论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0160-04

PTEN 抑制增生性瘢痕成纤维细胞转分化作用及其机制

郭 亮[1,2],毕 胜[1],王珍祥[1],陈 亮[1],李 喆[1],黄书鹏[1],李世荣[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院整形美容专科医院[1];430070 武汉,广州军区武汉总医院急诊科[2])

[摘要] **目的** 观察染色体10上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, PTEN)编码蛋白对TGF-β1刺激下瘢痕成纤维细胞转分化的抑制作用及其机制。**方法** 用重组PTEN腺病毒转染体外培养的人瘢痕成纤维细胞,倒置荧光显微镜检测PTEN转染组及空载体转染组绿色荧光蛋白表达;将实验分为对照组、PTEN转染组、空载体转染组、TGF-β1刺激组(给予TGF-β1刺激)、PTEN+TGF-β1组(PTEN基因转染后给予TGF-β1刺激)、空载体+TGF-β1组(空载体转染后给予TGF-β1刺激),RT-PCR和Western blot分别检测对照组、PTEN转染组、空载体转染组中PTEN mRNA和蛋白表达;Western blot检测各组中α-SMA、Akt、p-Akt表达水平。**结果** PTEN基因转染瘢痕成纤维细胞36 h后可见明显绿色荧光蛋白表达,PTEN转染组PTEN mRNA及蛋白的表达明显升高,与对照组及空载体转染组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),而p-Akt和α-SMA的表达明显下降($P<0.05$);TGF-β1组α-SMA表达较对照组明显升高,同时伴有p-Akt表达上升,与对照组、PTEN转染组、PTEN+TGF-β1组相比,差异均有统计学意义($P<0.01$);空载体转染组与对照组相比,p-Akt、α-SMA蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$);空载体+TGF-β1组与TGF-β1刺激组相比,p-Akt、α-SMA蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组细胞的Akt表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** TGF-β1可促进PI3K/Akt通路活化,使瘢痕成纤维细胞α-SMA表达升高,促进其转分化;空载体转染对p-Akt、α-SMA的表达无明显影响,高表达PTEN可使瘢痕成纤维细胞α-SMA的表达明显降低,并且可拮抗TGF-β1对瘢痕成纤维细胞的转分化作用,其机制可能是抑制PI3K/Akt通路活化。

[关键词] PTEN;成纤维细胞;细胞转分化;PI3K/Akt

[中图法分类号] R341;R364.31;R394.2 **[文献标志码]** A

PTEN inhibits trans-differentiation of hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*

Guo Liang[1,2], Bi Sheng[1], Wang Zhenxiang[1], Chen Liang[1], Li Zhe[1], Huang Shupeng[1], Li Shirong[1] ([1]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Emergency, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan, Hubei Province, 430070, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effects of overexpression of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) on the trans-differentiation of hypertrophic scar fibroblast induced by TGF-β1, and the signaling transduction mechanism. **Methods** Hypertrophic scar fibroblasts were transfected with GFP-PTEN *via* adenovirus. The cells were divided into 6 groups, normal group, Ad-PTEN group, Ad-Laz group, TGF-β1 stimulation group (10 ng/ml), Ad-PTEN +TGF-β1 group, and empty vector +TGF-β1 group. The efficiency of transfection was detected by fluorescence microscopy. The expression of PTEN protein and mRNA in the transfected cells was detected by Western blot analysis and RT-PCR respectively. The expressions of α-SMA, Akt and p-Akt were detected by Western blot analysis. **Results** Most cells transfected with Ad-PTEN expressed GFP. The expression of PTEN protein and mRNA were strongly increased when the cells were transfected with Ad-PTEN (all $P<0.05$). In Ad-PTEN group, the expression levels of p-Akt and α-SMA were lower than those in normal group and Ad-Laz group ($P<0.05$). In TGF-β1 group, the expression levels of α-SMA and p-Akt were higher than those in normal group, Ad-PTEN group and PTEN + TGF-β1 group ($P<0.01$). The expression levels of p-Akt and α-SMA had no diversity in normal group and Ad-Laz group ($P>0.05$), and in Ad-Laz + TGF-β1 group and TGF-β1 group ($P>0.05$). The expression of

[通信作者] 李世荣,电话:(023)68765851,E-mail:lishirong.xnzx@yahoo.com.cn

Akt was similar in the 6 groups. **Conclusion** TGF-β1 can promote the expression of α-SMA by activating the PI3K/Akt signal pathway. PTEN inhibits the trans-differentiation of hypertrophic scar fibroblasts induced by TGF-β1 through suppressing the activation of PI3K/Akt signal pathway.

