

基础研究

DOI:10.11699/cyxb20130305

5-氮杂-2-脱氧胞苷对人瘢痕疙瘩成纤维细胞的影响

杨 娥, 张恒术

(重庆医科大学附属第一医院整形外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷对人瘢痕疙瘩成纤维细胞生长的抑制作用及对人瘢痕疙瘩成纤维细胞相关因子的影响。**方法:**收集人瘢痕疙瘩以及周围正常皮肤标本原代培养成纤维细胞,分为瘢痕疙瘩成纤维细胞 5-氮杂-2-脱氧胞苷药物干预组、瘢痕疙瘩成纤维细胞对照组、正常皮肤成纤维细胞 5-氮杂-2-脱氧胞苷药物干预组及正常皮肤成纤维细胞对照组 4 组,用 RT-PCR 检测各组转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) mRNA、Smad7 mRNA 的表达,流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测各组细胞的周期及凋亡。**结果:**人瘢痕疙瘩成纤维细胞较正常皮肤成纤维细胞 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达增高($P=0.001$), Smad7 mRNA 表达降低($P=0.001$), 细胞周期停滞于 G0/G1 期($P=0.035$)及细胞凋亡($P=0.006$)比例降低;5-氮杂-2-脱氧胞苷干预人瘢痕疙瘩成纤维细胞后, TGF- $\beta 1$ mRNA 表达降低($P=0.003$), Smad7 mRNA 回升($P=0.000$), FCM 显示瘢痕疙瘩成纤维细胞停滞于 G0/G1 期比例增加($P=0.000$)并且细胞凋亡率增加($P=0.047$),而正常皮肤成纤维细胞组无明显变化(P 均 >0.05)。**结论:**甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷可影响瘢痕疙瘩形成相关因子的表达并且可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖及促进其凋亡,而对正常皮肤的成纤维细胞无明显影响。瘢痕疙瘩的发病可能与相关基因甲基化有关,5-氮杂-2-脱氧胞苷可能成为瘢痕疙瘩治疗的新选择。

【关键词】瘢痕疙瘩;成纤维细胞;5-氮杂-2-脱氧胞苷;转化生长因子- $\beta 1$;Smad7

【中国图书分类号】R62

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-30

Effects of 5-aza-2-deoxycytidine on human keloid fibroblasts

YANG E, ZHANG Hengshu

(Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the inhibition effects of methylase inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine on human keloid fibroblasts, and the effects of 5-aza-2-deoxycytidine on related cytokines of human keloid fibroblasts. **Methods:** Human keloid and surrounding normal skin samples were collected for primary cultured fibroblasts. Cells were divided into keloid fibroblast experimental group, normal skin fibroblast experimental group, keloid fibroblast control group and normal skin fibroblast control group. 5-aza-2-deoxycytidine was used to intervene the experimental groups. Expressions of TGF- $\beta 1$ mRNA and Smad7 mRNA in each group were detected with RT-PCR. Effects of 5-Aza-2-deoxycytidine on the cell cycle and apoptosis of fibroblasts were analyzed with flow cytometry (FCM). **Results:** Compared with those of normal skin fibroblast, expressions of TGF- $\beta 1$ mRNA was increased ($P=0.001$) but Smad7 mRNA were decreased ($P=0.001$) in keloid fibroblast, meanwhile the proportion of cells in G0/G1 stage ($P=0.035$) and apoptosis cells were decreased ($P=0.006$). Expressions of TGF- $\beta 1$ mRNA were decreased ($P=0.003$) and those of Smad7 mRNA were elevated ($P=0.000$) in keloid fibroblasts intervened by 5-aza-2-deoxycytidine. FCM demonstrated that the proportions of cells in G0/G1 stage and apoptosis cells were increased ($P=0.000$, $P=0.047$) in keloid fibroblasts intervened by 5-aza-2-deoxycytidine. But changes in normal skin fibroblast group were insignificant ($P>0.05$). **Conclusions:** Methylase inhibitors, 5-aza-2-deoxycytidine may inhibit the proliferation and promote the apoptosis of keloid fibroblast as well as influence expressions of its related cytokines, however, the effects on normal skin fibroblasts are insignificant. Pathogenesis of keloid may relate with the methylation of certain genes. 5-aza-2-deoxycytidine may be a new choice in the treatment of pathological scar.

