

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.36.016

A 型肉毒素预防人瘢痕成纤维细胞增生机制的初步研究*

郝荣涛,李宗超,陈兴,叶伟[△]
(重庆市中医院皮肤美容科 400021)

[摘要] **目的** 探究不同浓度 A 型肉毒素(BTX-A)对瘢痕成纤维细胞的影响,初步阐释 BTX-A 治疗瘢痕及预防术后瘢痕增生的相关分子作用机制。**方法** 选取人瘢痕成纤维细胞,以不同浓度的 BTX-A(0.01、0.10、1.00 U/L 及 10.00 U/L)作用 24 h 后,激光共聚焦显微镜观察细胞黏附及骨架变化,并采用 MTT 及流式技术检测其增殖、凋亡及周期变化,同时采用实时荧光定量 PCR(qPCR)及蛋白免疫印迹(Western blot)方法,探究 TGF- β 、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-2 及 MMP-9 基因及蛋白的表达变化。**结果** 随着 BTX-A 剂量的升高,其细胞黏附数量及骨架荧光强度逐渐减弱;细胞增殖能力减弱且主要阻断在细胞 G₀/G₁ 期;此外其凋亡也随着 BTX-A 剂量增大而逐渐增强。qPCR 及 Western blot 结果显示,随着 BTX-A 剂量增大,MMP-1 及 MMP-2 基因及蛋白均呈现高表达,而 TGF- β 及 MMP-9 呈现出低表达。**结论** BTX-A 通过阻断瘢痕细胞 G₀/G₁ 期抑制其增殖,同时提高 MMP-1 及 MMP-2 的表达来减轻瘢痕形成,对瘢痕的治疗起着积极的作用。

[关键词] 肉毒杆菌毒素,A 型;瘢痕细胞;成纤维细胞;分子机制

[中图分类号] R622

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)36-5086-04

A preliminary study on the mechanism of botulinum toxin type A in preventing the proliferation of keloid fibroblast cells*

Hao Rongtao, Li Zongchao, Chen Xing, Ye Wei[△]

(Department of Skin Cosmetology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Chongqing City, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of different concentrations of botulinum toxin type A on hypertrophic scar fibroblasts, and to explore the molecular mechanism of botulinum toxin type A in the treatment of scar and prevention of postoperative scar hyperplasia. **Methods** Different concentrations of botulinum toxin A(0.01, 0.1, 1 U/L and 10 U/L) were used on hypertrophic scar fibroblasts for 24 hours, to observe the changes of cell adhesion and cytoskeleton under laser confocal microscopy. MTT and flow cytometry were used to detect the proliferation, apoptosis and cycle of change, at the same time real time fluorescence quantitative PCR and Western blot were conducted to detect the expression of TGF- β , matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-2 and MMP-9 gene and protein expression changes. **Results** With the increase of botulinum toxin A dose, the number of cell adhesion and cytoskeletal fluorescence intensity decreased, cell proliferation ability decreased and mainly blocked at G₀-G₁ phase, and the apoptosis also increased with the dose increased. The results of qPCR and Western blot showed that MMP-1 and MMP-9 gene and protein were highly expressed with the increase of botulinum toxin A dose, while TGF- β and MMP-9 showed low expression. **Conclusion** Botulinum toxin A can inhibit the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts and inhibit the expression of MMP-1 and MMP-2, which can inhibit scar formation. It plays a positive role in the treatment of scar.

[Key words] botulinum toxin type A; keloid; fibroblast; molecular mechanism

瘢痕是当今国内外医学界一直未攻克的难题,由于其发病率及术后复发率高,对患者的身心健康影响较大,且尚无行之有效的治疗手段^[1-4]。当前注射治疗的药物主要为曲安奈德等激素,有效率高,但药物本身有较多的不良反应^[5-6]。而 A 型肉毒素(botulinum toxin type A, BTX-A)的安全性得到了大量临床研究的证实,不良反应较小,应用于手术切口能促进切口愈合,并且可以减轻伤口瘢痕或瘢痕增生的程度^[7];但 BTX-A 对瘢痕成纤维细胞具体的影响及其对瘢痕细胞调控的分子及其机制目前还尚不清楚。本实验通过不同浓度的 BTX-A 作用于瘢痕成纤维细胞,初步探究其影响及分子作用机制,为 BTX-A 在瘢痕防治领域的临床运用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 本研究选用的细胞为原代培养的人瘢痕成纤维细胞,培养血清为杭州四季青有限公司胎牛血清,DMEM 低糖培养基购自 Hyclone 公司。实验中采用的 BTX-A 购于兰

