

程中起着关键性的作用。核心蛋白多糖是一种富含亮氨酸的小分子蛋白多糖,已有研究表明,在单层培养系统中核心蛋白多糖具有拮抗 TGF- β_1 刺激瘢痕成纤维细胞增殖的作用^[1]。但离开了与细胞外基质共同构成的三维立体结构,细胞在体外所表现出的生物学行为与体内存在较大差异。在皮肤组织内,核心蛋白多糖总是结合在胶原纤维表面^[2],为模拟体内核心蛋白多糖和 TGF- β_1 的相互接触方式,笔者采用成纤维细胞胶原网格(FPCL)体外三维培养模型,研究核心蛋白多糖在固相对 TGF- β_1 刺激瘢痕成纤维细胞作用的影响。

材料与方法

1. 成纤维细胞培养:取材于烧伤患者治愈后行整形手术切除的增生性瘢痕(患者知情同意),瘢痕增生的时间为伤后 3~6 个月。修除表皮和皮下组织,在少量胎牛血清(FCS,美国 Gibco 公司)中剪成 0.5~1.0 mm³ 的组织块贴附于培养瓶,加入含体积分数 20% FCS 的 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司),待细胞生长融合成片,再进行传代。实验用第 4~8 代细胞。

2. FPCL 的制备及实验分组:参照文献[3]制备 FPCL。采用醋酸法从清洁级雄性 SD 大鼠(中国医学科学院上海实验动物中心)尾腱中提取 I 型胶原,网格胶原终浓度为 1 g/L,加入经传代的细胞,调整其含量为 1×10^6 /ml。将胶原和细胞的混悬液按 2 ml/皿均匀加入直径 35 mm 的培养皿内,37 °C 培养 10 min,混悬液便形成凝胶即 FPCL,再加入相应的培养液。将 FPCL 分为 4 组,每组 6 个培养皿。(1) 对照组:FPCL 加入含体积分数 2% FCS 的 DMEM 7 ml;(2) 核心蛋白多糖组:重组人核心蛋白多糖(美国 R&D 公司,冻干粉剂,按说明书稀释至终浓度为 2 mg/L)混入 FPCL 中,加入含体积分数 2% FCS 的等量 DMEM;(3) TGF- β_1 组:FPCL 加入含体积分数 2% FCS 和 5 μ g/L TGF- β_1 的等量 DMEM;(4) TGF- β_1 + 核心蛋白多糖组:重组人核心蛋白多糖(终浓度为 2 mg/L)混入 FPCL 中,加入含体积分数 2% FCS 和 5 μ g/L TGF- β_1 的等量 DMEM。

3. FPCL 收缩率的测定:用坐标纸测量各组 FPCL 的直径,计算其面积。以开始培养即时的网格面积为起始面积,按照下列公式计算各组 FPCL 培养 12、24、48、72、96 h 的收缩率。收缩率 = (起始面积 - 测定面积) \div 起始面积 \times 100%。

4. FPCL 中瘢痕成纤维细胞 I 型纤溶酶原激活

物抑制因子 1(PAI-1)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白表达水平的检测:采用蛋白质印迹法检测。将各组 FPCL 培养 24 h,加入胶原酶 I(美国 Sigma 公司)消化 1 h,分离出细胞,加入胞质裂解液,冰上孵育 15 min,20 000 \times g 离心 15 min。取上清液,即为胞质蛋白,调整其浓度为 2 g/L,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,加样量为 20 μ l,电转移转印迹至硝酸纤维膜,10 g/L 封闭缓冲液封闭 1 h,采用小鼠抗人 PAI-1 单克隆抗体(1:100 稀释,英国 Novocastra 公司)、兔抗人 α -SMA 抗体(1:100 稀释,美国 Lab Vision 公司)作为一抗,二抗分别采用碱性磷酸酶偶联的羊抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG,稀释比例均为 1:500,硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸(NBT/BCIP)显色。用 Quantity One 4.4.0 版图像分析软件(德国 Zeiss 公司)进行分析,以相应蛋白条带的平均吸光度(A)值来表示 PAI-1、 α -SMA 的相对含量。

