论著

文章编号:1000-5404(2012)02-0154-04

富组蛋白1促进人成纤维细胞增殖和迁移

蒋 艳[1],王仙园[1],罗向东[2] (400038 重庆,第三军医大学:护理系[1],西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 了解富组蛋白1(histatin1,Hst1)对人成纤维细胞增殖和迁移功能的影响。**方法** 将人成纤维细胞按常规方法传代培养,分为空白对照组(DMEM+1%小牛血清)、A组(100 μg/ml Hst1)、B组(30 μg/ml Hst1)、C组(3 μg/ml Hst1),细胞计数法观察不同浓度Hst1(3~100 μg/ml)在不同时相点(24、48、72 h)对人成纤维细胞增殖功能的影响;将已融合的人成纤维细胞分为丝裂霉素C处理组及丝裂霉素C未处理组,各组中再次分为空白对照组(DMEM+1%小牛血清)、Ⅰ组(30 μg/ml Hst1)、Ⅱ组(10 ng/ml rhEGF)、Ⅲ组(30 μg/ml Hst1+10 ng/ml rhEGF)、Ⅳ组(15 μg/ml Hst1+5 ng/ml rhEGF)、Ⅴ组(15 μg/ml Hst1+10 ng/ml rhEGF),通过体外细胞划痕实验考察Hst1对人成纤维细胞迁移功能的影响。**结果** ①不同浓度的Hst1能够促进人成纤维细胞增殖,与浓度及时间无明显依赖关系,24 h时间点A、B组细胞数显著高于其余各组($P<0.01$);②30 μg/ml Hst1能促进细胞划痕创面愈合,8 h划痕愈合率约37.7%,与rhEGF联合应用时促划痕愈合率高于单独用药;利用丝裂霉素C排除细胞增殖作用后,30 μg/ml Hst1较空白对照组无促进细胞迁移功能($P>0.05$),划痕愈合率较丝裂霉素C未处理对应组下降,但无统计学意义,且与rhEGF联合应用时促划痕愈合率与单独用药无统计学差异($P>0.05$)。**结论** Hst1能够促进人成纤维细胞增殖,但促迁移功能不明显。Hst1联合rhEGF使用时对人成纤维细胞划痕创伤愈合具有协同促进作用。

[关键词] 人成纤维细胞;富组蛋白1;细胞增殖;细胞迁移;创伤

[中图法分类号] R329.28;R341 [文献标志码] A

Histatin1 improves proliferation and migration in human human skin fibroblasts

Jiang Yan[1], Wang Xianyuan[1], Luo Xiangdong[2] ([1]School of Nursing, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of histatin1 (Hst1) and recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) on the proliferation and migration in human skin fibroblasts. **Methods** Human skin fibroblasts was subcultured, and then randomly divided into control group (DMEM+1% NBS), A group (100 μg/ml Hst1), B group (30 μg/ml Hst1) and C group (3 μg/ml Hst1). Cell proliferation was observed by growth curve at 24, 48 and 72 h after corresponding treatment. Human skin fibroblasts was also randomly divided into control group (DMEM+1% NBS), Ⅰ group (30 μg/ml Hst1), Ⅱ group (10 ng/ml rhEGF), Ⅲ group (30 μg/ml Hst1+10 ng/ml rhEGF), Ⅳ group (15 μg/ml Hst1+5 ng/ml rhEGF), and Ⅴ group (15 μg/ml Hst1+10 ng/ml rhEGF). The ability of cell migration was evaluated by cell scrath test. **Results** ① The cell proliferation was significantly enhanced in B group and A group at 24 h ($P<0.01$). ②Hst1 at 30 μg/ml resulted in remarkable increased cells in the healing area, with a healing rate of 37.7% at 8 h. The healing area rate in combination groups (Hst1+rhEGF) was significantly higher than that in 10 ng/ml rhEGF group or 30 μg/ml Hst1 group. After Mitomycin C treatment, which restrained the cells proliferation, the cells healing area was more elevated in 10 ng/ml rhEGF group, 15 μg/ml Hst1 + 5 ng/ml rhEGF group and 15 μg/ml Hst1 + 10 ng/ml rhEGF group, but not in 30 μg/ml Hst1 group when compared with that in control group. The healing area was declined at 8 h than that of Mitomycin C untreated, but the difference was no significant. The healing area in combination groups (Hst1+rhEGF) had no significantly difference with that in 10 ng/ml rhEGF group

[基金项目] 国家自然科学基金(30730093)

[通信作者] 王仙园,E-mail:zhouxz11@yahoo.com.cn

罗向东,E-mail:Luoxd2005@163.com

or 30 μg/ml Hst1 group. **Conclusion** Hst1 can induce the proliferation of human skin fibroblasts, but exert not significant effect on migration. rhEGF combined with Hst1 shows a synergic effect on wound healing.

