg/ml 组	$2.643 \pm 0.043$	$0.535 \pm 0.038$
MF+DEX 0.05mg/ml 组	$2.175 \pm 0.060^\dagger$	$0.623 \pm 0.028^\dagger$
MF+DEX 0.25mg/ml 组	$1.847 \pm 0.028^\dagger$	$0.680 \pm 0.015^\dagger$
F 值	1 256.000	116.637
P 值	0.000	0.000

注:  $\dagger$  与 MF 组比较,  $P < 0.05$



1: NF 组; 2: MF 组; 3: MF+DEX 0.01 mg/ml 组; 4: MF+DEX 0.05 mg/ml 组; 5: MF+DEX 0.25 mg/ml 组

图 3 各组 I 型胶原和 PTEN 蛋白表达水平的比较

3 讨论

在损伤修复的过程中, 不可避免会形成不同程度的增生性疤痕, 轻微的疤痕可以通过组织塑形得以纠正, 过多的疤痕则难以通过简单的组织塑形予以解决<sup>[11]</sup>。增生性疤痕在胆道的形成伴随着较高的 BBS 发病率。

成纤维细胞是重要的组织修复细胞, 来源于胚胎时期的间充质细胞。组织损伤后, 成纤维细胞大量增殖并转化为肌成纤维细胞, 一方面收缩创面, 另一方面分泌细胞外基质填补创面。正常情况下, 一旦创面被完全表皮化, 组织修复过程趋于停止, 成纤维细胞及肌成纤维细胞等组织修复细胞就开始加速凋亡, 细胞外基质的分泌就减少; 另一方面, 一旦成纤维细胞及肌成纤维细胞等组织修复细胞持续过度增殖、细胞外基质过度积聚, 则形成增生性疤痕<sup>[12]</sup>。胶原是构成细胞外基质的骨架, 尤其是 I 型胶原是细胞外基质的重要组成部分。在胆管疤痕修复及 BBS 形成过程中, 成纤维细胞大量增殖, 同时转化为肌成纤维细胞收缩创面、分泌大量包括 I 型胶原在内的细胞外基质填补创面, 成纤维细胞和肌成纤维细胞是胆管

瘢痕修复及 BBS 形成过程中的主要效应细胞<sup>[3-4]</sup>。本研究结果提示, BBS 模型胆管成纤维细胞中 I 型胶原的表达较正常胆管成纤维细胞中的表达增高,提示大量 I 型胶原的产生在 BBS 形成过程中可能发挥重要作用。

CTGF 是一种可刺激成纤维细胞增殖和胶原沉积的生长因子,可由成纤维细胞、内皮细胞及平滑肌细胞合成分泌。CTGF 可以直接作用于成纤维细胞等间充质来源细胞,促进细胞增殖和合成包括 I 型胶原在内的细胞外基质,还能作为转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)的下游蛋白介导其促瘢痕形成<sup>[13]</sup>。而 TGF- $\beta_1$  是目前已知的与瘢痕及胆管瘢痕形成最重要的细胞因子。研究表明,CTGF 对 TGF- $\beta_1$  诱导的肌成纤维细胞分化是必需的,但仅 CTGF 不足以引起肌成纤维细胞的分化和胶原基质的收缩<sup>[14]</sup>。研究发现,CTGF 在胆管瘢痕组织中的表达增高,并且可能是通过 TGF- $\beta_1$ /Smads/CTGF 通路在胆管瘢痕修复和 BBS 形成过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。本研究结果提示, BBS 模型胆管成纤维细胞中 CTGF 的表达较正常胆管成纤维细胞中上调,提示 CTGF 在 BBS 形成过程中可能发挥重要作用。

PTEN 作为一种肿瘤抑制基因,在中枢神经系统、心脏、肝脏、肾脏、胃肠道及皮肤等全身多器官有表达。研究发现,通过对皮肤瘢痕成纤维细胞转染 PTEN 基因后,成纤维细胞蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)活性降低,细胞增殖、胶原合成受抑制,细胞凋亡增加,PTEN 可能通过调控 PTEN/AKT 和 PTEN/磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT 通路抑制皮肤瘢痕的形成<sup>[5,15]</sup>。调控瘢痕成纤维细胞中 PTEN 的表达是瘢痕治疗的措施之一<sup>[15-17]</sup>。本研究结果提示,PTEN 在胆管成纤维细胞中有表达,并且 BBS 模型胆管成纤维细胞中 PTEN mRNA 和蛋白表达较正常胆管成纤维细胞下调,提示 PTEN 的下调在 BBS 形成过程中可能发挥重要作用。