州生物制品研究所有限责任公司(国药准字 S10970037),四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂为美国 Sigam 公司产品,免疫荧光中细胞骨架抗体 Actin-tracker Green 为上海碧云天生物有限公司产品。引物由上海生物有限公司合成,PCR 采用的反转录及相关试剂盒均购于美国 Promega 公司。蛋白免疫印迹(Western blot)中需要的一抗及货号信息见表 1,细胞凋亡 Annexin V/碘化丙啶(PI)试剂盒、辣根过氧化物标记的山羊抗鼠及山羊抗兔二抗均购于武汉博士德生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将前期原代培养的瘢痕成纤维细胞复苏,并在含 10% 的胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 低糖培养基中孵箱 2~3 d 后传代,用于后续实验。

1.2.2 细胞增殖 取生长及形态良好的细胞,胰酶消化重悬后以每孔 1×10^5 /100 μ L 的密度接种到 96 孔板中,当细胞生

* 基金项目:重庆市卫计委医学科研项目(20142071)。 作者简介:郝荣涛(1982—),主治医师,硕士,主要从事瘢痕防治的临床及科研工作。 [△] 通信作者,E-mail:cqzyyyw@sina.com。

长到 50% 融合后去除培养基,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,加入提前配置好的含有不同浓度 BTX-A 的培养基,分别是 0、0.01、0.1、1.0 U/L 及 10 U/L,继续培养 24 h 后采用 MTT 检测细胞增殖。每组设置 6 个复孔,检测其 570 nm 吸光度(A)值。

表 1 一抗相关信息

抗体名称	货号	种属	稀释比例	分子量 (×10 ³)	厂家
MMP-1	sc-21731	鼠抗	1:500	52	美国 Santa Cruz
MMP-2	sc-13594	鼠抗	1:500	63	美国 Santa Cruz
MMP-9	sc-12759	鼠抗	1:500	92	美国 Santa Cruz
TGF-β	3711	兔抗	1:1000	45	美国 Cell Signaling Technology
GAPDH	MAB374	鼠抗	1:300	36	美国 Millipore

1.2.3 细胞形态变化观察 取生长及状态良好的瘢痕成纤维细胞消化重悬后接种于铺有无菌盖玻片的 24 孔板中,待细胞生长到 70% 融合后去除培养基,无菌 PBS 清洗后加入不同浓度梯度 BTX-A 的培养基。继续培养 24 h 后移去培养基,无菌 PBS 清洗,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.1% Triton-X 处理 10 min,加入正常山羊血清封闭 30 min,不洗加入稀释比例为 1:100 的 Actin-tracker Green,保湿暗盒放置 2 h,PBS 清洗,DAPI 染核 5 min,抗荧光猝灭剂封片,置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.4 细胞周期及凋亡检测 细胞培养及处理方法同前,细胞经过不同浓度的 BTX-A 处理后,4 °C 低温离心 5 min 收集细胞,预冷的 PBS 清洗细胞 3 次,继续离心,调整细胞浓度为 1×10⁵/mL。然后去除上清液,加入 70% 的乙醇固定 3 h,PBS 清洗后加入 RNase A,并在 37 °C 水浴 30 min,最后加入 400 μL 的碘化丙啶(PI)液混匀,避光 0.5 h 后上机检测周期变化。细胞在计数后,加入 500 μL 结合缓冲液用于凋亡检测,用 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI 保湿湿暗盒中孵育 5 min 后 400 目筛网过滤后上机检测,Winmdi 软件分析细胞凋亡率。

1.2.5 qPCR 检测相关基因表达 细胞经不同浓度 BTX-A 处理后采用 Trizol 试剂提取总 RNA,电泳鉴定 RNA,紫外分光光度计测定浓度,以 1 μg RNA 总量反转录合成 cDNA;在 PE5700 实时荧光定量 PCR 仪上进行实时定量扩增。反应体系 20 μL,qPCR Master Mix 10 μL,上、下游引物各 1.0 μL,cDNA 2.0 μL,ddH₂O 6 μL。反应条件:94 °C 5 min;93 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 20 s,40 个循环。每个实验重复 3 次,采用相对定量 2^{-ΔΔCt} 法比较各组细胞相关基因水平。引物序列见表 2。

