

二氯化钴化学缺氧诱导瘢痕成纤维细胞整合素连接激酶的表达及其对细胞增殖的影响



李叶扬 李罡 米兰 林伟华 孙敬恩 汪锦伦 梁振文 王晓红

【摘要】 目的 探讨二氯化钴 (CoCl_2) 化学缺氧对瘢痕 Fb 整合素连接激酶 (ILK) 表达的影响, 以及其对细胞增殖的影响。方法 体外培养 7 例患者增生性瘢痕 Fb, 取第 5~6 代细胞进行实验。7 例患者的 Fb 各取 6 瓶, 分别加入含 6 种终浓度为 0、50、100、150、200、250 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 的 DMEM 培养液培养 24 h, 采用实时荧光定量 PCR 法检测 ILK mRNA 表达。选择最适 CoCl_2 浓度 (100 $\mu\text{mol/L}$) 进行缺氧刺激, 观察 ILK 蛋白于 CoCl_2 作用 0、1、2、4、12、24 h 的表达。将细胞分为正常对照组、阴性对照组、ILK 小干扰 RNA (siRNA) 组, 分别将 con-siRNA 及 ILK siRNA 转染入后 2 组细胞, 对照组仅以培养液培养, 24 h 后弃培养液, 置于含 6 种浓度 CoCl_2 的培养液中培养 24 h。各组各浓度 4 个复孔。采用 3,3'-[1-(苯氨基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠 (XTT) 法检测各组细胞增殖水平。对数据进行单因素方差分析以及重复测量方差分析, 多重比较采用 LSD 法。结果 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 24 h 时 ILK mRNA 表达最高, 与其他浓度 CoCl_2 作用的 Fb 相比差异有统计学意义 ($F = 50.958, P < 0.001$)。100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 1 h 时 Fb ILK 蛋白表达量 (0.243 ± 0.009) 较 0 h (0.387 ± 0.017) 降低, 2 h (0.361 ± 0.010) 开始增高, 4 h (0.584 ± 0.028)、12 h (0.730 ± 0.029)、24 h (0.785 ± 0.031) ILK 蛋白表达强度逐渐增强。其中 1、4、12、24 h 的 ILK 蛋白表达量与 0 h 相比差异具有统计学意义 (P 值均小于 0.05)。XTT 结果显示, 正常对照组在 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用时细胞增殖水平最高 ($F = 488.026, P < 0.001$), 从 150 $\mu\text{mol/L}$ 起细胞增殖水平开始下降, 250 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞增殖水平显著低于 0 $\mu\text{mol/L}$ 时水平 (P 值均小于 0.05)。ILK siRNA 组细胞增殖水平在各浓度 CoCl_2 作用下无明显变化 ($F = 2.542, P = 0.056$)。ILK siRNA 组的细胞增殖水平显著低于正常对照组及阴性对照组 ($F = 2519.542, P < 0.001$)。结论 ILK 可能是 Fb 对缺氧应答的关键蛋白, 轻度缺氧可以提高细胞 ILK 的表达, 促进瘢痕 Fb 增殖; 而重度缺氧可以降低 ILK 的表达, 抑制细胞增殖。

【关键词】 缺氧; 成纤维细胞; 整合素连接激酶; 增生性瘢痕

Expression of integrin-linked kinase in fibroblasts of scar induced by cobalt chloride and its effect on cell proliferation Li Ye-yang, Li Gang, Mi Lan, Lin Wei-hua, Sun Jing-en, Wang Jin-lun, Liang Zhen-wen, Wang Xiao-hong. Department of Burns and Plastic Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Ji'nan University, Guangzhou 510220, China

【Abstract】 Objective To explore the expression of integrin-linked kinase (ILK) in fibroblasts (Fbs) of scar induced by cobalt chloride (CoCl_2) and its effect on cell proliferation. Methods The human hypertrophic scar Fbs of seven patients were isolated and cultured in vitro. Cells from the 5th to the 6th passages were used in the experiment. Six bottles of Fbs were obtained from each of the seven patients, and they were respectively cultured with DMEM nutrient solution containing CoCl_2 in the concentration of 0, 50, 100, 150, 200, and 250 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. The expression of ILK mRNA was determined with real-time fluorescence quantitative PCR. Fbs were stimulated by CoCl_2 in the most suitable concentration (100 $\mu\text{mol/L}$) and the protein expression of ILK was determined 0, 1, 2, 4, 12, and 24 h after the stimulation. Then the Fbs were divided into control group (cultured with nutrient solution), negative control group (transfected with con-siRNA), and ILK siRNA group (transfected with ILK siRNA). They were cultured with nutrient solution containing CoCl_2 in different concentrations 24 h after transfection, with 4 wells for each concentra-

