论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1644-03

三羟基异黄酮对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及侵袭作用的影响

曹 川,戴 霞,李世荣,李 丹,张 谊,冯 智,陈艳清 (第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察 5,7,4'-三羟基异黄酮(Genistein)对体外培养的人瘢痕疙瘩成纤维细胞生长及侵袭作用的影响,探讨其抗纤维化作用的机制。方法 以 25、50、100 μmol/L 浓度 Genistein 处理体外培养的人瘢痕疙瘩成纤维细胞,MTT 法检测细胞增殖活性,^{3}H-脯氨酸掺入法检测细胞胶原合成,Transwell 小室趋化运动模型检测细胞侵袭能力。结果 Genistein 作用后,瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖及胶原合成作用降低,细胞的侵袭能力显著下降。随着药物浓度增加,对细胞的这种抑制作用也增强。结论 Genistein 具有体外抗瘢痕疙瘩成纤维细胞纤维化与侵袭的作用,可成为治疗病理性瘢痕及纤维化疾病的有效药物。

关键词:5,7,4'-三羟基异黄酮;瘢痕疙瘩;成纤维细胞;增殖;侵袭
中图法分类号:R619.6;R965;R977.3 文献标识码:A

Effects of genistein on proliferation and invasion of human keloid fibroblasts

CAO Chuan, DAI Xia, LI Shi-rong, LI Dan, ZHANG Yi, FENG Zhi, CHEN Yan-qing (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of genistein on the proliferation and invasion of the cultured human keloid fibroblasts and explore the mechanism of its anti-fibrosis. Methods The human keloid fibroblasts were cultured and stimulated with 25, 50, 100 mol/L genistein, respectively. Their proliferation was measured by MTT. The collagen synthesis was assessed by ^{3}H-proline incorporation method. The invasion of human keloid fibroblasts was detected in Transwell chemotaxis chamber model. Results Genistein markedly inhibited the proliferation and collagen synthesis of the cultured keloid fibroblasts and the inhibitory effects were increased with the increasing concentration of genistein. Genistein also weakened the invasion of keloid fibroblasts. Conclusion Genistein has the ability of anti-fibrosis and inhibits the invasion of human keloid fibroblasts *in vitro*, indicating genistein may be an effective drug for pathological scar or fibrosis disease.

Key words: genistein; keloid; fibroblast; proliferation; invasion

瘢痕疙瘩(keloid)是一种以胶原等细胞外基质过度沉积为特征的皮肤纤维化疾病,具有侵袭性生长的特性。目前对瘢痕疙瘩的发病机制仍不明确,也无满意的治疗药物,手术切除极易复发[1,2]。5,7,4'-三羟基异黄酮(genistein)是一种特异性酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase,TPK)抑制剂,对多种肿瘤和纤维化疾病具有治疗作用[3-5]。此外,Genistein 还能抑制恶性肿瘤细胞的侵袭转移[6,7]。我们既往的研究已证实,Genistein 对病理性瘢痕中增生性瘢痕(hypertrophic scar,HS)的增殖与活性具有抑制作用[8]。本实验进一步探讨 Genistein 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和侵袭作用的影响,为临床应用 Genistein 治疗瘢痕等纤维化疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

苏州 YJ-875 型超净工作台、美国 SHEL-LAB1815TC 型二氧化碳培养箱、美国 Beckman LS26500 液体闪烁计数仪、美国 BIO-RAD 550 型酶标仪。Transwell 小室(滤膜为 12μm 孔径的无聚碳酸脂聚乙烯吡咯烷酮多孔滤膜)和 Matrigel(Becton Dickinson,美国)、Genistein(Sigma,美国)、DMEM 细胞培养基(HyClone,美国)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma,美国)、^{3}H-脯氨酸(北京中国原子能科学研究所)、RPMI-1640 (Gibco,美国)。

1.2 标本来源

组织均取自我科 2006 年 6 月至 2007 年 10 月瘢痕疙瘩患者,手术切除共 10 例,其中男性 3 例,女性 7 例,年龄 18~45

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。电话:(023)65410744,E-mail:cnccao@yahoo.com
通信作者:李世荣,电话:(023)65410724,E-mail:zhengxing@vip.163.com
收稿日期:2007-12-21;修回日期:2008-03-30

