文章编号:1000-5404(2010)11-1127-04

论著

外源性 CCN1 促进辐射损伤 L929 细胞的生长和迁移

李招权[1*],万莹铧[1*],李 军[1],司维柯[1],粟永萍[2],杜业军[1],潘 静[1] (400038 重庆,第三军医大学:医学检验系临床血液学教研室[1],军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 观察外源性 CCN1 是否促进辐射损伤 L929 细胞生长和迁移,以探讨 CCN1 在放创复合伤修复中的作用。**方法** 以 4 Gy γ 射线辐射 L929 细胞作为辐射损伤细胞模型,细胞辐射后分别加入 2 ml CCN1 或 RFP 条件培养液,37℃,5% CO_2 培养,作为 CCN1 组和 RFP 组;空白条件培养液培养辐射损伤 L929 细胞作为空白组。各组进行 MTT 试验、平板克隆形成试验、细胞周期分析和划痕愈合试验。**结果** 与 RFP 组和空白组相比,CCN1 条件培养液处理后,与空白组辐射损伤 L929 细胞增殖明显增强($P<0.05$),与 RFP 组和空白组相比,克隆形成率明显增高[CCN1 组(34.4±3.6)%,RFP 组(24.5±2.9)%,空白组(29.5±3.5)%]($P<0.05$),培养 5 d 时 CCN1 组 S 期细胞[(37.3±2.3)%]比 RFP 组[(25.2±1.9)%]和空白组[(26.9±1.3)%]增多($P<0.01$),细胞迁移能力明显增强划痕愈合试验在 1~5 d 的愈合宽度/原宽度值与 RFP 组和空白组相比差异显著($P<0.01$)。**结论** 外源性 CCN1 可促进辐射损伤的成纤维细胞生长和迁移,提示 CCN1 是放创复合伤修复的促进因素之一。

[关键词] CCN1;辐射损伤;L929;增殖;迁移
[中图法分类号] R818.05; R329.28; R394.2 **[文献标志码]** A

Exogenous CCN1 promotes proliferation and migration of radiation-injured L929 cells

Li Zhaoquan[1*], Wan Yinghua[1*], Li Jun[1], Si Weike[1], Su Yongping[2], Du Yejun[1], Pan Jing[1] ([1]Department of Clinical Hematology, College of Laboratory Medicine, [2] State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Anti-radiation Medicine, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of Cysteine-rich 61 (Cyr61/CNN1) in repair of combined injury by observing whether exogenous CCN1 promotes the proliferation and migration of radiation-injured L929 cells. **Methods** A radiation model of L929 cells was induced by γ ray at a dose of 4 Gy. The irradiated L929 cells were cultured in a medium containing 2 ml adenovirus plasmids of CCN1 or RFP at 37 ℃ in an atmosphere containing 5% CO_2, which served as a CCN1 group and a RFP group, respectively. Irradiated L929 cells cultured in a blank control medium served as a blank control group. Effects of CCN1 on proliferation and migration of radiation-injured L929 cells were detected by MTT assay, plate colony formation assay, cell cycle analysis, and scratch test of wound healing. **Results** The proliferation and colony formation rates of L929 cells cultured in a medium containing CCN1 were significantly higher than in RFP and control groups [colony formation rate: (34.4±3.6)% *vs* (24.5±2.9)% and (29.5±3.5)%, $P<0.05$]. Five hours after culture, the amount of L929 cells in the S phase was larger in CCN1 group than in RFP and control groups (37.3% ±2.3% vs 25.2% ±1.9% and 26.9% ±1.3%, $P<0.01$). Scratch test of wound healing showed that the width/thickness ratio of migrated L929 cells in healed wounds was significantly higher in CCN1 group than in RFP and control groups ($P<0.01$). **Conclusion** Exogenous CCN1 promotes the proliferation and migration of radiation-injured L929 cells, suggesting that CCN1 is one of the stimulating factors for the repair of combined injury.

