

# 重组人转化生长因子 $\beta 3$ 对成纤维细胞作用的观察

吕洛 陈玉林 章庆国

**【摘要】目的** 观察重组人转化生长因子  $\beta 3$  (recombine human transforming growth factor  $\beta 3$ , rhTGF $\beta 3$ )对成纤维细胞的作用,探讨其可能机制。**方法** 取体外培养的人正常皮肤成纤维细胞(normal skin fibroblast, NSFb)和增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast, HSFb),经不同浓度的 rhTGF $\beta 3$  处理;另设不含 rhTGF $\beta 3$  的 DMEM 培养液相应细胞组作为对照。通过放射免疫和 Northern blot 杂交法,观察 NSFb 和 HSFb 中 I、III 型胶原蛋白及转录水平 mRNA 表达的变化。**结果** (1) NSFb 和 HSFb 中 I、III 型前胶原的表达有明显不同;(2)与对照组相比,经 rhTGF $\beta 3$  处理的各实验组 I、III 型前胶原合成明显增加 ( $P < 0.001$ ), I/III 型前胶原的比例变小;(3) rhTGF $\beta 3$  对 NSFb 和 HSFb 生物学作用的影响呈明显的量效关系。在相同剂量作用下,HSFb 的 PC I、PC III 含量高于 NSFb。**结论** rhTGF $\beta 3$  能有效提高成纤维细胞中 I、III 型胶原的合成和 I、III 型构成比中 III 型胶原的相对含量,可能对加速创面愈合及减少瘢痕形成具有重要的作用。

**【关键词】** 转化生长因子; 成纤维细胞; 瘢痕; 原胶原

An observation of the effects of recombinant human transforming growth factor  $\beta 3$  on fibroblast LV Luo, CHEN Yu-lin, ZHANG Qing-guo. Department of Burns, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433. P. R. China

**【Abstract】Objective** To investigate the role of recombinant human transforming growth factor  $\beta 3$  (rhTGF $\beta 3$ ) on fibroblast and its possible mechanism. **Methods** Normal skin fibroblast (NSFb) and hypertrophic scar fibroblast (HSFb) were cultured in vitro, and were processed by different concentrations of rhTGF $\beta 3$ . NSFb and HSFb in DMEM solution without rhTGF $\beta 3$  were employed as control. The changes in the protein and mRNA expression of type I and III collagen in NSFb and HSFb were observed. **Results** (1) The expression of type I and III procollagen in NSFb was evidently different from that of HSFb (2) The synthesis of type I and III procollagen in all test groups was increased obviously after rhTGF $\beta 3$  process ( $P < 0.001$ ) while the ratio of type I to III procollagen was decreased when compared with that in control group. (3) The effects of rhTGF $\beta 3$  on the biological behavior exhibited an obvious dose-effects relationship. The contents of type I to III procollagen in HSFb were higher than those in NSFb when the dose of rhTGF $\beta 3$  was same. **Conclusion** rhTGF $\beta 3$  could effectively promote the synthesis of type I and III procollagen, especially type III procollagen in fibroblasts. This might be beneficial to the accelerate of wound healing and to inhibit or prevent scar formation.

**【Key words】** Transforming growth factor (TGF); Fibroblast; Scar; Procollagen

增生性瘢痕是临床上常见的皮肤病理性疾患,大多为创面愈合修复过度所致。经动物实验观察,在创面愈合过程中,转化生长因子  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ) 具有明显抑制增生性瘢痕形成的作用<sup>[1]</sup>。本实验将 rhTGF $\beta 3$  应用于体外培养的人正常皮肤成纤维细胞(normal skin fibroblast, NSFb)和增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast, HSFb),观察 rhTGF $\beta 3$  对 NSFb 和 HSFb 胶原代谢的影响,探讨其在抑制瘢痕形成作用中的可能机制,为进一步指导临床应用打下基础。

## 材料与方法

### 一、主要试剂及来源

rhTGF $\beta 3$  为美国 R&D 公司产品;人 I 型前胶原 Pro I (I)、人 III 型前胶原 Pro I (III) 探针 DNA 片段由中国预防医学科学院劳卫所刘秉慈教授提供;人  $\beta$ -actin 探针模板购于美国 Abion 公司;disperse II 分离酶、DMEM 细胞培养基、谷氨酰胺、胎牛血清为美国 Gibco 公司产品;I 型胶原酶为美国 Sigma 公司产品;人的 I 型前胶原(PC I) 放免试剂盒和人的 III 型前胶原(PC III) 放免试剂盒购于重庆肿瘤研究所。

