

• 论 著 •

过表达 PTEN 对 LPS 诱导的成纤维细胞周期及胶原分泌的影响*

邹曰坤¹, 石志远², 易 竞², 祝闽辉², 张 明², 宋垚垚², 叶祥柏², 于 燕^{2△}

(海军总医院:1. 干部病房综合内科;2. 烧伤整形科, 北京 100048)

摘要:目的 探索过表达第 10 号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(PTEN)对大肠杆菌细菌脂多糖(LPS)诱导的成纤维细胞(FB)周期及胶原分泌的影响。方法 体外培养增生性瘢痕患者正常皮肤成纤维细胞, 原代培养接近 80%融合时消化传代, 培养至第 3 代, 采用 0.5 μg/mL 的 LPS 刺激第 3 代正常皮肤成纤维细胞, 将携带有 PTEN 基因的缺陷型腺病毒转染 LPS 刺激后的第 3 代正常皮肤成纤维细胞。采用流式细胞仪检测细胞周期, ELISA 法检测细胞胶原分泌。结果 过表达 PTEN 基因能够抑制 LPS 处理后成纤维细胞周期 G2M 期的增加。LPS 刺激能够升高皮肤成纤维细胞中胶原的分泌, 过表达 PTEN 能够抑制 LPS 诱导的细胞胶原的分泌。结论 LPS 可增加成纤维细胞 G2M 期的数量, 增加胶原分泌, 过表达 PTEN 可阻断这种作用。

关键词:脂多糖; 成纤维细胞; PTEN; 细胞周期; 胶原**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.012**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2017)09-1190-03

Influence of excessive PTEN expression to fibroblast cycle and collagen secretion induced by LPS*

ZOU Yuekun¹, SHI Zhiyuan², YI Jing², ZHU Minhui², ZHANG Ming², SONG Yaoyao², YE Xiangbai², YU Yan^{2△}

(1. Department of Cadres Wards and General Internal Medicine; 2. Department of Burn and Plastic Surgery, Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract: Objective To explore the influence of excessive PTEN expression to fibroblast cycle and collagen secretion induced by LPS. **Methods** Normal skin fibroblast in the patient with hyperplastic scar were cultured in vitro. When the primary culture was close to 80% fusion, the digestive passage was performed, cultured to the third generation. LPS(0.5 μg/mL) was adopted to stimulate the third generation of normal skin fibroblasts. Defective adenovirus carrying PTEN gene was transfected to the third passage fibroblasts after LPS stimulation. Flow cytometer was adopted to detect the cell cycle. ELISA method was adopted to detect the secreted collagen amount. **Results** Excessive PTEN expression could inhibit the increase of G2M cell cycle induced by LPS. LPS stimulation could increase the secretion of collagen in skin fibroblasts, yet excessive PTEN expression could inhibit the secretion of collagen induced by LPS. **Conclusion** LPS could increase the amount of fibroblasts on G2M cell cycle and secretion of collagen, yet excessive PTEN expression can inhibit the effect.

Key words:LPS; fibroblasts; PTEN; cell cycle; collagen

创烧伤后留下的瘢痕因影响美观及功能障碍常常困扰患者, 虽可以通过后期整形加以修复, 但患者往往承受巨大的心理压力及经济负担。如何在创面愈合过程中减少瘢痕增生是临床工作者及科研人员一直致力探索的课题。近年发现第 10 号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(PTEN)表达降低与多脏器纤维化密切相关, PTEN 作为一个潜在的抗纤维化靶点, 被越来越多的学者所重视。课题组前期研究发现, 脂多糖(LPS)可直接作用于成纤维细胞(FB), 使其增殖、表型发生改变, 具备增生性瘢痕的特性, 基因分析提示基因变异可能是成纤维细胞表型变化的基础^[1-3]。本研究拟探索 PTEN 过表达对 LPS 诱导的成纤维细胞周期及胶原分泌的影响, 期望为增生性瘢痕的预防开辟新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本来源于海军总医院烧伤整形科收治的增生性瘢痕患者 20 例, 男 8 例, 女 12 例, 年龄 14~62 岁, 平均(35±9)岁。20 例患者均为烧伤后瘢痕增生, 为行整形手术来院。手术中每例患者均切取正常皮肤用于成纤维细胞的培养

