论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0618-03

三羟基异黄酮抑制增生性瘢痕成纤维细胞转分化作用的研究

曹 川,李世荣,覃 霞,陈艳清,姚 恒,冯 智,李 □ (第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察三羟基异黄酮(Genistein)对人增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化的影响,探讨其抑制组织纤维化的作用机制。方法 体外培养人HS成纤维细胞,分别以25、50、100 μmol/L浓度的Genistein进行处理,流式细胞术检测体外培养HS成纤维细胞中α-SMA阳性细胞率;Western blot检测细胞α-SMA蛋白的表达;观察HS成纤维细胞三维培养组织的收缩情况。结果 在Genistein作用下,α-SMA阳性细胞率及α-SMA蛋白表达与对照组比较均降低($P<0.05$);其中50、100 μmol/L组与对照相比较具有非常显著性差异($P<0.01$)。HS成纤维细胞三维培养组织持续收缩,加入Genistein作用后,组织块的收缩现象减弱,第48、72小时,50 μmol/L与100 μmol/L组收缩指数(CI)显著低于对照组($P<0.01$),呈现明显的时效-剂量关系。结论 Genistien能抑制HS成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化,可能是其抗组织纤维化的作用机制之一。

关键词:转分化;三羟基异黄酮;增生性瘢痕;成纤维细胞
中图法分类号:R329.28;R364.31;R965 文献标识码:A

Genistein inhibits transdifferentiation of human hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*

CAO Chuan, LI Shi-rong, QIN Xia, CHEN Yan-qing, YAO Heng, FENG Zhi, LI Zhe (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of genistein on the transdifferentiation of the cultured human hypertrophic scar fibroblasts and to explore the mechanism of the anti-fibrosis by genistein. Methods Human hypertrophic scar fibroblasts were cultured in presence of genistein (25, 50, and 100 μmol/L respectively). The rate of α-SMA-positive cells was measured with flow cytometry and the expression of α-SMA protein was detected by Western blotting. The fibroblasts in 3D gel culture were established and their contraction was measured 24, 48, and 72 h after genistein treatment. Results After the treatment with genistein, the rate of α-SMA-positive cells and the expression of α-SMA protein were significantly decreased ($P<0.05$), especially when treated with 50 and 100 μmol/L genistein ($P<0.01$). In fibroblasts in 3D gel culture, the control cells kept contracting. The contraction of the experimental cells was weakened after genistein treatment in a dose-dependent and time-dependent manner. Conclusion Genistein can inhibit the transdifferentiation of the cultured human hypertrophic scar fibroblasts to myofibroblasts, which may be one of the important anti-fibrosis mechanisms.

Key words: transdifferentiation; genistein; hypertrophic scar; fibroblasts

细胞在特定的生理和病理情况下可发生形态、结构和功能的改变,这种细胞表型转化的现象称为转分化(transdifferentiation)[1]。研究表明肌成纤维细胞(myofibroblast)有强大的促细胞外基质沉积和组织收缩的作用,与器官纤维化的发生、发展有着密切关系,成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞是增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)形成的重要机制之一[2]。5,7,4'-三羟基异黄酮(Genistein)是来源于豆类的植物雌激素,它是一种特异性酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase,TPK)抑制剂,对多种肿瘤和组织器官纤维化有显著的抑制作用。我们在前期的研究中证实Genistein具有体外抗瘢痕纤维化作用[3],本研究进一步观察Genistein对体外培养的HS成纤维细胞转分化作用的影响,以明确Genistein抗瘢痕组织纤维化的作用机制,为临床应用异黄酮类药物治疗病理性瘢痕提供理论基础。

作者简介:曹 川,男,湖北省武汉市人,博士,主治医师,讲师,主要从事创伤修复和瘢痕防治方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)65410744

收稿日期:2007-07-26;修回日期:2007-11-06

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　Genistein（美国 Sigma 公司）；DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶（美国 HyClone 公司）；活性胶原蛋白（四川铭让生物科技有限公司）；大鼠抗人 α 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）单克隆抗体（北京中山生物技术有限公司）；FITC 标记羊抗鼠 IgG 抗体（北京中杉金桥生物技术有限公司）。

