DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.042
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
594 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0594-03

TGF-β_1对增生性瘢痕成纤维细胞中c-myc和c-fos表达及胶原分泌的影响

毋巨龙[1],李荟元[2],李世荣[1] ([1]第三军医大学附属西南医院整形康复中心,重庆 400038,[2]第四军医大学西京医院整形外科中心,西安 710033)

提 要:目的 了解TGF-β_1对增生性瘢痕成纤维细胞中癌基因c-myc和c-fos的表达及胶原分泌的影响,探讨瘢痕增生机制。方法 烧伤患者增生性瘢痕6例标本,通过细胞培养研究了TGF-β_1对增生性瘢痕成纤维细胞癌基因c-myc和c-fos的表达(免疫组织化学和图像分析方法)及胶原分泌(^{3}H-脯氨酸法)的影响。结果 TGF-β_1可显著提高增生性瘢痕成纤维细胞癌基因c-myc和c-fos的表达,图像分析结果面密度(c-myc:0.0687±0.0072 *vs* 0.0141±0.0016,$P<0.01$;c-fos:0.0529±0.0048 *vs* 0.0223±0.0021,$P<0.01$);平均灰度(c-myc:3340±462 *vs* 1120±232,$P<0.01$;c-fos:1402±286 *vs* 605±79,$P<0.01$);积分吸光度[c-myc:2.0±0.3 *vs* -(1.5±0.2),$P<0.01$;c-fos:3.3±0.4 *vs* -(1.3±0.1),$P<0.01$]等指标经统计学处理与对照组有显著性差异;TGF-β_1可促使增生性瘢痕成纤维细胞合成分泌胶原率提高2.0倍($P<0.01$)。结论 TGF-β_1可能是通过癌基因c-myc和c-fos的表达而促进增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成分泌增加。

关键词:增生性瘢痕;成纤维细胞;癌基因;胶原
中图法分类号:R392.11;R394.3;R619.6 文献标识码:A

Effects of TGF-β on c-myc and c-fos expressions and collagen syntheses of fibroblasts from hypertrophic scar *in vitro*

WU Ju-long, LI Hui-yuan, LI Shi-rong (Center of Plastic Surgery and Rehabilitation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of TGF-β_1 on the expressions of c-myc and c-fos genes and the synthesis of collagen of fibroblasts in hypertrophic scar and to explore the mechanism of pathogenesis of hypertrophic scar. Methods Six samples of hypertrophic scar were collected to isolate fibroblast cells. Cultured cells was used to investigate the effects of TGF-β_1 on the expressions of c-myc and c-fos and on the synthesis of collagen. Results TGF-β_1 significantly increased the expressions of c-myc and c-fos by morphometric analyses, including area density, gray level value, and integral absorbance. It also elevated by 2 times the synthesis of collagen of fibroblasts cell in hypertrophic scar. Conclusion TGF-β_1 induces an increase of the synthesis of collagen through activating the expression of c-myc and c-fos in the pathogenesis of hypertrophic scar.

Key words: hypertrophic scar; fibroblasts; oncogene; TGF-β_1

增生性瘢痕(Hypertrophic scar HS)的发生机制尚未完全清楚[1,2],转化生长因子β(TGF-β)可以促进胶原合成和减少胶原降解,从而促进细胞外基质堆积,TGF-β_1 mRNA和TGF-β_1蛋白在HS中表达增高,并和Ⅰ,Ⅲ前胶原mRNA平行表达增高[3,4],TGF-β在瘢痕形成中起重要作用。TGF-β致细胞外基质堆积可能是通过癌基因编码的核蛋白转录因子起作用的[5,6],原癌基因c-myc和c-fos的表达与细胞生长,分化和启动细胞的增殖活性密切相关。我们通过离体增生性瘢痕组织中成纤维细胞培养,研究了TGF-β_1对胶原合成和癌基因表达的影响,以探讨瘢痕增生机制。

1 材料和方法

1.1 材料

深度烧伤后增生性瘢痕6例,局部有瘙痒,潮红,高出皮肤,触之较硬,瘢痕增生局限于皮损区,部位包括面部、上肢和下肢,时间在创伤愈合后5~18月,男4例,女2例,年龄16~45岁。瘢痕患者均因要求改善外观解除症状而进行手术,取材前都向患者说明目的并征得同意。

