

Fas基因转染瘢痕疙瘩成纤维细胞并诱导其凋亡的实验研究

罗 勇¹ 葛建华¹ 袁 菲² 第一军医大学¹ 南方医院整形外科袁病理学教研室袁广东 广州 510515 袁

摘要目的 探讨瘢痕疙瘩成纤维细胞抗 Fas 单克隆抗体(mAb)诱导的凋亡是否能通过正常 Fas 基因转染使凋亡率得以提高遥方法 利用分子克隆技术将人 Fas cDNA 插入真核表达载体 pcDNA3.1 多克隆位点之间袁以脂质体介导法将目的基因导入瘢痕疙瘩成纤维细胞袁用 Fas mAb 诱导凋亡曰通过琼脂糖凝胶电泳尧HE 染色和流式细胞仪检测瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的情况遥结果 转基因的瘢痕疙瘩成纤维细胞经 Fas mAb 作用后袁在形态学上出现典型的细胞核固缩尧碎裂曰琼脂糖凝胶电泳显现特征性的梯状带曰流式细胞仪检测凋亡率明显增加遥对照组未见上述结果遥结论 瘢痕疙瘩成纤维细胞 Fas 诱导的凋亡异常是由于 Fas 凋亡通道的上游事件尧无功能 Fas 蛋白造成袁与通道下游无关遥瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡异常可能是 Fas 基因突变引起袁其与瘢痕疙瘩形成有密切关系遥

关键词 瘢痕疙瘩 袁 Fas 基因 袁 细胞凋亡 袁 单克隆抗体

中图分类号 袁R394; R619.602; R730.231 文献标识码 院 文章编号 院000-2588(2003)10-1015-03

Apoptosis of keloid-derived fibroblasts induced by Fas gene transfection

LUO Yong¹, GAO Jian-hua¹, ZHAO Fei²

Department of Plastic Surgery, Nanfang Hospital¹, Department of Pathology², First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the effect of Fas gene transfection on the apoptosis of keloid-derived fibroblasts. Methods The full-length cDNA of Fas was inserted into the multicloning site of the expression vector pcDNA-3.1 by molecular cloning technique, and the recombinant plasmid was transfected into the keloid-derived fibroblasts via lipofectin. Fas monoclonal antibody (mAb) was used to induce the apoptosis of the cells, which was evaluated with HE staining, DNA agarose gel electrophoresis and flow cytometry. Results The expression plasmid pcDNA-3.1-Fas was constructed successfully. Fas mAb induced apoptosis of these fibroblasts transfected with Fas gene, with the typical features of fibroblast apoptosis observed in the treated cells (e.g. typical apoptotic cell nuclei, DNA ladder and high apoptosis rate as determined by flow cytometer), but not in the control cells. Conclusion Blockage of upstream apoptosis pathway in keloid-derived fibroblasts is due to nonfunction of Fas protein, and mutation of Fas gene may be the pathogenesis of keloids.

Key words: Fas cDNA; keloid-derived fibroblasts; apoptosis; monodonal antibody

瘢痕疙瘩是现代医学面临的几大难题之一遥其过度增殖的能力以及难以控制的术后再复发长期困扰整形外科学界遥近年来我们开展了病理性瘢痕成纤维细胞 Fas 受体介导凋亡的研究遥先前实验^[1]发现 瘢痕疙瘩成纤维细胞有别于正常皮肤及增生性瘢痕成纤维细胞袁用 Fas 单克隆抗体 mAb 在 ng~滋 水平即可迅速诱导正常皮肤及增生性瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡袁而在相同浓度下 瘢痕疙瘩成纤维细胞对此却无反应遥通过银染 PCR-SSCP 检测发现 编码 Fas 蛋白分子死亡域基因存在突变遥提示瘢痕疙瘩这种抗 Fas 介导的凋亡可能是 Fas 基因突变导致 Fas 受体功能丧失袁而造成瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡异常遥我们将 Fas cDNA 导入瘢痕疙瘩成纤维细胞袁观察 Fas 基因转染细胞的凋亡袁期望为瘢痕疙瘩形成的分

