

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.008

文章编号: 1005-8982(2017)13-0039-05

5-氨基酮戊酸光动力疗法对瘢痕成纤维细胞的作用研究

朱志娟, 王琪影, 王晓利, 宋凤敏

(郑州大学第一附属医院 整形外科, 河南 郑州 450052)

摘要:目的 研究 5-氨基酮戊酸光动力疗法(ALA-PDT)对瘢痕成纤维细胞的作用及其机制,为临床运用 ALA-PDT 治疗瘢痕疙瘩提供理论依据。**方法** 取入瘢痕成纤维细胞原代培养,并将生长状态无明显差异的瘢痕成纤维细胞随机分为空白对照组、磷酸盐缓冲液(PBS)组以及 6 个不同浓度的 5-氨基酮戊酸(ALA)培养液组。每组给予 635 nm 发光二极管(LED)激光器照射。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测 ALA-PDT 对瘢痕成纤维细胞增殖的影响,并应用实时聚合酶链反应(real-time PCR)和 Western blot 检测各组瘢痕成纤维细胞中胶原蛋白 III(Collagen III)mRNA 水平和蛋白表达水平。**结果** 与空白对照组及 PBS 组比较,CCK-8 结果表明,ALA-PDT 能抑制瘢痕成纤维细胞生长,其抑制作用随着 ALA 浓度增加逐渐增强,当 ALA 浓度为 0.500 mmol/L 时抑制作用最明显。RT-PCR 和 Western blot 结果表明,随着 ALA 浓度增大,Collagen III mRNA 水平和蛋白表达水平逐渐下降,当 ALA 溶液浓度达到 0.500 mmol/L 时下降至最低值。**结论** ALA-PDT 能有效抑制瘢痕成纤维细胞增殖,抑制作用在 ALA 浓度为 0.500 mmol/L 时最强。ALA-PDT 可能是通过抑制瘢痕成纤维细胞中 Collagen III 的合成,进而抑制瘢痕疙瘩的形成。

关键词: 5-氨基酮戊酸光动力疗法;瘢痕成纤维细胞;胶原蛋白 III

中图分类号: R751

文献标识码: A

Impact of ALA-PDT on fibroblasts from keloid and its mechanism

Zhi-juan Zhu, Qi-ying Wang, Xiao-li Wang, Feng-min Song

(Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University,
Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To study the impact of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy (ALA-PDT) on proliferation of fibroblasts from keloid and its mechanism for guiding the use of ALA-PDT treating keloid in clinic. **Methods** Fibroblasts from patients' keloid were primarily cultured, then those cells without significant difference in growth state were divided into control group, PBS group and 6 ALA groups. Each group received PDT of 635 nm light emitting diode (LED) laser irradiation. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the suppressive rate of ALA-PDT on the proliferation of the fibroblasts. RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of Collagen III. **Results** Compared with the control and PBS groups, ALA-PDT inhibited the proliferation of fibroblasts and the suppressive rate was gradually enhanced with the increase of the ALA concentration. When the concentration of ALA was 0.500 mmol/L, the inhibition was the strongest. The levels of Collagen III mRNA and protein were decreased with the increase of the ALA concentration, and the levels of Collagen III mRNA and protein were the lowest when the concentration of ALA was 0.500 mmol/L. **Conclusions** ALA-PDT could inhibit the proliferation of fibroblasts from keloid and the inhibition would be the strongest at the ALA concentration of 0.500 mmol/L. The mechanism may be associated with the suppression of the synthesis of Collagen III in scar fibroblasts.

Keywords: ALA-PDT; fibroblast; keloid; Collagen III

收稿日期: 2016-12-12

[通信作者] 王琪影, E-mail: drqqwang@163.com

瘢痕疙瘩是一种局部皮肤组织的良性纤维增生性疾病,是遗传易感个体的皮肤组织对于损伤产生病理性伤口愈合反应的产物,并以成纤维细胞的增殖和细胞外基质(特别是胶原蛋白)的大量堆积为主要特征^[1]。目前,虽然治疗瘢痕疙瘩的药物和方法有很多,但疗效有限,同时可能引起明显的不良反应和较高的复发率^[2]。因此,寻找疗效好、不良反应率和复发率低的治疗方法意义重大。