[**Key words**] human skin fibroblasts; histatin1; proliferation; migration; trauma

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30730093). Corresponding author: Wang Xianyuan, E-mail: zhouxz11@yahoo.com.cn; Luo Xiangdong, E-mail: Luoxd2005@163.com

抗菌肽(antimicrobial peptide, AMPs)是生物体防御系统产生的一类小分子多肽,具有免疫调节活性,能直接杀灭或抑制多种病原微生物[1]。富组蛋白(histatins, Hsts)是一类内源性抗菌肽,仅存在于人类或灵长类动物腮腺及颌下腺分泌物中[2]。目前的研究发现 Hsts 除具有抗微生物作用,还有促进口腔黏膜上皮细胞迁移功能,可能在口腔黏膜创伤愈合过程中起重要作用[3]。为了探讨 Hsts 与皮肤创伤的相关性,本研究以人成纤维细胞株为实验对象,考察富组蛋白 1(histatin1, Hst1)在体外对这种标准细胞株迁移、增殖等功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

人成纤维细胞标准细胞株(美国 ATCC),hst1(中国锐东生物合成,纯度 95%),重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF,中国上海博华),DMEM 培养基(HyClone),小牛血清(中国北京鼎国昌盛生物公司),胰蛋白酶(中国北京鼎国昌盛生物公司),磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.4)干粉包,PBS(中国北京博奥森),丝裂霉素 C(美国 Sigma)。细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),细胞培养净化工作台(苏净集团安泰公司),多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器公司 TDZ5-WS),电热恒温水箱(北京长风仪器仪表公司),电子天平(德国 Sartorius 公司),倒置显微镜(Olympus 公司)。

1.2 细胞培养

人成纤维细胞接种于培养瓶,血清浓度 10% 的 DMEM 培养基,37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。细胞长至 90% 融合时传代,再次接种。

1.3 细胞增殖实验

生长曲线检测细胞的生长状况。根据实验要求分为对照组和实验组 3 组(A 组:100 μg/ml Hst1,B 组:30 μg/ml Hst1,C 组:3 μg/ml Hst1)。取对数生长期的细胞,2×10^4/ml 接种于 12 孔细胞培养板,常规培养 48 h 后,换血清浓度 1% DMEM 培养基培养过夜,按实验分组加入等体积含药血清浓度 1% DMEM 培养基,等体积血清浓度 1% DMEM 培养基为对照组,常规培养,于 24、48、72 h 时间点取样,每组各取 3 孔,血球计数板计算细胞浓度,每孔重复计数 3 次,取其平均值,以 24、48、72 h时间点为横坐标,细胞计数为纵坐标做生长曲线图。

1.4 人成纤维细胞体外愈合率测定

采用细胞划痕实验。于 24 孔细胞培养板底部中央做十字形标记,收集对数期细胞,接种于 24 孔细胞培养板,血清浓度 10% DMEM 培养基,置 37 ℃ 5% CO_2 温箱培养;待细胞贴壁融合达 90% 后,分为丝裂霉素 C 处理组及丝裂霉素 C 未处理组,2 组又各分实验组(Ⅰ组:30 μg/ml Hst1,Ⅱ组:10 ng/ml rhEGF,Ⅲ组:30 μg/ml Hst1 + 10 ng/ml rhEGF,Ⅳ组:15 μg/ml Hst1 + 5 ng/ml rhEGF,Ⅴ组:15 μg/ml Hst1 + 10 ng/ml rhEGF)及对照组共 6 组,各组 3 个重复。丝裂霉素 C 处理组加入丝裂霉素 C(10 μg/ml)避光处理,2 h 后 PBS 冲洗;换血清浓度 1% DMEM 培养基培养过夜,200 μl 移液器枪头垂直划痕,PBS 冲洗以去除划痕区残留细胞及死细胞;按分组加入含药血清浓度 1% DMEM 培养基继续培养,以血清浓度 1% DMEM 培养基作为空白对照;分别于 0、8、16、24 h 时间点观察细胞划痕区愈合情况,并于倒置显微镜下照相记录。每组设 3 个复孔,取均值。利用 Imagetool 软件进行愈合面积计算。

