

核酶对人皮肤瘢痕成纤维细胞增殖和 TIMP-1 表达的影响

吴建明¹,汪滋民²,吴包金¹,林子豪¹,江 华¹,袁湘斌¹,金由辛^{3*},高中玉¹

(1. 第二军医大学长征医院整形外科,上海 200003;2. 第二军医大学长海医院骨科,上海 200433;3. 中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室,上海 200031)

[摘要] **目的:**探讨核酶对人金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)基因表达的特异性抑制作用,以寻找治疗增生性瘢痕的新方法。**方法:**应用特异切割 TIMP-1 的嵌合型核酶基因克隆 pU6-Rz182 转染增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar derived fibroblasts, HSF),G418 筛选稳定表达核酶的细胞克隆,MTT 法检测并绘制细胞生长曲线,观察核酶对细胞生长的影响;RT-PCR 检测核酶对靶基因 TIMP-1 表达的抑制。**结果:**在 mRNA 水平,与正常对照组相比,稳定表达活性核酶 Rz182 的 HSF 中 TIMP-1 的表达被抑制了 87.9%,而点突变核酶抑制率达 36.4%,两者之间差异非常显著($P < 0.01$)。HSF 细胞生长进入平台期后,转染核酶基因组与点突变组及对照组相比,活细胞数显著降低($P < 0.01$),而点突变组与对照组无明显差异。**结论:**核酶 U6Rz182 能特异地抑制 HSF 中 TIMP-1 的表达,并使 HSF 的增殖受到抑制。

[关键词] 核酶;瘢痕;组织金属蛋白酶抑制因子;克隆

[中图分类号] R 619.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0030-04

Effect of ribozyme on TIMP-1 expression and proliferation fibroblasts in human skin scars

WU Jian-ming¹, WANG Zi-min², WU Bao-jin¹, LIN Zi-hao¹, JIANG Hua¹, YUAN Xiang-bin¹, JIN You-xin^{3*}, GAO Zhong-yu¹(1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. State key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate inhibitive the effects of ribozyme on gene expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1), searching for a new therapeutic strategy for hypertrophic scar. **Methods:** Human hypertrophic scar derived fibroblasts(HSF) were stably transfected with reconstructed plasmids named pU6-Rz182. G418 was applied to screen the cell clone steadily expressing ribozyme. The transfected cells were examined by MTT to draw the growth curve and evaluate cell growth. The expressions of TIMP-1 mRNA were detected by semi-quantity RT-PCR. **Results:** Compared with the control group, the expressions of TIMP-1 mRNA in HSF in the Rz182 group and Rzm group were depressed by 87.9% and 36.4%, respectively. There was significant difference between the Rz182 group and the Rzm group($P < 0.01$). The number of living HSF cells at platform interval decreased markedly($P < 0.01$, Rz182 group vs Rzm group and control group), while there was no significant difference between Rzm group and control group. **Conclusion:** The rebozyme of pU6Rz182 is able to specifically inhibit the expression of TIMP-1 in HSF and the proliferation of HSF.

[KEY WORDS] ribozyme;scar;tissue inhibitor of metalloproteinases-1;clone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 30-33]

增生性瘢痕成纤维细胞是瘢痕增生过程中的关键细胞,主要参与瘢痕中胶原及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的代谢。胶原及 ECM 的合成与分解代谢的失衡是增生性瘢痕产生的机制。以往对瘢痕的治疗研究多集中在如何减少胶原及 ECM 的合成,而对如何促进胶原及 ECM 的降解研究较少。而增生性瘢痕持续不退的原因更大程度上是胶原及 ECM 降解的减少。人金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)是调控胶原和 ECM 代谢的重要因子。在

增生性瘢痕中, TIMP-1 的过量表达直接抑制了胶原酶的活性,并同时刺激成纤维细胞的强力增殖,介导促瘢痕形成因子如 TGFβ 对胶原酶的抑制作用^[1,2]。如能抑制 TIMP-1 的表达,则有望促进胶原

[基金项目] 国家自然科学基金(30371472,39970761);中国科学院重要研究方向项目(KSCX2-2-04)。

[作者简介] 吴建明(1963-),男(汉族),硕士,副教授、副主任医师,硕士生导师。现在复旦大学附属华山医院整形外科,上海 200040。E-mail:wujian ming63@sobu.com