### 二、细胞来源

取患者手术后剩余的正常皮肤及增生性瘢痕,采用胶原酶消化培养法<sup>[2]</sup>培养 NSFb 和 HSFb,本实

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院烧伤科[吕洛(现在上海家化联合股份有限公司科研部,200082)、陈玉林];南京东南大学中大医院整形外科(章庆国)

验所用为第 4~6 代细胞。

三、检测指标

1. NSFb 和 HSFb 中 PC I、PC III 蛋白含量的测定:取 6 孔细胞培养板,每孔接种 2 ml(1 × 10<sup>5</sup>/ml) NSFb 或 HSFb,用体积分数为 10% 的胎牛血清 DMEM 培养液,于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。细胞达到 70%~80% 融合时,用 PBS(0.01 mol/L、pH 7.3)漂洗 1 遍,更换体积分数为 3% 的胎牛血清 DMEM 培养液(含维生素 C 5 ng/L)培养 24 h。将终浓度分别为 10、5、1 ng/ml 的 rhTGFβ3 DMEM 培养液加入培养的 NSFb、HSFb(2 ml/孔)中作为实验组,同时设不含 rhTGFβ3 的单纯 DMEM 培养液相应细胞组作为对照,实验组每个稀释度及对照组各 6 个重复孔。培养 24 h 后,收集培养细胞上清液,根据放免试剂盒提供的说明书,进行 PC I 和 PC III 的含量测定,最终数据经 γ 计数器随机附带软件处理后,获得测定值。

2. Proα1(I)和 Proα1(III)前胶原 mRNA 的表达:(1)取 T<sub>75</sub> 细胞培养瓶,每瓶接种 NSFb 或 HSFb (6~8) × 10<sup>6</sup> 个,应用终浓度为 5 ng/ml 的 rhTGFβ3 DMEM 培养液;实验组及对照组各为 8 个培养瓶。培养 24 h 后收集 NSFb 和 HSFb,采用异硫氰酸胍一步法<sup>[3]</sup>提取 NSFb 和 HSFb 的总 RNA,进一步纯化后按 megaprime™ DNA labelling system 试剂盒说明书操作,检测放射性活性大于 1 × 10<sup>8</sup> μg/min。(2)取 NSFb 和 HSFb 样品 mRNA 各 2 μg,进行 RNA 甲醛变性电泳。在真空转印机上进行 mRNA 的尼龙膜转印,转印后的尼龙膜置滤纸上自然晾干,80℃ 干烤 2 h 后封装于保鲜袋中,4℃ 保存。将尼龙膜置入预杂交液中,在杂交炉中 68℃ 杂交 2~3 h;进一步加入杂交液和已标记且经过变性后的探针,68℃ 杂交过夜;最后用 cyclone 增感屏压片数小时后,以随机附带软件对结果进行分析。

四、统计学处理

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SAS 统计软件进行 t 检验、方差分析和秩和检验。

结 果

1. PC I、PC III 蛋白含量的测定:检测结果显示,NSFb 和 HSFb 各实验组 PC I、PC III 蛋白水平均有不同程度上调,PC I 与 PC III 比值明显变小。NSFb 实验各组中,rhTGFβ3 的剂量与 PC I、PC III 蛋白表达水平上调直接相关,5 ng/ml rhTGFβ3 组中 PC I 增加量超过 2 倍,PC III 增加量接近 4 倍(表 1)。

HSFb 实验各组中 PC I、PC III 的蛋白表达明显高于对照组,rhTGFβ3 的剂量与 PC I、PC III 蛋白表达水平上调直接相关,5 ng/ml rhTGFβ3 组中 PC I 增加量超过 1.5 倍,PC III 增加量接近 4 倍(表 2)。

表 1 不同剂量 rhTGFβ3 作用下 NSFb 上清液 PC I 及 PC III 含量变化(ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The changes in type I and III procollagen in the supernatant of NSFb under the effects of rhGFβ3 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Table with 5 columns: 组别, 样本数(孔), PC I, PC III, PC I/PC III. Rows include 对照组 and 实验组 (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml).

