论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1505-04

外源性一氧化氮对体外培养瘢痕成纤维细胞的抑制作用

罗洪智
(湖南省怀化市第一人民医院外科,怀化 418000)

【摘 要】目的:探讨外源性一氧化氮对体外培养瘢痕成纤维细胞增殖的抑制作用。方法:取我院整形外科 9 例病理性瘢痕组织标本,组织块贴壁法培养瘢痕成纤维细胞。传代细胞分 5 组,对照 A 组不加一氧化氮供体硝普钠,实验组 B ~ D 组加入浓度分别为 100、200、300 μmol/L 的硝普钠,实验组 E 组加入浓度为 200 μmol/L 的硝普钠及和 10 μmol/L 的鸟苷酸环化酶抑制剂美蓝。24 h 后用 Griess 还原法检测细胞上清液中一氧化氮的释放量,并进行 MTT 试验。结果:病理性瘢痕组织标本原代培养成纤维细胞全部成活,形态正常。实验 24 h 后细胞上清液中一氧化氮释放量随硝普钠浓度的增高而增加。MTT 试验显示经硝普钠作用后瘢痕成纤维细胞的活细胞数较对照组明显减少($P<0.05$),实验组 B ~ D 之间,随着硝普钠浓度的增高,细胞活力也有降低趋势。并且,加入美蓝的实验组 E 较实验组 C 活细胞数增高($P<0.05$)。免疫细胞化学检测显示:SNP 作用后Ⅰ型胶原表达降低,而美蓝作用后Ⅰ型胶原表达增加。Ⅲ型胶原检测结果也有相同的变化。结论:外源性一氧化氮对培养状态下瘢痕成纤维细胞有抑制作用,这其中可能有 NO-GC-cGMP 通路的参与。

【关键词】病理性瘢痕;成纤维细胞;一氧化氮;细胞增殖;细胞培养
【中图图书分类法分类号】R622+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-15

Exogenous nitric oxide inhibits proliferation of in vitro cultured human keloid fibroblasts

LUO Hong-zhi
(*Department of Surgery, the First People's Hospital of Huaihua*)

【Abstract】*Objective*: To explore the inhibitive effects of exogenous nitric oxide on the proliferation of in vitro cultured human keloid fibroblasts. *Methods*: Fibroblasts was isolated from fresh pathological scar tissue and cultured. Fibroblasts were distributed in five groups. Fibroblasts in control group A was cultured without SNP; in experiment group B ~ D, SNP was used in the concentration of 100、200、300 μmol/L each; in experiment group E, Fibroblasts was cultured with 200 μmol/L SNP and 10 μmol/L methylene blue. After 24 h, Griess and MTT were used to detect the concentration of NO and cell vigor. *Results*: The release of NO increased along with the enhancement of the concentration of SNP. The amount of living cells in experiment groups decreased compared with the controls as shown by MTT test($P<0.05$), but in experiment group E, the amount of living cells was increased than group C($P<0.05$). Immunocytochemical detection shows: SNP treatment decreased the expression of collagen Ⅰ, and expression of collagen Ⅰ increased after treated by Methylene blue. *Conclusion*: Exogenous nitric oxide inhibits the proliferation of of in vitro cultured human keloid fibroblasts, and these may be result in NO-GC-cGMP path way.

【Keywords】Pathological scar; Fibroblast; Nitric oxide; Cell proliferation; In vitro

瘢痕组织不仅影响美容和功能,而且常常伴有瘙痒和刺痛,切除后又易复发。由于其发病机制尚未彻底阐明,治疗棘手,是目前整形美容外科的难题之一。近年来发现一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶在创伤及创面愈合过程中均具有重要作用[1~3]。本实验以硝普钠(SNP)为 NO 供体,观察外源性 NO 对体外培养瘢痕成纤维细胞的作用,并初步探讨其调控机制,从而为临床应用 NO 供体药物减少病理性瘢痕形成提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

病理性瘢痕组织标本取自我院整形外科 08 年 3 月至 4 月手术病例,共 9 例。其中取自胸前 4 例、耳垂和大腿各 2 例、上臂 1 例。患者年龄22 ~ 68 岁,男 3 例,女 6 例。瘢痕形成时间 7 ~ 22 个月,均无系统性疾病和激素注射史。