子生物学机制和基因治疗提供有意义的依据遥

1 材料和方法

1.1 材料与主要试剂

本实验所用的瘢痕疙瘩标本均取自南方医院整形外科患者袁经临床及病理诊断证实遥 Fas cDNA 质粒由第二军医大学国际肿瘤研究所刘彦青博士惠赠遥限制性内切酶尧 DNA 连接酶尧nase A尧蛋白酶 K尧CIAP尧MEM 培养基等为华美生物工程公司产品遥另有 PCR 引物合成 渊angon 公司 袁lipofectamine 渊ibco 公司 袁胎牛血清 渊yclone 袁 Fas mAb 渊M袁 Couler 公司 袁Annexin 呼-FITC Kit 渊LONTECH 公司 袁

1.2 方法

1.2.1 瘢痕疙瘩成纤维细胞的培养 将手术切下的瘢痕疙瘩采用组织块贴壁法袁用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基袁在 37 益尧% CO₂尧饱和湿度条件下进行原代培养遥待细胞生长成单层袁用 0.25% 胰酶消化后袁按 1 颐 1 的比例传代袁继续培养遥实验用第 5~15 代

收稿日期 院003-03-10

基金项目 院国家自然科学基金 0170972 袁

Supported by National Natural Science Foundation (3017972)

作者简介 罗 勇 970- 袁男 袁湖南益阳人 袁1994 年毕业于第一军医大学 袁现为在读博士研究生 袁电话 院20-61641888-87260

细胞遥

1.2.2 重组载体的构建与鉴定 根据重组真核表达载体构建的方法袁选 EcoR 吁为切点消化 PMD18-T-Fas 袁用 DNA 回收试剂盒回收 Fas cDNA 遥同样用 EcoR 吁消化 pcDNA3.1 袁去磷酸化遥在 T4DNA 连接酶作用下把 Fas cDNA 和去磷酸化的 pcDNA3.1 连接 渊6 益袁 20 h 袁转化 DH5-琢感受态细菌 袁常规培养遥随机挑选 Amp 抗性的菌落 袁并小量制备重组质粒遥用 EcoR 吁尧 Hind 芋尧 BamH 玉作酶切分析袁鉴定其连接的效果与连接的方向正确与否遥把克隆正确的 pcDNA3.1-Fas 重组质粒送去做 DNA 测序袁分析重组载体中目的基因的读框遥

1.2.3 基因转染与凋亡诱导 转染前 24 h 袁消化传代表使细胞生长面积达培养皿的 70%~80%遥将 2.0 滋 质粒 DNA 溶于 100 滋 无血清培养液中袁制成 A 管遥将 20 滋 的 Lipofectamine 溶于 80 滋 无血清培养液中袁制成 B 管遥将管 A 和管 B 混匀 袁室温下放置 45 min 遥吸去细胞培养液袁用无血清培养液洗涤细胞 2 次遥加 800 滋 无血清培养液至 Lipofectamine-DNA 混合液中轻轻混匀 袁再滴加到细胞培养皿中袁然后加入 1 000 滋 无血清培养液遥放入 CO₂ 孵箱中培养 10 h 遥取出转染液 袁加 4 ml 完全培养液继续培养 24~48 h 遥同时设立 pcDNA3.1 空载体为对照遥在转染后 48 h 袁按 500 ng/ml 加入 Fas mAb 诱导细胞的凋亡遥

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳 诱导凋亡 24 h 收集细胞 (1伊 10⁶/ml) 袁 000 r/min 袁 5 min 沉淀细胞 袁BS 重悬遥离心后加细胞裂解液 500 滋 袁 5 益水浴消化过夜遥酚和氯仿 异戊醇 渊4 颐 1 颐 1) 顺序抽提后 袁 5 体积的 10 mol/L 醋酸氨和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA 遥 TE 100 滋 溶解 DNA 沉淀 袁加 RNase 5 滋 37 益水浴 30 min 遥取所制备好的样品 20 滋 袁用 1% 琼脂糖凝胶电泳 袁UV 灯下观察遥