光动力疗法(photodynamic therapy,PDT)是在光敏剂的参与下,运用非热能激光照射,引起光敏剂和氧的相互作用,产生活性氧和自由基,从而诱导组织损伤的治疗方法^[3]。5-氨基酮戊酸(5-aminolevulinic acid,ALA)由甘氨酸、琥珀酸、辅酶 A 在 ALA 合成酶作用下合成,其本身并不是一种光敏剂,是体内合成亚铁血红素的前体物质,但在细胞内一些酶的作用下可转化为具有强光敏作用的原卟啉 IX (Protoporphyrin IX,PpIX)^[4]。ALA-PDT 已在皮肤性疾病领域得到越来越广泛地应用,特别是在皮肤病毒疣及皮肤肿瘤等方面具有较好的疗效。近年来,有研究证实^[5],ALA-PDT 对于瘢痕组织具有一定的疗效,陈金波等^[6]通过研究发现光动力治疗病理性瘢痕有效率与糖皮质激素局部注射治疗差异无统计学意义,但无糖皮质激素治疗的不良反应;焦健等^[7]通过研究认为 ALA-PDT 可能是通过 Akt 途径上调程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4,PD-CD4)蛋白的表达水平,促进了异常增殖的成纤维细胞的凋亡而发挥治疗作用;孔祥明等^[8]ALA-PDT 干预裸鼠瘢痕疙瘩模型,观察到瘢痕疙瘩内成纤维细胞、胶原纤维均减少,瘢痕体积亦缩小,但其最佳的作用条件以及具体的作用机制尚不明确。

为此,本研究运用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测 ALA-PDT 对瘢痕成纤维细胞的作用,实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction,real-time PCR)和 Western blot 方法检测 ALA-PDT 处理后成纤维细胞中胶原蛋白 III(Collagen III)的 mRNA 和蛋白的表达情况,探讨 ALA-PDT 治疗瘢痕疙瘩的可能机制,为临床运用 ALA-PDT 治疗瘢痕疙瘩提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

羊抗人 Collagen III 单克隆抗体购自美国 Santa

Cruz 公司,羊抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体购自美国 CST 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗羊 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,ALA 购自美国 Sigma 公司,PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit RT 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,CCK8 购自日本 Dojindo 公司。

1.2 组织来源和细胞培养

1.2.1 瘢痕成纤维细胞来源 切取外伤后 1~2 年经过病理检查证实的瘢痕疙瘩,未使用任何干预治疗,并经患者知情同意。切取后即放置于无血清 DMEM 细胞培养液的 50 ml 离心管中,放入冰盒中保存。

1.2.2 瘢痕成纤维细胞的原代培养 去除离心管内的 DMEM 细胞培养液,用 0.25% 氯霉素溶液和磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)反复冲洗,去除瘢痕组织内的血凝块,小心剪除脂肪。将瘢痕组织剪成 1 mm 宽长条状,PBS 再次反复冲洗残余凝血块,放入 15 ml 离心管中,加入 2.4 μl/ml 中性蛋白酶 II 溶液,放置于 4℃ 冰箱消化过夜。第 2 天取出离心管,吸去中性蛋白酶 II 溶液,PBS 冲洗 2 次,放入 10 cm 细胞培养皿中,加入 DMEM 细胞培养液,用眼科镊子去除表皮组织并剪成 1 mm³ 大小组织碎片后,置入 50 ml 离心管中,加入 5 倍体积的无血清 DMEM 细胞培养液配制的 0.3% I 型胶原酶溶液,37℃ 轻微震荡消化 2~3 h,以 200 目金属滤网过滤,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀用 10% 胎牛血清的 DMEM 溶液重悬,血球计数板细胞计数,将细胞悬液种于 10 cm 培养皿。在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(含 1% 青、链霉素),37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 条件下培养。

