

# Hepatocyte Growth Factor (HGF) modula il ricambio della matrice extracellulare in colture di cellule endoteliali umane

C. Esposito, A. Foschi, G. Fasoli, F. Cornacchia, N. Bellotti, T. Mazzullo, A.R. Plati, L. Semeraro, M.M. Conte, T. Rampino, A. Dal Canton

Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, IRCCS Policlinico San Matteo, Università degli Studi di Pavia, Pavia

## Riassunto

**Premessa.** HGF ha un ruolo di primo piano nella angiogenesi. Nelle prime fasi dell'angiogenesi è necessaria una alterazione del turnover della matrice extracellulare affinché le cellule endoteliali possano proliferare e migrare. È stato dimostrato che HGF riduce la sclerosi in topi suscettibili. Nel nostro studio abbiamo valutato l'effetto di HGF sul turnover della matrice extracellulare in cellule endoteliali in coltura.

**Metodi.** Cellule endoteliali subconfluenti venivano trattate con HGF (50 ng/ml). Dopo 24 ore veniva valutata la proliferazione mediante conta cellulare. Il turnover della matrice extracellulare veniva studiato valutando i livelli di mRNA per  $(\alpha 1)$  I e  $(\alpha 2)$  IV e per gli inibitori tissutali delle metalloproteasi TIMP-1 e 2 mediante trascrittasi inversa e PCR. L'attività gelatinolitica veniva valutata mediante zimografia. Cellule non trattate erano utilizzate come controllo. In alcuni esperimenti HGF veniva pretrattato con anticorpi bloccanti.

**Risultati.** HGF aumentava in maniera significativa la proliferazione delle cellule endoteliali ( $1.19 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$  vs  $0.8 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^4$  cellule,  $p < 0.05$ ). Questo effetto era annullato dalla incubazione con anticorpi bloccanti ( $1.19 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$  vs  $0.9 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^4$  cellule). HGF aumentava l'espressione di collagene  $(\alpha 1)$  I mentre diminuiva quella di collagene  $(\alpha 2)$  IV. L'attività gelatinolitica non era modificata da HGF mentre era marcatamente aumentata l'espressione di TIMP-1.

**Conclusioni.** HGF altera il turnover della matrice extracellulare. Queste alterazioni favoriscono una netta deposizione di ECM. È possibile che HGF promuova la degradazione in altri tipi cellulari coinvolti nella fase precoce dell'angiogenesi.

*PAROLE CHIAVE:* Angiogenesi, Endotelio, HGF, Sclerosi, Matrice extracellulare

## Modulation of extracellular matrix (ECM) turnover by HGF in endothelial cell cultures

**Background.** HGF plays a pivotal role in angiogenesis. Endothelial cell proliferation and migration are the hallmarks of angiogenesis but the angiogenic response requires a change in ECM turnover. Recently it has been shown that HGF reduces glomerulosclerosis in a mouse model of chronic renal failure. Our study evaluated the effect of HGF on ECM turnover in cultured human skin endothelial cells (HECs).

**Methods.** HECs, cultured in 24-well plates, were treated with HGF (50 ng/mL) for 24 h. HGF pretreated with blocking antibodies for 6 h was added to some wells. Untreated cells were used as control. Proliferation was evaluated by cell counting. ECM turnover was studied by measuring  $(\alpha 1)$  I and  $(\alpha 2)$  IV collagen subchains and tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP-1 and 2) mRNA levels by *in situ* RT followed by PCR.  $\beta$ -actin mRNA was used as internal standard. Type IV collagen and gelatinolytic activity of cell supernatant were evaluated by ELISA and zymography respectively.

**Results.** HGF significantly increased HEC proliferation ( $1.19 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$  vs  $0.8 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^4$  cells,  $p < 0.05$ ). This effect was blunted by the incubation with blocking antibodies ( $1.19 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$  vs  $0.9 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^4$  cells).

---

*( $\alpha 1$ ) I and ( $\alpha 2$ ) IV collagen mRNAs were up- and downregulated, respectively, by HGF. Collagen type IV level was non significantly changed in HGF-treated endothelial cell supernatant. The activity of 72 and 92 kDa gelatinases was reduced by HGF whereas HGF induced an increased expression of TIMP-1.*

**Conclusions.** *HGF alters ECM turnover in endothelial cells. Surprisingly, the changes seem to favor the net accumulation of ECM. Presumably HGF promotes ECM degradation in other cell types involved in the early phases of angiogenesis. (Giorn It Nefrol 2000; 17: 27-31)*

**KEY WORDS:** *Angiogenesis, Endotelium, HGF, Sclerosis, Extracellular matrix*

---