作者介绍:罗洪智(1969-),男,副主任医师,
研究方向:整形外科学。

1.2 成纤维细胞的培养

采用组织块贴壁法培养成纤维细胞。将组织标本用含 100 U/L 青霉素和 100 U/L 链霉素的磷酸盐缓冲液反复冲洗 3 次，去皮下组织和表皮，剪成约 1.0 mm^3 左右的小块，均匀贴附于培养瓶底面。加入含 30%小牛血清（Gibco 公司）的 DMEM（Gibco 公司）培养液，置于 37℃、95%空气、5%二氧化碳、饱和湿度的组织培养箱（日本 TABAI）中静置培养。每 4～6 d 用含 10%小牛血清的 DMEM 培养液换液 1 次。待细胞长满瓶底形成细胞单层后，用 0.25%胰蛋白酶（Sigma 公司）消化，按 1∶3 的比例进行传代培养，每 3 d 换液 1 次。

1.3 实验及分组

取 5～7 代的成纤维细胞，胰蛋白酶消化，用滴管吹打成单细胞悬液。将同一批细胞混合稀释至 10^7 个 /L，接种到 6 孔板中，每孔接种细胞悬液 2 ml。共接种 50 孔。每 10 孔为 1 组，共分 1 个对照组（A 组）和 4 个实验组（B～E 组）。A 组不加 SNP，B～D 组加入浓度分别为 100、200、300 μmol/L 的 SNP（北京双鹤药业股份有限公司），E 组加入浓度为 200 μmol/L 的 SNP 及和 10 μmol/L 的鸟苷酸环化酶抑制剂美蓝（Sigma 公司）。培养 24 h 后，用吸管吹打成单细胞悬液。从每孔中吸取 1 ml 的细胞悬液，进行 NO 含量和细胞活性的测定。

1.4 NO 含量的测定

NO 的氧化产物 NO^{2-} 浓度可通过 Griess 试剂染色方法测得，其含量可间接反映 NO 的释放量。取 A～D 组上清液 0.5 ml，按 NO 测试盒（南京建成生物工程研究所）说明书中提供的方法检测。用分光光度仪（光波长为 550 nm）进行比色，测定光密度值。根据计算公式：（测定管 A 值－空白管 A 值）/（标准管 A 值－空白管 A 值）× 标准管浓度（20 μmol/L）× 样品测试前的稀释倍数，计算出溶液中 NO 的含量。

1.5 细胞活性的测定

采用四甲基偶氮唑蓝比色法（MTT 法）。从各组培养孔中吸出 1 ml 细胞悬液，以 1 500 r/min 离心 5 min，将上清液吸出。往沉淀细胞中加入 DMEM/F12 培养基 200 μl，吹打成细胞悬液，再加入 5 g/l 的 MTT 溶液（Sigma 公司）20 μl，置 37℃50 ml/L CO_2 孵箱中继续孵育 4 h 后，1 500 r/min、离心 5 min，弃上清。每管中加入 150 μl 二甲基亚砜，振荡 10 min，酶联免疫检测仪（波长 490 nm）测定各孔吸光度值。

1.6 免疫细胞化学检测

细胞中Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达变化，瘢痕细胞传代后接种于预先铺好无菌玻片的培养皿中，分别加入 200 μmol/L SNP 和 10 μmol/L 美蓝，培养到细胞达 70%融合时，将玻片取出，进行特异性抗体Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达检测。免疫组化的检测严格参照说明书进行。

1.7 统计学方法

结果以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间均数比较用方差分析，两组比较采用 q 检验。$P<0.05$ 时被认为结果有显著性差异。

2 结 果

2.1 瘢痕疙瘩成纤维细胞培养

9 例手术切取的病理性瘢痕组织标本原代培养成纤维细胞全部成活，形态正常。

2.2 不同浓度 SNP 细胞培养上清液中 NO 含量

各实验组和对照组间 NO 浓度均有差异，各实验组 NO 浓度高于对照组（$P<0.05$），且各实验组之间，随着 SNP 浓度的增高，NO 的释放量也呈升高趋势。详见表 1。