[Key words] CCN1; radiation injury; L929; proliferation; migration

Supported by the International Copperative Project of "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06H034). Li Zhaoquan and Wan Yinghua are first authors who contribated equally to the article. Corresponding author: Si Weike, Tel: 86-23-68752312, E-mail: weikesi2004@hotmail.com; Su Yongping, Tel: 86-23-68752009, E-mail: suyping@yahoo.com

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划国际合作项目(06H034);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题(2006)
* 同等贡献者
[通信作者] 司维柯,电话:(023)68752312,E-mail:weikesi2004@hotmail.com
粟永萍,电话:(023)68752009,E-mail:suyping@yahoo.com

CCN1(cysteine-rich 61,Cyr61/CCN1)是即刻早期基因家族CCN(Cyr61、CTGF、NOV)的成员之一,参与细胞增殖、粘附及分化调节,在血管发生、细胞外基质形成中发挥重要作用[1]。近来研究表明CCN1可能是Wnt信号相关分子,研究显示在间充质干细胞中CCN1是Wnt信号的下游靶基因,在成骨分化中起到精细的调节作用[2];CCN1在肝癌中的作用也与Wnt/β-catenin信号途径异常激活有关[3,4]。我们前期研究发现,在动物试验中,放创复合伤CCN1表达下调且影响肉芽组织形成及其他组织修复过程,这可能是放创复合伤难愈的重要原因之一[5];在体外细胞试验中,辐射能抑制L929细胞生长和迁移,且辐射后的L929细胞CCN1表达明显下调[6],但CCN1对于辐射损伤有何作用,其作用机制如何,目前仍不清楚。本研究中,我们通过观察外源性CCN1能否促进辐射损伤小鼠成纤维细胞L929生长和迁移,以探讨Wnt信号的下游基因CCN1在放创复合伤修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞株

小鼠皮肤成纤维细胞株L929细胞由本校基础医学部细胞生物学教研室惠赠,CHO细胞由本室保存。RPMI1640培养基(Gibco公司),小牛血清(杭州四季青生物材料研究所),MTT(Sigma公司),DMSO(上海生工),蛋白抽提及定量测定试剂盒(上海申能博彩),兔CCN1多克隆抗体(Santa Cruz公司),HRP标记羊抗兔IgG(北京中山生物技术公司),增强化学发光显色试剂盒(Pierce公司),重组腺病毒AdCCN1、AdRFP为美国芝加哥大学分子肿瘤研究室何通川教授赠送。

1.2 细胞培养

L929、CHO细胞用含10%小牛血清的RPMI1640培养基,37 ℃、5% CO_2条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 辐射损伤细胞模型

取对数生长期L929细胞,采用^{60}Co γ射线进行照射,照射剂量为4 Gy,剂量率为0.7~0.8 Gy/min,辐照时间约为5 min。

1.4 条件培养液制备及鉴定

接种CHO细胞于6孔板,待汇合度达80%时,分别加入AdCCN1和AdRFP各5 μl,培养24~48 h检测荧光,依据荧光强度在48~72 h收集培养液约6 ml,4 ℃保存备用,条件培养液CCN1表达鉴定以Western blot进行。

1.5 条件培养液培养辐射损伤细胞及分组

细胞辐射后分别加入2 ml CCN1或RFP条件培养液,37 ℃,5% CO_2培养,分别为CCN1组和RFP组;空白条件培养液培养辐射损伤L929细胞作为空白组。

1.6 MTT法检测细胞增殖

具体方法参考文献[4]。3组细胞分别培养1、3、5 d后,检测波长490 nm处的光密度值[$D(490)$]。

1.7 平板克隆形成实验

L929细胞制成1×10^4/ml的单细胞悬液,以约300个/孔接种于6孔板,实验分组同上,每组设3个复孔,置37 ℃、5% CO_2培养10 d至6孔板出现肉眼可见的克隆。PBS洗2次,甲醇固定5 min,结晶紫染色5 min,去离子水冲洗,37 ℃干燥。倒置显微镜下观察其克隆数,大于50个细胞计为1个克隆。按公式计算克隆形成率。

克隆形成率=(克隆形成数目/接种细胞数)×100%

1.8 流式细胞术检测细胞周期分布

取单细胞悬液,离心,PBS洗涤2次,1 000 r/min离心5 min,去上清,70%预冷乙醇固定,置4 ℃过夜,RNA酶消化,PI室温染色30 min后,上流式细胞仪检测,分析得出实验各组辐射细胞培养1、3、5 d时的细胞周期分布。

