DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.12.012

论著

文章编号:1000-5404(2003)12-1056-03

重组正反义α-SMA逆转录病毒载体对瘢痕与皮肤成纤维细胞的影响

王珍祥,吴 军,易绍萱,陈希炜,李世荣 (第三军医大学附属西南医院整形外科,重庆 400038)

提 要:目的 利用α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)基因重组反义和正义逆转录病毒载体,探讨α-SMA逆转录病毒对瘢痕与皮肤成纤维细胞的影响。方法 用含α-平滑肌肌动蛋白cDNA,重组反义和正义逆转录病毒载体,并感染培养的瘢痕和皮肤成纤维细胞,进行α-SMA在蛋白水平表达等的研究,观察瘢痕与皮肤成纤维细胞形态学与功能的变化。结果 反义α-SMA逆转录病毒抑制了瘢痕成纤维细胞的增殖,细胞形态变小;α-SMA在瘢痕与皮肤成纤维细胞表达降低,并随着作用时间延长,效果更明显;正义α-SMA逆转录病毒则具有相反的作用,促进α-SMA的表达。结论 α-SMA重组病毒对瘢痕与皮肤成纤维细胞的形态、生长、细胞功能均有影响。

关键词:逆转录病毒;转染;α-平滑肌肌动蛋白;成纤维细胞
中图法分类号:R394-33;R373;R619+.6 文献标识码:A

Effect of recombinant sense and antisense α-SMA retroviral vector on fibroblasts isolated from scar tissue and skin

WANG Zhen-xiang, WU Jun, YI Shao-xuan, CHEN Xi-wei, Li Shi-rong (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of transfection recombinant sense and antisense α-smooth muscle actin (α-SMA) gene on fibroblasts from the scar and skin retrovirus. Methods A recombinant sense and antisense α-SMA cDNA was obtained using gene recombinant technique to clone the α-SMA cDNA to vector, and then transfected into cultured fibroblasts from the scar and skin. The cellular morphology and gene expression of sense and antisense α-SMA in them were observed by immunofluorescent method. Results The recombinant antisense α-SMA retrovirus inhibited fibroblast proliferation and reduced the volumes of cells. The expression of α-SMA in the fibroblasts decreased in a time-dependent manner. However, the recombinant sense α-SMA retrovirus had an opposite function to that of antisense α-SMA. Conclusion Recombinant sense and antisense α-SMA retrovirus can affect the morphology, growth and cell function of the fibroblasts from the hypertrophic scar and skin.

Key words: retrovirus; transfection; α-smooth muscle actin; fibroblast

成纤维细胞是瘢痕形成与发展的主要细胞成分,而肌成纤维细胞是一种假定的成纤维细胞的亚型,即含有α-肌动蛋白同分异构体的张力丝出现。α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)已被认为是肌成纤维细胞最有用的标志之一,并且长期以来它也一起被视为是肉芽组织和瘢痕收缩机制的重要结构基础[1,2]。对肌成纤维细胞中α-SMA的调节有望改善瘢痕肌成纤维细胞的功能,达到减轻瘢痕收缩的目的。本研究利用含α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)cDNA,重组反义和正义逆转录病毒载体,并感染培养的瘢痕与皮肤成纤维细胞,进行α-SMA在蛋白水平表达的研究,评价α-SMA逆转录病毒对瘢痕与皮肤成纤维细胞的影响,为基因治疗提供新的工具。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

本室用含人类α-SMA cDNA目的片段的pBS/SK质粒与载体pLXSN质粒构建反义和正义逆转录病毒载体,分别命名为正义重组子pLXSN/s-SMA和反义重组子pLXSN/αs-SMA(另文报道);鼠抗人α-平滑肌肌动蛋白的单抗购自北京中山公司;FITC标记IgG(1∶100)购自Sigma公司。

