

- [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2002, 122(6): 315-323
- 4 张宏志, 孙福祥, 闫树恒, 等. 股骨折早期与延期内固定的比较[J]. 骨与关节损伤杂志, 1991, 6(4): 208-209
 - 5 Bhandari M, Adili A, Leone J, et al. Early versus delayed operative management of closed tibial fractures [J]. Clin Orthop Relat Res, 1999, (368): 230-239
 - 6 Boldin C, Fankhauser F, Hoier H P, et al. Three year results of proximal tibia fractures treated with the LrSS [J]. Clin Oaho0 Relat Res, 2006, 445(4): 222-229
 - 7 马伯俊, 陈联源, 姜晓锐. 延期切开复位内固定治疗复杂 Pilon 骨折[J]. 中医正骨, 2007, 19(1): 40-42
 - 8 Influence of operative time on effect of the Pilon fracture [J]. Zhongguo Gu Shang, 2009, Oct, 22(10): 770-772
 - 9 Borrelli J Jr, Ellis E. Pilon fractures: assessment and treatment [J]. Orthop Clin North Am, 2002, 33: 231-245
 - 10 刘献祥, 余希杰, 许书亮. 无名异冲剂影响骨折愈合过程的组织学及 X 线定量研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 1998, 6(3): 11-13
 - 11 朱建民, 金宗达. 骨折愈合的分子生物学进展 [J]. 中华骨科杂志, 1993, 6: 458
 - 12 苏佳灿, 王家林, 张春才. 骨折愈合过程血管形成的影响因素 [J]. 中国骨伤, 2002, 15(3): 187
 - 13 Arikawa T, Omurak, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandinE-2 in human mesenchymal stem cells [J]. cell physiol, 2004, 200(3): 400-406
 - 14 Goodship AE, Norroddin N, Francis M. The stimulation of prostaglandin synthesis by micromovement in fracture healing micromovement in orthopaedics [M]. London: university of oxford, 1992: 31-34
 - 15 王文良, 吴岳嵩, 王新伟, 等. 两种内固定后兔骨髓中成骨细胞内骨形态生成蛋白含量的比较 [J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(5): 321-322

(收稿: 2010-10-18)

(修回: 2011-06-22)

高糖通过上调 Axl 受体表达促进心肌成纤维细胞增殖

刘存飞 杨群芳 符江琳 徐 晓 陈星霖 刘承云

摘 要 **目的** 探讨不同浓度糖在心肌成纤维细胞增殖中的作用及 Axl 酪氨酸激酶受体在血糖调控心肌成纤维细胞增殖中的作用。**方法** 分别用不同浓度糖孵育乳鼠心肌成纤维细胞, 48h 后分别检测细胞增殖、细胞周期以及 Axl mRNA 的表达量。**结果** (1) 高糖组心肌成纤维细胞增殖显著高于正常糖组 [OD490: 正常糖组 (5mmol/L) 0.358 ± 0.023 ; 高糖组 (25mmol/L) 0.446 ± 0.036 ; $P < 0.01$]。 (2) 高糖显著促进 Axl 表达上调 (Ct 值: 正常糖组 28.996 ± 0.579 ; 高糖组 27.253 ± 0.548 ; 相对表达量: $1: 2.63$; $P < 0.05$)。 (3) 高糖显著促进心肌成纤维细胞进入增殖周期 (正常糖组 $G_1\% 73.89 \pm 5.52$; $G_2 + S + M\% 26.11 \pm 5.52$; 高糖组 $G_1\% 63.22 \pm 6.52$; $G_2 + S + M\% 36.78 \pm 6.52$; $P < 0.05$)。 **结论** 高糖能够通过上调 Axl 受体表达促进离体培养乳鼠心肌成纤维细胞增殖, Axl 受体在糖尿病性心肌病变中有可能扮演重要作用。

