

三羟基异黄酮对增生性瘢痕成纤维细胞受体酪氨酸蛋白激酶-丝裂原活化蛋白激酶信号通路的影响



曹川 李世荣 戴霞 陈艳清 冯智 覃霞 赵云 吴军

【摘要】 目的 了解 5,7,4'-三羟基异黄酮(genistein)对增生性瘢痕成纤维细胞(HSFb)内受体酪氨酸蛋白激酶-丝裂原活化蛋白激酶(TPK-MAPK)信号转导通路的影响,探讨 genistein 抑制瘢痕增生的分子机制。方法 体外分离培养 HSFb,以不同浓度 genistein(25、50、100 μmol/L)处理细胞,再加入 10 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)刺激,用[γ-³²P]腺苷三磷酸底物掺入法检测细胞 TPK 活性;用蛋白质印迹法检测 TPK-MAPK 通路中主要信号蛋白分子 c-Raf、丝裂原活化蛋白激酶(MEK)、细胞外信号调节激酶(ERK)、p38 MAPK、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)磷酸化蛋白的表达变化。以二甲亚砜溶剂处理的 HSFb 为对照组。结果 25、50、100 μmol/L genistein 作用后,HSFb 内 TPK 活性分别为(7.15 ± 0.35)、(5.62 ± 0.88)、(3.17 ± 0.94) × 10⁵ pmol · min⁻¹ · mg⁻¹,与对照组(8.92 ± 0.28) × 10⁵ pmol · min⁻¹ · mg⁻¹比较,差异有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01);细胞内磷酸化 c-Raf、MEK1/2、ERK1/2、p38 蛋白的含量均有不同程度降低,与对照组比较,差异有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01)。genistein 各剂量组磷酸化 JNK 蛋白含量与对照组近似。在 genistein 预处理前提下,加入 bFGF 刺激的细胞内 TPK 活性及各信号蛋白的表达亦呈下降趋势。结论 genistein 可通过抑制细胞受体 TPK 信号转导途径影响 HSFb 的增殖与活化,主要信号通路可能为 TPK → Raf → MEK → ERK/p38 途径。

【关键词】 异黄酮类; 瘢痕; 蛋白质酪氨酸激酶; 成纤维细胞; 信号转导

The effects of genistein on tyrosine protein kinase-mitogen activated protein kinase signal transduction pathway in hypertrophic scar fibroblasts CAO Chuan, LI Shi-rong, DAI Xia, CHEN Yan-qing, FENG Zhi, QIN Xia, ZHAO Yun, WU Jun. Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China.

Corresponding author: LI Shi-rong, Email: zhengxing@vip.163.com, Tel: 023-68765851; WU Jun, Email: junwupro@126.com, Tel: 023-68752688

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effects of genistein on tyrosine protein kinase (TPK)-mitogen activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway in hypertrophic scar fibroblasts (HSFb), in order to explore the molecular mechanism of inhibition of scar hyperplasia by genistein. Methods HSFbs were isolated from human hypertrophic scar tissues and cultured in vitro. The cells were treated by genistein in different concentrations (25, 50, 100 μmol/L, respectively), followed by basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulation. The activity of TPK was assessed with [γ-³²P]ATP substrate incorporation. The phosphorylation protein expression levels of main signal molecules in TPK-Ras-MAPK pathway including c-Raf, MEK1/2, extracellular signal regulated kinase (ERK), p38MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) were determined by Western blot. HSFbs treated with dimethylsulfoxid (DMSO) were used as control group. Results After being treated with genistein in concentration of 25, 50, 100 μmol/L, the activity of TPK in HSFbs was depressed significantly [(7.15 ± 0.35) × 10⁵, (5.62 ± 0.88) × 10⁵, (5.62 ± 0.88) × 10⁵ pmol · min⁻¹ · mg⁻¹, respectively] when compared with that in control group [(8.92 ± 0.28) × 10⁵ pmol · min⁻¹ · mg⁻¹, P < 0.05]. Compared with those in control group, the phosphorylation protein expression levels of c-Raf, MEK1/2, ERK1/2 and p38 MAPK were lowered in different degree (P < 0.05 or P < 0.01) after genistein treatment. The phospho-JNK levels after treatment with genistein were similar to that of control group. Under the condition of pretreatment with genistein, the activities of TPK and signal pathway protein expressions in HSFb showed a downward trend after stimulation with bFGF. Conclusion

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院整形美容科(曹川、李世荣、戴霞、陈艳清、冯智、覃霞),全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(赵云、吴军)

通讯作者:李世荣,Email:zhengxing@vip.163.com,电话:023-68765851;吴军,Email:junwupro@126.com,电话:023-68752688

Genistein can effect the proliferation and activation of HSFb by inhibiting the phosphorylation of receptor of TPK signal transduction pathway (TPK→Raf→MEK→ERK/p38).