* Corresponding author. yxjin@sunm.shmuc.ac.cn

的降解, 促使瘢痕消退。

核酶(ribozyme, Rz)是一种具有切割活性从而可以特异性切割靶 RNA 的小分子 RNA, 迄今已在基因治疗研究领域得到广泛的应用^[3,4]。单纯的核酶 RNA 在体内表达水平低且极易被体内核酸酶降解, 难以达到治疗的水平。U6snRNA 作为一种小分子 RNA, 能够定位于细胞核内高表达, 不易被核酸酶降解且无复杂的二级结构, 将核酶嵌合于 U6snRNA 中形成嵌合型的核酶基因, 使得核酶也具备在体内高效表达并抗核酸酶降解的能力, 大大提高了核酶的治疗效果^[5,6]。在前期的工作中, 我们设计了特异切割 TIMP-1 mRNA 的锤头状核酶基因, 并嵌合于 U6snRNA 基因内部, 构建了高效表达核酶的载体 pU6Rz182, 体外实验证实了核酶 U6Rz182 能够特异切割 TIMP-1 的 mRNA^[7]。但是体外研究不能完全反映细胞内情况, 因此, 有必要进一步研究核酶在瘢痕成纤维细胞中的活性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 质粒小量抽提试剂盒为上海华舜生物有限公司产品。PBS 缓冲液、0.05%胰蛋白酶-EDTA、DMEM 培养液、100 U/ml 青霉素、胎牛血清、G418、Opti-MEM 培养液为 Gibco/BRL 公司产品。新生牛血清为杭州四季青公司产品。Dispasell 分离酶为 Brehringer Mannheim 公司产品。I 型胶原酶: Washington 公司产品。LipofectamineTM 2000; Invitrogen life technologies 产品。MTT 试剂盒: R&D 公司产品。

1.2 抗 TIMP-1 核酶质粒 特异切割人 TIMP-1 mRNA 核酶的表达质粒 pBSKneorU6-Rz182/182m (以下简称 pU6Rz182/182m) 为本实验室构建, 并已证实其表达的核酶 Rz182 在体外可以高效特异地切割 TIMP-1 mRNA^[7]。pEGFP-C1(4.7 kb) 质粒购自美国 Clontech 公司。

1.3 核酶真核表达质粒构建 针对 U6 基因设计 PCR 引物, 两端加入 *mlu* I 限制性酶切位点, 上游引物: 5'-CCC GGG CAA GGT CGG GCA GGA AG-3', 下游引物: 5'-CCC GGG TGG TAA ACC GTG CAC CGG CG-3'。PCR 扩增含有 pU6Rz182/182m 中的核酶基因及其 3'、5' 侧翼的 U6 基因的 450 bp 的片段, 亚克隆到含绿色荧光蛋白基因(EGFP)的载体 pEGFP-C1(4.7 kb) 中, 构建核酶的真核表达载体, 该载体转染后既可以通过 GFP 的表达报告核酶基因在体内的表达情况, 又可以通过 G418 筛选稳定表达核酶基因的细胞克隆。

1.4 增生性瘢痕成纤维细胞的培养 整形外科手术中切取的新鲜增生性瘢痕数块(取自一男性患者, 21 岁, 汉族, 为火焰烧伤后 5 个月的双手背增生性瘢痕) 无菌条件下用 0.05% 醋酸氯己定清洗、消毒约 5 min 后, 去除皮下组织。0.5% Dispasell 4℃ 消化过夜, 分离表皮和真皮, 真皮部分用 0.1% I 型胶原酶 37℃ 消化 4 h, 用 DMEM-10 在 5% CO₂ 37℃ 培养获得原代培养的 HSF^[8], 待细胞 70%~80% 汇合生长时, 0.05% 的胰酶-EDTA 消化传代。取第 4~5 代细胞进行转染实验。

1.5 实验分组 实验分 3 组: (1) 对照组, 为未转染任何质粒的 HSF; (2) Rz_m 组 (mutant ribozyme), 为稳定表达点突变失活核酶 Rz182m 的 HSF; (3) Rz 组 (ribozyme), 为稳定表达活性核酶 Rz182 的 HSF。

