

for the stimulation, the phosphorylation of PKC in NFb and SFb cells was evidently lower than that when 3 different concentrations of adrenaline was used alone for stimulation ($P < 0.01$). **Conclusion** Adrenaline can inhibit the proliferation of NFb and SFb by activating PKC through binding α adrenaline receptor.

【Key words】 Protein kinase C; Adrenaline; Phentolamine; Fibroblasts; Scar; Cell proliferation

病理性瘢痕包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩,两者形成的病理基础均是成纤维细胞(Fb)过度增殖。笔者在前期实验中观察到,一定浓度的肾上腺素能有效抑制增生性瘢痕成纤维细胞(SFb)和正常皮肤成纤维细胞(NFb)的增殖。为探讨其具体机制,笔者选用酚妥拉明(α 受体阻滞剂)与肾上腺素先后作用于NFb、SFb,并检测细胞蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的活性,希望能为临床应用激素类药物治疗瘢痕提供实验依据。

材 料 与 方 法

1. 主要试剂及仪器:DMEM培养液(美国Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶(德国Merk公司),噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司),二甲亚砜(DMSO,美国Amresco公司),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程公司),兔抗人PKC磷酸化多克隆抗体(美国Santa Cruz公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司),酚妥拉明(商品名:利其丁,奥地利Nycomed公司,批号:SA3200)。酶联免疫检测仪(DG3022A型,华东电子管厂),聚丙烯垂直电泳仪(DYY-III型,北京六一仪器厂),凝胶图像分析系统(Tanon Gis-1000型,上海天能科技有限公司)。

2. 细胞培养:取3例瘢痕患者(南华大学第一附属医院整形科)术中切除的增生性瘢痕组织以及植皮术后剩余的正常皮肤组织(患者知情同意),参照文献[1]分离、培养NFb、SFb。待细胞长成致密单层后,用2.5 g/L胰蛋白酶消化传代。

3. 细胞处理方法:实验选用第3~8代细胞。取对数生长期的SFb和NFb,经2.5 g/L胰蛋白酶消化后,接种于96孔(0.5×10^4 /孔)、24孔(1×10^5 /孔)培养板以及底面积25 cm²培养瓶(2×10^5 /瓶)中。48~72 h后更换为无血清DMEM培养液,加入酚妥拉明(终浓度分别为 0×10^{-6} 、 3×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$),于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中培养1 h后,加入肾上腺素(终浓度分别为0.00、0.05、0.10、0.20 $\mu\text{mol/L}$),每种处理方法3个复孔(瓶)。

4. 细胞存活实验:接种于96孔中的细胞经上述处理后,继续培养24 h。吸弃含药物的上清液,余下

步骤按MTT法²进行。用酶联免疫检测仪测定波长490 nm下的吸光度(A)值(即细胞增殖活力),调零孔所加试剂与各处理孔相同,但不含细胞。细胞存活率 = 各种浓度酚妥拉明、肾上腺素联用时的A值 \div 酚妥拉明 0×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 、肾上腺素 0.00 $\mu\text{mol/L}$ 刺激时(下称未刺激时)的A值 $\times 100\%$ 。

5. 药物毒性检测:接种于24孔培养板中的细胞经前述处理后(未单独应用0.05或0.10 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素处理),继续培养24 h。每孔取上清液50 μl ,按LDH试剂盒说明书于波长440 nm下测定A值。LDH活性(U/L) = (测定管A值 - 测定空白管A值) \div (标准管A值 - 标准空白管A值) \times 标准管浓度(2 $\mu\text{mol/L}$) $\times 1 \text{ L}$ \times 样本稀释倍数。

6. 蛋白印迹(Western blot)法检测NFb、SFb磷酸化PKC的表达水平:接种于培养瓶中的细胞经前述处理后,继续培养24 h。裂解细胞,提取总蛋白,测定其浓度后,调整各样本的蛋白浓度使之一致。配制120 g/L的分离胶和50 g/L的积层胶,每孔加入15 μg 蛋白样品,参照文献[3]检测细胞磷酸化PKC的表达水平。结果用凝胶图像分析系统扫描,测定感光区带的A值,并进行积分处理。

7. 统计学处理:部分数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 11.0统计软件进行方差齐性分析后,采用单因素方差分析或配对t检验、 χ^2 检验。

结 果

1. 细胞存活实验:与未刺激时比较,当单独用0.05、0.10、0.20 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素作用时,NFb、SFb的A值及存活率均明显下降($P < 0.01$)。 3×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 酚妥拉明单独作用或与0.05、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素联用后,未使NFb、SFb的A值及存活率发生明显改变($P > 0.05$);但与0.20 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素联用后,NFb、SFb两指标明显降低($P < 0.05$)。见表1。

2. 药物毒性检测:与未刺激时比较,0.20 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素单独作用或 3×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 酚妥拉明与4种剂量肾上腺素联用后,SFb、NFb培养上清液中LDH活性差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

3. 细胞磷酸化PKC表达水平:与未刺激时比较,

表 1 酚妥拉明与肾上腺素对 NFb、SFb 存活情况及培养上清液中 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab 1 Influence of adrenaline and phentolamine on the proliferation of NFb and SFb cells and LDH activity in the culture supernatant ($\bar{x} \pm s$)