1.2.6 Western blot 检测相关蛋白表达 细胞经不同浓度 BTX-A 处理后,用细胞裂解液提取细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测样品蛋白浓度,取 30~50 μg 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿转法转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 2~4 h,一抗于 4 °C 条件下过夜,二抗室温孵育 2 h。其后采用 ECL 显色试剂盒于凝胶成像仪中观察相关蛋白表达情况。最后采用 Image J 软件对 Western blot 条带进行分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad 7.0 软件进行分析处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行单因素方差分析,各组间比较采用 SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 引物序列

基因	方向	引物(5'-3')
MMP-1	正向	ATG GAA CAA GAC AAT ACA A
	反向	TAG ACA GTT CTT CAG GAA
MMP-2	正向	CTA ATC AGC ATT CTC ACT
	反向	AGT CAG CAT CTA TTC TTG
MMP-9	正向	TAT TCT GTT CTG GAG GAA
	反向	GGT TAG AGA ATC CAA GTT
TGF-β	正向	ATC ATC TCA GAC GAA TCA
	反向	CTC CTT CCT CCT CAT AG
GAPDH	正向	CTC TGG TAA AGT GGA TAT TGT
	反向	GGT GGA ATC ATA TTG GAA CA

2 结 果

2.1 BTX-A 影响细胞黏附及形态变化 与 BTX-A 相比, BTX-A 各处理组细胞形态发生明显变化。0 U/L 组细胞贴附较好,铺展较开,呈现出规律排列。随着 BTX-A 剂量的升高,细胞贴附面积逐渐变小且具有逐渐脱落的趋势,整体细胞形态相比 0 U/L 组细小。从各个视野细胞核的数量来看,随着 BTX-A 剂量的增加其细胞数量逐渐减少,见图 1。

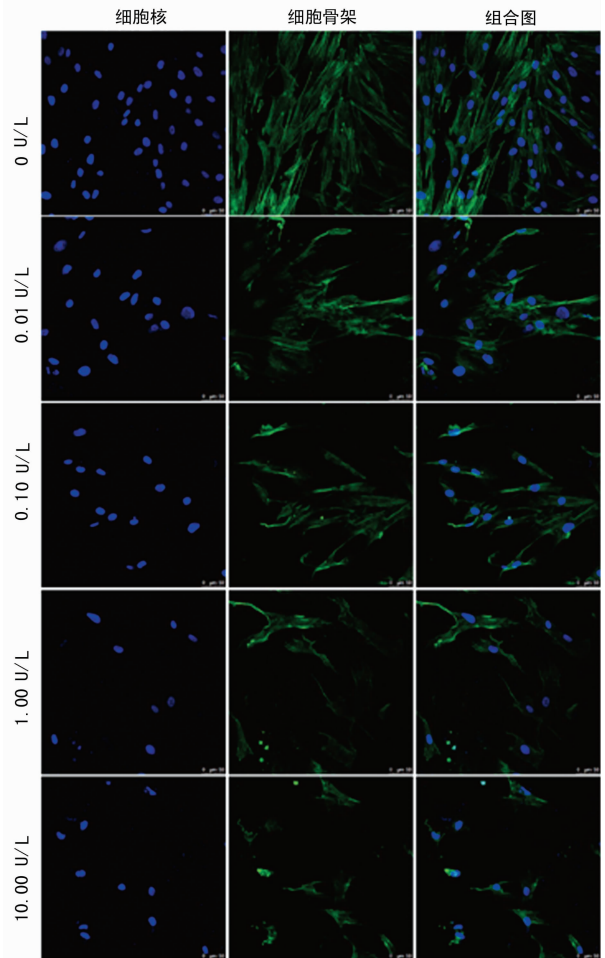
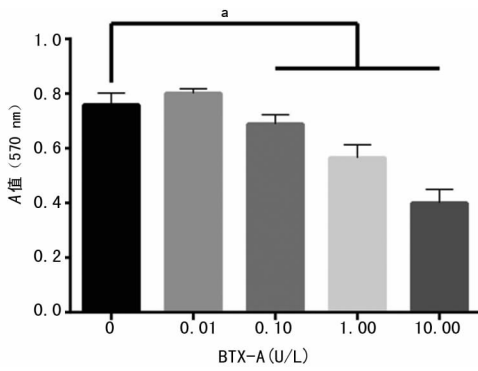