1.3 实验分组及处理

将所培养的生长状态无明显差异的瘢痕成纤维细胞接种于 96 孔板和 6 孔板,分为 8 组,包括空白对照组(A 组),PBS 组(B 组),以及 6 个 ALA 培养液组(C、D、E、F、G 和 H)。A 组只给予含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,B 组给予 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和 PBS 处理,6 个 ALA 培养液组分别给予含 0.0625(C 组)、0.125(D 组)、0.250(E 组)、0.500(F 组)、1.000(G 组)和 2.000 mmol/L(H 组) ALA 培养液的 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。5 h 后,每组给予 635 nm LED 激光器照射 10 min 后继续培养 24 h。96 孔板细胞用于 CCK-8 检测成纤维细胞增殖抑制率。6 孔板细胞用于提取 Collagen III

RNA 和蛋白。

1.4 ALA-PDT 对瘢痕成纤维细胞增殖能力的影响

向 96 孔板中每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液,将培养板在细胞培养箱内孵育 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。各药物浓度组的生长抑制率(%)=(1-实验孔平均 OD 值/对照孔平均 OD 值)×100%。

1.5 引物设计、RNA 提取和 RT-PCR

1.5.1 引物设计 RT-PCR 引物采用 Premier 5.0 软件设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成, Collagen III 正向引物:5'-AGTAGCAGTAGGAGGACT CGCAGG-3',反向引物:5'-GAAGCCTCTGTGCCTTT CA-TACC-3',引物长度 24 bp,扩增片段长度 227 bp;内参 GAPDH 正向引物:5'-ACCACAGTCC-ATGCC ATCAC-3',反向引物:5'-TCCACCACCCTGTT-GCT-GTA-3',扩增片段长度 450 bp。

1.5.2 RNA 提取和 RT-PCR 按照 Trizol 抽提说明书抽提各待测组细胞中总 RNA。Collagen III 与内参基因 GAPDH 同管扩增,扩增条件为 94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,维持 35 个循环,72℃延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后应用凝胶分析软件分析目标条带的净吸光度值。

1.6 Western blot 检测

胰蛋白酶消化培养瓶中不同组的成纤维细胞,用含血清培养基终止消化,离心,去上清,加入 PBS 洗细胞 3 次,加入裂解缓冲液,冰上放置 20 min,收集裂解液,离心,12 000 r/min,吸取上清,紫外线分光光度仪测定各待测样品浓度,分装,冷冻保存在 -80℃冰箱备用。将变性后的各蛋白样品 50 μ g/l 孔上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%的脱脂奶粉(TBST 配制)中封闭。应用 TBST 洗膜后进行免疫检测:一抗(分别为 1:1 000 羊抗人 GAPDH 和 1:400 羊抗人 Collagen III)抗体室温孵育过夜,TBST 洗膜 3 次后加入二抗(分别为辣根过氧化物酶标记的二抗 1:40 000 兔抗羊 IgG)抗体室温孵育 1 h。TBST 洗膜后采用增强化学发光法显色曝光。分析各条带净吸光度值,并以 GAPDH 作为内参,计算各蛋白样品与 GAPDH 比值作为 Collagen III 蛋白相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量

资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验或 Dunnett t3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态变化

成熟的瘢痕成纤维细胞呈梭形或不规则形,细胞间以细长突起交互相连,细胞饱满,边界清晰,贴壁良好,立体感强,胞浆丰富、均匀,细胞核清晰,呈圆形或类圆形,核内染色质均匀。经 635 nm LED 激光器照射后 10 min 的 A 组和 B 组细胞形态上比较无明显变化。6 个不同浓度的 ALA 培养液组每组给予 635 nm LED 激光器照射 10 min 后,成纤维细胞皱缩呈类球样改变,部分细胞膜、细胞壁破裂,胞内容物溢出,细胞核缩小或碎裂,胞浆内有大小不等颗粒样物,出现空泡样改变,各结构模糊(见图 1)。

