

· 论著 ·

重组人内皮型一氧化氮合酶基因转染对增生性瘢痕成纤维细胞的影响

杨平 王爱丽 刘德武 徐顺 顾耀辉 黄静 陈波 罗前程 贾卿 吴志宏



【摘要】 目的 了解重组人内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因转染人增生性瘢痕成纤维细胞(HSFb)的可行性,以及转染后一氧化氮(NO)的生成和I、Ⅲ型胶原的合成情况。方法 体外构建人eNOS真核表达载体。取体外培养的人HSFb进行转染实验,根据细胞培养液中所加质粒不同分为pcDNA3.0空载体组、pcDNA3.0-eNOS转染组。另设未转染组,细胞按常规培养。采用实时荧光定量PCR法检测各组细胞eNOS及I、Ⅲ型胶原mRNA表达。硝酸还原酶法测定NO含量。结果 细胞转染后eNOS显著表达,pcDNA3.0-eNOS转染组eNOS mRNA相对表达量为 5.92 ± 0.21 ,明显高于pcDNA3.0空载体组(0.98 ± 0.13 , $P < 0.05$);pcDNA3.0-eNOS转染组I型胶原mRNA相对表达量为 0.76 ± 0.15 ,Ⅲ型胶原mRNA相对表达量为 0.79 ± 0.08 ,均明显低于pcDNA3.0空载体组(0.98 ± 0.15 , 1.02 ± 0.12 , $P < 0.05$)。pcDNA3.0-eNOS转染组NO含量为(36.1 ± 0.8) $\mu\text{mol/L}$,明显高于pcDNA3.0空载体组(28.4 ± 1.0) $\mu\text{mol/L}$ 和未转染组[(27.7 ± 1.3) $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$]。结论 HSFb可作为eNOS基因转染的靶细胞,转染的细胞能表达eNOS并产生NO,并且对细胞的胶原合成功能有抑制作用。

【关键词】 转染; 一氧化氮合酶Ⅲ型; 瘢痕; 成纤维细胞

Effect of transfection of recombinant human endothelial nitric oxide synthase gene on hypertrophic scar fibroblasts in vitro YANG Ping, WANG Ai-li, LIU De-wu, XU Shun, GU Yao-hui, HUANG Jing, CHEN Bo, LUO Qian-cheng, JIA Qing, WU Zhi-hong. Department of Burns and Plastic Surgery, The 7th People Hospital of Shanghai, Shanghai 200137, P. R. China

Corresponding author: WU Zhi-hong, Email: tsuhon@hotmail.com, Tel: 021-58670561-286

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility of transfection of recombinant human endothelial nitric oxide synthase (eNOS) into human hypertrophic scar fibroblasts (HSFbs), and to observe NO secretion and the synthesis of collagen I and III. Methods Recombinant human eNOS with karyocyte expressive vector was constructed in vitro, then was transfected into HSFbs which was isolated from hypertrophic scar tissues and cultured in vitro (T group). The HSFbs untransfected (normal culture) or transfected with empty-vector was used as control group and empty-vector group respectively. The mRNA expression of eNOS, collagen I and III was determined by Realtime PCR. The content of NO was determined by NO assay kit. Results The expression of eNOS mRNA in T group was 5.92 ± 0.21 , which was obviously higher than that in empty-vector group (0.98 ± 0.13 , $P < 0.05$). The expression of collagen I mRNA (0.76 ± 0.15), and collagen III (0.79 ± 0.08) in T group was significantly lower than those in empty-vector group (0.98 ± 0.15 , 1.02 ± 0.12 , $P < 0.05$, respectively). The content of NO in T group ($36.1 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$) was obviously higher than that in empty-vector group ($28.4 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$) and control group ($27.7 \pm 1.3 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$). Conclusion HSFbs can be the target cells for eNOS gene transfection. The transfected cells can express eNOS and produce NO, which inhibit the synthesis of collagen.