5. FPCL 中瘢痕成纤维细胞 PAI-1、 α -SMA 的 mRNA 表达水平的检测:(1) 总 RNA 提取:FPCL 培养 24 h,加入胶原酶 I 消化分离出细胞,用 Trizol 液裂解细胞,提取总 RNA。(2) 逆转录(RT)反应:反应条件为 70 °C 10 min、42 °C 15 min、95 °C 5 min、5 °C 5 min。(3) 聚合酶链反应(PCR)扩增:PAI-1 上游引物 5'-TGCTGGTGAATGCCCTCTACT-3',下游引物 5'-CGGTCATTCAGGTTCTCTA-3',扩增片段长度 400 bp; α -SMA 上游引物 5'-AGGAAGGACCTC-TATGCTAACAAAT-3',下游引物 5'-AACACATAGG-TAACGAGTCAGAGC-3',扩增片段长度 379 bp; β 肌动蛋白上游引物 5'-ACTTAGTTGCGTTACAC-CCTTTCT-3',下游引物 5'-TTCATACATCTCAAGTT-GGGGAC-3',扩增片段长度 493 bp。反应条件为 95 °C 预变性 5 min、95 °C 变性 1 min、55 °C 退火 60 s、72 °C 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。(4) PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)分析目的基因与 β 肌动蛋白 A 值的比值,以判断目的基因的相对表达量。

6. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理,采用单因素方差分析比较组间差异。

结 果

1. 各组 FPCL 培养至各时相点时,其收缩率的变化情况见表 1。

2. FPCL 中瘢痕成纤维细胞 PAI-1、 α -SMA 蛋白

表达水平的变化:核心蛋白多糖组 PAI-1、 α -SMA 蛋白表达水平(1 665 ± 139、1 603 ± 138)与对照组(1 764 ± 147、1 699 ± 146)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。TGF- β_1 组 PAI-1、 α -SMA 蛋白表达水平(3 482 ± 211、4 320 ± 272)显著高于对照组($P < 0.01$)。TGF- β_1 + 核心蛋白多糖组 PAI-1、 α -SMA 蛋白表达水平(1 996 ± 177、2 095 ± 172)显著低于 TGF- β_1 组($P < 0.05$),且与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组 FPCL 培养至各时相点收缩率的变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	皿数 (个)	培养时间(h)				
		12	24	48	72	96
对照组	6	31.5 ± 6.5	60.2 ± 5.3	67.6 ± 3.4	73.8 ± 3.4	77.4 ± 2.7
核心蛋白多糖组	6	20.2 ± 4.2*	46.2 ± 5.4*	59.2 ± 3.5*	63.6 ± 3.4*	66.7 ± 2.7*
TGF- β_1 组	6	44.0 ± 6.1*	67.6 ± 5.0*	76.1 ± 3.2*	83.4 ± 3.2*	86.3 ± 2.5*
TGF- β_1 + 核心蛋白多糖组	6	21.8 ± 4.0 Δ	50.0 ± 4.9 Δ	62.2 ± 3.2 Δ	67.2 ± 3.1 Δ	70.5 ± 2.5 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与 TGF- β_1 组比较, $\Delta P < 0.05$

3. FPCL 中瘢痕成纤维细胞 PAI-1 及 α -SMA 的 mRNA 表达水平的变化:RT-PCR 检测结果见图 1。核心蛋白多糖组 PAI-1、 α -SMA mRNA 的表达水平(0.25 ± 0.05、0.19 ± 0.07)与对照组(0.29 ± 0.06、0.21 ± 0.06)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。TGF- β_1 组二者的表达水平(0.89 ± 0.15、0.56 ± 0.11)显著高于对照组($P < 0.01$)。TGF- β_1 + 核心蛋白多糖组二者的表达水平(0.41 ± 0.09、0.33 ± 0.09)显著低于 TGF- β_1 组($P < 0.05$),且与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

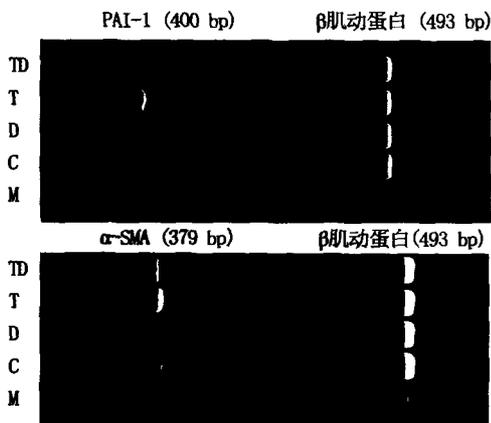


图 1 各组胶原网格中瘢痕成纤维细胞 PAI-1 和 α -SMA mRNA 表达水平的变化。M. marker; C. 对照组; D. 核心蛋白多糖组; T. TGF- β_1 组; TD. TGF- β_1 + 核心蛋白多糖组

