基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1351-03

青蒿琥酯对体外瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制作用

江 川,贺光照,冯登超
(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨青蒿琥酯对瘢痕疙瘩(Keloid)成纤维细胞(Fibroblast,Fb)的增殖抑制作用及其作用机制。方法:将 60 mg/L 的青蒿琥酯作用于体外培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞 24 h,MTT 法检测细胞生长抑制率,免疫细胞化学和 western blotting 法检测分化抑制因子 1(Inhibitor of differentiation 1,Id1)的表达情况。结果:在青蒿琥酯的作用下,成纤维细胞的 Id1 表达降低。结论:青蒿琥酯抑制成纤维细胞的机制可能与抑制 Id1 的表达有关。

【关键词】青蒿琥酯钠;瘢痕疙瘩;成纤维细胞;分化抑制因子 1(Id1)
【中国图书分类法分类号】R619.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-24

Inhibition of artemisinin of fibroblasts derived from human keloid in vitro

JIANG Chuan, et al
(*Department of the Burning and Plastic, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibition of artesunate on fibroblasts in vitro derived from human keloid. *Methods*: 60mg/L artesunate was added to the medium .The effects of artesunate on fibroblasts in vitro were observed after 24h.The inhibitory rate of the cellular growth was meassured using MTT assay.The expression of Id1 protein was detected by immunohistochemistry and western blotting. *Results*: The data indicated that the expression of Id1 of fibroblasts derived from keloid were depressed by artesunat. *Conclusion*: The mechanism of inhibit fibroblast proliferation by artesunat might be related to the depression of protein expression of Id1.

【Key words】Artesunate; Keloid; Fibroblast; Inhibitor of differentiation 1(Id1)

在创伤后组织修复的过程中,常有病理性瘢痕形成,造成机体的形态和功能障碍。成纤维细胞(Fibroblast,Fb)为瘢痕组织中主要细胞成分,其过度增殖构成了病理性瘢痕形成的生物学基础,抑制病理性瘢痕成纤维细胞的增殖是防治瘢痕形成与发展的关键。本实验旨在观察青蒿琥酯影响体外培养的瘢痕疙瘩(Keloid)成纤维细胞的分化抑制因子 1(Inhibitor of differentiation,Id1)的表达变化,为临床防治瘢痕提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

青蒿琥酯纳(纯度 99.99%,桂林制药厂),MTT(SIGMA 公司 美国),DMEM 培养基(HyClone-PIERCE 公司),胎牛血清(杭州四季青生物制品研究所),胰蛋白酶(SIGMA 公司 美国),二甲基亚砜(DMSO,SIGMA 公司)。兔抗人 Id1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司)、SP 免疫组化试剂盒(福建迈新生物技术开发公司),DAB 显色剂等。ECL 化学发光试剂盒(美国 Santa Cruz 公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(百泰克斯公司)、RIPA 裂解液(百泰克斯公司)、β-actin(美国 Santa Cruz 公司)、PVDE 膜(Millipor 公司)、预染蛋白分子量 marker(Fermentas 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 成纤维细胞的培养 组织标本共 14 例,其中男 8 例,女 6 例,年龄分布在 12~30 岁,病程为 3~5 年,其中耳垂瘢痕疙瘩 4 例、胸前瘢痕疙瘩 5 例、肩部瘢痕疙瘩 5 例,近期无使用抗瘢痕药物史,不伴有其他严重疾病。应用组织块贴壁法行成纤维细胞原代培养,定期观察细胞生长情况,每 2~3 d 换液一次,待细胞爬满瓶底,0.2%的胰酶消化,进行传代培养。本实验所用细胞为第 4~6 代。

1.2.2 MTT 法测成纤维细胞生长抑制率

1.2.2.1 青蒿琥酯钠对瘢痕疙瘩成纤维细胞体外药敏实验

将青蒿琥酯纳稀释成 10、20、40、80、160 mg/L 的含药培养液,作为实验组。MTT 以 0.1 mol/L pH 为 7.4 的 PBS 溶解成 5 g/L 的溶液。选生长状态良好的成纤维细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,共 3 块,置 5%CO_2 孵箱中,在 37℃、饱和湿度下培养 24 h 后,实验组按实验设计换所需浓

