

野生型 p16 基因对人瘢痕疙瘩成纤维细胞生长及代谢影响的实验研究

韩军涛 陈璧 刘淑娟 汤朝武

【摘要】 目的 探讨野生型 p16 基因对人瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KfB)生长增殖及 DNA 合成代谢的影响。**方法** 构建含 p16cDNA 片段的真核表达载体 pcDNA3-p16,采用脂质体介导的基因转染法,将其导入体外培养的 KfB 中,并用 G418 筛选阳性克隆。随后对已转染及未转染的 KfB 进行免疫细胞化学染色,观察 p16 蛋白的表达,并通过绘制细胞生长曲线及采用氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)掺入法,比较转染前后细胞在生长增殖及 DNA 合成代谢方面的变化。**结果** 经酶切鉴定证实,pcDNA3-p16 构建成功。已转染的 KfB 经 G418 筛选,出现阳性克隆,并有 p16 蛋白表达;与正常 KfB 比较,其生长增殖速度明显减缓,DNA 合成代谢能力明显减弱($P < 0.05$)。**结论** p16 基因对 KfB 的生长增殖及 DNA 合成代谢有明显的抑制作用。

【关键词】 p16 基因; 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞; 基因疗法; 转染

An experimental study on the effects of wild type p16 gene on the proliferation and metabolism of human keloid fibroblasts HAN Jun-tao, CHEN Bi, LIU Shu-juan, TANG Chao-wu Department of Burns, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 Shaanxi Province. P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of wild type p16 gene on the proliferation and metabolism of human keloid fibroblasts. **Methods** Eukaryotic expression vector pcDNA3-p16 was constructed and imported into KfB by gene transfection mediated by liposome. And the positive clones were screened by G418. The transfected and untransfected KfBs were stained by Immunocytochemical method. The expression of p16 protein was observed. The changes of the proliferation and DNA synthesis of KfB before and after transfection were observed and compared by drafting cell growth curve and by ³H-TdR incorporation method.

Results The recombinant vector pcDNA3-p16 was successfully constructed and identified by enzyme digestion. The positive clones were identified by G418 selection for 10 days from transfected KfB and with p16 protein expression. The growth rate of transfected KfB slowed down obviously and its DNA synthesis decreased significantly ($P < 0.05$) when compared with those of normal KfB. **Conclusion** p16 gene might inhibit the growth and DNA synthesis of KfB.

【Key words】 p16 gene; Keloid; Fibroblasts; Gene therapy; Transduction

p16 基因又名多肿瘤抑制基因 1(MTS1),其基因编码产物 p16 蛋白可通过与细胞周期素依赖性激酶(CDK)4 结合而使其失活,从而阻止细胞由 G1 期进入 S 期。瘢痕疙瘩是创伤修复过程中结缔组织异常增生的结果。瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KfB)在细胞增殖及 DNA 合成代谢等多个方面,均明显高于正常成纤维细胞和瘢痕成纤维细胞。本研究中,笔者以基因转染的方式将 p16 基因导入体外培养的 KfB 中,观察其生物学行为的改变。

材 料 与 方 法

1. 主要试剂:pUC19 载体、DMEM 培养基及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;p16 质粒由本院袁建林博士惠赠;真核表达载体 pcDNA3、BamH I、EcoR I

及四氮嘧啶蓝(MTT)购自华美生物公司;脂质体 FuGENE™6 购自德国 Roche 公司;G418 购自美国 Sigma 公司;兔抗人 p16 多克隆抗体及亲和素-生物素-过氧化物酶复合法(ABC)试剂盒购自武汉博士德生物工程公司;氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)购自中国科学院原子能物理研究所。

2. KfB 培养:取手术切除的成人胸部瘢痕疙瘩组织标本,采用组织块培养法常规分离培养原代 KfB,置液氮中保存备用。

3. p16 真核表达载体的构建:用碱裂解法分别制备 pUC19-p16 和 pcDNA3 质粒。用 BamH I 与 EcoR I 对 pUC19-p16 质粒进行双酶切电泳,然后用低熔点琼脂糖法回收 p16 基因片段,并与经相同酶切处理的 pcDNA3 在 T₄DNA 连接酶作用下连接 48 h,构建重组的真核表达载体 pcDNA3-p16,随后以之转化感受态大肠杆菌 HB101。铺板挑选菌落,提取质粒并进行酶切鉴定。

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院烧伤科(韩军涛、陈璧、汤朝武),妇产科(刘淑娟)

4. pcDNA3-p16 转染 KfB: (1) 将 KfB 接种于 3 个 35 ml 培养瓶中, 每瓶 5×10^4 个细胞。待细胞 80% 融合时, 用无血清 DMEM 培养基换液, 2 ml/瓶, 备用。(2) 另备 3 个 1.5 ml Eppendorf 离心管, 均加入 6 μ l 脂质体 FuGENE™ 6 和 94 μ l 无血清 DMEM, 混匀后室温下静置 5 min, 再将 2 μ g pcDNA3-p16 质粒和 2 μ g pcDNA3 空载体质粒分别加入其中两管 (另一管不加质粒), 室温下静置 15 min。(3) 将 3 个离心管中的混合物分别加入到前述 3 瓶细胞中, 相应设为转染组、空载体组和空白对照组, 于 37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下孵育 5 h 后, 每瓶补加含体积分数 30% 小牛血清的 DMEM 1 ml, 继续孵育。转染后 48 h, 用 G418 (质量浓度为 100 ng/L) 筛选阳性克隆。

