

# 干扰素 $\alpha$ -2b 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及端粒酶活性的影响

## Effects of IFN $\alpha$ -2b on proliferation and telomerase activity of keloid fibroblasts

黄 勇, 邢 新\*, 李军辉, 薛春雨

(第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**观察干扰素  $\alpha$ -2b(IFN $\alpha$ -2b)对瘢痕疙瘩成纤维细胞生长增殖及端粒酶活性的影响,探讨其在瘢痕疙瘩治疗中的作用机制。**方法:**取来自 8 例瘢痕疙瘩和 8 例正常皮肤的标本进行成纤维细胞原代培养,第 3~4 代的细胞用于实验。分别于 24、48、72、96、120 h 以浓度为 50、500、5 000、10 000 和 20 000 IU/ml 干扰素  $\alpha$ -2b 作用于体外培养的瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞,细胞计数和 MTT 法检测成纤维细胞生长增殖情况,PCR-ELISA 法检测不同处理浓度和时间成纤维细胞端粒酶活性。**结果:**5 000、10 000 及 20 000 IU/ml IFN $\alpha$ -2b 对瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞有生长抑制作用,可明显下调成纤维细胞端粒酶活性,和对照组相比其差异具有非常显著性意义( $P < 0.01$ );经浓度为 10 000 IU/ml IFN $\alpha$ -2b 处理,在 72、96、120 h,处理组细胞生长明显受到抑制、端粒酶活性明显降低,与对照组比较其差异有显著性意义( $P < 0.05$ );且呈现出明显的剂量-效应和时间-效应关系。**结论:**作为一个负性调节因子,干扰素  $\alpha$ -2b 能抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长增殖,降低成纤维细胞端粒酶活性是其重要作用机制之一。

**[关键词]** 瘢痕疙瘩;端粒酶;干扰素  $\alpha$ -2b

**[中图分类号]** R 619.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1384-03

瘢痕疙瘩是常见的病理性瘢痕,常无明显的诱因,以皮肤胶原等大量结缔组织基质的过度产生和沉积以及成纤维细胞的过度增殖为特征。作为一类具有抗病毒、抗肿瘤以及免疫调节等多种生物活性的细胞因子,干扰素(interferon, IFN)对人体正常皮肤、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩成纤维细胞都具有肯定的细胞增殖、胶原合成的抑制作用,它是目前比较明确的瘢痕增生负性调控因子<sup>[1]</sup>,临床上已经有应用于干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  局部注射治疗增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的实例,但其确切的作用机制并不清楚。在很多肿瘤的研究中,已经证实干扰素对端粒酶活性有负性调节作用,在瘢痕研究领域则缺乏这方面的报道。本研究即以 IFN $\alpha$ -2b 作用于瘢痕疙瘩成纤维细胞,观察对其生长增殖和端粒酶活性的影响,以探讨干扰素作用于瘢痕疙瘩成纤维细胞的内在机制,为临床防治提供可靠的理论依据。

### 1 材料和方法

1.1 标本来源 瘢痕疙瘩 8 例,来源于手术患者。入选要求:患者无结缔组织疾病;无全身应用皮质类固醇激素史;1 年内无注射药物、外用药物及放疗史;瘢痕局部无溃疡。年龄 18~32 岁,中位年龄 26 岁;病程 12~20 个月,平均病程 17 个月。正常皮肤 8 例,取自邻近正常皮肤。手术切取标本后,取瘢痕疙瘩边缘突起发红的部分进行实验研究。

1.2 成纤维细胞培养 按组织块法<sup>[2]</sup>培养进行,取第 3~4 代的细胞用于实验。

1.3 不同浓度 IFN $\alpha$ -2b 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和端粒酶活性的影响 IFN $\alpha$ -2b 为深圳海王公司产品。取正常皮肤和瘢痕疙瘩来源第 3、4 代成纤维细胞,分别用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后显微镜下计数,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基稀释至终密度为  $2 \times 10^5$  /ml,按 100  $\mu$ l/孔依次接种至 96 孔板中,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度条件下培养 24 h 待细胞贴壁后开始实验处理。IFN $\alpha$ -2b 处理工作浓度分别为 50、

