

基础研究

DOI:10.11699/cyxb20130718

肿瘤侵犯相关蛋白-自分泌运动因子对真皮成纤维细胞生物学特性的影响

倪智敏¹, 周璐珩¹, 田 怡¹, 张军波², 牙祖蒙¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院整形美容科, 重庆 400010; 2. 第三军医大学大坪医院医学美容科, 重庆 400042)

【摘要】目的:观察自分泌运动因子(autocrine motility factor, AMF)对体外培养的人真皮成纤维细胞(human dermal fibroblasts, HDF)生物学特性(增殖、抗凋亡和迁移运动)的影响。**方法:**HDF 体外培养后分为 AMF 组和空白对照组。MTT 法检测细胞增殖活性, 流式细胞仪检测细胞周期及细胞抗凋亡能力, Transwell 小室迁移运动模型检测细胞迁移运动能力。**结果:**与空白对照组相比, AMF 组体外培养的 HDF 的增殖能力($t=9.13, P<0.001$)、抗凋亡能力($t=30.94, P<0.001$)及运动迁移能力($t=5.35, P=0.003$)均显著增强。**结论:**AMF 具有提高 HDF 增殖、运动迁移和抗凋亡能力, 提示该因子与瘢痕疙瘩的肿瘤学特征有着密切关系。

【关键词】自分泌运动因子; 成纤维细胞; 增殖; 抗凋亡; 细胞运动

【中国图书分类法分类号】R622

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-02

Effects of tumor invasion related protein-autocrine motility factor on biological property in human dermal fibroblasts

NI Zhimin¹, ZHOU Luheng¹, TIAN Yi¹, ZHANG Junbo², YA Zumeng¹

(1. Department of Plastic Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Plastic Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effects of autocrine motility factor(AMF) on the biological property (proliferation, anti-apoptosis and migration) of the cultured human dermal fibroblasts(HDF). **Methods:** Cultured HDF were divided into experimental group (AMF group) and blank control group. Cellular anti-apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Proliferation and migration of the cells were respectively determined by MTT assay and Transwell chamber. **Results:** Abilities of proliferation($t=9.13, P<0.001$), anti-apoptosis($t=30.94, P<0.001$) and migration($t=5.35, P=0.003$) were increased significantly in experimental group compared with those in blank control group. **Conclusions:** AMF could induce abilities of proliferation, anti-apoptosis and migration of HDF, suggesting that AMF is associated with keloid in characteristics of oncology.

【Key words】autocrine motility factor; fibroblast; proliferation; anti-apoptosis; cell migration

瘢痕疙瘩具有无自限性生长, 超越创缘向周边浸润等恶性肿瘤特征, 从肿瘤学角度探讨瘢痕疙瘩的发病机制已成为热点^[1-3]。自分泌运动因子(auto-craine motility factor, AMF)是一种自分泌蛋白, 能促进细胞黏附、增殖、移动、抗凋亡并可能与组织修复有关^[4-5]。本课题组前期研究结果显示: 与增生性瘢痕及生理性瘢痕比较, 瘢痕疙瘩组织中 AMF 的表达水平显著增高, 提示 AMF 在瘢痕疙瘩的发病机制中可能扮演重要角色^[6]。本研究观察 AMF 对正常真皮体外培养成纤维细胞增殖、抗凋亡和侵袭作

用的影响, 进一步了解 AMF 在瘢痕疙瘩发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

苏州 YJ-875 型超净工作台、倒置显微镜(Olympus, 日本)、美国 SHELL-LAB1815Tc 型二氧化碳培养箱、流式细胞仪(Partec, 德国)。Transwell 小室(滤膜为 12 mm 孔径的无聚碳酸酯聚乙烯吡咯烷酮多孔滤膜)、DMEM/High Glucose 细胞培养基(Gibco, 美国)、胎牛血清(Gibco, 南美)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma, 美国)。

1.2 标本来源

组织取自重庆医科大学附属第一、第二医院 2011 年 11 月至 2012 年 6 月男性包皮过长患者, 手术切除共 10 例, 年龄

作者介绍: 倪智敏, Email: nizhimin119@163.com,

研究方向: 体表器官的再造修复和整形。

通信作者: 牙祖蒙, Email: yazumeng@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81071596)。