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.03.017

基金项目:广东省自然科学基金(S2011010000764);广州市医药卫生科技重点项目(2009-ZPi-05);广东省社会发展领域科技计划(2010-75)

作者单位:510220 广州,暨南大学附属广州市红十字会医院烧伤整形科

tion in each group. The cell proliferation was detected by XTT assay. Data were processed with one-way analysis of variance (ANOVA) and ANOVA for repeated measurement, and LSD method was used in multiple comparisons. **Results** The expression level of ILK mRNA was highest in Fbs cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 for 24 h, with significant difference compared with those of Fbs cultured with other concentrations of CoCl_2 ($F = 50.958$, $P < 0.001$). The expression of ILK protein in Fbs cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 for 1 h (0.243 ± 0.009) was lower than that cultured for 0 h (0.387 ± 0.017), and it started to increase from 2 h (0.361 ± 0.010), and exaggerated at 4 h (0.584 ± 0.028), 12 h (0.730 ± 0.029), and 24 h (0.785 ± 0.031). The expression levels of ILK protein at 1, 4, 12, 24 h were statistically different from that at 0 h (P values all below 0.05). XTT showed that cell proliferation level was highest in control group when cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 ($F = 488.026$, $P < 0.001$), which decreased from 150 $\mu\text{mol/L}$. The cell proliferation level in control group cultured with 250 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 was significantly lower than that with 0 $\mu\text{mol/L}$ (P values all below 0.05). There was no significant change in cell proliferation in ILK siRNA group among different concentrations of CoCl_2 ($F = 2.542$, $P = 0.056$). The cell proliferation level in ILK siRNA group was significantly lower than that in control group and negative control group ($F = 2519.542$, $P < 0.001$). **Conclusions** ILK may be a key protein in response of hypoxia in Fbs. The mild hypoxia can stimulate the expression of ILK and promote the proliferation of Fbs, while severe hypoxia can reduce the expression of ILK and inhibit cell proliferation.

【Key words】 Anoxia; Fibroblasts; Integrin-linked kinase; Hypertrophic scar

在病理性瘢痕发展的各个阶段均存在不同程度的缺氧,与瘢痕的形成、发展及转归有着密切关系。整合素连接激酶(ILK)是近年发现的一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可介导多种信号通路参与不同病理生理过程,如创面愈合、肿瘤发生、组织纤维化过程等^[1-3]。本研究旨在探讨二氯化钴(CoCl_2)化学缺氧作用下瘢痕 Fb ILK 的表达及其对细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)购自杭州吉诺生物医药技术有限公司,高糖 DMEM 培养液、FBS 购自美国 Gibco 公司, InterferinTM 购自法国 Polyplus-transfection 公司, PCR 引物购自中山大学达安基因股份有限公司, ILK 小干扰 RNA (siRNA, 靶序列为 5'-ACACCGTGATATTGTACAG-3' 和 con-siRNA 阴性对照(序列为 5'-CACGTAAGCTTGTACGAT-3') 购自广州复能基因有限公司, CoCl_2 干粉、3,3'-[1-(苯氨基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠(XTT)、硫酸酚嗪甲脂(PMS)购自美国 Sigma 公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。兔抗人 ILK 单克隆抗体、羊抗兔 IgG 均购自美国 Abcam 公司。9700 型 PCR 仪、3900 型台式高通量 DNA 合成仪、7500 型荧光定量 PCR 仪均购自美国 ABI 公司。JD801 型核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统购自珠海黑马医学仪器有限公司。Smart Spec plus 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 瘢痕 Fb 的培养

