文章编号:1000-5404(2006)08-0775-03

论著

# 结缔组织生长因子体外促进人增生性瘢痕成纤维细胞转分化的研究

李 喆,李世荣,刘剑毅,戴 霞,陈 康,陶 灵 (第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

**提 要: 目的** 研究结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在人增生性瘢痕成纤维细胞转分化中的作用。**方法** 培养人增生性瘢痕成纤维细胞,分别给予不同剂量CTGF刺激(10 ng/ml),以及CTGF ASODN转染,48 h后用Western blot方法比较各组间α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)的表达变化。**结果** 刺激48 h后,对照组表达少量α-SMA蛋白;小剂量CTGF刺激组和大剂量CTGF刺激组作用48 h后,α-SMA表达量均显著增多,且成浓度依赖性变化($P<0.01$);而CTGF ASODN转染组α-SMA蛋白表达与对照组比较明显减少($P<0.05$)。**结论** CTGF在体外能促进人增生性瘢痕成纤维细胞向肌成纤维细胞(myofibroblast ,MyoF)的转分化,阻断或者抑制其表达可能将更有效的治疗瘢痕挛缩。

**关键词**: 结缔组织生长因子; 增生性瘢痕; 成纤维细胞; 转分化
**中图法分类号**: R329.24;R341;R364.31 **文献标识码**: A

# Connective tissue growth factor promotes transdifferentiation of fibroblasts from human hypertrophic scar *in vitro*

LI Zhe, LI Shi-rong, LIU Jian-yi, DAI Xia, CHEN Kang, TAO Ling (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of connective tissue growth factor (CTGF) in transdifferentiation of fibroblasts from human hypertrophic scar (HSF). **Methods** The fibroblasts from hypertrophic scar were passaged and then divided into 4 groups according to stimulation factors: stimulated with 10% FBS-DMEM (negative control), with 2.5 ng/ml rhCTGF, with 10 ng/ml rhCTGF, transfected with CTGF ASODN. The expression of α-smooth muscle actin(α-SMA) was measured by Western blotting. **Results** The expression of α-SMA in fibroblasts increased markedly after 2.5 ng/ml or 10 ng/ml rhCTGF treatment ($P<0.01$), while decreased markedly after CTGF ASODN transfection ($P<0.05$). **Conclusion** CTGF can promote the transdifferentiation of fibroblasts of human hypertrophic scar towards myofibroblasts *in vitro*. Inhibition of CTGF expression may be a more effective therapy of scar contracture.

**Key words**: connective tissue growth factor; hypertrophic scar; fibroblast; transdifferentiation

增生性瘢痕(hypertrophic scar,HS)是人类皮肤真皮损伤后以局部胶原等大量结缔组织的过度产生和沉积为特征的皮肤纤维化疾病,是烧伤、整形乃至整个创伤修复领域亟待解决的难题之一,大量研究表明转化生长因子(transforming growth factor-$\beta_1$,TGF-$\beta_1$)在瘢痕的形成过程中起到极其重要的作用,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促进作用的生长因子,被认为是TGF-$\beta_1$的直接下游效应介质[1],它是否也具有促进人增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast, HSF)转分化的作用,其机制如何,尚少见报道,本研究拟通过研究上调CTGF及CTGF反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides,ASODN)阻断,观察其对体外培养的人HSF转分化的影响,并观察α-SMA的表达变化,探讨CTGF对人HSF转分化的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

DMEM培养基和新生小牛血清(Gibco,USA),胰蛋白酶(Gibco,USA),重组人CTGF(rhCTGF, peprotech,USA);小鼠抗人α-平滑肌肌动蛋白(北京中杉金桥生物技术有限公司),

**基金项目**:国家自然科学基金资助项目(30400472)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400472)
**作者简介**:李 喆(1982-),男,湖北省老河口市人,硕士研究生,主要从事皮肤瘢痕的诊治方面的研究。电话:(023)66566626, E-mail:tmmulizhe@163.com
**通讯作者**:刘剑毅,电话:(023)60751194, E-mail:ljy2000188@163.com
**收稿日期**:2005-10-02;**修回日期**:2006-03-03