8~21 岁。取材局部无感染和溃疡,均已取得患者知情同意。

1.3 原代培养

人正常真皮体外培养、成纤维细胞体外培养采用组织块法,行正常人真皮成纤维细胞(human dermal fibroblast, HDF)原代培养^[7]。将切下的包皮组织去除表皮,切成 1 mm³ 左右的组织块置于培养瓶,在 5%CO₂、37 ℃、饱和湿度条件下培养 6~8 h,使组织块贴壁,加入适量 DMEM/High Glucose 培养基继续培养,3~4 d 换液 1 次;当细胞达到 80%融合时行传代培养,每 4~5 d 传代 1 次,实验用第 3~8 代细胞。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

HDF 分别用 0.25%胰酶消化,计数细胞数。然后用含 10%小牛血清的培养液将细胞调整至 2.5×10^4 个/ml,分为正常真皮空白对照组、正常真皮 AMF 组共 2 组(即空白对照组、AMF 组),每组按时间梯度分别接种 3 板细胞于 96 孔细胞培养板中。

不同剂量 AMF 对体外分离培养的 HDF 增殖的影响在无菌条件下,96 孔细胞培养板中每孔加入已调整好的 HDF 悬液 180 μ l 和已设定好浓度的药物 20 μ l。为减少实验误差,每组药物浓度设 5 个复孔,然后放置于 37 ℃、5%CO₂ 和饱和湿度的培养箱中分别培养 24、48、72 h,细胞完全贴壁后,吸出培养基,加入无血清培养基 200 μ l(避免血清中蛋白产生反应造成误差)后加入 0.25% MTT 试液 20 μ l 于每孔,再继续培养 4 h,吸出培养基后每孔再加入 DMSO 150 μ l,振荡 10 min。将培养细胞的 96 孔板在 570 nm 波长下,用酶标仪测定吸光度(absorbance, A)值,计算药物对 HDF 增殖的促进率。促进率(%)=(A 值_{AMF 组}/A 值_{空白对照组}) $\times$ 100%。

1.5 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞周期

将 HDF 分别以 1×10^6 个种于 6 孔板上, HDF 分为空白对照组及 AMF 组培养 48 h 后制成细胞悬液,以 75%酒精 4 ℃固定过夜后进行 FCM 检测。

1.6 Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡

将 HDF 分别以 1×10^6 个种于 6 孔板上, HDF 分为空白对照组及 AMF 组,以无血清培养基诱导凋亡培养 48 h 后,制成悬浮细胞用 PBS 洗 2 次,加入 100 μ l Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin-V(20 μ g/ml)10 μ l,室温避光 30 min,再加入 PI(50 μ g/ml)5 μ l,避光反应 5 min 后,加入 400 μ l Binding Buffer,立即用 FACSscan 进行 FCM 定量检测。

1.7 Transwell 小室趋化运动模型检测细胞迁移能力

HDF 用 0.25%胰酶消化成单细胞悬液,无血清 DMEM/High Glucose 调整细胞数至 1×10^5 个/ml,并分为空白对照组及 AMF 实验组。将 Transwell 小室放入 24 孔板,上室中加入 100 μ l 细胞悬液,下室中加入 600 μ l 常规细胞培养基,于 5%CO₂、37 ℃培养 36 h 后 PBS 冲洗,用棉签轻轻擦去滤膜上层未过膜细胞,甲醛固定 15 min,苏木精染色后镜下观察。每个滤膜随机选取 5 个不重叠的 200 倍视野,计算穿膜细胞数。以穿膜细胞的相对数量表示 HDF 的迁移能力,以迁移促进率表示药物的促进效应。迁移促进率(%)=(AMF 组穿膜细胞数/空白对照组穿膜细胞数) $\times$ 100%。每组平行设 2 个小室,计算平均数。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组比较采用两独立样本 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 MTT 检测 AMF 对 HDF 增殖的影响

AMF 分别作用于 HDF 24、48、72 h 后,均显示出其对细胞生长的促进作用,差异有统计学意义,见表 1。细胞的促进率分别为 107.3%(24 h)、107.5%(48 h)、116.3%(72 h),对不同时间点细胞促进率行单因素方差分析,显示不同时间点的细胞促进率差异有统计学意义($F=16.928, P<0.001$),见表 1。进一步两两比较发现,随作用时间延长细胞促进率逐渐增加,其中 48 h 组细胞促进率高于 24 h 组细胞促进率,差异无统计学意义($q=0.034, P=0.922$),而 72 h 组细胞促进率高于 24 h 组和 48 h 组的细胞促进率,差异有统计学意义($q=1.763, P<0.05; q=1.729, P<0.05$)。

