

TSG-6对人病理性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡的影响

张苏文, 李小静, 陈 钊, 王 晖

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子 α 刺激基因6(TSG-6)对人病理性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡的影响。方法 取人病理性瘢痕组织共6例,用组织块培养法培养人病理性瘢痕成纤维细胞,体外培养的第3、4代细胞,用浓度为2 $\mu\text{g/ml}$ 的重组人TSG-6蛋白处理,在作用48 h后,用免疫组化法检测TSG-6作用前后人病理性瘢痕成纤维细胞增殖细胞核抗原(PCNA)的变化,并计算PCNA阳性细胞率;流式细胞术计算、分析人重组TSG-6蛋白作用前后,人病理性瘢痕成纤维细胞的凋亡率;Western blot法检测细胞凋亡相关蛋白p53、半胱天冬酶3(caspase-3)表达的变化。结果 2 $\mu\text{g/ml}$ TSG-6体外干预人病理性瘢痕成纤维细胞48 h情况下,人病理性瘢痕成纤维细胞PCNA的阳性细胞率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);细胞凋亡率增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);Western blot法检测显示细胞凋亡相关蛋白p53、caspase-3表达明显增多。结论 TSG-6在体外能够抑制人病理性瘢痕成纤维细胞的增殖并促进其凋亡,TSG-6对细胞的抑制作用可能与TSG-6抑制PCNA基因表达有关,TSG-6诱导人病理性瘢痕成纤维细胞凋亡的作用可能与TSG-6促进细胞凋亡相关蛋白p53、caspase-3表达有关。

关键词 肿瘤坏死因子 α 刺激基因6;病理性瘢痕;成纤维细胞;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号 R 619+.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0102-04

肿瘤坏死因子 α 刺激基因6(tumor necrosis fac-

tor alpha stimulated gene-6, TSG-6)是Lee et al^[1]发现的一种参与多种炎症反应的抗炎因子。病理性瘢痕是由皮肤创伤过度愈合而形成,增生的病理性瘢痕组织高于周围正常皮肤,不仅影响美观,而且可出现瘙痒、疼痛等症状,甚至会发生瘢痕挛缩,发生在关节处瘢痕挛缩常造成关节严重的功能障碍,因此皮肤创伤后瘢痕形成的防治是创伤愈合领域的一个重要问题。Tan et al^[2]首次证明抗炎因子TSG-6表达的减少可能是导致病理性瘢痕形成的一个重要因素。该研究探讨2 $\mu\text{g/ml}$ TSG-6对人病理性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 人病理性瘢痕组织标本均来源于安徽医科大学第一附属医院整形外科病房与门诊手术中切除的病理性瘢痕组织,全部征得患者同意并签署知情同意书,组织标本共6例(男2例,女4例),年龄4~27(16.82 ± 1.35)岁,患者均属于首次治疗,未经其他治疗,且病理性瘢痕症状突出,病程6~12个月。

1.2 主要试剂及仪器 TSG-6蛋白购自美国R&D Systems公司;胎牛血清、PBS、DMEM(高糖)培养基均购自美国HyClone公司;增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体及免疫组化SP试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司;BD 556547 AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒、流式细胞仪购自美国BD公司;Western blot试剂盒购自美国Sigma公司;CO₂细胞培养箱购自德国Heraeus公司;Western blot检测全套设备购

2015-09-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81272107)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介: 张苏文,男,硕士研究生;

李小静,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lixiaojing5@163.com

expressions of TLR4, NF- κ B p65 and the TNF- α , IL-1, IL-10 were lower compared with LPS alone or TGA when stimulated with LPS combined with TGA. However it was high compared with the control. The differences were both clearly statistically significant($P < 0.05$). And the correlations between the TLR4 and NF- κ B p65 were clearly statistically significant($P < 0.01$). **Conclusion** Tricalacturonic acid competing with LPS may inhibit the TLR4 signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells of gestational diabetes. And it can provide a guide to the prevention and treatment of gestational diabetes mellitus.

Key words tricalacturonic acid; endotoxin; gestational diabetes mellitus; TLR4 signaling pathway

自 Bio-Rad 公司; 超净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司; 倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 病理性瘢痕成纤维细胞原代培养 应用组织块培养法进行病理性瘢痕成纤维细胞的原代培养, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内常规培养。每 3 d 更换细胞培养液 1 次, 10 ~ 14 d 可见组织块周围有成纤维细胞萌出, 当成纤维细胞爬满细胞培养瓶底并连接成片 (铺满细胞瓶底 80% 以上), 可行传代, 待细胞传至第 3 或 4 代时, 可用于实验。