1.2.5 HE 染色 盖玻片生长的细胞经上述基因转染和凋亡诱导后 袁继续培养 24 h 遥取出 PBS 轻洗 袁 5% 乙醇固定 15 min 遥苏木素染色 5 min 袁水洗 1 min 袁盐酸乙醇分化 30 s 袁水浸泡 15 min 袁置于伊红液 2 min 遥常规脱水 袁透明 袁封片遥光学显微镜下观察遥

1.2.6 流式细胞仪分析 处理组和对照组经凋亡诱导 8 h 后 袁用胰酶消化 袁用 DMEM 完全培养液温和地把细胞吹下来 袁 000 r/min 离心 5 min 遥结合缓冲液洗 1 次 袁 00 滋 结合缓冲液重悬细胞 遥加 5 滋 Annexin 吁和 10 滋 PI 染液 袁避光在室温下孵育 10~15 min 遥上机检测 袁激发波长为 488 nm 遥

2 结果

2.1 真核表达载体的构建

重组载体 pcDNA3.1-Fas 用 EcoR 吁酶切 袁可见 1.08 kb 的 Fas cDNA 片段和 5.4 kb 空载体袁用 BamH 玉尧 Hind 芋作酶切 袁得到 0.54 kb 和 1.05 kb 的片段 渊图 1 袁袁说明重组载体 pcDNA3.1-Fas 目的基因是正向单拷贝插入的遥重组载体测序结果 袁经过校对和分析 袁与文献列出的 渊 序列完全一致 袁没有任何错误的读框遥

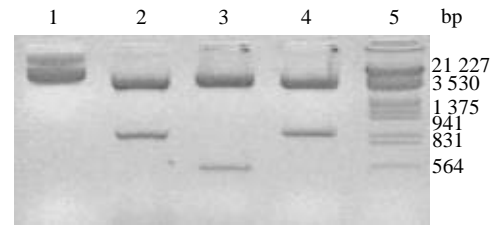


图 1 重组载体 pcDNA3.1-Fas 酶切图谱 Fig.1 Restriction enzyme digestion of the recombinant vector pcDNA3.1-Fas Lane 1: Control; Lane 2: pcDNA-Fas/Hind 芋; Lane 3: pcDNA3.1-Fas/BamH 玉; Lane 4: pcDNA3.1-Fas/EcoR 吁; Lane 5: Marker

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳

转基因组和对照组同时用 500 ng/ml 的 Fas mAb 诱导细胞的凋亡 袁在 1% 琼脂糖凝胶上行电泳观察 袁可见转基因组呈现典型的 野梯形冶条带 袁对照组仅在近电泳点样处出现基因组条带 渊图 2 袁袁

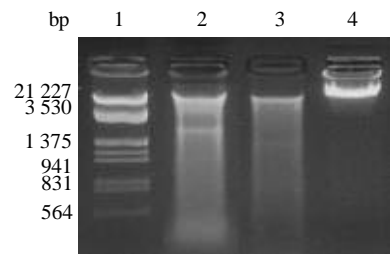


图 2 DNA 琼脂糖凝胶电泳 Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the DNA extracted from the fibroblasts Lane 1: Marker; Lane 2: Induction of apoptosis 24 h after transfection; Lane 3: Induction of apoptosis 12 h after transfection; Lane 4: Control

2.3 HE 染色

细胞爬片经 HE 染色后 袁在光学显微镜下观察 袁转基因组细胞可见多数细胞变圆 尧变 小 袁细胞核固缩 尧碎裂 袁染色体被染成深蓝色或蓝黑色 袁细胞膜皱折 尧卷曲和出泡等 渊图 3 袁袁而对照组细胞经染色后仍保持细胞原有的生长形态和大小 袁细胞核规整 袁染成均一蓝色 渊图 4 袁袁

2.4 流式细胞仪检测结果

转基因组和对照组在诱导后 8 h 袁经 Annexin 吁和 PI 双染色 袁上机检测 遥在双变量流式细胞仪的散点图上 袁左下象限显示活细胞 袁右上象限为死细胞 袁右下