关键词 心肌成纤维细胞 Axl 酪氨酸激酶受体 高糖 细胞增殖

High Glucose Promote Cardiac Fibroblast Cell Proliferation by Inducing Up-regulation of Axl Receptor. Liu Cunfei, Yang Qunfang, Fu Jianglin, Xu Xiao, Chen Xinglin, Liu Chengyun. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430022, China

Abstract Objective To investigate the effect of high glucose and normal glucose on the proliferation of cardiac fibroblasts and the role of Axl tyrosine kinase receptor in this process. **Methods** Cardiac fibroblasts of SD neonate rats (1-3 days) were separated and the 2~4 passage cardiac fibroblasts were used for experiments. Cultured cardiac fibroblasts were incubated with high concentration glucose (25mmol/L) and normal concentration glucose (5mmol/L). After 48 h, the cell proliferation, cell cycle and mRNA expression of Axl were measured by MTT, flow cytometry and real-time PCR, respectively. **Results** (1) Compared with the group of normal glucose (5mmol/L), cell proliferation was significantly higher in the group of high glucose (25mmol/L) (OD490: 0.446 ± 0.036 vs 0.358 ± 0.023 ; $P < 0.01$). (2) The Ct value of Axl in the group of high glucose was lower and its relative expression was higher than that in the group of normal glucose (Ct value: 27.253 ± 0.548 vs 28.996 ± 0.579 ; relative expression: high glucose vs low glucose $1: 2.63$; $P < 0.05$). (3) $G_2 + S + M\%$ in the group of high glucose was higher than that in the group of normal glucose (36.78 ± 6.52 vs 26.11 ± 5.52 ; $P < 0.05$). **Conclusion** High glucose could promote cardiac fibroblast cell proliferation by inducing up-regulation of mRNA of Axl. Axl receptor

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院老年科 (刘存飞、符江琳、徐晓、陈星霖、刘承云); 高压氧中心 (杨群芳)

通讯作者: 刘承云, 电子信箱: lcyun@medmail.com.cn

may play important role in diabetes cardiomyopathy.

Key words Cardiac fibroblast cell; Axl tyrosine kinase receptor; High glucose; Cell proliferation

糖尿病性心肌病变是糖尿病的主要并发症之一,可引起心肌的纤维化。心肌纤维化的重要特征之一就是心肌成纤维细胞的增殖。而糖尿病高血糖状态能够显著促进心肌成纤维细胞的增殖^[1]。以前有研究发现外源性 Gas6(生长停滞特异性基因 6)与 Axl 酪氨酸激酶受体结合后能够显著促进心肌成纤维细胞的增殖^[2]。而心肌成纤维细胞 Axl 受体调控成纤维细胞的增殖是否受到血糖的调控,进而参与糖尿病性心肌病变的发生、发展过程,目前尚不清楚。本实验通过体外培养的乳鼠心肌成纤维细胞对其进行高糖培养干预模拟在体糖尿病状态来探讨 Gas6 - Axl 系统在糖尿病性心肌病变中对心肌成纤维细胞增殖的影响。为糖尿病性心肌病变的防治提供新的思路和理论依据。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物:出生 1~3 天的 SD 大鼠乳鼠,雌雄不拘,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。(2)主要试剂和仪器:DMEM 培养基、Trizol 试剂购自武汉博士德生物工程有限公司;小牛血清为 Gibco 公司产品;反转录及 Real - Time PCR 试剂购自北京金全式金生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯。荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品,型号:Step - One Plus;流式细胞仪为美国 BD 公司产品,型号:FACSCanto - II。

