

研究论文

脂氧素A₄对瘢痕成纤维细胞生物学活性的影响及机制研究周晓燕^{1*} 况晓东² 黄永红¹ 徐方云¹ 蔡震宇¹ 王红梅^{1*}(南昌大学医学院病理生理学教研室, 南昌 330006; ²南昌大学医学院病理学教研室, 南昌 330006)

摘要 最新文献表明, 脂氧素A₄(lipoxin A₄, LXA₄)对组织纤维化及相关疾病有防治作用。为了观察脂氧素A₄对瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡和胶原合成的影响并探讨其抗瘢痕形成的机理, 该文首先通过RT-PCR和Western blot法检测瘢痕成纤维细胞是否表达脂氧素受体ALX; 然后将不同浓度脂氧素A₄加入瘢痕成纤维细胞培养液中分别作用相应时间后, MTT法检测细胞的增殖程度, 流式细胞仪检测细胞的凋亡情况, 羟脯氨酸测试盒检测细胞培养液中羟脯氨酸含量, ELISA法检测细胞培养上清中TGF-β水平。结果发现, 瘢痕成纤维细胞表达ALX, 脂氧素A₄抑制瘢痕成纤维细胞增殖、羟脯氨酸释放及TGF-β分泌, 同时还诱导细胞凋亡。综上所述, 脂氧素A₄抑制瘢痕成纤维细胞增殖和胶原合成并诱导其凋亡, 可能是防治瘢痕形成的重要潜在药物。

关键词 脂氧素; 瘢痕; 增殖; 凋亡

The Effect and Mechanism of Lipoxin A₄ Suppressing Scar FormationZhou Xiaoyan^{1*}, Kuang Xiaodong², Huang Yonghong¹, Xu Fangyun¹, Cai Zhenyu¹, Wang Hongmei^{1*}

(¹Medical College of Nanchang University Department of Pathophysiology, Nanchang 330006, China; ²Medical College of Nanchang University Department of Pathology, Nanchang 330006, China)

Abstract It was reported that Lipoxin A₄ (LXA₄) could prevent and cure tissue fibrosis and related disease. In this paper, we observed the effects of LXA₄ on the proliferation, apoptosis and collagen synthesis of keloid fibroblast, and analyzed the possible mechanisms. Firstly, we tested the expression of ALX through RT-PCR and Western blot. Then, we examined the proliferation by MTT, the apoptosis through flow cytometry, the degree of collagen synthesis with hydroxyproline testing cassette, and the level of TGF-β via ELISA. The data demonstrated that ALX was expressed in hyperplastic scar fibroblast cell, LXA₄ inhibited the proliferation and collagen synthesis, LXA₄ induced cell apoptosis and LXA₄ decreased the level of TGF-β. It seemed LXA₄ was an important potential drug for prevention and control of scar formation.

Key words lipoxin; scar; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2012-11-22 接受日期: 2013-01-06

国家自然科学基金(批准号: 81100299)、江西省自然科学基金(批准号: 20114BAB215010)和江西省卫生厅科技计划(批准号: 20122020)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0791-86360562, E-mail: zhouxiaoyan@ncu.edu.cn; Tel: 0791-86360562, E-mail: wanghongmay@hotmail.com

Received: November 22, 2012 Accepted: January 6, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81100299), Jiangxi Province Natural Science Fund (Grant No.20114BAB215010) and the Foundation of the Health Department of Jiangxi Province (Grant No.20122020)

*Corresponding authors. Tel: +86-791-86360562, E-mail: zhouxiaoyan@ncu.edu.cn; Tel: +86-791-86360562, E-mail: wanghongmay@hotmail.com

