

· 论 著 ·

丝裂霉素 C 对瘢痕疙瘩成纤维细胞 TGF- β 和 Smads 表达的影响孙 奎, 吴晓明, 张鸿霞, 许新华, 王鹤鹏, 杨景哲, 李树松
(承德医学院附属医院烧伤整形外科, 河北承德 067000)

摘要:目的 探讨丝裂霉素 C(MMC)对瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFB)转化生长因子 β (TGF- β)/Smads 通路作用及机制。方法 采用不同浓度的 MMC 作用于体外培养的 KFB,通过采用 RT-PCR 方法,检测 MMC 对体外培养的 KFB TGF- β_1 mRNA 表达的影响,采用 Western blot 技术检测 MMC 作用下体外培养 KFB 中 Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白的表达。结果 RT-PCR 方法显示:MMC 干预组 TGF- β_1 mRNA 相对表达量明显低于正常对照组,从 12.5 μ g/L MMC 开始具有显著的统计学差异($P < 0.05$),随 MMC 浓度增大,MMC 干预组 TGF- β_1 mRNA 相对表达量呈逐渐降低趋势。Western blot 技术检测显示:12.5 μ g/L MMC 开始对 KFB 中 Smad7 蛋白的表达具有明显增强效应($P < 0.05$),50 μ g/L MMC 对 Smad2/3 蛋白的表达开始有减弱效应($P < 0.05$),而对 Smad4 蛋白的表达无明显变化。结论 MMC 对 TGF- β_1 mRNA 的表达具有明显减弱效应;加入不同浓度的 MMC 能明显增加 KFB 中 Smad7 蛋白的表达,减弱 KFB 中 Smad2/3 蛋白的表达,而对 Smad4 蛋白的表达无变化。

关键词:丝裂霉素 C/药理学;瘢痕疙瘩;成纤维细胞/药理作用;转化生长因子 β ;Smad2/3;Smad4;Smad7

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.08.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)08-0853-03

Influence of mitomycin C on expressions of TGF- β /Smad in keloid fibroblasts

Sun Kui, Wu Xiaoming, Zhang Hongxia, Xu Xinhua, Wang Hepeng, Yang Jingzhe, Li Shusong

(Department of Burn and Plastic Surgery, Affiliated Hospital, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To study the effect of mitomycin C(MMC) on transforming growth factor(TGF)- β /Smad signal passage in keloid fibroblasts(KFB) and its mechanism. Methods The different concentrations of MMC were acted on *in vitro* cultured KFB and their influence on the expression of KFB TGF- β_1 mRNA was detected by the RT-PCR method. The Western blot technology was used to detect the expression of Smad2/3, Smad4 and Smad7 protein in the *in vitro* cultured KFB under MMC action. Results The RT-PCR results showed that TGF- β_1 mRNA related expression quantity in the MMC intervention group was significantly lower than that in the normal control group, showing statistical differences starting from 12.5 μ g/L MMC($P < 0.05$). With the MMC concentration increase, the related expression quantity of TGF- β_1 mRNA in the MMC intervention group showed the gradually decreasing trend. The Western blot detection displayed that 12.5 μ g/L MMC started to show the enhancing effect on Smad7 protein expression in KFB($P < 0.05$), 50 μ g/L MMC started the weakening effect on the expression of Smad2/3 protein($P < 0.05$), but had no effect on the Smad4 protein expression. Conclusion MMC has obviously decreasing effect on expression of TGF- β_1 mRNA. The different concentrations of MMC can obviously increase the expression of Smad7 protein, decrease the expression of Smad2/3 protein in KFB and has no effect on the expression on Smad4 protein.