2.2 FCM 检测 AMF 对 HDF 周期的影响

AMF 培养 HDF 48 h 后,FCM 检测结果显示,细胞周期发生改变,表现为 G0/G1 期的比例降低, S 期比例增高,与空白对照组比差异有统计学意义($P<0.001$),结合 MTT 结果提示 AMF 促进该细胞增殖,见图 1、表 2。

2.3 Annexin-V/PI 法检测 AMF 对 HDF 抗凋亡能力的影响

AMF 培养 HDF 48 h 后,流式细胞仪检测结果显示,AMF

表 1 AMF 培养 HDF 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of AMF on cell proliferation in HDF($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	24 h		48 h		72 h	
		A 值	促进率	A 值	促进率	A 值	促进率
空白对照组	8	0.302 $\pm$ 0.036		0.464 $\pm$ 0.034		0.709 $\pm$ 0.028	
AMF 组	8	0.324 $\pm$ 0.038	1.073 $\pm$ 0.22	0.499 $\pm$ 0.035	1.075 $\pm$ 0.20	0.610 $\pm$ 0.024	1.163 $\pm$ 0.54 ^a
<i>t</i> 值		-9.602		-11.172		-9.130	
<i>P</i> 值		<0.001		<0.001		<0.001	

注:a,采用单因素方差分析,与 24、48 h 组相比, $F=16.928, P<0.001$

组细胞凋亡率明显低于空白对照组细胞凋亡率,差异有统计学意义($P<0.001$),结合细胞周期提示 AMF 对 HDF 的凋亡有明显的抑制作用,见表 3、图 2。

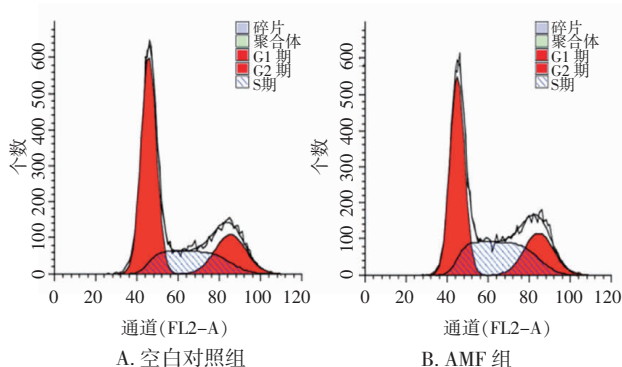


Fig.1 Results of cell cycle distribution detected by FCM

表 2 AMF 培养 HDF 48 h 细胞周期的变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Changes in cell cycle in HDF cultured by AMF at 48 h ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数 (n)	G0/G1期	S期	G2/M期
空白对照组	6	56.91 $\pm$ 0.25	25.01 $\pm$ 0.23	18.08 $\pm$ 0.23
AMF组	6	47.98 $\pm$ 0.22	29.10 $\pm$ 0.42	22.93 $\pm$ 0.56
t 值		65.553	21.085	19.494
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 3 AMF 对 HDF 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.3 Effects of AMF on apoptosis of HDF ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数 (n)	凋亡率 (%)
空白对照组	8	13.40 $\pm$ 0.64
AMF 组	8	5.11 $\pm$ 0.30
t 值		33.261
P 值		< 0.001