1.2 方法

取新鲜无菌HS组织去掉表皮和皮下脂肪后,用生理盐水冲洗,剪成直径小于0.5 mm的小碎块,接种于直径为60 mm的培养皿中,每个培养皿加4 ml含100 ml·L^{-1}小牛血清的DMEM培养液(Dulbecco's modified Eaglemedium)在50 ml·L^{-1}CO_2,37 ℃的细胞培养孵箱中培养,每周换液2次。待成纤维细胞长满瓶底后,用2.5 g·L^{-1}胰酶消化后传代,转移到75 cm^{2}培养瓶中培养,每3~5 d传代1次,4~6代成纤维细胞用于胶原合成和癌基因表达研究。将传代后细胞经2.5 g·L^{-1}胰酶消化后计数,接种于24孔板,每孔含细胞数为2×10^4。加TGF-β_1前4 h将培养液更换为含10 ml·L^{-1}小牛血清的DMEM,然后实验组加含10 ml·L^{-1}小牛血清的DMEM,TGF-β_1 10 μg·L^{-1},^{3}H-脯氨酸185 MBq·L^{-1},抗坏血酸50 mg·L^{-1},β-氨基丙腈延胡索酸50 mg·L^{-1},对照组不加TGF-β_1,每孔液体总量均为1 ml,培养24 h后,取培养液,装透析袋,透析24 h,更换3次透析液,各组取5个样本,每个样本取200 μl,闪烁计数1 min,测定每个样本Bq值,即

作者简介:毋巨龙(1965-),男,山西省晋城市人,硕士,主治医师,主要从事瘢痕发生机制方面的研究。电话:(023)65410784

收稿日期:2001-12-01;修回日期:2002-03-20

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

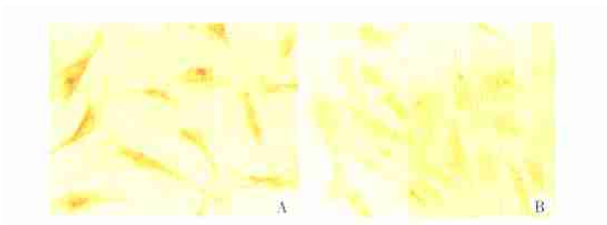
代表合成分泌的胶原量。将传代后细胞经 2.5 g·L^{-1}胰酶消化后计数, 接种于 96 孔板, 每孔含细胞数为 0.5× 10^4, 加 TGF-β1 前 4 h 将培养液更换为含 10 ml·L^{-1}小牛血清的 DMEM, 然后实验组加含 10 ml·L^{-1}小牛血清的 DMEM, TGF-β1 10 μg·L^{-1}, 对照组加含 10 ml·L^{-1}小牛血清的 DMEM, 液体总量为 0.3 ml, 培养 8 h 后, 去掉培养液, 生理盐水冲洗 3 次, 40 ml·L^{-1}多聚甲醛固定培养细胞 24 h, 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法免疫组织化学法行 c-myc 和 c-fos 免疫组化染色, 染色后做图像分析。培养 HS 成纤维细胞免疫染色照片后, 每组任取 5 个视野, 分别测定目标总个数、总面积、统计场总面积, 以面密度、平均灰度, 积分吸光度为指标进行半定量分析。

1.3　统计学处理

图像分析及胶原合成分泌量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 t 检验。

2　结果

培养的成纤维细胞内胞核及胞质均有 c-myc 和 c-fos 蛋白阳性分布, 但 TGF-β1 实验组中着色浓, 密度高, 见图 1, 2。



A: Strong positive staining in TGF－β1 group; B: Weak positive staining in control group

图 1　成纤维细胞 c-myc 染色　(IHC× 400)

Fig 1　c-myc positive fibroblasts　(IHC× 400)



A: Strong positive staining in TGF－β1 group; B: Weak positive staining in control group

图 2　成纤维细胞 c-fos 染色　(IHC× 400)

Fig 2　c-fos positive fibroblasts　(IHC× 400)

2.1　HS 成纤维细胞胶原合成

经 TGF-β1 处理后成纤维细胞合成胶原比对照组提高 2.0 倍(P< 0.01), 见图 3。

2.2　HS 成纤维细胞 c-myc 和 c-fos 表达

实验组和对照组 HS 成纤维细胞胞质、胞核内都有 c-myc 和 c-fos 蛋白产物阳性分布, 将对照组和 TGF-β1 处理组免疫染色进行图像分析, 选取积分吸光度, 面密度和平均灰度做指标, TGF-β1 刺激 c-myc 和 c-fos 蛋白表达显著增高, 见表 1。

