

碱性成纤维细胞生长因子与瘢痕成纤维细胞 I、III型胶原蛋白的代谢☆

谢举临¹, 卞徽宁², 李厚东¹, 舒斌¹, 祁少海¹, 唐锦明¹, 徐盈斌¹, 利天增¹, 刘旭盛¹

Basic fibroblast growth factor and metabolism of I and III collagen protein in scar fibroblasts

Xie Ju-lin¹, Bian Hui-ning², Li Hou-dong¹, Shu Bin¹, Qi Shao-hai¹, Tang Jin-ming¹, Xu Ying-bin¹, Li Tian-zeng¹, Liu Xu-sheng¹

Abstract

BACKGROUND: Studies have confirmed that basic fibroblast growth factor (bFGF) can promote wound surface healing. Scholars have paid great attention on whether bFGF can induce fibroblastic proliferation and lead to scar hyperplasia during wound surface healing.

OBJECTIVE: To investigate the regulatory effects of bFGF on the synthesis and degradation of fibroblast I and III collagen protein.

METHODS: Hyperplastic scar tissue was obtained from patients undergoing scar plasty at the Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University. Fibroblasts of scar tissue were cultured by tissue block method. The second passage of cells was collected. Effects of bFGF (0-500 µg/L) on synthesis and secretion of I and III collagen protein and cell matrix metalloproteinase 1 in scar-derived fibroblasts were measured by chloramines T, RT-PCR and Western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: bFGF stimulation had no effect on hydroxyproline, I and III collagen protein mRNA expression. Low mass concentration of bFGF did not affect cell matrix metalloproteinase 1 expression, but cell matrix metalloproteinase 1 expression was increased with increased mass concentration of bFGF, especially 50, 100, 500 µg/L groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Simultaneously, changes in cell matrix metalloproteinase 1 expression were identical in cells and supernatant. Results have suggested that high mass concentration of bFGF contributes to degradation of collagen protein by increasing cell matrix metalloproteinase 1 synthesis, resulting in avoiding excessive deposition of extracellular matrix.

Xie JL, Bian HN, Li HD, Shu B, Qi SH, Tang JM, Xu YB, Li TZ, Liu XS. Basic fibroblast growth factor and metabolism of I and III collagen protein in scar fibroblasts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41): 7657-7660. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究证实碱性成纤维细胞生长因子有促进创面愈合的作用, 然而其在促进创面愈合的同时是否会引起成纤维细胞的增殖而导致瘢痕增生已受到学者的广泛关注。

目的: 探讨碱性成纤维细胞生长因子对瘢痕成纤维细胞 I、III型胶原蛋白合成和降解的调控作用。

方法: 增生性瘢痕组织取自中山大学附属第一医院烧伤科行瘢痕整复术的患者, 组织块法培养瘢痕成纤维细胞。取第 2 代细胞, 采用氯胺 T 法、RT-PCR 和 Western blot 法检测不同浓度(0~500 µg/L)碱性成纤维细胞生长因子对瘢痕来源的成纤维细胞 I、III型胶原蛋白及细胞基质金属蛋白酶 1 合成和分泌的影响。

结果与结论: 碱性成纤维细胞生长因子对瘢痕成纤维细胞羟脯氨酸及 I、III型胶原蛋白 mRNA 的表达均无促进作用。低质量浓度碱性成纤维细胞生长因子对细胞基质金属蛋白酶 1 的表达无明显影响, 但随着质量浓度的升高表现为增高趋势, 以 50, 100, 500 µg/L 组增高最显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时, 细胞基质金属蛋白酶 1 的表达在细胞与上清中变化一致。说明高质量浓度碱性成纤维细胞生长因子可以通过增加细胞基质金属蛋白酶 1 的合成来促进胶原蛋白降解, 从而避免细胞外基质的过度沉积。

关键词: 碱性成纤维细胞生长因子; 成纤维细胞; 细胞基质金属蛋白酶 1; 瘢痕; 胶原蛋白

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.014

谢举临, 卞徽宁, 李厚东, 舒斌, 祁少海, 唐锦明, 徐盈斌, 利天增, 刘旭盛. 碱性成纤维细胞生长因子与瘢痕成纤维细胞 I、III型胶原蛋白的代谢[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7657-7660.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