1.2 方法与步骤

1.2.1 正常皮肤消化法细胞原代培养 将皮肤块剪成1 mm×1 mm×1 mm大小组织块,取30 ml消毒三角瓶,放入组织块,

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054204)
作者简介:王珍祥(1966-),男,湖北省黄州市人,博士,主治医师,主要从事瘢痕与神经再生方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754000-73091
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006
收稿日期:2002-11-20;修回日期:2003-02-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加入 10 ml 0.25%胰蛋白酶, 在 37 ℃、150 r/min 恒温摇床上振荡 1 h, 血清中止消化, 收集上清液; 再在三角瓶中加入 8 ml 10%含血清的 DMEM, 按上述条件, 在摇床上振荡 1 h, 收集上清液。将两种上清液转入离心管离心(800 r/min, 5 min)使细胞沉淀, 弃上清。又在离管中加入 10%含小牛血清 DMEM, 吹散沉淀细胞, 转入培养瓶, 在 37 ℃, 5% CO_2 培养箱孵育。部分细胞贴壁生长, 每 2~3 天换液。

1.2.2　应用组织块法瘢痕组织成纤维细胞的原代培养　取瘢痕组织(离体后 4 h 内), 修除表皮和皮下组织, 在少量小牛血清中剪碎, 组织块(0.5~1 mm^3)接种于培养瓶, 在 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养 4~5 h, 使组织块较牢固地粘附于瓶壁, 然后加入含 10%小牛血清的 DMEM 适量, 继续培养, 每 3 天换液 1 次。3~4 周后, 原代培养细胞生长成细胞单层, 用 0.25%胰蛋白酶消化后, 按 1∶2 的比例分种传代培养, 第 3 天用含 10%小牛血清的 DMEM 换液 1 次, 每 4~5 天继续分种传代 1 次, 实验用第 2~5 代细胞。

1.2.3　将处于对数生长后期、形态良好的成纤维细胞用 0.25%胰蛋白酶消化, 加在消毒处理的盖玻片上, 继续培养 3~5 d 至细胞长满盖玻片。

1.2.4　逆转录病毒感染培养成纤维细胞　取病毒上清 200 μl, 滴加在 50%~60%融合的培养成纤维细胞上, 37 ℃, 5% CO_2 孵箱中培养 3 h, 补充培养液继续培养。

1.2.5　体外实验分组　每组 6 孔细胞。正常皮肤成纤维细胞实验: ①对照组: 皮肤培养的正常成纤维细胞; 反义组: 培养成纤维细胞+ pLXSN/αs-SMA; 正义组: 培养成纤维细胞+ pLXSN/s-SMA。②瘢痕培养成纤维细胞实验: 对照组: 培养的瘢痕成纤维细胞; 反义组: 培养的瘢痕成纤维细胞+ pLXSN/αs-SMA; 正义组: 培养的瘢痕成纤维细胞+ pLXSN/s-SMA。

1.2.6　免疫荧光染色: ①盖玻片入 0.01 mol/L PBS 中漂洗 5 min×3 次; ②3% H_2O_2 室温下 30 min; ③0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次; ④1% Triton X-100, 室温 30 min; ⑤0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次; ⑥10%羊血清 37 ℃, 30 min; ⑦一抗, 于孵育板内 37 ℃孵育 1 h 后, 转入 4 ℃, 24 h; ⑧0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次; ⑨FITC 标记 IgG(1∶100), 37 ℃ 1 h; ⑩0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次; ⑪荧光显微镜激发后观察。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 行单因素方差分析。

2　结果

2.1　反义和正义 α-SMA 逆转录病毒对培养的瘢痕成纤维细胞的影响

未感染病毒体外培养的瘢痕成纤维细胞胞体呈梭形, 细胞为对数增殖, 贴壁生长; 抗α-SMA 荧光免疫细胞化学染色部分细胞为阳性。

pLXSN/αs-SMA 组感染体外培养的瘢痕成纤维细胞后, 见成纤维细胞的胞体缩小, 呈不规则形为主, 突起短, 缺乏典型的培养成纤维细胞的形态; 荧光免疫细胞化学染色变浅, 相对荧光强度降低, 荧光由原来的充满整个胞浆变为仅呈区域分布。病毒孵育 24 h, 成纤维细胞内的荧光仍有一定的强度; 72 h 后, 细胞内的荧光非常微弱。

pLXSN/s-SMA 组感染体外培养的瘢痕成纤维细胞后, 见成纤维细胞的胞体大, 突起长, 相互间的分支连接增多, 呈培养成纤维细胞的形态典型; 抗α-SMA 荧光免疫细胞化学染色强, 相对荧光强度升高, 整个细胞浆被荧光充满, 见图 1; 病毒孵育 24 h 与 72 h 相比, 后者信号更强, 但差别不大, 见表 1。