【Key words】 keloid; fibroblasts; 5-aza-2-deoxycytidine; transforming growth factor- $\beta 1$; Smad7

作者介绍: 杨 娥, Email: 512442489@qq.com,

研究方向: 伤口愈合与瘢痕。

通信作者: 张恒术, Email: 1390527030@qq.com。

基金项目: 重庆市教委科技资助项目 (编号: KJ090317)。

瘢痕疙瘩是整形外科常见的疾病,其发病机制错综复杂,主要与成纤维细胞的增殖与凋亡紊乱及胶原的过度沉积有关,其临床表现主要为瘙痒疼痛,甚至影响功能及美观,目前主要以手术治疗为主,辅以物理、放疗、药物、光动力学等治疗,但复发率均较高。对于瘢痕疙瘩的发病机制目前研究甚多,但对于瘢痕疙瘩的防治仍是临床的难点之一。因此研究瘢痕疙瘩的发病机制及寻找有效的治疗方法尤为重要。本实验研究探讨了甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷对瘢痕疙瘩发病的关键因子转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 及 Smad7 的影响,检测了其对人瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 对象与仪器

1.1.1 实验对象 收集本院整形美容科手术切除的瘢痕疙瘩标本及周围正常皮肤标本 36 例 (所有标本收集均征得患者同意并签署相关同意书)。瘢痕疙瘩生长时间为 0.5~3.0 年,瘢痕疙瘩分布部位为耳垂 19 例,颈部 6 例,胸前 9 例,上肢 2 例,腿部 1 例。所有标本均未感染。标本的收集以及实验研究均征得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会同意。

1.1.2 主要试剂及仪器 主要试剂:DMEM(H)培养基、胎牛血清购自美国 Thermo scientific 公司,胰蛋白酶、DMSO 购自美国 Sigma 公司,总 RNA 提取试剂 Trizol、反转录试剂盒及 *Tap* 酶购自 Takara 宝生物工程 (大连) 有限公司,5-氮杂-2-脱氧胞苷购自美国 Sigma 公司。

主要仪器:无菌操作台,中国苏净集团;超低温冰箱,美国 NBS;恒温水浴箱,中国江苏金坛荣华;PCR 仪,Bio-Rad;核酸蛋白分析仪,瑞典安玛西亚公司;冷冻离心机,HEMNLE;高速离心机,美国 Sigma;凝胶成像系统,Bio-Rad。

1.2 实验方法

1.2.1 人瘢痕疙瘩及正常皮肤成纤维细胞培养及分组 原代单细胞法培养人瘢痕疙瘩及正常皮肤成纤维细胞,标本收集入无菌 DMEM(H)培养基,在超净台上去除表皮及皮下脂肪组织,将组织块剪成碎末状移入培养瓶中,加入 3 ml 0.25% 胰酶后放入 37 °C 水浴箱消化 25 min,消化完后加入等量含 15% FBS 的 DMEM(H)培养基终止消化,用 200 目不锈钢筛过滤组织块,吸取滤液入离心管 800 r/min、5 min 离心后弃去上清,加入 15% FBS 的 DMEM(H)培养液 3 ml,轻轻吹打至细胞悬液后移入培养瓶,平放培养瓶让细胞悬液均匀铺满瓶底后放入 37 °C、5%CO₂ 孵育箱培养,第 5 天加入 15% FBS 的 DMEM(H)培养液 1 ml,第 8 天第 1 次换液,之后 2~3 d 换液 1 次,细胞生长至 80% 左右进行传代,取第 2、3 代覆盖率

60% 左右的细胞进行实验,将瘢痕疙瘩及正常皮肤成纤维细胞分别随机分为瘢痕疙瘩药物干预组 (K+组,30 例) 与对照组 (K 组,30 例)、正常皮肤药物干预组 (N+组,30 例) 与对照组 (N 组,30 例),药物干预组用工作量 5×10^{-5} mol/L 的 5-氮杂-2-脱氧胞苷干预 (即每瓶细胞加入 2.85 ml 15% FBS 的 DMEM(H)培养液和 0.15 ml 10^{-3} mol/L 的 5-氮杂-2-脱氧胞苷溶液,5-氮杂-2-脱氧胞苷溶液用 PBS 液配制),对照组用等量的 PBS 液代替 (即每瓶细胞加入 2.85 ml 15% FBS 的 DMEM(H)培养液和 0.15 ml PBS 液),每 24 h 换液 1 次,72 h 后收集细胞进行实验。