研究证实碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)有促进创面愈合的作用^[1-3]。由于可人工重组获得, 已广泛应用于临床各科^[4-5]。然而bFGF在促进创面愈合的同时是否会引起成纤维细胞的增殖而导致瘢痕增生已受到学者的广泛关注。I、III型胶原蛋白过度沉积和降解减少是增生性瘢痕形成的主要原因^[6-7]。而基质金属蛋白酶 1(matrix

metalloproteinase-1, MMP-1)具有特异降解 I、III型胶原蛋白的作用^[8-10]。

实验从蛋白及分子水平观察bFGF对体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞 I、III型胶原蛋白及MMP-1合成和分泌的影响, 探讨bFGF与瘢痕形成的关系和可能机制。

1 材料和方法

设计: 单一因素体外实验。

时间和地点: 于2009年在中山大学附属第

¹Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ²Department of Burn, Guangdong People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Xie Ju-lin☆, Doctor, Associate professor, Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
xieji90@sina.com

Received: 2010-04-22
Accepted: 2010-05-20

¹中山大学附属第一医院烧伤科, 广东省广州市, 510080; ²广东省人民医院烧伤科, 广东省广州市, 510080

谢举临☆, 男, 1973年生, 江西省瑞金县人, 汉族, 博士, 副教授。主要从事创面愈合和瘢痕形成方面的研究。
xieji90@sina.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)41-07657-04

收稿日期:2010-04-22
修回日期:2010-05-20
(20100311016/
WLM·Q)

一医院外科实验室完成。

材料: 瘢痕组织取自中山大学附属第一医院烧伤科行瘢痕整复术的患者, 均取得患者的知情同意。共取得瘢痕组织3例。经病理学鉴定为增生性瘢痕组织。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清	杭州四季青公司
DMEM 培养液, 胰蛋白酶	美国 Gibco-BRL 公司
PE480 型 PCR 扩增仪	美国 PE 公司
细胞裂解缓冲液	美国 Amersco 公司
IBAS 2.0 全自动图像分析系统	德国 KONTRON 公司
鼠抗人 MMP-1 单克隆抗体	美国 Sigma 公司
山羊抗鼠 IgG	美国 Santa Cruz 公司

方法:

瘢痕成纤维细胞的培养与鉴定: 具体操作步骤见文献[11], 培养条件为 37 °C、体积分数5%CO₂, 每隔3 d 换液1次。4~6 d有细胞爬出, 三四周长满瓶底。以0.25% 胰蛋白酶消化传代, 行抗III型胶原蛋白免疫荧光染色, 荧光显微镜下鉴定。取第2代细胞用于实验。

实验分组及干预: 取生长状态良好的对数生长期细胞, 以0.25%胰酶消化, 用含体积分数15%胎牛血清的 DMEM调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$, 按1 000 μL /孔接种于6孔板。分别设置0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/L}$ bFGF 7个质量浓度组, 加入相应质量浓度的bFGF及含体积分数15%胎牛血清的DMEM培养液2 mL, 继续培养72 h。

氯胺T法测上清中羟脯氨酸(hydroxyproline, HPr)的水平: 具体操作步骤见文献[9]。取培养液上清, 氧化显色, 调节波长至560 nm, 以空白管调零, 读取标准管和测定管的吸光度。做标准曲线, 计算测定管HPr水平。

RT-PCR检测 I、III型胶原蛋白mRNA的表达: 以Trizol 法提取细胞总RNA, 用紫外分光光度计测总RNA的纯度和浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。取总RNA 1 μg 反转录为cDNA, 样品-20 °C保存。PCR引物由上海博亚生物有限公司合成。

序列:

引物	序列	片段长度(bp)
I 型胶原蛋白	上游 5'-TCC AAA GGA GAG AGC GGT AA-3' 下游 5'-GAC CAG GGA GAC CAACT CA-3'	693
III型胶原蛋白	上游 5'-TTA TAA ACC ACC CTC TTC CT-3' 下游 5'-TAT TAT AGC ACC ATT GAG AC-3'	255
GAPDH	上游 5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3' 下游 5'-CGG CCA TCG CCA CAG TTT-3'	300