1.6 转染 HSF 以 5×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板, 在无抗生素的生长培养液中培养 24 h, 用 Opti-MEM 稀释质粒后与 LipofectamineTM 2000 混匀, 再在室温孵育 20 min, 形成 DNA-脂质体混合物, 转染 HSF。2 d 后, 细胞以 1:5 的比例传代, 加入 G418 进行筛选得到单细胞克隆扩大培养, 获得稳定表达核酶的细胞克隆。

1.7 转染细胞的生长曲线检测 转基因细胞生长融合后, 10^3 个细胞/孔传代于 96 孔板, 每孔内加 DMEM-10 100 μ l, 培养 3 d 后开始对 1 列细胞做 MTT 实验: 每孔加入 10 μ l MTT 试剂, 37℃ 培养 2~4 h; 每隔 30 min, 镜下观察有无胞内沉淀形成; 待镜下可见清晰的紫色结晶沉淀后, 每孔加 100 μ l 裂解液; 18~24℃ 暗室中孵育 3 h 以上。测定光密度值 (D_{570}), 设定酶标仪吸收波长为 570 nm, 参照波长 650 nm。上述实验重复 10 d, 以时间为横轴, 光密度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.8 半定量 RT-PCR 检测转染细胞 TIMP-1 基因的表达 以 TRIzol 试剂(美国 Gibco 公司)提取 HSF 的总 RNA, 以紫外分光光度计检测纯度并定量, RT-PCR 采用两步法试剂盒(日本 TaKaRa 公司), 按试剂盒说明进行。引物设计: 针对 NCBI GenBank 的人 TIMP-1 和 GAPDH 的 mRNA 序列设计引物, 排除与人其他基因的同源性后, 合成引物。TIMP-1 引物序列: P1, 5'-GAA TTC ACC ATG GCC CCC TTT GA-3'; P2, 5'-AAG CTT GGG CAG GAT TCA GGC TA-3', PCR 产物长度 636 bp。GAPDH 引物序列: P1', 5'-TCC TGC ACC ACC AAC TGC TT-3'; P2', 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3', PCR 产物长度 527

bp。

先通过 RT 反应获得全长 cDNA 序列,以看家基因 GAPDH 为内参照,PCR 扩增 TIMP-1 cDNA。反应体系:2×缓冲液 20 μl,dNTP(analog) 4 μl,MgCl₂ 8 μl,P1 1 μl,P2 1 μl,P1' 2 μl,P2' 2 μl,RT 反应液 10 μl,AMV *Taq* 1 μl,加 ddH₂O 至总体积 50 μl。反应条件:85℃变性 1 min,54℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,反应 25 个循环。每组检测 4 个样本。

1.9 统计学处理 所有数据均用微软 Excel 软件进行分析,两样本间均数比较行独立样本 *t* 检验,多个样本间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 核酶对转染细胞生长的影响 对照组中未转染的 HSF 细胞形态正常,生长曲线呈典型的“S”形,具备滞留期、指数生长期及平台期表现。随着培养时间的延长,细胞数量不断增加,在 2~6 d 增长速度最快,为指数生长期。Rzm 组中转染点突变核酶 pRz182m 的 HSF 细胞形态未见异常,生长抑制不显著;Rz 组中转染 pU6Rz182 的 HSF 细胞形态未见异常,但生长速度显著减慢,指数生长期缩短,活细胞数降低。结果显示:进入平台期后,Rz 组转染核酶基因 pU6Rz182 的 HSF 与对照组和 Rzm 组相比,其活细胞数降低非常显著($P < 0.01$),而对照组和 Rzm 组之间差别不显著($P > 0.05$,图 1)。

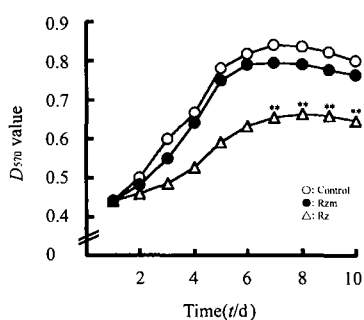


图 1 抗 TIMP-1 核酶转基因细胞的生长曲线
Fig 1 Growth curve of TIMP-1 ribozyme gene transfected HSF
** $P < 0.01$ vs control and Rzm group