愈合率 = (初始划痕面积 − 现划痕面积)/初始划痕面积 × 100%

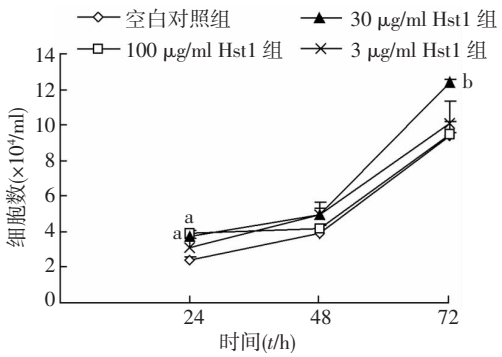
1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用非配对 t 检验,多组数据间比较采用单因素方差分析结合 SNK 检验。

2 结果

2.1 Hst1 对人成纤维细胞细胞增殖能力的影响

100、30 μg/ml Hst1 在作用 24 h 后能够促进人成纤维细胞增殖,与空白对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。48 h Hst1 对人成纤维细胞无明显促增殖作用,至 72 h 30 μg/ml Hst1 对该细胞具有促进增殖功能($P < 0.01$)。见图 1。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与空白对照组比较

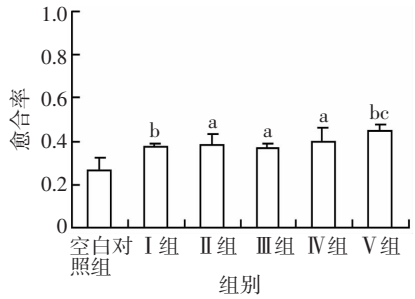
图 1 Hst1 作用下人成纤维细胞生长曲线

2.2 Hst1 对人成纤维细胞迁移能力的影响

30 μg/ml Hst1 能促进其划痕创面愈合,8 h 细胞划痕区愈

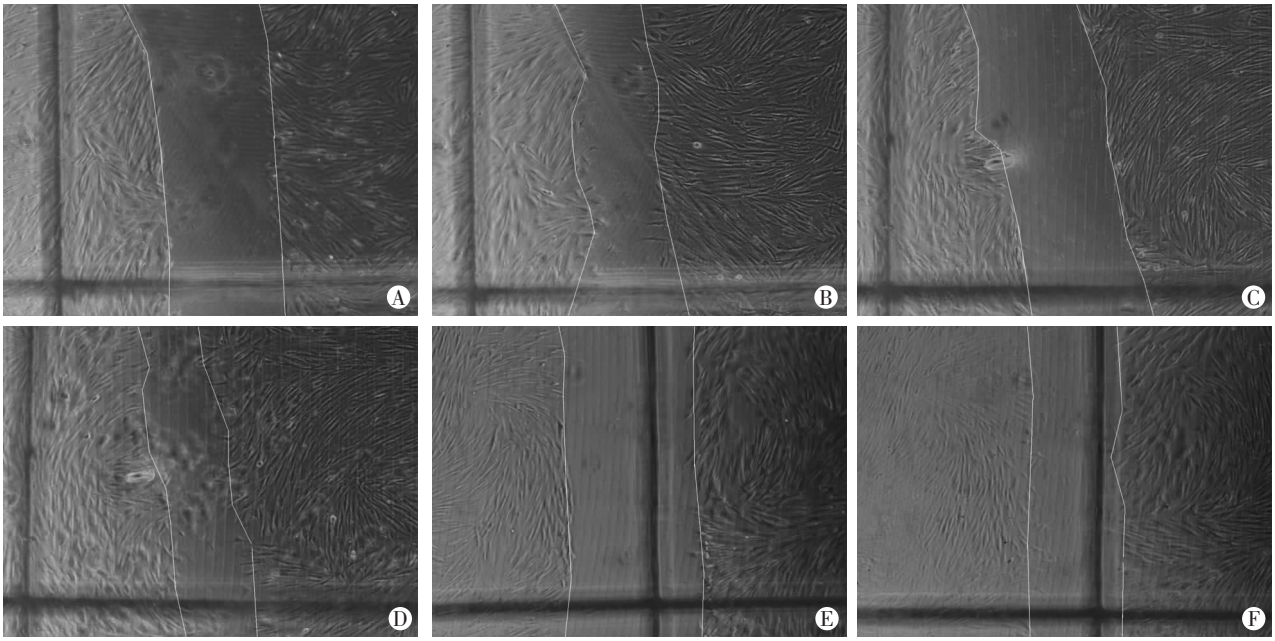
合率约37.7%,高于空白对照组8 h划痕愈合率(26.3%,$P<0.01$)。随着时间延长,划痕愈合速度减慢,同组内16、24 h与8 h划痕愈合率差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2、3。

