论著

文章编号:1000-5404(2007)20-1982-03

大黄素对人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖抑制及细胞内游离 Ca^{2+} 的作用

夏 珊,李世荣,刘剑毅,曹 川,姚 恒,冯 智 (第三军医大学西南医院整形科,重庆 400038)

提 要: 目的 对大黄素的防治瘢痕的生物学作用进行初步探索,为瘢痕的防治开辟新的途径。**方法** 采集我科住院患者的增生性瘢痕标本,进行人增生性瘢痕成纤维细胞培养,分别以不同浓度的大黄素作用于细胞,以MTT法测试药物处理后细胞增殖规律,并以激光共聚焦显微镜观察细胞内$[Ca^{2+}]_i$荧光强度的变化。**结果** 在不同浓度组大黄素的处理下,人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖呈现出抑制的趋势($P<0.05$);细胞内$[Ca^{2+}]_i$的荧光强度也明显上升,其幅度和药物浓度有一定的关联。**结论** 大黄素对人增生性瘢痕成纤维细胞有显著的抑制作用,其机制可能和细胞内$[Ca^{2+}]_i$水平的改变有关。

关键词: 增生性瘢痕;大黄素;细胞培养;细胞增殖;游离钙

中图法分类号: R619+6;R285;Q954.6-33+2 **文献标识码**: A

Effect of emodin on proliferation and intracellular free calcium of hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*

XIA Shan, LI Shi-rong, LIU Jian-yi, CAO Chuan, YAO Heng, FENG Zhi (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of emodin in preventing and treating hypertrophic scar. Methods The hypertrophic scar samples were collected from 6 patients admitted to our hospital. The fibroblasts of hypertrophic scar were cultured and treated with emodin (respectively 20, 40, 60 μg/ml) in culture medium. The proliferation of fibroblasts was detected by MTT colorimestric assay and the fluorescence intensity of intracellular free calcium was investgated by confocal laser microscopy. Results The proliferation of fibroblasts was inhibited significantly after emodin treatment in a dose-dependent manner, while the fluorescence intensity of intracellular free calcuim was significantly increased. Conlusion Emodin can inhibit the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts, which mechanism may be related to increasing intracellular calcium.

Key words: hypertrophic scar; emodin; cell culture; cell proliferation; free calcium

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是临床常见疾病,在东亚人群中患病率较高,至目前为止,尚无令人满意的防治措施。

药用大黄是祖国医学的重要药材之一,运用极其广泛,其有效药理成分近年来获得逐步深入的研究。大黄素(Emodin)是药用大黄的主要成分之一,最近的一系列研究证实它具有广泛的病理作用,主要有抑制器官纤维化、抗炎及抗肿瘤等。研究表明大黄素能有效地抑制人肾成纤维细胞的分裂增殖和促其凋亡的作用,从而达到减轻层粘连蛋白肾间质纤维化病变,改善其预后[1]。大黄素还能显著抑制血清促大鼠肝星状细胞HSC-T6的增殖以及血小板衍虫生长因子HSC-T6细胞增殖作用[2]。而大黄素在增生性瘢痕中的作用报道较少,值得进一步的研究。

本研究运用细胞培养、MTT比色和激光共聚焦显微镜的手段,研究了人增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblasts, HSFb)在不同浓度大黄素的作用下所表现出来的细胞生物学特点进行了观察,有助于为临床的增生性瘢痕防治工作开拓新的措施。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

大黄素(辽宁生物医药科技有限公司),DMEM高糖培养基(Gibco),0.25%胰蛋白酶(进口分装),新生牛血清(杭州四季青),D-Hanks缓冲液(自制),四唑蓝(MTT,Sigma),Fluco-4乙酸羟基甲酯(Fluco-4/AM,Biotium),非离子型多元醇表面活性剂(Pluronic F127,Biotium),Bio-Rad 550型酶标仪(Bio-Rad Laboratories. Inc),隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),Olympus光学显微镜(Olympus),激光共聚焦显微镜(SP5,Leica)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 选择本科室临床诊断为增生性瘢痕住院

作者简介:夏 珊(1981-),女,安徽省池州市人,硕士研究生,医师,主要从事人增生性瘢痕防治方面的研究。电话:(023)65410784

通讯作者:李世荣,电话:(023)65410724;E-mail: zhengxing@vip.163.com

收稿日期:2007-05-10;修回日期:2007-08-30

患者(15～30 岁)共 6 例，分别切取颈部、胸部、肘部瘢痕标本共 8 个，以组织块法原代培养 HSFb，培养液为 DMEM + 10% 新生牛血清，0.25% 胰蛋白酶常规消化传代，经倒置显微镜下观察确定所获得细胞为 HSFb 后，取第 4～8 代细胞进行研究[3]。