讨 论

细胞外基质对细胞生物学行为有着重要的调节作用,将成纤维细胞置于细胞外基质三维结构中培养更接近人体组织内的成纤维细胞-细胞外基质功能合胞体(syncytium)。1979 年, Bell^[3] 研究设计出 FPCL, 从而实现对成纤维细胞进行三维立体培养。三维立体培养的细胞比单层培养细胞的生物学特征更加接近体内的状态。在皮肤组织内,核心蛋白多糖总是结合在胶原纤维表面。与胶原结合的核心蛋白多糖能与 TGF- β_1 相互作用^[4]。本研究采用 FPCL 体外三维培养模型,将重组人核心蛋白多糖和瘢痕成纤维细胞混入胶原凝胶中,在培养液中加入 TGF- β_1 , 这种固相研究更接近人体组织内的瘢痕成纤维细胞、与胶原结合的核心蛋白多糖、TGF- β_1 三者之间的相互接触方式。

培养于胶原凝胶中的成纤维细胞重塑基质形成致密的组织样结构,这一过程表现为凝胶收缩。FPCL 收缩过程中力的产生来源于细胞自身的运动和依赖于肌动蛋白细胞骨架^[5]。已有研究表明, TGF- β_1 直接作为促进剂和间接通过激活成纤维细胞分化为肌成纤维细胞促进 FPCL 收缩^[6]。Markmann 等^[7] 将 MG-63 骨肉瘤细胞转染入正义的或反义的核心蛋白多糖 cDNA 以造成核心蛋白多糖过表达或低表达,结果显示核心蛋白多糖过度表达与 TGF- β_1 介导的胶原凝胶收缩呈负相关。本研究结果表明, TGF- β_1 能明显促进增生性瘢痕 FPCL 收缩,将重组人核心蛋白多糖混入胶原凝胶中,能显著抑制 TGF- β_1 刺激 FPCL 收缩的作用。

Hausser 等^[8] 报道,在培养液中同时加入核心蛋白多糖(100 nmol/L)和 TGF- β_1 (200 pmol/L),虽然能够完全抑制 TGF- β_1 介导骨肉瘤细胞合成双糖链蛋白多糖(biglycan)的作用,但并不能抑制 TGF- β_1 收缩胶原凝胶的作用。这可能是由于: TGF- β_1 刺激细胞的其中一种方式是激活细胞自分泌生长因子,自分泌的 TGF- β_1 结合在胶原基质中,而不在培养液中。本研究将重组人核心蛋白多糖混入胶原凝胶,这样核心蛋白多糖存在于瘢痕成纤维细胞的微环境中,不仅可以结合外源性的 TGF- β_1 ,也能结合细胞自分泌的 TGF- β_1 。

在创面愈合过程中,参与创面修复的成纤维细胞中可见 α -SMA 的表达,因此被称为肌成纤维细胞,具有旺盛的合成、分泌活性和更强的收缩能力, TGF- β_1 能激活成纤维细胞分化成为肌成纤维细胞。

本研究结果显示, TGF- β_1 能显著增强胶原凝胶中瘢痕成纤维细胞 α -SMA 蛋白及其 mRNA 的表达; 将重组人核心蛋白多糖混入胶原凝胶中并加入 TGF- β_1 刺激, α -SMA 蛋白及其 mRNA 的表达水平并不增强, 这表明在体内核心蛋白多糖可抑制 TGF- β_1 刺激成纤维细胞大量表达 α -SMA 的作用。

PAI-1 是一种细胞外基质蛋白酶抑制因子, TGF- β_1 刺激后, 细胞的 PAI-1 蛋白及 mRNA 水平均升高, 从而促进组织中细胞外基质的过度沉积。本研究结果显示, TGF- β_1 能显著增强胶原凝胶中瘢痕成纤维细胞 PAI-1 蛋白及其 mRNA 的表达; 将重组人核心蛋白多糖混入胶原凝胶中, 加入 TGF- β_1 刺激, PAI-1 蛋白及其 mRNA 的表达并不增强, 提示在体内核心蛋白多糖可抑制 TGF- β_1 刺激成纤维细胞大量表达 PAI-1 的作用。

核心蛋白多糖在正常真皮中含量丰富, 而在早期增生性瘢痕组织中它的含量极低或无, TGF- β_1 含量却比正常值高^[9], TGF- β_1 被认为在增生性瘢痕形成过程中起着关键性的作用。本实验观察到重组人核心蛋白多糖混入胶原凝胶, 能显著抑制 TGF- β_1 对瘢痕成纤维细胞的刺激效应, 表明在体内核心蛋白多糖具有拮抗 TGF- β_1 的作用, 提示皮肤组织损伤后, 创面机械性缺少核心蛋白多糖, 允许 TGF- β_1 活性上调, 可能是瘢痕增生的一个重要因素。核心