丝裂霉素C处理Ⅰ~Ⅳ组愈合率较未处理组下降,差异无统计学意义($P>0.05$);Ⅴ组愈合率较未处理组下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。丝裂霉素C处理Ⅰ~Ⅲ组愈合率与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Ⅳ、Ⅴ组较空白对照组显著提高($P<0.01$)。丝裂霉素C处理组Ⅰ~Ⅴ组愈合率两两比较无统计学差异($P>0.05$)。提示两者协同可能主要作用于细胞的增殖效应。见图4、5。



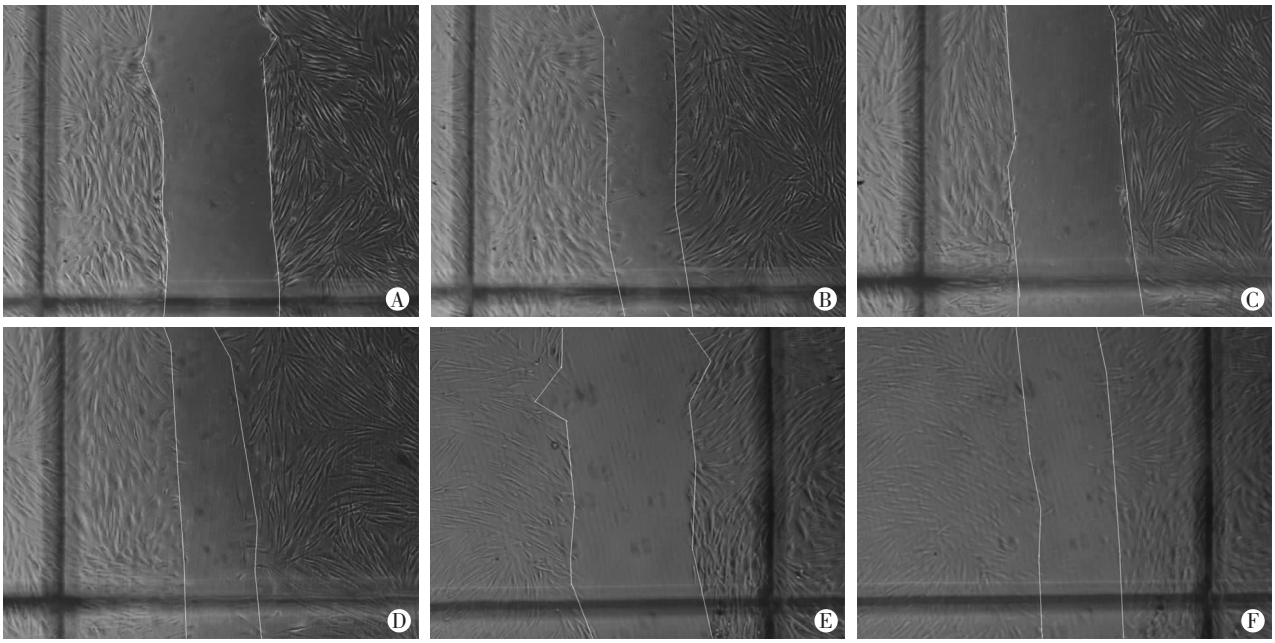
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较;c:$P<0.01$,与Ⅰ组比较

图2 Hst1、rhEGF作用下人成纤维细胞划痕8 h愈合率



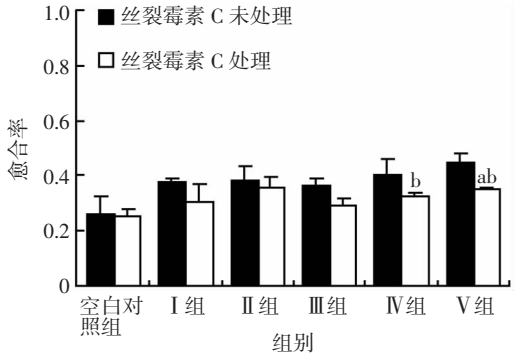
A、B:空白对照组0、8 h;C、D:30 μg/ml Hst1组0、8 h;E、F:15 μg/ml Hst1 + 10 ng/ml rhEGF组0、8 h

图3 Hst1、rhEGF作用下人成纤维细胞划痕8 h愈合情况 (倒置显微镜 ×40)