500、5 000、10 000 和 20 000 IU/ml,每一实验组均分别设立阴性对照。每个处理设 3 个平行重复孔。于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度条件下继续培养 72 h。

1.4 MTT 法测定 IFN $\alpha$ -2b 对瘢痕疙瘩成纤维细胞生长增殖的影响 上述处理 72 h 后,取出 96 孔细胞培养板,每孔加入 MTT(上海振兴化工一厂产品)溶液 10  $\mu$ l(含 MTT 5 mg/ml PBS),置 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度孵箱内再培养 4 h 后,吸出上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO,分析纯,上海振兴化工一厂产品)溶液 100  $\mu$ l 作用 10 min,不停震荡,使结晶物充分溶解。用自动酶联检测仪测定波长 570 nm 时的光密度值(D),记录结果。

1.5 PCR-ELISA 法检测端粒酶活性 端粒酶 PCR ELISA 试剂盒为德国宝灵曼公司产品。(1)细胞准备:取上述 IFN $\alpha$ -2b 处理 72 h 后的正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞,分别用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后,显微镜下计数,收集  $10^6$  个细胞检测,加入 200  $\mu$ l 裂解液,充分混匀,4 $^{\circ}$ C 裂解 30 min,12 000 r/min 离心 20 min,小心地将上清(约 150  $\mu$ l)移至另一洁净管中备用。(2)PCR 扩增:取上述提取液 5  $\mu$ l,加入 25  $\mu$ l 端粒酶测定混合液,用无菌 DEPC 水补充至体积 50  $\mu$ l,加石蜡覆盖,在 PCR 扩增仪中扩增:25 $^{\circ}$ C 延伸 30 min;94 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 终止反应。(3)ELISA 反应:取上述 PCR 产物 5  $\mu$ l 加变性液 20  $\mu$ l 混匀,置室温 20 min,加入 225  $\mu$ l 杂交液,混匀后取出 100  $\mu$ l 加入包被于亲和素的 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 300 次/min 振荡 2 h。冲洗后加入过氧化物酶标记的地高辛抗体,洗 5 次。加入 100  $\mu$ l 四甲基联苯胺室温振荡显色 20

**[作者简介]** 黄 勇,博士,副主任医师。现在山东烟台毓璜顶医院整形科,烟台 264000。E-mail: hyong915@sina.com

\* Corresponding author. E-mail: xingxin56@yahoo.com.cn

min, 终止反应。20 min 内在酶标仪上测波长为 450 nm 和 690 nm 的  $D$  值。(4) 结果判断:  $D = D_{450} - D_{690}$ 。样品检测时均设置 3 个复孔。

1.6 IFN $\alpha$ -2b 作用不同时间对瘢痕疙瘩成纤维细胞的影响 取正常皮肤和瘢痕疙瘩来源第 3、4 代的成纤维细胞, 分别用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后, 显微镜下计数, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基稀释至终密度为  $2 \times 10^5$ /ml, 按 100  $\mu$ l/孔依次接种至 96 孔板中, IFN $\alpha$ -2b 处理工作浓度为 10 000 IU/ml, 每一实验组均分别设立阴性对照。每个处理设 3 个平行重复孔, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 、95% 湿度孵箱培养, 分别于 24、48、72、96、120 h 5 个时间点取出培养板, 采用 1.5 项下所述 PCR-ELISA 法检测每个时间点端粒酶活性。在每个时间点取出 96 孔细胞培养板, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化, 每标本收集细胞悬液, 血球计数板计数, 每孔细胞计数 2

次, 共 3 个平行重复孔, 取均值。细胞计数公式如下:

$$\text{细胞数/ml 原悬液} = \frac{4 \text{ 大格细胞总数}}{4} \times 10\ 000 \times \text{稀释倍数}$$

1.7 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件, 组间比较采用  $t$  检验。

## 2 结果

2.1 不同浓度 IFN $\alpha$ -2b 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和端粒酶活性的影响