【Key words】 Transfection; Nitric oxide synthase type III; Cicatrix; Fibroblasts

一氧化氮(NO)是一种弥漫性细胞内信号分子,主要由血管内皮细胞合成和释放,其合成酶为一氧

化氮合酶(NOS)。NO具有广泛的生物学作用,包括血管舒张、促肿瘤细胞凋亡、免疫功能调节和神经递质作用。研究表明,瘢痕组织中的NOS含量和NO的表达与瘢痕组织增生呈负相关,NO对瘢痕组织增生具有抑制作用^[1]。本实验将体外重组的内皮型一氧化氮合酶(eNOS)转染入体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞(HSFb),观察eNOS的表达和NO生成情况,以及细胞增殖状态和胶原合成的改变,探讨eNOS转染HSFb的可行性,以期对增生性瘢痕(HS)

基金项目:上海市卫生局科研基金(044112);上海市重点专科建设基金(05 II 014)

作者单位:200137 上海市第七人民医院烧伤整形科(杨平、王爱丽、徐顺、顾耀辉、黄静、陈波、罗前程、贾卿、吴志宏);南昌大学医学院第一附属医院烧伤科(刘德武)

通讯作者:吴志宏, Email: tsuhon@hotmail.com, 电话: 021-58670561-286

的治疗提供新的途径和实验依据。

1 对象与方法

1.1 主要试剂及仪器

大肠杆菌 top10、高效真核表达载体 pcDNA3.0、脂质体 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司), DMEM 培养基、胰蛋白酶、Trizol 试剂盒 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司), 胶原酶 NB4 (德国 Serva 公司), 反转录 (RT)-PCR 试剂盒、克隆载体 pMD18-T、*Taq* 酶 (日本 TaKaRa 公司), NO 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。荧光显微镜 (日本 Nikon 公司), 7300 型实时荧光定量 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司), DNA 测序仪 (上海捷兰生物公司), GIS22800 型凝胶图像处理系统 (上海天能科技有限公司)。

1.2 eNOS 真核表达载体构建与鉴定

采用 RT-PCR 方法获取目的基因 eNOS cDNA 片段, 序列全长 3673 bp。PCR 扩增引物, 上游引物 5'-TGGAGCAGGCAGCAGAGTG-3', 下游引物 5'-CG-GAACTGGAAGGAAAGC-3'。PCR 纯化产物装入克隆载体 pMD18-T, 大肠杆菌 top10 在 LB 固体培养基上涂片培养, 经蓝白斑筛选, 挑取单个白色菌落在含氨苄西林的 LB 培养液中扩增, DNA 测序仪上测序分析。用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 TA 载体回收目的片段, 表达载体 pcDNA3.0 用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切回收线性载体, 采用 T4 连接酶连接并构建 pcDNA-eNOS, 经酶切电泳鉴定。

1.3 细胞培养、转染及分组

HS 标本来源于上海市第七人民医院烧伤整形科门诊 HS 患者 (患者均知情同意)。HSFb 分离和培养参照文献 [2] 方法。待细胞长至 80% 融合时用于实验。转染前 24 h, 胰蛋白酶消化细胞, 计数后按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板中继续培养, 待细胞 30% ~ 50% 融合时进行质粒转染。取无血清 DMEM 培养液 245 μ L 与 5 μ L Lipofectamine 2000 混匀, 另取 245 μ L DMEM 培养液与 5 μ L (100 pmol) 质粒混匀, 根据所加质粒不同分为 pcDNA3.0 空载体组和 pcDNA3.0-eNOS 转染组。5 min 后分别合并脂质体和质粒液, 室温下放置 20 min。吸除待转染细胞中培养液, 以无血清 DMEM 培养液洗涤 2 次, 添加不含血清和抗生素的 DMEM 培养液 1.5 mL/孔, 再加入已经合并的脂质体质粒液, 37 $^{\circ}$ C 培养 5 h。弃去转染液, 更换含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培