2. 方法:(1)体外心肌成纤维细胞的分离培养:1)体外乳鼠心肌成纤维细胞的培养:取出生 1~3 天的 SD 大鼠乳鼠,在无菌的条件下,开胸取出心脏,用预冷的 PBS 冲洗 3 次以去除血细胞,然后剪成约 1mm³ 大小的碎块,弃去 PBS,用 0.1% 的胰酶在 37℃ 水浴锅中消化,收集消化悬液,直至组织块消失。收集的细胞悬液加等体积的含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基(pH7.2)终止消化,1000r/min 离心收集细胞沉淀,然后用含 20% 小牛血清的培养基制成单细胞悬液,分种于 50ml 培养瓶中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养 90min,根据心肌成纤维细胞比心肌细胞贴壁速度快的特点,将细胞悬液到掉,经过两次差速贴壁后,留在瓶底的细胞主要为心肌成纤维细胞。培养心肌成纤维细胞 2~3 天至 80%~90% 细胞融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代(1:3~1:2)。取第 2~4 代细胞用于实验。实验前代之以无血清的培养基培养,每 48h 换液 1 次。(2)实验分组:所有细胞分成两组,高糖组定义为 DMEM 培养基中含葡萄糖 25mmol/L,正常组 DMEM 含葡萄糖 5mmol/L。

(2)MTT 检测细胞增殖:传代后的心肌成纤维细胞以 1 × 10⁴/孔接种于 96 孔培养板中,按照实验分组分别添加高糖培养基、正常糖培养基进行培养,每组重复 6 个孔。孵育 48h

后,每孔加入 MTT(5mg/ml, pH7.4) 20μl,37℃ 继续孵育 4h。小心吸去含 MTT 的培养液,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 150μl,脱色摇床振荡 10min,在酶标仪 490nm 波长下测定各孔光吸收值。以比较各组细胞增殖情况。

(3)实时荧光定量 PCR 检测 Axl 的表达:1)引物设计与合成:以 GAPDH 为内参,Axl 引物序列参考文献[3],由上海生工生物工程公司合成。引物序列如下:GAPDH:Sense 5' - AGTTCAACGGCAGCTCAAG - 3'; Antisense 5' - TACTCAG - CACCAGCATCACC - 3'。Axl: Sense 5' - TGATAACAC - CCAGACCCAGG - 3'; Antisense 5' - TGACTCCCTTGGCATT - GTGG - 3'。总 RNA 提取及 cDNA 合成:为明确高糖对心肌成纤维细胞的影响,传代的心肌成纤维细胞在分别用高糖培养基、正常糖培养基培养 48h 后,加入 Trizol 试剂 1ml 提取细胞总 RNA,采用紫外分光光度计,测定 OD260 及 OD280 值,计算 RNA 浓度及纯度。所得 OD260/OD280 比值在 1.8~2.2 之间视为符合纯度要求。以提取的总 RNA 为模板进行反转录反应(20μl):总 RNA 2μl;Oligo(dT)₁₈ 1μl;2 × TS Reaction Mix 10μl;TransScriptTM RT Enzyme Mix 1μl;Rnase - free Water 6μl。反应条件:42℃ 30 min;85℃ 5min。所得反转录 cDNA 保存在 -20℃ 备用。2)实时荧光定量 PCR 反应:按照试剂说明书以反转录合成的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 反应并做溶解曲线检测引物的特异性。实时荧光定量反应体系(25μl)如下:2 × Trans Start Green qPCR SuperMix 12.5μl;上、下游引物各 0.5μl;反转录合成的 cDNA 4μl;Passive Reference Dye 0.5μl;余下由高压灭菌的双蒸水补足至 25μl。反应条件:95℃ 30s;95℃ 10s,56℃ 15s,72℃ 10s,循环 40 次。基因表达量比较采用相对定量法(2^{-ΔΔt}法):ΔΔt = (待测样品目的基因 Ct 均值 - 待测样品内参基因 Ct 均值) - (对照样品目的基因 Ct 均值 - 对照样品内参基因 Ct 均值)。以 2^{-ΔΔt} 表示样品中目的基因初始 mRNA 的相对表达量。