PCR反应条件: ① I 型胶原蛋白: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 45 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共33 个循环; 最后72 °C延伸10 min, 4 °C终止反应。②III 型胶原蛋白: 94 °C 预变性5 min; 94 °C 45 s, 53 °C

1 min, 72 °C 1 min, 共35个循环; 最后72 °C延伸 10 min, 4 °C终止反应。以2%琼脂糖凝胶, 在0.5×TBE 缓冲液中电泳进行PCR产物鉴定, 反射紫外灯下用 IBAS 2.0全自动图像分析系统扫描、分析, mRNA结果 用其PCR产物与GADPH吸光度×面积的比值表示。

Western blot检测MMP-1蛋白的表达: 具体操作步骤见 文献[11]。以鼠抗人MMP-1单克隆抗体(1 : 500)孵育 1.5 h, 用TBS-T缓冲液洗膜6次, 山羊抗鼠IgG(1 : 5 000) 孵育1.5 h, 荧光放射自显影成像。

主要观察指标: 上清中HPr的水平; I、III型胶原 蛋白mRNA的表达; MMP-1蛋白的表达。

设计、实施、评估者: 实验的设计、实施、评估均 为本文作者, 均受过专业培训。

统计学分析: 实验所用数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 8.0统计软件包进行One Way-ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 瘢痕成纤维细胞的培养与鉴定结果 组织块接种 4~6 d, 有长梭形细胞萌出, 随后迅速生长, 传代后成纤 维细胞排列整齐, 呈结节状或旋涡状走行。免疫荧光染 色可见梭形细胞的胞浆呈鲜红色, 所有细胞全部为III型 胶原蛋白阳性细胞, 说明培养细胞为成纤维细胞, 见图1。

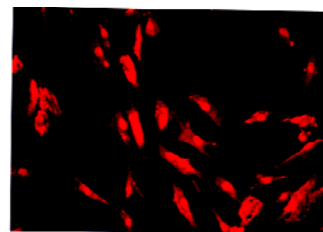
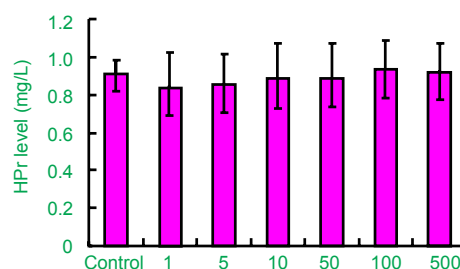


Figure 1 Immunofluorescence staining of collagen type III in the cultured cells (x100)
图1 培养细胞的抗III型胶原蛋白免疫荧光染色(x100)