1.3.2 免疫组化法检测 PCNA 取第 3 代处于对数生长期的人病理性瘢痕成纤维细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 以 1×10^5 /ml 的密度接种于放有盖玻片的 6 孔培养板中。实验分为空白对照组和浓度为 2 μg/ml 的 TSG-6 干预组。细胞贴壁生长后, 弃上清液, 分别加入不含 TSG-6 的完全培养基和 TSG-6 蛋白终浓度为 2 μg/ml 的培养基。于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内常规培养 48 h。再经过固定、烤片处理, 采用柠檬酸 (0.01 mol/L, pH = 6.0) 微波法行抗原修复。采用 SP 法, DAB 显色。实验重复 3 次。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 取处于对数生长期的第 3 代人病理性瘢痕成纤维细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 以 1×10^5 /ml 的密度接种于放有盖玻片的 6 孔培养板中。实验分为空白对照组和 2 μg/ml TSG-6 干预组。细胞贴壁生长后, 弃上清液, 分别加入不含 TSG-6 的完全培养基和 TSG-6 蛋白终浓度 2 μg/ml 的培养基。于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内常规培养 48 h。收集空白对照组和浓度为 2 μg/ml TSG-6 干预组细胞到试管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用冰 PBS 漂洗 2 次, 后按 BD 556547 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书操作, 操作完成后上流式细胞仪检测。

1.3.4 Western blot 法检测 p53、半胱天冬酶 3 (caspase3) 取处于对数生长期的第 3 代人病理性瘢痕成纤维细胞进行实验。实验分为空白对照组和浓度为 2 μg/ml TSG-6 干预组。将人病理性瘢痕成纤维细胞提取物与上样缓冲液混合后, 加热变性, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 在 50 mA、4 ℃ 条件下转移 8 h, 实验按照 Western blot 试剂盒说明书操作, 将 PVDF 膜放入另一塑料袋, 加含二抗的封闭液, 置室温下 1 h, 振摇洗涤后, 加新配置的 DAB 显色液, 条带显色

清楚后终止显色并拍照保存。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据两两比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 TSG-6 抑制人病理性瘢痕成纤维细胞增殖 免疫组化法结果显示: 细胞核内含有棕黄色颗粒者为 PCNA 阳性表达细胞, 见图 1, 从每张切片中选取 5 个阳性率较多的视野计数, 阳性细胞率 (%) = 阳性细胞/细胞总数 × 100%, TSG-6 干预组 PCNA 阳性细胞率 (24.7 ± 4.3) 较空白组 (40.5 ± 5.0) 显著降低, 差异有统计学意义 ($n = 6, t = 5.88, P < 0.01$)。表明 TSG-6 在体外能够抑制人病理性瘢痕成纤维细胞的增殖。

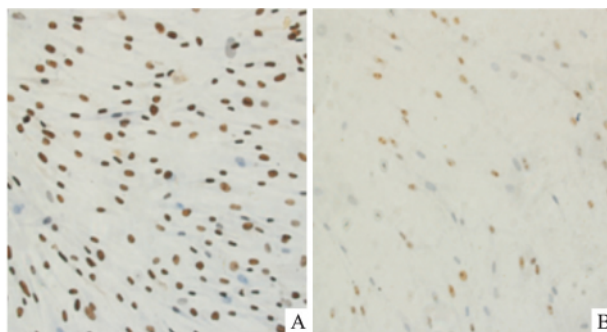


图 1 PCNA 在人病理性瘢痕成纤维细胞中的表达 DAB × 400

A: 空白对照组; B: 2 μg/ml TSG-6 干预组

2.2 TSG-6 促进人病理性瘢痕成纤维细胞凋亡 流式细胞仪检测结果显示: 对数生长期细胞消化重悬, 接种 6 孔培养板贴壁生长, 浓度为 0、2 μg/ml 的 TSG-6 处理 48 h 后, 细胞凋亡率分别为 0、12.43%, TSG-6 干预组细胞凋亡率较空白对照组增高, 差异有统计学意义, 见图 2。Western blot 法检测显示, 以

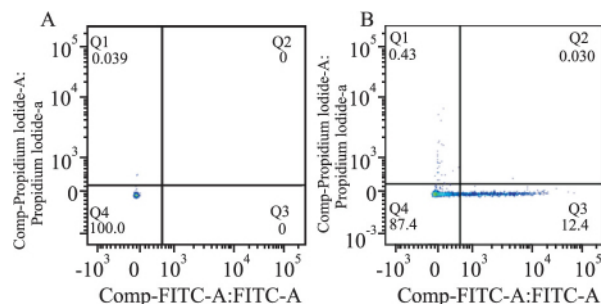


图 2 流式细胞仪分析人病理性瘢痕成纤维细胞的凋亡

A: 空白对照组; B: 2 μg/ml TSG-6 干预组

β -actin 作参照, TSG-6 干预组 p53 蛋白相对定量明显高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($n=6, t=2.903, P<0.05$); 同时 TSG-6 干预组 caspase3 蛋白相对定量明显高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($n=6, t=5.666, P<0.01$), 见图 3、4。