2.2 核酶对细胞 TIMP-1 基因表达的影响 半定量 RT-PCR 法显示 TIMP-1 mRNA 与内参照 GAPDH mRNA 扩增产物的比值:对照组 > Rzm 组 > Rz 组(图 2)。对照组和 Rzm 组、Rz 组之间均有显著差异($P < 0.01$)。Rzm 组和 Rz 组之间差异显

著($P < 0.01$)。与对照组相比,在 mRNA 水平,Rz 组 TIMP-1 被抑制了 87.9%;而 Rzm 组 TIMP-1 抑制达 36.4%。提示核酶能显著抑制 HSF 细胞内的 TIMP-1 mRNA 表达,而 Rz 组即点突变核酶抑制作用减弱。

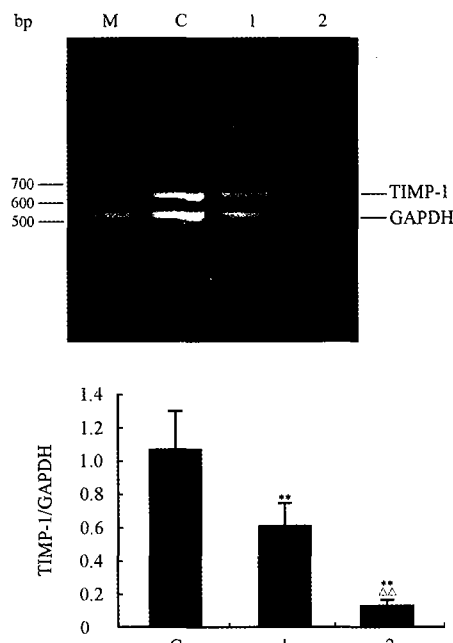


图 2 核酶对转基因细胞的 TIMP-1 mRNA 表达的影响
Fig 2 Effect of ribozyme on TIMP-1 mRNA expression after transfection in HSF
M:100bp DNA marker; C: Control; 1: Rzm; 2: Rz;
** $P < 0.01$ vs control group;
△△ $P < 0.01$ vs control group and Rzm group; $n = 4$

3 讨论

创面修复失控而过度增生形成的病理性瘢痕(瘢痕疙瘩或增殖性瘢痕)不仅会破坏人的体表完美,严重者甚至导致功能障碍。病理性瘢痕形成的核心问题是胶原、细胞外基质等的合成与分解代谢失衡。目前认为胶原酶(MMP-1)和组织金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)在调控胶原的降解方面起重要的作用。胶原酶属于基质金属蛋白酶家族,是特异降解胶原的关键酶,其活性受 TIMP-1 的调控。TIMP-1 通过与 MMP-1 结合形成 1:1 复合物抑制胶原酶的活性,是调控胶原降解的重要因素。有研究表明^[9] TIMP-1 在肥厚性瘢痕中的表达明显高于在正常皮肤中,且较多分布于胶原结节中。有人认为是^[10] TIMP-1 对胶原降解起着抑制作用。因此,如特异性阻断 TIMP-1 基因的表达,则可上调胶原酶的活性,从而达到促进胶原降解的目的,有利于增生性瘢痕的消退。在细胞内的靶 RNA 所形成二级

及三级结构,核酶和靶 RNA 的亚细胞器分布,核酶的降解,在细胞内核酶与核蛋白体所形成的复合体及基因转导的载体都会影响核酶的表达和核酶的切割活性。而如果将核酶应用于增生性瘢痕的治疗,则其必须能够在 HSF 细胞内稳定高效地表达并能特异阻断 TIMP-1 的表达。我们应用稳定表达的核酶基因特异性阻断 HSF 中 TIMP-1 的表达,RT-PCR 显示核酶成功阻断了 TIMP-1 mRNA 的表达。TIMP-1 除了能与 MMP 特异结合而抑制其活性外,还具有多种其他生物学功能,如对多种细胞(包括成纤维细胞、上皮细胞、平滑肌细胞)均具有强力促增殖作用,而这也是 TIMP-1 促进瘢痕增殖的另一重要因素。在我们的实验中,细胞生长曲线显示:核酶抑制 TIMP-1 的表达后,HSF 细胞的增殖也被明显抑制,二者之间是否存在必然联系尚待进一步研究。

