文章编号:1000-5404(2008)10-0921-03

论著

结缔组织生长因子通过PI3K/PKB抑制人增生性瘢痕成纤维细胞凋亡

刘剑毅,李世荣 (第三军医大学西南医院整形美容外科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)是否具有抑制人增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast,HSF)凋亡的作用及磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路(PI3K/PKB)是否介导该效应。**方法** 体外培养HSF,实验分3组:①空白对照组,②CTGF刺激组(10 ng/ml),③PI3K抑制剂LY294002(10 μmol/L)预处理后CTGF刺激组(LY294002组)。应用免疫印迹技术检测30 min后蛋白激酶B的活化情况,应用流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 和空白对照组相比,CTGF组细胞凋亡指数下降,蛋白激酶B的活化水平升高,具有统计学差异($P<0.05$);LY294002组细胞凋亡指数上升,蛋白激酶B的活化水平没有升高,与CTGF组比较具有显著性差异($P<0.05$)。**结论** CTGF能够抑制HSF凋亡,PI3K/PKB介导该效应。

关键词: 结缔组织生长因子;增生性瘢痕;成纤维细胞;磷脂酰肌醇3激酶;蛋白激酶B;凋亡
中图法分类号: R329.28;R341;R619.6 **文献标识码:** A

Connective tissue growth factor inhibits apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal pathway

LIU Jian-yi, LI Shi-rong (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore whether the anti-apoptotic effect of connective tissue growth factor on human hypertrophic scar fibroblasts is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) signal pathway. **Methods** The cultured human hypertrophic scar fibroblasts were divided into three groups: control group, connective tissue growth factor (10 ng/ml) stimulated group, the group pretreated with PI3K inhibitor LY294002 (10 μmol/L) and stimulated with connective tissue growth factor. Levels of phosphorylated PKB were examined by Western blotting in human hypertrophic scar fibroblasts that were stimulated with connective tissue growth factor for 30 min. Flow cytometry was used to detect the apoptosis ratio of the cells. **Results** Compared with the control group, the apoptosis ratio of the connective tissue growth factor stimulated group decreased ($P<0.05$) and the activation of PKB increased ($P<0.05$). However, the apoptosis ratio of connective tissue growth factor stimulated group after the pretreatment of PI3K inhibitor LY294002 increased ($P<0.05$), and the activation of PKB remained as the control group. **Conclusion** It is proven that connective tissue growth factor can inhibit the apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts through PI3K/PKB signaling pathway.

Key words: connective tissue growth factor; hypertrophic scar; fibroblast; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; apoptosis

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是人类皮肤真皮损伤后以成纤维细胞过度增殖和细胞外基质如胶原等过度沉积为特征的皮肤纤维化疾病。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)是一种具有强烈促纤维化作用的生长因子,具有抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的作用[1],但其是否也具有抑制人增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast,HSF)凋亡的作用尚少见报道。磷脂肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路(PI3K/PKB)参与CTGF促HS纤维化,但是否介导抑制凋亡效应,尚少见报道。本研究拟应用CTGF刺激HSF,检测细胞凋亡变化,并应用PI3K抑制剂LY294002进行阻断,以初步阐明CTGF对人HSF凋亡的作用,以及PI3K/PKB信号通路在其中的作用。

基金项目: 国家自然科学基金(30400472)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400472)
作者简介: 刘剑毅,男,山东省潍坊市人,博士,主治医师,主要从事病理性瘢痕的基础方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)66261671
收稿日期: 2008-01-04;**修回日期:** 2008-03-14

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人重组 CTGF 购自美国 Peprotech 公司。总 PKB 多克隆抗体和抗磷酸化 PKB（p-PKB）多克隆抗体、PI3K 特异性抑制剂 LY294002、辣根过氧化物酶连接的“二抗”、生物素化的蛋白相对分子质量标准及其抗体以及化学发光试剂均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。预染的蛋白相对分子质量标准购自美国 Promega 公司。PI 染色试剂盒购自深圳晶美生物公司。DMEM 培养基和新生小牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 实验所用 HS 组织取自我科因 HS 自愿行手术治疗的患者，均为创面愈合 3 个月以上瘢痕仍持续增生者。共 6 例，其中男性 4 例，女性 2 例，年龄 21 ~ 40 岁，平均 29.2 岁。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。用酶消化法分离成纤维细胞，于 37 ℃、5% CO_2 的孵箱中培养、传代。实验用第 5 ~ 7 代细胞，用 0.25% 胰酶消化后，以 8×10^5/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。实验分 3 组：空白对照组、CTGF 刺激组（10 ng/ml）、PI3K 抑制剂 LY294002（10 μmol/L）预处理后 CTGF 刺激组（LY294002 组，先用 10 μmol/L LY294002 作用细胞 60 min，再与 10 ng/ml CTGF 共同作用细胞 30 min）。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 收集细胞 1×10^5 个，900 r/min 离心 5 min，弃去培养液；用 Buffer A 洗涤细胞 1 次（2 000 r/min 离心 5 min）收集并调整细胞数为 1×10^6/ml；细胞加 9 倍体积的 70% 乙醇，于 -20 ℃ 固定至少 12 h；离心收集细胞后，用 Buffer A 洗细胞以除去乙醇，细胞重悬于 500 μl Buffer A 中；加入 RNase A，使其终浓度为 0.25 mg/ml，37 ℃ 反应 30 min；加入 5 μl PI 室温避光染色 30 min，准备上机检测；PI 用氩离子激发荧光，激发光波为 488 nm，发射光波长大于 630 nm，产生红色荧光。计算细胞凋亡指数（AI）= 阳性细胞数/细胞总数 × 100%。