1.2.2　细胞增殖实验　　大黄素以 0.2 mol/L 的 NaOH 溶解后用含 10% 新生牛血清 DMEM 培养液稀释，配制成 20、40、60 μg/ml 浓度，取 96 孔细胞培养板，每孔中加 0.1 ml 含 3×10^4/ml 的 HSFb 培养液(含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液)，在 37 ℃ 5% CO_2 的饱和水汽二氧化碳培养箱中培养，48 h 后换液后加入不同浓度的大黄素，每组浓度药物设置 5 个复孔，同时设置空白对照组，以含 10% 新生牛血清的 DMEM 为调零孔，分别在药物作用 24、48、72、96、120 h 后加入含 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl，37 ℃ 孵箱中培养 4 h 后吸弃培养液，加入 100 μl 二甲基亚砜(DMSO)，充分震荡后，置于 Bio-Rad 550 型酶标仪中，波长选择 490 nm，检测吸光度值[D(490)]，记录每孔测量结果，对结果进行统计学分析，绘制细胞增殖曲线[1]。选择第 72～120 小时的结果计算细胞抑制率，其计算公式为细胞抑制率 = [1 - 处理组 D(490) 值/对照组 D(490) 值] × 100%。

1.2.3　细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的测量(动态法)　　将细胞按常规方法消化，含血清细胞悬液以 1×10^5/ml 密度接种于 6 孔板，进行细胞爬片，8 h 后更换用无血清 DMEM 培养基，37 ℃孵箱中培养过夜，次日晨用缓冲液冲洗 2 次，加入 Fluco-4/AM 至终浓度为 8 μmol/L，并加入配制好的 F127 4 μl 助溶，于37 ℃ 孵箱中培养 30 min，再用缓冲液冲洗 2 次，以激光共聚焦显微镜观察。实验条件在整个观察过程中不变。随机选择 3～4 个细胞动态扫描细胞内 Ca^{2+} 的荧光吸光度。先扫描记录一段正常波动曲线，再加入药物，观察并记录荧光强度变化。利用激光共聚焦显微镜所配备的数据与图像处理软件，计算出整个细胞荧光强度的相对值，以观察 Ca^{2+} 动态变化。细胞内 Ca^{2+} 浓度变化用给药前后荧光强度变化计算：$[Ca^{2+}]_i = (F - F_0)/F_0 \times 100\%$。

其中 F 表示给药后的荧光强度，由包括峰值在内的 3 个测定值确定，F_0 表示静息状态的荧光强度，由平台期 3 个时间点的测定值确定。

1.3　统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析。

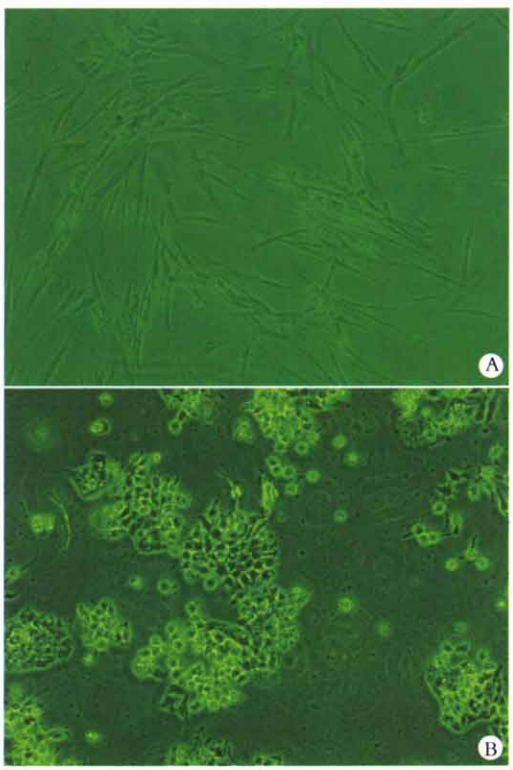
2　结果

2.1　镜下观察

细胞在倒置显微镜下观察呈典型长梭形，胞体较大，细胞质丰富胞突多，呈多角型，部分细胞可见向外伸出 2～3 个长短不一的突起，细胞走向趋于一致，为典型的成纤维细胞。加入大黄素处理后，药物浓度加大、作用时间延长，活细胞数量逐渐减少，细胞间隔增宽。细胞突起明显缩短，甚或消失。细胞变圆，胞体缩小。细胞质减少，有的呈空泡状，染色质浓缩边聚，胞核模糊或断裂成块状，见图 1。