1.9 划痕愈合实验检测L929细胞迁移

L929细胞以1×10^4/ml的密度种于6孔板,试验分组同上,每组设3个复孔,具体方法参考文献[4]。划痕后0、1、2、3、4、5、6 d以倒置相差显微镜观察划痕宽度的变化并拍照。用NIS-Elements图像分析系统,沿标记处每间隔100 pixs测量每1个点垂直于划痕方向的宽度,计算3点的均值作为实验的划痕宽度值。按公式计算该划痕不同时间点的愈合速率。

愈合速率=(初始划痕宽度值-相应点划痕宽度值)/初始划痕宽度值×100%

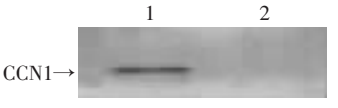
1.10 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计分析软件进行方差分析。

2 结果

2.1 条件培养液CCN1表达鉴定

CCN1条件培养液浓缩后经Western blot检测到CCN1蛋白的表达,出现清晰的特异性条带,而为对照的RFP条件培养液则未出现相应的条带(图1)。

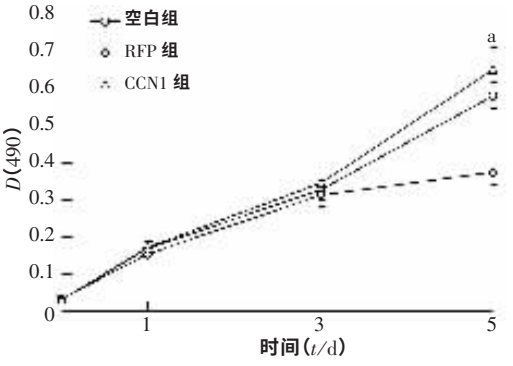


1:CCN1-CM;2:RFP-CM

图1 条件培养液中CCN1蛋白的表达鉴定

2.2 CCN1对辐射损伤细胞增殖的影响

MTT比色结果显示,CCN1条件培养液处理辐射损伤细胞后5 d,细胞增殖明显快于RFP条件培养液处理的细胞($P<0.05$,图2),表明CCN1促进L929细胞的增殖。



a:$P<0.05$,与RFP组比较

图2 外源性CCN1对辐射损伤L929细胞增殖的影响

2.3 CCN1 对辐射损伤细胞克隆形成的影响

平板克隆形成实验发现，CCN1 处理后克隆形成率显著高于 RFP 组（$P<0.05$，表 1），形成的细胞克隆体积较 RFP 组大（图 3）。表明 CCN1 对辐射损伤 L929 细胞克隆形成有明显促进作用。

表 1　CCN1 对辐射损伤 L929 细胞克隆形成的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	克隆形成数（个）	克隆形成率（%）
空白组	148 ± 17	29.5 ± 3.5
RFP 组	123 ± 15	24.5 ± 2.9
CCN1 组	172 ± 18[a]	34.4 ± 3.6[a]

a：$P<0.01$，与 RFP 组和空白组比较

2.4 CCN1 对辐射损伤细胞周期的影响

细胞周期检测结果见表 2。结果表明，与对照组相比，CCN1 条件培养液培养辐射损伤 L929 细胞 3 d 细胞的 S 期增高，G_2/M 期降低，但无统计学意义；培养 5 d 时，G_0/G_1 期低于 RFP 组，S 期明显高于 RFP 组（$P<0.01$），G_2/M 期所占细胞比率明显低于 RFP 组（$P<0.01$）。

2.5 CCN1 对辐射损伤细胞迁移能力的影响

划痕损伤 5 d 后，与 RFP 条件培养液处理的辐射损伤 L929 细胞相比，CCN1 条件培养液处理的细胞更趋于愈合（图 4），且在 1、2、3、4、5 d，CCN1 组和 RFP 组的划痕愈合程度均有显著性差异（$P<0.01$，表 3），CCN1 明显增强了辐射损伤 L929 细胞的迁移能力。