养液继续培养。另设未转染组作为对照, 按常规方法培养细胞。

1.4 检测指标

1.4.1 eNOS、I 型胶原和 III 型胶原 mRNA 的表达

收集对数生长期的各组细胞, 用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计定量后, 行 RT 反应, 操作按试剂盒说明书进行。反应程序: 25 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 37 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 终止反应后, 采用实时荧光定量 PCR 法检测 RT 产物 eNOS、I 型胶原和 III 型胶原表达。eNOS 上游引物 5'-CTCATG-GGCACGGTGATG-3', 下游引物 5'-ACCACGTCA-TACTCATCCATACAC-3'。I 型胶原上游引物 5'-GAA-CGCGTGTCCCTTGT-3', 下游引物 5'-GAACGAG-GTAGTCTTTCAGCAACA-3'。III 型胶原上游引物 5'-AACACGCAAGGCTGTGAGACT-3', 下游引物 5'-GC-CAACGTCCACACCAAATT-3'。RT 产物稀释 10 倍后取 1 μ L 作为模板, 加入 2 倍 *Taq* TM 12.5 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 去离子水补足体积到 25 μ L。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 min, 95 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环。以各转染组与未转染组数据的比值表示其相对表达量。

1.4.2 NO 检测 将对数生长期的细胞以 2×10^5 个/ cm^2 接种于 24 孔培养板中, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养。采用硝酸还原酶法测定各组细胞培养上清液中 NO 含量, 操作按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 STATA 9.0 统计软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 eNOS 基因克隆及表达载体构建

eNOS 基因扩增成功, 全长约 3700 bp。特异片段回收后, 经过 TA 克隆以及亚克隆到表达载体 pcDNA3.0 上, 成功构建了 pcDNA3.0-eNOS 真核表达载体。载体经琼脂糖凝胶电泳可见约 9100 bp 的 DNA 带, 与预期质粒大小一致, 用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶中出现 2 条 DNA 带, 1 条约 5400 bp, 与空质粒 DNA 带相齐, 是质粒 DNA 带; 另 1 条约 3700 bp, 与 eNOS cDNA 片段大小一致, 是目的片段 eNOS cDNA 带, 通过重组体酶切说明目的片段已定向插入到表达载体中。见图 1。经测序检测, 证实所克隆基因为 eNOS, 与美国国立生物技术信息中心网站上所查阅的一致。

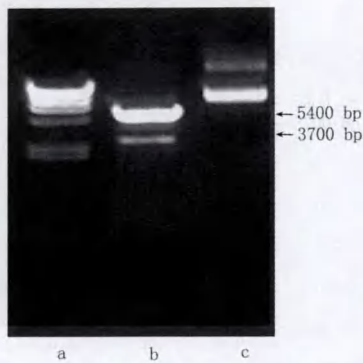


图 1 重组质粒 pcDNA3.0-内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 酶切电泳图。a. *Hind* III + *Xba* I marker; b. *Hind* III + *Xba* I 双酶切后电泳; c. pcDNA-eNOS 电泳

2.2 HSFb eNOS 转染及表达

HSFb 经 Lipofectamine 2000 转染绿色荧光表达载体 pEGFP-N1 48 h 后,以蓝色荧光照射,显示约 20% 细胞有绿色荧光,见图 2。转染后 eNOS 显著表达,pcDNA3.0-eNOS 转染组 eNOS mRNA 相对表达量为 5.92 ± 0.21 ,明显高于 pcDNA3.0 空载体组 (0.98 ± 0.13 , $P < 0.05$)。