标本来自于笔者单位

2010 年 2 月—2011 年 2 月收集的 7 例住院患者手术切除的增生性瘢痕组织,年龄 18~48 岁。瘢痕发病时间为术后 3~6 个月,具有突出于皮肤表面,发红、质硬、有痒痛等增生性瘢痕的特征,无其他合并症,取材前未进行特殊治疗,取材部位无破损、感染。所取标本均获得患者知情同意。将手术中切取的瘢痕迅速置于预冷 Hank 液中浸泡 10 min, PBS 清洗后切去表皮以及皮下多余组织,将组织块剪成 1~2 mm^2 转移到培养瓶中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 孵育箱培养。大约 1 周左右,可见梭形 Fb 从组织块周围长出,待细胞完全融合后,采用 2.5 g/L 胰蛋白酶及 0.2 g/L EDTA 进行消化传代,选第 5、6 代细胞进行实验。

1.2.2 不同浓度 CoCl_2 作用下瘢痕 Fb ILK mRNA 表达

采用实时荧光定量 PCR 检测。7 例患者的 Fb 各取 6 瓶,分别加入含终浓度为 0、50、100、150、200、250 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 的 DMEM 培养液中培养 24 h。提取各瓶细胞总 RNA,常规进行反转录反应。分别取等量互补 DNA 进行荧光定量 PCR 反应扩增人 ILK 基因,以人 β 肌动蛋白基因作为内参照。ILK 引物序列:上游 5'-TGTCGTGAAGGTGCTGAAGG-3', 下游 5'-TGTGTGTAGGAAGGCCATGC-3'。人 β 肌动蛋白引物序列:上游 5'-CTTACAGATCATGTTT-GAGACCTTCAA-3', 下游 5'-CTCAGGGCAGCGGAACC-3'。反应条件为 93 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 40 个循环。测得 ILK 和 β 肌动蛋白的循环阈值,根据标准曲线分别换算出 ILK 与内参基因的拷贝数,以二者比值(ILK/ β 肌动蛋白)表示目的基因的表达强度。

1.2.3 CoCl₂ 作用后不同时相点 Fb 中 ILK 的蛋白表达 采用蛋白质印迹法检测。7 例患者的 Fb 各取 6 瓶,分别加入终浓度为 100 μmol/L CoCl₂ 的 DMEM 培养液培养 0、1、2、4、12、24 h。于各浓度时相点提取细胞总蛋白并定量,将所有蛋白样品调整浓度至 2 g/L,加入等体积上样缓冲液充分混匀后置于 -20 °C 冰箱储存。每个样本取 20 μL 上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳、转膜、封闭后,加入稀释比为 1:200 的兔抗人 ILK 单克隆抗体,4 °C 孵育过夜;PBS 漂洗后在稀释比为 1:500 的辣根过氧化物酶标记 ILK 羊抗兔 IgG 中振荡孵育 1 h;PBS 漂洗,增强型化学发光试剂盒发光。以 β 肌动蛋白作为内参照,处理方法同上。拍照后运用软件分析各目的蛋白条带灰度值,与 β 肌动蛋白条带灰度值之比即为目的蛋白的表达强度。

1.2.4 各组细胞增殖情况 用 XTT 比色法检测。取 7 例患者对数生长期的 Fb,以每孔 7500 个细胞分别接种于 96 孔板中。细胞分为正常对照组、阴性对照组、ILK siRNA 组。应用 Interferin™ 转染试剂介导化学合成的 con-siRNA、ILK siRNA,分别对后 2 组细胞进行转染,正常对照组仅以培养液培养。各组细胞培养 24 h 后,弃培养液,分别加入含 0、50、100、150、200、250 μmol/L CoCl₂ 的培养液培养,各组各浓度设 4 个复孔。24 h 后加入含 1 μg/L XTT 的 PMS 溶液,置于 37 °C 培养箱中孵育 3 h 后用酶标仪测定吸光度值,测量波长 450 nm,参考波长 655 nm。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对数据行单因素方差分析及重复测量方差分析,多重比较采用 LSD 法分析(软件自动略去该统计量值)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 CoCl₂ 作用下 Fb 中 ILK 的 mRNA 表达

不同浓度 CoCl₂ 作用 24 h, Fb 中 ILK mRNA 表达呈先增后降的趋势,当 CoCl₂ 浓度达 100 μmol/L 时 ILK mRNA 表达量达峰值,与其他浓度作用的细胞相比差异有统计学意义 ($F = 50.958, P < 0.001$)。当 CoCl₂ 浓度为 150 μmol/L 时,ILK mRNA 表达水平开始下降;当其浓度为 250 μmol/L 时,细胞 ILK mRNA 表达量与 0 μmol/L CoCl₂ 作用下的细胞相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

