

重组人内抑素对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

张晓明¹, 余建^{1,2}, 黄学应¹, 邓雪飞¹, 李小静³

摘要 目的 观察重组人内抑素(rhEndostatin)对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞(HSFs)增殖的影响,探讨rhEndostatin抑制HSFs增殖的相关机制。方法 制备兔耳增生性瘢痕(HS)模型,分离、培养并鉴定兔耳HSFs;应用四甲基偶氮唑盐(MTT)法和流式细胞仪分别检测rhEndostatin对HSFs增殖和周期的影响。结果 分离培养的兔耳细胞经波形蛋白免疫细胞化学染色检测呈阳性。rhEndostatin对HSFs增殖的抑制效应与浓度和作用时间呈依赖关系,测得IC₅₀值为100 mg/L。与正常对照组细胞相比,HSFs G₁期细胞比例减少($P < 0.01$) S期和G₂/M期细胞比例增加($P < 0.01$);与模型组细胞相比,rhEndostatin组细胞G₁期比例增加($P < 0.01$) S期和G₂/M期细胞比例减少($P < 0.01$)。结论 rhEndostatin可抑制兔耳HSFs增殖,该作用可能与其引起HSFs细胞周期G₁期阻滞相关。

关键词 重组人内抑素;增生性瘢痕;增殖;细胞周期;流式细胞术

中图分类号 R 587.1; R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0264-05

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是皮肤创伤后组织过度修复引起的纤维增生性疾病,术后发病率可达40%~70%,烧伤后则高达91%;临床表现为凸于周围正常皮肤的异常增生,色红或粉红,多伴有瘙痒、疼痛等症状,不仅影响美观,还可发生瘢痕性挛缩,特别是造成关节严重功能障碍,给患者身心健康带来极大危害^[1-3]。其组织学特点是成纤维细胞过度增殖,胶原等细胞外基质大量合成、分泌和过度沉积,血管增生^[4]。内抑素是从小鼠血管内皮瘤细胞培养上清液中分离出来的一种蛋白质,可特异性抑制新生血管内皮细胞增殖,并诱导其凋亡而发挥抗肿瘤效应^[5-7]。前期研究^[8]显示,重组人内抑素(recombinant human endostatin, rhEndostatin)可抑制兔耳创面瘢痕增生,减少其血管生成和胶原沉积等。该研究拟在此基础上进一步观察rhEndostatin对增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblasts, HSFs)增殖的影响,探讨其抗瘢痕增生的作

2014-11-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171819、81272107);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012Z166)

作者单位:¹安徽医科大学人体解剖学教研室,合肥 230032

²湖北省宜昌市第一人民医院,宜昌 443000

³安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:张晓明,男,硕士,讲师;

黄学应,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

hxy8676@126.com

VZV vaccination efficiency. **Methods** Constructing eukaryotic expression plasmid pCDNA3.1-gE, which contained coding gene for the extracellular domain of VZV gE. The authenticity of the insert was confirmed by DNA sequencing before it was transfected into COS-7 cells. G418 was used to select the cell line that stably expressed VZV gE fusion protein. VZV gE gene expression in those cells was recognized by RT-PCR, and corresponding protein expression was demonstrated by Western blot and immunofluorescence. An ELISA assay was developed with the use of Ni²⁺-NTA column purified gE as the coating antigen, and the assay was then used to detect IgG antibodies against VZV in 127 serum specimens of normal children. **Results** COS-7 cell lines that stably expressed VZV gE extracellular domain protein was cloned successfully. mRNA encoding gE was determined by RT-PCR. The gE has obvious immunoreactivity detected by Western blot and indirect immunofluorescence. Western blot proved the expression of recombinant gE fusion protein in both cells and culture supernatant of the COS-7 cells. The total gE protein was 0.632 mg/ml and the purity was nearly 90%. The serological test detected VZV-IgG antibody in 81.89% of the 127 serum specimens from normal children. The specificity and the sensitivity of this ELISA test were 93.75% and 88.24% respectively. **Conclusion** COS-7 cell lines that efficiently express gE extracellular domain protein was obtained, and an ELISA based serology test was developed and validated. The test is not only beneficial to the epidemiological studies of VZV infection, but also to the screen individuals that are at risk of VZV infection.

