

· 皮肤性病科用药专栏 ·

粉防己碱对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

冯幼平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院整形美容外科, 武汉 430030)

[摘要] 目的 观察粉防己碱(tetrandrine, Tet)对增生性瘢痕成纤维细胞增殖及 MEK/ERK、MKP-1 信号通路的影响。方法 培养增生性瘢痕成纤维细胞,四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法、 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入率测定不同浓度 Tet 对细胞增殖的抑制作用;免疫沉淀法纯化蛋白并细胞外信号调节激酶(ERK)试剂盒测定 ERK 活性;Western-blot 测定 p-MEK_{1/2}、p-ERK_{1/2}及蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1)表达。结果 MTT 实验、 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入率均显示 Tet 明显抑制细胞增殖,同时 Tet 明显抑制 ERK 活性,Western-blot 显示 Tet 明显抑制 p-MEK_{1/2}及 p-ERK_{1/2}表达,同时提高 MKP-1 表达。结论 粉防己碱明显抑制增生性瘢痕成纤维细胞增殖,机制与下调 ERK 活性,抑制 MEK/ERK 通路及上调 MKP-1 表达有关。

[关键词] 粉防己碱;成纤维细胞;增殖;细胞外信号调节激酶

[中图分类号] R986;R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)12-1455-03

Effects of Tetrandrine on the Proliferation of Hypertrophic Scar Fibroblasts *in Vitro*

FENG You-ping (Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Tongji Hospital Affiliated to the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of tetrandrine (Tet) on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*. **Methods** The effects of Tet on proliferation of fibroblasts were identified by MTT assay, $[^3\text{H}]$ -TdR incorporation and flow cytometry. ERK activity was measured by immuno-precipitation. p-MEK_{1/2}, p-ERK_{1/2} and MKP-1 expressions were assessed by Western blot. **Results** Tet can depress the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts and ERK activity. The p-MEK_{1/2} and p-ERK_{1/2} expressions were inhibited, and MKP-1 expression was increased by different concentrations of Tet. **Conclusion** The proliferation of fibroblasts is able to be depressed by Tet in the dose dependent manner through down-regulating ERK signaling.

KEY WORDS Tetrandrine; Fibroblast; Proliferation; Extracellular signal-regulated kinase

皮肤损伤后成纤维细胞增殖,胶原蛋白、氨基多聚糖等细胞外基质的过度沉积可形成增生性瘢痕,严重者可影响人的美观并导致功能障碍,然治疗效果并不理想。故对增生性瘢痕的形成机制和防治的研究一直是整形美容外科领域一个非常重要的课题。我国传统中药粉防己的有效成分粉防己碱(tetrandrine, Tet)具有抗炎、镇痛、降血压等药理作用,临床上主要用于治疗心律失常、心肌缺血、肺纤维化等疾病,具有良好疗效^[1]。近年来的研究表明, Tet 可作为一种潜在的抗纤维化药物^[2],但其对瘢痕成纤维细胞的作用笔者尚未见报道。因此笔者拟探讨 Tet 对瘢痕成纤维细胞株生长作用及 MEK/ERK、MKP-1 信号通路的影响,探索其抑制增生性瘢痕成纤维细胞生长的可能机制,为从阻断信号通路角度治疗增生性瘢痕提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 Tet (浙江金华制药厂,批准文号:国药准