(4)流式细胞仪检测细胞增殖周期:在 6 孔培养板生长的传代心肌成纤维细胞分别在高糖(25mmol/L)、正常糖(5mmol/L)浓度培养 48h 后,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液并调整细胞数量至 1 × 10⁶ cells/ml,用预冷的 70% 乙醇固定过夜,PBS 漂洗后经 RNA 酶 37℃ 作用 30min,碘化丙啶(pmpidium iodide,PI)染色 30min,上机检测,分析各实验组 PI 荧光直方图上细胞各周期的百分率。

3. 统计学方法:实验结果统计分析采用 SPSS 16.0 统计软件包,计量资料以均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$),组间比较采用两独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 高糖显著促进心肌成纤维细胞增殖:与正常浓度糖组(5mmol/L)相比,高糖组(25mmol/L)孵育 48h 后能够显著促进心肌成纤维细胞增殖(*P* <

0.01), 结果见表 1。

表 1 不同浓度糖对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	OD490
正常糖组 (5mmol/L)	0.358 $\pm$ 0.023
高糖组 (25mmol/L)	0.446 $\pm$ 0.036 *

与正常糖 (5mmol/L) 组比较, * $P < 0.01$

2. 高糖促进 Axl 表达上调: 有研究发现^[4], 在血管平滑肌细胞中 Gas6 - Axl 受到血糖的调控, 但在心肌成纤维细胞中血糖是否能够调控 Axl 的表达尚不清楚, 在高糖孵育 48h 后, 我们用实时荧光定量 PCR 技术检测了高糖对心肌成纤维细胞 Axl 表达的影响, 结果表明, 高糖孵育后能显著增加心肌成纤维细胞中 Axl 的表达量 ($P < 0.05$) (图 1)。

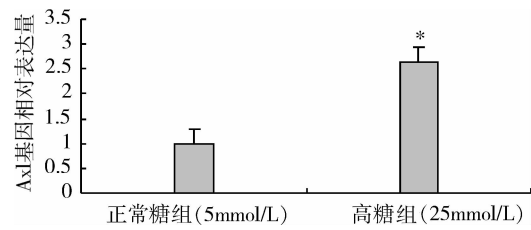


图 1 Axl 基因相对表达量 ($n = 6$)

* 与正常糖 (5mmol/L) 组比较, $P < 0.05$

3. 高糖对细胞周期的影响: 分别用不同浓度糖孵育心肌成纤维细胞 48h 后, 利用流式细胞仪检测细胞周期, 发现高糖 (25mmol/L) 组 $G_2 + S + M$ 期的细胞百分比显著高于正常糖 (5mmol/L) 组, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。这表明高糖能够显著促进心肌成纤维细胞进入增殖周期。

表 2 不同浓度糖对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \%$)

组别	G_1	$G_2 + S + M$
正常糖组 (5mmol/L)	73.89 $\pm$ 5.52	26.11 $\pm$ 5.52
高糖组 (25mmol/L)	63.22 $\pm$ 6.52 *	36.78 $\pm$ 6.52 *

与正常糖组 (5mmol/L) 比较, * $P < 0.05$

讨 论

Axl 属于受体酪氨酸家族成员 (其家族成员还包括 Mer、Tyro - 3), 结构由胞外区、胞内区、和跨膜区三部分组成^[5]: 胞外区由两个免疫球蛋白样结构域和两个纤维连接蛋白 III (FN III) 重复序列组成, 是与配体发生结合的区域。胞内区是酪氨酸激酶结构域, 是酪氨酸蛋白激酶的催化部位, 能够发生自身磷酸化进而向胞内传递信号。Axl 及其配体 Gas6 广泛表达

于多种组织, 包括脉管系统、心脏、肾脏、肺脏等, 此外, 在一些肿瘤组织中也有过度表达^[6,7]。当 Axl 与其配体 Gas6 结合后会激活下游的细胞信号, 包括 $PI_3K - Akt$ 、ERK, 进而发挥多方面的作用, 包括促进细胞增殖/存活、促进细胞黏附、迁移、参与免疫调控等^[2,8-10]。

