

· 短篇论著 ·

α₁ (I) 型前胶原基因反义寡聚脱氧核苷酸对瘢痕成纤维细胞的作用

邢帮荣 利天增 祁少海 叶志强 孔庆磊 邓宇

1 对象与方法

1.1 主要试剂及仪器

α₁ (I) 型前胶原基因反义寡聚脱氧核苷酸 (AODN, 上海生工生物工程有限公司); 阳离子脂质体 LipofectAMINE™ 试剂 (美国 Gibco 公司); 即用型免疫组织化学试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 倒置相差显微镜 (上海宙山精密光学仪器有限公司); IBA 2.5 型全自动图像分析系统 (德国 Kontron 公司)。

1.2 分组处理

取笔者单位收治的 4 例患者创面愈合后 3 ~ 8 个月的增生性瘢痕 (HS) 组织, 切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 行细胞培养。常规消化传代, 选用第 4 ~ 6 代细胞, 调整细胞浓度为 0.8 × 10⁵ 个/孔, 接种于 6 孔培养板, 细胞约 70% ~ 80% 融合时用无血清 DMEM 培养液漂洗备用。

将细胞分为 3 组进行转染: (1) 实验组: 每个培养孔中加入 4 μL AODN (已提前用 LipofectAMINE™ 包裹) 和 96 μL 无血清 DMEM 培养液; (2) 对照组: 每个培养孔中加入 8 μL LipofectAMINE™ 和 92 μL 无血清 DMEM 培养液; (3) 空白对照组: 每个培养孔中加入 100 μL 无血清 DMEM 培养液。先将各组试剂混匀, 并于 25 °C 孵育 30 min, 再加入前述 6 孔培养板中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 5 h, 更换为含体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养液常规培养。

1.3 检测指标

1.3.1 细胞生长情况 于转染后 1 ~ 7 d, 每天每组取 8 孔细胞, 常规消化并计数, 8 孔细胞的平均值即为每日细胞计数值, 并据此绘制细胞生长曲线。

1.3.2 I 型胶原蛋白含量 于转染后 3、5、7 d 收集各组细胞爬片标本, 用链霉菌亲和素-生物素复合物法行组织形态学观察。一抗浓度 1:20, 标本用苏木素复染, 封固, 在光学显微镜下观察。每张切片随意选取 8 个视野, 用全自动图像分析系统计算背景的吸光度 (阳性单位, PU, 以 % 表示) 值。PU 值越小, I 型胶原蛋白含量越高。

1.4 统计学处理

部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用中山大学统计教研室提供的 SAS 软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞生长情况

转染后 1 ~ 7 d 各组细胞计数值变化趋势相近。

基金项目: 广东省科委攻关项目 (9827817)

作者单位: 510630 广州, 中山大学附属第三医院急诊外科 (邢帮荣、叶志强、孔庆磊、邓宇); 中山大学附属第一医院烧伤科 (利天增、祁少海)

2.2 I 型胶原蛋白含量

实验组转染后 3 d 未观察到阳性细胞, 随时间推移, 被染成棕黄色的阳性细胞逐渐出现; 对照组和空白对照组转染后 3 d 所有细胞均被染成棕黄色, 随着时间推移, 细胞质及细胞外基质的棕黄色明显加深。见表 1。

表 1 各组免疫组织化学染色 PU 值 (% , $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 标本数 | 转染后时间 (d) | | |
|-------|-----|---------------|--------------|--------------|
| | | 3 | 5 | 7 |
| 实验组 | 8 | 3.52 ± 1.13 | 1.97 ± 0.76 | 0.83 ± 0.28 |
| 对照组 | 8 | 12.41 ± 1.58* | 7.81 ± 1.45* | 1.61 ± 0.65* |
| 空白对照组 | 8 | 12.73 ± 1.87* | 7.79 ± 1.54* | 1.69 ± 0.55* |

注: 与实验组比较, *P < 0.05

3 讨论

HS 是一种常见的纤维增生性疾病^[1]。针对瘢痕形成中 HS 成纤维细胞 (HSF) 的前胶原基因 mRNA 转录上调产生过多的 I 型胶原, 应用反义 DNA, 可以减少 I 型胶原蛋白的合成, 从而达到防治 HS 的目的。本实验用阳离子脂质体为载体, 将人工合成的 α₁ (I) 型前胶原基因 AODN 转染至第 4 ~ 6 代的人 HSF 中。实验组、对照组、空白对照组细胞生长曲线无明显差别, 说明 AODN 对人 HSF 的增殖无明显抑制作用。各组免疫组织化学染色结果提示, AODN 能显著抑制人 HSF 中 I 型胶原的合成。AODN 随时间的增加, 可能被逐渐降解, 失去封闭基因的作用, 从而观察到阳性染色强度升高。

笔者针对 α₁ (I) 型胶原蛋白 mRNA 序列设计合成了 22 bp 的 AODN, 并研究其对 HF 的作用, 取得了一系列成果^[2-3]。α₁ (I) 型前胶原基因 AODN 抑制人 HSF I 型胶原合成的作用, 已被应用于多项研究中, 其发展前景较为广阔。但其作用于人的最佳剂量、时效及组织特异性尚不清楚, 有待进一步研究和完善。

参考文献

- [1] Bayat A, Bock O, Mrowietz U, et al. Genetic Susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta 1 common polymorphisms and plasma levels. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 111: 535 - 543, 544 - 546.
- [2] 谢举临, 利天增, 祁少海, 等. α₁ (I) 型前胶原基因反义重组质粒对成纤维细胞的影响. *中华整形外科杂志*, 2001, 17 (3): 157 - 160.
- [3] 祁少海, 利天增, 单越新, 等. α₁ (I) 型前胶原基因反义核酸对增生性瘢痕动物模型的抑制作用. *中华整形外科杂志*, 2000, 16 (5): 295 - 297.

(收稿日期: 2007 - 04 - 28)

(本文编辑: 赵敏、张红)