[Key words] Isoflavones; Cicatrix; Protein tyrosine kinase; Fibroblast; Signal transducing

生长因子与细胞表面受体结合后,其受体胞内区的酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPK)活化,激活细胞内信号转导途径,引起细胞增殖等多种效应。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activator protein kinase, MAPK)信号转导途径是生长因子受体 TPK 作用的主要信号通路,是调控细胞生长发育最重要的信号之一。增生性瘢痕组织中 TPK 及 MAPK 的活性异常,可能是瘢痕形成的重要机制之一^[1-2]。5,7,4'-三羟基异黄酮(genistein)是公认的特异性 TPK 抑制剂,能影响细胞 MAPK 信号转导通路^[3-4]。研究表明,genistein 对增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast, HSFb)的增殖与胶原合成具有抑制作用^[5]。本研究拟观察 genistein 在 HSFb 中对 TPK-MAPK 信号通路各主要蛋白活化的影响,进一步阐明 genistein 抗纤维化作用的分子机制。

1 对象与方法

1.1 主要试剂来源

genistein 购自美国 Sigma 公司,DMEM 细胞培养液、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司,TPK 活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 腺苷三磷酸(ATP)购自北京亚辉生物制品公司,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自美国 Gibco 公司,兔抗人磷酸化 c-Raf[丝氨酸(Ser)338]抗体、兔抗人磷酸化丝裂原激活蛋白激酶激酶(MEK)1/2(Ser217/221)抗体、兔抗人磷酸化细胞外信号调节激酶(ERK)1/2[苏氨酸(Thr)202/酪氨酸(Tyr)204]抗体、兔抗人磷酸化 p38(Thr180/Thr182)抗体和兔抗人磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(JNK, Thr183/Tyr185)抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司。

1.2 主要设备来源

YJ-875 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),RKJ 型二氧化碳培养箱(日本池本理化株式会社),Mini-Protean 型垂直电泳槽、Gel-Doc 2000 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),LS 6500 型液体闪烁测量仪(美国 Beckman 公司)。

1.3 标本来源

取自本院整形美容科增生性瘢痕患者手术切除标本,瘢痕形成时间为深度烧伤创面愈合后 6~12 个月。共 8 例,其中男 5 例、女 3 例,年龄 10~37

岁,本人均知情同意。手术前瘢痕外观充血发红、质硬,高出皮肤表面 1 cm 以上,处于增生活跃期。所有标本均留样送检,经组织病理学确诊。

1.4 细胞培养与分组

参照文献[5]采用组织块法行 HSFb 分离培养,取第 3~5 代对数生长期细胞。用无血清 DMEM 液培养 24 h 后进行分组,每组 8 个样本。在 HSFb 中分别加入不同浓度的 genistein(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)作用 30 min,对照组只加入等体积的二甲亚砷溶剂。之后在每组细胞培养液中加入 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF,作用 15 min 进行检测。另外设组仅在 HSFb 中加入 bFGF 进行对照观察。

1.5 检测指标

1.5.1 细胞 TPK 活性 采用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 底物掺入法,按照试剂盒说明书进行操作。反应完毕后,将 12.5 μL 混合液滴加到 SAM²TM 膜,分别置于液闪瓶,加闪烁液 2 mL 后进行检测,计算 TPK 相对活性。TPK 相对活性是指使 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 掺入外源性底物 poly-(Glu Tyr)的磷放射活性,以每毫克蛋白每分钟转移³²P 的 pmol 数($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)表示。

1.5.2 细胞信号分子磷酸化蛋白表达 采用蛋白质印迹法进行检测,按试剂盒说明书分别加入一抗及异硫氰酸荧光素-IgG 二抗进行反应,内参照为 β 肌动蛋白,用荧光成像分析系统采集蛋白电泳条带,通过 Quantity One 分析软件计算得到蛋白表达指数(EI)。EI = 目的蛋白条带面积 \times 灰度 \div 内参照蛋白条带面积 \times 灰度。将对照组各检测数据结果定为 1.00 后进行蛋白相对表达量比较。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。两两比较行 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