脂氧素(lipoxins, LXs)是机体最重要的内源性促炎症缓解因子之一。现已证实, LXs在促炎介质前列腺素和白三烯之后产生, 对多种炎症细胞和炎症相关基因有显著的负性调节作用, 是炎症反应的重要“刹车信号”^[1-2]。更重要的是, 已有资料初步表明, LXs可以调节纤维组织生成, 例如, LXs抑制肺囊性纤维化^[3]、抑制系膜细胞增殖和肾纤维化^[4]、抑制NIH3T3成纤维细胞增殖和胶原合成^[5]。综上所述, LXs同时具备促进炎症缓解和抗纤维化之功效, 同时, 这些资料提示LXs可能存在抗瘢痕作用。为此, 本研究观察了脂氧素A₄(Lipoxin A₄, LXA₄)对瘢痕成纤维细胞KELF1B(CRL-1762)增殖、凋亡及胶原合成的影响, 并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基为Gibco公司产品, 胎牛血清购自浙江三利生物技术有限公司, LXA₄购自Cayman公司, TGF- β ELISA试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, Lipoxin A₄ receptor(ALX)一抗购自Santa Cruz公司, CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒和 β -actin一抗购自碧云天生物技术研究, 羟脯氨酸测试盒购自南京建成生物工程研究所, Annexin V/PI试剂盒为Bender(Bender MedSystems Inc. USA)公司产品。

1.2 细胞培养与分组

瘢痕成纤维细胞KELF1B(CRL-1762)(购自美国菌种保藏中心, ATCC)用DMEM培养液培养在培养板中, 培养液中加入10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素, 细胞培养在37 °C、5% CO₂培养箱中。在进行实验前无血清化细胞24 h。实验分为空白对照组和不同浓度脂氧素处理组。

1.3 RT-PCR检测脂氧素受体ALX基因表达

采用TRIzol法提取各样品总RNA, 测定浓度定量后取4 μ g进行逆转录, 总反应体积为25 μ L。然后, 取1 μ L逆转录产物进行PCR反应。目的基因ALX上游引物为: 5'-CAC CAG GTG CTG CTG GCA AG-3', 下游引物为: 5'-AAT ATC CCT GAC CCC ATC CTCA-3', 退火温度57 °C, 产物大小383 bp。内参 β -actin上游引物为: 5'-GAA ATC GTG CGT GAC ATT AAG-3', 下游引物为: 5'-CTA GAA GCA TTT GCG

GTG GA-3', 退火温度54.5 °C, 产物大小490 bp。PCR反应条件为首先95 °C预变性5 min; 然后94 °C变性30 s, 57 °C(或54.5 °C)退火60 s, 72 °C延伸60 s, 共循环30次; 最后72 °C延伸10 min。产物于2%琼脂糖凝胶电泳后照相并分析图像。

1.4 免疫印迹法检测ALX蛋白表达水平

提取总蛋白, BCA法测定浓度。加入相应体积的loading buffer后煮沸变性, 取40 μ g蛋白样品上样, 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V电转移至硝酸纤维素膜上, 将硝酸纤维素膜置于5%脱脂奶粉中室温封闭1 h, 硝酸纤维素膜置于稀释的ALX或 β -actin一抗(1:200)中4 °C孵育过夜, TBST(TBS+0.05% Tween-20)洗膜3次, 再置于稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)中37 °C温育1 h, TBST洗膜3次。将配好的ECL工作液滴加至硝酸纤维素膜的正面, 反应5 min后, 曝光于X光胶片上, 显影、定影, 扫描后进行图像分析。

1.5 细胞增殖检测

细胞悬液接种于96孔培养板内, 各组细胞预处理后, 每孔加入10 μ L CCK-8试剂, 37 °C继续培养4 h, 酶标仪450 nm测定 D_{450} 值。

1.6 细胞凋亡分析

各组细胞预处理后, 收集细胞, PBS洗涤细胞2次, 先后加入5 μ L Annexin V和10 μ L PI, 避光孵育10 min, 冷PBS洗涤细胞2次, 最后通过流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

1.7 羟脯氨酸释放实验(总胶原含量测定)

各组细胞预处理后, 收集培养上清, 严格按照羟脯氨酸测试盒说明书的要求操作。

1.8 ELISA试剂盒检测细胞培养上清TGF- β 分泌水平

各组细胞预处理后, 收集培养上清, 严格按照试剂盒说明书的要求依次加入样品或标准品、生物素化抗体、酶结合物工作液、显色液、显色终止液, 最后酶标仪450 nm测定 D_{450} 值。

1.9 统计学分析

采用SPSS19.0软件进行数据处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 瘢痕成纤维细胞表达ALX