2.2 ALA-PDT 抑制瘢痕成纤维细胞增殖

如表 1 和图 2 所示,ALA-PDT 能明显抑制瘢痕成纤维细胞增殖,抑制作用随着 ALA 浓度增加逐渐增强($P < 0.05$),且 ALA 浓度达到 0.500 mmol/L 时,其抑制作用达到高峰,其后抑制作用不再随着 ALA 浓度增加而增强。F 组与 C、D、E 组比较,差异有统计学意义($t=12.807、6.800$ 和 $3.151,P=0.000、0.001$ 和 0.008);G 组与 C、D、E 组比较,差异有统计学意义($t=13.099、7.092$ 和 $3.443,P=0.000、0.001$ 和 0.005);H 组与 C、D、E 组比较,差异有统计学意义($t=13.280、7.273$ 和 $3.623,P=0.000、0.001$ 和 0.003);F 组与 G、H 组比较,差异有统计学意义($t=0.473$ 和 $0.292,P=0.645$ 和 0.775);G 组与 H 组比较,差异有统计学意义($t=0.181,P=0.860$)。

2.3 Collagen III mRNA 水平

如表 2 与图 3 显示,Collagen III 和 GAPDH 扩增产物电泳条带与预期一致,ALA-PDT 处理后的成纤维细胞中 Collagen III mRNA 水平低于 A 组和 B 组。且随着 ALA 溶液浓度增加,Collagen III mRNA 的水平逐渐下降(与 A 组和 B 组相比, $P < 0.05$);当 ALA 溶液浓度达到 0.500 mmol/L 时,Collagen III mRNA 水平达到最低值,但其后不再随着 ALA 浓度增加而下降。Collagen III mRNA:C、D、E、F、G、H 组分别与 A 组比较,差异有统计学意义($t=3.943、4.294、5.326、10.076、10.340$ 和 $10.244,P=0.007、0.002、0.000、0.000、0.000$ 和 0.000);C、D、E、F、G、H 组分别与 B 组比较,差异有统计学意义($t=2.271、$

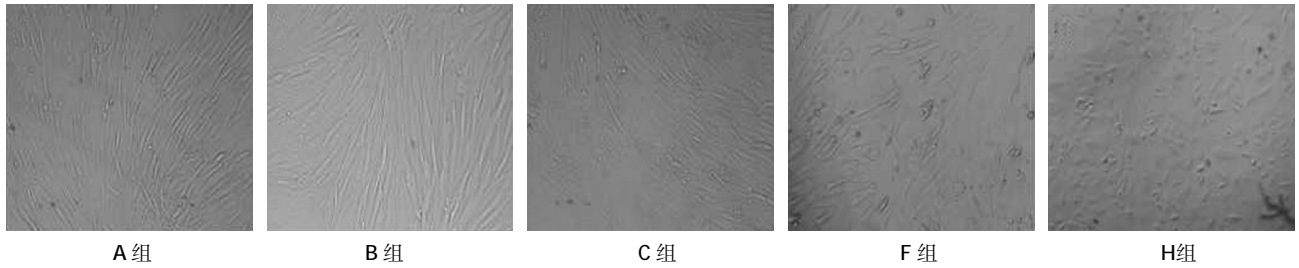


图 1 不同浓度 ALA-PDT 对瘢痕成纤维细胞状态的影响 (光学显微镜 × 200)

表 1 ALA-PDT 对瘢痕成纤维细胞增殖能力的影响

组别	抑制率 / (% , $\bar{x} \pm s$)
A 组	-
B 组	-
C 组	15.52 ± 2.76
D 组	41.66 ± 3.31
E 组	57.54 ± 1.18
F 组	71.25 ± 5.24
G 组	72.52 ± 8.86
H 组	73.32 ± 6.65
F 值	37.562
P 值	0.030

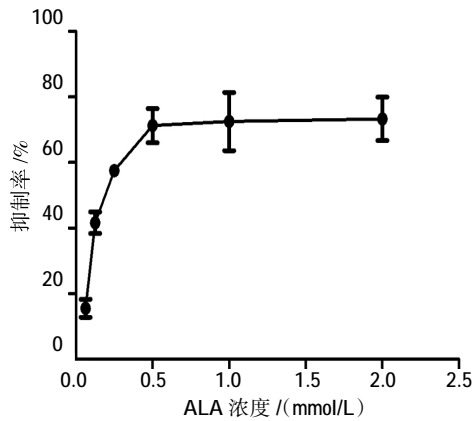


图 2 不同浓度 ALA-PDT 对瘢痕成纤维细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3.623、4.654、9.405、9.668 和 9.572, $P = 0.022、0.002、0.002、0.000、0.000$ 和 0.000); F 组与 C、D、E 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.133、5.782$ 和 $4.750, P = 0.000、0.000$ 和 0.002); G 组与 C、D、E 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.397、6.046$ 和 $5.014, P = 0.000、0.000$ 和 0.001); H 组与 C、D、E 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.301、5.950$ 和 $4.918, P = 0.000、0.000$ 和 0.002); F 组与 G、H 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 0.264$ 和 $0.168, P = 0.795$ 和 0.869), G 组与 H 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 0.096, P = 0.925$).