字 Z34020911),溶解于二甲亚砜(DMSO,终浓度为 0.02%,一般认为 DMSO < 0.1% 时,不引起细胞生物学性状的改变),过滤除菌保存,临用时以适量的培养液稀释到实验所需浓度。胰蛋白酶、DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自武汉众一生物公司。细胞外信号调节激酶(ERK)活性测定试剂盒购于 Chemicon 公司。PMSF、aprotinin 购自 Sigma 公司;小鼠抗大鼠 p-MEK_{1/2}、p-ERK_{1/2}、蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1)单克隆抗体、化学发光试剂 ECL 购自 Santa Cruz 公司。垂直电泳仪及转膜系统购自 Biorad 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 瘢痕组织取材 增生性瘢痕标本取自华中科技大学同济医学院附属同济医院整形美容外科 2005 年 8~10 月切取的烧伤后形成的增生性瘢痕。实验完成时间为 2005 年 12 月~2006 年 1 月。取材标准:①增生性瘢痕,瘢痕色泽红,质硬,高出皮肤表面,均为烧伤创面愈合 > 3 个月,但瘢痕仍持续增生,瘢痕局部无感染和溃疡,均未曾使用抗瘢痕药物、弹力加压、放疗等方法治疗;②患者无高血压、肝硬化、肺纤维化、慢性肾

[收稿日期] 2008-03-14 **[修回日期]** 2008-04-24

[作者简介] 冯幼平(1963-),男,湖北武汉人,主治医师,硕士,主要从事整形美容外科工作。电话:027-61341396, E-mail: fengyouping@yahoo.com.cn。

炎、心肌梗死等疾病;③患者无全身感染、肿瘤;④无结缔组织疾病或可能影响结缔组织代谢的疾病,未全身应用皮质类固醇等药物治疗。

1.3 成纤维细胞的培养 采用组织块法进行原代培养,将手术中切下的符合条件的增生性瘢痕在无菌条件下切除其表皮,在少量胎牛血清中将标本切成大小为 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 组织块置于培养瓶中,95%空气,5%二氧化碳(CO_2)、 $37\text{ }^\circ\text{C}$,饱和湿度条件下培养6~8 h,使组织块牢固黏附在瓶壁上,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养,3~4 d换液1次,2~3周后,原代细胞生长成单层,按1:3的比例传代,实验用第3~5代细胞。待细胞基本长满瓶后,加入Tet。根据所加试剂不同分为4组,对照组(培养基)、实验A组(Tet $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、实验B组(Tet $20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、实验C组(Tet $40\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),观察其对成纤维细胞的作用。

1.4 MTT 比色 消化对数增殖期细胞以每孔 2×10^4 个细胞接种于96孔板,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%二氧化碳、饱和湿度培养。当细胞达到接近汇合状态时,每孔加入200 μL 无血清培养液,12 h后弃培养液。加入如上分组的不同浓度Tet及培养液。各组继续培养48 h后,每孔加MTT溶液($5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)20 μL 。孵育4 h后弃培养液,每孔加入DMSO 150 μL ,振荡10 min,用酶联免疫检测仪读取每孔吸光度(A)(测量波长620 nm,参考波长490 nm)。根据公式计算细胞增殖率(%):实验组A/对照组A $\times 100\%$ 。

1.5 DNA 合成($[^3\text{H}]$ -TdR 掺入率)的测定 成纤维细胞接种到24孔培养板,贴壁生长至汇合状态后,更换无血清培养液,继续培养48 h,使成纤维细胞处于 G_0/G_1 期。更换新的培养液(含0.4% FCS-DMEM及 $0.3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素C),加入上述浓度的Tet干预,同时每孔加入 $37 \times 10^6\text{ Bq} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $[^3\text{H}]$ -TdR,共育24 h后,0.25%胰酶消化并收集细胞。在孔径 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的醋酸纤维素微孔滤膜上负压抽滤,0.9%氯化钠溶液和10%三氯乙酸冲洗滤膜,95%乙醇溶液脱色,烘干后置入闪烁瓶中,加入二甲苯闪烁液4 mL,静置过夜后,在液体闪烁仪计数器(Tri-carb2300,美国Packard公司)上进行放射性强度的测定。

1.6 细胞质蛋白提取 细胞先经过冷磷酸盐(PBS)液冲洗3遍,置于400 μL 冰浴缓冲液(HEPES $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.9;氯化钾 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、EDTA $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、EGTA $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、DTT $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、PMSF $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、aprotinin 1和leupeptin 1)充分匀浆。匀浆液冰浴30 min后加入