尽管已有反义核酸抑制肝纤维化模型中 TIMP-1 的报道,但核酶与之相比,仍有其独特的优势^[10]:(1)既与靶 RNA 结合又将其切割,作用更为彻底;(2)催化效率高,1 分子的核酶可切割多分子的靶 RNA,而其本身不被消耗;(3)核酶具有稳定的空间结构,不易被核酸酶降解。因此核酶在抗病毒和肿瘤治疗方面的研究正得到广泛开展。为了剔除核酶切割活性外的反义作用,本研究在核酶的催化核心区突变一个必需核苷酸来构建失活核酶作为对照。点突变的核酶仍可以其侧翼序列与 TIMP-1 的 mRNA 互补结合,但由于丧失了切割活性,其对 TIMP-1 的抑制作用与活性的核酶相比明显减弱。这与核酶的作用原理相符,同时也反映核酶与其他反义技术相比的优越性。本实验显示,核酶 U6Rz182 成功阻断了 HSF 细胞 TIMP-1 的表达,有望发展成为揭示瘢痕形成机制的新型手段,成为

抗瘢痕的核酸药物。

[参考文献]

- [1] Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, *et al.* Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells: A possible new growth factor in serum[J]. *FEBS Lett*, 1992, 17(298): 29-32.
- [2] Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta/Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(20): 17058-17062.
- [3] Hagen M, Symons RH. Self-splicing of the Tetrahymena intron from mRNA in mammalian cells[J]. *EMBO J*, 1999, 18(22): 6491-6500.
- [4] Tekur S, Ho SM. Ribozyme-mediated down regulation of human metallothionein II (a) induces apoptosis in human prostate and ovarian cancer cell lines[J]. *Mol Carcinog*, 2002, 33(1): 44-55.
- [5] Valadkhan S, Manley JL. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs[J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 701-707.
- [6] Good PD, Krikos AJ, Li SX, *et al.* Expression of small therapeutic RNAs in human cell nuclei[J]. *Gene Ther*, 1997, 4(1): 45-54.
- [7] 汪滋民, 吴建明, 林子豪, 等. 抗人病理性瘢痕 TIMP-1 核酶 U6Rz182 的体外活性鉴定[J]. *中华整形外科杂志*, 2003, 19(4): 315-316.
- [8] 鄂征主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1997. 85-86.
- [9] 武继祥, 陈德英, 吴宗耀. 增生性瘢痕中 TGF- β 和胶原酶、TIMP-1 mRNA 表达的定量研究[J]. *中华整形外科杂志*, 2000, 16(1): 34-36.
- [10] Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, *et al.* Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis[J]. *Gastroenterol*, 2001, 7(3): 363-369.

[收稿日期] 2004-07-15

[修回日期] 2004-10-21

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群

《组织工程与重建外科》杂志征稿、征订启事

《组织工程与重建外科》(*Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*)杂志是由上海第二医科大学主办的综合性医学学术期刊,标准刊号:ISSN 1673-0364,国内外公开发行。本杂志由中国工程院院士张涤生教授担任名誉主编,上海第二医科大学附属第九人民医院整复外科主任曹谊林教授担任主编。本杂志是组织工程学和整形重建外科的专业学术期刊,以组织工程研究人员和广大整形重建外科医师为主要读者对象。报道组织工程及其相关领域、美容外科、颅面外科、眼科、口腔颌面外科、四肢显微外科、骨科的临床及基础研究成果,并及时介绍整形重建外科的重大进展、新技术和新动态,力求科学性、实用性。本编辑部诚征上述相关研究领域文章,欢迎各位专家、学者赐稿。本刊辟有论著、论著摘要、病例报告、经验交流、讲座、综述、国内外学术动态、会议纪要等栏目。适合广大医务人员、科研工作者、相关研究所、医院图书馆、高等院校图书馆订阅。本杂志为双月刊,大 16 开,60 页,每期定价:8 元,全年 6 册 48 元。订阅可通过邮局汇款。

联系方式:上海第九人民医院《组织工程与重建外科》编辑部

地 址:上海市制造局路 639 号,邮编:200011;

电 话:021-63138341(5104,5602); 传真:021-53078128; E-mail:zhongbin93@yahoo.com.cn