

· 论 著 ·

结缔组织生长因子反义寡核苷酸体外对人增生性瘢痕成纤维细胞凋亡的影响

许 明, 邢 新* (第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察结缔组织生长因子(CTGF)反义寡核苷酸(ASODN)体外对人增生性瘢痕组织中成纤维细胞凋亡的影响并探讨其可能的作用机制。**方法:**体外培养的人增生性瘢痕组织中成纤维细胞,分为CTGF-ASODN脂质体治疗组(ASODN treatment, AT)、空白脂质体对照组(liposome control, LC)和空白对照组(control, C),荧光显微镜观察各组CTGF-ASODN时相性分布,流式细胞术检测各组凋亡率随时相的变化,观察Fas受体表达;RT-PCR检测各组CTGF、Fas、bcl-2 mRNA的表达。**结果:**AT组细胞转染24 h后胞质内可见有大量黄绿色荧光,呈离散型、点状分布,而LC和C组成纤维细胞内未见荧光。转染24 h后LC组和C组成纤维细胞的凋亡率及Fas受体阳性表达率无显著差异;而AT组凋亡率及Fas受体阳性表达率明显增加,明显高于LC组和C组($P < 0.01$)。RT-PCR结果表明,转染组CTGF mRNA相对表达量明显低于空白对照组($P < 0.05$),Fas mRNA表达明显高于空白对照组($P < 0.01$),转染组bcl-2 mRNA与空白对照组无显著差异。**结论:**CTGF反义寡核苷酸体外能促进人增生性瘢痕成纤维细胞凋亡,可能与其上调Fas mRNA及其蛋白表达有关。

[关键词] 瘢痕,肥大性;成纤维细胞;结缔组织生长因子;寡核苷酸类,反义;细胞凋亡;Fas

[中图分类号] R 62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0822-05

Effects of antisense oligonucleotide of connective tissue growth factor on apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts and the related mechanism

XU Ming, XING Xin* (Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the effects of antisense oligonucleotide (ASODN) of connective tissue growth factor (CTGF) on the apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts (HSF) and the related mechanisms. **Methods:** The hypertrophic scar fibroblasts were cultured *in vitro* and were divided into the following 3 groups: CTGF-ASODN-treated group, liposome control group and blank control group. The distribution of CTGF-ASODN in HSF of different phases was observed under fluorescent microscope in 3 groups. Flow cytometer was employed to detect the apoptotic rate of HSF and the expression of Fas. The expression of CTGF, Fas and bcl-2 mRNA in HSF was assessed by RT-PCR. **Results:** 24 h after transfection, large quantity of yellow-green fluorescence was seen in the HSF cytoplasm of CTGF-ASODN group in a scattered or doted manner, but not found in that of the other 2 groups. The apoptosis rate of HSF in CTGF-ASODN group was significantly higher than those in the other 2 groups ($P < 0.01$). RT-PCR result showed that CTGF mRNA expression in transfection group was significantly lower than that in the blank control group ($P < 0.05$) and the Fas mRNA expression was significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.01$); the expression of bcl-2 mRNA had no significant difference between the 2 groups. **Conclusion:** CTGF-ASODN can promote the apoptosis of HSF *in vitro*, which might be related to the up-regulation Fas gene.

[KEY WORDS] cicatrix, hypertrophic; fibroblasts; connective tissue growth factor; oligonucleotides, antisense; apoptosis; Fas

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 822-826]

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是人类皮肤真皮损伤后局部过度愈合的结果。但是由于发病机制还不清楚,临床上也缺乏特别有效的预防和根治性治疗手段。因此HS一直是整形外科研究领域的难点和热点。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种在纤维化病程中发挥重要作用的生长因子,其过度表达与某些纤维化性疾病(如硬皮病、肾纤维化、肝硬化、肺纤维化、

动脉粥样硬化等)的发生、发展密切相关^[1-3]。本研究应用脂质体转染技术观察CTGF反义寡核苷酸体外对人增生性瘢痕成纤维细胞凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制,为进一步应用基因工程技术治疗病理性瘢痕奠定基础。