2.1.1 检测结果 IFN $\alpha$ -2b 浓度为 50、500 IU/ml 对瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞生长抑制作用不明显, 而 5 000、10 000 及 20 000 IU/ml IFN $\alpha$ -2b 对两类成纤维细胞有明显的生长抑制作用, 与对照组比较其差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 不同浓度 IFN $\alpha$ -2b 对瘢痕疙瘩和正常皮肤来源成纤维细胞生长增殖及端粒酶活性的影响

( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

IFN $\alpha$ -2b ( $\mu$ B/U $\cdot$ ml $^{-1}$ )	$D_{570}$		$D_{450} - D_{690}$	
	正常皮肤	瘢痕疙瘩	正常皮肤	瘢痕疙瘩
0(阴性对照)	0.558 $\pm$ 0.030	0.584 $\pm$ 0.034	0.199 $\pm$ 0.016	0.386 $\pm$ 0.024
50	0.551 $\pm$ 0.020	0.574 $\pm$ 0.031	0.187 $\pm$ 0.016	0.367 $\pm$ 0.020
500	0.532 $\pm$ 0.025	0.555 $\pm$ 0.027	0.185 $\pm$ 0.012	0.362 $\pm$ 0.021
5 000	0.457 $\pm$ 0.034**	0.495 $\pm$ 0.024**	0.183 $\pm$ 0.013	0.333 $\pm$ 0.021**
10 000	0.405 $\pm$ 0.022**	0.410 $\pm$ 0.026**	0.171 $\pm$ 0.013**	0.286 $\pm$ 0.013**
20 000	0.381 $\pm$ 0.021**	0.393 $\pm$ 0.023**	0.166 $\pm$ 0.010**	0.275 $\pm$ 0.021**

\*\*  $P < 0.01$  与阴性对照组比较

2.1.2 PCR-ELISA 法检测端粒酶活性结果 对正常皮肤成纤维细胞, IFN $\alpha$ -2b 浓度为 10 000 及 20 000 IU/ml 可明显降低端粒酶活性, 与对照组比较其差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ )。对瘢痕疙瘩成纤维细胞, IFN $\alpha$ -2b 浓度为 5 000、10 000 及 20 000 IU/ml 时则端粒酶活性明显降低, 与对照组比较其差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.2 IFN $\alpha$ -2b 作用不同时间对瘢痕疙瘩成纤维细胞的影响

2.2.1 动态细胞计数 经浓度为 10 000 IU/ml IFN $\alpha$ -2b 处理 48 h 后处理组细胞生长缓慢, 和对照组相比差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。在 72、96、120 h 3 个时间点, 正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞对照组快速生长、增殖旺盛, 而处理组细胞生长明显受到抑制, 差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 IFN $\alpha$ -2b 作用不同时间对瘢痕疙瘩和正常皮肤来源成纤维细胞计数

( $n=8, \bar{x} \pm s, \times 10^5$ )

作用时间( $t$ /h)	正常皮肤		瘢痕疙瘩	
	对照组	IFN $\alpha$ -2b	对照组	IFN $\alpha$ -2b
24	1.53 $\pm$ 0.13	1.48 $\pm$ 0.11	1.58 $\pm$ 0.14	1.49 $\pm$ 0.14
48	2.18 $\pm$ 0.12	1.77 $\pm$ 0.12*	2.35 $\pm$ 0.13	1.93 $\pm$ 0.16*
72	3.95 $\pm$ 0.16	2.26 $\pm$ 0.14**	4.12 $\pm$ 0.23	2.30 $\pm$ 0.15**
96	5.21 $\pm$ 0.22	2.78 $\pm$ 0.16**	5.15 $\pm$ 0.31	2.75 $\pm$ 0.21**
120	6.52 $\pm$ 0.28	2.55 $\pm$ 0.18**	6.83 $\pm$ 0.29	2.64 $\pm$ 0.16**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  与对照组比较