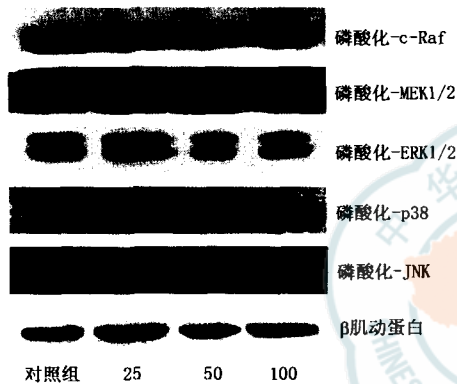
2.1 genistein 对 HSFb 中 TPK 活性的影响

与对照组(8.92 ± 0.28) $\times 10^5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 比较,25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组细胞内 TPK 活性分别为(7.15 ± 0.35)、(5.62 ± 0.88)、(3.17 ± 0.94) $\times 10^5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。加入 bFGF 后与对照

组 $(13.2 \pm 0.6) \times 10^5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 比较, 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ genistein 各组的实验结果分别为 (12.2 ± 0.7) 、 (8.4 ± 0.5) 、 $(5.2 \pm 0.3) \times 10^5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 后 2 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 genistein 对 Raf-MAPK 信号通路的影响

与对照组比较, 经 genistein 处理后, 细胞内磷酸化 c-Raf、MEK1/2、ERK1/2 及 p38 蛋白含量均有所下降, 其中 50、100 $\mu\text{mol/L}$ genistein 作用后, c-Raf、MEK1/2 和 ERK1/2 磷酸化蛋白的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组 genistein 均不能减少磷酸化 JNK 蛋白的表达, 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1, 表 1。



不同剂量 5,7,4'-三羟基黄酮作用 ($\mu\text{mol/L}$)

图 1 增生性瘢痕成纤维细胞各信号蛋白表达结果。

MEK 为丝裂原激活蛋白激酶激酶, ERK 为细胞外信号调节激酶, JNK 为 c-Jun 氨基末端激酶

2.3 genistein 对 bFGF 活化 Raf-MAPK 信号通路的抑制作用

bFGF 刺激后可提高细胞内各磷酸化蛋白的含量。genistein 预先处理后, HSFb 中 c-Raf、MEK1/2、

ERK1/2 及 p38 磷酸化蛋白含量均有降低, 与 bFGF 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 磷酸化 ERK1/2 蛋白含量甚至低于对照组 (EI 为 0.87)。genistein 预处理对 bFGF 活化 JNK 蛋白没有显著的抑制作用 ($P > 0.05$)。见图 2, 表 2。

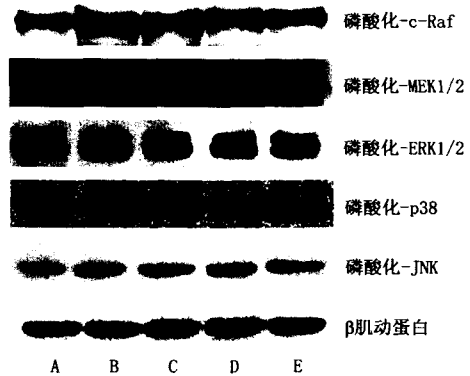


图 2 5,7,4'-三羟基黄酮 (genistein) 与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 共同作用于增生性瘢痕成纤维细胞后各信号蛋白表达结果。MEK 为丝裂原激活蛋白激酶, ERK 为细胞外信号调节激酶, JNK 为 c-Jun 氨基末端激酶; A. 对照组, B. bFGF 组, C. bFGF + 25 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组, D. bFGF + 50 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组, E. bFGF + 100 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组

3 讨论

信号转导是保持细胞相互联系、传递生物信息、调节生命功能的关键因素, 许多疾病的发生都与细胞信号的异常有关。生长因子是细胞生长发育的重要调节因素, 能与细胞表面的受体结合, 进而激活细胞内相应的信号蛋白, 使下游信号分子再发生磷酸化