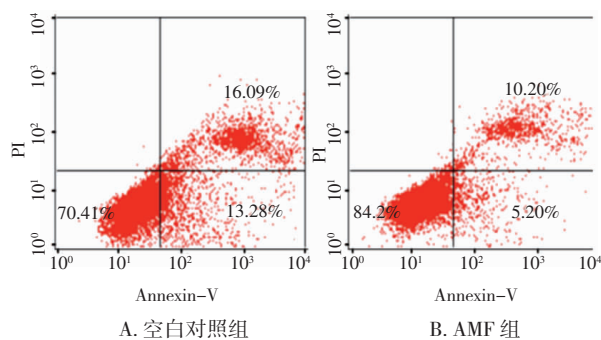


Fig.2 Results of cellular anti-apoptosis detected by FCM

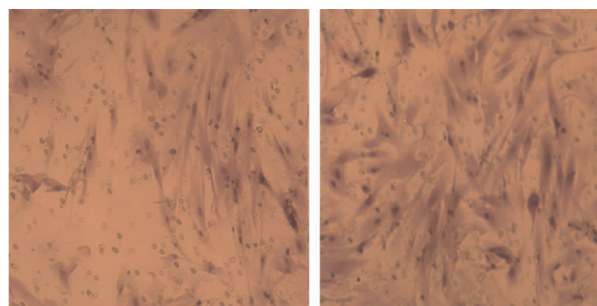
2.4 Transwell 实验检测 AMF 对 HDF 促迁移的影响

AMF 作用于 HDF 36 h 后,显示出促进 HDF 的运动迁移能力,穿过到下室的细胞数量多于空白对照组,差异有统计学意义($P=0.003$),见表 4、图 3。

表 4 AMF 对 HDF 迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Effects of AMF on migration of HDF ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	HDF (个)
空白对照组	8	50.2 $\pm$ 5.9
AMF组	8	71.9 $\pm$ 4.5
t 值		-7.191
P 值		0.003



A. 空白对照组 (100 $\times$) B. AMF 组 (100 $\times$)

图 3 Transwell 实验检测 AMF 对 HDF 促迁移的影响

Fig.3 Effects of AMF on migration of HDF by Transwell chamber

3 讨论

3.1 瘢痕疙瘩的恶性肿瘤生物学特征

与其他哺乳类动物不同,人类真皮受损、创面愈合后会形成以胶原等细胞外基质过度沉积为特征的真皮纤维化疾病瘢痕疙瘩,其具有侵袭性生长的特性。由于发病机制不清楚,因而治疗效果不理想。临床上局部应用药物治疗可暂时缓解症状,采用外科手术切除后,若不综合抗瘢痕治疗,极易复发,且向周围组织外延性生长,有效的药物治疗瘢痕疙瘩对减少术后复发,提供非手术治疗方法具有重要作用^[8-9]。因此瘢痕疙瘩一直是整形外科领域研究的重点之一。与其它瘢痕不同,瘢痕疙瘩可进行性地浸润到未受损伤的真皮,与正常真皮无明确的分界线,呈浸润性生长,并有相当高的复发率^[10]。这些特点显示了瘢痕疙瘩具有明显的恶性肿瘤生物学特征。而瘢痕疙瘩成纤维细胞是具有一定肿瘤性质的细胞^[11]。在真皮创口愈合过程中,成纤维细胞是主要的修复细胞,它在创口修复过程中的过度增殖、向周围浸润、凋亡能力减弱等功能活跃,从而引起一系列级联反应造成创面修复失控可造成纤维排列紊乱而形成瘢痕疙瘩,因此,对各种因素诱导下成纤维细胞发生功能异常的研究,成为瘢痕疙瘩病因机制研究的主要方向。

3.2 AMF 的生物学效应

细胞运动是细胞浸润转移的关键条件。多种因子包括自分泌和旁分泌对这种细胞运动都有影响。其中 AMF 及其受体与肿瘤转移的关系越来越受到重视。AMF 是一种由肿瘤细胞产生和分泌的细胞因子,通过与一种细胞膜糖蛋白即自分泌运动因子受体结合,刺激细胞随机和定向运动。AMF 最早从肝癌、肺癌、纤维肉瘤、乳癌、黑色素瘤等恶性肿瘤细胞株培养基中分离、提纯的细胞因子,其后的研究发现,AMF 与磷酸葡萄糖异构酶、神经白细胞素相同^[12],迄今为止有关 AMF 研究得最多的是它在肿瘤的发生发展尤其是肿瘤侵袭、转移和血管生成等方面发挥重要作用^[13-14]。而在具有恶性肿瘤生物学特征的瘢痕疙瘩的研究中很少,本研究希望通过发现该细胞因子在瘢痕疙瘩发病机制中的作用,为瘢痕疙瘩的治疗提供新的靶点和治疗方案。