2.3 SNP 对瘢痕成纤维细胞增殖的影响

经 SNP 作用 24 h 后，光镜下可见各实验组细胞数量较对照组明显减少，且随 SNP 浓度的增高，细胞数量有进一步减少趋势。详见图 1~3。各实验组与对照组之间吸光度值均数（A）有显著性差异（$P<0.05$），MTT 法检测显示，各实验组细胞活性要明显低于对照组。各实验组之间，随着 SNP 浓度的增高，细胞活力也有降低趋势。详见表 2。

2.4 鸟苷酸环化酶抑制剂对 SNP 作用后的瘢痕成纤维细胞增殖影响

MTT 法检测显示，实验组 C 吸光度值 A 低于对照组 A（$P<0.05$），但加入鸟苷酸环化酶抑制剂美蓝的实验组 E，A 值又有所上升（$P<0.05$），提示鸟苷酸

表 1 不同浓度 SNP 细胞培养上清液中 NO 含量

	A 组	B 组	C 组	D 组
SNP 浓度（μmol/L）	0	100	200	300
NO 浓度（μmol/L）	4.17 ± 0.23	72.51 ± 2.32*	89.67 ± 3.42*	114.35 ± 4.01*

注：* 和对照组相比，$P<0.05$

表 2 SNP 对瘢痕成纤维细胞增殖的抑制作用

	A 组	B 组	C 组	D 组
吸光度 A 值	0.68 ± 0.03	0.51 ± 0.02*	0.38 ± 0.02*	0.29 ± 0.01*

注：* 和对照组相比，$P<0.05$

环化酶抑制剂可以阻断 SNP 对瘢痕成纤维细胞增殖的抑制作用。详见表 3。

2.5 免疫细胞化学检测Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达

免疫细胞化学方法检测 200 μmol/L SNP 和 10 μmol/L 美蓝以及空白对照组细胞中Ⅰ、Ⅲ型胶原特异性抗体的表达。结果显示，SNP 作用后Ⅰ型胶原表达降低，而美蓝作用后Ⅰ型胶原表达增加，Ⅲ型胶原检测结果也有相同的变化（图 4~6）。

3 讨 论

病理性瘢痕包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩。病理改变上，瘢痕以真皮纤维化和间质胶原蛋白过度积聚为特征，并伴有炎性细胞侵润及真皮微血管异常。病理性瘢痕的产生与体内许多因子的异常有关[4,5]，而成纤维细胞是瘢痕形成、增生和挛缩的功能性细胞，其功能异常可直接导致病理性瘢痕的形成[6]。NO