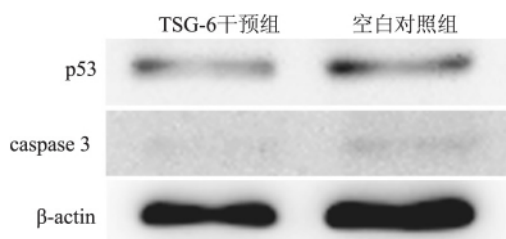


图3 Western blot 检测成纤维细胞中 p53、caspase3 蛋白表达

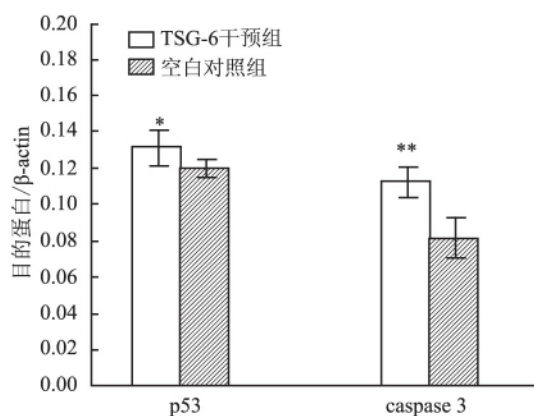


图4 TSG-6 干预组及空白对照组成纤维细胞中 p53、caspase3 蛋白相对定量

与空白对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

病理性瘢痕一旦产生就无法完全消除, 虽然当前病理性瘢痕的治疗方法很多, 主要包括外科手术、加压、放射和药物注射治疗^[3], 但治疗后病理性瘢痕再次复发率高, 疗效达不到完全满意。有关病理性瘢痕的防治目前仍然是国际上的医学难题, 寻求更为有效、理想的病理性瘢痕治疗方法为临床迫切所需。

在临床治疗病理性瘢痕的过程中发现, 组织损伤后形成病理性瘢痕的创面在恢复的过程中往往伴随着感染, 在一定程度上提示了病理性瘢痕的形成与炎症反应密切相关^[4]。近年, 越来越多的学者认为病理性瘢痕的形成是一种纤维化的病理过程, 组织损伤后的炎症反应与纤维化病理过程以及其反应

程度紧密相关, 而炎症反应是组织损伤后纤维化病理变化的部分或主要原因^[5-7], 有报道^[8]称通过某些抗炎作用减少瘢痕形成是一种已被证实的有效的治疗方法。因此, 通过抗炎作用以期治疗病理性瘢痕为近年相关领域研究热点之一。

TSG-6 基因位于人染色体 2q23.3, mRNA 全长为 1 440 bp, 开放阅读框为 77 ~ 910, 主要编码由 277 个氨基酸残基组成的一种分泌性蛋白质, 相对分子质量为 $31\ 203 \times 10^3$, 第 1 ~ 19 位氨基酸残基为信号肽。TSG-6 基因是一个保护性的炎症反应基因, 其参与多种炎症反应性疾病, 主要发挥抗炎以及细胞外基质重塑等作用^[9]。继 Tan et al^[10]首次证明抗炎因子 TSG-6 表达的减少可能是导致病理性瘢痕形成的一个重要因素以来, 洪学哲等^[11]研究发现 TSG-6 可能具有抑制病理性瘢痕形成的作用。唐悦玲等^[12]研究 TSG-6 对病理性瘢痕成纤维细胞凋亡的影响, 发现 TSG-6 对病理性瘢痕有抑制增殖促进凋亡的作用, 机制可能与 TSG-6 调节成纤维细胞内 Bcl-2、Bax 表达有关。Wang et al^[13]通过建立兔耳病理性瘢痕模型, 研究证实 TSG-6 对兔耳病理性瘢痕有显著抑制作用。

病理性瘢痕组织学主要表现为成纤维细胞的过度增殖及细胞外基质的过度聚集^[10-11], 创伤后的皮肤愈合过程中^[12], 作为伤口愈合和瘢痕增生的主要效应细胞, 成纤维细胞活化增殖合成胶原以及分化异常, 可直接导致病理性瘢痕的形成。因此, 抑制成纤维细胞的增殖或诱导成纤维细胞凋亡成为治疗病理性瘢痕的关键^[13]。本研究显示, TSG-6 在体外能够抑制人病理性瘢痕成纤维细胞的增殖, 其抑制作用可能与 TSG-6 通过抑制 PCNA 基因表达有关。另一方面, 流式细胞仪检测分析显示 $2\ \mu\text{g/ml}$ TSG-6 作用于人病理性瘢痕成纤维细胞 48 h 后, 细胞凋亡率明显增高。因此, TSG-6 在体外能诱导或促进人病理性瘢痕成纤维细胞凋亡, 其作用可能与 TSG-6 诱导 p53、caspase3 蛋白表达有关。