Key words: mitomycin C/pharmacology; keloid; fibroblast/pharmacological action; transforming growth factor- β ; Smad2/3; Smad4; Smad7

瘢痕疙瘩是皮肤损伤后伤口愈合过程中出现成纤维细胞过度增殖、胶原大量沉积,也是皮肤损伤后组织异常修复的结果。目前,对瘢痕发生的机制仍知之甚少,因而临床上亦远未找到切实有效的防治措施。瘢痕疙瘩多采用局部药物注射、压迫治疗、手术和激光治疗等进行综合治疗,但效果不是很理想,因而瘢痕疙瘩也成了当今整形外科领域的一个研究热点和难点^[1]。现将丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)对瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblast, KFB)转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smads 通路作用及机制报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 6 月至 2010 年 6 月本院收治的瘢痕疙瘩进行整形手术的患者 13 例,其中,男 9 例,女 4 例;年龄 12~46 岁。取材部位:上肢 5 例,面部 3 例,躯干 5 例。入选标准为病程短且生长活跃的瘢痕疙瘩组织,未接受任何抑制瘢痕增生的治疗,均无系统性疾病史,且对所取组织均知情同意。

1.2 标本的制作 将手术切下的瘢痕疙瘩组织采用组织块贴

壁培养法进行体外培养。在无菌条件下切除表皮及皮下脂肪,将标本制成 1 mm³ 左右的组织块,置于培养瓶中,在 95% 空气、5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度条件下培养 8~12 h。然后加入含 15% 胎牛血清的达氏修正依氏培养基(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)适量,继续培养,3~4 d 换液 1 次。2~3 周后,原代细胞生长成单层,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,按 1:3 的比例传代培养。常规培养 KFB 24 h 后,吸去培养液和未贴壁细胞,更换含不同药物浓度的培养液,实验分为对照组和 MMC 干预组,正常对照组用 DMEM 培养液;MMC 干预组:MMC 的终末浓度分别为 2.50、12.50、50.00、100.00、200.00 μ g/L。

1.3 TGF- β_1 在 mRNA 水平的检测 将成纤维细胞按 10 cm²/mL 比例加入 Trizol,用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,经紫外分光光度计(日本岛津 UV2201 型)测定总 RNA 浓度和纯度,重复测定 3 次, A260 和 A280 之比值应在 118~210,计算样品总 RNA 浓度。引物序列为 TGF- β_1 cD-

NA 扩增的上游引物为 5'-CTG CTT CAG CTC CAC AGA GAA GA-3', 下游引物为 5'-AAG TTG GCG TGG TAG CCC TT-3', 产物片段长度为 111 bp。取 1 μ g 总 RNA, 加入 Oligo (dT)18 Primer, 70 $^{\circ}$ C 温育 5 min; 迅速放入冰浴中, 加入 10 mmol/L dNTP, RNA 酶抑制剂, 5 倍缓冲液, 42 $^{\circ}$ C 温育 5 min; 冰浴中加入 5 U/ μ L AMV 逆转录酶, 加入 DEPC 处理水至总体积 20 μ L, 42 $^{\circ}$ C 温育 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min, 立置冰上, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。将反应管置于 PCR 仪上, 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后, 进入 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 15 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 的循环, 共 34 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。反应完成后取 10 μ L PCR 反应液, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 PCR Marker 作相对分子质量标准。电泳完毕后在紫外荧光数字成像仪下观察结果。以每例 TGF- β_1 与 β -actin 扩增产物条带吸光度的比值作为 TGF- β_1 mRNA 的相对表达量。

1.4 Western Blot 检测 Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白 取对数生长期的 KFB, 以 5×10^5 /mL 接种于 25 mL 培养瓶内, CO₂ 孵箱内, 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 24 h, 更换含不同药物的培养液培养 24 h, 彻底去除上清液, 加入适量细胞裂解液并加入 PMSF (使 PMSF 终浓度为 0.174 mg/mL), 冰上作用 40 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 取上清液, 以考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。按 4 : 1 比例加入 $5 \times$ Loading Buffer, 封好 EP 管口, 置水浴箱中变性 5 min, 进行稳压电泳, 以 2 mA/cm² 恒流转膜, β -actin 4 $^{\circ}$ C 转膜 2 h, Smad2/3、Smad4、Smad7 4 $^{\circ}$ C 转膜 3 h。2.5% 封闭液配制抗体稀释液, Smad2/3、Smad4 及 Smad7 1 : 1 000 稀释, β -actin 1 : 1 000 稀释。将聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜置于杂交袋中, 加适量的抗体稀释液于 PVDF 膜上有蛋白的一面, 压紧四角。4 $^{\circ}$ C 孵育过