表 3 美蓝对 SNP 抑制瘢痕成纤维细胞增殖的干预作用

	A 组	C 组	E 组
吸光度 A 值	0.68 ± 0.03	0.38 ± 0.02*	0.61 ± 0.03*△

注：* 和对照组 A 相比，$P<0.05$；△和实验组 C 相比，$P<0.05$

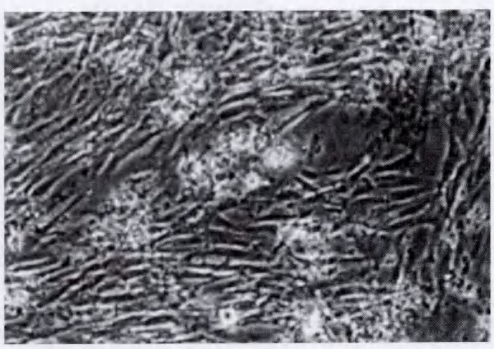


图 1 无 SNP 对照组的成纤维细胞培养（×40）



图 2 100 μmol/L SNP 的实验组 B 成纤维细胞培养（×40）

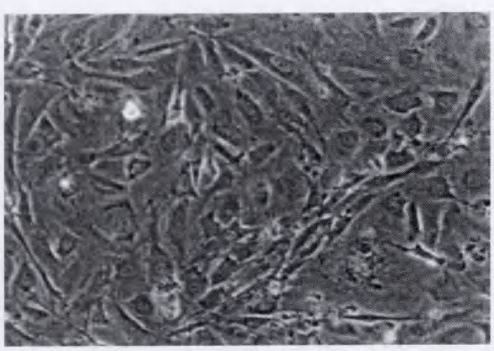


图 3 300 μmol/L SNP 的实验组 D 成纤维细胞培养（×40）

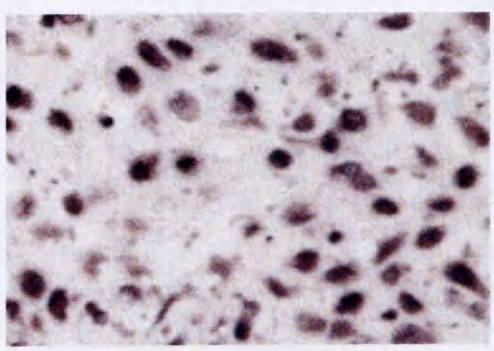


图 4 空白对照组Ⅰ型胶原表达情况（×100）

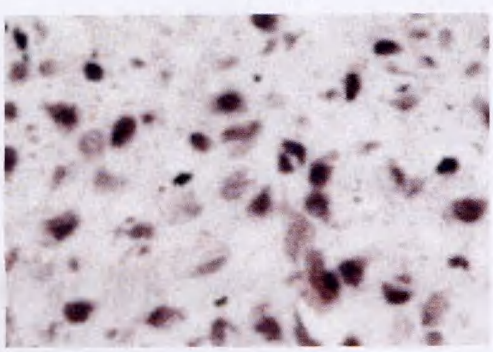


图 5 SNP 组Ⅰ型胶原表达有所减弱（×100）

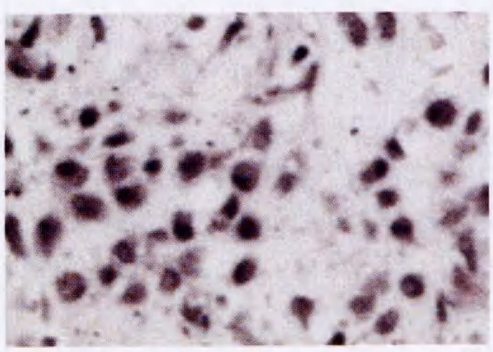


图 6 美蓝组Ⅰ型胶原表达又有增强（×100）

则可能在参与瘢痕组织中成纤维细胞的调节中起着重要作用。

NO 是具有高度生物活性的无机小分子。它是体内 L- 精氨酸(L-Arg)和分子氧在 NO 合成酶(NOS)的作用下产生的。王爱丽等[7]体外培养获得皮肤和瘢痕成纤维细胞,通过免疫组化及 RT-PCR 方法比较两种组织及细胞中 NOS 的表达及分布的差异,结果发现体外培养的人增生性瘢痕来源的成纤维细胞 NOS 表达和 NO 生成量较正常皮肤组织中明显减少。经 NOS 阻断剂 L-NAME 200 μmol/L 作用后,Ⅰ、Ⅲ型胶原表达显著增加。因此认为 NOS 表达降低可能与瘢痕增生密切相关。而阎国富[8]取瘢痕疙瘩、正常皮肤和非病理性瘢痕制作组织匀浆后用 Griess 试剂检测上清液中的亚硝酸盐和硝酸盐的含量,结果显示瘢痕疙瘩中 NO 的含量显著高于正常皮肤组和非病理性瘢痕组,而非病理性瘢痕组和正常皮肤组之间无显著性差异。NO 含量的增高可能是病理性瘢痕组织中微血管的阻塞导致组织中细胞因子较慢地被血流带走,也可能是机体抑制瘢痕产生的代偿。