1.1.2　主要设备　YJ-875 型超净工作台（苏州安泰空气技术公司）；倒置相差显微镜（日本 Olympus 公司）；TGL-16G 型台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；Mini-PROTEAN 型垂直电泳槽、Gel-Doc 2000 型凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）；ELITE-ESP 型流式细胞仪（美国 Bencton Dickinson 公司）。

1.1.3　标本来源　实验用瘢痕组织为我科室 6 例深Ⅱ～Ⅲ度烧伤后 8 个月至 1 年增生性瘢痕患者行整形手术所切取的瘢痕组织标本。瘢痕外观充血发红、质硬，高出皮面 1 cm 以上，处于增生活跃期并伴有显著的挛缩表现。所有标本经病理检查确诊。

1.2　方法

1.2.1　增生性瘢痕成纤维细胞体外分离培养　按文献[3]的方法进行 HS 成纤维细胞分离培养及传代，实验用第 3～5 代细胞。

1.2.2　流式细胞术检测 α-SMA 阳性细胞率　PBS 冲洗细胞，0.25% 胰蛋白酶消化分离细胞，调整细胞数为 1×10^6/ml，接种于 6 孔板，每孔 2 ml；12 h 后换为无血清培养基继续培养 24 h。实验组加入 DMSO 配制的终浓度为 25、50、100 μmol/L 的 Genistein，对照组加同体积的 DMSO，继续培养 48 h。收集细胞悬液，2% 多聚甲醛冰浴固定，Triton-X100 及枸橼酸钠作用细胞打孔后，加入鼠抗人 α-SMA 一抗反应 30 min；PBS 漂洗后加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG 避光孵育 30 min，PBS 漂洗后重悬细胞，400 目筛网过滤除去成团细胞，流式细胞仪测定 α-SMA 阳性细胞的百分数，以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.3　Western blot 检测细胞 α-SMA 蛋白表达　换无血清 DMEM 培养基培养 24 h，再按上述浓度分组加入 Genistein 反应 48 h。常规收集细胞，加入预冷的细胞裂解液 RIPA 和胰蛋白酶抑制剂 PMSF 冰上静置 30 min 裂解细胞，4 ℃振荡离心，收集上清；Lowry 法测定蛋白含量。加适量上样缓冲液 100 ℃热变性 5 min，取 100 μg 总蛋白在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳；再将凝胶中的蛋白质低温电转移至硝酸纤维素膜；用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h，加入 α-SMA 一抗（1∶500 稀释）4 ℃过夜；TBST 清洗后再加入 FITC 标记的二抗（1∶2 000 稀释）室温孵育 2 h。用荧光成像分析系统采集蛋白电泳条带，观察 α-SMA 的表达量变化。以 β-actin 为内参照蛋白，Quangtity One 软件分析计算得到蛋白表达指数。表达指数（EI）=（目的蛋白条带面积 × 灰度）/（内参照蛋白条带面积 × 灰度）。

1.2.4　增生性瘢痕成纤维细胞三维培养及胶原收缩指数的检测　参照文献[4]的方法建立 HS 成纤维细胞体外三维培养模型：取 3～5 代对数生长期细胞，0.25% 胰蛋白酶消化后用含 10% 小牛血清的 DMEM 重悬细胞，调整细胞数为 5×10^6/ml，按细胞悬液∶小牛血清∶5 × DMEM∶胶原蛋白溶液 = 1∶1∶2∶6（体积）的比例混合上述各种成分；将该成纤维细胞-胶原蛋白混悬液加入直径 35 mm 的细胞培养皿中，每培养皿 2 ml，置于 5% CO_2、37 ℃细胞培养箱中培养；当细胞悬液形成凝胶状时，加入含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基，使凝胶块与培养皿表面分离。按上述浓度分组加入 Genistein 培养液培养 72 h，于加药后第 24、48、72 小时分别用透明坐标纸测定凝胶块的最大和最小直径，计算收缩指数。收缩指数（CI）= [1 −（D/D_0）^{2}] × 100%，其中 D 为凝胶块最大与最小直径的均数，D_0 为培养皿凝胶组织块的初始直径（33 mm）。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件，实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示；两两比较用 t 检验，组间比较采用单因素方差分析。