HRP 标记羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),HRP 标记甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,上海康成);BCA™ Protein Assay Kit(PIERCE,USA),RIPA 及 PMSF(上海申能博彩生物科技有限公司),ECL 发光液(Santa cruz,USA),Lipofectamine™2000(invitrogen,USA),CTGF ASODN(上海基康生物技术有限公司合成),碱基序列为 5′-TACTGGCGGCGGTCAT-3′[2],全硫代修饰及 FAM 荧光标记。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 实验所用 HS 组织取自我科手术患者,均为创面愈合 3 个月以上瘢痕仍持续增生者,术前均取得患者同意。所取 HS 特点为外观发红、充血、质硬、高出皮面 1 cm 以上,瘢痕增生局限于皮损区,局部伴瘙痒或疼痛等不适,共 6 例。于各例标本局部无感染、无溃疡处取材,用酶消化法分离成纤维细胞,于 37 ℃,5% $CO_2$ 孵箱中培养,传代,实验用第 5~7 代细胞,用 0.25% 胰酶消化后,将细胞以 $8\times10^5$/瓶接种于 75 $cm^2$ 培养瓶中,先用 10% FBS-DMEM 培养基培养 12 h,待细胞达到 60% ~70% 融合后,用无血清培养基培养 24 h,使细胞达到同步,弃去培养基,细胞分成 4 组:①对照组:加入 10% FBS-DMEM;②小剂量 CTGF 刺激组:培养基中加入 rhCTGF,终浓度为 2.5 ng/ml;③大剂量 CTGF 刺激组:培养基中加入 rhCTGF,终浓度为 10 ng/ml;④CTGF ASODN 转染组。

1.2.2 基因转染 ①制备 CTGF-ASODN-脂质体复合物:将 CTGF-ASODN(24 μg)和 Lipofectamine™ 2000(60 μl)分别加入 1.5 ml 无抗、无血清培养基中,静置 5 min,再将二者混匀,室温下孵育 15 min,即形成 CTGF-ASODN-脂质体复合物,②转染:将细胞以 $8\times10^5$/瓶接种到 75 $cm^2$ 培养瓶中,先用 10% FBS-DMEM 培养基培养 12 h,待细胞达到 60% ~70% 融合后,用无血清培养基培养 24 h,使细胞达到同步,弃去培养基,同时加入 12 ml 无血清培养基和 CTGF-ASODN-脂质体复合物,于 37 ℃,5% $CO_2$ 的孵箱中培养 2 h,弃去瓶内培养基,重新加入 10% FBS-DMEM 培养基。

1.2.3 倒置显微镜下观察细胞形态 加入各组试剂后,每 12 h 倒置显微镜下观察细胞 1 次,48 h 后照相。

1.2.4 Western blot 分析 作用 48 h 后,收获细胞,加入细胞裂解液 RIPA 和胰蛋白酶抑制剂 PMSF(每 $10^6$ 个细胞加入 100 μl RIPA 和 2 μl PMSF),按照试剂盒说明提取蛋白,BCA 法蛋白定量,取 30 μg 总蛋白与 6×SDS 上样缓冲液混合,100 ℃ 变性 5 min,用 10% Tricine 胶电泳分离,半干法将蛋白转至醋酸纤维膜上,立春红 S 染液观察转移效果,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h,加入一抗(1∶500 稀释),4 ℃ 过夜,TBST 洗膜,10 min/次×4 次,加入 HRP 标记的二抗(1∶5 000 稀释)室温孵育 1 h,TBST 洗膜,10 min/次×4 次,ECL 发光,显影,观察 α-SMA 的表达变化。

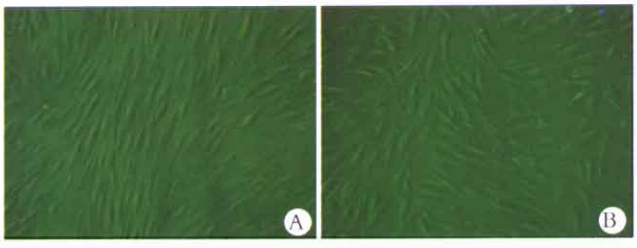
### 1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计分析软件行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 rhCTGF 对细胞形态的影响