[Key words] phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten; fibroblast; trans-differentiation; PI3K/ Akt

Corresponding author: Li Shirong, Tel: 86-23-68765851, E-mail: lishirong. xnzx@ yahoo. com. cn

增生性瘢痕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。PTEN 是近年来发现的定位于 10q23.3 的 1 个肿瘤抑制基因,其编码的蛋白在细胞质中表现出双重特异性磷酸酶活性,是迄今为止发现的第 1 个具有磷酸酶活性的抑癌基因。它在细胞凋亡、细胞周期阻滞、细胞迁移过程中起关键性作用[1],其发挥抑癌作用的机制之一是能够阻断 PI3K/Akt 途径。在对肺间质纤维化、风湿性关节炎等纤维化疾病的研究发现,PTEN 表达水平下降,通过腺病毒转染方法过表达 PTEN 可以抑制纤维化肺组织及风湿性关节炎滑膜组织中成纤维细胞的增殖[2-3]。有学者进一步提出 PTEN 可能是有效的抗纤维化靶点[4]。前期实验观察到在增生性瘢痕组织中 PTEN 的表达低于正常皮肤组织,而且 PI3K/Akt 信号通路在瘢痕成纤维细胞转分化中起着重要作用。本研究进一步观察通过腺病毒转染方式过表达 PTEN 是否能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路阻止瘢痕成纤维细胞转分化,探讨 PTEN 在增生性瘢痕形成过程中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 瘢痕成纤维细胞的分离及原代培养

将手术切下的增生性瘢痕组织在无菌条件下切除其表皮,在少量胎牛血清中将标本切成 1 mm^3 左右的组织块置于培养瓶中,在 95% 空气、5% CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养 6 ~ 8 h,使组织块牢固地黏附在瓶壁上,加入含 15% DMEM 培养基适量,继续培养,3 ~ 4 d 换液 1 次,2 ~ 3 周后,原代细胞生长成单层,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,按 1∶3 传代培养,此后每 2 ~ 3 天换液 1 次,每 4 ~ 5 天传代 1 次。实验用第 4 ~ 6 代瘢痕成纤维细胞。

1.2 主要试剂

胎牛血清购于美国 HyClone 公司,胎牛血清(FBS,杭州四季青公司),青霉素、链霉素(华北制药厂),重组 PTEN 腺病毒[Ad-PTEN,带有 PTEN 基因,并连有绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)示踪基因,受赠于 Stephen W, University of Pennsylvania School of Medicine],兔抗人 PTEN 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),兔抗人 α-SMA 多克隆抗体、兔抗人 β-actin(美国 Sigma 公司),兔抗人 p-Akt、兔抗人 Akt(美国 cell signal technology 公司)。

1.3 重组腺病毒 Ad-PTEN 转染增生性瘢痕成纤维细胞

重组腺病毒 Ad-PTEN 以感染复数(MOI)100 转染增生性瘢痕成纤维细胞,并通过倒置荧光显微镜下观察绿色荧光表达。

1.4 实验分组及各组细胞的培养

①对照组:增生性瘢痕成纤维细胞,以含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养,每 2 ~ 3 天更换 1 次细胞培养液;②TGF-β1 刺激组:增生性瘢痕成纤维细胞融合至 80% 后无血清培养液静止细胞 24 h,然后以 10 ng/ml TGF-β1 刺激 36 h;③PTEN 转染组:取 6 孔板内对数生长期融合至 80% 的增生性瘢痕成纤维细胞,用无血清和抗生素的培养液漂洗后,加入 MOI = 100 的 Ad-PTEN 孵育 6 h,然后改用含 10% FBS 但不含抗生素的培养液培养 48 h;④空载体转染组:取 6 孔板内对数生长期融合至 80% 的增生性瘢痕成纤维细胞,用无血清和抗生素的培养液漂洗后,加入 MOI = 100 的 Ad-Laz 孵育 6 h,然后改用含 10% FBS 但不含抗生素的培养液培养 48 h;⑤PTEN + TGF-β1 组:PTEN 基因转染后给予 10 ng/ml TGF-β1 刺激 36 h;⑥空载体 + TGF-β1 组:Ad-Laz 转染后给予 10 ng/ml TGF-β1 刺激 36 h。

实验分两部分:①RT-PCR 和 Western blot 分别检测对照组、PTEN 转染组、空载体转染组中 PTEN mRNA 和蛋白表达;②Western blot 检测对照组、PTEN 转染组、空载体转染组、TGF-β1 组、PTEN + TGF-β1 组、空载体 + TGF-β1 组中 α-SMA、Akt、p-Akt 表达水平。