岁。瘢痕疙瘩的临床诊断标准为初始病因轻微或不明，发展较缓慢，外观隆起、质硬、高出皮面 1 cm 以上，边缘可见与正常皮肤间红色的浸润带，常超过原创伤范围，并不断扩大。取材局部无感染和溃疡，手术切除前未经药物及放射治疗。所有标本经病理学检查证实。

1.3　人瘢痕疙瘩成纤维细胞体外培养

采用组织块法行瘢痕疙瘩成纤维细胞（keloid fibroblast，KF）原代培养[8]。将切下的瘢痕组织去除表皮，切成 1 mm^3 左右的组织块置于培养瓶，在 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养 6 ~ 8 h，使组织块贴壁，加入适量 DMEM 培养基继续培养，3 ~ 4 d 换液 1 次，当细胞达到 80% 融合时行传代培养，每 4 ~ 5 天传代 1 次，实验用第 3 ~ 5 代细胞。

1.4　MTT 法检测细胞增殖

将处于对数生长期的 KF 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化，制成单细胞悬液接种于 96 孔平面培养板中，调整细胞数为 $2.5 \times 10^4 ml^{-1}$，每孔细胞悬液 200 μl。实验组分别加入 99% DMSO 配制的终浓度为 25、50、100 μmol/L 的 Genistein，对照组只加同体积的 DMSO（加入细胞培养液后 DMSO 终浓度低于 1%，该浓度对细胞活性没有影响）。各组设 3 个复孔，继续培养 48 h。再分别于每孔加入 0.5% MTT 溶液 20 μl，37℃ 继续培养 4 h，小心吸弃上清，每孔加入 150 μl DMSO 震荡 15 min，振荡待紫蓝色结晶完全溶解，以酶标仪在 570 nm 波长检测各孔的光密度值 [D(570)]，每组实验重复 3 次。

1.5　^{3}H-脯氨酸掺入法检测细胞胶原合成率

将 KF 单细胞悬液以 $2.5 \times 10^4 ml^{-1}$ 接种于 96 孔培养板，按上述分组方式及药物浓度加入 Genistein 培养 48 h，完后每孔加入 ^{3}H-脯氨酸（1.85×10^4 Bq/孔）、维生素 C、β-氨基丙腈混合液共 100 μl 继续培养 10 h，吸弃上清，0.25% 胰蛋白酶消化细胞，加入 D-Hanks 液洗涤细胞后，用多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维纸上，用三氯醋酸和甲醇冲洗滤纸数次，80℃ 烘干 2 h，液闪测定仪行液闪计数。实验结果以每分钟衰变数（disintegrations per minute，DPM）表示。

1.6　Transwell 小室趋化运动模型检测细胞侵袭能力

Matrigel 按说明稀释后铺于 Transwell 无聚碳酸脂聚乙烯吡咯烷酮多孔滤膜（12 μm）的上表面，每孔 50 μl，置于 24 孔培养板 37℃ 重建 1 h，形成一个模拟的基质屏障层。以上分组浓度 Genistein 处理 48 h 后的 KF 细胞用 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液，无血清 RPMI1640 调整细胞数至 1×10^5 L^{-1}。将 Transwell 小室放入 24 孔板，上室中加入 200 μl 细胞悬液，下室中加入常规细胞培养液，于 5% CO_2、37℃ 培养 24 h。完后取出滤膜，PBS 冲洗，用棉签轻轻擦去滤膜上层未过膜细胞，甲醛固定 5 min，苏木精染色后镜下观察。每个滤膜随机选取 5 个不重叠的 200 倍视野，计算穿膜细胞数。以穿膜细胞的相对数量表示 KF 细胞的侵袭能力，以侵袭抑制率表示药物的抑制效应。侵袭抑制率（%）=（1 - 实验组穿膜细胞数/对照组穿膜细胞数）×100%。每组平行设 3 个小室，计算平均数。

1.7　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析，实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　Genistein 对 KF 细胞增殖与胶原合成代谢的影响

各组 Genistein 共培养 48 h 后，KF 细胞的增殖均受到抑制，与对照组相比具有显著性差异（$P < 0.05$），且抑制作用随药物浓度的增加而增强。当 Genistein 浓度为 100 μmol/L 时，细胞的增殖与对照组相比差异非常显著（$P < 0.01$）。^{3}H-脯氨酸掺入法检测显示，Genistein 共培养 48h 后 KF 细胞的胶原合成下降，与对照组相比差异具有显著性意义（$P < 0.05$）。当 Genistein 浓度为 100 μmol/L 时，胶原合成率与对照组相比差异非常显著（$P < 0.01$）（表 1）。