A、B:空白对照组0、8 h;C、D:30 μg/ml Hst1组0、8 h;E、F:15 μg/ml Hst1 + 10 ng/ml rhEGF组0、8 h

图4 丝裂霉素C、Hst1、rhEGF作用下人成纤维细胞划痕8 h愈合情况 (倒置显微镜 ×40)



a:$P<0.01$,与对应丝裂霉素 C 未处理组比较;b:$P<0.01$,与丝裂霉素 C 处理空白对照组比较

图 5 丝裂霉素 C 对 Hst1、rhEGF 作用下人成纤维细胞划痕 8 h 点愈合率的影响

3 讨论

研究发现 Hsts 除能活化口腔黏膜上皮细胞,也能活化某些非口腔来源细胞[4]。前期的实验证实 Hsts 能促进人表皮细胞(HaCat 细胞株)的增殖和迁移[5]。为了进一步探讨 Hsts 对非口腔组织细胞的作用,本研究考察 Hst1 对人成纤维细胞增殖和迁移功能的作用,结果显示 Hst1 对人成纤维细胞具有促增殖功能,但促迁移功能不明显。100、30 μg/ml Hst1 对人成纤维细胞具有促增殖作用,低浓度 3 μg/ml Hst1 对细胞增殖作用不显著,但在 30 ~ 100 μg/ml 范围内其促进功能与 Hst1 浓度、作用时间并无依赖关系,可能与随着时间延长,药物浓度下降有关,有待进一步实验论证。值得注意的是,100 μg/ml Hst1 对人成纤维细胞促增殖作用低于 30 μg/ml Hst1 组,是否由于高浓度 Hst1 组对细胞存在一定副作用,机制尚不清楚,需要进一步考证;另外,本研究利用丝裂霉素 C 排除细胞增殖后,发现 Hst1 对人成纤维细胞并无明显促迁移功能,提示 Hst1 对人成纤维细胞的功能影响可能侧重于促增殖作用,这与 Oudhoff 等[4]的研究 Hst1 主要作用于人成纤维细胞迁移功能不一致,可能与其在考察其迁移作用时实验中并未完全排除细胞增殖效应有关。由于人成纤维细胞是重要的创伤修复细胞之一,创伤及周围部位这两类细胞的增殖或迁移,是创伤被表皮组织重建,完成再上皮化的关键[6],那么,基于这个结果,本研究为 Hst1 用于非口腔黏膜创伤治疗提供了可能性依据。Hst1 联合 rhEGF 使用时对人成纤维细胞划痕创面愈合具有协同促进作用。目前的研究大多认为抗菌肽(防御素和 LL-37)促生长机制多依赖于表皮生长因子受体[7-8],但 Oudhoff 等[3]对 Hst2 促口腔黏膜细胞迁移的研究发现其作用机制可能与之不同,使用该受体抗体并不能抑制其促迁移效果。此外,我们发现随着联合用药中 rhEGF 比例的改变,对人成纤维细胞联合效应有所差异,提示 rhEGF 与 Hst1 之间确实存在某种联系,且这种协同效应对人成纤维细胞的作用可能主要侧重于增殖功能。

抗菌肽由于同时具有抵抗病原微生物、促细胞增殖或迁移的双重功能[9],能够弥补目前创伤治疗某些药物作用单一的不足,可能是一种极具潜力的创伤治疗药物,值得进一步研究[10]。

参考文献:

[1] Reddy K V, Yedery R D, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises[J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 24(6): 536 - 547.

[2] Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection[J]. Respir Res, 2000, 1(3): 141 - 150.

[3] Oudhoff M J, Bolscher J G, Nazmi K, *et al*. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay[J]. FASEB J, 2008,23(11): 3805 - 3812.

[4] Oudhoff M J, van-den-Keijbus P A, Kroeze K L, *et al*. Histatins enhance wound closure with oral and non-oral cells[J]. J Dent Res, 2009, 88(9): 846 - 850.

[5] Oudhoff M J, Kroeze K L, Nazmi K, *et al*. Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1000-fold[J]. FASEB J, 2009, 23(11): 3929 - 3935.

[6] Santoro M M, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing[J]. Exp Cell Res, 2005, 304(1): 274 - 286.

[7] Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, *et al*. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(3): 594 - 604.

[8] Von-Haussen J, Koczulla R, Shaykhiev R, *et al*. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells[J]. Lung Cancer, 2008, 59(1): 12 - 23.

[9] Oudhoff M J, Blaauboer M E, Nazmi K, *et al*. The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity[J]. Biol Chem, 2010, 391(5): 541 - 548.

[10] Zasloff M. Antimicrobial peptide of multicellular organisms[J]. Nature, 2002, 415(6870): 389 - 395.

(**收稿**:2011-08-31;**修回**:2011-10-10)

(编辑 张 维)