Key words varicella-zoster virus; glycoprotein E; stable eukaryotic expression; serology test

用机制,为临床上 HS 药物治疗及寻找其治疗新靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新西兰大耳兔 6 只,雌雄不限(不含孕兔) 2.0~2.5 kg/只,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 rhEndostatin 注射液(山东先声麦得津生物制药有限公司,批号 201201001);5-氟尿嘧啶(5-FU)(上海旭东海普药业有限公司,批号 1201081);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青有限公司);胰蛋白酶、DMSO、四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司);小鼠抗兔波形蛋白单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);细胞周期检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所)。

1.1.3 仪器 超净工作台(SW-CJ-1F,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);CO₂ 培养箱(Shellab 2323,美国 SHELLAB 公司);倒置相差显微镜(XDS-1B,重庆光电仪器总公司);酶联免疫检测仪(ELX800,美国 Bio-Tek 公司);流式细胞仪(COULTER EPICS XL-MCL,美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔耳 HSFs 的分离、培养与鉴定 6 只新西兰大耳兔分为:正常组($n=3$)、HS 模型组($n=3$),单笼单只饲养,兔耳 HS 模型制备参照本实验室建立的方法进行^[8],每耳 2 个创面,共计 12 个。术后第 28 天处死实验兔,取出兔耳 HS 组织和正常兔耳真皮组织,超净台内剔除表皮和皮下组织,PBS、DMEM 充分漂洗后,用眼科剪将组织块剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块,接种于含 10% 胎牛血清的培养瓶底壁,置入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。每 3 d 更换 1 次培养液,2~3 周后,待原代细胞覆盖瓶底约 70% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:2 的比例传代培养。实验用传 2 代细胞。

兔耳 HSFs 的鉴定采用 SP 免疫细胞化学法:0.25% 胰蛋白酶消化传 2 代培养的兔耳 HSFs,接种于放有盖玻片的 6 孔培养板中,置入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。取出盖玻片,PBS 漂洗、4% 多聚甲醛固定、室温下晾干后按试剂盒说明书操作。一抗为小鼠抗兔波形蛋白单克隆抗体,浓度为 1:100,DAB 显色,苏木精复染,光镜下观察并摄

片。阴性对照以 PBS 代替一抗,其余操作同上述步骤。

1.2.2 rhEndostatin 对兔耳 HSFs 增殖的影响 取传 2 代培养的兔耳 HSFs,经 0.25% 胰蛋白酶消化后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液配成细胞密度为 5×10^7 /L 的单细胞悬液,接种于 3 块 96 孔培养板中,每孔 100 μ l,共分 6 组:6.25、12.5、25、50、100 mg/L rhEndostatin 组和空白对照组(加细胞不加药),另设调零组(只加培养液,不加细胞),每组设 6 个复孔。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,rhEndostatin 组细胞加入上述终浓度的 rhEndostatin,继续培养 24、48、72 h。终止培养前 4 h 弃去培养液,每孔加入 180 μ l 培养液和 20 μ l MTT 溶液(5 g/L),37 °C 孵育 4 h,弃上清液,每孔加 150 μ l DMSO 振荡混匀,用酶联免疫检测仪检测波长 492 nm 下各孔光密度(optical density, OD) 值。相对抑制率(%) = [(对照孔平均 OD 值 - 加药孔平均 OD 值) / 对照孔平均 OD 值] × 100%,求接近半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration of a substance, IC₅₀)。实验重复 3 次,同时观察并记录细胞形态的变化。

1.2.3 rhEndostatin 对 HSFs 周期的影响 取传 2 代培养的兔耳 HSFs 和正常兔耳真皮成纤维细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成 2×10^7 /L 单细胞悬液,接种于 6 孔培养板中。实验共分 4 组:正常对照组、模型组、rhEndostatin 组和 5-FU 对照组,用不含血清的 DMEM 培养液培养细胞 24 h,使细胞周期同步化;弃去培养液,加入完全培养基(rhEndostatin 组培养基中含终浓度为 100 mg/L 的 rhEndostatin;5-FU 对照组培养基中含终浓度为 500 mg/L 的 5-FU),继续培养 48 h 后收集细胞,流式细胞仪检测细胞周期,每组各测 3 个样本。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 兔耳 HSFs 的培养与鉴定 兔耳 HSFs 为贴壁细胞,组织块接种后 4~6 d 可见许多小圆形细胞从其周边游出,7~9 d 出现少量长梭形和扁平星形细胞,随着时间的推移,此类细胞逐渐增多并以组织块为中心呈放射状或旋涡状生长排列,16~18 d 细胞融合成致密的单层,以长梭形和扁平星形细胞为主,折光性好,其间散在分布有少量圆形细胞。传代培养后,细胞生长速度较原代快,细胞形态也较为均