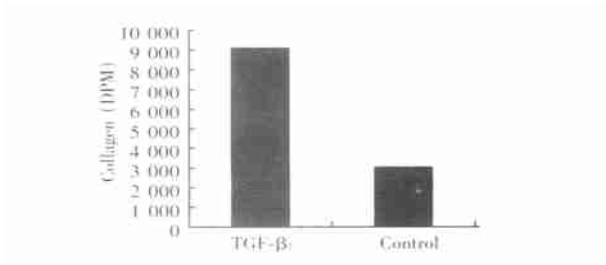


图 3　TGF-β1 对培养 HS 成纤维细胞胶原合成的影响

Fig 3　Effect of TGF-β1 on the synthesis of collagen of fibroblasts derived from hypertropic scar

表 1　TGF-β1 实验组与对照组 c-myc, c-fos 图像分析结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Image analysis of effect TGF-β1 on the expression of c-myc and c-fos cells in the fibroblasts($\bar{x} \pm s$)

Protein	Group	Area density (pixel/μm^2)	Grey level value	Integral absorbance
c-myc	TGFβ1	0.0687±0.0072 *	3 340±462 *	2.0±0.3 *
	Control	0.0141±0.0016	1 120±232	－(1.5±0.2)
c-fos	TGFβ1	0.0529±0.0048 *	1 402±286 *	3.3±0.4 *
	Control	0.0223±0.0021	605±79	－(1.3±0.1)

*: P< 0.01 *vs* it own control

3　讨论

早期基因 c-myc 和直接早期基因 c-fos 都是编码核蛋白的癌基因。它们的产物具有转录调节作用、介导细胞由静止期向增殖期转化, 并在伤口愈合中起作用。c-myc 在成纤维细胞中表达明显增高, 推测可能与成纤维细胞激活有关。我们在另外的实验结果显示 c-myc 和 c-fos 蛋白产物主要分布于基底层细胞, 血管内皮细胞以及增生性瘢痕组织的成纤维细胞中, c-myc 和c-fos 的表达可能与这些细胞功能有关。成纤维细胞是皮肤伤口愈合和瘢痕增生的关键细胞, c-myc 和 c-fos 在 HS 组织中强阳性表达, 提示它们的表达可能在瘢痕增生中起重要作用。TGF-β1 可能是通过自分泌或旁分泌方式刺激胶原合成, TGF-β1 持续存在于基质中不断地刺激胶原合成。在烧伤后瘢痕组织中, Ⅰ, Ⅲ型胶原和 TGF-β1 mRNA 平行地表达增高。在瘢痕疙瘩组织中, Ⅰ, Ⅵ型胶原和 TGF-β1 mRNA 平行表达, 并有相同的分布, 表明在 HS 组织中持续存在着有较高水平的 TGF-β, 它不断地刺激 c-myc 和 c-fos 的表达, 并促进胶原的合成, 致使瘢痕增生。本结果显示 TGF-β1 可促使胶原合成分泌率提高 2.0 倍, 同时可大大提高 c-myc 和 c-fos 表达。

然而 TGF-β 是通过什么机制影响上述基因转录的对此尚未完全弄清楚。推测本实验 TGF-β1 致胶原合成分泌增高的机制可能是: TGF-β1 和成纤维细胞表面受体结合, 信号传导至核内导致 c-myc 和 c-fos 表达增高。它们的蛋白产物形成 AP－1 复合物或单独发挥转

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

录调节作用，使胶原基因表达增高，胶原合成分泌增加。

参考文献：

[1] 王 臻，郭树忠，张琳西，等. 增生性瘢痕组织中血管形成的形态学[J]. 第四军医大学学报，2001，22(17)：1 612－1 614.

[2] 李永林，陈 璧，徐明达. 烧伤后创面成纤维细胞的转归规律及其与瘢痕形成的关系[J]. 第四军医大学学报，1999，20(5)：434－436.

[3] Wang R, Ghahary A, Hypertr Shen Q, *et al*. ophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-beta1 mRNA and protein than normal skin and cells[J]. Wound Repair Regen, 2000, 8(2): 128－137.