图 1　pLXSN/s-SMA 组感染瘢痕成纤维细胞 α-SMA 荧光染色　(×200)

Fig 1　Fluorescent results of transfected fibroblasts from scar in pLXSN/s-SMA　(×200)

表 1　两种病毒对瘢痕成纤维细胞 α-SMA 荧光染色的影响(A, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of two retroviruses on fluorescent results of fibroblasts from scar(A, $\bar{x}\pm s$)

	Untreated	αs-SMA	s-SMA
24 h	214.0±17.2	125.1±7.4※※△	225.7±19.3
72 h	173.3±15.4	81.4±5.3※※	203.8±18.2

※※: $P<0.01$ *vs* untreated; △: $P<0.05$ *vs* 72 h

2.2　反义和正义 α-SMA 逆转录病毒对培养的正常皮肤成纤维细胞的影响

未感染病毒体外培养的皮肤成纤维细胞胞体呈梭形, 细胞贴壁生长; 抗α-SMA 荧光免疫细胞化学染色细胞极少为阳性, 信号微弱。

pLXSN/s-SMA 逆转录病毒上清感染正常皮肤成纤维细胞, 细胞的形态与增殖速度变化不大, 但抗 α-SMA 荧光免疫细胞化学发现较多的细胞出现荧光染色, 而且随着时间延长, 荧光强度有所增强, 阳性细胞的比例增加; pLXSN/αs-SMA 病毒上清感染正常成纤维细胞, 培养细胞的差别不明显。抗 α-SMA 荧光免疫细胞化学, 没有肌成纤维细胞的微丝结构和荧光阳性出现, 细胞保持正常皮肤和非增生性瘢痕的特点, 见表 2。

表 2　两种病毒对皮肤成纤维细胞荧光染色 α-SMA 的影响(A, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of two retroviruses on fluorescent results of fibroblasts from skin(A, $\bar{x}\pm s$)

	Untreated	αs-SMA	s-SMA
24 h	50.2±4.6	31.6±4.1※※	135.3±13.9※※
72 h	51.5±4.8	0※※	241.5±22.7※※△△

※※: $P<0.01$ *vs* untreated; △△: $P<0.01$ *vs* 24 h

3　讨论

肌成纤维细胞被认为具有成纤维细胞和平滑肌细胞的某些特征, 而 α-肌动蛋白通常在平滑肌细胞中出

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

现。肌成纤维细胞在光镜下为梭形或长扁形细胞，不易与成纤维细胞区别，它的形态主要由电镜观察来鉴别。特点是：①胞内有发育良好的微丝束，微丝与细胞长轴平行，直径为 6～8 nm，并与胞膜附着点形成致密斑；②胞内有丰富粗面内质网及高尔基体，靠近胞膜有大量的吞饮小体；⑧细胞核不规则，常出现凹痕和深陷的褶；④表面分化良好，有桥粒或裂隙连接。免疫荧光标记可看到，在伤口愈合开始的第 6 天出现微丝，12～15 d 达高峰，相当于肉芽组织最大收缩的时候，以后微丝逐渐减少，30 d 伤口组织中微丝消失。电镜观察结果一致。肌成纤维细胞之间通过裂隙连接聚合在一起，位于伤口边缘的肌成纤维细胞则通过纤维连接体使肌成纤维细胞内的微丝与细胞外基质中的粘连蛋白紧密结合[3～5]。组织损伤后，可见成纤维细胞反应性增生，细胞器增生、扩大，随后靠近细胞表面的皮质微丝发育，并排列成束为张力纤维。此成纤维细胞逐渐转变成典型的肌成纤维细胞，成为肉芽组织中的主要细胞成分。它们彼此及对周围基质的牵拉可维持数小时，这就允许增生的胶原重新排列，然后胶原沉积，伤口闭合。在此过程中，肌成纤维细胞还有合成胶原的作用，主要是 II型胶原。当肉芽组织开始发生收缩时，肌成纤维细胞常与 II型胶原同时出现，而在伤口愈合后，肌成纤维细胞消失时，I 型胶原则替代 III型胶原，并与基质的粘多糖融合，形成坚硬固定的结构，即瘢痕组织，在创口肉芽组织中，肌成纤维细胞数量与分布变化符合伤口收缩率，肌成纤维细胞持续出现是典型的异常愈合[6,7]。