表 2　CCN1 对辐射损伤 L929 细胞各细胞周期比率的影响［$n=6$，($\bar{x}\pm s$)%］

组别	时间（d）	G_0/G_1	S	G_2/M
空白组	1	56.0 ± 4.1	6.8 ± 0.8	37.2 ± 2.4
	3	60.8 ± 2.3	21.1 ± 1.1	18.1 ± 2.9
	5	64.9 ± 5.0	26.9 ± 1.3	8.2 ± 0.6
RFP 组	1	55.4 ± 4.8	7.5 ± 0.7	37.1 ± 3.3
	3	61.0 ± 5.1	20.8 ± 1.4	18.2 ± 3.7
	5	64.6 ± 5.8	25.2 ± 1.9	10.2 ± 0.9
CCN1 组	1	54.4 ± 4.1	6.9 ± 0.4	38.7 ± 4.6
	3	61.3 ± 5.2	23.9 ± 2.4	14.8 ± 1.8
	5	56.8 ± 4.9	37.3 ± 2.3[a]	5.9 ± 0.3[a]

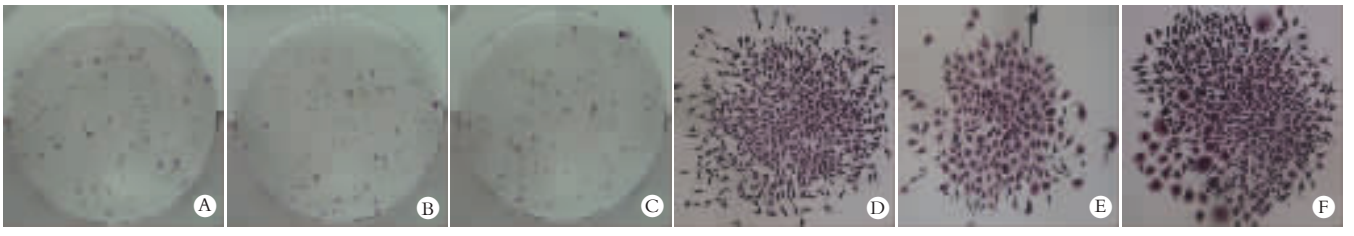
a：$P<0.01$，与 RFP 组和空白组比较

表 3　CCN1 对辐射损伤 L929 细胞划痕愈合程度的影响

［$n=6$，愈合宽度/原宽度（$\bar{x}\pm s$）%］

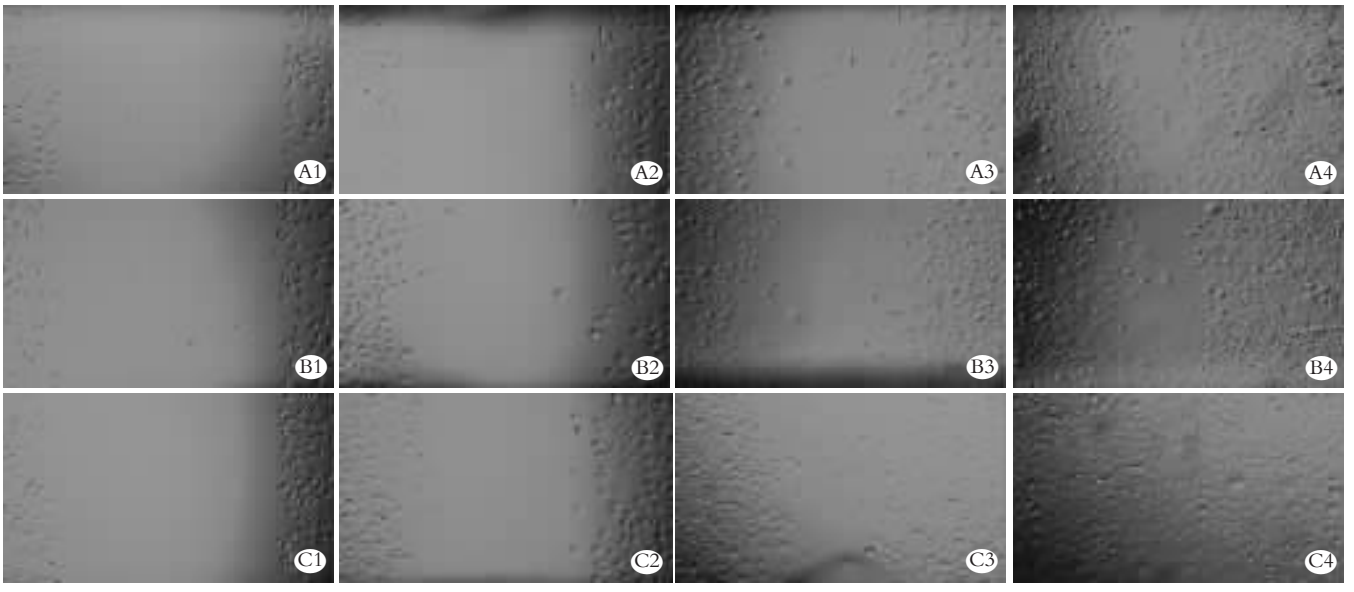
组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
空白组	13.29 ± 5.22	35.53 ± 10.74	55.99 ± 10.37	70.61 ± 13.15	82.73 ± 12.55	93.39 ± 12.11
RFP 组	12.11 ± 4.03	34.98 ± 3.56	54.38 ± 6.57	70.20 ± 5.74	80.43 ± 6.74	92.48 ± 5.19
CCN1 组	18.73 ± 5.33[a]	49.46 ± 10.42[a]	74.48 ± 9.19[a]	85.66 ± 7.68[a]	93.67 ± 7.05[a]	96.10 ± 3.01