1.2.2 各组成纤维细胞 TGF- $\beta 1$ mRNA, Smad7 mRNA 表达的检测 采用 RT-PCR 法,Trizol 提取各组约 1×10^6 个细胞的总 RNA,分光光度计测 RNA 浓度及纯度后取等量 RNA 模板加样反转录试剂盒反转录 RNA 为 cDNA,扩增后,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参基因做琼脂糖凝胶电泳比较各组 mRNA 差异 (Smad7、TGF- $\beta 1$ 、GAPDH 引物及产物大小见表 1)。

表 1 Smad7、TGF- $\beta 1$ and GAPDH mRNA 引物序列及产物大小

引物名称	引物序列 (5' - 3')	产物长度
Smad7	上游 CAGCTCAATTCGGACAACAAGA	102 bp
	下游 GTACACCCACACACCATCCAC	
TGF- $\beta 1$	上游 CTAATGGTGGAAACCCACAACG	209 bp
	下游 TATCGCCAGGAATTGTTGCTG	
GAPDH	上游 GAGCCAAAAGGCTCATCATCTC	542 bp
	下游 AAAGGTGGAGGACTGGGTGTC	

1.2.3 各组成纤维细胞周期及凋亡检测 取上述各组长势相当计数为 10^6 个的细胞采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测细胞周期,采用流式细胞术 Annexin V 联合碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 法检测 K+、K-、N+、N- 4 组的成纤维细胞凋亡情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理和分析。实验数据为计量资料,用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间数据的比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-氮杂-2-脱氧胞苷对体外培养人瘢痕疙瘩成纤维细胞 TGF- $\beta 1$ 、Smad7 mRNA 表达的影响

琼脂糖凝胶电泳显示 TGF- $\beta 1$ mRNA 在体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达明显高于正常皮肤成纤维细胞,而 Smad7 mRNA 在体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达明显低于正常皮肤成纤维细胞,经 5-氮杂-2-脱氧胞苷干预后,体外培养性瘢痕疙瘩成纤维细胞 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达下降

(图 1), Smad7mRNA 表达回升(图 2), 而正常皮肤成纤维细胞 TGF- β 1, Smad7mRNA 均无明显变化。图形采用 Image J 图形分析软件进行灰度比分析, 各组间比较采用单因素方差分析, K 组 TGF- β 1mRNA 的表达灰度比(0.73 ± 0.06)较 N 组(0.54 ± 0.04)增高($F=31.278, P=0.001$), K 组 Smad7mRNA 的表达灰度比(0.49 ± 0.17)较 N 组(0.59 ± 0.42)降低($F=24.010, P=0.001$), 差异有统计学意义; K+组 TGF- β 1mRNA 的表达灰度比(0.58 ± 0.05)较 K 组(0.73 ± 0.06)降低($F=18.253, P=0.003$), 而 K+组 Smad7mRNA 的表达灰度比(0.63 ± 0.05)较 K 组(0.49 ± 0.17)回升($F=40.664, P=0.000$), 差异有统计学意义。而 N+组与 N 组 TGF- β 1mRNA($F=1.827, P=0.213$)及 Smad7mRNA($F=2.311, P=0.167$)的表达灰度比的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