注:与对照组比较,\* P < 0.05,\*\* P < 0.01

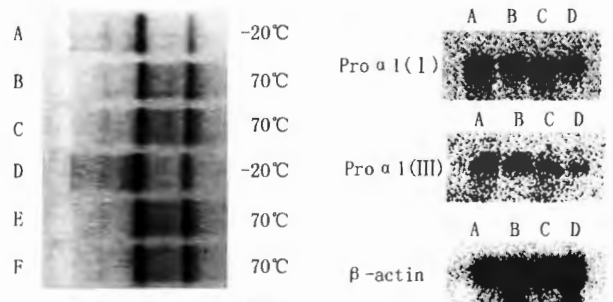
表 2 不同剂量 rhTGFβ3 作用下 HSFb 上清液 PC I 及 PC III 含量变化(ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The changes in type I and III procollagen in the supernatant of HSFb under the effects of rhGFβ3 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Table with 5 columns: 组别, 样本数(孔), PC I, PC III, PC I/PC III. Rows include 对照组 and 实验组 (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml).

注:与对照组比较,\* P < 0.05,\*\* P < 0.01

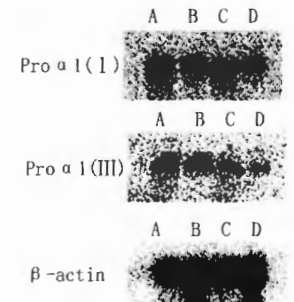
2. Proα1(I)和 Proα1(III)前胶原 mRNA 的表达:(1)细胞总 RNA 的 LiCl 沉淀得率分别为 NSFb 60 g、HSFb 50 g,两者在紫外波长 260~280 nm 下的吸光度 A 值为 1.86~1.92。保温实验 RNA(浓度相同)凝胶电泳显示,各条带清晰,未见任何降解(图 1)。mRNA 纯化后的得率为 1~2 μg/100 μg 总 RNA



注:A、B、C 为来自 NSFb 中的总 RNA,D、E、F 为来自 HSFb 中的总 RNA

图 1 NSFb 和 HSFb 的保温实验凝胶电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of NSFb and HSFb



注:A:HSFb 实验组,B:HSFb 对照组,C:NSFb 实验组,D:NSFb 对照组

图 2 Northern blot 检测结果

Fig 2 Results of Northern blot



RNA,在紫外波长 260 ~ 280 nm 下的吸光度 A 值为 1.93 ~ 1.97。(2) Northern blot 结果显示,内参照-actin RNA 探针在约 1.9 kb 处可显示高丰度、单一而清晰的条带,经密度扫描(标准为 100%)显示各组间无明显差异;Pro 1(I)、Pro 1(III)的 mRNA 在约 4.6 kb 和 4.5 kb 处出现单一而清晰杂交条带,实验组 NSFb 和 HSFb 的 mRNA 丰度有明显差异。Northern blot 杂交结果及 CyClone™ 磷屏扫描半定量结果分析见图 2。

### 讨 论

最近,TGFβ3 对创面愈合影响的研究颇受关注。哺乳类中 TGF s 超家族成员主要包括 TGFβ1、TGFβ2 和 TGFβ3。一般认为,在组织修复过程中,增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的形成,均涉及组织修复过程中局部 TGFβ1 和(或)TGFβ2 的过多产生和激活<sup>[4]</sup>,然而 TGFβ3 则显示出与 TGFβ1 和 TGFβ2 明显不同作用。研究表明,TGFβ3 可通过与 TGF s 膜受体竞争性地结合,部分阻断或下调 TGFβ1 和 TGFβ2 的激活或表达,从而抑制 TGFβ1、TGFβ2 在局部表达及其对瘢痕形成的诱导作用。结果表明,在组织修复过程中,TGFβ3 除了能够刺激靶细胞(成纤维细胞、血管内皮细胞等)的细胞外基质合成和加快血管化进程以外,还具有促进创面愈合和减轻瘢痕形成的生物学作用<sup>[5]</sup>。但是,迄今为止,对 TGFβ3 确切作用机制尚未完全了解<sup>[6]</sup>。