[作者简介] 许明, 博士, 主治医师. E-mail: xmdoctor@sina.com
* Corresponding author. E-mail: xingxin56@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 Fas引物、CTGF引物、bcl-2引物、逆转录酶均购自南京基天生物技术有限公司,转染试剂 Transfectin 购自 Bio-Rad 公司,PE anti-human CD95 单克隆抗体购自 eBioscience 公司,琼脂糖由 Amresco 进口分装。美国 Beckman Coulter 公司 EPICS XL 型流式细胞仪,Leica 公司激光共聚焦显微镜,MJ Research 公司 PCR 仪,Heraeus BB5060 CO₂培养箱,Eppendorf 公司离心机。

1.2 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASODN)的合成 CTGF-ASODN 碱基序列为 5'-TAC TGG CGG CGG TCA T-3',进行全硫代磷酸化修饰及 5'-异硫氰酸荧光素(FITC,上海生工生物工程技术有限公司)标记。

1.3 增生性瘢痕组织来源的成纤维细胞的培养及分组 组织标本取自我科因增生性瘢痕自愿行手术治疗的患者,共 16 例,其中男性 6 例,女性 10 例,年龄 18~42 岁,中位年龄 33 岁,均为外观发红充血、质硬、高出皮面 1 cm 左右,病变不超过原创面或损伤,取材局部无感染和溃疡,未曾应用抗瘢痕药物治疗。组织标本采用组织块培养法。首先将采集到的人增生性瘢痕组织标本用含 100 U/ml 青霉素和链霉素的 PBS 冲洗数遍,在培养皿中剔除表皮及脂肪组织。然后用眼科剪将组织剪碎至 1 mm³小块,接种于 6 孔培养皿,放入 CO₂培养箱 4~6 h 干燥至组织块贴壁。每孔加入 1 ml 含 20% 小牛血清及 100 U/ml 青霉素和链霉素的 DMEM 培养液,放入 37℃ 5% CO₂培养箱继续培养,72 h 后陆续有梭形成纤维细胞爬出,补加 500 μ l 培养液,约 2 周后细胞长满可传代,转至细胞培养瓶进行培养。视细胞生长状况,3~5 d 传代一次。实验选用增殖旺盛,性状稳定的 4~8 代细胞。实验分 CTGF-ASODN 脂质体治疗组(ASODN treatment, AT)、空白脂质体对照组(liposome control, LC)和空白对照组(control, C) 3 组。

1.4 细胞转染 铺板:选取 T100 方瓶培养的细胞,吸出培养液,1 mol/L PBS 冲洗后加入 2 ml 0.25% 胰蛋白酶消化,4% 锥虫蓝染色后细胞计数,收集 1 \times 10⁶ 个细胞,重悬于 12 ml DMEM 培养液中,吹打均匀后铺板。24 孔板,每孔加 500 μ l;6 孔

板每孔加 2 ml。转染:铺板 24 h 后,细胞贴壁至 80% 融合,准备 2 个无菌 EP 管,各加入 50 μ l 无血清 DMEM 培养液(6 孔板每孔 200 μ l),吸取适量 ASODN 加入一管,适量转染试剂加入另一管,吹打均匀后轻柔混合两管。室温孵育 20 min,以便形成脂质体/DNA 混合物,加入细胞培养板,24 h 后换液。经转染优化实验,转染体系为 6 孔板每孔 1 μ g ASODN+2 μ l Transfectin。

1.5 CTGF-ASODN 在成纤维细胞中的分布 于转染后 24 h 收集各组培养板中长满细胞的载玻片,无血清 DMEM 培养液冲洗 3 遍后装片,于激光共聚焦显微镜下观察 CTGF-ASODN 在成纤维细胞中的分布及转染效率。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 应用美国 Beckman Coulter 公司的 EPICS XL 型流式细胞仪进行 DNA 含量的单参数分析,检测凋亡率随时相变化。分别收集转染后 12、24、48、72 h 细胞,每样本细胞数不少于 5 \times 10⁵ 个,1 500 r/min 离心 5 min,弃去培养液。3 ml PBS 洗涤 1 次,离心去除 PBS,加入冰预冷的 70% 的乙醇固定,4℃,1~2 h。离心弃去固定液,3 ml PBS 重悬 5 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS,1 ml PI 染液染色,避光孵育 30 min 即可上机检测。使用氩离子激光(488 nm)激发,其荧光发射波长为 630 nm,颜色为橙红色。根据凋亡率变化绘制凋亡随时相变化图。