一,呈长梭形并伸出突起。波形蛋白免疫细胞化学染色可见胞质内大量棕黄色颗粒,呈阳性反应,表明原代培养的细胞为 HSFs。见图 1。

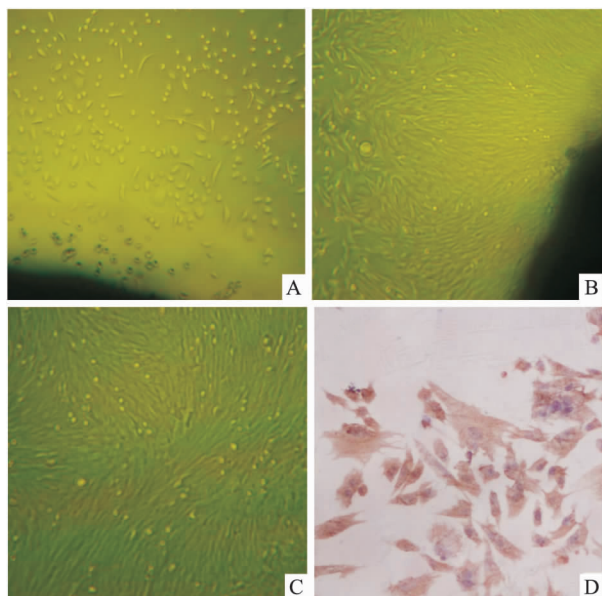


图1 兔耳 HSFs 的培养和鉴定

A: 原代培养 7 d $\times 100$; B: 原代培养 18 d $\times 100$; C: 传 2 代培养 5 d $\times 100$; D: 波形蛋白染色 $\times 400$

2.2 rhEndostatin 对兔耳 HSFs 增殖能力的影响

与空白对照组比较, rhEndostatin (6.25、12.5、25、50、100 mg/L) 组作用 24 h 后, HSFs 形态均无明显变化; 作用 48 h 后, 仅见 50、100 mg/L rhEndostatin 组细胞生长缓慢、数量减少、梭状突起回缩、胞体变小、变圆、部分细胞呈单极或不规则形态生长、细胞间空隙变大、极性紊乱、排列不规则、部分细胞脱落悬浮于培养液中; 作用 72 h 后, 50、100 mg/L rhEndostatin 组细胞数量仍较少, 但较 48 h 稍多。见图 2。

MTT 结果显示: rhEndostatin 对兔耳 HSFs 增殖的抑制作用与浓度和作用时间呈一定依赖关系。与空白对照组相比, 6.25 mg/L rhEndostatin 组在各时间段对 HSFs 增殖的抑制效果均不明显, 差异无统计学意义; 12.5 mg/L 组在作用 48 h 后对 HSFs 的增殖有抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 随着浓度的增高, rhEndostatin 抑制 HSFs 增殖的作用效果增强 ($P < 0.01$), 其中, 100 mg/L 组作用 48 h 时抑制作用达到峰值, IC_{50} 值为 100 mg/L, 因此选用浓度为 100 mg/L 的 rhEndostatin 用于后续实验。各组作用 72 h 后, 抑制率较 48 h 减少。见表 1、图 3。