2.2　MTT 法测细胞增殖

不同浓度的大黄素作用于 HSFb 后，和对照组相比，随着时间的推移，各浓度组均表现出一定的抑制趋势。如表 1 所示，20 μg/ml 的大黄素的增殖速度一直稍低于对照组，40 μg/ml 在第 72 小时细胞增殖开始下降，在随后的 48 h 之内进一步表现出抑制的趋势，而 60 μg/ml 的大黄素的抑制效应表现的最为强烈，细胞的增殖趋势几乎完全被抑制。所获得数据经统计分析，药物作用后第 72～120 小时，和对照组数据相比，40 μg/ml 和 60 μg/ml 组数据有显著性差异($P < 0.05$)。相应各组大黄素对瘢痕成纤维细胞的增殖抑制率也随着浓度的增长在逐渐加大，在第 96 小时，40 μg/ml 和 60 μg/ml 组的细胞增殖抑制率分别为 13% 和 19%，而在第 120 小时，则分别涨至 22% 和 27%。



A：给药前；B：40 μg/ml 药物处理后 96 h

图 1　人增生性瘢痕成纤维细胞　(倒置显微镜 ×100)

表 1　不同浓度的大黄素对 HSFb 的增殖抑制的结果

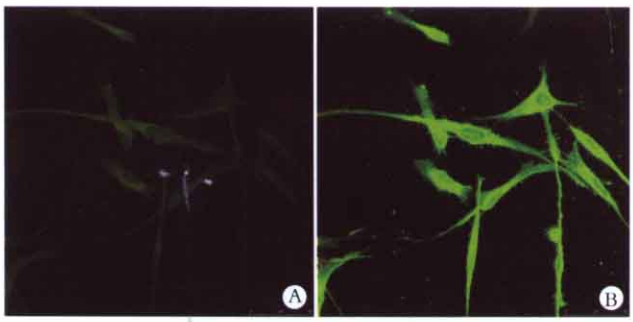
[D(490)，$n = 5$，$\bar{x} \pm s$]

浓度 (μg/ml)	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0	0.155 ± 0.007	0.156 ± 0.007	0.173 ± 0.006	0.200 ± 0.007	0.223 ± 0.006
20	0.154 ± 0.006	0.156 ± 0.006	0.174 ± 0.005	0.190 ± 0.007	0.199 ± 0.009
40	0.154 ± 0.007	0.155 ± 0.007	0.165 ± 0.006[a]	0.174 ± 0.005[a]	0.175 ± 0.008[a]
60	0.157 ± 0.005	0.165 ± 0.005	0.166 ± 0.005[a]	0.162 ± 0.004[a]	0.163 ± 0.004[a]

a：$P < 0.05$，与 0 组比较

2.3　激光共聚焦测细胞内 $[Ca^{2+}]_i$

不同浓度组大黄素处理 HSFb 后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度均呈现迅速上升的态势，但持续时间和增长幅度有所不同，20 μg/ml 的大黄素使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度在 53 s 之内上升了 145%，40 μg/ml 组在 65 s 内上升了 175%，而 60 μg/ml 组在 74 s 之内骤升了 225%。并且在随后约 10 min 的观察期内，这种高强度钙荧光水平没有明显下降的趋势，相对稳定于一个平台期，见图 2。



A:给药前; B:给药 74 s

图2 人增生性瘢痕成纤维细胞内 Ca^{2+} 荧光照片 (荧光显微镜×600)

3 讨论

增生性瘢痕是人体常见疾病,其主要病理改变是瘢痕组织内成纤维细胞的大量增殖和细胞外基质的沉积。研究表明,成纤维细胞的增殖与凋亡和增生性瘢痕的形成、消退过程密切相关[4,5]。本实验用现代生物学研究方法,初步探索了大黄素在人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖中所起到的抑制作用及其可能的作用机制。