以前有研究发现^[11], 糖尿病情况下高糖状态能够显著上调肾脏中 Axl 受体及其配体 Gas6 的表达, 通过促进肾系膜细胞的增殖而大大加速糖尿病肾病的进展。在血管平滑肌细胞中, 高糖浓度亦能够调控血管平滑肌细胞中 Axl 及其下游信号通路的表达^[4]。但高糖对心脏组织中 Axl 受体的作用尚不清楚。因此, 在本研究中, 我们通过体外细胞模型研究了高糖对心脏组织中 Axl 受体的作用。我们的研究发现, 高糖能够显著促进更多的心肌成纤维细胞进入增殖周期。并且高糖能够上调心肌成纤维细胞中 Axl 基因的表达; 这表明, Axl 酪氨酸激酶受体在高糖诱导的心肌成纤维细胞增殖中发挥着重要作用。

既往研究证实了 Axl 及其配体 Gas6 在血栓形成、动脉粥样硬化等心血管疾病中起着重要作用^[12]。我们以往的研究也发现在急性冠脉综合征患者, 其血浆中 Gas6 浓度的变化与疾病呈显著相关性, 这些均表明 Axl 及其配体 Gas6 在心血管疾病的发生中起着重要作用。本研究首次探讨了 Axl 在糖尿病诱导心肌损害中的作用, 发现高糖能够通过上调 Axl 基因的表达显著促进心肌成纤维细胞增殖, 这表明 Axl 途径有可能在糖尿病性心肌病变中起着一定的作用。至于高糖条件下 Axl 促心肌成纤维细胞增殖的信号转导通路目前尚不清楚, 但已有研究表明, ERK、 PI_3K 信号通路是 Axl 发挥其重要生物学作用的主要信号通路, 在基因敲除小鼠 (Gas6 - / -) 模型中, 证明外源性 Gas6 通过与 Axl 受体结合促进心肌成纤维细胞的增殖主要是通过 ERK 途径^[2]。因此, 我们推断, 高糖条件下诱导 Axl 表达促进心肌成纤维细胞增殖也可能是通过 ERK 和 (或) PI_3K 途径。

我们的研究表明 Axl 受体在高糖诱导的心肌成纤维细胞增殖中起着重要作用, 为研究糖尿病性心肌病变提供了新的思路。

参考文献

1 Neumann S, Huse K, Semrau R, et al. Aldosterone and D - glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts in vitro [J]. Hypertension, 2002, 39 (3) : 756 - 760

2 Stenhoff J, Dahlbäck B, Hafizi S. Vitamin K - dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblast [J]. Bio-

- chem Biophys Res Commun, 2004, 319(3): 871 - 878
- 3 Couchie D, Lafdil F, Martin - Garcia N, *et al.* Expression and role of Gas6 protein and of its receptor Axl in hepatic regeneration from oval cells in the rat[J]. Gastroenterology, 2005, 129(5): 1633 - 1642
- 4 Cavet ME, Smolock EM, Ozturk OH, *et al.* Gas6 - Axl receptor signaling is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(5): 886 - 891
- 5 Hafizi S, Dahlbäck B. Gas6 and protein S vitamin K - dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily[J]. FEBS J, 2006, 273(23): 5231 - 5244
- 6 Shieh YS, Lai CY, Kao YR, *et al.* Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumour progression[J]. Neoplasia, 2005, 7(12): 1058 - 1064
- 7 Ito M, Nakashima M, Nakayama T, *et al.* Expression of receptor - type tyrosine kinase, Axl, and its ligand, Gas6, in pediatric thyroid carcinomas around Chernobyl[J]. Thyroid, 2002, 12(11): 971 - 975
- 8 Fridell YW, Villa J Jr, Attar EC, *et al.* GAS6 induces Axl - mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 1998, 273(12): 7123 - 7126
- 9 Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, *et al.* Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(4): 881 - 887
- 10 Lu W, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family[J]. Science, 2001, 293(5528): 306 - 311
- 11 Nagai K, Arai H, Yanagita M, *et al.* Growth arrest - specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy[J]. J Biol Chem, 2003, 278(20): 18229 - 18234
- 12 Tjwa M, Moons L, Lutgens E. Pleiotropic role of growth arrest - specific gene 6 in atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipido, 2009, 20(5): 386 - 392