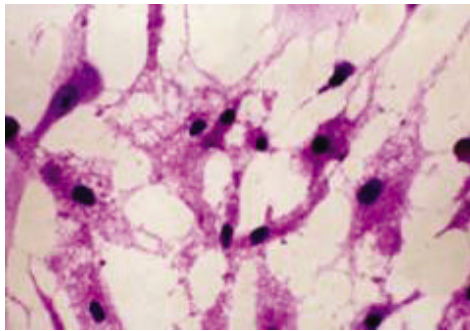


图 3 实验组 HE 染色 伊00 宽
Fig.3 HE staining of the apoptotic fibroblasts after transfection (伊00)

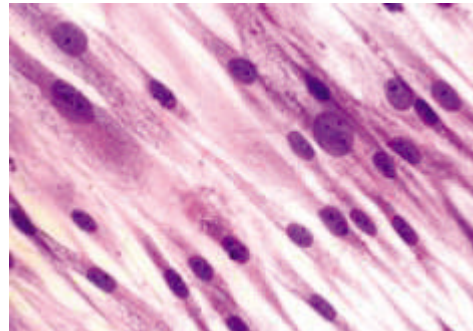


图 4 对照组 HE 染色 伊00 宽
Fig.4 HE staining of control cells (伊00)

象限为凋亡细胞遥转基因组凋亡细胞率为 64.6% 尧 64.9% 尧 0.7% (图 5 A~C)遥对照组为 12.0% 尧 7.9% 尧

30.5% 图 5 D~F 尧经统计学分析袁两组细胞凋亡率有显著差异 渊<0.05 宽

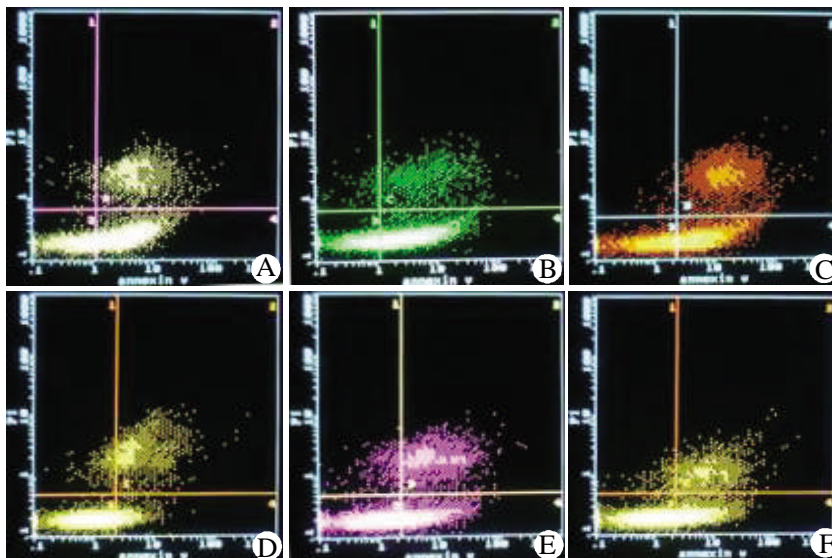


图 5 流式细胞仪检测结果
Fig.5 Apoptosis rate determined by flow cytometry
A: 64.6%; B: 64.9%; C: 50.7%; D: 12.0%; E: 7.9%; F: 30.5%

3 讨论

瘢痕疙瘩是目前整形外科界最棘手的问题之一遥近年来袁关于瘢痕疙瘩形成机制的研究虽然已取得了一些进展袁但目前仍缺乏有力的证据从根本上解释瘢痕疙瘩发生的具体机制遥随着细胞凋亡在各领域内研究的进展袁基因调控的程序性细胞死亡袁在瘢痕研究领域也越来越受到重视遥近年来研究认为成纤维细胞是瘢痕形成尧增生尧挛缩的功能性细胞袁其增殖尧活化尧分化的调控异常可能直接导致瘢痕疙瘩的形成遥

FasR-FasL 系统在调控细胞增殖和凋亡中所起的重要作用袁在众多研究领域已得到了广泛的重视袁而且 Fas 介导的凋亡也被认为是细胞凋亡的主要通路之一遥 Fas 基因产物是一种典型的玉型膜蛋白袁属 TNF 和 NGF 受体家族成员遥细胞表面的 Fas 分子与它的配体分子 FasL 或抗 Fas 抗体袁可向细胞内传递死亡信号袁使 Fas 表达细胞在数小时内发生死亡遥