表 1　Genistein 对 KF 细胞增殖及胶原合成的影响（$n = 10$，$\bar{x} \pm s$）

Genistein 浓度	细胞增殖 [D(570)]	胶原合成(DPM)
0 μmol/L	0.735 ± 0.066	1 135 ± 230
25 μmol/L	0.610 ± 0.125[a]	997 ± 126[a]
50 μmol/L	0.368 ± 0.117[a]	873 ± 79[a]
100 μmol/L	0.229 ± 0.091[b]	532 ± 176[b]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 0 μmol/L 浓度组比较

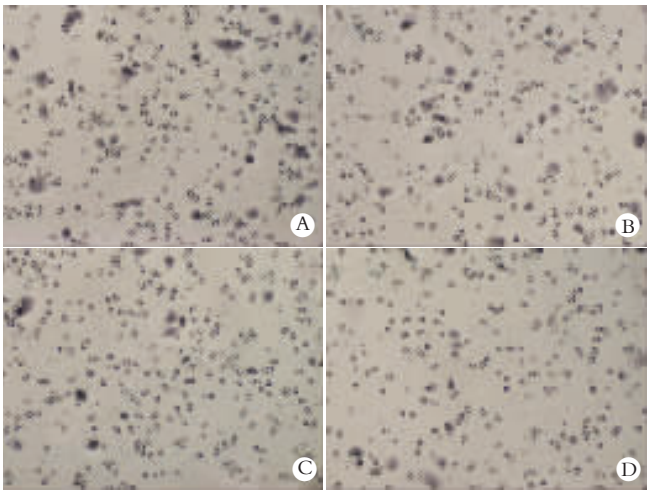
2.2　Genistein 对 KF 细胞侵袭能力的作用

结果显示，各组 Genistein 作用 48h 均能有效抑制 KF 细胞的侵袭能力，穿过到滤膜下的细胞数量减少，与对照相比具有显著性差异（$P < 0.05$），并呈剂量依赖关系。随着药物浓度的增加，Genistein 对细胞的侵袭抑制率逐渐增强（表 2，图 1）。

表 2　Genistein 对 KF 细胞侵袭能力的影响（$n = 10$，$\bar{x} \pm s$）

Genistein 浓度	穿膜细胞数	侵袭抑制率(%)
0 μmol/L	125.7 ± 28.2	—
25 μmol/L	75.3 ± 16.3[a]	40.1
50 μmol/L	37.9 ± 12.5[b]	69.8
100 μmol/L	32.4 ± 11.3[b]	74.2

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 0 μmol/L 比较



A：0 μmol/L；B：25 μmol/L；C：50 μmol/L；D：100 μmol/L

图 1　Transwell 细胞迁移模型检测不同浓度 Genistein 对 KF 细胞侵袭的影响作用　（苏木精 ×200）

3　讨论

瘢痕疙瘩是病理性瘢痕的一种，其本质是成纤维

细胞的异常增殖和以胶原为主的细胞外基质过度沉积。瘢痕疙瘩不仅影响功能与外观,产生痛痒症状,与增生性瘢痕相比,还能向周围正常组织浸润,具有肿瘤样生长的特性,且手术切除极易复发,治疗效果较差。寻求有效治疗瘢痕疙瘩的药物一直是医学界的重要研究课题。

病理性瘢痕的发生与多种信号转导异常有关。TPK 是与细胞生长发育有密切关系的一类重要的信号转导通路,其信号异常是多种增殖性病变发生的内在原因。研究表明,刺激瘢痕疙瘩形成的刺激信号主要经由其受体偶联的丝氨酸/酪氨酸激酶-Smads 通道传递[9] 病理性瘢痕组织中表皮生长因子受体(EGFR)高于正常皮肤,磷酸化酪氨酸蛋白表达也增强,病理性瘢痕的形成是这种信号失衡造成的非正常结局[10]。此外,细胞的迁移运动证实也与 TPK 信号有关[11],TPK 信号的异常参与了肿瘤细胞的一些恶性性状(如侵袭与转移等)的形成。瘢痕疙瘩虽为一种良性病变,但由于其能侵入到周围正常组织,在某种程度上与恶性肿瘤细胞的转移侵袭具有相似性。研究表明,瘢痕疙瘩患者血浆中胰岛素生长因子-Ⅰ(IGF-Ⅰ)的水平异常增高,成纤维细胞表达的 IGF-Ⅰ受体数量增加,提示 IGF-Ⅰ与 IGF-Ⅰ受体途径的活化与瘢痕疙瘩成纤维细胞的侵袭性有关[12]。加用 IGF 因子可促进体外瘢痕疙瘩成纤维细胞的侵袭活性,而使用 IGF 抗体可阻断这种侵袭作用[13]。PDGF 刺激能提高瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和趋化作用,这种促进作用较正常皮肤成纤维细胞更强,并主要通过 TPK 家族信号途径发挥作用[14]。