图 1 激光共聚焦显微镜观察不同浓度 BTX-A 作用瘢痕成纤维细胞后细胞骨架变化情况(×200)

2.2 细胞增殖变化情况 在不同浓度 BTX-A 处理后,细胞增殖具有较大变化。与 0 U/L 组比较 0.01 U/L 组细胞增殖能力具有轻微增加的趋势,但差异无统计学意义($P < 0.05$)。当浓度达到 0.10 U/L 时,细胞增殖明显降低,且随着 BTX-A 剂量的增加,增殖能力进一步降低,各组与 0 U/L 组比较差异有

统计学意义($P < 0.01$),见图 2。



$a: P < 0.01$

图 2 不同浓度 BTX-A 作用瘢痕成纤维细胞后细胞增殖能力变化情况

2.3 细胞周期变化及凋亡情况 与 0 U/L 组相比, BTX-A 各处理组细胞 G_0/G_1 期明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。BTX-A 各处理组细胞总凋亡率与 0 U/L 组比较增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但早期凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 3 各处理组细胞周期变化情况 ($\bar{x} \pm s, \%, n=8$)

BTX-A(U/L)	G_0/G_1	S	G_2/M
0	39.01±4.87	39.76±3.94	21.24±3.47
0.01	57.31±1.77 ^a	33.49±0.88 ^a	9.25±2.12
0.10	59.31±0.87 ^a	29.03±0.45 ^a	11.67±1.27
1.00	60.77±2.97 ^a	26.94±3.81 ^a	12.29±5.52
10.00	68.73±1.66 ^a	24.99±1.04 ^a	6.27±1.54

$a: P < 0.01$, 与 0 U/L 组比较

表 4 各处理组细胞凋亡变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

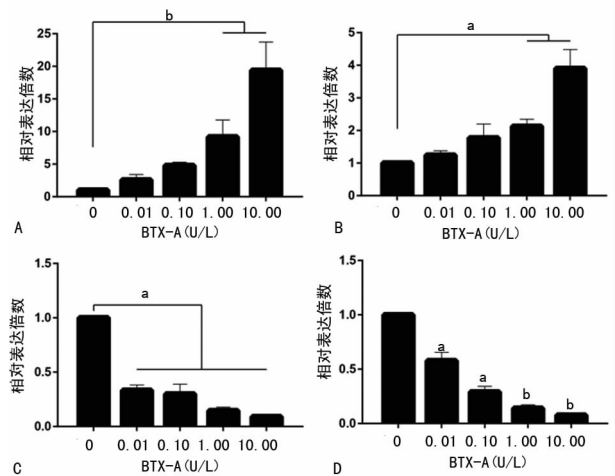
BTX-A(U/L)	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
0	3.59±0.35	4.69±0.30	8.28±0.59
0.01	7.70±0.18	5.90±0.30 ^a	13.60±0.40 ^a
0.10	8.13±0.06	6.68±0.32 ^a	14.81±0.34 ^a
1.00	6.82±0.56	9.56±0.57 ^a	16.39±0.89 ^a
10.00	5.36±0.36	11.98±0.30 ^a	17.35±0.60 ^a

$a: P < 0.01$, 与 0 U/L 组比较

2.4 基因表达变化情况 瘢痕细胞经 BTX-A 处理后, MMP-1 与 MMP-2 的表达逐渐升高。当 BTX-A 浓度达到 1.00 U/L 时, 与 0 U/L 组相差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而 TGF- β 及 MMP-9 的表达随着 BTX-A 浓度的增加而出现低表达的趋势, 且具有明显的剂量效应, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。

2.5 蛋白表达变化情况 BTX-A 各处理组 MMP-1 蛋白的表达与 0 U/L 组比较明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 但其余各浓度梯度组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MMP-2 蛋白的表达也呈现出高表达趋势, 与 0 U/L 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 此外, 1.00 U/L 组与 10.00 U/L 组表达量也明显较 0.01 U/L 及 0.10 U/L 高。BTX-A 各处理组 TGF- β 及 MMP-9 均有表达降低的趋势, 但 BTX-A 各处理组 MMP-9 表达与 0 U/L 组比较差异无统计学意义 ($P >$