夜。TBST 液洗膜后, 加适量的抗体稀释液于 PVDF 膜上有蛋白的一面, 室温作用 2 h, TBST 液洗 PVDF 膜后, 暗室曝光, 10 s~3 min, 常规方法显影、定影, 直至显影出电泳带, 拍照的图像用灰度扫描软件 BandScan 4.5 进行扫描, 取得目的条带灰度值, 用该灰度值和内参 β -actin 灰度值相比, 用相对灰度值在 Excel 中作图分析。

1.5 统计学处理 应用 SPSS11.5 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差分析, 组间比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

不同浓度的 MMC 对 TGF- β_1 mRNA 表达, 对照组和 2.50、12.50、50.00、100.00、200.00 μ g/L 的 MMC 干预组的 TGF- β_1 mRNA 相对表达量分别为 0.88 ± 0.07 、 0.80 ± 0.06 、 0.51 ± 0.04 、 0.47 ± 0.05 、 0.36 ± 0.03 和 0.22 ± 0.02 。MMC 干预组 TGF- β_1 mRNA 相对表达量明显低于正常对照组, 见图 1~2。两组 Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白的表达见表 1。

表 1 两组 Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=13$)

组别	MMC 浓度 (g/L)	Smad2/3	Smad4	Smad7
对照组	—	0.11 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.04 ± 0.01
干预组	2.50	0.10 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.06 ± 0.02
	12.50	0.10 ± 0.02	0.36 ± 0.08	0.10 ± 0.03
	50.00	0.08 ± 0.02	0.33 ± 0.10	0.18 ± 0.08
	100.00	0.06 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.21 ± 0.10
	200.00	0.05 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.36 ± 0.17