地塞米松是临床常用的糖皮质激素,具有较强的抗炎、免疫抑制等作用。研究表明,地塞米松能抑制皮肤瘢痕成纤维细胞增殖,抑制瘢痕形成,而机制可能与其调控瘢痕成纤维细胞中 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号转导通路等因素有关<sup>[7-9]</sup>。本实验结果提示,地塞米松能下调 BBS 模型胆管成纤维细胞中 I 型胶

原、CTGF mRNA 及蛋白的表达,同时上调该细胞中 PTEN mRNA 和蛋白表达,从而抑制该细胞的增殖,且浓度越高(DEX 0.05 ~ 0.25 mg/ml),抑制作用越强。提示 DEX 抑制 BBS 形成的作用机制之一可能与其对 BBS 模型胆管成纤维细胞中 I 型胶原、CTGF 及 PTEN 的调控有关。

总之,与正常胆管成纤维细胞比较, BBS 胆管成纤维细胞增殖加快,而 I 型胶原和 CTGF 的表达上调, PTEN 的表达下调, DEX 可能具有抑制 BBS 形成的作用,其机制之一可能与其对 BBS 胆管成纤维细胞中 I 型胶原、CTGF 及 PTEN 的调控有关。

#### 参 考 文 献:

- [1] HUANG C, AKAISHI S, OGAWA R. Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring[J]. Arch Dermatol Res, 2012, 304(8): 589-597.
- [2] GENG Z M, ZHENG J B, ZHANG X X, et al. Role of transforming growth factor-beta signaling pathway in pathogenesis of benign biliary stricture[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(31): 4949-4954.
- [3] GENG Z M, YAO Y M, LIU Q G, et al. Mechanism of benign biliary stricture: a morphological and immunohistochemical study[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(2): 293-295.
- [4] XU J, GENG Z M, MA Q Y. Microstructural and ultrastructural changes in the healing process of bile duct trauma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 2(2): 295-299.
- [5] GUO L, CHEN L, BI S, et al. PTEN inhibits proliferation and functions of hypertrophic scar fibroblasts[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 361(1/2): 161-168.
- [6] SANG P F, WANG H, WANG M, et al. NEDD4-1 and PTEN expression in keloid scarring[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 13467-13475.
- [7] SYED F, BAYAT A. Superior effect of combination vs. single steroid therapy in keloid disease: a comparative in vitro analysis of glucocorticoids[J]. Wound Repair Regen, 2013, 21(1): 88-102.
- [8] WRZESZCZ A, DITTRICH B, HAAMANN D, et al. Dexamethasone released from cochlear implant coatings combined with a protein repellent hydrogel layer inhibits fibroblast proliferation[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(2): 442-454.
- [9] SCHWARTZ J T, BECKER S, SAKKAS E, et al. Glucocorticoids recruit tgfr3 and smad1 to shift transforming growth factor-beta signaling from the tgfr1 / smad2/3 axis to the acvr1 / smad1 axis in lung fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2014, 289(6): 3262-3275.
- [10] LI K Y, SHI C X, HUANG J Z, et al. Tetramethylpyrazine effects on the expression of scar-related genes in rabbit benign biliary stricture fibroblasts[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2016, 26(10): 813-817.

- [11] GAUGLITZ G G, KORTING H C, PAVICIC T, et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies[J]. *Mol Med*, 2011, 17(1/2): 113-125.
- [12] HU B, PHAN S H. Myofibroblasts [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2013, 25(1): 71-77.
- [13] SHI L, CHANG Y, YANG Y, et al. Activation of JNK signaling mediates connective tissue growth factor expression and scar formation in corneal wound healing[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): DOI: 10.1371/journal.pone.0032128.
- [14] GARRETT Q, KHAW P T, BLALOCK T D, et al. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(4): 1109-1116.
- [15] ZHU H Y, LI C, BAI W D, et al. MicroRNA-21 regulates hTERT via PTEN in hypertrophic scar fibroblasts[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): DOI: 10.1371/journal.pone.0097114.
- [16] LIU Y, WANG X, YANG D, et al. MicroRNA-21 affects proliferation and apoptosis by regulating expression of PTEN in human keloid fibroblasts[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2014, 134(4): DOI: 10.1097/PRS.0000000000000577.
- [17] GONCALVES M B, MALMQVIST T, CLARKE E, et al. Neuronal RAR $\beta$  signaling modulates pten activity directly in neurons and via exosome transfer in astrocytes to prevent glial scar formation and induce spinal cord regeneration [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(47): 15731-15745.

(童颖丹 编辑)