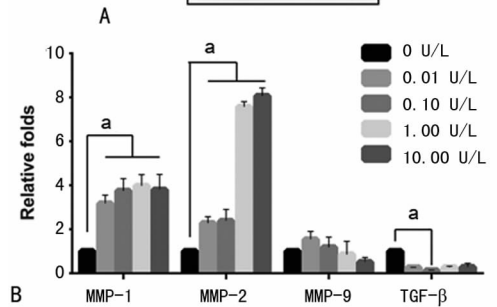
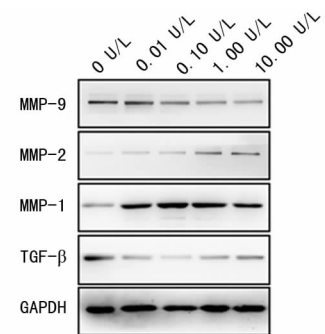
0.05), 然而 0.10 U/L 组 TGF- β 与 0 U/L 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4。



A: MMP-1; B: MMP-2; C: MMP-9; D: TGF- β ; $a: P < 0.05$; $b: P <$

0.01, 与 0 U/L 比较

图 3 不同浓度 BTX-A 作用瘢痕成纤维细胞后 MMP-1、MMP-2、MMP-9 及 TGF- β 基因表达



A: Western blot; B: 半定量分析结果; $a: P < 0.01$

图 4 不同浓度 BTX-A 作用瘢痕成纤维细胞后 MMP-1、MMP-2、MMP-9 及 TGF- β 蛋白表达变化

3 讨论

正常的创伤后瘢痕为平坦的、相对狭窄的线性瘢痕。当伤口过度修复, 发生增生性病变, 便发展为增生性瘢痕和瘢痕疙瘩^[8-9]。瘢痕疙瘩为皮肤损伤后, 结缔组织过度增生和透明变性而引起的良性皮肤肿瘤, 为机体异常愈合的一种形式, 有类似肿瘤无限增殖生长的方式^[10]。其表现为皮肤损伤后, 以胶原和大量细胞外基质的形成, 在局部过度沉积。其原因为瘢痕疙瘩中胶原酶的活性高于正常皮肤, 如 I 型胶原的合成增加, 使大量胶原沉积^[11]。目前还不能确定其精确的发病机制。本研究发现, 采用 BTX-A 作用于瘢痕成纤维细胞后细胞形态及黏附能力明显发生变化, 其增殖能力降低。这对预防瘢痕的过度增生有着积极的作用。

BTX-A 是肉毒梭状芽孢杆菌在繁殖过程中分泌的毒性蛋白质,为一种细胞外毒素,能特异性阻断乙酰胆碱释放,未稀释的原药具有很强的神经毒性^[12]。根据抗原性的不同,可将其分为 A、B、C、D、E、F、G 共 7 个亚型,而用于皮肤美容的为 BTX-A。其相对分子质量为 90×10^3 ,属于高分子蛋白质^[13]。现有研究表明,BTX-A 能抑制人增生性瘢痕成纤维细胞增殖和胶原蛋白的合成^[1]。应用于手术切口可降低局部张力,促进切口愈合,可以减轻伤口瘢痕或瘢痕增生的程度。在不影响创面愈合的时间和速度的情况下,可下调大鼠 TGF- β 的表达^[14],同时也能影响人瘢痕组织 TGF- β 的生成^[15]。在本研究中发现,BTX-A 作用瘢痕成纤维细胞后其细胞骨架牵张力明显变小,细胞骨架与对照组相比呈现出明显的收缩状。这也证实了 BTX-A 对瘢痕成纤维细胞牵张力的影响。同时本研究还发现,BTX-A 作用瘢痕细胞后,TGF- β 基因及蛋白的表达均明显下调。此外从 MMP-1、MMP-2 及 MMP-9 基因及蛋白的表达情况来看,前两者出现明显高表达,然而的表达下降。

MMPs 是一种锌依赖性的中性蛋白酶家族,便于细胞在基质中的迁移,参与组织重塑,对疙瘩形成过程中细胞外基质的合成及降解的调控有重要作用,维持细胞外基质的动态平衡,参与人体许多病理及生理过程^[16-17]。在瘢痕的形成过程中,MMPs 起着十分重要的作用,特别是 MMP-1、MMP-2 和 MMP-9 等,是影响胶原降解的主要因素^[18]。MMP-1 和 MMP-2 在瘢痕的形成过程中被成纤维细胞稳定表达,以降解除细胞外基质,便于细胞在基质中的迁移,参与组织重塑^[19-21]。本研究发现,瘢痕成纤维细胞在 BTX-A 作用下,MMP-1 与 MMP-2 明显高表达,然而 MMP-9 表达出现下调,推测 BTX-A 作用下瘢痕成纤维细胞通过降低 TGF- β 的表达,进一步促进 MMP-1 及 MMP-2 的表达来增强细胞外基质的降解,进而降低瘢痕成纤维细胞胶原过度沉积的问题,对瘢痕疙瘩等的预防起到积极的作用。