RT-PCR和Western blot结果(图1)显示, 阴性对

照组(HEK293细胞)没有任何条带, 而瘢痕成纤维细胞组有明显的条带, 说明瘢痕成纤维细胞表达脂氧素受体。

2.2 LXA₄对瘢痕成纤维细胞增殖的影响

不同浓度LXA₄与瘢痕成纤维细胞共同培养48 h, MTT法检测发现, LXA₄呈浓度依赖性地抑制瘢痕成纤维细胞增殖(图2)。

2.3 LXA₄对瘢痕成纤维细胞凋亡的影响

100 nmol/L LXA₄与瘢痕成纤维细胞共同培养48 h, 经流式细胞仪检测发现, LXA₄明显诱导瘢痕成纤维细胞凋亡, 其凋亡率增加8.2倍(图3)。

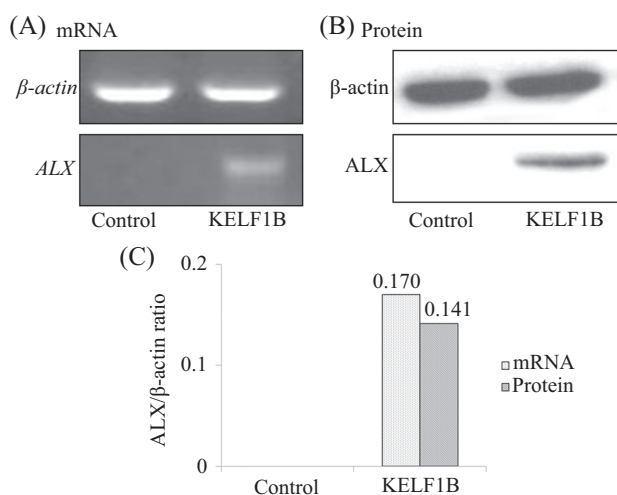
2.4 LXA₄对瘢痕成纤维细胞分泌羟脯氨酸的影响

不同浓度LXA₄与瘢痕成纤维细胞共同培养48 h, 经羟脯氨酸释放实验检测发现, LXA₄抑制瘢痕成纤维

细胞分泌羟脯氨酸, 并且呈现明显的浓度依赖性(图4)。

2.5 LXA₄对瘢痕成纤维细胞分泌TGF-β₁的影响

不同浓度LXA₄与瘢痕成纤维细胞共同培养48 h后, 利用ELISA试剂盒测定培养上清TGF-β₁含量。结果提示, LXA₄呈浓度依赖性地抑制瘢痕成纤维细胞分泌TGF-β₁(图5)。

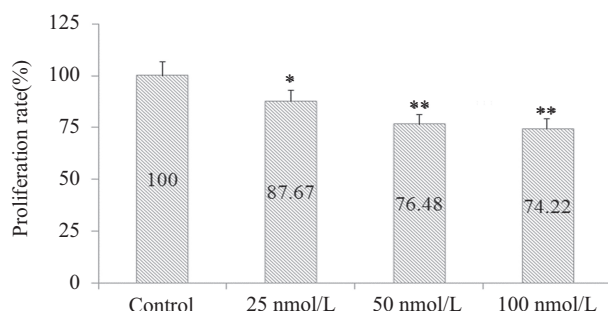


对照组为HEK293细胞, $n=4$ 。

Control is HEK293 cell, $n=4$ 。

图1 瘢痕成纤维细胞表达ALX

Fig.1 Expression of ALX on KELF1B fibroblast cell



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。 $n=8$ 。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. $n=8$ 。