33 μL 10% NP-40 并剧烈振荡30 s。匀浆液于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 11 000 g 离心1 min,含细胞质蛋白的上清液进行定量后冻存于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.7 ERK 活性测定 取0.5 mL蛋白样品,加入抗ERK抗体10 μL , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育12 h。加入含50%体积比蛋白A的琼脂糖20 μL ,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育2 h。然后经 $1\text{ 800 r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心1 min,弃上清液,加入1 mL裂解液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育10 min后离心;再重复两次,第3次用适量激酶活性测定缓冲液代替裂解液。弃去上清液,沉淀的蛋白进行激酶活性测定,在酶标仪450 nm处读取吸光度。计算实验组吸光度/对照组吸光度(活性比),以此比值来衡量各组ERK活性。

1.8 Western blot 以上述提取的细胞质蛋白和核蛋白点样,每泳道20 μg ,经SDS/PAGE电泳后,电转至硝酸纤维素膜。室温封闭3 h,加p-MEK $_{1/2}$ 、p-ERK $_{1/2}$ 、MKP-1一抗,室温下孵育2 h,再加辣根过氧化物酶标记二抗,室温下孵育1 h,采用ECL显色试剂盒进行2~5 min显色,拍摄照片,记录结果。

1.9 统计学方法 所有数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用统计程序软件包(SPSS 10.0 for Windows)进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞增殖率 以对照组增殖率为(100.00 \pm 0.00)%。MTT比色法结果显示($n=6$),实验组(10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)细胞增殖率分别为(85.26 \pm 7.33)%,(75.32 \pm 9.26)%,(67.15 \pm 8.56)% ,与对照组比较明显降低($P < 0.05$)。

2.2 DNA 合成($[^3\text{H}]$ -TdR 掺入率) 以对照组 $[^3\text{H}]$ -TdR掺入率为(100.00 \pm 0.00)%。结果显示($n=6$),实验组(10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $[^3\text{H}]$ -TdR掺入率分别为(83.12 \pm 9.63)%,(71.56 \pm 8.62)%,(60.58 \pm 7.39)% ,与对照组比较明显降低($P < 0.05$)。提示Tet可有效抑制成纤维细胞DNA合成。

2.3 成纤维细胞ERK活性 以对照组ERK活性为(100.00 \pm 0.00)%。实验组(10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)ERK活性分别为(82.97 \pm 8.15)%,(73.71 \pm 9.77)%,(69.78 \pm 7.78)% ,与对照组比较明显降低($P < 0.05$)。

2.4 p-MEK $_{1/2}$ 、p-ERK $_{1/2}$ 及MKP-1表达 为证实Tet抑制成纤维细胞增殖的机制,用免疫印迹法检测各组p-MEK $_{1/2}$ 、p-ERK $_{1/2}$ 及MKP-1表达,结果显示Tet显著降低p-MEK $_{1/2}$ 、p-ERK $_{1/2}$ 表达同时上调MKP-1表达($n=6$)。见表1。

表 1 Tet 对成纤维细胞 p-MEK_{1/2}、p-ERK_{1/2}、MKP-1 表达的影响

组别	p-MEK _{1/2}	p-ERK _{1/2}	MKP-1
A 组(Tet10 μmol · L ⁻¹)	0.80 ± 0.10 ^{*1}	0.83 ± 0.13 ^{*1}	0.58 ± 0.09 ^{*1}
B 组(Tet20 μmol · L ⁻¹)	0.70 ± 0.09 ^{*2}	0.70 ± 0.09 ^{*2}	0.71 ± 0.10 ^{*2}
C 组(Tet40 μmol · L ⁻¹)	0.61 ± 0.07 ^{*2}	0.62 ± 0.08 ^{*2}	0.79 ± 0.06 ^{*2}
对照组	0.88 ± 0.09	0.94 ± 0.11	0.49 ± 0.11