本实验以 SNP 为供体,观察外源性 NO 对体外培养瘢痕成纤维细胞的作用。我们发现 SNP 浓度在 100~300 μmol/L 时,NO 的释放量随 SNP 浓度的增高而增加。说明 SNP 适合作为 NO 的供体来模拟其体内释放过程。同时我们也发现经 SNP 作用 24 h 后,光镜下可见各实验组细胞数量较对照组明显减少,且随 SNP 浓度的增高,细胞数量进一步减少。通过 MTT 法,各实验组细胞活性要明显低于对照组,并且实验组之间细胞活力也和 SNP 浓度有明显的相关性。这表明外源性 NO 对体外培养状态下瘢痕成纤维细胞有明显抑制作用。而仇树林等[9]通过建立大鼠创伤模型,并分别在创面局部应用 50 g/L 葡萄糖溶液、0.5~4 mmol/LSNP,观察及测量创伤后 3、7、10、14 d 的肉芽组织生长情况、NOS 的表达情况和肉芽组织中羟脯氨酸含量,结果发现局部应用外源性 NO 具有显著的促修复作用,主要体现在伤后第 7~10 d,小剂量的 NO 促进创面愈合的作用大于大剂量 NO。体内实验同样也证实外源性 NO 有抑制瘢痕形成的作用。但和本实验不同的是,抑制作用没有显示出剂量依赖性,考虑和本实验应用的 SNP 剂量范围较小有关。

对于 NO 产生生物效应的主要方式是:由 NOS 催化 L- 精氨酸生成内源性 NO,NO 与可溶性鸟苷酸环化酶结合,促使 GTP 转化成 cGMP,再激活 cGMP 依赖性的蛋自激酶,使蛋白质磷酸化而发挥生物学效应,即 NO-GC-cGMP 通路。本实验发现 SNP 对瘢痕成纤维细胞增殖的抑制作用可以被预先加入鸟苷酸环化酶抑制剂美蓝阻断。这表明 NO-GC-cGMP 的通路同样参与了 NO 抑制瘢痕成纤维细胞增殖过程。这一结果和 Yi-Chiang Hsu 等[10]的结果类似。

综上,我们的实验发现外源性 NO 对培养状态下瘢痕成纤维细胞有抑制作用,这其中可能有 NO-GC-cGMP 通路的参与。这提示临床应用 NO 供体药物对减少病理性瘢痕形成可能有较好的效果。

参 考 文 献

[1] Hiroshi I,Radharaman R,Prabhati R. Molecular approaches to promote wound healing in sulfur mustard exposed human keratinocytes in vitro:role of nitric oxide in wound healing[J]. FASEB J,2008,22: 835-834.

[2] Greg S,Joyce S. Wound healing and nitric oxide production: too little or too much may impair healing and cause chronic wounds[J]. international journal of lower extremity wounds,2006,5:6-8.

[3] Luo J D,Chen A F. Nitric oxide:a newly discovered function on wound healing[J]. Acta Pharmacologica Sinica,2005,26:259-264.

[4] 董茂龙,陈 璧,徐明达,等.PDGF-AB 对人正常皮肤和增生性瘢痕成纤维细胞胶原网收缩影响的差异[J]. 第四军医大学学报,2005,26(3):226-228.

[5] 章建林,林子豪,江 华,等.增生性瘢痕组织中 TNF-α 基因的表达及其意义[J]. 第二军医大学学报,2005,26(1):48-50.

[6] Lim I J,Phan T T,Bay B H,et al. Fibroblasts cocultured with keloid keratinocytes:normal fibroblasts secrete collagen in a keloid-like manner[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2002,283: 212-222.

[7] 王爱丽,杨 平,徐 顺,等.一氧化氮合酶对增生性瘢痕的影响[J]. 中国临床医学,2008,15(1):84-88.

[8] 阎国富,何 威,刘荣卿.瘢痕疙瘩组织中一氧化氮含量测定[J]. 中国皮肤性病学杂志,2000,14(3):147.

[9] 仇树林,张培培,李 兵,等.外源性一氧化氮对创伤愈合过程中一氧化氮合酶表达及瘢痕形成的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(14):2652-2656.

[10] Hsu Y C, Hsiao M,Yie W,et al. Exogenous nitric oxide stimulated collagen type I expression and TGF-β1 production in keloid fibroblasts by a cGMP-dependent manner[J]. Nitric Oxide, 2007,16:258-265.

(责任编辑:冉明会)