和观察。获取标本前均征得患者本人或家属同意。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM 培养基及胰蛋白酶(Invitrogen 公司, 美国); LPS(E. coli055 : B5); 胎牛血清(中国科学院生物制品研究所, 中国); 胰蛋白酶(Invitrogen 公司, 美国); 碘化丙啶 PI 染料(Sigma 公司, 美国); 流式细胞仪(BD 公司, 美国); 酶标仪(Biotek 公司, 美国); 携带绿色荧光蛋白基因的腺病毒(Ad-GFP)(汉恒生物, 中国); 携带有 PTEN 基因的缺陷型腺病毒(Ad-PTEN)(汉恒生物, 中国); ELISA 试剂盒(Sigma 公司, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 Ad-GFP 组: 对照空载病毒干预组; Ad-GFP+LPS 组: 对照空载病毒干预之后给予 LPS 刺激; Ad-PTEN 组: PTEN 过表达病毒干预组; Ad-PTEN+LPS 组: PTEN 过表达病毒干预之后给予 LPS 刺激。

1.3.2 成纤维细胞培养 取增生性瘢痕患者正常皮肤组织, 采用黄勇等^[4]方法进行原代培养。基础培养基为 DMEM, 添加 10% 胎牛血清、青霉素及链霉素(100 U/mL)。每个 25 cm²

* 基金项目: 海军总医院 2014 创新培育基金资助项目(CXPY201416)。

作者简介: 邹曰坤, 男, 主治医师, 主要从事老年重症研究。 △ 通信作者, E-mail:yuyan301@sina.com。

培养瓶中添加 3~5 mL,于 37 °C、5% CO₂、95% 空气及饱和湿度孵箱中静置培养,每周更换培养基 2~3 次。原代培养细胞接近 80% 融合时,采用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% 乙二胺四乙酸消化,将细胞培养至第 3 代。1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液,得到 5×10^4 密度的成纤维细胞,接种于 6 孔培养板中,每孔体积 2 mL。按照实验分组分别加入 100 pfu/cell 的 Ad-GFP 0.2 mL、Ad-PTEN 0.2 mL 和 0.5 μg/mL 的 LPS 0.2 mL,孵育 48 h。

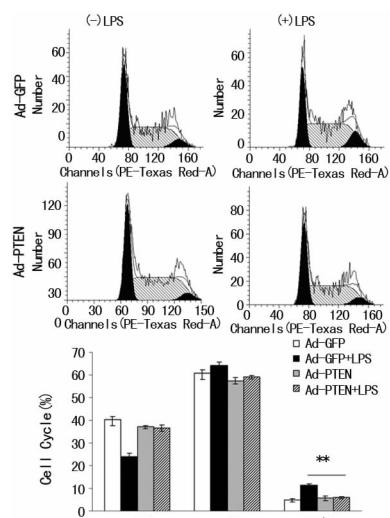
1.3.3 流式细胞仪检测过表达 PTEN 对 LPS 诱导的成纤维细胞周期的影响 0.25% 胰酶消化,当细胞形态变圆时终止消化,加入 PBS 洗涤细胞,转入 EP 管;一边振荡细胞,一边快速加入预冷的 100% 乙醇 7 mL,使得乙醇的终浓度为 70%,4 °C 冰浴过夜;1 000 r/min 离心 5 min,弃去固定液,PBS 洗涤细胞 2 次,用 300 目细胞筛过滤,1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS,用 0.5 mL 核糖核酸酶 A(10 mg 溶解于 10 mL PBS,过滤除菌)PBS 悬浮细胞,37 °C 消化 1 h。在使用流式细胞仪之前 1 h,用 0.5 mL 0.1 mg/mL 的 PI 染液重悬细胞,4 °C 避光 30 min,流式细胞仪分析细胞周期分布情况。

1.3.4 ELISA 检测过表达 PTEN 对 LPS 诱导的成纤维细胞胶原分泌的影响 按照 ELISA 检测试剂盒操作。

1.4 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 软件包进行统计分析,采用单因素方差分析(首先检验方差齐性,组间比较采用 Tukey 法),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

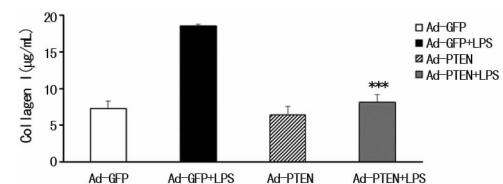
2.1 流式细胞仪检测过表达 PTEN 对 LPS 诱导的成纤维细胞周期的影响 LPS 可使成纤维细胞 G2M 期增加,将 Ad-PTEN 加入后,处于 G2M 期的成纤维细胞明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),过表达 PTEN 基因能够抑制 LPS 处理后成纤维细胞周期 G2M 期的增加,见图 1。