反义技术。pLXSN /αs-SMA：反义核酸技术是根据核酸杂交原理设计选择性抑制特定基因表达为目的的新技术反义技术的机制尚未完全搞清。我们利用的是 α-SMA cDNA 的全长，理论上能够完全阻断在体损伤局部内源性的 α-SMA 表达，利用浓缩的病毒悬液克服了病毒滴度不很高的问题，满足了实验需要，从实验观测到的结果十分显著。反义寡核苷酸治疗具有高度特异性，是一种改变肿瘤和病毒感染性疾病中操纵基因表达的治疗方法。随着快速基因克隆、测序技术及快速自动 DNA 化学合成技术的出现，反义药物的研究和应用才真正广泛开展[8]。

pLXSN /s-SMA 的作用：经过包装分泌的上清含带有 SMA 开放阅读框（Open reading frame，ORF）的缺陷逆转录病毒颗粒，注入损伤局部后，感染正在分裂的胶质前体细胞，并随机整合到被感染细胞的基因组中，从而使 SMA 的细胞表现型增强。当然，如何将特定基因定向整合到固有的基因组或染色体位点，且使其表达，是今后基因功能研究的方向之一。

重组正、反义 α-SMA 道转录病毒对成纤维细胞具有调节作用。成纤维细胞是增生性瘢痕组织中的主要功能细胞之一，在创伤愈合及过度修复初期更是最多的功能细胞。这种成纤维细胞具有异质性，即有多种显型，其中向肌成纤维细胞的转变与创面收缩关系最为密切。通过抗 α-SMA 的抗体，可以直观地检测出这种表型的变化，即 α-SMA 阳性细胞即为肌成纤维细胞。

在实验中，反义 α-SMA 义转录病毒抑制了瘢痕成纤维细胞的增殖，细胞形态变小，功能也同时降低，细胞膜也有一定的改变；通过免疫荧光检测作用 24 h 后比例下降，细胞荧光亮度减弱，阳性面积减少，而 72 h，肌成纤维细胞内荧光非常微弱，阳性细胞形态不完整，胞体也小，但仍未能完全抑制。免疫细胞化学结果大致相同，胞体内微丝结构由强变弱，胞体由大变小信号非常低，但未完全抑制。同时，正向 α-SMA 逆转录病毒则具有相反的作用，促进该基因的表达。更有意义的是，正向 α-SMA 可以使本来表达水平低数量少的皮肤成纤维细胞转向肌成纤维细胞，具有这种细胞的结构及功能特点。以上结果变化说明，反、正义 α-SMA 逆转录病毒调控了 α-SMA 的表达，正向重组子起到上调作用，而反向者则下调。但这种下调不完全，其意义在于，它抑制了 α-SMA 基因表达同时，仍保留部分功能，便于创面保持一定水平收缩状态，维持生理性愈合。

参考文献：

[1] Afore P I, Mecullorch A G. Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts[J]. J Cell Physiol, 1994, 159(1): 161－163.

[2] 汪 琴，吴家辉. 肌成纤维细胞凋亡与肥厚性瘢痕消退的关系[J]. 第三军医大学学报，1999，21(3)：190－192.

[3] Masur S K, Dewel H S, Dinh T T, *et al*. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(9): 4219－4223.

[4] Grinell L. Fibroblasts, myofibrohlasts and wound contraction[J]. J Cell Biol, 1994, 127(4): 401－405.

[5] Rudolph R. Myobroblastic phenotype induction by transforming growth factor-13[J]. J Cell Biol, 1998, 143(3): 873－875.

[6] Funk W D, Wang C K, Shelton D N, *et al*. Telomerase expression restores dermal integrity to *in vitro*-aged fibroblasts in a reconstituted skin model [J]. Exp Cell Res, 2000, 258(2): 270－278.

[7] Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, *et al*. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype[J]. J Biol Chem, 2001, 276(39): 36575－36585.

[8] 陈云弟. 反义基因治疗[J]. 生物工程进展，2000，20(3)：23－25.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net