相差显微镜下观察各组细胞变化,正常瘢痕成纤维细胞为梭形贴壁细胞,细胞排列成一定顺序,培养液中加入不同剂量 CTGF 后,可见细胞排列紊乱,呈不规则排列,部分细胞变肥大,细胞质增多,不再表现为典型的梭形。见图 1。

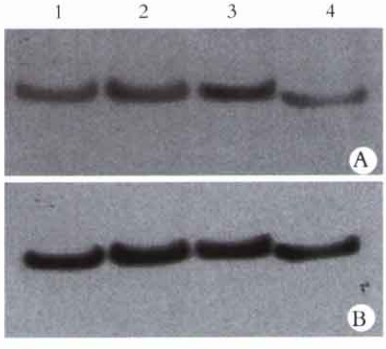



A:正常 HSF;B:CTGF 刺激后 HSF

**图 1 CTGF 对 HSF 形态的影响** (相差显微镜×100)

### 2.2 rhCTGF 对 α-SMA 蛋白表达的影响

Western 印迹结果显示,刺激 48 h 后,对照组表达少量 α-SMA蛋白;小剂量 CTGF 刺激组和大剂量 CTGF 刺激组作用 48 h后,α-SMA 表达量均明显增多,且成浓度依赖性变化($P<0.01$);而 CTGF ASODN 转染组 α-SMA 蛋白表达与对照组比较明显减少($P<0.05$),见图 2。




1:对照组;2:小剂量 CTGF 刺激组;3:大剂量 CTGF 刺激组;4:CTGF ASODN 转染组. A:α-SMA 蛋白;B:GAPDH

**图 2 Western 免疫印迹结果**

## 3 讨论

在创面愈合过程中,曾处于静止状态的成纤维细胞增殖并分化,其中 70% 左右的成纤维细胞分化为收缩表型,被称为 MyoF。它是介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间的终末分化细胞,MyoF 能够分泌Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原和纤维连接蛋白,使细胞外基质沉积,α-SMA 是 MyoF 的标志性蛋白[3],它通过跨膜复合物 Fibronexus 与成纤维细胞外纤维粘连蛋白相连,而后者可与细胞外基质或其他成纤维细胞相连,从而能把成纤维细胞的收缩传导至整块组织,引起整个创面或瘢痕的收缩,因此抑制成纤维细胞的分化是抗纤维化及挛缩的中心策略。

1991 年 Bradham 等[4]在筛选人类脐静脉内皮细胞 cDNA(互补脱氧核糖核酸)文库时,首次发现了人类 CTGF,直接参与生长因子对细胞生长分化的调控,具有促进细胞增殖,介导细胞黏附等作用。随后的研究表明 CTGF 在多种纤维化疾病中表达上调[5],刘剑毅等[6]对瘢痕疙瘩、增生性瘢痕和正常皮肤中 CTGF 的表达进行检测,其表达强弱依次为瘢痕疙瘩 > 增生性瘢痕 > 正常皮肤,提示 CTGF 是瘢痕形成过程中的重要调控因子,但是关于 CTGF 对于 HSF 转分化的调节作用尚少见报道。

我们通过观察 CTGF 刺激 HSF 后 α-SMA 表达的变化,间接检测 MyoF 的表达情况,从而阐明 CTGF 在 HSF 向 MyoF 转分化中的作用。研究表明 CTGF 在体外能使 HSF 形态发生变化,细胞横径增大,细胞质增多,不再表现为典型的梭形。研究中我们还发现正常人 HSF 表达少量 α-SMA,加入不同剂量 rhCTGF 刺激后 α-SMA 蛋白表达显著增强($P<0.01$),且成一定的浓度依赖性,而通过 CTGF ASODN 阻断后 α-SMA 蛋白明显减少,说明 CTGF 在体外能促进 HSF 向 MyoF 转分化。