表 1 不同剂量 genistein 作用后磷酸化 Raf-MAPK 信号蛋白的表达 (EI, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	c-Raf	MEK1/2	ERK1/2	p38	JNK
对照组	40	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
25 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组	40	0.83 \pm 0.11 ^a	0.87 \pm 0.12	0.79 \pm 0.16 ^a	0.91 \pm 0.13	1.19 \pm 0.16
50 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组	40	0.55 \pm 0.05 ^b	0.64 \pm 0.05 ^b	0.41 \pm 0.07 ^b	0.70 \pm 0.15 ^a	0.91 \pm 0.07
100 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组	40	0.24 \pm 0.07 ^b	0.58 \pm 0.11 ^b	0.62 \pm 0.12 ^b	0.44 \pm 0.09 ^b	0.89 \pm 0.22

注: genistein 为 5,7,4'-三羟基黄酮, MEK 为丝裂原激活蛋白激酶激酶, JNK 为 c-Jun 氨基末端激酶, MAPK 为丝裂原活化蛋白激酶; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

表 2 genistein 对 bFGF 活化 Raf-MAPK 信号的影响 (EI, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	c-Raf	MEK1/2	ERK1/2	p38	JNK
对照组	40	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
bFGF 组	40	2.55 \pm 0.17	1.91 \pm 0.23	3.11 \pm 0.21	2.17 \pm 0.22	1.48 \pm 0.11
bFGF + 25 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组	40	1.98 \pm 0.25 ^b	1.65 \pm 0.19 ^b	1.80 \pm 0.15 ^c	1.93 \pm 0.18	1.36 \pm 0.24
bFGF + 50 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组	40	1.53 \pm 0.12 ^c	1.26 \pm 0.12 ^c	1.44 \pm 0.17 ^c	1.36 \pm 0.08 ^c	1.29 \pm 0.17
bFGF + 100 $\mu\text{mol/L}$ genistein 组	40	1.17 \pm 0.09 ^c	0.92 \pm 0.09 ^c	0.87 \pm 0.16 ^{ac}	1.03 \pm 0.15 ^c	1.51 \pm 0.13

注: genistein 为 5,7,4'-三羟基黄酮, MEK 为丝裂原激活蛋白激酶激酶, JNK 为 c-Jun 氨基末端激酶, MAPK 为丝裂原活化蛋白激酶; 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 浓度为 10 $\mu\text{g/L}$; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 bFGF 组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

激活,通过这种途径将信息传递到细胞核内调控基因表达,从而产生相应的生物学效应。TPK 是转导中最最重要的信号酶,对细胞的增殖分化及功能具有调控作用。受体依赖型 TPK 即具有酶活性的细胞膜受体,是细胞内段跨膜结构的酶蛋白,胞外区可与生长因子配体结合,激活胞内段的酶活性区启动信号转导,包括大多数细胞生长因子受体如表皮生长因子(EGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、bFGF、胰岛素样生长因子(IGF)等。

对受体依赖型 TPK 信号转导研究最深入的是 MAPK 途径,这也是与细胞增殖分化关系最为密切、影响作用最大的信号转导途径^[6]。目前认为,该转导系统包括受体型 TPK、衔接蛋白、鸟苷酸释放因子(SOS)、Ras 以及 MAPK 级联反应体系。多种外在因素的刺激如生长因子等作用可激活 TPK 信号,活化的 TPK 激活衔接蛋白 Grb2、Shc 和 SOS 再激活 Ras,进一步激活 Raf 蛋白。Raf 具有 Ser/Thr 蛋白激酶活性,可继续激活下游的 MEK1/2,后者再磷酸化 ERK1/2,同时影响到 JNK1、2、3 和 p38 α 、 β 、 γ 信号通路,最终通过对转录调节因子表达的影响而将细胞增殖信号传递到细胞核内。各信号作用不同,既相互独立又密切联系。