蛋白多糖是一种天然蛋白质, 用于人体无不良反应, 选择合适的方法使其应用于局部创面, 或上调其基因表达(如基因转染), 或添加到组织工程皮肤支架中, 可能在增生性瘢痕的防治中有一定的应用前景。

参 考 文 献

- 1 胡大海, 陈壁, 曹茂开, 等. 重组融合饰胶蛋白拮抗转化生长因子 β_1 刺激增生性瘢痕成纤维细胞增殖的作用. 中华创伤杂志, 2001, 17: 330 - 333.
- 2 Keene DR, Antonio JD, Mayne R, et al. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. J Biol Chem, 2000, 275: 21801 - 21804.
- 3 Bell E. Production of a tissue-like structure by construction of collagen lattice by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76: 1274 - 1278.
- 4 Schonherr E, Broszat M, Brandan E, et al. Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF- β but does not compete for decorin binding to type I collagen. Arch Biochem Biophys, 1998, 335: 241 - 248.
- 5 Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, et al. Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. Biomaterials, 2001, 22: 2883 - 2891.
- 6 Grinnell F, Ho CH. Transforming growth factor beta stimulates fibroblast-collagen matrix contraction by different mechanisms in mechanically loaded and unloaded matrices. Exp Cell Res, 2002, 273: 248 - 255.
- 7 Markmann A, Hausser H, Schonherr E, et al. Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction. Matrix Biol, 2000, 19: 631 - 636.
- 8 Hausser H, Groning A, Hasilik A, et al. Selective inactivity of TGF-beta/ decorin complexes. FEBS Lett, 1994, 353: 243 - 245.
- 9 张志, 刘琰, 章雄, 等. 核心蛋白多糖及其 mRNA 在正常皮肤和增生性瘢痕组织中的表达. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 76 - 78.

(收稿日期: 2005 - 10 - 17)

(本文编辑: 赵敏)

· 消息 ·

第六届全国创伤学术会议暨创伤骨科新进展研讨会征文通知

中华医学会创伤学分会、《中华创伤杂志》编辑部主办、深圳市第二人民医院协办的第六届全国创伤学术会议暨创伤骨科新进展研讨会, 拟定于 2006 年 9 月 22 日—24 日在广东省深圳市召开。

征文内容: (1) 颅脑创伤救治; (2) 胸腹创伤救治及诊断; (3) 四肢及血管损伤; (4) 脊柱脊髓及骨盆损伤; (5) 多发伤救治; (6) 创伤评分进展; (7) 创伤基础研究。征文要求: (1) 未曾发表过的论文摘要 1 份 (500 字以内); (2) 撰写顺序为文题、作者单位及邮政编码、姓名、目的、方法、结果、结论; (3) 请寄打印稿并加盖公章, 同时附该软盘 (Word 格式) 或 Email 投稿。请自留底稿不退稿。信封上请注明“创伤会议”。

参加会议者, 将颁发国家级继续教育项目学分证书和中华医学会论文证书。拟参加青年优秀论文评选者 (45 岁以下), 除寄摘要外, 需附全文 1 份, 并另纸注明第一作者的年龄、职称及职务。符合本刊要求的获奖论文将优先发表。

截稿日期: 2006 年 7 月 20 日 (以当地邮戳为准), 逾期不予受理。来稿请寄: 重庆市渝中区大坪长江支路 10 号《中华创伤杂志》编辑部向勇主任收, 邮政编码: 400042。电话: 023 - 68757458, 68818654; 传真: 023 - 68818654; Email: zhcszz@163.com。广东省作者可寄深圳市第二人民医院急救中心创伤外科 (笋岗西路 3002 号) 张胜利收, 邮政编码: 518035。电话: 0755 - 83324595、13360519059; Email: zhangsl12001@yahoo.com.cn。

读者 · 作者 · 编者

关于收集本刊已发表论文获奖材料的通知

为了解本刊论文发表后的社会效益及其在医疗科研工作中的重要价值, 本刊常年统计所发表论文的科技成果获奖情况 (注: 论文发表在成果获奖之前)。希望各位作者大力协助, 为编辑部提供论文获国家、省、部级奖项证书 (包括新设备、新工艺等的专利证书或成果鉴定书) 的复印件。感谢支持!