1.2.3 Western blot 检测 PKB 活化情况 采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）和免疫印迹杂交法。药物作用：以 10 ng/ml CTGF 作用 HSF 30 min。细胞总蛋白的提取：弃去药物，预冷的磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗细胞，立即加入 1 × SDS 上样缓冲液（含 62.5 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸，2% SDS，10% 甘油，50 mmol/L 二硫苏糖醇，0.01% 溴酚蓝），迅速刮下细胞，冰上裂解，冰上细胞超声 15 ~ 20 s，离心，取上清液于 -70 ℃ 保存。SDS-PAGE 和免疫印迹杂交：各取 20 μl 细胞裂解提取物，95 ℃ 变性 5 min，上样，进行电泳、转膜、洗膜后封闭，加入抗 p-PKB 多抗（1∶1 000），4 ℃ 过夜，洗膜，加入二抗室温下作用 1 h，洗膜后加化学发光液，X 线片曝光，对蛋白条带进行吸光度值［D(480)］测定。洗脱液洗膜和再杂交：曝光后，洗膜，洗脱液与膜 50 ℃ 下作用 30 min，再次洗膜，封闭，加入抗总 PKB 抗体（1∶1 000），4 ℃ 过夜，洗膜，加二抗，洗膜，化学发光，X 线片曝光，对蛋白条带进行吸光度值［D(480)］测定。以 p-PKB 和总 PKB D(480) 值的比值（p-PKB/PKB）表示 PKB 的活化水平。

1.3 统计学方法

实验重复 3 次，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，组间比较行方差分析。

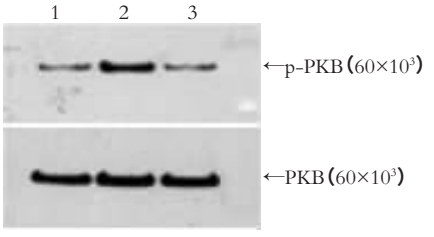
2 结果

2.1 细胞凋亡情况

应用流式细胞术检测 HSF 的凋亡，并计算凋亡指数。和空白对照组［(8.63 ± 1.92)%］相比，CTGF 组细胞凋亡指数［(1.78 ± 0.27)%］下降，具有统计学差异（$P < 0.05$）；LY294002 组细胞凋亡指数［(8.22 ± 2.04)%］上升，和 CTGF 组相比具有统计学差异（$P < 0.05$）。空白对照组和 LY294002 组相比无统计学差异（$P > 0.05$）。

2.2 PKB 活化情况

空白对照组 PKB（0.35 ± 0.09）有较少量的磷酸化表达，CTGF 组（0.67 ± 0.16）PKB 活化水平升高，而 LY294002 组（0.28 ± 0.06）PKB 活化水平并没有升高，与 CTGF 组比较具有统计学差异（$P < 0.05$），结果见图 1。



1：空白对照组；2：CTGF 组；3：LY294002 组

图 1 免疫印迹法检测 p-PKB 活化水平

3 讨论

HS 是烧伤、整形乃至整个创伤修复领域亟待解决的难题之一。和正常皮肤成纤维细胞不同，HS 成纤维细胞凋亡减少，增殖旺盛，并持续分泌胶原[2]。CTGF 是一种新发现的在纤维化病程中发挥重要促进作用的生长因子，具有促进成纤维细胞增殖、分化的作用[3,4]，我们前期研究表明它具有抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的作用[1]。此次实验，我们应用外源重组人 CTGF 刺激体外培养的 HSF，观察到其细胞凋亡指数明显下降，说明在 HS 发病过程中，CTGF 同样具有促使 HSF 免于凋亡的作用，但其发挥抑制凋亡效应的细胞内信号传导途径不明。

PI3K/PKB 是近年来发现的一个新的生长因子信号传导途径，主要通过生长因子与受体结合而激活，如血小板源生长因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子等。PKB 是 PI3K 的一个重要的下游调节激酶，它可以通过 PI3K 生成的脂类与 PKB 的 PH 区域结合，然后被这些脂类调控的激酶磷酸化而活化[5]。大量研究证