1.7 流式细胞术检测 Fas 受体表达 分别收集转染后 12、24、48、72 h 细胞,每样本细胞数不少于 5 \times 10⁵ 个,1 500 r/min 离心 5 min,弃去培养液。PBS 洗涤 1 次,离心去除 PBS,4% 多聚甲醛固定,4℃ 过夜。离心收集细胞,PBS 洗涤 1 遍,重悬于 1 ml PBS 中,每样本加入 20 μ l 抗 Fas 单克隆抗体,温和混匀,4℃ 避光孵育 30 min,1 500 r/min 离心 5 min,去除染色液,PBS 洗涤 2 遍即可上机检测。本实验采用 PE 直标抗体,激发波长为 488 nm,发射波长为 575 nm。

1.8 RT-PCR 检测相关基因的表达

1.8.1 引物设计 采用 Primer Premier 5 软件设计引物,并经 GenBank Blast 进行同源检索后合成。CTGF 引物为:F 5'-GCC CAG ACC CAA CTA TGA-3';R 5'-AGC CAG AAA GCC CAA ACT-3',预期扩增产物长度为 252 bp。Fas 引物为:F 5'-AGC TCT TTC ACT TCG GAG GAT T-3';R 5'-TGG CAA AAG AAG AAG ACT AAG C-3',

预期扩增产物长度为 335 bp。Bcl-2 引物为: F 5'-ACA CTG TTA AGC ATG CCG-3'; R 5'-CCA GCT CAT CTC ACC TCA C-3',预期扩增产物长度为 318 bp。β-actin 引物为: F 5'-CAG GAG ATG GCC ACT GCC GCA-3'; R 5'-TCC TTC TGC ATC CTG TCA GCA-3',预期扩增产物长度为 275 bp。

1.8.2 细胞总 RNA 制备和鉴定 收集未处理和处理后 24 h 成纤维细胞, PBS 洗 2 次, 分别加入 1 ml TRIzol, 混匀, 在冰上放置 15 min 后加入氯仿, 振荡 15 s, 室温静置 2 min。4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 转移上层水相至 1.5 ml 离心管中, 加异丙醇混匀后, 冰上放置 10 min。4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。沉淀以 1 ml 75% 乙醇洗涤。4℃ 7 500×g 离心 5 min, 以 1 ml 无水乙醇洗涤沉淀, 室温晾干。用无 RNA 酶的水溶解 RNA 沉淀至 60 μl。取 10 μl 稀释 1 000 倍, 用 752 紫外分光光度计测量 D_{260} 与 D_{280} 。以 D_{260}/D_{280} 的比值确定 RNA 的完整性与纯度, 以 D_{260} 值确定 RNA 的量并稀释至终浓度为 1 μg/μl, 用甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 完整性。

1.8.3 RT-PCR 反应(两步法)检测 CTGF、Fas、bcl-2 mRNA 表达 RT 反应体系为: 六碱基随机引物 1 μl (150 ng), 无 RNA 酶的水 12 μl, 混匀 25℃, 预热 10 min。未处理和处理过细胞总 RNA 5 μl (1 μg/μl), dNTP Mix 1 μl, 混匀于 65℃, 放置 5 min。迅速置冰上至少 1 min, 加入 5×first-band

buffer 5 μl, 0.1 mol/L DTT 2 μl, RNase Inhibitor (40 U/μl) 1 μl, 混匀后 42℃ 2 min, 加入 1 μl (200 U/μl) Superscript II RNase H-Reverse transcriptase, 42℃ 50 min 后, 再 70℃ 20 min。逆转录反应后置于冰浴上加入 RNase H, 37℃ 放置 20 min 使逆转录酶灭活后进行 PCR 反应。