2.2.2 PCR-ELISA 法检测端粒酶活性结果 对正常皮肤成纤维细胞, 处理 72、96 和 120 h 端粒酶活性明显降低, 与对照组比较其差异有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。对瘢痕疙瘩成纤维细胞, IFN $\alpha$ -2b 作用 24 h 时端粒酶活性即明显降低 ( $P < 0.05$ ), 作用 48、72、96 和 120 h 时端粒酶活性与对照组比较其差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

## 3 讨论

瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞具有一些不同于正常皮肤来源的成纤维细胞的生物学特性, 表现为细胞活性异常增高, 分泌大量细胞外基质, 从而导致其不断增殖。由于其发病机制尚不完全清楚, 因此在治疗上也是非常棘手的问题。

虽有外科手术切除、压力疗法、放射治疗、局部注射药物等<sup>[3~5]</sup>,但没有一种方法达到理想的效果。我们在先前的研究中已经证实,在瘢痕疙瘩端粒酶活性明显高于正常皮肤,

端粒酶激活很可能是瘢痕疙瘩发生发展过程中的一个关键性因素<sup>[6]</sup>。因此尝试对端粒酶进行调控,抑制端粒酶的活性从而抑制瘢痕疙瘩的生长增殖。

表3 IFN $\alpha$ -2b作用不同时间对瘢痕疙瘩和正常皮肤来源成纤维细胞端粒酶活性影响

( $n=8, \bar{x} \pm s, D_{450} - D_{690}$ )

作用时间(t/h)	正常皮肤		瘢痕疙瘩	
	对照组	IFN $\alpha$ -2b	对照组	IFN $\alpha$ -2b
24	0.196 $\pm$ 0.011	0.187 $\pm$ 0.012	0.392 $\pm$ 0.025	0.355 $\pm$ 0.021*
48	0.201 $\pm$ 0.012	0.179 $\pm$ 0.013	0.383 $\pm$ 0.021	0.292 $\pm$ 0.018**
72	0.195 $\pm$ 0.012	0.170 $\pm$ 0.011*	0.402 $\pm$ 0.032	0.259 $\pm$ 0.016**
96	0.213 $\pm$ 0.014	0.165 $\pm$ 0.010**	0.376 $\pm$ 0.028	0.233 $\pm$ 0.018**
120	0.198 $\pm$ 0.013	0.161 $\pm$ 0.010**	0.384 $\pm$ 0.022	0.219 $\pm$ 0.015**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  与对照组比较

干扰素是机体细胞对病毒感染或各种生物诱生作用反应产生并分泌的一类具有多种生物活性的糖蛋白,相对分子质量为20 000~30 000,有的可高达90 000。它可激活别的基因亚群进行转录,从而具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用。根据免疫原性和分子结构的不同,可将干扰素分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 3种类型。干扰素在细胞内抗RNA或DNA病毒,不影响正常细胞功能,但可抑制快速分裂的细胞包括肿瘤细胞,并且已成功地用于多种恶性肿瘤的治疗。干扰素抗肿瘤作用主要是通过增强机体免疫功能,提高巨噬细胞、NK细胞和CTL的杀伤能力而实现的。再者,干扰素与细胞表面的特异性受体结合,引起一系列细胞内信号级联反应,诱导介导抗肿瘤、生长抑制和免疫调节的蛋白质的合成<sup>[7]</sup>。