本课题组前阶段实验研究发现遥瘢痕疙瘩成纤维细胞虽然有高表达的 Fas 受体袁但在 Fas mAb 作用下不能正常凋亡遥同时通过研究其 Fas 介导的死亡信号传导袁认为瘢痕疙瘩成纤维细胞的 Fas 受体可能处于无功能状态遥 PCR/SSCP 检测编码 Fas 分子死亡域的外显子袁发现有异常电泳带存在遥提示导致这种无功能状态的 Fas 分子的机制可能是因为其蛋白编码区基因结构的改变遥 Fas 分子的功能障碍必将阻断成纤维细胞的凋亡袁导致成纤维细胞的增殖 - 凋亡失衡袁最终导致瘢痕疙瘩的形成遥

为了明确瘢痕疙瘩成纤维细胞 Fas 介导的凋亡异常袁除了凋亡通道野出游治 Fas 分子异常外袁通道的野出游治是否异常袁探讨 Fas 分子异常在瘢痕疙瘩形成中所起的作用遥我们采用分子克隆技术袁成功地构建了真核表达载体 pcDNA3.1-Fas cDNA遥通过脂质体介导的转染技术袁将重组表达载体转入瘢痕疙瘩成

BMSC的增殖无明显影响袁对 BMSc 的分化及分泌功能却有明显的促进作用遥两种微球生物相容性良好袁同时 BMP 微球对包裹的 BMP 有明显的缓释作用袁与细胞复合培养 9 d 时仍有外源性 BMP 的作用存在遥我们认为这两种微球均可以作为骨组织工程载体材料袁同时壳聚糖海藻酸钠复合材料对外源性生长因子具有一定的缓控释作用袁可以促进 BMSc 的定向分化袁有利于新生骨组织的形成遥当然袁体外实验并不能完全反映出该材料长期植入体内可能发生的生物学反应袁因此有必要进一步以体内实验加以完善袁同时进一步明确 BMP 的释放速度遥

参考文献院

咱暂 YangLJ,JinL.Immunohistochemicalobservationsonbonemorphogeneticproteininnormalandabnormalconditions咱暂ClinOrthop,1990,257:249-56.
 咱暂 KawamuraM,UristMR.Humanfibrinisa physiologicdeliverysystemforbonemorphogeneticprotein咱暂ClinOrthop,1988,235:302-10.
 咱暂 MaysingerD,KriegelsteinK, FilipovicGJ, et al. Microencapsulated ciliary neurotrophic factor: physical properties and biological activities咱暂ExpNeurol,1996,138(2):177-88.
 咱暂 HirakiY,InoueH,ShigenoC.Bonemorphogeneticprotein(BMP-2 andBMP-3) promotegrowthand expression ofthedifferentiated phenotypeof rabbitchondrocytesandosteoblasticMC3T3-E1 cell in vitro咱暂BoneMinerRes,1991,6(12):1373-85.
 咱暂 CookSD,DaltonJE, TanEH, et al. In vivo evaluationof recombinanthumanosteogenicprotein(rhOP-1) implantsasabonegraft