5. p16 蛋白表达的检测: 将正常 KfB 和经 G418 筛选后所获的细胞克隆常规传代, 并做细胞爬片, 采用 ABC 法进行免疫细胞化学染色, 常规封片保存。

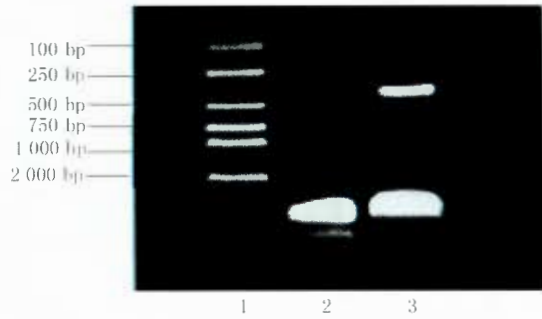
6. 细胞生长曲线的绘制: 取正常 KfB 及经 G418 筛选成活的 KfB, 制备单细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^6 /L, 接种于 48 孔培养板, 每种细胞各接种 12 孔, 1 ml/孔。24 h 后, 每种细胞选其 1 孔, 加入 80 μ l MTT (质量浓度 20 g/L), 继续孵育 4 h 后弃去上清, 加入 0.5 ml 二甲基亚砷, 振荡 30 min。在酶联免疫检测仪上 (波长 490 nm) 测定各孔的吸光度 (A) 值。此后每天于相同时相点重复检测, 连续测量 12 d。根据所得数据, 绘制细胞生长曲线。

7. 细胞 DNA 合成量的测定: 取正常 KfB 及经 G418 筛选成活的 KfB, 接种于 48 孔板, 每种细胞设 8 个复孔, 每孔 1×10^4 个细胞。接种后 24 h 换液, 每孔加入 3.7×10^4 Bq ³H-TdR, 继续培养 24 h 后弃培养基, 用 37℃ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗培养板 10 次, 风干后每孔加入 2 mol/L 的 NaOH 200 μ l, 室温放置 30 min。镜下观察到细胞完全溶解后, 将各孔液体分别收集于纤维滤纸上, 采用液体闪烁计数器 (美国 Beckman 公司 LS-6500 型) 测定放射性荧光闪烁计数值 (min^{-1})。

8. 统计学处理: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Origin 软件进行统计分析, 组间差异采用 t 检验。

结 果

1. p16 真核表达载体的酶切鉴定结果: 重组子经 BamH I/EcoR I 双酶切, 显示为 5 400 bp 和 450 bp 两条带, 即 p16 基因已被成功克隆到 pcDNA3 的 BamH I/EcoR I 位点间 (图 1)。



注: 1. marker 2. pcDNA-p16 酶切前 3. pcDNA-p16 酶切后
图 1 pcDNA3-p16 酶切鉴定结果

Fig 1 Identification results after pcDNA3-p16 enzymatic digestion

2. pcDNA3-p16 转染结果: 用 G418 筛选 10 d 后, 空白对照组细胞全部死亡, 转染组及空载体组均有细胞存活。

3. p16 蛋白的表达: 免疫细胞化学染色结果显示, 转染组第 1、3 代细胞胞浆内均有 p16 蛋白表达, 呈棕黄色颗粒; 而正常 KfB 和空载体组细胞内无 p16 蛋白表达 (图 2)。



图 2 a. 正常 KfB 中未见 p16 蛋白表达 ABC $\times 200$ b. 转染 pcDNA3 后 KfB 中未见 p16 蛋白表达 ABC $\times 400$ c. 转染 pcDNA3-p16 后 KfB 中有明显的 p16 蛋白表达 ABC $\times 400$
Fig 2 a. No p16 protein expression in normal kFb ABC $\times 200$ b. No p16 protein expression in kFb after pcDNA3 transfection ABC $\times 400$ c. There was evident p16 protein expression in kFb after pcDNA3-p16 tranfection ABC $\times 400$