PCR 反应体系为: 5×PCR Buffer 5 μl, dNTPs (10 mmol/L) 1 μl, Taq 酶 0.3 μl, F、R 引物 (10 pmol/μl) 各 1 μl, 上述逆转录生成的 cDNA 2 μl, 无 RNase ddH₂O 36.7 μl, 混合后于 94℃ 4 min。PCR 反应条件: 94℃ 45 s, 54℃ 50 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min。

1.8.4 1% 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 产物 8 μl 和上样缓冲液 2 μl 混合上样, 与 pUC Mix DNA marker 一起在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离后, 溴化乙啶染色 10 min, 图像分析仪 (UVP) 拍照并分析结果。

1.9 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对各实验组数据进行单因素方差分析, 所用软件为 SPSS 10.0。

2 结果

2.1 CTGF-ASODN 在成纤维细胞内的分布 AT 组细胞转染 24 h 后细胞质内可见有大量黄绿色荧光, 呈离散型、点状分布 (图 1A), LC 组和 C 组成纤维细胞内未见荧光 (图 1B、1C)。

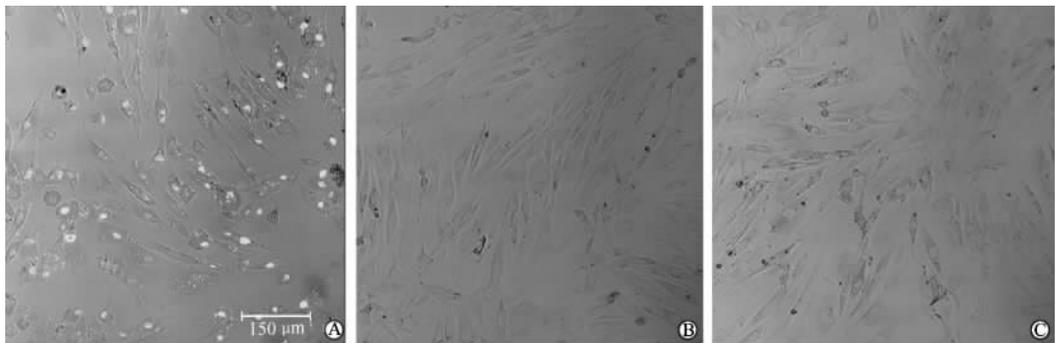


图 1 转染后各组细胞 CTGF-ASODN 的分布情况

Fig 1 Cytoplasmic distribution of fluorescence in HSF of 3 groups 24 h after transfection (FM, ×100)

A: CTGF-ASODN-treated group(24 h); B: Liposome control group; C: Blank control group

2.2 CTGF-ASODN 对成纤维细胞凋亡的影响 结果表明, 转染 24 h 后 LC 组和 C 组成纤维细

胞的凋亡率无显著差异; 而 AT 组凋亡率明显增加, 明显高于 LC 组和 C 组 ($P < 0.01$, 表 1)。

表1 转染后各组成纤维细胞凋亡率的比较

Tab 1 Effects of CTGF-ASODN on apoptosis of fibroblasts from hypertrophic scar

(n=3, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	Time after transfection(t/h)			
	12	24	48	72
CTGF-ASODN	6.53±0.65	24.56±0.44	20.15±0.57	35.60±0.35
Liposome control	4.05±0.82	2.92±0.63**	3.15±0.67**	1.83±0.39**
Blank control	5.67±0.26	4.18±0.85**	5.09±0.22**	3.53±0.29**

** P<0.01 vs CTGF-ASODN group

2.3 CTGF-ASODN对Fas受体表达的影响 转染后12 h AT、LC和C组增生性瘢痕成纤维细胞Fas受体阳性表达率无显著差异;AT组转染后24、48、72 h Fas受体阳性表达率均明显高于转染后12

h(P<0.05),而LC组和C组转染后24、48、72 h Fas受体阳性表达率与12 h无显著差异;转染后24、48、72 h各时间点AT组Fas受体阳性表达率明显高于LC组和C组(P<0.01)。详见表2。