2.2 bFGF对瘢痕成纤维细胞HPr表达的影响 见图2。

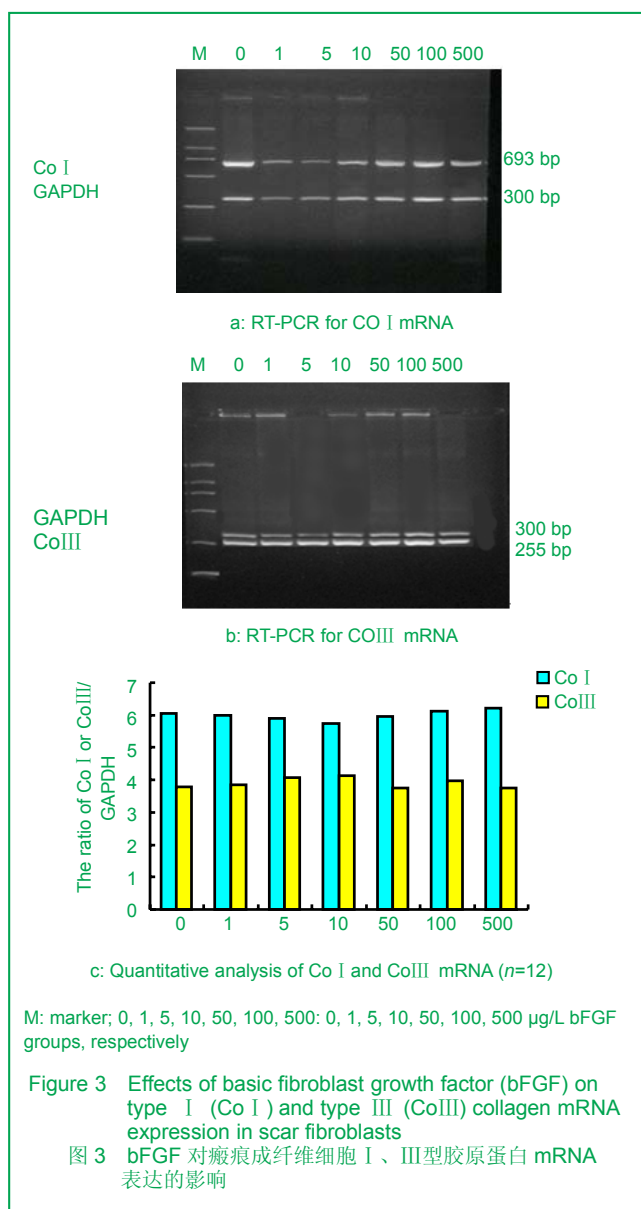


1, 5, 10, 50, 100, 500: 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/L}$ bFGF groups, respectively

Figure 2 Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on hydroxyproline (HPr) in scar fibroblasts ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
图2 bFGF 对瘢痕成纤维细胞上清中 HPr 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

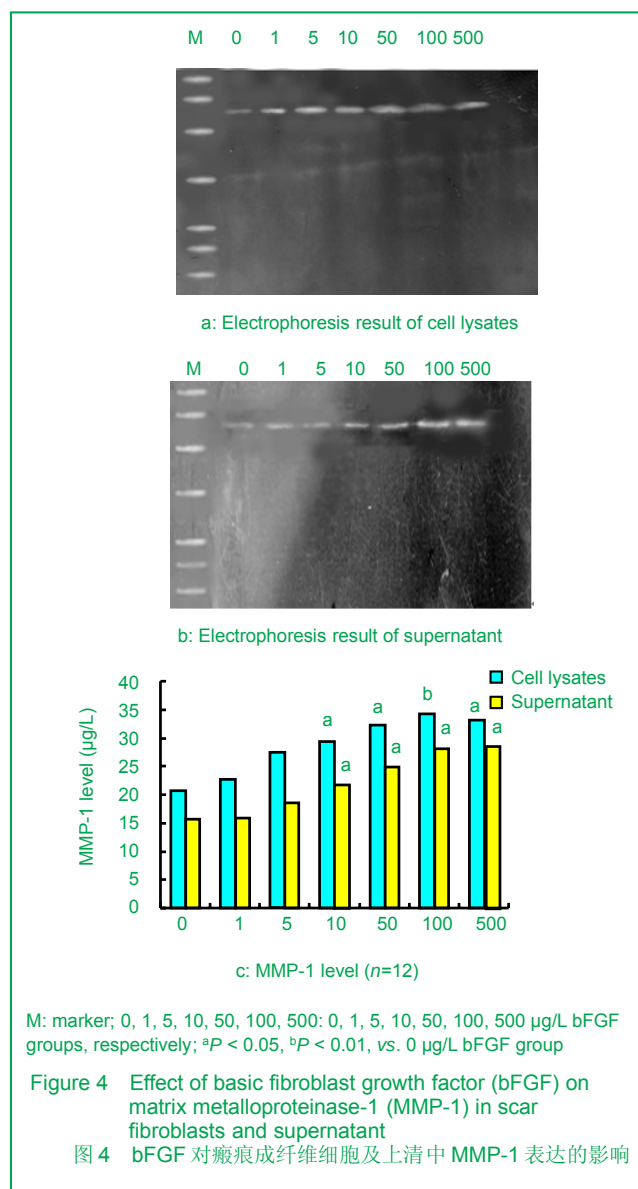
统计学分析发现各组间HPr的表达差异均无显著性意义($P > 0.05$), 说明bFGF对瘢痕成纤维细胞胶原蛋白的合成无促进作用。