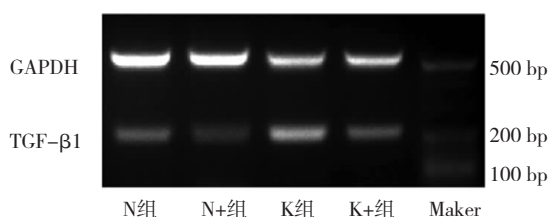


图 1 TGF- β 1mRNA 在各组的表达

Fig.1 TGF- β 1mRNA expressions in each group

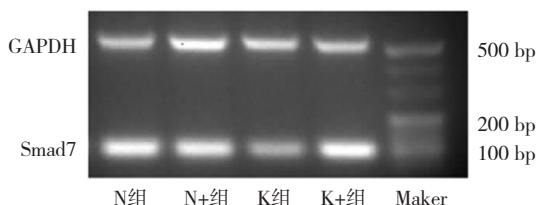


图 2 Smad7mRNA 在各组的表达

Fig.2 Smad7mRNA expressions in each group

2.2 5-氮杂-2-脱氧胞苷对人瘢痕疙瘩成纤维细胞周期及凋亡的影响

K 组成纤维细胞停滞于 G0/G1 期的细胞比例(62.09 ± 0.60)%少于 N 组(76.84 ± 8.13)%, 组间差异采用单因素方差分析($F=9.824, P=0.035$), 差异有统计学意义。K+组成纤维细胞停滞于 G0/G1 期的细胞比例(81.21 ± 1.59)%多于 K 组(62.09 ± 0.60)%, 各组数据组间差异采用单因素方差分析($F=380.437, P=0.000$), 差异有统计学意义。而 N+组(77.26 ± 13.03)%与 N 组(76.84 ± 8.13)%差异无统计学意义($F=0.002, P=0.965$)(表 2)。

表 2 各组细胞周期分布

Tab.2 Distribution of cell cycle in each group

分组	G0/G1 期细胞 (%, $\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
K+组	81.21 ± 1.59	380.437	0.000
K组	62.09 ± 0.60		
N+组	77.26 ± 13.03	0.002	0.965
N组	76.84 ± 8.13		

细胞凋亡从 FCM 图观察到, K 组细胞凋亡率(9.97 ± 1.25)%较 N 组(17.64 ± 2.10)%小, 数据采用单因素方差分析($F=29.511, P=0.006$), 差异有统计学意义。K+组细胞凋亡率(位于 LR 区)(34.49 ± 14.97)%大于 K 组(9.97 ± 1.25)%, 各组数据采用单因素方差分析($F=7.995, P=0.047$), 差异有统计学意义, 而 N+组(14.29 ± 7.11)%与 N 组(17.64 ± 2.10)%相比, 差异无统计学意义($F=0.613, P=0.477$)(表 3)。

表 3 各组细胞凋亡率比较

Tab.3 Comparison on apoptosis rate among groups

分组	凋亡率 (%, $\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
K+组	34.49 ± 14.97	7.995	0.047
K组	9.97 ± 1.25		
N+组	14.29 ± 7.11	0.613	0.477
N组	17.64 ± 2.10		

3 讨论

瘢痕疙瘩是皮肤创伤修复和愈合过程的病态产物。临床表现不一, 皮损一般高出周围正常皮肤, 范围超过原伤口界限而侵犯临近组织呈瘤样浸润生长。瘢痕疙瘩的发病与成纤维细胞生长失去正常的调控有关, 表现为增殖能力增强, 而凋亡降低, 同时引起胶原纤维蛋白过度沉积^[1]。其大多散发发病, 但具有一定的家族遗传倾向^[2]。

瘢痕疙瘩发病机制中的重要通路 TGF- β /Smads 通路已得到公认, 该通路的主导因子 TGF- β 1 是一种多功能的细胞因子, 参与创面愈合过程的所有阶段, 是瘢痕疙瘩形成中的关键效应因子^[3]。Smad7 在该通路中起着尤为重要的作用, 能阻止受体调节型 Smads 的活化, 负调控 TGF- β 通路, 从而抑制瘢痕形成^[4]。Tang 等^[5]也发现瘢痕疙瘩 Smad7 表达相对于正常瘢痕下调。

5-氮杂-2-脱氧胞苷是一种 DNA 甲基化酶抑制剂。它可以抑制 DNA 甲基化转移酶的活性。据报道, 用 5-氮杂-2-脱氧胞苷干预治疗供体细胞^[6]或早期 NT 胚胎^[7]不增加克隆胚胎的发育潜力。Wang 等^[8]还证明, 5-氮杂-2-脱氧胞苷及曲古霉素 A 处理细胞后 DNA 甲基化水平显著降低, 5-氮杂-2-脱氧胞苷能抑制 DNA 甲基转移酶, 从而逆转启动子甲基化沉默产生的基因表达, 具有治疗肿瘤的前景^[9-10]。2006 年 5 月 2 日 FDA 已批准 5-氮杂-2-脱氧胞苷用于骨髓增生异常综合征的治疗。DNA 过度甲基化致一些重要基因表达调控失常或基因组的稳定性

减弱,因此与肿瘤的发病密切相关^[1]。一些抑癌基因(比如 p16、p15、E-cadherin、hMLH1 和 VHL)由于过度甲基化而失活,这些基因的失活导致细胞周期失调^[2],引发各种疾病。去甲基化药物如 5-氮杂-2-脱氧胞苷在体内和体外均能通过抑制 DNA 甲基转移酶 1 使抑癌基因恢复正常的去甲基状态^[3],重新激活那些因为 DNA 过度甲基化而失活的基因,使细胞恢复正常终末分化、衰老或凋亡。