表2 CTGF-ASODN对成纤维细胞Fas受体表达的影响

Tab 2 Effects of CTGF-ASODN on expression of Fas in fibroblasts from hypertrophic scar

(n=3, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	Time after transfection(t/h)			
	12	24	48	72
CTGF-ASODN	11.3±0.55	44.6±0.48	40.5±0.77	36.6±0.25
Liposome control	10.5±0.52	11.2±0.23**	13.5±0.60**	12.3±0.19**
Blank control	12.5±0.36	11.8±0.15**	12.9±0.32**	13.3±0.26**

** P<0.01 vs CTGF-ASODN group

2.4 CTGF、Fas、bcl-2 mRNA表达的变化 RT-PCR结果(图2)表明,转染组CTGF-ASODN作用24 h, CTGF mRNA相对表达量明显低于空白对照组(0.450 vs 0.863, P<0.05), Fas mRNA表达明显高于空白对照组(1.294 vs 0.090, P<0.01), bcl-2 mRNA两组间无显著差异(0.082 vs 0.084)。

3 讨论

CTGF是一种新近发现的间充质细胞生长因子,具有多种生物学活性。研究发现,病理情况下,GTGF的过度表达与器官增殖性或纤维化疾病的发生、发展密切相关。方明等^[1]发现CTGF在人类增生性瘢痕成纤维细胞中高度表达,提示其在增生性瘢痕的纤维化进程中起着重要的作用。而金哲等^[2]在研究肺纤维化时发现转染了CTGF反义寡核苷酸人成纤维细胞的增殖明显受到抑制,其CTGF mRNA的表达明显减少。金珍婧等^[3]实验发现在肝纤维化小鼠肝脏中CTGF mRNA的表达水平明显上调,提示CTGF在肝纤维化激活及调控中具有重要作用。Chen等^[4]的实验发现内源性的CTGF在活化的真皮成纤维细胞及肝星状细胞中是通过高尔基体分泌的,并在内涵体中被降解。

随着分子生物学和遗传工程的发展,基因治疗应运而生,得到广泛的肯定,其中包括反义核苷酸技术,简称反义技术。反义(antisense)的概念1967年被提出,1978年Zamecnik等首次报道反义寡核苷

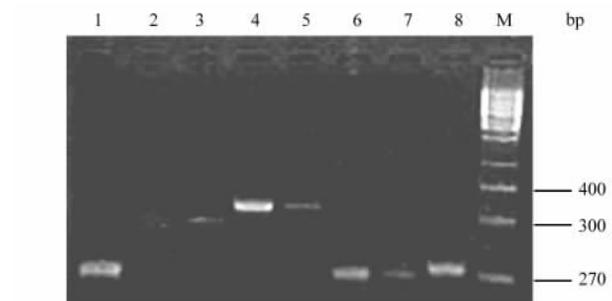


图2 转染与未转染成纤维细胞中CTGF、Fas、bcl-2 mRNA的表达

Fig 2 RT-PCR analysis of CTGF, Fas and bcl-2 mRNA expression in 3 groups 24 h after transfection

1: β -actin(transfection); 2: bcl-2(transfection); 3: bcl-2(control); 4: Fas(transfection); 5: Fas(control); 6: CTGF(control); 7: CTGF(transfection); 8: β -actin(control); M: DNA marker

酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)可抑制鸡肉瘤病毒的复制^[5]。针对癌基因、生长因子及其受体、信号转导通路等设计的 ASODN 已作为一种新的工具广泛应用于体内外生物进程机制的研究和作为一种有希望的药物用于治疗癌症、病毒感染等疾病^[6]。

刘剑毅等^[7-9]曾证明,在人病理性瘢痕组织中存在 CTGF 基因和蛋白质的高水平表达,且其变化趋势与病理性瘢痕组织自然演变过程相一致。因为目前缺乏理想的病理性瘢痕动物模型,动物实验条件尚不成熟,因此本研究应用 CTGF-ASODN 对体外培养的增生性瘢痕来源的成纤维细胞中的 CTGF 进行阻断,以阐明 CTGF 对增生性瘢痕凋亡的作用及机制。实验结果表明在脂质体介导下 CTGF-ASODN 能有效进入成纤维细胞内,随着时相改变,其转染效率增高,CTGF 基因表达下降,这表明 CTGF-ASODN 成功发挥了反义抑制作用。