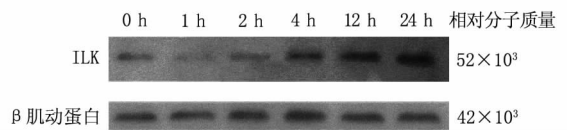
表 1 不同浓度二氯化钴作用下 Fb ILK mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

二氯化钴浓度(μmol/L)	样本数	ILK mRNA
0	7	0.079 ± 0.012
50	7	0.170 ± 0.021 ^a
100	7	0.510 ± 0.119 ^b
150	7	0.289 ± 0.056 ^b
200	7	0.161 ± 0.032 ^a
250	7	0.050 ± 0.033

注:ILK 为整合素连接激酶;与 0 μmol/L 作用相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2.2 CoCl₂ 作用不同时间 Fb 中 ILK 的蛋白表达

100 μmol/L CoCl₂ 作用 1 h, Fb 的 ILK 蛋白表达量为 0.243 ± 0.009,较 0 h 的 0.387 ± 0.017 降低;CoCl₂ 作用 2 h 时 ILK 蛋白表达量开始增高,为 0.361 ± 0.010,作用 4、12、24 h ILK 蛋白表达量逐渐增强,分别为 0.584 ± 0.028、0.730 ± 0.029、0.785 ± 0.031。作用 1、4、12、24 h 的 ILK 蛋白表达量与 0 h 相比差异均有统计学意义 (P 值均小于 0.05)。见图 1。



注:ILK 为整合素连接激酶

图 1 二氯化钴作用不同时间 Fb 中 ILK 的蛋白表达

2.3 各组 Fb 在不同浓度 CoCl₂ 作用下的增殖情况

各组细胞在不同浓度 CoCl₂ 作用下呈不同增殖水平,其中 ILK siRNA 组细胞增殖水平显著低于正常对照组及阴性对照组 ($F = 2519.542, P < 0.001$)。当 CoCl₂ 浓度为 0 ~ 100 μmol/L 时正常对照组细胞增殖水平呈上升趋势,于 100 μmol/L 时达峰值 ($F = 488.026, P < 0.001$);CoCl₂ 浓度大于 150 μmol/L 时细胞增殖能力开始下降,至 250 μmol/L 时细胞增殖水平明显低于 0 μmol/L 时水平 ($P < 0.05$);ILK siRNA 组的细胞增殖水平在各浓度 CoCl₂ 作用下的变化无明显差异 ($F = 2.542, P = 0.056$)。见表 2。

3 讨论

氧张力是诱导病理性瘢痕形成的物理环境因素,但缺氧对瘢痕增生的作用一直存在争议。有学者认为缺氧可以促进瘢痕增生,由于组织损伤后创面局部血管收缩,暂时形成一个缺氧区域^[4],这种病理改变可以促进 Fb 合成和胶原分泌^[5]。同时,缺氧

表 2 各组细胞在不同浓度二氯化钴作用后的增殖情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	150 $\mu\text{mol/L}$	200 $\mu\text{mol/L}$	250 $\mu\text{mol/L}$	F 值	P 值
正常对照组	4	0.83 \pm 0.12	1.29 \pm 0.11 ^a	1.65 \pm 0.13 ^a	1.00 \pm 0.12	0.77 \pm 0.12	0.51 \pm 0.09 ^a	488.026	<0.001
阴性对照组	4	0.90 \pm 0.16	1.28 \pm 0.13 ^a	1.67 \pm 0.18 ^a	1.01 \pm 0.16	0.80 \pm 0.11	0.51 \pm 0.14 ^a	220.928	<0.001
ILK siRNA 组	4	0.52 \pm 0.05	0.57 \pm 0.03	0.58 \pm 0.07	0.55 \pm 0.10	0.52 \pm 0.03	0.44 \pm 0.03	2.542	0.056

注:数据以吸光度值表示;siRNA 为小干扰 RNA;与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,^a $P < 0.05$

可以引起过多微血管生成,促进瘢痕增生^[6]。反之,也有研究表明缺氧可以促进瘢痕的成熟和消退^[7]。作者推测细胞中可能存在缺氧感受受体,面对不同的缺氧环境,细胞能作出不同的反应以适应生存,由此影响瘢痕 Fb 或血管内皮细胞的增殖活性。但缺氧诱导细胞应答的分子机制尚不清楚。