2.3 bFGF对瘢痕成纤维细胞 I、III型胶原蛋白mRNA表达的影响 经不同质量浓度bFGF处理的瘢痕成纤维细胞 I、III型胶原蛋白mRNA的表达情况见图3。统计学分析发现各组间 I、III型胶原蛋白mRNA的表达差异均无显著性意义($P > 0.05$), 说明bFGF不能上调 I、III型胶原蛋白mRNA的表达。mRNA表达趋势与上清中蛋白的表达具有一致性。



2.4 bFGF对瘢痕成纤维细胞及上清中MMP-1表达的影响 经不同质量浓度bFGF处理的瘢痕成纤维细胞及上清中MMP-1的表达情况见图4。统计学结果显示低质量浓度(1, 5 $\mu\text{g/L}$)bFGF对MMP-1的表达无明显影响。但是随着质量浓度的升高表现为增高趋势, 具有一定的浓度相关性, 以50, 100, 500 $\mu\text{g/L}$ bFGF的作用效果

最明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。MMP-1的表达在细胞与上清中变化一致。



3 讨论

瘢痕形成的机制目前尚未完全清楚, 一般认为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积和降解减少是增生性瘢痕形成的主要原因, 其中 I、III型胶原是ECM的主要成分^[11-12]。有研究证实瘢痕组织内胶原蛋白的合成是正常细胞的3倍。它们的数量、组成比例与瘢痕组织的成熟、塑形、挛缩等过程密切相关。除了对新形成的组织提供支持和张力外, 还能促进细胞对已形成的胶原进行重塑或改构^[13-14]。因此, 减少胶原的合成或增加胶原的降解都可能减轻ECM异常沉积, 最终导致减轻瘢痕的形成。

HPr是合成胶原的特有原料, 在胶原中的含量较为稳定^[15]。因此在临床和实验中, 胶原总量的测定常采用

HPr法, 实验即采用此方法, 结果发现不同质量浓度bFGF处理的瘢痕成纤维细胞上清中HPr水平差异无显著性意义, RT-PCR结果显示I、III型胶原蛋白mRNA表达水平的变化与HPr基本一致, 说明bFGF不会增加胶原蛋白的合成, 更不会导致ECM异常沉积而引起瘢痕形成^[16-17]。实验发现, 不同病例来源的细胞胶原合成的情况相差较大, 使得组间差异增加, 从而统计学分析差异无显著性意义(结果未给出)。提示个体差异是瘢痕形成的一个重要因素。bFGF在促进成纤维细胞增殖的情况下未相应地增加胶原的合成, 这可能是由于胶原合成的量与成纤维细胞的生物合成活性有直接关系, 与细胞数无关^[18]。

ECM的降解主要是依靠组织细胞所分泌的MMPs, 尤其是间质胶原酶, 即MMP-1。研究表明MMP-1具有特异降解I、II、III型胶原的作用, 因此组织中MMP-1的水平及活性直接影响ECM的降解水平^[19]。MMP-1通常在胎儿无瘢痕愈合伤口中高表达, 而在成人增生性瘢痕或瘢痕疙瘩组织中表达水平低, 说明MMP-1在瘢痕形成过程中可能起重要作用。实验发现, bFGF不同程度地增加了MMP-1的表达, 并具有一定的浓度依赖性。这提示bFGF可能通过增加胶原蛋白的降解减轻ECM的过度沉积。

综上所述, bFGF主要是通过增加MMP-1合成、促进胶原蛋白降解作用而避免ECM过度沉积的发生。因此, 从单因子角度分析, bFGF可能属于瘢痕形成的负性因子。