细胞名称	刺激因素		孔数(个)	存活情况		LDH(U/L)
	酚妥拉明($\times 10^{-6}$ $\mu\text{mol/L}$)	肾上腺素($\mu\text{mol/L}$)		A 值	存活率(%)	
NFb	0	0.00	3	0.306 \pm 0.012	100.0	28.00 \pm 0.23
	0	0.05	3	0.184 \pm 0.004*	60.0*	—
	0	0.10	3	0.129 \pm 0.000*	42.0*	—
	0	0.20	3	0.039 \pm 0.011*	13.0*	27.00 \pm 0.54
	3	0.00	3	0.299 \pm 0.003	98.0	27.00 \pm 0.46
	3	0.05	3	0.359 \pm 0.000	100.0	26.80 \pm 0.65
	3	0.10	3	0.197 \pm 0.018	97.0	28.20 \pm 0.12
	3	0.20	3	0.240 \pm 0.000*	78.5*	29.10 \pm 0.09
	3	0.00	3	0.314 \pm 0.021	100.0	24.00 \pm 0.33
SFb	0	0.00	3	0.181 \pm 0.003*	57.7*	—
	0	0.10	3	0.114 \pm 0.017*	36.3*	—
	0	0.20	3	0.042 \pm 0.000*	13.3*	21.00 \pm 0.42
	3	0.00	3	0.314 \pm 0.016	100.0	25.60 \pm 0.19
	3	0.05	3	0.295 \pm 0.020	94.0	23.50 \pm 0.43
	3	0.10	3	0.262 \pm 0.000	83.5	23.90 \pm 0.48
	3	0.20	3	0.270 \pm 0.045*	87.0*	22.80 \pm 0.53

注：“—”表示未检测；与酚妥拉明 0×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ + 肾上腺素 $0.00 \mu\text{mol/L}$ 比较，* $P < 0.05$ ，# $P < 0.01$

单独用 0.05、0.10、0.20 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素作用后，NFb、SFb 磷酸化 PKC 表达均明显升高 ($P < 0.01$)；单独用 3×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 酚妥拉明作用，NFb 磷酸化 PKC 表达水平升高 ($P < 0.01$)，而 SFb 磷酸化 PKC 表达无明显变化 ($P > 0.05$)。0.05、0.10、0.20 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素与 3×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 酚妥拉明联用后，两种细胞磷酸化 PKC 表达水平较 3 种剂量肾上腺素单独作用时低 ($P < 0.01$)。见图 1~3。

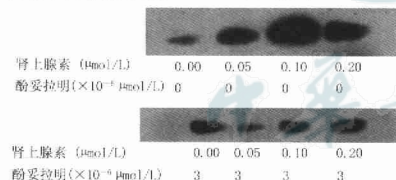


图 1 酚妥拉明及肾上腺素对 NFb 磷酸化 PKC 表达水平影响的 Western blot 检测结果

Fig 1 Influence of adrenaline and phentolamine on the expression of phosph-PKC in NFb cells

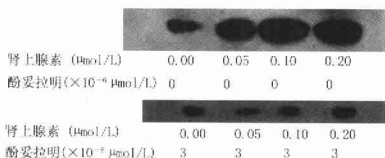
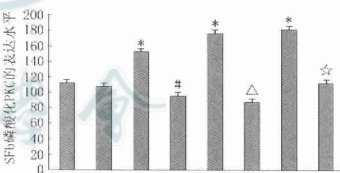
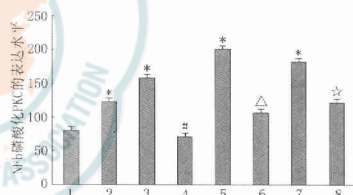


图 2 酚妥拉明及肾上腺素对 SFb 磷酸化 PKC 表达水平影响的 Western blot 检测结果

Fig 2 Influence of adrenaline and phentolamine on the expression of phosph-PKC in SFb cells



注：图中数据均为积分 4 值；1 为用 0×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 酚妥拉明 + $0.00 \mu\text{mol/L}$ 肾上腺素刺激；2、4、6、8 分别指用 3×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 酚妥拉明 + 0.00 、 0.05 、 0.10 、 $0.20 \mu\text{mol/L}$ 肾上腺素刺激；3、5、7 分别指单独用 0.05 、 0.10 、 $0.20 \mu\text{mol/L}$ 肾上腺素刺激；与 1 比较，* $P < 0.01$ ；4 与 3 比较，# $P < 0.01$ ；6 与 5 比较， Δ $P < 0.01$ ；8 与 7 比较， \star $P < 0.01$

图 3 酚妥拉明及肾上腺素对 SFb、NFb 磷酸化 PKC 表达水平影响的半定量分析结果

Fig 3 Semiquantitative analysis of adrenaline and phentolamine on the expression of phosph-PKC in SFb and NFb cells

讨 论

组织损伤引发了创伤修复过程，在这一过程中，Fb 及其所释放的细胞因子和生长因子通过诱导细胞外基质合成，在瘢痕形成过程中扮演着十分重要