—: 表示无数据。

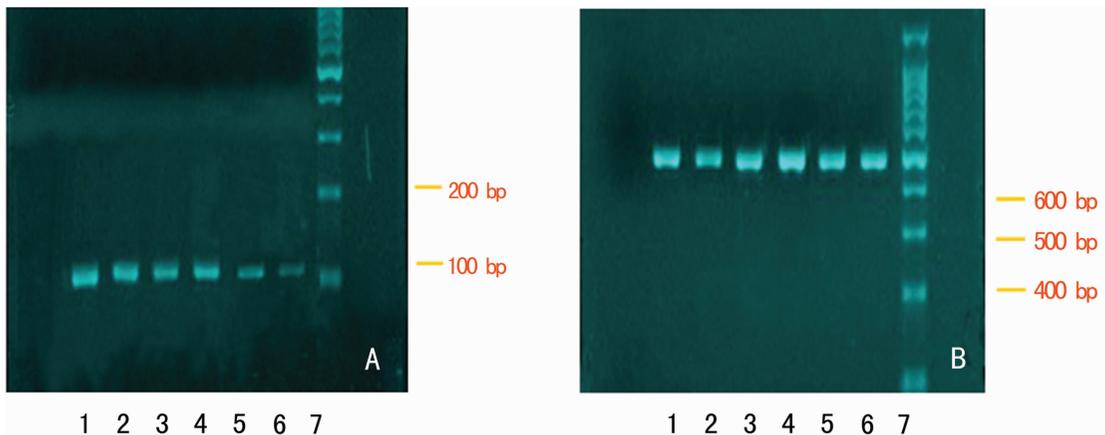


图 1 TGF- β_1 mRNA 对 KFB 的表达

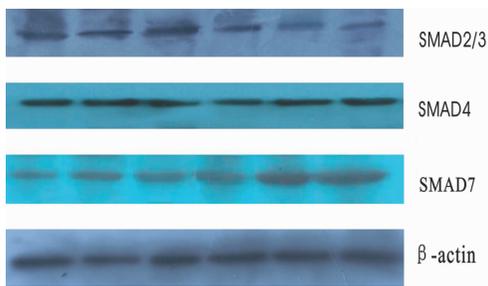


图 2 MMC 对 Smad2/3、Smad4、Smad7 β -actin 蛋白的表达

3 讨 论

MMC 是一种抗肿瘤药物, 还是一种强有力的抑制成纤维细胞增殖的药物。MMC 在耳鼻喉科、眼科、神经外科等领域中治疗组织粘连比较广泛, 但在治疗瘢痕增生的临床及基础研究较少。研究表明, MMC 对 KFB 增殖有抑制作用, 使细胞周期停滞于 G₁/S 期而实现^[2], 并有时间依从性, 同时与剂量密切相关^[3]。有研究表明, 手术切除瘢痕疙瘩后, 局部使用丝裂霉素取得了满意的临床效果^[4]。于冬梅等^[5]研究表明, MMC 对体外培养 KFB 增殖的抑制作用与药物浓度、处理时间有关。刘莺等^[6]通过 MTT 检测证实 100 μ g/L MMC 对 KFB 的增殖

抑制效果为最佳,为该药物临床应用提供了有力的实验依据。

TGF- β_1 是目前公认的与瘢痕疙瘩形成最为密切的细胞因子^[7]。TGF- β 家族成员对表皮细胞的生长、分化、凋亡及肿瘤形成具有调控作用^[8]。TGF- β 细胞表面受体主要分为 I、II、III 型。其中 TGF- β_1 直接刺激血管生成,刺激 FB 增殖及细胞中葡萄糖与氨基酸的转运和糖酵解的进行,同时也抑制基质金属蛋白酶活性和促进基质金属蛋白酶组织抑制剂纤溶酶原激活物抑制剂-1 基因的表达,进而抑制细胞外基质的降解;还介导血小板源性生长因子、结缔组织生长因子的致纤维化作用^[9];促进纤维粘连蛋白和胶原基质的黏附,促进瘢痕的形成。陈伟等^[10]研究发现,TGF- β_1 的存在会不断刺激 KFB 诱导基质产生,导致细胞基质的过度沉积。曹艳杰等^[11]研究发现,丹参涂膜剂可改善增生期瘢痕微循环局部缺氧状态,进而抑制瘢痕组织内细胞因子 TGF- β_1 的表达。本研究结果显示,干预组较对照组 TGF- β_1 mRNA 降低,随作用时间增加 TGF- β_1 mRNA 表达变化越为明显,在处理 72 h 后 TGF- β_1 mRNA 表达变化最为明显,不同浓度 MMC 作用下 TGF- β_1 mRNA 表达量差异有统计学意义。提示 MMC 可能通过减少 TGF- β_1 表达,从而起到抑制瘢痕增生的作用。

TGF- β 信号主要由 Smad 家族介导,其作为配体形成受体复合物,激活 Smad,转移到细胞核内与 TGF- β 诱导基因的特定序列直接结合,共同激活或抑制其调节的靶基因转录^[12]。Smad 家族作为细胞质内 TGF- β 下游的信号转导因子,在瘢痕疙瘩的发生、发展过程中起关键作用。根据结构和功能,Smad 蛋白分成 R-Smad、Co-Smad 和 I-Smad 3 个亚家族。受体激活型或通路特异性主要包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8。共同通路型主要是 Smad4,其不能与 TGF- β 受体相互作用,但它可以与磷酸化的 R-Smads 相互作用形成稳定的异源三聚体^[13-14]。抑制型包括 Smad6 和 Smad7,它们主要通过竞争性地与激活的 I 型受体结合抑制 R-Smads 的磷酸化作用,I-Smads 作为一种负反馈调节信号调节 TGF- β 的信号转导^[15]。TGF- β /Smad 信号通路是通过正、负反馈的调节通路自我调控的,一方面,Smad2/3 发挥正反馈调节作用;另一方面,Smad7 与激活的 TGF- β_1 型受体结合,阻止 R-Smad 磷酸化,阻断信号的传导。已有研究表明,5-氟尿嘧啶(5-FU)有可能提高抑制型 Smad(Smad6 和 Smad7)在胞质中的表达,使 Smad3 免受磷酸化,进而减少 Smad3、Smad4 杂络物的生成,最终阻碍信号进一步下传^[16]。积雪草甙对增生性瘢痕内 TGF- β_1 mRNA 有明显的抑制作用,能提高抑制型 Smad7 蛋白在胞质中的表达^[17]。