作者介绍:江 川(1976-),男,硕士,
研究方向:病理性瘢痕的形成机制及防治。
通讯作者:贺光照,男,副教授,E-mail:glenhe@sina.com。

度的含青蒿琥酯纳培养液,空白对照组仅加入等量培养液,分别培养 6、12、24 h 后,取出 1 块培养板,以 MTT 法测其光密度值(Optical density,OD)。

1.2.2.2 成纤维细胞抑制率的计算 以各实验组与对照组平均吸光值的比值求出细胞存活率,根据浓度 - 存活率求出其存活率为 50% 的药物浓度(IC_{50})。计算各组平均 OD 值及抑制率。抑制率 =(1- 实验组 OD_{570} 值 / 对照组 OD_{570} 值)× 100%。

1.2.3 免疫组织化学法检测成纤维细胞 Id1 的表达变化 细胞爬片后分为对照组和实验组,实验组加含 60 mg/L 青蒿琥酯的 10% 胎牛血清 DMEM 培养液,对照组加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37℃,5%CO_2,饱和湿度培养 24 h 后,取出进行免疫细胞化学染色,检测 Id1 在成纤维细胞的蛋白表达。按常规免疫组织化学检测,DAB 染色,具体步骤参照说明书进行。

1.2.4 Western blotting 检测成纤维细胞中 Id1 的表达变化 提取 Fb 蛋白,行 10%的 SDS-PAGE,每孔上样量 50 μg 蛋白,电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜上,用 3%BSA 封闭膜 2 h,分别加入一抗,37℃孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,二抗 37℃孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,然后以增强型化学发光试剂(Enhanced chemiluminescence,ECL)显色,凝胶成像仪采取图像,分子条带为 $15\times10^3\sim17\times10^3$ Du 的位置出现条带为 Id1 蛋白表达阳性。再用 Quantity One 分析软件进行分析。以目的蛋白条与 β-actin 的平均灰度值比值表示 Id1 的相对表达水平。

2 结 果

2.1 青蒿琥酯对瘢痕疙瘩成纤维细胞体外药敏实验

青蒿琥酯对瘢痕疙瘩成纤维细胞体外药敏实验的 MTT 法检测结果,6 h 组,12 h 组和 24 h 组分别见后表 1。计算得青蒿琥酯中效剂量在 6 h 组为 130 mg/L;在 12 h 组为 110 mg/L;在 24 h 组为 60 mg/L。图 1 示:青蒿琥酯对成纤维细胞的生物活性随药物浓度的递增而减弱。我们在根据 Dm 值确定实验浓度时,为了方便,取 24 h 组青蒿琥酯 Dm 为 60 mg/L,即 IC_{50},作为以后实验的药物作用浓度。

2.2 免疫细胞化学检测 Id1 蛋白表达

细胞化学检测发现,对照组胞浆和胞核均有 Id1 表达,胞核着色较胞浆深,呈棕黄色。青蒿琥酯实验组胞浆和胞核也有 Id1 表达,着色较对照组浅(图 2)。细胞免疫化学结果显示,原代培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞中有 Id1 蛋白表达,经过青蒿琥酯处理的瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Id1 蛋白表达有所减少。

2.3 Western blotting 检测 Id1 蛋白表达

以 β-actin 蛋白特异反应条的亮度带作为标准,可以发现,与对照组相比较,青蒿琥酯实验组瘢痕疙瘩成纤维细胞中,Id1 反应条带减弱 (表 2、图 3)。图象分析 Id1 蛋白下调约 30.76% (图 3)。