1.5 RT-PCR 检测 PTEN mRNA 的表达

Trizol 法提取细胞总 RNA。取 1 μg 总 RNA 逆转录。逆转录产物按如下条件行 PCR。PTEN 引物:上游 5′-ACCAGTGGCACTGTTGTTTCAC-3′,下游 5′-TTCCTCTGGTCCTGGTATGAAG-3′,产物长度 259 bp;β-actin 引物:上游 5′-GGTTACCTCCCATCAGCT-3′,下游 5′-CAGTGTCCGGAAATCTCC-3′,产物长度 576 bp。PCR 反应体系:25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μl,10 × buffer 5 μl,*Taq* 酶 1 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,上下游引物 5 μl,cDNA 模板 4 μl,注射用水 25 μl,反应体积为 50 μl。反应条件:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环,完成 PCR 扩增。取 5 μl 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像仪进行分析。

1.6 Western blot 检测各组蛋白表达

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。各组样品按 50 μg/孔上样,SDS-PAGE 电泳结束后将蛋白转移到 NC 膜上,5% 脱脂奶 37 ℃封闭 1 h,一抗(1∶1 000 稀释) 4 ℃孵育过夜,次日 TBST 漂洗 10 min × 3 次后,加入 FITC 标记的二抗(1∶1000 稀释)37 ℃孵育 1 h,再用 TBST 漂洗 10 min

×3 次后，加入碱性磷酸酶显色液显色。以 β-actin 为内参，应用图像分析软件对特异性条带做定量分析，以目标条带与内参的吸光度值比反映蛋白相对表达量。

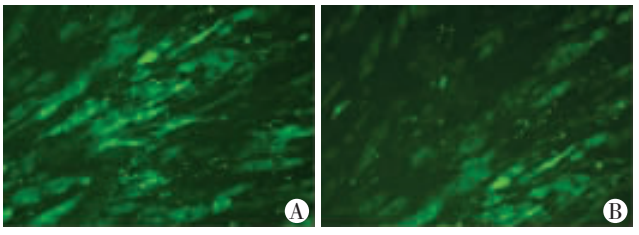
1.7 统计学分析

各组实验至少重复 3 次，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 15.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

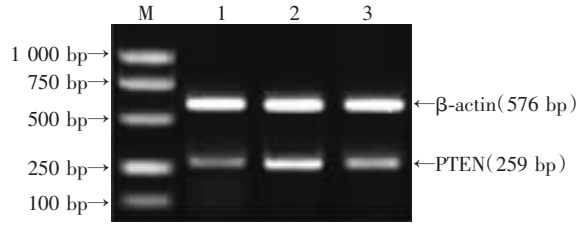
2.1 建立过度表达 PTEN 的瘢痕成纤维细胞原代培养体系

携带报告基因绿色荧光蛋白的细菌内重组腺病毒 Ad-PTEN 感染 36 h 后，荧光显微镜下观察，可见 80% 细胞质内表达绿色荧光蛋白，呈绿色荧光（图 1），提示病毒成功转染细胞并表达。PTEN 转染组或空载体转染组感染增生性瘢痕成纤维细胞 36 h 后，RT-PCR 凝胶成像仪分析结果显示，对照组、PTEN 转染组、空载体转染组成纤维细胞内 PTEN mRNA 表达分别为 1.26 ± 0.08、2.11 ± 0.13、1.22 ± 0.10，可见 PTEN 转染组增生性瘢痕成纤维细胞 PTEN mRNA 表达显著高于对照组及空载体转染组（$P < 0.05$），而空载体转染组与对照组比较差异无显著性（$P > 0.05$）（图 2）；Western blot 检测显示 PTEN 转染增生性瘢痕成纤维细胞 36 h 后，PTEN 蛋白表达较对照组及空载体转染组细胞显著升高，PTEN 蛋白与 mRNA 表达趋势相一致（图 3）。提示重组腺病毒 PTEN 成功转染进入瘢痕成纤维细胞，并且 PTEN 能正确表达。