大量研究表明 TGF-$\beta_1$ 在纤维化疾病中起着极为重要的作用,然而通过阻断 TGF-$\beta_1$ 而达到阻止纤维化的进程却事与愿违,由于其作用的靶细胞种类繁多、生物学效应复杂,阻断或抑制其表达及活性的后果是难以预料的,有研究表明,敲除 TGF-$\beta_1$ 基因的小鼠因失去对炎症的抑制而在出生后很快死于严重的全身性炎症反应[7],与 TGF-$\beta_1$ 相比,CTGF 在生理状态下的表达水平很低,而且主要在间质细胞中表达,其作用范围多局限于结缔组织,因此在创伤修复或纤维化中 CTGF 是一种特异性更强的,可选择性干预结缔组织形成的细胞因子,阻断或者抑制其表达可能是更特异、更有效的治疗纤维化疾病的方法,进一步研究其受体及胞内信号转导途径,可能会为器官纤维化疾病的防治提供一种新的方法。

**参考文献:**


[1] INKINEN K, WOLFF H, LINDROOS P, *et al*. Connective tissue growth factor and its correlation to other growth factors in experimental granulation tissue[J]. Connect Tissue Res, 2003, 44(1): 19 - 29.

[2] HISHIKAWA K, OEMAR B S, NAKAKI T. Static pressure regulates connective tissue growth factor expression in human mesangial cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(20): 16797 - 16803.

[3] MUCHANETA-KUBARA E C, EL-NAHAS A M. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring[J]. Nephrol Dial Transplant, 1997, 12(5): 904 - 915.

[4] BRADHAM D M, IGARASHI A, POTTER R L, *et al*. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10[J]. J Cell Biol, 1991, 114(6): 1285 - 1294.

[5] LEASK A, HOLMES A, ABRAHAM D J. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2002, 4(2): 136 - 142.

[6] 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(9): 818 - 821.

[7] LETTERIO J J, BOTTINGER E P. TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice[J]. Miner Electrolyte Metab, 1998, 24(2 - 3): 161 - 167.


(编辑　栾　嘉)


## 《现代美容整形外科学》征订启事

由军内外著名美容整形外科专家、第三军医大学西南医院教授领衔主编、国内外数十名经验丰富的美容整形外科专家和学者编撰,系统阐述了以常见经典手术为主的各类美容整形外科手术的基本原则及操作技术等最新知识的专著《现代美容整形外科学》于2006年4月由人民军医出版社出版,全国发行。本书有下列特点:①70余位美容整形专家鼎力奉献,中韩13位著名权威专家主编、审定。②系统介绍了头颅、额颞、面颈、牙颌、五官、胸壁、乳房、四肢、会阴、生殖器等各部位的美容整形手术的适应症、禁忌症、术前准备、麻醉与体位、手术步骤、术中注意要点、术后注意事项、术后处理以及并发症等都进行了详细阐述,并配有大量精细的局部解剖和手术操作示意图或照片。全面阐述了美容整形、显微外科、创伤美容、麻醉、皮肤色斑及体表肿瘤、皮肤软组织扩张、吸脂减肥、组织移植、生物材料、组织工程、瘢痕的预防和治疗的最新知识和冷冻、文刺、计算机、内镜、超声、光子、纳米、激光等技术在美容整形外科的应用。根据当今美容整形外科的发展特点,特别加入了人体美学、心理学、康复医学以及医学美容法规及医疗纠纷的防范等内容。③全书共计1848页,插图1160余幅,其中彩色插图80余幅。开本正16开,80 g双面铜版纸彩色印刷。豪华精装加封面套盒。定价:680元/册。

本书作者在参阅国内外大量最新文献的基础上,较全面地反映了美容整形外科学的发展水平。《现代美容整形外科学》是一部系统、全面介绍美容整形外科技术的专著,是从事美容整形外科的工作人员案头必备参考书,是各级各类美容整形医疗单位、医学院校师生、图书馆、资料室重点收藏图书。

地　址:重庆市高滩岩第三军医大学学报编辑部　　邮　编:400038

联系人:王　红　　电　话:(023)68752782,68752189 - 84