TPK 活性异常和调节紊乱以及 Ras-MAPK 信号通路失调,是许多增殖性疾病和肿瘤发生的重要原因^[7]。研究证实,多种生长因子在瘢痕增生和形成的过程中发挥重要作用^[8-10],而 TPK 是这些细胞因子信号转导共同的结构与功能基础。病理性瘢痕组织内表皮生长因子受体(EGFR)高于正常皮肤,磷酸化酪氨酸蛋白表达增强,其原因可能是损伤后修复细胞的细胞膜上过量表达的 EGFR 与配体结合,激活细胞质内的 TPK,进而通过细胞信号途径对修复活动产生影响,病理性瘢痕的形成可能是这种信号失衡造成的结局^[11]。genistein 是一种脂溶性小分子,可自由进出细胞,与细胞内多种 TPK 作用,竞争性抑制 ATP 结合到 TPK 的催化活性区域,通过抑制受体依赖型 TPK 阻断 EGF、PDGF、FGF、IGF 等生长因子的信号传递,从而调节和影响细胞的生长与分化。

尽管已知瘢痕的发生与 TPK 活性异常有关,genistein 对 TPK 又具有特异性的抑制作用,但 genistein 是否通过抑制该信号通路,产生对瘢痕的负调节以及具体信号作用过程,还需加以了解和证实。本实验结果提示,不同浓度 genistein 作用于 HSFb 30 min 后,细胞内 TPK 活性下降,磷酸化 Raf、MEK、ERK、p38 蛋白含量均有不同程度降低,大部

分与对照组相比具有明显差异。其中以 c-Raf、ERK 的抑制作用最为明显,在加入 bFGF 刺激后仍表现为抑制效应,说明 genistein 对生长因子活化 HSFb 的 TPK 信号途径有拮抗作用,但对 JNK 蛋白的磷酸化效应抑制作用不明显。分析原因,可能为 genistein 作用到 HSFb 受体 TPK 后,通过 Ras、Raf 和 MEK 到达 MAPK 水平,再通过影响磷酸化 ERK 分子的核转位效应产生对细胞增殖与活性的抑制,并通过信号间的交叉作用,对 p38 蛋白产生影响,使这条通路同样受到抑制。

研究结果提示,genistein 作用 HSFb 抑制 TPK 活性后,一方面可能通过 ERK 抑制细胞的生长与增殖,另一方面又通过抑制 p38 活性减少转化生长因子 β 1 等生物活性蛋白的生成,影响细胞功能。几条通路互相联系、互相作用,共同发挥药物对细胞的抑制效应。

参考文献

- [1] 程颺,付小兵,盛志勇. 胎儿无瘢痕愈合与受体酪氨酸激酶. 中华整形外科杂志,2003,19(4):300-302.
- [2] 陈伟,付小兵,孙同柱,等. 增生性瘢痕中磷酸化丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达的变化. 解放军医学杂志,2004,29(2):147-158.
- [3] Seki M, Toi M, Kobayashi K, et al. Differential behavior of VEGF receptor expression and response to TNP-470 in two immortalized human endothelial cell lines. *Int J Oncol*, 2000, 17(3): 525-533.
- [4] 余小平,糜漫天,朱俊东. MAPK 在三羟异黄酮抑制静脉内皮细胞中作用. *中国公共卫生*, 2004, 20(11): 1296-1298.
- [5] 曹川,李世荣,陈艳清,等. 三羟基异黄酮对增生性瘢痕成纤维细胞增殖与胶原合成作用的影响. *中国美容整形外科杂志*, 2007, 18(3): 220-222.
- [6] 邢雁霞,刘斌钰. 受体型 TPK-Ras-MAPK 信号转导途径研究进展. *大同医学专科学校学报*, 2006, 26(1): 42-43.
- [7] Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, et al. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther*, 2002, 93(2): 79-98.
- [8] Ono I, Gunji H, Zhang JZ, et al. A study of cytokines in burn blister fluid related to wound healing. *Burns*, 1995, 21(5): 352-355.
- [9] Kossi J, Peltonen J, Uotila P, et al. Differential effects of hexoses and sucrose, and platelet-derived growth factor isoforms on cyclooxygenase-1 and -2 mRNA expression in keloid, hypertrophic scar and granulation tissue fibroblasts. *Arch Dermatol Res*, 2001, 293(3): 126-132.
- [10] Frank L, Lebreton DC, Godeau G, et al. Dextran derivatives modulate collagen matrix organization in dermal equivalent. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2006, 17(5): 499-517.
- [11] 程颺,付小兵,盛志勇,等. 增生性瘢痕与正常皮肤内的磷酸化酪氨酸蛋白及表皮生长因子受体的变化及意义. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(3): 283-284.

(收稿日期:2007-07-26)

(本文编辑:王旭)