图2 LXA₄抑制瘢痕成纤维细胞增殖

Fig.2 LXA₄ inhibited the proliferation of keloid fibroblast

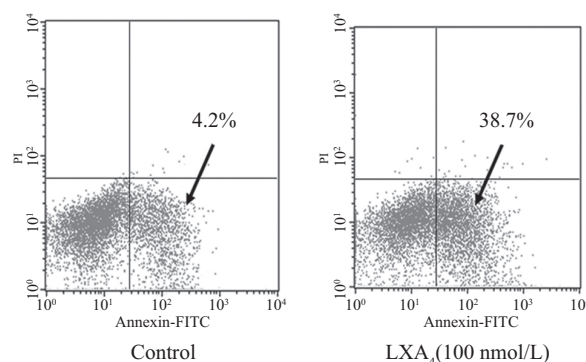
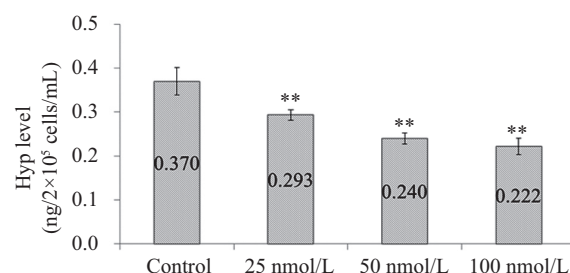


图3 LXA₄诱导瘢痕成纤维细胞凋亡

Fig.3 LXA₄ induced the apoptosis of keloid fibroblast

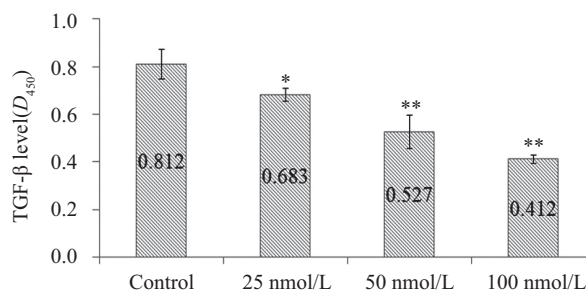


** $P<0.01$, 与对照组比较。 $n=8$ 。

** $P<0.01$ vs control group. $n=8$ 。

图4 LXA₄对瘢痕成纤维细胞分泌羟脯氨酸的影响

Fig.4 The effect of LXA₄ on Hyp production in keloid fibroblast



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。 $n=8$ 。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. $n=8$ 。

图5 LXA₄对TGF-β₁分泌的影响

Fig.5 The effect of LXA₄ on the secretion of TGF-β₁ in keloid fibroblast

3 讨论

增生性瘢痕是组织过度增生形成的一种病理性瘢痕。目前,治疗增生性瘢痕的方法主要包括手术切除、激素治疗、抗代谢药、免疫抑制剂、放射治疗、物理疗法等,但效果均不能令人满意^[6-7]。增生性瘢痕既影响患者外观又导致严重的功能障碍,是整形领域急需解决的重大课题。瘢痕组织的成纤维细胞过度增殖、凋亡受抑制并分泌大量的细胞外基质,上述异常的细胞生物学行为是增生性瘢痕形成的主要原因^[8]。因此,抑制瘢痕成纤维细胞生物学行为是防治瘢痕形成与发展的关键。最新研究表明,LXA₄对组织纤维化及其相关疾病有预防及治疗作用^[3-5]。为此,本实验观察并分析了LXA₄对瘢痕成纤维细胞的增殖活力、凋亡水平及胶原合成能力的影响,并初步探讨了其机制,为临床上瘢痕的防治提供实验依据。

由于LXA₄主要通过受体ALX发挥其下游的生物学效应,在进行LXA₄对瘢痕成纤维细胞生物学活性影响的研究之前,我们检测了瘢痕成纤维细胞是否表达ALX。RT-PCR和Western blot的结果提示,瘢痕成纤维细胞表达ALX。于是,我们进行了一系列实验研究并获得如下结果。首先,台盼蓝染色实验提示25~100 nmol/L脂氧素对瘢痕成纤维细胞无直接细胞毒性作用。MTT法检测发现,LXA₄明显抑制瘢痕成纤维细胞增殖并呈现浓度依赖性。其次,本实验通过Annexin V/PI双染法对凋亡细胞进行流式细胞仪检测。结果表明,LXA₄处理组凋亡指数明显升高,与空白对照组相比,凋亡率增加8.2倍,差异具有显著性。最后,本实验还检测了羟脯氨酸的释放水平。羟脯氨酸是胶原分解代谢的产物,机体内的羟脯氨酸主要存在胶原中,因此,羟脯氨酸是反映胶原含量的重要指标。结果提示,LXA₄使瘢痕成纤维细胞分泌的羟脯氨酸明显减少,即LXA₄抑制瘢痕成纤维细胞胶原合成。以上的实验结果提示,LXA₄对瘢痕的防治具有潜在的应用前景。