3 讨 论

瘢痕疙瘩是整形美容外科棘手的问题之一,因其增生及挛缩而产生畸形及功能障碍,在增殖过程中产生的痒感和刺痛感也严重影响患者的生活。但瘢痕疙瘩产生的机制尚不清楚,临床疗效还尽不如人意。因此,寻找有效而方便的药物治疗瘢痕疙瘩,成为关注的焦点。20 世纪 70 年代,我国学者从中药黄花蒿中分离出有效单体成分青蒿素,又陆续合成了多种有效衍生物。通过对该类药物作用的深入研究,发现青蒿素类药物除了有很好的抗疟作用外,还有免疫调节、抗炎、抗纤维化和抗肿瘤作用。有研究[1]发现青蒿素对实验性矽肺有明显的治疗作用,而矽肺的发生是由于成纤维细胞增生,胶原合成增多导致肺内胶原沉积所致。这提示青蒿素具有抗纤维化作用。而瘢痕疙瘩也是成纤维细胞过度增生的结果,与矽肺有相似性,这就提示青蒿素可能对瘢痕疙瘩也有治疗作用。贺光照等[2]观察到青蒿素治疗增殖性瘢痕的临床疗效,发现它具有明显的抗瘢痕作用,可使瘢痕软化、变平。随后对人瘢痕成纤维细胞进行体外培养,试验中观察并分析了青蒿素对增殖性瘢痕成纤维细胞的增殖活力及胶原合成功

表 1 青蒿琥酯对瘢痕疙瘩成纤维细胞体外杀伤实验平均 OD 值($\bar{x}\pm s$)

时相浓度	6 h 组	12 h 组	24 h 组
0 mg/L	0.172 ± 0.010	0.168 ± 0.022	0.185 ± 0.006
10 mg/L	0.159 ± 0.018	0.150 ± 0.011	0.147 ± 0.006
20 mg/L	0.146 ± 0.009	0.143 ± 0.018	0.134 ± 0.006
40 mg/L	0.135 ± 0.012	0.127 ± 0.007	0.118 ± 0.011
80 mg/L	0.103 ± 0.006	0.084 ± 0.005	0.082 ± 0.006
160 mg/L	0.077 ± 0.004	0.064 ± 0.004	0.052 ± 0.008
空白组	0.041 ± 0.002	0.042 ± 0.002	0.042 ± 0.001

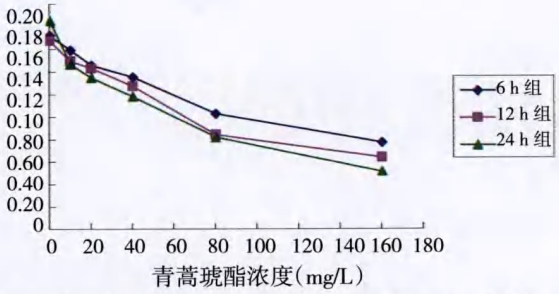
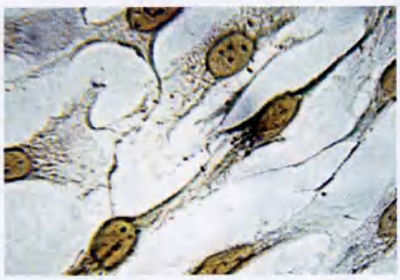


图 1 青蒿琥酯处理后瘢痕疙瘩成纤维细胞 OD 值的变化

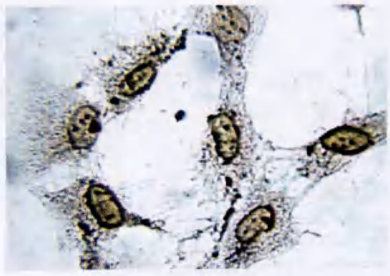
表 2 Id1 蛋白表达光密度值与 β-actin 的光密度值比率

组列	例数	Id1
对照组	14	1.421 ± 0.051
实验组	14	0.984 ± 0.061
$P<0.05$		



A

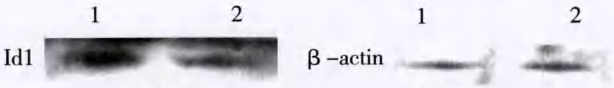
A．对照组



B

B．治疗组

图 2 瘢痕疙瘩成纤维细胞 Id1 蛋白免疫细胞化学染色×400



1.对照组　　2.实验组

图 3 Western blotting 检测瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Id1 蛋白的表达