substituteforspinalfusions咱暂Spine,1994,19(15):1655-63.
 咱暂 尉文华,毛天球,陈富林,等.重组人骨形成蛋白-2/胶原珊瑚复合人工骨异位诱导成骨的实验研究咱暂现代口腔医学杂志,2000,14(4):231-2.
 WeiWH,MaoTQ,ChenFL, et al. Experimentalstudyonthebone inductivityofrhBMP2collagenandcoralcomplex [J]. J Modern Stomatol,2000,14(4):231-2.
 咱暂 GrootJD.Carrierthatconcentratenativebonemorphogeneticprotein in vivo咱暂TissueEng,1998,4(4):337-41.
 咱暂 Lee EO, KimJD. Palmitoyllysozyme-inducedstabilizationofPE (phosphatidylethanolamine) liposomes and their interaction with Candidaalbicans咱暂Biochem,1995,117(1):54-8.
 咱暂 吴德升,赵定麟,何兆平,等.修复周围神经缺损的组织工程研究咱暂生物医学工程学杂志,1997,14(2):108-10.
 WuDS, ZhaoDL, HeZP, et al. Tissueengineeringstudyon repairmentofinjurednervegapinrat咱暂BiomedEng,1997,14 (2):108-10.
 咱0暂 覃昱,裴国献.骨形态发生蛋白缓释载体的研究进展咱暂中华创伤骨科杂志,2001,3(4):295-7.
 QinY, PeiGX. Developmentofgradualreleasecarriersforbone morphogeneticprotein咱暂Chin J Orthop Trauma, 2001, 3(4): 295-7.
 咱1暂 RodriguezML,HolgadoMA,SanchezLC, et al. Alginate/chitosan particulatesystemsfor sodiumdiclofenacrelease咱暂IntJPharm, 2002,232(1-2):225-34.
 咱2暂 ReddiAH.Roleofmorphogeneticproteinsinskeletaltissueengineeringandregeneration咱暂NatBiotechnol,1998,16(3):247-52.
 咱3暂 CheungHS,HeakMH.Growthofosteoblastsonporouscalciumphosphateceramic: an in-vitro modelforbiocompatibilitystudy咱暂 Biomaterials,1989,10:63-8.

渊接 1017 页冤

纤维细胞袁使其表达结构和功能正常的 Fas 蛋白遥通过 Fas mAb 诱导凋亡袁流式细胞仪检测结果表明袁 Fas 基因转染组的凋亡率明显高于空载体转染的对照组遥从而证明袁瘢痕疙瘩成纤维细胞 Fas 介导的凋亡异常袁其阻断在 Fas 分子袁而不在凋亡通路的下游各个环节遥

临床上瘢痕疙瘩的治疗颇为棘手袁虽然有很多方法先后问世袁概括起来可分为手术疗法和非手术疗法袁但迄今无一获确切疗效遥随着人们不断从基因水平阐述瘢痕疙瘩发生的分子机制袁基因治疗为瘢痕疙瘩的治疗带来了新的希望和挑战遥本实验正是从这一思路出发袁为瘢痕疙瘩的基因治疗探索一条新路遥

参考文献院

咱暂 DesmouliereA,RedardM,DarbuL.Apoptosismediatethedecrease in cellularity during thetransition between granulation tissue and scar咱暂AmJPathol,1995,32(2):146-56.
 咱暂 鲁峰,高建华,刘永波,等.瘢痕疙瘩 Fas 基因突变的银染 PCR-SSCP 检测咱暂解放军医学杂志,1999,24(5):358-60.

LuF, GaoJH, LiuYB, et al. Analysisof Fas genemutationsin keloidsusingpolymerasechainreaction-basedsingle-strandconformationpolymorphism andDNAsequencing咱暂PLAMedJ,1999, 24(5):358-60.
 咱暂 刘永波,高建华,鲁峰,等.瘢痕疙瘩 Fas 基因突变子 6-9 号突变的检测咱暂解放军医学杂志(PLAMedJ),2000,25(4):269.
 咱暂 GarbinS,PittetB,MontandonD, et al. Coveringbyaflapinduces apoptosis of granulationtissue fibroblasts and vascular cells咱暂 WoundRepairRegener,1996,24(4):244-6.
 咱暂 SuY,Arnoldf,CherryG, et al. Proliferationandapoptosisinchronicwounds咱暂WoundRepairRegener,1996,24(6):141-6.
 咱暂 NaotoI,ShinY,AiI, et al. ThepolypeptideencodedbythecDNA forhumancellsurfaceantigenFascanmediateapoptosis咱暂Cell, 1991,66(3):233-43.
 咱暂 FreibergRA,SpencerDM,ChoateKA, et al. Fas signaltransduction triggerseitherproliferationorapoptosisinhumanfibroblasts咱暂 J InvestDermatol,1997,108(2):215-23.
 咱暂 姜泊,张亚历,周殿元.分子生物学常用实验方法咱暂北京:人民军医出版社,1996.15-162.
 咱暂 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF,曼尼阿蒂斯著 T 著.金冬雁,黎孟枫,译.分子克隆实验指南咱暂第 2 版.北京:科学出版社,1992.765-822.