转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)由成纤维细胞分泌,被认为是最强的促纤维化生长因子,在创伤修复过程中,可趋化巨噬细胞及中性粒细胞至创面,促进增生性瘢痕成纤维细胞增殖,并可增加创面胶原纤维和蛋白表达,是增生性瘢痕形成过程中重要调控因子^[9-10]。Martins等^[3]研究表明,LXA₄通过减少TGF- β 1分泌而抑制肺纤维

化。为此,我们进一步检测了LXA₄对TGF- β 1分泌的影响,结果表明LXA₄抑制瘢痕成纤维细胞分泌TGF- β 1。这可能是LXA₄抑制瘢痕成纤维细胞增殖和胶原合成的重要机制之一,但LXA₄如何影响其下游信号通路,如TGF- β /Smad通路,有待进一步深入研究。

促进瘢痕成纤维细胞凋亡是抗疤的重要策略之一。本研究发现,脂氧素可以诱导瘢痕成纤维细胞凋亡,凋亡率约增加8.2倍,但脂氧素诱导其凋亡的具体机制有待进一步深入研究。Messadi等报道^[11],在瘢痕成纤维细胞NF- κ B信号通路的几种组分明显高于正常组织,提示NF- κ B在瘢痕发病机理中起重要作用;通过基因芯片和Western blot发现,促炎因子、抗凋亡基因表达上调,而这些分子均可被NF- κ B直接激活,大量抗凋亡蛋白高表达时成纤维细胞的分化增殖能力明显加强,则表现出强大的抗凋亡能力,因此瘢痕组织形成。上述实验提示,NF- κ B对瘢痕的影响可能通过调控细胞凋亡实现。这些实验结果与各种肿瘤细胞的结果一致,都证明NF- κ B活化使细胞具有更强抵抗凋亡而促进生长的能力。另有文献报道,可以诱导脂氧素生成的阿斯匹林抑制瘢痕成纤维细胞NF- κ B活化^[12],并且脂氧素也可以抑制NF- κ B及通路相关组分活化^[13-14]。我们推测脂氧素促进瘢痕成纤维细胞凋亡可能与其抑制NF- κ B活化相关。

综上所述,LXA₄抑制瘢痕成纤维细胞生物学行为,其抑制作用可能与其下调TGF- β 1表达相关,是新的防治瘢痕形成的潜在药物。

参考文献 (References)

- 1 Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel anti-inflammatory- pro-resolving mediators and their receptors. *Curr Top Med Chem* 2011; 11(6): 629-47.
- 2 Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: A new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol* 2008; 153(suppl 1): S200-15.
- 3 Martins V, Valenca SS, Farias-Filho FA, Molinaro R, Simões RL, Ferreira TP, *et al.* ATLa, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog, prevents the inflammatory and fibrotic effects of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2009; 182(9): 5374-81.
- 4 Kieran NE, Maderna P, Godson C. Lipoxins: Potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease. *Kidney Int* 2004; 65(4): 1145-54.
- 5 Sato Y, Kitasato H, Murakami Y, Hashimoto A, Endo H, Kondo H, *et al.* Down-regulation of lipoxin A4 receptor by thromboxane A2 signaling in RAW246.7 cells *in vitro* and bleomycin-induced lung fibrosis *in vivo*. *Biomed Pharmacother* 2004; 58(6/7): 381-7.

(下转153页)