能的影响，结果表明，青蒿素可呈剂量和时间依赖性地抑制成纤维细胞的增殖，并明显降低细胞外胶原量[3]。但青蒿素抑制瘢痕成纤维细胞增殖的机制尚不清楚。

Id 蛋白家族属于 HLH(Helix-loop-Helix)蛋白，其结构中不含有与 DNA 特异性结合的碱性区，与很多 HLH 转录因子结合形成无功能的异二聚体，是 bHLH 家族的负调控因子。Id 蛋白生物学效应复杂，主要在细胞生长、分化调控及肿瘤生成等方面发挥重要作用[4-6]。Id1 是 Id 蛋白的一种，在多种组织和细胞内均有表达。有研究表明 Id1 的过度表达可延缓细胞老化或导致细胞永生化[7,8]。在多种实体瘤组织中发现 Id1 呈高表达趋势，其表达水平与肿瘤细胞的恶性程度、发展及不良预后有密切关系[9-11]。在正常的子宫内膜中，未发现 Id1 蛋白表达，而在子宫内膜癌细胞中发现有 Id1 的表达，并且表达量与子宫内膜癌的组织学恶性程度以及癌细胞浸润程度明显相关[12]。有研究表明 Id1 可通过灭活肿瘤抑制因子和激活生长促进通路，促进细胞的增殖和细胞周期的进行，在肿瘤增殖中起着非常重要的作用[13]。瘢痕疙瘩表现为局部增生样改变，且能超出原有损伤范围，向正常皮肤浸润，持续时间久且有不断扩大的趋向，其在一定时间内生长失控，与肿瘤有一定的相似性[14]。推测 Id1 调节细胞增殖的机理可能为：Id1 通过与 bHLH 类转录因子（如 HEB、E12/E47、E2-2a 等）结合形成异源二聚体，阻止 bHLH 蛋白与 DNA 增强子 E-box 结合从而抑制基因的转录。当 Id1 功能活跃时，可使 bHLH 转录因子与细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21、p16 启动子中 E-box 的结合减少，p21、p16 的表达降低，促进了细胞增殖；反之，Id1 功能抑制时，将抑制细胞增殖[15]。

本实验发现，Id1 蛋白在瘢痕疙瘩成纤维细胞中存在表达，并且在青蒿琥酯作用于瘢痕疙瘩成纤维细胞后，其表达较用药前有明显降低，说明 Id1 蛋白可能与瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖有关。青蒿琥酯抑制瘢痕疙瘩的增殖可能是通过减少成纤维细胞的 Id1 的表达来实现抑制成纤维细胞的增殖、分化及胶原合成。Id1 在瘢痕疙瘩的发生、发展中可能起着重要作用，但其参与瘢痕疙瘩增殖的具体过程及其上游调控机制仍需要进一步的研究，这有可能将有助于揭示病理性瘢痕的产生机理，为临床预防和治疗病理性瘢痕提供理论依据。

参 考 文 献

[1] 徐德忻，张维德，代长生，等.青蒿素对实验性矽肺的预防、病后治疗观察[J].医学研究通讯，1998，27(2)：43-44.

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1354-04

PCNA 在小鼠胚胎着床过程中的作用

孟 君,魏莎莉,覃致远,张 谭,杜 芳,王庆跃
(重庆医科大学公共卫生学院生殖生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在小鼠胚胎着床过程中的作用。方法:实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time Fluorescence Quantitative PCR, Real -time FQ-PCR)技术检测未孕及孕 2、3、4、5、6、7 d(分别记为 d0、d2、d3、d4、d5、d6、d7)小鼠子宫内膜 PCNA mRNA 的表达;子宫角注射 PCNA 单克隆抗体观察胚泡着床数。结果:FQ-PCR 测得随着小鼠妊娠天数的增加,PCNA mRNA 表达量也逐渐增高,在孕 d4、d5 达到峰值,孕 d6、d7 逐渐下降。子宫角注射 PCNA 单克隆抗体后胚泡着床数明显减少。结论:PCNA 在妊娠早期子宫内膜持续表达,可能参与了胚泡着床。