综上所述, TSG-6 蛋白对体外培养的病理性瘢痕成纤维细胞具有抑制增殖及促进凋亡的作用, 这可能与提高细胞凋亡相关蛋白 p53 及 caspase3 表达相关。成纤维细胞作为病理性瘢痕主要功能细胞, 抑制其增殖、促进其凋亡是瘢痕治疗的重要研究方向, 本实验证实 TSG-6 对人病理性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡具有调控作用, 为病理性瘢痕的治疗提供了新的研究方向和一定的实验基础, 然而具体作用机制尚不清楚, 仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Lee R H, Pulin A A, Seo M J, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 54–63.
- [2] Tan K T, McGrouther D A, Day A J, et al. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2011, 25(3): 317–27.
- [3] 付小兵, 程 彪. 病理性瘢痕治疗现状与展望 [J]. *中华整形外科杂志*, 2006, 22(2): 146–9.
- [4] Pradhan L, Cai X, Wu S, et al. Gene expression of pro-inflammatory cytokines and neuropeptides in diabetic wound healing [J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): 336–42.
- [5] Mak K, Manji A, Gallant-Behm C, et al. Scarless healing of oral mucosa is characterized by faster resolution of inflammation and control of myofibroblast action compared to skin wounds in the red Duroc pig model [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 56(3): 168–80.
- [6] Theoret C. Tissue engineering in wound repair: the three “R”s—repair, replace, regenerate [J]. *Vet Surg*, 2009, 38(8): 905–13.
- [7] 洪学哲, 李小静, 宁金龙. TSG-6 在病理性瘢痕的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(6): 685–7.
- [8] 唐悦玲, 李小静, 陈 钊, 等. TSG-6 对病理性瘢痕成纤维细胞凋亡的影响 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2014, 25(3): 157–60.
- [9] Wang H, Chen Z, Li X J, et al. Anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 751: 42–9.
- [10] 段红梅, 吴志远, 江黎明. 皮肤创伤在胚胎内外愈合过程中基因差异表达 [J]. *广西医学*, 2009, 31(9): 1252–3.
- [11] Shaker S A, Ayuob N N, Hajrah N H. Cell talk: a phenomenon observed in the keloid scar by immunohistochemical study [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2011, 19(2): 153–9.
- [12] 吴志远, 罗少军, 江黎明. 隐丹参酮对兔耳增生性瘢痕组织的影响 [J]. *广西医学*, 2008, 30(7): 1012–3.
- [13] Gauglitz G G, Korting H C, Paviciv T, et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies [J]. *Mol Med*, 2011, 17(1–2): 113–25.

Effects of TSG-6 on the proliferation and apoptosis of human pathological scar fibroblasts

Zhang Suwen, Li Xiaojing, Chen Zhao, et al

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effects of tumor necrosis factor-stimulated gene 6 (TSG-6) on the proliferation and apoptosis of human pathological scar fibroblasts. **Methods** The samples were harvested from human pathological scar tissue, a total of 6 cases, and then were cultured to pathological scar fibroblasts with adherence method. Cells used in this study were propagated for 3–4 times before use. The pathological scar fibroblasts were cultured with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of recombinant human TSG-6 protein for 48 h. The effects of TSG-6 on cell proliferation were then assessed by immunohistochemical method at the indicate time. The rate of apoptosis induced by TSG-6 was determined by flow cytometry. Western blot was performed to detect the expression levels of caspase-3 and p53 after TSG-6 was treated. **Results** After treated with TSG-6 for 48 h, cells expressing proliferating cell nuclear antigen, an indicator of cell proliferation, reduced significantly ($P < 0.05$). On the other hand, the rate of apoptosis of pathological scar fibroblasts induced by TSG-6 with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was increased ($P < 0.05$). The expression levels of apoptosis related proteins caspase-3 and p53 were significantly increased in TSG-6 treated group. **Conclusion** TSG-6 may inhibit proliferation and induce apoptosis of human pathological scar fibroblast *in vitro*. The inhibition of proliferation might be caused by inhibition of PCNA gene expression, and the induction of apoptosis might be associated with promotion expression of caspase-3 and p53.

Key words TSG-6; pathological scar; fibroblasts; cell proliferation; apoptosis