实,PKB 与细胞代谢、生长、凋亡、恶变等密切相关,是机体维持正常生命活动的一个重要调节因子[6,7]。

细胞凋亡时核酸内切酶激活,导致 DNA 的广泛断裂,这是细胞凋亡的特征性表现,也为流式细胞仪鉴别凋亡细胞奠定了物质基础。细胞在染色之前,首先经过去污剂处理,由于细胞膜的通透性增加和固定剂的影响,使降解的 DNA 不能完全封闭于细胞中,在细胞洗染过程中 DNA 碎片从细胞内逸出,因此凋亡细胞的 DNA 含量减少;加之由于 DNA 的降解,与荧光染料的结合减少,故细胞荧光强度降低。DNA 直方图上显示在 G_0/G_1 峰前出现 1 个 DNA 含量减少的亚二倍体或者称亚 G_0/G_1 峰,又称凋亡细胞峰。PI3K/PKB 参与 CTGF 促 HS 纤维化,其是否介导 CTGF 抑制凋亡? 我们应用 10 ng/ml CTGF 刺激细胞后,PKB 被激活,磷酸化水平升高,细胞凋亡指数下降,说明了 CTGF 具有使 HSF 免于凋亡的作用。同时应用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 预处理 HSF,再以 CTGF 刺激,结果表明和空白对照组相比,细胞凋亡指数无明显下降, PKB 磷酸化水平无明显增高,这说明 LY294002 阻断了 PI3K/PKB 信号通路,外源性 CTGF 刺激不能产生抑制凋亡的效应,亦即 PI3K/PKB 信号通路介导了 CTGF 抑制凋亡的效应。但该通路介导 CTGF 促纤维化作用的细胞核内机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] 刘剑毅, 李世荣, 纪淑兴. CTGF 反义寡核苷酸对人瘢痕疙瘩成纤维细胞的作用[J]. 中华整形外科杂志, 2004, 20 (6): 455 - 457.
[2] Colwell A S, Phan T T, Kong W, *et al*. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation[J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 116(5): 1387 - 1390.
[3] Khoo Y T, Ong C T, Mukhopadhyay A, *et al*. Upregulation of secretory connective tissue growth factor (CTGF) in keratinocyte-fibroblast coculture contributes to keloid pathogenesis[J]. J Cell Physiol, 2006, 208(2): 336 - 343.
[4] 李 喆, 李世荣, 刘剑毅, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(8): 775 - 777.
[5] Dreesen O, Brivanlou A H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells[J]. Stem Cell Rev, 2007, 3(1): 7 - 17.
[6] Gustin J A, Ozes O N, Akca H, *et al*. Cell type-specific expression of the IkappaB kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(3): 1615 - 1620.
[7] Zhang X, Jin B, Huang C. The PI3K/Akt pathway and its downstream transcriptional factors as targets for chemoprevention[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(4): 305 - 316.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2008)10-0923-01

个案与短篇

术中胆道造影 CR 技术的临床应用

席道友,戚跃勇,张启川,周 宇 (第三军医大学新桥医院放射科,重庆 400037)

随着计算机 X 线摄片技术(computed radiography, CR)的广泛普及,CR 的高敏感度和宽容度使术中胆道造影摄片的成功率及影像质量亦提高[1]。为了更好的面向临床提供优质的影像及诊断质量,我们与手术医师及麻醉师密切配合,控制好患者呼吸后,立即进行曝光,在较短的时间内完成注射造影剂并进行摄片,要求一次性配合完成。准确掌握曝光时间是影响术中胆道造影摄片的重要因素。现探讨术中胆道造影 CR 技术的临床应用。

1 资料与方法

收集我院 2006 年 5 月至 2007 年 10 月肝胆外科住院患者 100 例,男性 36 例,女性 64 例,年龄 18 ~ 82 岁,平均 36 岁。日本岛津 50 mA 移动床旁机,美国 Kodak Directview CR900 成像系统,10 in × 12 in IP 板,Dryview8900 干式激光相机。在手术之前放置木制盒子,辅消毒床单,让患者舒适仰卧于手术台上,麻醉师麻醉患者,肝胆科医师给患者剖腹后,将胆道组织结构完全暴露,由收受医师抽取 10 ml 安射力造影剂,穿刺到胆总管后,马上将先准备好的 IP 板放置到木制的盒子中间,IP 板上方包括患者右侧第 10 前肋,下方包括患者的髂前上棘,中心点对准胆总管的中心,手术台向头侧倾斜 15°,焦点与 IP 板距 90 cm,电压 75 ~ 80 kV,曝光量 20 mAs。麻醉师控制患者呼吸,术后医生给患者注射造影剂,当造影剂注射约 8 ml 时,立即按下曝光开关,造影结束后,快速将 IP 板送回到 CR 系统进行图像处理。

2 结果

100 例胆道系统手术中,右肝管结石 56 例(结石伴蛔虫 17 例),肿瘤 6 例,左肝管结石 22 例(结石伴蛔虫 6 例),肿瘤 2 例,胆总管多样结石 7 例,肿瘤 5 例,失败 2 例。

(下转 927 页)

作者简介:席道友,男,湖北省襄樊市人,副主任技师,主要从事 CR、CT 后处理方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)68774676
收稿日期:2008-01-09;修回日期:2008-04-10