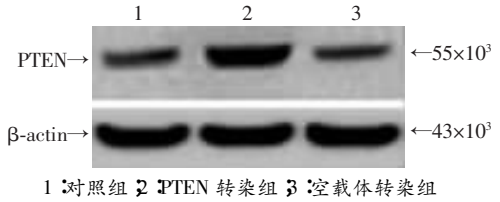
A：PTEN 转染组；B：空载体转染组

图 1 倒置荧光显微镜观察基因转染后绿色荧光蛋白在增生性瘢痕成纤维细胞中的表达 （×100）



M：标准；1：对照组；2：PTEN 转染组；3：空载体转染组

图 2 RT-PCR 检测各组中 PTEN mRNA 的表达

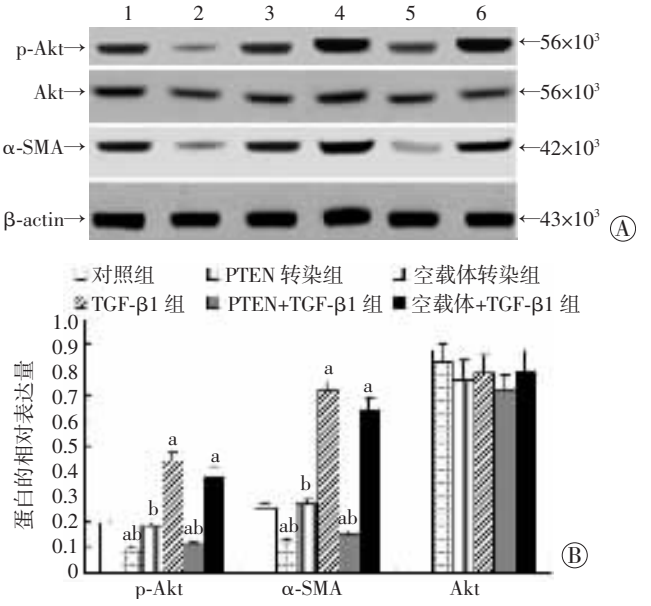


1：对照组；2：PTEN 转染组；3：空载体转染组

图 3 Western blot 检测各组中 PTEN 蛋白的表达

2.2 Western blot 检测各组细胞 Akt、p-Akt 及 α-SMA 蛋白表达

PTEN 转染组 p-Akt 和 α-SMA 表达的表达明显下降，与对照组及空载体转染组相比，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；TGF-β1 组 α-SMA 表达较对照组明显升高，同时伴有 p-Akt 表达上升，与对照组、PTEN 转染组、PTEN + TGF-β1 组相比，差异均有统计学意义（$P < 0.01$）；空载体转染组与对照组相比，p-Akt、α-SMA 蛋白表达差异均无统计学意义（$P > 0.05$）；空载体 + TGF-β1 组与 TGF-β1 刺激组相比，p-Akt、α-SMA 蛋白表达差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。各组细胞的 Akt 表达差异均无统计学意义（$P > 0.05$）（图 4）。提示 TGF-β1 可促进 PI3K/Akt 通路活化，使瘢痕成纤维细胞 α-SMA 表达升高，促进其转分化；空载体转染对 p-Akt、α-SMA 的表达无明显影响，而高表达 PTEN 可使瘢痕成纤维细胞 α-SMA 的表达明显降低，并且可拮抗 TGF-β1 对瘢痕成纤维细胞的转分化作用，其机制可能是通过抑制 PI3K/Akt 通路活化。



A：定性分析 1：对照组 2：PTEN 转染组；3：空载体转染组 4：TGF-β1 组 5：PTEN + TGF-β1 组；6：空载体 + TGF-β1 组；B：定量分析 a：$P < 0.05$，与对照组比较 b：$P < 0.05$，与 TGF-β1 组比较

图 4 Western blot 检测各组细胞 Akt、p-Akt 及 α-SMA 蛋白表达

3 讨论

增生性瘢痕是一种皮肤异常损伤、修复和重塑的疾病[5-6]，其中主要是成纤维细胞转化为肌成纤维细胞，合成大量胶原等细胞外基质成分，同时细胞外基质降解减少，所以，研究肌成纤维细胞的分化、形成过程，并对其进行干预，在增生性瘢痕的防治上有至关重要的意义[7]。研究证实 TGF-β1 是关键的致纤维化细胞因子，可以诱导成纤维细胞合成和分泌细胞外基质并抑制其降解，并且可诱导向肌成纤维细胞分化[8-10]。本研究以 TGF-β1 诱导肌成纤维细胞的分化作为切入