实验中,用甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷干预后,RT-PCR 结果显示体外培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞瘢痕形成相关因子发生了相应的变化,TGF- β 1mRNA 表达下降,而 Smad7mRNA 表达回升,表明 5-氮杂-2-脱氧胞苷通过抑制相关基因甲基化,抑制了瘢痕疙瘩形成的重要通路 TGF- β /Smads 通路,而原本降低的 Smad7 得到回升。同时,FCM 检测显示体外培养的人瘢痕疙瘩成纤维细胞细胞周期停滞于 G0/G1 期的细胞比例增加,细胞凋亡的比例也增加,说明 5-氮杂-2-脱氧胞苷具有抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞生长及促进成纤维细胞凋亡的作用。同时也说明瘢痕疙瘩成纤维细胞过度增生与基因的甲基化关系密切。然而 5-氮杂-2-脱氧胞苷对正常皮肤成纤维细胞均无明显影响,这可能与正常皮肤成纤维细胞相对低甲基化状态有关,与瘢痕疙瘩成纤维细胞可能存在某些基因高甲基化状态的假设相符。因此,5-氮杂-2-脱氧胞苷抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖并促进细胞凋亡作用并非自身细胞毒作用,可能与其对某些基因去甲基化作用并恢复表达有关。当然,瘢痕疙瘩的发病机制错综复杂,本实验也只是对体外培养的成纤维细胞进行研究,对于在深奥而又神秘的机体内具体机制仍有待研究,抑制甲基化可能成为预防及治疗瘢痕疙瘩的新方法,甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷是否能用于瘢痕疙瘩的预防或治疗也有待于进一步的实验研究。另外,找出瘢痕疙瘩发病中异常甲基化基因做出靶向研究及治疗有望成为瘢痕疙瘩防治的突破口。

参 考 文 献

- [1] van der Veer W M, Bloemen M C, Ulrich M M, et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation[J]. Burns, 2009, 35(1): 15-29.
- [2] Marneros A G, Norris J E, Olsen B R, et al. Clinical genetics of familial keloids[J]. Arch Dermatol, 2001, 137(11): 1429-1434.
- [3] Liu W, Wang D R, Cao Y L. TGF- β : a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2004, 4(1): 123-136.
- [4] Slemper A K, Kirschner R E. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management[J]. Curr Opin Pediatr, 2006, 18(4): 396-402.
- [5] 唐冰, 朱斌, 毕良宽, 等. 瘢痕疙瘩中 Smads 表达的研究[J]. 中华外科杂志, 2009, 47(12): 941-943.
- [6] Tang B, Zhu B, Bi L K, et al. Expression of Smads in keloid scarring[J]. Chin J Surg, 2009, 47(12): 941-943.
- [7] Enright B P, Sung L Y, Chang C C, et al. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2-deoxycytidine[J]. Biol Reprod, 2005, 72(4): 944-948.
- [8] Tsuji Y, Kato Y, Tsunoda Y. The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2-deoxycytidine[J]. Zygote, 2009, 17(2): 109-115.
- [9] Wang Y S, Su J, Wang L, et al. The effects of 5-Aza-2-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts[J]. Cell Reprogram, 2011, 13(4): 297-306.
- [10] Mossman D, Kim K T, Scott R J. Demethylation by 5-Aza-2-deoxycytidine in colorectal cancer cells targets genomic DNA whilst promoter CpG island methylation persists[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 366.
- [11] Mirza S, Sharma G, Pandya P, et al. Demethylating agent 5-Aza-2-deoxycytidine enhances susceptibility of breast cancer cells to anti-cancer agents[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 342(1-2): 101-109.
- [12] Dhodapkar M, Grill J, Lust J A. Abnormal regional hypermethylation of the calcitonin gene in myelodysplastic syndromes[J]. Leuk Res, 1995, 19(10): 719-726.
- [13] Kamb A, Gruis N A, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 264(5157): 436-440.
- [14] Momparler R L, Bovenzi V. DNA methylation and cancer[J]. J Cell Physiol, 2000, 183(2): 145-154.

(责任编辑:冉明会)