(收稿: 2010 - 10 - 20)

(修回: 2010 - 12 - 02)

肝穿刺病理学检查对肝功能正常 HBV 感染者诊断的临床意义

陈仕祥 胡爱荣 何维新 陈玺卿 熊志远 江 军 范 平

摘 要 **目的** 评估肝穿刺组织病理学检查对肝功能正常的慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者的诊断价值。**方法** 选取肝功能正常的慢性 HBV 感染者 244 例,行肝穿刺病理检查,同时检测肝功能、血清 HBV DNA 及 HBV 血清学标志物。**结果** 244 例患者中符合病毒携带者 53 例(21.7%);慢性乙型肝炎轻度 143 例(58.6%),中度 34 例(13.9%),重度 14 例(5.7%),肝硬化 7 例(2.9%)。炎症分级 $G \geq 2$ 者 48 例(19.7%);纤维化分期 $S \geq 2$ 者 54 例(22.1%)。HBeAg 阴性组患者中如 HBV DNA 高水平复制,其病理炎症分级及纤维化分期均明显重于阳性组($P < 0.05$)。HBV DNA 高载量和低载量(以 10^5 拷贝/毫升为界限)肝组织炎症分级统计学差异无显著意义,但是纤维化分期则差异明显。**结论** 多数肝功能正常的慢性 HBV 感染者有一定程度的病变损害,血清 HBeAg 及 HBV DNA 均不能完全反映肝脏病变情况,肝穿刺组织病理学检查在判定肝功能正常的 HBV 感染者的病情程度和指导治疗方面有重要价值。

关键词 乙型肝炎病毒 乙型肝炎 e 抗原 HBV DNA 活组织检查

Diagnostic Value of Liver Biopsy in Patients with Normal Liver Function Infected with Chronic Hepatitis B Virus. Chen Shixiang, Hu Airon, He Weixin, Chen Xiqing, Xiong Zhiyuan, Jiang Jun, Fan Ping. Department of Infectious Diseases, The 113th Hospital of the people's Liberation Army, Zhejiang 315040, China

Abstract **Objective** To evaluate diagnostic value of liver biopsy in patients with normal liver function infected with chronic hepatitis B virus(HBV). **Methods** 244 patients with normal liver function infected with HBV were examined with liver biopsy, liver function, HBV DNA level and serological markers of hepatitis B e antigen(HBeAg). All patients were divided into different groups based on serum HBeAg and HBV DNA levels. **Results** From liver histopathology, 53 cases (21.7%) was diagnosed with chronic hepatitis B virus carrier, 143 cases (58.6%) with slight chronic hepatitis B(CHB), 34 cases (13.9%) with moderate CHB and 14 cases (5.7%) with severe CHB, in which 7 cases (2.9%) were diagnosed with cirrhosis. 48 cases (19.7%) had inflammation grades with $G \geq 2$, and 54 cases (22.1%) had fibrosis stages with $S \geq 2$. The inflammation grades and fibrosis stages in patients with HBeAg negative and high levels of HBV

作者单位: 315040 宁波, 解放军 113 医院感染科(陈仕祥、何维新、陈玺卿、熊志远、江军、范平); 315040 宁波市第二医院·宁波市传染病医院(胡爱荣)

通讯作者: 胡爱荣, 电子信箱: har1224@126.com