创面愈合过程中,细胞外基质的主要成分—胶原蛋白过多合成或/和沉积,是病理性瘢痕形成的主要原因之一。真皮成纤维细胞或其不同表型的肌成纤维细胞是创面修复不同时期合成、分泌胶原的主要功能细胞,也部分参与对胶原的降解<sup>[7]</sup>。研究证实,烧伤后增生性瘢痕成纤维细胞中 TGFβ1 mRNA 高水平表达,与增生性瘢痕成纤维细胞 Pro 1(I)、Pro 1(III) mRNA 水平增加有直接的关系<sup>[8]</sup>。皮肤中的胶原成分主要以 I、III 型胶原为主,正常成人皮肤中 I 型胶原含量较高,胚胎创面中 III 型胶原的含量所占百分比则明显高于成人创面。因此,对愈合

组织中 I、III 型胶原含量和两者比例的测定,常被用作衡量愈合组织质量的可靠指标之一<sup>[9]</sup>。本实验采用快速、灵敏的放射免疫法,检测了 NSFb 和 HSFb 培养上清中 PC I、PC III 的含量,以代表 I、III 型胶原的蛋白表达水平。实验结果显示,应用 rhTGFβ3 以后,NSFb 和 HSFb 上清中 PC I、PC III 总体蛋白表达水平明显提高,PC I/PC III 的比例有所减少,在相同剂量作用下,HSFb 的反应体现在 PC I、PC III 含量高于 NSFb。应用 Pro 1(I)、Pro 1(III)探针 DNA 对 I、III 型胶原 mRNA 的表达进行检测的结果与其蛋白表达结果基本一致。提示 rhTGFβ3 能有效地提高 NSFb 和 HSFb I、III 型胶原基因水平和蛋白表达的能力,尤其是相对提高 PC III 胶原的含量、降低 PC I 的表达及分泌。此结果可能是 rhTGFβ3 促进创面愈合、减少愈合后瘢痕形成的主要原因,其确切的作用机制有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Coerper S, Sigloch E, Cox D, et al. Recombinant human transforming growth factor beta 3 accelerates gastric ulcer healing in rats. *Scand J Gastroenterol*, 1997, 32:985 - 990.
- 2 鄂征. 基本培养操作技术. 见:鄂征,主编. 组织培养和分子细胞学技术. 北京:北京出版社,1997. 85 - 86.
- 3 Piotr C, Nicoletta S. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162:156 - 159.
- 4 Cowin AJ, Holmes TM, Brosnan P, et al. Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur J Dermatol*, 2001, 11:424 - 431.
- 5 O'kane S, Ferguson MWJ. Transforming growth factor s and wound healing. *Int Biochem cell Biol*, 1997, 29: 63 - 78.
- 6 Wu LC, Siddiqui A, Morris DE, et al. Transforming growth factorβ3 (TGFβ3) accelerates wound healing without alteration of scar Prominence. *Arch Surg*, 1997, 132:753 - 760.
- 7 Su CW, Alizadeh K, Boddie A, et al. The Problem scar. *Clin Plast Surg*, 1998, 25:451 - 465.
- 8 Dale PD, Sherratt JA, Maini PK. Role of fibroblast migration in collagen fiber formation during fetal and adult dermal wound healing. *Bull Math Biol*, 1997, 59:1077 - 1100.
- 9 Lanning DA, Diegelmann RF, Yager DR, et al. Myofibroblast induction with transforming growth factor-beta1 and -beta3 in cutaneous fetal excisional wounds. *J Pediatr Surg*, 2000, 35:183 - 188.

(收稿日期:2001-11-28)

(本文编辑:王 旭)

### · 消息 ·

## 《中华烧伤杂志》特约通讯员招聘启事

为促进烧伤外科专业发展,不断提高杂志质量,扩大本刊的影响,加强本刊与广大读者、作者间的联系,共同办好杂志,本刊编辑部自即日起在全国招聘《中华烧伤杂志》特约通讯员。

1. 应聘条件:(1)烧伤外科正、副主任,同时应有副主任医师(或副高)以上职称或硕士以上学位;(2)能为杂志发展献计献策;(3)能积极为杂志联系广告赞助;(4)热情宣传杂志,扩大发行量;(5)完成编辑部交办的其他工作。有意者请将本人简历及 1 寸彩色登记照 2 张寄本刊编辑部付佑梅收。特约通讯员经研究被聘任后,将在本刊公布名单并颁发聘书。