ILK 是 1996 年 Hannigan 等^[8]以整合素 β_1 亚单位胞质结构域为诱饵进行酵母双杂交筛选时发现的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。在 ILK 的分子结构域中含有整合素 β_1 亚基的结合位点^[9],所以 ILK 可以和整合素连接参与多种信号通路过程。有研究表明,ILK 可能是缺氧的感应分子^[10],本实验重点观察 ILK 在增生性瘢痕早期所起的作用。

细胞缺氧模型的建立分物理方法和化学方法,物理方法是将细胞在低氧环境中进行培养,该法往往受到实验条件的限制。而 CoCl_2 一方面可以通过 Co^{2+} 代替血红素中的 Fe^{2+} 与氧结合,从而抑制血红素的氧合,使细胞处于缺氧状态,另一方面可以通过稳定细胞内的缺氧诱导因子 1α (HIF-1 α),在常氧条件下激活 HIF-1 α 诱导的缺氧信号途径,发挥与缺氧相似的作用^[11],所以常被用于细胞缺氧模型。本实验以瘢痕 Fb 为研究对象,利用 CoCl_2 建立化学缺氧环境,观察不同程度缺氧对 Fb 增殖及 ILK 表达的影响,再利用 siRNA 介导同源靶基因技术阻断 ILK 基因表达,观察 ILK 沉默后缺氧对 Fb 增殖的影响。

结果显示,在低浓度 CoCl_2 刺激下 Fb 的 ILK 表达增强,而在高浓度 CoCl_2 作用下 ILK 表达下降,间接反映出在缺氧程度异常增高的情况下,ILK 的活性可能被抑制。而在相同浓度 CoCl_2 作用下,随着缺氧刺激时间的延长,ILK 的表达也逐渐上升。在未经 ILK siRNA 转染的 Fb 检测中观察到,低浓度 CoCl_2 可以促进瘢痕 Fb 的增殖,而高浓度 CoCl_2 可以抑制 Fb 增殖,反映出不同程度的缺氧对瘢痕 Fb 增殖具有促进和抑制 2 种作用。而经 ILK siRNA 转染的细胞,其增殖水平在不同浓度的 CoCl_2 作用下无明显变化,提示此时 Fb 对缺氧的应答反应降低,这可能与 ILK 沉默有关。

综上所述,ILK 可能是瘢痕 Fb 感应缺氧的关键蛋白。在轻度缺氧诱导下,Fb 的 ILK 的表达增高,使细胞对缺氧的敏感性加强,增殖水平明显提高;随着缺氧程度加重,ILK 表达受到抑制,使细胞对缺氧的反应降低,增殖受到抑制。但严重缺氧导致 ILK 表达降低的原因,作者推测可能与瘢痕细胞功能严重受损有关。

参考文献

- [1] 李叶扬,李罡,潘姝,等.整合素连接激酶和整合素 β_1 在大鼠不同深度烫伤创面的表达及意义.中华烧伤杂志,2010,26(2):152-154.
- [2] Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004,5(10):816-826.
- [3] 杨晓萍,张焕巧,赵瑾,等.整合素连接激酶和 α -平滑肌肌动蛋白的表达与肾间质纤维化关系的研究.北京医学,2007,29(10):600-603.
- [4] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. J Surg Res, 2009,153(2):347-358.
- [5] Steinbrech DS, Longaker MT, Mehrara BJ, et al. Fibroblast response to hypoxia: the relationship between angiogenesis and matrix regulation. J Surg Res, 1999,84(2):127-133.
- [6] Kischer CW, Shetlar MR, Shetlar CL. Alteration of hypertrophic scars induced by mechanical pressure. Arch Dermatol, 1975,111(1):60-64.
- [7] Scheid A, Wenger RH, Christina H, et al. Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair. Pediatr Surg Int, 2000,16(4):232-236.
- [8] Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. Nature,1996,379(6560):91-96.
- [9] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000,97(7):3207-3212.
- [10] Lee SP, Youn SW, Cho HJ, et al. Integrin-linked kinase, a hypoxia-responsive molecule, controls postnatal vasculogenesis by recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue. Circulation, 2006,114(2):150-159.
- [11] Ho VT, Bunn HF. Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Biochem Biophys Res Commun, 1996,223(1):175-180.

(收稿日期:2012-11-02)

(本文编辑:梁光萍)