本研究显示,加入不同浓度的 MMC 能明显增加 KFB 中 Smad7 蛋白的表达,减弱 KFB 中 Smad2/3 蛋白的表达,并且对 KFB 中 Smad7 蛋白的增强效应强于对 Smad2/3 蛋白的减弱效应,对 Smad4 蛋白的表达无变化。这可能是由于 MMC 通过增加 Smad7 蛋白的表达,通过竞争性占据 TGF- β_1 型受体而抑制受体蛋白激酶对 R-Smad(Smad2/3)的磷酸化,抑制 TGF- β 的病理性作用,从而达到抑制瘢痕增生的作用。

MMC 依靠其强大的抑制成纤维细胞的功能广泛应用于临床,但目前对于其治疗不同类型瘢痕的方法、剂量以及不良反应还没有大样本的临床统计学资料。对于 TGF- β /Smad 信号通路作用研究获得了迅猛发展,但仍有大量问题有待于深入研究。

参考文献:

[1] Kelly AP. Medical and surgical therapies for keloids[J]. *Dermatol Ther*,2004,17(2):212-218.

- [2] Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration[J]. *Br J Dermatol*,2005,153(2):295-300.
- [3] 陈诗书,汤雪明. 医学细胞与分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2004:717-722.
- [4] Stewart CE, Kim JY. Application of mitomycin-C for head and neck keloids[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*,2006,135(6):946-950.
- [5] 于冬梅,郝立君,李颖,等. 丝裂霉素 C 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*,2007,12(8):900-905.
- [6] 刘莺,于冬梅,郝立君,等. 丝裂霉素 C 对瘢痕疙瘩成纤维细胞 Cyclin D1、CD K4 及 p27 基因表达的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*,2008,17(2):126-131.
- [7] Liu W, Wang DR, Cao YL. TGF- β : a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*,2004,4(1):123-136.
- [8] Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, et al. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment site[J]. *J Cell Biol*,1994,124(4):557-568.
- [9] Murata H, Zhou L, Ochoa S, et al. TGF-beta3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF-beta1-dependent and independent mechanisms[J]. *J Invest Dermatol*,1997,8(3):258-262.
- [10] 陈伟,付小兵,葛世丽,等. 增生性瘢痕形成和成熟过程中 TGF- β_1 、TGF- β_3 及其受体的基因表达变化[J]. *中华整形外科杂志*,2004,7(20):308-309.
- [11] 曹艳杰,王福波. 丹参涂膜剂对肥厚性瘢痕裸鼠模型血液流变学及细胞因子 TGF- β_1 、bFGF 的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,2010,28(6):135-137.
- [12] 郭永红,罗金燕. TGF- β 超家族与 Smad 信号转导研究进展[J]. *医学综述*,2005,11(8):685-688.
- [13] Heldin CH, Miyazono K, Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. *Nature*,1997,390(6659):465-471.
- [14] Shi Y, Hata A, Lo RS, et al. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4[J]. *Nature*,1997,388(6637):87-93.
- [15] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily[J]. *Science*,2002,296(5573):1646-1664.
- [16] Wendling J, Marchand A, Mauviel A, et al. 5-fluorouracil blocks transforming growth factor-beta-induced $\alpha 2$ type I collagen gene(COL1A2) expression in human fibroblasts via c-Jun NH2-terminal kinase/activator protein-1 activation[J]. *Mol Pharmacol*,2003,64(3):707-713.
- [17] Tateshita T, Ono I, Kaneko F, et al. Effect of collagen matrix containing transforming growth factor(TGF)-beta(I) on wound contraction[J]. *Dermatol Sci*,2001,27(2):104-113.