2.3 rhEndostatin 对兔耳 HSFs 细胞周期的影响

流式细胞仪检测和分析结果显示: 正常对照组兔耳

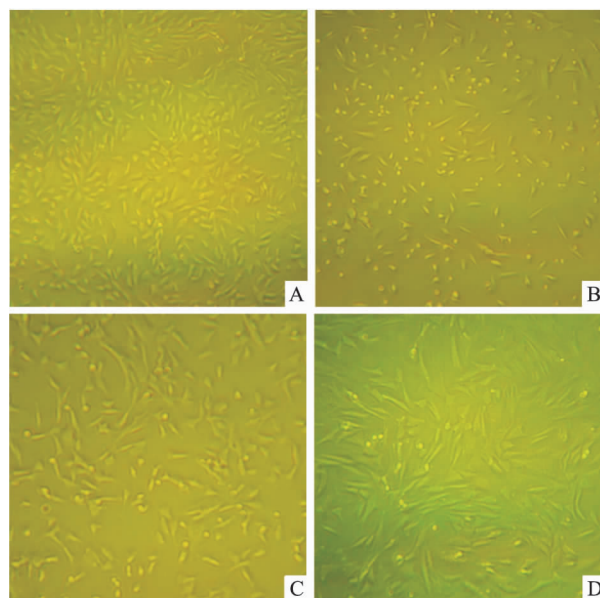


图2 rhEndostatin(100 mg/L)作用后不同

时间段 HSFs 形态及数量变化 $\times 100$

A: 空白对照组 48 h; B: rhEndostatin 组 24 h; C: rhEndostatin 组 48 h; D: rhEndostatin 组 72 h

表1 rhEndostatin 对 HSFs 的生长抑制作用 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	OD 值			F 值
	24 h	48 h	72 h	
空白对照	0.301 $\pm$ 0.040	0.607 $\pm$ 0.045	0.666 $\pm$ 0.096	189.200
rhEndostatin (mg/L)				
6.25	0.288 $\pm$ 0.032	0.576 $\pm$ 0.059	0.644 $\pm$ 0.021	541.840
12.5	0.263 $\pm$ 0.079	0.503 $\pm$ 0.087*	0.578 $\pm$ 0.095*	548.147
25	0.251 $\pm$ 0.035*	0.458 $\pm$ 0.036**	0.516 $\pm$ 0.049**	349.835
50	0.228 $\pm$ 0.049**	0.380 $\pm$ 0.042**	0.456 $\pm$ 0.036**	200.961
100	0.222 $\pm$ 0.031**	0.303 $\pm$ 0.016**	0.394 $\pm$ 0.040**	156.012

与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

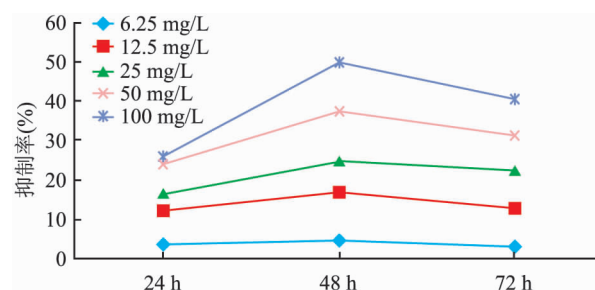


图3 rhEndostatin 对 HSFs 抑制作用的量效时效关系曲线

真皮成纤维细胞周期主要停留在 G_0/G_1 期, S 期和 G_2/M 期细胞较少。与正常对照组相比, 模型组 HSFs G_1 期细胞比例减少, S 期和 G_2/M 期细胞比例增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。rhEndostatin (100 mg/L) 作用 48 h 后, HSFs 细胞周期发生明显

表2 各组 HSFs 细胞周期分布($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

细胞周期分布(%)	正常对照	模型	rhEndostatin	5-FU 对照	F 值
G_0/G_1	69.61 ± 2.95	$39.93 \pm 3.17^{**}$	$77.90 \pm 2.86^{***\#\#}$	$66.38 \pm 2.28^{***\#\#}$	325.25
S	24.30 ± 1.61	$47.12 \pm 1.53^{**}$	$2.80 \pm 1.21^{***\#\#}$	$28.76 \pm 1.35^{***\#\#}$	906.42
G_2/M	5.90 ± 1.37	$12.90 \pm 2.12^{**}$	$19.30 \pm 1.65^{***\#\#}$	$4.84 \pm 1.23^{\#\#}$	454.06