综上所述,BTX-A 通过降低瘢痕成纤维细胞细胞骨架牵张力,抑制 TGF- β 的表达,进一步促进 MMP-1 与 MMP-2 的表达增强瘢痕组织细胞胞外基质及组织的重塑,从而对瘢痕的预防及治疗起着积极的作用。但本研究仅对 MMPs 等分子进行了初步研究,TGF- β 是如何对 MMP-1 与 MMP-2 调控,以及是否还有其他分子参与该过程还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Al-attar A, Mess S, Thomhennes JM, et al. Keloid pathogenesis and treatment [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117(1):286-300.
- [2] He Y, Deng Z, Alghamdi M, et al. From genetics to epigenetics; new insights into keloid scarring [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(2):e12326.
- [3] Jumper N, Paus R, Bayat A. Functional histopathology of keloid disease [J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(9):1033-1057.
- [4] Seifert O, Mrowietz U. Keloid scarring: bench and bedside [J]. *Arch Dermatol Res*, 2009, 301(4):259-272.
- [5] Shaffer JJ, Taylor SC, Cook-bolden F. Keloidal scars: a review with a critical look at therapeutic options [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 46(2 Suppl):S63-97.
- [6] 马林泉, 鲍济洪, 陈斌. 瘢痕: 评估、防治、早期干预方法的研究与进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(20):3253-3257.
- [7] Sherris DA, Gassner HG. Botulinum toxin to minimize facial scarring [J]. *Facial Plast Surg*, 2002, 18(1):35-39.
- [8] Shih B, Bayat A. Genetics of keloid scarring [J]. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302(5):319-339.
- [9] Viera MH, Vivas AC, Berman B. Update on Keloid Management: Clinical and Basic Science Advances [J]. *Adv Wound Care*, 2012, 1(5):200-206.
- [10] Jones CD, Guiot L, Samy M, et al. The Use of Chemotherapeutics for the Treatment of Keloid Scars [J]. *Dermatol Reports*, 2015, 7(2):5880.
- [11] 付小兵, 程飏. 进一步重视病理性瘢痕发生机制的研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(1):1-5.
- [12] Carr LK. More data are needed to use BTX A as first-line treatment [J]. *Can Urol Assoc J*, 2011, 5(3):209.
- [13] Felber ES. Botulinum toxin in primary care medicine [J]. *J Am Osteopath Assoc*, 2006, 106(10):609-614.
- [14] 王琳, 邵正宁, 陈蕊, 等. A 型肉毒素对大鼠皮肤中神经肽 SP、CGRP 及创面组织表达 TGF- β 1 和 α -SMA 的影响 [J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2009, 5(4):202-204.
- [15] Kim S, Ahn M, Piao Y, et al. Effect of Botulinum Toxin Type A on TGF-beta/Smad Pathway Signaling: Implications for Silicone-Induced Capsule Formation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2016, 138(5):821e-829e.
- [16] Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, et al. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs) [J]. *J Cancer Ther Res*, 2016, 12(1):28-35.
- [17] Singh D, Srivastava SK, Chaudhuri TK, et al. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs) [J]. *Front Mol Biosci*, 2015, 2(1):19.
- [18] Lee WJ, Choi IK, Lee JH, et al. Relaxin-expressing adenovirus decreases collagen synthesis and up-regulates matrix metalloproteinase expression in keloid fibroblasts; in vitro experiments [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 130(3):407e-417e.
- [19] Kobayashi T, Kim H, Liu X, et al. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF-beta and stimulates fibroblast contraction of collagen gels [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(11):L1006-1015.
- [20] Lisboa RA, Lisboa FA, Castro SG, et al. Matrix metalloproteinase 2 activity decreases in human periodontal ligament fibroblast cultures submitted to simulated orthodontic force [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2009, 45(10):614-621.
- [21] Suganuma K, Nakajima H, Ohtsuki M, et al. Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts [J]. *J Dermatol Sci*, 2010, 58(2):136-142.