4. 细胞的增殖情况:与正常 Kfb 比较,空载体组细胞的生长情况与之基本一致,而转染组细胞没有明显的对数生长期,增殖速度明显减慢(图 3)。

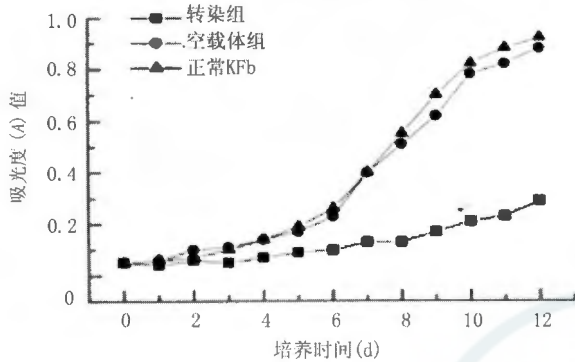
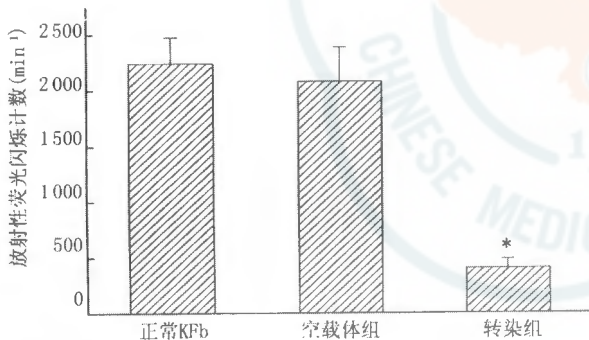


图 3 Kfb 转染前后细胞生长曲线的比较
Fig 3 Comparison of the growth curve before and after kfb transfection

5. DNA 合成代谢的测定:与正常 Kfb 比较,转染组细胞 DNA 合成量明显降低 ($P < 0.05$),而空载体组细胞仅有轻微变化(图 4)。



注:与正常 Kfb 比较, * $P < 0.05$

图 4 kfb 转染前后 DNA 合成量的比较

Fig 4 Comparison of DNA synthetic contents before and after kfb transfection

讨 论

p16 基因是 1994 年由 Kamb 等^[1]与 Nobori 等^[2]首先报道的一种新型抑癌基因,位于人类第 9 号染色体短臂(9P21)上,由 3 个外显子和 2 个内含子组成,其外显子编码的蛋白质产物即 p16 蛋白。研究表明,p16 的抑癌机制与细胞周期的调控密切相关,它通过特异地抑制 CDK4 的活性,阻止细胞从 G1 期进入 S 期,从而抑制细胞的过度增殖。其在肿瘤的基因治疗方面可能存在着广泛的应用前景^[3,4]。

瘢痕疙瘩是皮肤创伤修复过程中结缔组织异常增殖所形成的肿块,临床上表现为增长速度较快,不易退化,可以向周围正常皮肤浸润扩散,并超出原皮损区范围,早期常伴有炎症浸润带,加之手术切除后

复发率高,复发范围可超过原瘢痕范围,因此又被称为“瘢痕瘤”^[5,6]。目前其临床治疗措施主要包括手术切除、物理压迫、局部药物注射、激光及放射性治疗等,但疗效均未能肯定^[6,7]。研究表明,在体外培养条件下,Kfb 的形态与正常成纤维细胞相似,均为典型的长梭形,但不同的是前者生长较迅速,且增殖过程中细胞间排列杂乱无章;而后者在增殖过程中常呈平行状或漩涡状排列。此外,Kfb 的细胞增殖及胶原合成能力是正常成纤维细胞及增生性瘢痕成纤维细胞的 2~3 倍^[8]。因此如何控制 Kfb 的增殖及胶原合成,将成为治疗瘢痕疙瘩的关键。

近年来,基因治疗已成为人类多种疾病的重要治疗手段之一。本研究中,笔者首先构建了含有 p16cDNA 片段的真核表达载体 pcDNA3-p16,随后利用脂质体介导的转染技术对 Kfb 进行转染。由于重组载体 pcDNA3-p16 中的 neo 基因片段具有 G418 抗性,故在转染后可利用 G418 筛选阳性克隆。通过对转染后的第 1、3 代 Kfb 进行免疫细胞化学染色,证实其有 p16 蛋白表达;细胞生长曲线显示,经 p16 基因转染后的细胞生长增殖受到明显抑制;³H-TdR 的掺入实验结果也证实转染 p16 基因后,Kfb 的 DNA 合成量明显降低。以上结果表明,外源性 p16 基因对 kfb 的生长增殖及 DNA 代谢具有明显的抑制作用。在今后的工作中,笔者将就 p16 基因对 Kfb 的影响机制作进一步的探讨,以期对瘢痕疙瘩的治疗提供新思路。

参 考 文 献

- 1 Kamb A, Gruis NA, Weaver J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994, 264: 436 - 440.
- 2 Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994, 368: 753 - 756.
- 3 Rocco JW, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*, 2001, 264: 42 - 55.
- 4 龚振明,傅继梁. 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 4 抑制因子 α 与肿瘤. *中华医学遗传学杂志*, 2001, 18: 219 - 221.
- 5 Brissett AE, Sherris DA. Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. *Facial Plast Surg*, 2001, 17: 263 - 272.
- 6 Shaffer JJ, Taylor SC, Cook F. Keloidal scars: a review with a critical look at therapeutic options. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 46Suppl: 63 - 97.
- 7 Giovannini UM. Treatment of scars by steroid injections. *Wound Repair Regen*, 2002, 10: 116 - 117.
- 8 韩军涛,陈璧,汤朝武. 不同组织来源的成纤维细胞的生物学特性比较. *第四军医大学学报*, 2001, 22: 525 - 527.

(收稿日期:2002 - 09 - 02)

(本文编辑:罗 勤)