[4] Wang X, Smith P, Pu L L, *et al*. Exogenous transforming growth factor beta(2) modulates collagen Ⅰ and collagen Ⅲ synthesis in proliferative scar xenografts in nude rats[J]. J Surg Res, 1999, 87(2): 194－200.

[5] Chodon T, Sugihara T, Igawa H H, *et al*. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance[J]. Am J Pathol, 2000, 157(5): 1 661－1 669.

[6] Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, *et al*. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars[J]. J Dermatol Sci, 1999, 22(1): 31－37.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)05-0596-01

低能量氦氖(He-Ne)激光对贮存血液流变特性的影响

Sequential analyses on influence of low-energy He-Ne laser on hemorheology characteristics of stored blood

袁 玲[1]，陈方祥[1]，陈 钧[1]，胡 波[2]（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所：[1]输血科；[2]检验科；重庆 400042）

血液随着保存时间的延长会发生一系列的变化，从而给输入大量库存血的患者身体带来一些不利的影响，在这一系列变化中，血液流变学的变化是重要因素之一[1]，我们通过对低能量He-Ne激光照射后各时间段的指标测定，观察了He-Ne激光照射对血液流变学的影响。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

采用LH 801小功率氦氖激光（北京光电技术研究所生产）作血液照射，FASCO全自动粘度快测仪（重庆大学维多生物工程研究所研制）作指标测定。

1.2 实验操作及标本留取

采用ACD液，采血样（合格献血员）4份，每份200 ml，各分为4袋（50 ml/袋），2袋为照射组，2袋为对照组，共计（200 ml×4袋）对照组8袋、照射组8袋，置4 ℃专用储血冰箱（日本三洋）。

照射组于采血后连续5 d进行He-Ne激光血袋内照射，波长632.8 nm，输出功率：光针输出3 mW，室温下照射90 min，对照组同时取出放置室温下。

分别于采血后当天（下称0 d）、第3、7、14、21天留取标本作实验室检查。

1.3 测定项目

全血粘度：高切（200/s）、中切（30/s）、低切（3/s）；血浆粘度；红细胞压积；红细胞聚集指数；全血还原粘度；红细胞变形指数。

1.4 统计学方法

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示，各观察点与A值的比较用t检验分析，对照组与照射组的比较用配对t检验。

2 结果

2.1 全血粘度与血浆粘度的变化

照射组全血粘度高切、中切、低切均有显著变化。①全血粘度高切值：和0 d比，照射组各观察点均显著下降（$P<0.01$），对照组除3 d外各测定点较0 d有显著升高（$P<0.05$），照射组和对照组相比3、14、21 d有非常显著的差异（$P<0.01$），7 d相差显著（$P<0.05$）。②全血粘度中切：对照组和0 d比除3 d外粘度升高明显（$P<0.05$），照射组3、7、0 d比下降明显（$P<0.05$），照射组和对照组比，3、14、21 d有非常显著的差异（$P<0.01$），7 d相差显著（$P<0.05$）。③全血粘度低切：对照组和0 d比除3 d无显著变化外，其它各点均升高非常明显（$P<0.01$），照射组和0 d比3 d、7 d下降明显（$P<0.05$），14 d、21 d无明显差异，对照组和照射组比差异非常显著（$P<0.01$）。④血浆粘度有明显下降，和对照组比，7 d变化更显著（$P<0.01$）。⑤全血还原粘度照射组14 d，21 d较0 d有显著下降（$P<0.05$和0.01）。

2.2 红细胞的变化

2.2.1 红细胞压积 照射组有所下降，14、21 d较0 d和对照组变化显著（$P<0.05$），这可能与反复内照射、摇动引起轻度溶血有关。

2.2.2 红细胞变形指数 照射组从0.89±0.09上升到1.12±0.08，与0 d及对照组比除3天外其他相差非常显著（$P<0.01$）。

2.2.3 红细胞聚集指数 He-Ne激光照射对红细胞聚集指数的影响是明显的，照射组和0 d及对照组比均下降显著（$P<0.05$）。

作者简介：袁 玲（1964－），女，四川省宜宾市人，主管技师。电话：(023) 68757221

收稿日期：2000-09-22；修回日期：2001-08-14

（下转599页）

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