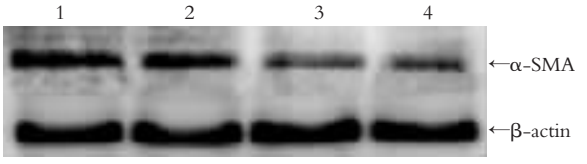
2　结果

2.1　HS 成纤维细胞 α-SMA 阳性细胞百分比的变化

流式细胞检测结果显示 25 μmol/L Genistein 对 α-SMA 阳性细胞百分比无影响作用，与对照组相比无显著性差异（$P>0.05$）；50、100 μmol/L Genistein 作用 48 h 后 α-SMA 阳性细胞数量显著减少，与对照组比较差异具有显著性意义（$P<0.05$，表 1）。

2.2　HS 成纤维细胞 α-SMA 蛋白表达量的变化

Western blot 检测结果显示，培养的 HS 成纤维细胞有一定量的 α-SMA 蛋白表达，加入 Genistein 作用后各组 α-SMA 蛋白表达均有减少（$P<0.05$），其中 50、100 μmol/L 组与对照相比较具有非常显著性差异（$P<0.01$，图 1，表 1）。



1∶对照组；2∶25 μmol/L；3∶50 μmol/L；4∶100 μmol/L

图 1　Western blot 检测 HS 成纤维细胞 α-SMA 蛋白表达结果

表 1　Genistein 对 HS 成纤维细胞 α-SMA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	α-SMA 阳性细胞百分率（%）	α-SMA 蛋白表达（EI）
对照组	24.32 ± 0.91	0.36 ± 0.05
25 μmol/L	22.15 ± 0.55	0.23 ± 0.12[a]
50 μmol/L	18.36 ± 0.39[a]	0.20 ± 0.07[a]
100 μmol/L	12.71 ± 1.85[b]	0.15 ± 0.08[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.3　HS 成纤维细胞三维培养组织收缩情况

随着时间的延长，对照组 HS 成纤维细胞三维培养组织持续收缩，说明其转分化的肌成纤维细胞的活性作用使组织块收缩。加入 Genistein 作用后，组织块的收缩现象减弱。第 48 小时与第 72 小时，50 μmol/L 与 100 μmol/L 组收缩指数与对照组相比具有非常显著性差异（$P<0.01$）；50 μmol/L 组在 48 h，100 μmol/L 在 48、72 h 与各自浓度组 24 h 时相点的 CI 相比差异不明显（$P>0.05$）。说明大剂量的 Genistein 可有效抑制 HS 成纤维细胞三维培养模型的挛缩，这种抑制作用在早期即较为显著（表 2）。

表2 Genistein 对 HS 成纤维细胞三维培养组织收缩效应的影响 [CI,($\bar{x} \pm s$)%]

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	46.15 ± 5.88	58.29 ± 3.75[d]	70.33 ± 8.17[d]
25 μmol/L	42.37 ± 9.37	49.35 ± 7.66[ac]	61.53 ± 12.48[bd]
50 μmol/L	37.43 ± 9.25[a]	38.67 ± 5.99[b]	41.55 ± 10.29[bc]
100 μmol/L	26.49 ± 7.10[b]	29.36 ± 8.39[b]	30.15 ± 6.87[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较，c：$P<0.05$，d：$P<0.01$ 与 24 h 组比较

3 讨论

转分化发生的原因可能为控制发育方向的转录因子表达发生改变，从而使成体干细胞或已分化细胞的分化状态发生改变[1]。转分化对机体具有修复损伤或加重病变的双重生物学意义：一方面，机体通过细胞转分化来代替或修复受损组织和功能；但另一方面长期存在的转分化作用使得细胞功能异常，引起组织的过度增生、纤维化、钙化以及肿瘤形成。

器官纤维化病变的形成与细胞转分化有密切的关系。研究表明，增生性瘢痕组织中有大量的肌成纤维细胞，其可同时表达平滑肌细胞和结缔组织细胞抗原，在超微结构上兼有成纤维细胞与平滑肌细胞二者特征，是产生细胞外基质和组织挛缩的主要因素。α-SMA是肌成纤维细胞的标志性蛋白[5]，作为细胞骨架蛋白，通过跨膜复合物 Fibronexus 与成纤维细胞外纤维黏连蛋白相连，后者又与细胞外基质或其他成纤维细胞连接，从而把肌成纤维细胞的收缩效应传导至整块组织，引起瘢痕的挛缩[6,7]。此外，肌成纤维细胞合成和分泌胶原蛋白的功能极为旺盛，是细胞外基质沉积的主要因素，因此肌成纤维细胞的数量和功能在很大程度上决定了 HS 形成的速度和程度，抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化是抗组织纤维化的重要策略[2,8,9]。