注:Ad-PTEN+LPS 组与 Ad-GFP+LPS 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 流式细胞仪检测过表达 PTEN 对 LPS 诱导的成纤维细胞周期的影响

2.2 ELISA 检测过表达 PTEN 对 LPS 诱导的成纤维细胞胶原分泌的影响 LPS 可导致成纤维细胞胶原分泌增加,加入 Ad-PTEN 后可明显抑制 LPS 导致的成纤维细胞胶原分泌增加,差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 2。



注:Ad-PTEN+LPS 组与 Ad-GFP+LPS 组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 2 ELISA 检测过表达 PTEN 对 LPS 诱导的成纤维细胞胶原分泌的影响

3 讨 论

增生性瘢痕在组织学上以成纤维细胞过度增生和细胞外基质过度聚集为特征,课题组前期研究发现 LPS 可直接作用于成纤维细胞,使其增殖、表型发生改变,具备增生性瘢痕的特性,基因分析提示基因变异可能是成纤维细胞表型变化的基础^[1-3]。临床中也发现烧伤创面感染越重,后期瘢痕增生往往也更为严重。课题组前期的研究已证实 LPS 可诱导人皮肤成纤维细胞发生表型改变,促使其过度增殖和细胞外基质过度聚集,从而具备增生性瘢痕成纤维细胞的生物学特性^[1-2],而基因变异可能是成纤维细胞表型变化的基础^[3]。

PTEN 是近年来发现的定位于 10q23.3 的一个肿瘤抑制基因,其编码的蛋白具有双重特异性磷酸酶活性,是目前发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,其作用机制主要是通过负性调控磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/AKT、MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)及黏着斑激酶(FAK)等信号通路,从而达到抑制肿瘤细胞周期的目的,并且能够诱导肿瘤细胞凋亡、抑制细胞黏附、迁移和转分化^[5]。PTEN 的突变或缺失与人类多种恶性肿瘤的发生密切相关。近年在对口腔黏膜纤维化、肺间质纤维化、风湿性关节炎、肾脏纤维化、眼结膜纤维化、肝硬化等纤维化疾病的研究中发现,在上述纤维化疾病组织中成纤维细胞 PTEN 表达水平受抑制,提示 PTEN 表达降低与多脏器纤维化密切相关^[6-8],而其病理特点主要为细胞外基质异常增多和过度沉积。通过腺病毒转染野生型 PTEN 到成纤维细胞中,使细胞过表达 PTEN,可以抑制纤维化肺组织肝组织及风湿性关节炎滑膜组织中成纤维细胞的增殖^[9]。因此,PTEN 作为一个潜在的抗纤维化靶点,被越来越多的学者所重视,但 LPS 与 PTEN 之间的关系目前尚缺乏研究。

本研究发现,过表达 PTEN 可对 LPS 诱导的成纤维细胞周期产生影响,LPS 可使成纤维细胞 G2M 期增加,将 Ad-PTEN 加入后,处于 G2M 期的成纤维细胞明显减少,过表达 PTEN 基因能够抑制 LPS 处理后成纤维细胞周期 G2M 期的增加。LPS 可导致成纤维细胞胶原分泌增加,加入 Ad-PTEN 后可明显抑制 LPS 导致的成纤维细胞胶原分泌增加。以上结果提示在基因水平上,LPS 可能通过调控 PTEN 的表达而使烧伤后创面形成瘢痕愈合,通过提高成纤维细胞 PTEN 表达有望阻断 LPS 导致的增生性瘢痕的形成,这将为增生瘢痕的预防开辟新的思路。

参考文献

- [1] 李凤玉,杨红明,贾国洪,等. 脂多糖对人皮肤成纤维细胞表型变化的影响及意义[J]. 华北国防医药,2010,22(3): 201-203.
- [2] 杨红明,李凤玉,柴家科. 脂多糖对皮肤(下转第 1195 页)