Genistein 作为一种特异性 TPK 抑制剂,能阻断生长因子受体酪氨酸蛋白激酶信号转导途径,从而影响细胞的增殖和分化,对多种恶性肿瘤和纤维化疾病具有治疗作用。此外,Genistein 作为 TPK 抑制剂,还可对肿瘤细胞中由于细胞-细胞外基质的粘附以及相互作用引起的蛋白酪氨酸磷酸化产生明显的抑制作用,并通过干扰细胞外基质信号,影响细胞侵袭的起始,进一步影响侵袭相关性质,如细胞运动、基质蛋白酶活性等[15]。我们既往的研究已证实 Genistein 能抑制增生性瘢痕成纤维细胞的增殖与胶原合成[8],本实验结果显示 Genistein 对瘢痕疙瘩成纤维细胞也具有类似的作用,且同样表现为剂量依赖效应。除了抑制细胞的增殖与胶原合成,还具有较强的抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的侵袭作用,通过引起细胞侵袭能力下降而阻止瘢痕疙瘩的发展,这一点对揭示瘢痕疙瘩的发病机制以及特异性治疗具有更为重要的意义。本研究进一步证实了 Genistein 具有多途径抑制组织纤维化的作用,可望开发成为有效的抗纤维化疾病药物。目前 Genistein 应用于治疗纤维化疾病还处于初步阶段,对其影响瘢痕增殖和信号转导作用的具体过程还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Datubo-Brown D D. Keloids: a review of the literature[J]. Br J Plast Surg, 1990, 43(1): 70-77.

[2] Al-Attar A, Mess S, Thomassen J M, *et al*. Keloid pathogenesis and treatment[J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(1): 286-300.

[3] Shim H Y, Park J H, Paik H D, *et al*. Genistein-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves calpain-caspase and apoptosis signaling kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase activation cascades[J]. Anticancer Drugs, 2007, 18(6): 649-657.

[4] Sarkar F H, Adsule S, Padhye S, *et al*. The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy[J]. Mini Rev Med Chem, 2006, 6(4): 401-407.

[5] 齐荔红, 康鲁平, 张俊平, 等. 染料木素和槲皮素体外抗肝纤维化作用[J]. 药学学报, 2001, 36(9): 648-651.

[6] Skogseth H, Follestad T, Larsson E, *et al*. Transcription levels of invasion-related genes in prostate cancer cells are modified by inhibitors of tyrosine kinase[J]. APMIS, 2006, 114(5): 364-371.

[7] 刘晓霞, 丰有吉, 赵凤娣, 等. 4, 5, 7-三羟基异黄酮对绒癌耐药细胞株 JAR/MTX 增殖、凋亡和侵袭的影响及相关机制[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(2): 236-241.

[8] 曹 川, 李世荣, 覃 霞, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 618-621.

[9] Heldin C H, Miyazono K, ten-Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature, 1997, 390(6659): 465-471.

[10] 程 飚, 付小兵, 盛志勇, 等. 增生性瘢痕与正常皮肤内的磷酸化酪氨酸蛋白及表皮生长因子受体的变化及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(3): 283.

[11] Schlaepfer D D, Mitra S K, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1692(2-3): 77-102.

[12] Phan T T, Lim I J, Bay B H, *et al*. Role of IGF system of mitogens in the induction of fibroblast proliferation by keloid-derived keratinocytes *in vitro*[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284(4): C860-C869.

[13] Yoshimoto H, Ishihara H, Ohtsuru A, *et al*. Overexpression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) receptor and the invasiveness of cultured keloid fibroblasts[J]. Am J Pathol, 1999, 154(3): 883-889.

[14] Haisa M, Okochi H, Grotendorst G R. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF[J]. J Invest Dermatol, 1994, 103(4): 560-563.

[15] Kousidou O Ch, Tzanakakis G N, Karamanos N K. Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells[J]. Mini Rev Med Chem, 2006, 6(3): 331-337.

(编辑 汪勤俭)