与对照组比较, ^{*1}P < 0.05, ^{*2}P < 0.01

3 讨论

创伤愈合是人体组织修复的过程,而瘢痕超常形成是过度愈合或愈合紊乱的结果。成纤维细胞大量增殖和胶原蛋白过度合成是形成瘢痕疙瘩的主要原因。研究表明,任何非手术治疗瘢痕有效的方法,均应直接或间接针对抑制成纤维细胞增殖和调整胶原代谢异常这一重要环节^[3]。Tet 作为一种潜在抗纤维化药物,对瘢痕成纤维细胞增殖可能具有抑制作用,有望成为治疗增生性瘢痕的新药。

ERK 信号通路是细胞增殖机制的重要一环^[4],处于细胞质信号转导通路的终末位置,主要被各种生长因子、离子射线、过氧化氢等激活而磷酸化(p-ERK),进入细胞核作用于 c-myc、AP-1、NF-κB 等转录因子,促进某些基因的转录与表达,与细胞的增殖密切相关,在细胞生长、发育、分裂、死亡及恶性转化等过程中起重要作用^[4,5]。而作为 ERK 上游的信号分子,ERK 激酶(MEK)可磷酸化 ERK 使其激活^[6,7],而丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1)可使 ERK 去磷酸化失活而起负反馈调节作用,直接影响 ERK 激活的数量和活化的持续时间。

本研究利用培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞,以 MTT 比色法、^[3H]-TdR 掺入率测定不同浓度 Tet 对成纤维细胞增殖的影响,显示各浓度 Tet 均明显抑制成纤维细胞增殖;ERK 免疫沉淀活性试剂盒测定 Tet 对 ERK 活性的影响,结果显示 Tet 明显抑制 ERK 活性;进一步用 Western-blot 测定 p-MEK_{1/2}、p-ERK_{1/2} 及 MKP-1 表

达,数据显示其显著抑制 p-MEK_{1/2} 及 p-ERK_{1/2} 表达,说明 Tet 对 MEK/ERK 通路的活化具有抑制作用。同时 Tet 可上调 MKP-1 表达,说明其还可通过增加磷酸酶的表达而加强 ERK 的去磷酸化失活。综上所述,Tet 成纤维细胞增殖的核心机制可能是调控 ERK 通路,一方面通过调控 MEK,抑制 ERK 的活化,另一方面通过上调 MKP-1 表达,促进 p-ERK 去磷酸化。

Tet 抑制成纤维细胞增殖的作用为治疗增生性瘢痕提供了新的思路,但其药理作用是否存在其他机制,而体内对增生性瘢痕作用及毒副作用如何,均待深入研究。

[参考文献]

- [1] KWAN C Y, ACHIKE F I. Tetrandrine and related bisbenzylisoquinoline alkaloids from medicinal herbs: cardiovascular effects and mechanisms of action[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(12):1057-1068
- [2] 王志荣. 粉防己碱药理作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(5):488-492.
- [3] PHAN T T, SUN L, BAY B H, et al. Dietary compounds inhibit proliferation and contraction of keloid and hypertrophic scar-derived fibroblasts *in vitro*: therapeutic implication for excessive scarring[J]. *J Trauma*, 2003, 54(6):1212-1216.
- [4] ANDRESEN B T, RIZZO M A, SHOME K, et al. The role of phosphatidic acid in the regulation of the ras/MEK/Erk signaling cascade[J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(1):65-68.
- [5] WEBB C P, VAN AELST L, WIGLER M H, et al. Signaling pathways in ras-mediated tumorigenicity and metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(15):8773-8778.
- [6] SOLIT D B, GARRAWAY L A, PRATILAS C A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition[J]. *Nature*, 2005, 439(7074):358-362.
- [7] FAVATA M F, HORIUCHI K Y, MANOS E J, et al. Identification of a novel mitogeninhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(29):18623-18632.