- fection in women with cervical histological abnormalities from an area with high incidence of cervical cancer[J]. *E-thiop Med J*, 2005, 43(3): 151-158.
- [2] 李毅. 宫颈病毒感染与宫颈癌相关因素研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(8): 1107-1108.
- [3] Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. *Lancet*, 2007, 370(9590): 890-907.
- [4] Petry KU. HPV and cervical cancer[M]// Petry KU. Breast and gynecological cancers. New York, USA: Springer, 2014: 59-62.
- [5] 张兴亮, 许俐, 王志萍. 宫颈癌相关危险因素致病风险的 Meta 分析[J]. 山东大学学报(医学版), 2012, 50(1): 155-160.
- [6] Srivastava S, Shahi UP, Dibya A, et al. Distribution of HPV genotypes and involvement of risk factors in cervical lesions and invasive cervical cancer: a study in an Indian population [J]. *Int J Mol Cell Med*, 2014, 3(2): 61-73.
- [7] Pierce Campbell CM, Menezes LJ, Paskett ED, et al. Prevention of invasive cervical cancer in the United States: past, present and future [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21(9): 1402-1408.
- [8] Motoyama S, Ladines-Llane CA, Luis Villanueva S, et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis [J]. *Kobe J Med Sci*, 2004, 50(12): 9-19.
- [9] 刘红彦, 赵晓丽, 郭社珂. 河南地区不同程度宫颈病变组织人乳头瘤状病毒感染情况分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(9): 844-846.
- [10] Coglianico V, Baan R, Straif K, et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses [J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(4): 204-209.
- [11] 黄雅, 冯玉昆, 周卓君, 等. 昆明地区妇女宫颈 HPV 感染状况[J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(2B): 71-76.
- [12] 李翀, 郑旭. 天津地区 4 232 例妇女宫颈 HPV 感染基因谱分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(10): 1571-1573.
- [13] 袁艳, 王焰, 马莉, 等. 贵州地区 8 102 例就诊妇女 21 种 HPV 亚型检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(9): 1159-1161.
- [14] Janssen RS, Holtgrave DR, Valdiserri RO, et al. The serostatus approach to fighting the HIV epidemic: prevention strategies for infected individuals [J]. *Am J Public Health*, 2001, 91(7): 1019-1024.
- [15] 李永川, 徐含青, 赵娜, 等. 重庆地区 32 882 例女性宫颈人乳头瘤病毒的感染状况调查[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(9): 1031-1034.
- [16] Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, et al. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 285(3): 771-777.
- [17] 曾昭瑛, 李亚娜, 苏建荣. 1 294 例女性高危型人乳头瘤病毒基因分型结果回顾性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(6): 796-800.
- [18] 智艳芳, 李肖甫, 班振英, 等. 河南地区女性 HPV 感染及基因型分布研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(9): 660-664.
- [19] 杨笑琼, 肖翔, 钟阳青, 等. 2 816 例妇女宫颈脱落细胞人乳头瘤病毒的检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(13): 1862-1863.
- [20] 李军, 王一羽, 田小飞, 等. 陕西省人乳头瘤病毒基因分型检测分析[J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(3): 192-196.
- [21] 李世君, 王芳. 1 803 例女性人乳头瘤病毒基因分型检测及感染情况分析[J]. 内蒙古医学杂志, 2016, 48(1): 46-48.

(收稿日期: 2016-12-14 修回日期: 2017-02-08)

(上接第 1191 页)

- 成纤维细胞生物学特性的影响及与创面愈合的关系[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(9): 873-876.
- [3] 李凤玉, 王舒琦, 刘秀芳. 内毒素对人皮肤成纤维细胞基因表达谱的影响[J]. 华南国防医学杂志, 2011, 25(2): 104-110.
- [4] 黄勇, 任林森, 岑瑛. 瘢痕成纤维细胞培养及其生物学行为的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1998, 12(6): 332-335.
- [5] Angadi PV, Krishnapillai R. Evaluation of PTEN immunoreexpression in oral submucous fibrosis: role in pathogenesis and malignant transformation[J]. *Head Neck Pathol*, 2012, 6(3): 314-321.
- [6] Liu S, Parapuram SK, Leask A. Fibrosis caused by loss of PTEN expression in mouse fibroblasts is crucially dependent on CCN2[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(11): 2940-2944.

- [7] He Z, Gao Y, Deng Y, et al. Lipopolysaccharide induces lung fibroblast proliferation through Toll-like receptor 4 signaling and the phosphoinositide3-kinase-Akt pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35926.
- [8] Chung EJ, Lee HK, Jung SA, et al. Transduction of PTEN proteins using the tat domain modulate TGF- β 1-mediated signaling pathways and transdifferentiation in subconjunctival fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 379-386.
- [9] Zheng L, Chen X, Guo J, et al. Differential expression of PTEN in hepatic tissue and hepatic stellate cells during rat liver fibrosis and its reversal [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(6): 1424-1430.

(收稿日期: 2016-12-15 修回日期: 2017-02-09)