2.4 Collagen III 蛋白的表达

如表 2 与图 4 显示, Collagen III 和 GAPDH 电泳结果也与 real-time PCR 相似, ALA-PDT 处理后的成纤维细胞中 Collagen III 蛋白表达低于空白组和 PBS 组, 且随着 ALA 溶液浓度增加, Collagen III 蛋白表达逐渐减弱 (与 A 组和 B 组相比, $P < 0.05$); 当 ALA 溶液浓度达到 0.500 mmol/L 时, Collagen III 蛋白表达水平达到最低值, 但其后不再随着 ALA 浓度增加而减弱。Collagen III 蛋白 C、D、E、F、G、H 组分别与 A 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 2.224、2.289、2.306、2.489、2.582$ 和 $2.544, P = 0.042、0.035、0.027、0.024、0.020$ 和 0.022); C、D、E、F、G、H 组分别与 B 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 2.324、2.405、2.471、2.877、2.969$ 和 $2.932, P = 0.031、0.029、0.025、0.011、0.009$ 和 0.010); F 组与 C、D、E 组比较, 差异有统计

表 2 Collagen III 基因 mRNA 与蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Collagen III mRNA	Collagen III 蛋白
A 组	0.732 ± 0.076	0.261 ± 0.083
B 组	0.704 ± 0.015	0.282 ± 0.054
C 组	0.651 ± 0.037	0.257 ± 0.078
D 组	0.553 ± 0.039	0.219 ± 0.041
E 组	0.510 ± 0.056	0.184 ± 0.074
F 组	0.312 ± 0.041	0.126 ± 0.036
G 组	0.301 ± 0.054	0.121 ± 0.082
H 组	0.305 ± 0.065	0.123 ± 0.065
F 值	12.514	8.471
P 值	0.020	0.010

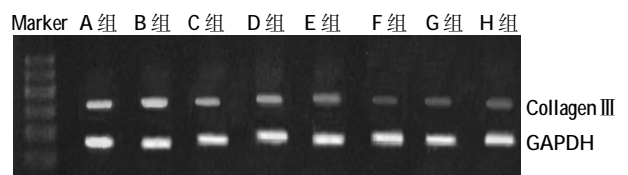


图 3 不同浓度 ALA-PDT 处理对成纤维细胞中 Collagen III mRNA 表达的影响

学意义($t=2.416, 2.265$ 和 $2.136, P=0.028, 0.033$ 和 0.047);G 组与 C、D、E 组比较,差异有统计学意义($t=2.508, 2.807$ 和 $2.481, P=0.023, 0.017$ 和 0.026);H 组与 C、D、E 组比较,差异有统计学意义($t=2.471, 2.771$ 和 $2.461, P=0.025, 0.019$ 和 0.026);F 组分别与 G、H 组比较,差异有统计学意义($t=0.092$ 和 $0.055, P=0.928$ 和 0.957),G 组与 H 组比较,差异有统计学意义($t=0.037, P=0.971$)。

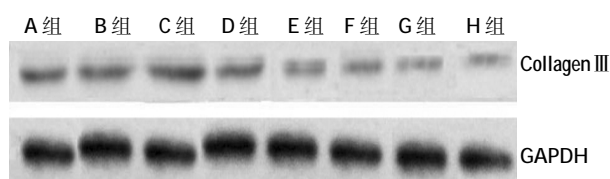


图 4 不同浓度 ALA-PDT 处理对成纤维细胞中 Collagen III 蛋白表达的影响

3 讨论

瘢痕疙瘩是由于损伤部位成纤维细胞过度活跃,真皮层胶原生成导致大量细胞外基质堆积引起^[9]。研究表明,瘢痕组织内主要含有胶原蛋白 I、胶原蛋白 III 以及少量其他型胶原蛋白^[10]。临床上,瘢痕疙瘩的生物学行为与良性肿瘤相似,可越过损伤边缘影响周围健康组织,并难以治疗。