a：$P<0.01$，与 RFP 组和空白组比较



A、D：空白组；B、E：RFP 组；C、F：CCN1 组；A、B、C：6 孔板观察；D、E、F：倒置显微镜观察单个克隆　（×400）

图 3　辐射损伤 L929 细胞培养 10 d 形成的克隆　（结晶紫染色）



A1～A4：空白组；B1～B4：RFP 组；C1～C4：CCN1 组；A1，B1，C1 为 0 点的划痕情况；A2，B2，C2 为 1 d 后的划痕愈合情况；A3，B3，C3 为 3 d 后的划痕愈合情况；A4，B4，C4 为 5 d 后的划痕愈合情况

图 4　CCN1 对辐射损伤 L929 细胞迁移的影响　（倒置显微镜 ×100）

3 讨论

CCN家族是一组细胞外基质交联的分泌性蛋白质,由4个特殊功能模块构成[7],在调节细胞发育、分化、黏附、运动,并在妊娠、血管生成、伤口修复、纤维变性、炎症及肿瘤方面起着重要的调节作用[8]。CCN1可由血清、PDGF或转化生长因子等诱导成纤维细胞产生,属于组织缺氧相关基因[9],能促进血管内皮细胞、成纤维细胞、单核细胞、平滑肌细胞等的黏附、迁移和增殖,在维持内皮细胞内环境稳定,以及胚胎发育、胚盘形成、肿瘤形成、纤维化和创伤愈合中等过程中发挥重要作用,还可介导细胞间、细胞与细胞外基质之间的相互作用,诱导创伤后肉芽组织表达,活化皮肤成纤维细胞伤口修复程序[10]。另有报道,在人肺成纤维细胞中,纤维蛋白溶酶经PAR-1(protease-activated receptor-1,蛋白酶活化受体-1)诱导CCN1表达或释放,对细胞起促增殖作用[11]。可见CCN1对细胞增殖、迁移及创伤愈合等过程有重要影响。

创伤愈合是一种由多细胞、细胞因子和细胞外基质协同作用的网络调控过程,如今,国外创伤修复研究的重点包括细胞外基质、细胞成分、细胞因子、再上皮化、组织替代物、病理状态下的创伤修复、酶学清创法、促进创伤愈合的基因治疗和创伤修复效果的评价方法等方面[12,13],加强创伤修复相关因子研究具有重要意义。结合前期研究,我们认为CCN1表达下调可能是放创复合伤难愈的重要原因之一[5],因此,本研究中,我们通过观察外源性CCN1能否促进辐射损伤小鼠成纤维细胞L929生长和迁移,以进一步探讨CCN1可能在放创复合伤修复中的作用,为发现和认识更多的新的促进创伤愈合基因或生物效应分子打下基础。