3.3 AMF 在瘢痕疙瘩发病机制中的作用

与可以手术治疗的增生性瘢痕相比,瘢痕疙瘩所表现无自限生长与向周围组织侵入等特点使其在临床上的治疗困难。以往的研究^[11,14]表明与正常真皮的成纤维细胞相比,瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖、抗凋亡、运动迁移能力都较高。在本课题的前期研究^[15]中显示 AMF 在瘢痕疙瘩组织中呈现过表达状态,表明其在瘢痕疙瘩形成过程中起着重要作用。在本实验中显示 AMF 作用后的 HDF 增殖、抗凋亡、运动迁移能力都有所提高,在研究中发现 AMF 可促进 HDF 的增殖,明显的抗凋亡能力及促进其运动迁移的能力。本实验提示 AMF 可能在创口愈合过程中,具有诱导 HDF 转化成过度增殖,向周围浸润,凋亡能力减弱的成纤维细胞从而形成瘢痕疙瘩的过程中有重要作用。本研究可望发现新的瘢痕疙瘩治疗靶点,研究出新的抗纤维化治疗药物及方法。目前 AMF 与瘢痕疙瘩的相关性研究还处于初级阶段,其具体的信号转导路径及作用和具体影响作用还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Datubo-Brown D D. Keloids: a review of the literature[J]. Br J Plast Surg, 1990, 43(1): 70-77.
- [2] Wolfram D, Tzankov A, Püzl P, et al. Hypertrophic scars and keloids—a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management[J]. Dermatol Surg, 2009, 35(2): 171-181.
- [3] Butler P D, Longaker M T, Yang G P. Current progress in keloid research and treatment[J]. J Am Coll Surg, 2008, 206(4): 731-741.
- [4] Tsutsumi S, Hogan V, Nabi I R, et al. Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts[J]. Cancer Res, 2003, 63(1): 242-249.
- [5] Tsutsumi S, Gupta S K, Hogan V, et al. Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling[J]. Cancer Res, 2002, 62(15): 4484-4490.
- [6] 张军波, 牙祖蒙. 肿瘤侵犯相关蛋白自分泌运动因子在瘢痕疙瘩中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3663-3666.
- [7] Zhang J B, Ya Z M. Expression of autocrine motility factor in keloid[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2012, 16(20): 3663-3666.
- [8] Bauer M, Su G, Beebe D J, et al. 3D microchannel co-culture: method and biological validation[J]. Integr Biol (Camb), 2010, 2(7-8): 371-378.
- [9] van de Kar A L, Kreulen M, Van Zuijlen P P, et al. The results of surgical excision and adjuvant irradiation for therapy-resistant keloids: a prospective clinical outcome study[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(7): 2248-2254.
- [10] Juckett G, Hartman-Adams H. Management of keloids and hypertrophic scars[J]. Am Fam Physician, 2009, 80(3): 253-260.
- [11] 贺肖洁, 韩春茂, 马奇, 等. 瘢痕疙瘩发病机制的研究进展[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(1): 56-59.
- [12] He X J, Han C M, Ma Q, et al. Advance in pathogenesis of keloid[J]. Chinese Journal of Burns, 2002, 18(1): 56-59.
- [13] 姜笃银, 付小兵, 盛志勇, 等. 瘢痕组织愈合中成纤维细胞凋亡抗性及其临床意义[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(7): 496-498.
- [14] Jiang D Y, Fu X B, Sheng Z Y, et al. The ability of Anti-apoptosis and clinical significance in Keloid-derived fibroblast[J]. Chinese Journal of Surgery, 2006, 44(7): 496-498.
- [15] Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, et al. Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy[J]. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(4): 749-759.
- [16] Timar J, Trikha M, Szekeres K, et al. Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion[J]. Cancer Res, 1996, 56(8): 1902-1908.
- [17] Funasaka T, Haga A, Raz A, et al. Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285(1): 118-128.
- [18] 吴莹, 尚经轩, 白定群, 等. 正常皮肤与瘢痕疙瘩增殖-凋亡差异性的比较[J]. 激光杂志, 2008, 29(6): 89-90.
- [19] Wu Y, Shang J X, Bai D Q, et al. Comparison the Differences Between keloid and normal skin according to the level of proliferation and apoptosis[J]. Laser Journal, 2008, 29(6): 89-90.

(责任编辑: 冉明会)