与正常对照组比较: $**P < 0.01$; 与模型组比较: $\#\#P < 0.01$

改变,与模型组细胞相比, G_1 期细胞比例增加($P < 0.01$),高于正常对照组水平($P < 0.01$),S 期细胞比例减少($P < 0.01$),低于正常对照组水平($P < 0.01$), G_2/M 期细胞比例则增高($P < 0.01$),并高于正常对照组水平($P < 0.01$)。5-FU 对照组各期与正常组(G_2/M 期除外)和模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表2、图4。

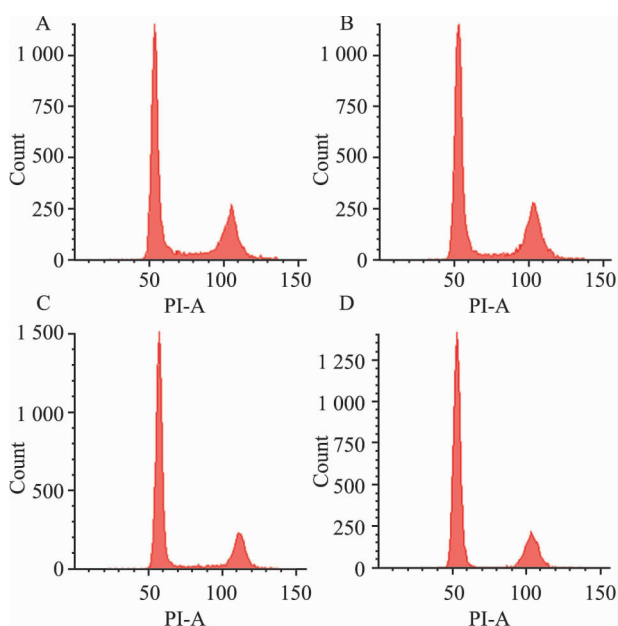


图4 流式细胞仪检测各组细胞周期分布

A: 正常对照组; B: 模型组; C: rhEndostatin 组; D: 5-FU 对照组

3 讨论

HS 是整形外科的常见疾病之一,传统的治疗方法如手术切除、硅胶、冷冻疗法、皮质类固醇激素、抗代谢药、免疫抑制剂和放射疗法等,均因易复发或有严重的不良反应而限制了临床应用。近期研究^[9]显示成纤维细胞是参与组织修复的主要功能细胞,正常皮肤成纤维细胞与 HSFs 具有不同的基因表现型、形态特征以及生长特性等,修复过程发生异常可以导致成纤维细胞过度增殖,转化为 HSFs,产生过多的胶原等细胞外基质,经过一系列复杂的作用过程,最终导致瘢痕的形成,因此探讨影响 HSFs 增

殖、凋亡的因素,对防治 HS 具有重要意义。兔耳 HS 模型是目前较为成熟的动物模型之一^[10],本研究通过体外培养兔耳 HSFs,观察 rhEndostatin 对 HSFs 增殖和周期的影响,探讨其作用机制。

rhEndostatin 目前主要用于抗肿瘤治疗,除可特异性抑制新生血管内皮细胞增殖、诱导其凋亡外,还可直接抑制部分肿瘤细胞增殖、迁移并诱导其凋亡^[11-13]。近年研究^[14]显示, rhEndostatin 对某些组织过度增生性疾病,如佐剂性关节炎大鼠模型等有治疗作用,可直接抑制成纤维样滑膜细胞的增殖,并诱导其凋亡。本研究显示 rhEndostatin 对兔耳 HSFs 的增殖抑制作用与 rhEndostatin 的浓度和作用时间呈正相关。在 48 h 内,随着药物浓度的增高,作用时间的延长,增殖抑制作用越明显,这与形态学观察结果是一致的。超过 48 h 则作用减弱,可能与药物浓度的衰减有关。

MTT 结果表明 rhEndostatin 能抑制兔耳 HSFs 的生长,推测 rhEndostatin 能导致兔耳 HSFs 周期阻滞。细胞周期中存在两个关键调控点,一个是调控 DNA 复制开始的 G_1/S 转换期,另一个是有丝分裂和细胞分化前的 G_2/M 期。进一步通过流式细胞仪检测细胞周期,结果显示,与正常组相比,HS 模型组 G_1 期比例明显减少, S 期和 G_2/M 期细胞比例增加,表明 HS 模型组成纤维细胞增殖活跃; 100 mg/L rhEndostatin 作用 48 h 后, HSFs 细胞周期发生显著改变,和模型组相比, G_1 期细胞增多,高于正常组水平, S 期细胞比例下降,低于正常组水平,差异有统计学意义。以上结果提示 rhEndostatin 抑制 HSFs 增殖的机制可能与细胞周期受阻有关, G_1 期细胞不能通过周期检测点进入 S 期而发生 G_0/G_1 期阻滞,阻断 DNA 合成,干扰 HSFs 周期正常进行,进而发挥抑制效应,与相关研究^[14]结果一致。