- Chinese Journal of Cell Biology) 2002; 24(5): 289-93.
- 13 Steinberg MS, Gilbert SF, Townes and Holtfreter (1955): Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2004; 301(9): 701-6.
 - 14 Nicol A, Rappel W, Levine H, Loomis WF. Cell-sorting in aggregates of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* 1999; 112(Pt 22): 3923-9.
 - 15 Krefft M, Voet L, Gregg JH, Mairhofer H, Williams KL. Evidence that positional information is used to establish the prestalk-prespore pattern in *Dictyostelium discoideum* aggregates. *EMBO J* 1984; 3(1): 201.
 - 16 Weening KE, Wijk IV, Thompson CR, Kessin RH, Podgorski GJ, Schaap P. Contrasting activities of the aggregative and late PDSA promoters in *Dictyostelium* development. *Dev Biol* 2003; 255(2): 373-82.
 - 17 Weijer CJ, Duschl G, David CN. Dependence of cell-type proportioning and sorting on cell cycle phase in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* 1984; 70(1): 133-45.
 - 18 Sesaki H, Siu CH. Novel redistribution of the Ca^{2+} -dependent cell adhesion molecule DdCAD-1 during development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 1996; 177(2): 504-16.
 - 19 Desbarats L, Lam TY, Wong L, Siu C. Identification of a unique cAMP-response element in the gene encoding the cell adhesion molecule gp80 in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1992; 267(27): 19655-64.
 - 20 Azhar M, Manogaran P, Kennady P, Pande G, Nanjundiah V. A Ca^{2+} -dependent early functional heterogeneity in amoebae of *Dictyostelium discoideum*, revealed by flow cytometry. *Exp Cell Res* 1996; 227(2): 344-51.
 - 21 Sriskanthadevan S, Zhu Y, Manoharan K, Yang C, Siu CH. The cell adhesion molecule DdCAD-1 regulates morphogenesis through differential spatiotemporal expression in *Dictyostelium discoideum*. *Development* 2011; 138(12): 2487-97.
 - 22 Hirose S, Benabentos R, Ho HI, Kuspa A, Shaulsky G. Self-recognition in social amoebae is mediated by allelic pairs of tiger genes. *Science* 2011; 333(6041): 467-70.
 - 23 West SA, Gardner A, Griffin AS. Altruism. *Curr Biol* 2006; 16(13): R482-3.
 - 24 West SA, Griffin AS, Gardner A, Diggle SP. Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(8): 597-607.
 - 25 Queller DC, Ponte E, Bozzaro S, Strassmann JE. Single-gene greenbeard effects in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science* 2003; 299(5603): 105-6.
 - 26 Keller L, Ross KG. Selfish genes: A green beard in the red fire ant. *Nature* 1998; 394(6693): 573-5.
 - 27 Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, *et al.* FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* 2008; 135(4): 726-37.
 - 28 Kuzdzal-Fick JJ, Queller DC, Strassmann JE. An invitation to die: Initiators of sociality in a social amoeba become selfish spores. *Biol Lett* 2010; 6(6): 800-2.

(接144页)

- 6 Bloemen MC, van der Veer WM, Ulrich MM, van Zuijlen PP, Niessen FB, Middelkoop E. Prevention and curative management of hypertrophic scar formation. *Burns* 2009; 35(4): 463-75.
- 7 Gabriel V. Hypertrophic scar. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2011; 22(2): 301-10.
- 8 Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Invest* 2008; 88(12): 1278-90.
- 9 Zunwen L, Shizhen Z, Dewu L, Yungui M, Pu N. Effect of tetrandrine on the TGF- β -induced smad signal transduction pathway in human hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*. *Burns* 2012; 38(3): 404-13.
- 10 He S, Yang Y, Liu X, Huang W, Zhang X, Yang S, *et al.* Compound *Astragalus* and *Salvia miltiorrhiza* extract inhibits cell proliferation, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblasts by mediating transforming growth factor- β /Smad pathway. *Br J Dermatol* 2012; 166(3): 564-74.
- 11 Messadi DV, Doung HS, Zhang Q, Kelly AP, Tuan TL, Reichenberger E, *et al.* Activation of NF- κ B signal pathways in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2004; 296(3): 125-33.
- 12 Zhu G, Cai J, Zhang J, Zhao Y, Xu B. Abnormal nuclear factor (NF)- κ B signal pathway and aspirin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF- κ B activation in keloid fibroblasts. *Dermatol Surg* 2007; 33(6): 697-708.
- 13 Gong J, Guo S, Li HB, Yuan SY, Shang Y, Yao SL. BML-111, a lipoxin receptor agonist, protects haemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats. *Resuscitation*. 2012; 83(7): 907-12.
- 14 Zhou XY, Li YS, Wu P, Wang HM, Cai ZY, Xu FY, *et al.* Lipoxin A4 inhibited hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatoma cells. *Hepatol Res* 2009; 39(9): 921-30.