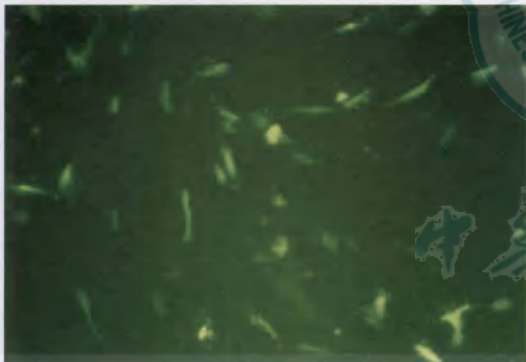


图 2 绿色荧光蛋白报告基因载体转染后,部分增生性瘢痕成纤维细胞呈绿色荧光 荧光显微镜 $\times 40$

2.3 I、III 型胶原 mRNA 表达

pcDNA3.0-eNOS 转染组 I 型胶原 mRNA 相对表达量为 0.76 ± 0.15 , III 型胶原 mRNA 相对表达量为 0.79 ± 0.08 ,均明显低于 pcDNA3.0 空载体组 (0.98 ± 0.15 、 1.02 ± 0.12 , $P < 0.05$)。

2.4 NO 检测结果

pcDNA3.0-eNOS 转染组 NO 含量 [$(36.1 \pm 0.8) \mu\text{mol/L}$] 明显高于 pcDNA3.0 空载体组 [$(28.4 \pm 1.0) \mu\text{mol/L}$] 和未转染组 [$(27.7 \pm 1.3) \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$]。

3 讨论

NO 是活体细胞在 NOS 的催化下,以 L-精氨酸

为底物,在有氧条件下生成的小分子物质。NOS 合成的 NO 寿命较短(几秒到几分钟),性质极其不稳定。作为替代疗法,外源性 NO 应用非常困难。外源性基因转染的方法具有表达稳定、作用直接而且持久的优点。关于治疗性应用研究,基因转染的方法应简便安全,为此我们选用了脂质体作为载体进行基因转染。本研究采用实时荧光定量 PCR 法,证实转染后的细胞有 eNOS mRNA 表达,且 NO 生成明显增加。

NO 具有舒张血管、促进毛细血管再生的作用,有利于创伤的正常修复^[3]。在创伤后早期,创面组织 NOS 表达上升,NO 合成增多。在创伤修复晚期,HS 组织中 NOS 表达较正常组织和非病理性瘢痕组织下降,局部组织中 NO 合成量减少,结果引起瘢痕组织中成纤维细胞异常增殖,伴有细胞外基质(主要为 I、III 型胶原)过量沉积^[4],从而促进 HS 的形成和发展。HS 组织中 NOS 表达及 NO 合成减少的机制及意义尚未完全明了,研究表明,可能与转化生长因子 β 抑制 NO 释放或组织中缺乏酶底物(L-精氨酸)致 NO 合成量下降有关^[5]。

本研究证实,eNOS 基因转染在体外培养的 HSFb 中是可行的,转染的基因可合成 eNOS,进而催化生成 NO,并对细胞的胶原合成功能产生负性作用。体外转染实验作用时间较短,其结果反映了基因转染后的即时效应,而瘢痕胶原沉积可长达数月之久,因此转染后长期作用效果如何尚待研究。我们的荧光表达载体转染实验证实转染效率并不高,如何提高转染效率还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wang R, Ghahary A, Shen YJ, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 1997, 108 (4): 438-444.
- [2] 司徒振强. 细胞培养. 西安:世界图书出版公司,1992:42-43.
- [3] 刘德伍,李国辉,刘德明. 粉防己碱对创面修复组织中一氧化氮和一氧化氮合酶的影响. *中华烧伤杂志*, 2005, 21 (2): 135-136.
- [4] 刘德伍,李国辉. 瘢痕组织一氧化氮含量检测及其临床意义. *华中医学杂志*, 2002, 26(1): 21-22.
- [5] Arthur JC, Jai KP. Up-regulation by human recombinant transforming growth factor β -1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling. *J Am Coll Surg*, 1999, 188(3): 271-279.

(收稿日期:2007-11-09)

(本文编辑:张红)