在研究过程中,人们发现,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 是一种很重要的细胞生物作用参与元素。它不仅参与细胞的增殖、分化,而且在细胞内的信号传递过程中作为第二信使发挥着诸多调控功能,如膜内外信息的传递,膜兴奋的控制,酶活性的调节等,均依赖于 Ca^{2+} 的参与。正常生理机制对细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的调控有一定的限度,在生理状态下,胞浆内 Ca^{2+} 浓度约为 10^{-7} mol/L,而细胞外 Ca^{2+} 浓度约为 10^{-3} mol/L。细胞浆内的 Ca^{2+} 贮存系统,如内质网和线粒体,其 Ca^{2+} 浓度也为 10^{-3} mol/L。超过极限将导致细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度升高,引起细胞和线粒体 Ca^{2+} 超载,从而触发一系列有害的病理生理过程,如线粒体供能障碍,细胞膜结构破坏等[6]。

目前认为,胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的大量增加,形成 Ca^{2+} 超载之后,有可能导致细胞增殖抑制或死亡,其可能的机制在于[7-9]:①正常细胞内 Ca^{2+} 依赖的核酸内切酶,与 ATP 一起作用于染色质,使其结构松散并暴露于 Dnase 的水解作用下;②激活谷氨酰胺转移酶,催化蛋白质交联;③Ca^{2+} 参与钙调素依赖的磷酸酯酶的作用,使磷酸化的物质脱磷酸化;④直接作用于核内的相关转录因子;⑤激活细胞内的中性蛋白水解酶。

本实验观察到不同浓度的大黄素对人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖具有明显的抑制作用,使得细胞增殖曲线偏离 S 型形态,并且在 40 μg/ml 以上的浓度组中,细胞的增殖形态和空白对照组相比,明显表现出抑制趋势,说明细胞的数量在观察期间并没有明显的增长。而镜下观察则表明了在大黄素的作用下,细胞的形态发生了改变,在从双极型逐渐丧失极性的过程中,细胞也逐渐丧失了增殖能力。

经过检测药物作用后。细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的变化,我们发现大约在 1 min 作用,细胞内 Ca^{2+} 的荧光强度急剧上升,其幅度均超过了 140%,最高的60 μg/ml 组,胞内 Ca^{2+} 的荧光强度在 74 s 之内上升了 225%。通常胞内 Ca^{2+} 浓度的调节主要是依赖于胞内"钙库"的迅速吸收和释放来实现的,但在此后长达 8 min 的观察时间里,荧光强度均未见明显的下降趋势,相对稳定于一个平台期,表明在此时胞内"钙库"的调节功能可能已经受损。另外,实验过程中所观测到的细胞形态随着浓度和时间的推移而发生改变,也从侧面验证了 Ca^{2+} 超载对细胞所造成的损伤。从这里可以推测,大黄素对人增生性瘢痕成纤维细胞的抑制作用的重要环节是通过胞内 Ca^{2+} 严重而持续的超载来实现的,这种钙超载似乎具有剂量依赖性,并最终影响到细胞的各种生理功能,抑制了细胞的增殖或导致了细胞死亡。但其具体的作用通路和量效关系需要进一步的实验验证。

综上所述,本研究证明,40 μg/ml 以上浓度的大黄素对人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖具有明显的抑制效果,推测其可能的作用环节在于大黄素可以强烈地导致细胞内 Ca^{2+} 超载,影响到细胞的正常增殖功能,从而为以后对大黄素抗瘢痕的研究开辟新的方向。

参考文献:

[1] 刘冠贤,叶任高,谭志明,等. 大黄素延缓狼疮性肾炎肾间质纤维化作用的研究[J]. 中国实验临床免疫学杂志,1999,11(3):24-27.

[2] 齐荔红,刘 晔,史 宁,等. 大黄素对大鼠肝星状细胞增殖和合成胶原的影响[J]. 第二军医大学学报,2005,26(10):1190-1191.

[3] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养(修订版)[M]. 西安:世界图书出版公司,2004:72-73,250.

[4] Chodon T, Sugihara T, Igawa H H, *et al*. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance[J]. Am J Pathol, 2000, 157(5): 1661-1669.

[5] Luo S, Benathan M, Raffoul W, *et al*. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(1): 87-96.

[6] 张亚松,涂植光. Ca^{2+} 与细胞凋亡[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册,2001,22(3):127-128.

[7] Kato M, Nonaka T, Maki M, *et al*. Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells[J]. J Biochem (Tokyo), 2000, 127(2): 297-305.

[8] Ermak G, Davies K J. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death[J]. Mol Immunol, 2002, 38(10): 713-721.

[9] Enslen H, Soderling T R. Roles of calmodulin-dependent protein kinases and phosphatase in calcium-dependent transcription of immediate early genes[J]. J Biol Chem, 1994, 269(33): 20872-20877.

(编辑 栾 嘉)