本研究中我们利用AdEasy系统将带有RFP标记基因的重组腺病毒Ad-CCN1感染CHO细胞,制备出含有CCN1蛋白的条件培养液,并处理辐射损伤的L929细胞。MTT比色法检测吸光度值和克隆形成率显著增高,表明外源性CCN1能促进细胞增殖,细胞周期分析显示S期细胞百分率显著增加,表明CCN1使细胞周期S期的增长,提示CCN1可能促进了细胞DNA的合成,促进细胞有丝分裂,从而促进细胞增殖。研究表明在体外试验中,外源性CCN1能显著促进辐射损伤小鼠成纤维细胞的生长和增殖,提示CCN1可在辐射损伤后创伤愈合中成纤维细胞增殖方面发挥重要的作用。另外,我们通过划痕愈合实验证实外源性的CCN1可以促进辐射损伤后的小鼠成纤维细胞L929细胞划痕的愈合,与本室前期研究一致[14]。综合分析,提示CCN1能促进成纤维细胞的生长与迁移,为进一步加快辐射创伤愈合提供了必要的条件。

综上,CCN1蛋白对辐射后成纤维细胞生长促进的同时,其迁移能力增强,通过相关文献对比分析,结合我们的动物实验结果推测,CCN1可诱导成纤维细胞增殖、血管形成和机制重建,可能是新的促进创伤愈合的基因。本研究为进一步研究CCN1在创伤愈合的促愈作用及其机制奠定了基础,并可望发展为临床难愈性创伤的基因工程药物。但CCN1在创伤愈合中的具体作用机制尚不清楚,CCN1与包括Wnt信号传导途径在内的创伤修复网络的信号传导通路和表达调控还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Chen Y, Du X Y. Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61[J]. J Cell Biochem, 2007, 100(6): 1337-1345.

[2] Si W, Kang Q, Luu H H, *et al*. CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(8): 2955-2964.

[3] 孙世俊, 司维柯, 丁伟, 等. Cyr61与β-catenin在肝癌组织和细胞株中表达的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 485-488.

[4] 丁伟, 司维柯, 孙世俊, 等. 过表达外源性Cyr61对人肝癌细胞株HepG2生长和迁移的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 378-381.

[5] 杜业军, 司维柯, 何通川, 等. Cyr61在单纯及放创复合伤愈合过程中的表达及其临床意义[J]. 重庆医学, 2008, 37(9): 937-939.

[6] 万莹铧, 司维柯, 杜业军, 等. 辐射对L929细胞生长及CCN1基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 205-208.

[7] Leask A, Abraham D J. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 23): 4803-4810.

[8] Katsube K, Sakamoto K, Tamamura Y, *et al*. Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development[J]. Dev Growth Differ, 2009, 51(1): 55-67.

[9] Le-Mercier M, Mathieu V, Haibe-Kains B, *et al*. Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2008, 67(5): 456-469.

[10] Matsumae H, Yoshida Y, Ono K, *et al*. CCN1 knockdown suppresses neointimal hyperplasia in a rat artery balloon injury model[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(6): 1077-1083.

[11] Mandal S K, Rao L V, Tran T T, *et al*. A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(1): 163-169.

[12] Zagon I S, Sassani J W, Malefyt K J, *et al*. Regulation of corneal repair by particle-mediated gene transfer of opioid growth factor receptor complementary DNA[J]. Arch Ophthalmol, 2006, 124(11): 1620-1624.

[13] Stoff A, Rivera A A, Banerjee N S, *et al*. Strategies to enhance transductional efficiency of adenoviral-based gene transfer to primary human fibroblasts and keratinocytes as a platform in dermal wounds[J]. Wound Repair Regen, 2006, 14(5): 608-617.

[14] 司维柯, 何通川. 过表达外源性CCN1对人骨肉瘤细胞系143B生长和迁移的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(7): 565-570.

(**收稿**:2009-12-24;**修回**:2010-03-15)

(编辑 汪勤俭)