Genistein 是异黄酮类药物的主要成分，研究表明其具有抗肿瘤和治疗多种器官纤维化的作用，这种作用主要通过其特异性抑制 TPK 活性从而抑制细胞的增殖与功能而实现。TPK 在细胞增殖与分化中具有重要的作用。有研究表明，表皮生长因子 EGF 可协同 TGF-β1 诱导肾小管上皮细胞转分化为间充质细胞[10]；此外 Genistein 对酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)诱导的肾小管上皮细胞的转分化具有抑制作用，并呈一定剂量效应关系[11]。我们在前期的研究中已证实 Genistein 可抑制 HS 的增殖与胶原合成[3]，而 Genistein 作为特异性酪氨酸蛋白激酶抑制剂，能拮抗这类生长因子的生物学作用。本实验应用不同浓度的 Genistein 干预体外培养的 HS 成纤维细胞，对肌成纤维细胞标志物 α-SMA 的表达强度以及 α-SMA 阳性细胞率进行了检测，结果观察到后两者均随应用 Genistein 的浓度增高而下降，说明 Genistein 可抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化；进一步实验观察到 Genistein 能显著抑制三维细胞培养凝胶模型的收缩，且具有剂量与时间依赖效应，说明 Genistein 具有体外抗瘢痕组织挛缩的作用。瘢痕形成过程中，多种生长因子的异常表达可引起成纤维细胞内 TPK 的过度激活，继而经过下游一系列信号分子传递到核内，引起 α-SMA 异常表达等转分化现象，使成纤维细胞转化为肌成纤维细胞，导致组织收缩。本实验结果提示 Genistein 可能通过阻断此信号传递途径而发挥其抑制细胞转分化、抗组织挛缩的作用，为防治组织纤维化提供了一条新的研究思路。

参考文献：

[1] 戴胜川，张玉梅，周 同，等. 细胞转分化的病理生理意义[J]. 生命科学，2006，18(1)：58－61.

[2] 刘 勇，岑 瑛，唐 颖，等. 肌成纤维细胞在病理性瘢痕形成中的机制[J]. 中国修复重建外科杂志，2005，19(1)：39－41.

[3] 曹 川，李世荣，陈艳清，等. 三羟基异黄酮对增生性瘢痕成纤维细胞增殖与胶原合成作用的影响[J]. 中国美容整形外科杂志，2007，18(3)：220－222.

[4] 杨松林，何清濂，林子豪，等. 瘢痕成纤维细胞三维培养的实验研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志，1996，12(1)：2－5.

[5] Muchaneta-Kubara E C，el-Nahas A M. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring [J]. Nephrol Dial Transplant，1997，12(5)：904－915.

[6] 贾赤宇，陈璧. α-平滑肌肌动蛋白 N-末端肽对伤口收缩的影响[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(3)：166－169.

[7] Nakazono-Kusaba A，Takahashi-Yanaga F，Morimoto S，*et al*. Staurosporine-induced cleavage of alpha-smooth muscle actin during myofibroblast apoptosis[J]. J Invest Dermatol，2002，119(5)：1008－1013.

[8] 朱剑武，赖西南，王正国，等. 增生性瘢痕成纤维细胞 P 物质表达的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(3)：183－185.

[9] 谢 锋，王喜梅，牛扶幼，等. 增生性瘢痕组织中细胞外信号调节激酶和增殖细胞核抗原蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(6)：1036－1038.

[10] Okada H，Danoff T M，Kalluri R，*et al*. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation[J]. Am J Physiol，1997，273(4 Pt 2)：F563－F574.

[11] 梅煜明，张 璟，黄云剑，等. 蛋白酪氨酸激酶活性在人肾小管上皮细胞转分化中的作用[J]. 重庆医学，2004，33(11)：1661－1663.

(编辑 邓强庭)