点，观察在瘢痕成纤维细胞中过表达 PTEN 基因后，肌成纤维细胞的标志性产物 α-SMA 的改变，进一步探索 PTEN 在瘢痕成纤维细胞转分化的机制。本实验采用 10 ng/ml TGF-β1 刺激瘢痕成纤维细胞 36 h 后，经 Western blot 检测发现，α-SMA 表达明显升高。PI3K/Akt 是体内重要的信号转导通路之一，其中 Akt 具有抗凋亡、促进细胞增殖、转分化等作用。Kattla 等[11]在糖尿病肾病的研究中发现 TGF-β1 可促进肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化的发生，其机制是激活 PI3K/Akt 通路。PTEN 是具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性的双重特异性磷酸酶，通过负性调控磷脂酰肌醇-3 激酶(P13K)/Akt、黏着斑激酶(FAK)及 MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)等信号转导抑制肿瘤细胞周期的运行，诱导肿瘤细胞凋亡，并抑制肿瘤细胞的黏附、迁移和分化[12-13]。关于 PTEN 的研究也主要集中于肿瘤上，PTEN 缺失或表达降低亦与人类多种恶性肿瘤的形成密切相关，如妇科肿瘤、消化道肿瘤、泌尿系肿瘤等[14-16]。近年来，PTEN 在纤维化疾病的作用也得到了重视[17]。研究发现，在特发性肺纤维化中肺成纤维细胞以及风湿性关节炎滑膜组织的成纤维细胞中，PTEN mRNA、PTEN 蛋白的表达均较正常组织显著降低[18]，而且高表达 PTEN 可以抑制上述组织中成纤维细胞的增值及肌纤维母细胞转分化，促进凋亡。前期研究在增生性瘢痕组织中 PTEN 的表达低于正常皮肤组织。本实验通过构建含 PTEN 基因的腺病毒载体并体外将 PTEN 转染至瘢痕成纤维细胞，得到高表达 PTEN 的增生性瘢痕成纤维细胞，然后给予 10 ng/ml TGF-β1 刺激，发现高表达 PTEN 可以抑制 TGF-β1 诱导增生性瘢痕成纤维细胞转分化。

综上所述，本实验证明 PTEN 可能通过抑制 PI3K/Akt 通路的活化，降低增生性瘢痕成纤维细胞 α-SMA 的表达，阻止其活化，为增生性瘢痕的治疗提供了一个新的研究靶点。

参考文献：

[1] Madhunapantula S V, Robertson G P. The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2009, 22(4): 400-419.

[2] White E S, Atrasz R G, Hu B, *et al*. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10) [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(1): 112-121.

[3] Wang C R, Shiau A L, Chen S Y, *et al*. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by adenovirus-mediated PTEN gene transfer[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(6): 1650-1656.

[4] Kuwano K. PTEN as a new agent in the fight against fibrogenesis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(1): 4-6.

[5] Stahl S, Barnea Y, Weiss J, *et al*. Treatment of earlobe keloids by extralesional excision combined with preoperative and postoperative "sandwich" radiotherapy[J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 125(1): 135-141.

[6] 赵平，李世荣. RNA 干扰对人瘢痕疙瘩成纤维细胞 TGF-β_1 刺激结缔组织生长因子表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(3)：213-215.

[7] Ahn J Y, Park S, YunY S, *et al*. Inhibition of type III TGF-beta receptor aggravates lung fibrotic process [J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(7): 472-476.

[8] Dawes L J, Eldred J A, Anderson I K, *et al*. TGF beta-induced contraction is not promoted by fibronectin-fibronectin receptor interaction, or alpha SMA expression [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci , 2008, 49(2): 650-661.

[9] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, *et al*. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF-beta1 suppression by apoptosis of myofibroblasts[J]. J Hypertens, 2010, 28(12): 2454-2461.

[10] Fujii S, Maeda H, Tomokiyo A, *et al*. Effects of TGF-beta1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line[J]. Cell Tissue Res, 2010, 342(2): 233-242.

[11] Kattla J J, Carew R M, Heljic M, *et al*. Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF-beta1-driven epithelial-mesenchymal transition *in vitro* and *in vivo*[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(1): F215-F225.

[12] Gao Q, Ye F, Xia X, *et al*. Correlation between PTEN Expression and PI3K/Akt signal pathway in endometrial carcinoma [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2009, 29 (1): 59-63.

[13] Trimboli A J, Cantemir-Stone C Z, Li F, *et al*. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours [J]. Nature, 2009, 461(7267): 1084-1091.

[14] Chung J Y, Hong S M, Choi B Y, *et al*. The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(2): 660-667.

[15] 杨君，唐良荟，王彬. PTEN、P27、TGF-β_1 在宫颈腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报，2009，31(2)：148-151.

[16] 赵雪峰，焦志凯，李勇，等. 胃癌中 PTEN、IGF-1、IGF-1R 蛋白表达及其预后意义评价[J]. 第三军医大学学报，2008，30(12)：1197-1199.

[17] 何晓童，樊晓明. PTEN 在纤维化疾病中的作用[J]. 国际内科学杂志，2009，36(10)：584-586，590.

[18] Pap T, Franz J K, Hummel K M, *et al*. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction[J]. Arthritis Res, 2000, 2(1): 59-64.

(收稿：2010-09-07 修回：2010-10-19)

(编辑 龙 亮)