综上所述, rhEndostatin 可抑制兔耳 HSFs 的增殖,其作用可能通过周期阻滞,抑制 G_1/S 期转换,干扰细胞周期调控而达到抑制增殖的目的。该课题为 HS 的临床治疗提供了实验依据,但 rhEndostatin 抑制 HSFs 增殖的机制并未完全阐明,其相关的分子机制还有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Gauglitz G G, Korting H C, Pavicic T, et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies[J]. *Mol Med*, 2011, 17(1-2): 113-25.
- [2] Rahban S R, Garner W L. Fibroproliferative scars[J]. *Clin Plast Surg*, 2003, 30(1): 77-89.
- [3] Armour A, Scott P G, Tredget E E. Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment[J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(4): 582.
- [4] Cui W, Cheng L, Hu C, et al. Electrospun poly(L-lactide) fiber with ginsenoside rg3 for inhibiting scar hyperplasia of skin[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68771.
- [5] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-85.
- [6] Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis[J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3403-11.
- [7] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M J, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis[J]. *Biol Chem*, 1999, 274(17): 11721-6.
- [8] 余建, 张晓明, 黄学应, 等. 重组人内抑素抑制创面瘢痕增生的实验研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(7): 891-5.
- [9] Wang J, Dodd C, Shankowsky H A, et al. Wound Healing Research Group. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring[J]. *Lab Invest*, 2008, 88(12): 1278-90.
- [10] 李荟元. 增生性瘢痕动物实验模型应用最新动态[J]. *中国美容医学*, 2013, 22(13): 1455-61.
- [11] Wilson R F, Morse M A, Pei P, et al. Endostatin inhibits migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2B): 1289-95.
- [12] Zhang Y, Zhang J, Jiang D, et al. Inhibition of T-type Ca^{2+} channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166(4): 1247-60.
- [13] Li S, Wei J, Yuan L, et al. RGD-Modified endostatin peptide 30 derived from endostatin suppresses invasion and migration of hepG2 cells through the avb3 pathway[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(5): 529-38.
- [14] 黄学应, 陈飞虎, 张晓明, 等. 重组人内抑素对佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞周期和 PCNA 表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(5): 649-53.

Effects of recombinant human endostatin on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts derived from rabbit ears *in vitro*

Zhang Xiaoming¹, Yu Jian^{1,2}, Huang Xueying¹, et al

(¹Dept of Anatomy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The First People's Hospital of Yichang, Yichang 443000)

Abstract Objective To observe the effects of recombinant human endostatin (rhEndostatin) on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts (HSFs) derived from rabbit ears, and to explore the related mechanism of rhEndostatin inhibiting HSFs proliferation. **Methods** To establish the model of hypertrophic scar in rabbit ears, and isolate, culture and identify HSFs of rabbit ears; MTT assay and flow cytometry were used to detect respectively the effects on proliferation and cell cycle of HSFs affected by rhEndostatin. **Results** The cells stained positive for vimentin. rhEndostatin inhibited HSFs proliferation in a concentration- and time-dependent manner, and IC_{50} values measured for the 100 mg/L. The percentage of cells in G_1 phase in HSFs decreased ($P < 0.01$), and the rate of cells in S and G_2/M phase increased ($P < 0.01$), compared with that in normal control groups. The percentage of cells in G_1 phase in HSFs treated with rhEndostatin increased ($P < 0.01$), and the rate of cells in S and G_2/M phase decreased ($P < 0.01$), compared with that in model groups. **Conclusion** RhEndostatin can inhibit the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts derived from rabbit ears *in vitro*, which may be related with the G_1 phase retardation in HSFs.

Key words recombinant human endostatin; hypertrophic scar; proliferation; cell cycle; flow cytometry