Fas(CD95)是诱导细胞凋亡的重要膜蛋白分子,也被认为是介导成纤维细胞凋亡的最重要通道之一^[10]。Wassermann 等^[11]研究发现体外培养增生性瘢痕成纤维细胞 Fas 表达减少。本研究结果表明,CTGF-ASODN 可以有效阻断 CTGF 基因表达,并诱发成纤维细胞凋亡发生。Fas 作为目前凋亡研究中重要指标之一,在本实验中转染组较未转染组其表达明显增高。由此可以推测成纤维细胞的凋亡可能由 Fas 介导而发生。Wassermann 等^[11]通过研究增生性瘢痕患者和正常人外周血单核细胞表面凋亡调节蛋白的表达,发现增生性瘢痕组织中 bcl-2 蛋白的含量较正常对照明显升高,而体外培养的成纤维细胞却未发现 bcl-2 表达。本实验进一步证实,体外培养的增生性瘢痕成纤维细胞仅有微量 bcl-2 表达,并且经 CTGF-ASODN 转染后表达虽有降低趋势,但无显著改变,由此也可表明病理性瘢痕形成中细胞凋亡障碍可能与机体内环境有密切关系。

有研究^[12]发现在许多纤维化疾病中 CTGF 与 TGF- β_1 的表达同步增高。与 TGF- β_1 相比,在生理

状态下 CTGF 的表达水平很低,而且主要在间质细胞中表达,其作用范围也主要局限于结缔组织,因此在创伤修复或者纤维化疾病过程中,CTGF 可能是一种特异性更强的、更有选择性的干预结缔组织形成过程和替代 TGF- β_1 治疗纤维化疾病的靶细胞生长因子。因此,在创伤修复或纤维化过程中,阻断 CTGF 表达可能是较特异、较有效的治疗病理性瘢痕的方法。

[参考文献]

- [1] 方明,麦环,吴平. 结缔组织生长因子在病理性瘢痕成纤维细胞中的表达[J]. 实用医药杂志, 2005, 22: 330-332.
- [2] 金哲,秦培顺,张志军. CTGF 反义寡核苷酸治疗肺纤维化的实验研究[J]. 吉林医学, 2006, 27: 6-7.
- [3] 金珍婧,迟宝荣,马丽娜,等. CTGF-mRNA 在实验性肝纤维化中的表达[J]. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31: 55-57.
- [4] Chen Y, Segarini P, Raoufi F, et al. Connective tissue growth factor is secreted through the Golgi and is degraded in the endosome[J]. Exp Cell Res, 2001, 271: 109-117.
- [5] 陈忠斌,王升启. 抗肿瘤反义寡核苷酸药物研究现状和趋势[J]. 中国新药杂志, 2002, 11: 683-685.
- [6] 潘光锦,韩金祥. 反义核酸类药物的药理学研究进展[J]. 医学综述, 2002, 8: 302-304.
- [7] 刘剑毅,李世荣,纪淑兴,等. 病理性瘢痕中胶原纤维形态和结缔组织生长因子表达的检测[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25: 818-821.
- [8] 李世荣,刘剑毅,纪淑兴. 体外培养人增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成及结缔组织生长因子的表达[J]. 中华整形外科杂志, 2004, 20: 124-127.
- [9] 刘剑毅,李世荣,纪淑兴,等. 病理性瘢痕中结缔组织生长因子基因的表达[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17: 436-438.
- [10] Freiberg R A, Spencer D M, Choate K A, et al. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts[J]. J Invest Dermatol, 1997, 108: 215-219.
- [11] Wassermann R J, Polo M, Smith P, et al. Differential production of apoptosis-modulating proteins in patients with hypertrophic burn scars[J]. Surg Res, 1998, 75: 74-80.
- [12] Chen M M, Lam A, Abraham J A, et al. CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32: 1805-1819.

[收稿日期] 2007-04-12

[修回日期] 2007-06-25

[本文编辑] 贾泽军