4 参考文献

- [1] Xie J, Bian H, Qi S, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of extracellular matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing. Clin Exp Dermatol. 2008; 33(2):176-182.
- [2] Ono I. The effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the breaking strength of acute incisional wounds. J Dermatol Sci. 2002;29(2):104-113.
- [3] Akasaka Y, Ono I, Yamashita T, et al. Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds. J Pathol. 2004;203(2): 710-720.
- [4] Chen B, Jia CY, Tang CW, et al. Zhonghua Putong Waikexue. 2002;17(1):45-47.
陈璧, 贾赤宇, 汤朝武, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对增生性瘢痕的作用[J]. 中华普通外科杂志, 2002, 17(1):45-47.
- [5] Shang QX. Zhonghua Shaoshang Zhengxing Waikexue. 1993; 9(5):379.
商庆新. 成纤维细胞、伤口愈合和瘢痕三者的关系[J]. 中华烧伤整形外科杂志, 1993, 9(5):379.
- [6] Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol. 2003;200(4):423-428.
- [7] Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. FASEB J. 1994;8(11):823-831.
- [8] Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. Clin Biochem. 1996;29(3): 225-229.
- [9] Suzuki K, Ikegaya Y, Matsuura S, et al. Transient upregulation of the glial glutamate transporter GLAST in response to fibroblast growth factor, insulin-like growth factor and epidermal growth factor in

- cultured astrocytes. J Cell Sci. 2001;114(Pt 20): 3717-3725.
- [10] E Z. Beijing: Beijing Chubanshe. 1995.
鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995.
- [11] Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka SG, et al. Concentrations of angiogenic factors in follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity and fertilization. Fertil Steril. 2001;76(1):98-101.
- [12] Kypreos KE, Nugent MA, Sonenshein GE. Basic fibroblast growth factor-induced decrease in type I collagen gene transcription is mediated by B-myb. Cell-Growth-Differ. 1998;9(9):723-730.
- [13] Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinase: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(2): 197-250.
- [14] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation, and biological functions. Eur J Cell Biol. 1997;74(2):111-122.
- [15] Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinase: a functional balance in tissue degradation. Oral Dis. 1996;2(1):70-76.
- [16] Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. Am J Surg. 1993;165(6):728-737.
- [17] Garner WL, Karmiol S, Rodriguez JZ, et al. Phenotypic differences in cytokine responsiveness of hypertrophic scar versus normal dermal fibroblasts. J Invest Dermatol. 1993;101(6): 875-879.
- [18] Edwards CA, O'Brien WD Jr. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. Clin Chim Acta. 1980; 104(2): 161-167.
- [19] Suzuki K, Enghild J, Morodomi Y, et al. Mechanisms of action of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3(stromelysin-1). Biochemistry. 1990;29(44):10261-10270.

来自本文课题的更多信息——

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 碱性成纤维细胞生长因子有促进创面愈合的作用, 已广泛应用于临床各科。然而碱性成纤维细胞生长因子在促进创面愈合的同时是否会引起来纤维细胞的增殖而导致瘢痕增生已受到学者的广泛关注。实验从蛋白及分子水平观察碱性成纤维细胞生长因子对体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞 I、III型胶原蛋白及细胞基质金属蛋白酶 1 合成和分泌的影响, 探讨碱性成纤维细胞生长因子与瘢痕形成的关系和可能机制, 对临床应用碱性成纤维细胞生长因子有一定的指导意义。

课题评估的“金标准”: 羟脯氨酸是合成胶原的特有原料, 在胶原中的含量较为稳定。因此在临床和实验中, 胶原总量的测定常采用羟脯氨酸测定法, 实验即采用此方法。

设计或课题的偏倚与不足: 细胞因子具有网络性特点, 它们相互诱导、相互影响受体的表达, 生物学活性随之发生相应的改变。因此, 不能孤立地讨论某种因子的作用。所以, 内源性碱性成纤维细胞生长因子对创面修复及瘢痕形成的作用有待于进一步研究。

提供临床借鉴的价值: 实验提示碱性成纤维细胞生长因子主要是通过增加细胞基质金属蛋白酶 1 合成、促进胶原蛋白降解作用而避免细胞外基质过度沉积的发生。因此, 从单因子角度分析, 碱性成纤维细胞生长因子可能属于瘢痕形成的负性因子。