瘢痕疙瘩是一种成纤维细胞异常增生性疾病,其很多特性又非常类似于肿瘤,因此IFN $\alpha$ -2b作为一种生物制品已用于临床瘢痕的治疗,被认为可抑制皮肤成纤维细胞的胶原合成,在体外能降解氨基多糖,还有较强的抗肿瘤活性。Berman等最早于1989年报道了1例注射IFN $\alpha$ -2b治疗瘢痕疙瘩的病例,2次注射IFN $\alpha$ -2b(每次150万IU)于瘢痕内,使一个处于发展期的瘢痕疙瘩面积减少了41%,2年后该病损未复发。将治疗前及首次注射后9d的瘢痕组织成纤维细胞与正常皮肤相比,发现注射后的成纤维细胞完全不同于注射前的表现,其较正常皮肤产生相同或更少的胶原、葡糖胺聚糖等结缔组织基质成分,并且胶原酶的活性也恢复至正常,即成纤维细胞胶原代谢回到正常水平,同时成纤维细胞呈现正常表型。但IFN $\alpha$ -2b治疗瘢痕的效果也有不同的报道<sup>[8]</sup>。我们通过在外成纤维细胞培养,观察IFN $\alpha$ -2b以不同浓度和在不同时间对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响。结果表明,IFN $\alpha$ -2b浓度为5 000、10 000及20 000 IU/ml对其有明显的生长抑制作用,具有明显的剂量依赖性。经浓度为10 000 IU/ml IFN $\alpha$ -2b处理后,动态细胞计数结果显示作用48~120 h后细胞即受到明显的生长抑制,呈现明显的时间依赖性。我们的结果也证实了干扰素对瘢痕疙瘩成纤维细胞有确切的生长抑制作用,可用于临床上瘢痕疙瘩的治疗,但由于其时间和剂量依赖性,需连续和较大剂量使用才可能有较好的效果。

现已知端粒酶是一种特殊的核蛋白逆转录酶,它能保证真核细胞染色体DNA序列得以完善,维持端粒长度稳定性

并维持细胞增殖性的作用。端粒酶激活见于多种肿瘤细胞,在很多恶性实体瘤中有较高的表达<sup>[9,10]</sup>。在瘢痕疙瘩成纤维细胞端粒酶活性异常增高<sup>[6]</sup>,我们的研究显示IFN $\alpha$ -2b可降低瘢痕疙瘩成纤维细胞端粒酶活性,而且呈现出一定的时间-效应与剂量-效应,从而抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞生长增殖,这也可能是IFN $\alpha$ -2b抗瘢痕疙瘩治疗作用的重要机制之一。IFN- $\alpha$ 作为一种肿瘤抑制蛋白,通过下调端粒酶活性调节正常和恶变细胞生长和分化<sup>[11]</sup>,从而提供一种抗生长信号,使得细胞完成分化或者造成分化不成熟细胞生长停滞而凋亡。

【参考文献】

[1] McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing[J]. Clin Plast Surg,1990,17:421.  
 [2] 黄勇,任林森,岑瑛. 瘢痕成纤维细胞培养及其生物学行为的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志,1998,12:332-334.  
 [3] Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, et al. Keloid pathogenesis and treatment[J]. Plast Reconstr Surg, 2006,117:286-300.  
 [4] Mutalik S. Treatment of keloids and hypertrophic scars[J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol,2005,71:3-8.  
 [5] Meshkinpour A, Ghasri P, Pope K, et al. A treatment of hypertrophic scars and keloids with a radiofrequency device: a study of collagen effects[J]. Lasers Surg Med, 2005,37:343-349.  
 [6] 黄勇,邢新. 端粒酶、bcl-2和p53在瘢痕疙瘩组织中的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志,2006,23:635.  
 [7] Brierley MM, Fish EN. IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry[J]. J Interferon Cytokine Res,2002,22:835-845.  
 [8] Wong TW. Intralesional interferon  $\alpha$ -2b has no effect in the treatment of keloids[J]. Br J Dermatol,1994,130:683-685.  
 [9] Kumar SK, Zain RB, Ismail SM, et al. Human telomerase reverse transcriptase expression in oral carcinogenesis-a preliminary report[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005,24:639-646.  
 [10] Bowles L, Bialkowska-Hobrzanska H, Bukala B, et al. A prospective evaluation of the diagnostic and potential prognostic utility of urinary human telomerase reverse transcriptase mRNA in patients with bladder cancer[J]. Can J Urol, 2004,11:2438-2444.  
 [11] Lengyel P. Tumor-suppressor genes: news about the interferon connection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993,90:5893-5895.

【收稿日期】 2006-07-03

【修回日期】 2006-11-05

【本文编辑】 曹静