【关键词】PCNA 子宫内膜;植入;FQ-PCR;子宫角注射
【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-11

Effect of PCNA in the mouse uterus during embryo implantation

MENG Jun, et al
(*Department of the Reproductive Physiology, Public Health Institute, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of PCNA in the mouse uterus during embryo implantation. *Methods*: Real-time fluorescence quantitative PCR (FQ -PCR) was used to detect the PCNA mRNA of the mouse of unpregnancy, pregnancy at d2, d3, d4, d5, d6 and d7. PCNA monoclonal antibody was injected in horn of uterus at pregnant d3. *Results*: The expression of PCNA mRNA showed gradual hoist trend as days passed , and at pregnant d4, d5 it reached the maximum, at pregnant d6, d7 it showed gradual descent trend. The number of blastocysts in horn of uterus which was injected PCNA monoclonal antibody was smaller than in that of injected with Saline. *Conclusion*: PCNA is persistently expressed in mouse endometrium during the early pregnancy and maybe participates in the regulation process of mouse blastodysts implantation .

作者介绍:孟 君(1981-),女,硕士,
研究方向:胚泡着床的分子生物学机制。
通讯作者:魏莎莉,女,副教授,E-mail: zwz007cn@yahoo.com.cn。

【Key words】PCNA; Endometria; Implantation; Real-timefluorescence quantitative PCR (FQ-PCR); Intrauterine injection

[2] 贺光照,黄崇本,张代录,等.青蒿素局部治疗增殖性瘢痕临床观测[J].重庆医科大学学报,1998,23(3):260-261.
[3] 曹治东,石崇荣,黄崇本.青蒿素对体外瘢痕成纤维细胞的生物学影响[J].重庆医学,2003,32(5):521-523.
[4] Norton JD.Id helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis[J].J Cell Sci, 2000,113(Pt 22):3897-3905.
[5] Chaudhary J,Sadler-Riggleman I,Ague J M,et al.The helix-loop-helix inhibitor of differentiation(ID) proteins induce postmitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate[J]. Biol Reprod,2005,72(5):1205-1217.
[6] Leeanansaksiri W,Wang H,Gooya J M,et al.IL-3 induces inhibitor of DNA-binding protein-1 in hemopoietic progenitor cells and promotes myeloid cell development[J].J Immunol,2005,174(11):7014-7021.
[7] Alani R M,Hasskarl J,Grace M,et al.Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein,Id-1[J].Proc Natl Acad Sci USA ,1999,96(17):9637-9641.
[8] Nickoloff B J,Chaturvedi V,Bacon P,et al.Id-1delays senescence but does not immortalize keratinocytes[J]. J Biol Chem,2000,275(36): 27501-27504.
[9] Schoppmann S F,Schindl M,Bayer G,et al.Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer[J]. Int J Cancer,2003,104(6):677-680.
[10] Lee K T,Lee Y W,Lee J K,et al.Overecpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers[J]. Br J Cancer,2004,90(6):1198-1203.
[11] Coppe J P,Itahama Y,Moore D H,et al.Id-1and Id2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression[J]. Clin cancer Res,2004,10(6):2044-2051.
[12] Takai N,Miyazaki T,Fujisawa K,et al.Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma[J]. Cancer Lett,2001,165(2):185-193.
[13] Wong YC,wang X,ling MT.Id-1 expression and cell survival[J]. Apoptosis,2004,9(3):279-289.
[14] 姚庆军,陈 壁,胡大海,等.烧伤后不同瘢痕组织中 p16 基因的缺失与突变分析[J].西北国防医学杂志,2005,23(2):105-107.
[15] Pagliuca A,Gallo P,De Luca P,et al. Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth [J].Cancer Res,2000,60(5):1376-1382.

(责任编辑:关蕴良)