PDT 是目前治疗皮肤性疾病的常见治疗方式。这种治疗方法通常与光敏剂相互作用,促进后者在目的细胞内转化为 PpIX。PpIX 在包含高度增殖细胞的组织内合成增加,这可能与血色素合成酶活性改变有关,它不仅与恶性细胞的生物学行为有关,而且与侵袭行为或者肿瘤细胞其他相似活性的非肿瘤细胞生物学行为有关。虽然瘢痕疙瘩是一种良性的纤维细胞增殖性紊乱,但是其具有临床侵袭性并在治疗后容易复发。ALA 是第 2 代光敏剂,进入人体后可被增生的细胞选择性吸收,在细胞内某些酶的作用下转化为 PpIX 等物质,进而在特殊光的照射下生成活性氧造成细胞损伤。

本组实验结果显示与 A 组和 B 组比较,ALA 组内 Collagen III 的 mRNA 和蛋白表达水平明显下降。提示 ALA-PDT 可能通过抑制 Collagen III 的合成,从而抑制瘢痕疙瘩的形成和发展。ALA-PDT 在瘢痕疙

瘩组织中产生的活性氧和自由基可诱导成纤维细胞结构蛋白和酶的巯基氧化形成二硫键,氨基酸残基氧化,胞浆及膜蛋白和某些酶交联形成而具体或者更大的聚合物。一方面合成胶原蛋白相关酶的活性受到抑制,胶原蛋白合成减少,另外细胞膜胶原蛋白功能发生改变并缺少能量,使成纤维细胞内合成的胶原蛋白无法转运至细胞外,进而使细胞外基质减少,致使胶原纤维结构模糊、成纤维细胞凋亡。

综上所述,本研究 ALA-PDT 可通过抑制瘢痕疙瘩纤维细胞中 Collagen III 的合成,进而抑制瘢痕疙瘩的形成,ALA 培养液的浓度达到 0.500 mmol/L 时,抑制作用达到高峰。这将有助于临床选择更为合适的 ALA-PDT 方案治疗瘢痕疙瘩。

参 考 文 献:

- [1] SHIH B, BAYAT A. Genetics of keloid scarring[J]. Arch Dermatol Res, 2010, 302(5): 319-339.
- [2] BAYAT A, MCGROUTHER D A. Clinical management of skin scarring[J]. Skin Med, 2005, 4(3): 165-173.
- [3] DOLMANS D E, FUKUMURA D, JAIN R K. Photodynamic therapy for cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 380-387.
- [4] PENG Q, SOLER A M, WARLOE T, et al. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinic acid[J]. J Photochem Photobiol B, 2001, 62(3): 140-145.
- [5] LI X, ZHOU Z P, HU L, et al. Apoptotic cell death induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of hypertrophic scar-derived fibroblasts[J]. J Dermatolog Treat, 2013, 25(5): 428-433.
- [6] 陈金波,李东升,夏萍,等.氨基酮戊酸光动力疗法治疗新发病理性瘢痕疗效观察[J].中国中西医结合皮肤性病杂志,2015,3: 173-175.
- [7] 焦健,范玉.δ-氨基酮戊酸光动力疗法对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及胶原分泌的影响[J].中华整形外科杂志,2015,31(1): 49-52.
- [8] 孔祥明,张明莉,陈楠,等.应用光动力治疗瘢痕疙瘩的实验研究[J].中国美容医学,2014,20: 1704-1707.
- [9] SHIH B, GARSIDE E, MCGROUTHER D A, et al. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease[J]. Wound Repair Regen, 2010, 18(2): 139-153.
- [10] LIM I J, PHAN T T, BAY B H, et al. Fibroblasts cocultured with keloid keratinocytes: normal fibroblasts secrete collagen in a keloidlike manner[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283(1): C212-222.

(张蕾 编辑)