

A型肉毒毒素对增生性瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡及对ERK/MAPK信号通路的影响

沈利余扬马少林

摘要目的 探讨A型肉毒毒素对体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡及对ERK/MAPK信号通路的影响。

方法 采用组织块法将人增生性瘢痕成纤维细胞分离并培养。将其分为对照组及A型肉毒毒素组。A型肉毒毒素组则给予含有0.4U/L A型肉毒毒素的DMEM培养基进行培养。对照组采用单纯DMEM培养基培养。在第1、3、5、7天时采用CCK8试剂盒检测细胞增殖并比较。采用流式细胞术对对照组和A型肉毒毒素干预的成纤维细胞行凋亡检测。Western blot法检测对照组、A型肉毒毒素组及U0126干预组成纤维细胞I型胶原蛋白(collagen I), p-ERK1/2及总ERK蛋白相对表达量。**结果** A型肉毒毒素能够显著抑制成纤维细胞增殖活性,干预7天时,细胞数量仅为对照组的68.9%。A型肉毒毒素组成纤维细胞的凋亡比率为35.9%,显著高于对照组。三组成纤维细胞的总ERK1/2蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而p-ERK1/2在对照组则仍显著高表达,但A型肉毒毒素组和U0126组的p-EKR1/2则显著受抑制,且低表达。I型胶原蛋白则在对照组中高表达,显著高于A型肉毒毒素组和U0126组($P < 0.05$)。**结论** A型肉毒毒素能够通过抑制ERK/MAPK信号通路而使得成纤维细胞凋亡增加,增殖活性减弱,I型胶原蛋白分泌减少。

关键词 A型肉毒毒素 增生性瘢痕 成纤维细胞 ERK MAPK

中图分类号 R826.8

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.07.007

Effects of Botulinum Toxin Type A on Proliferation, Apoptosis and ERK/MAPK Signaling Pathway of Hypertrophic Scar Fibroblasts.

Shen Li, Yu Yang, Ma Shaolin. Department of Burn and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830054, China

Abstract Objective To investigate the effects of botulinum toxin type A on the proliferation, apoptosis and ERK/MAPK signaling pathway of human hypertrophic scar fibroblasts in vitro. **Methods** Fibroblasts were isolated from human hypertrophic scar and cultured by tissue explant method. The cells were divided into control and botulinum toxin type A groups. The botulinum toxin group A was cultured in DMEM medium containing 0.4U/L botulinum toxin type A. The control group was cultured with DMEM alone. Cell proliferation was measured by CCK8 kit at days 1, 3, 5 and 7 and compared within groups. Apoptosis of fibroblasts was detected by flow cytometry which treated with botulinum toxin and control group. Western blot was used to detect the relative expression of collagen I, p-ERK1/2 and total ERK protein in fibroblasts of control, botulinum toxin type A and U0126 groups. **Results** Botulinum toxin type A could significantly inhibit the proliferation of fibroblasts, the number of cells was only 68.9% in the control group at 7th days. The apoptotic rate of botulinum toxin type A was 35.9%, which was significantly higher than that of the control group. ERK 1/2 protein expression in the three groups was not significantly different ($P > 0.05$), while p-ERK 1/2 expression in the control group was still significantly higher, but the p-EKR 1/2 in botulinum toxin type A and U0126 group was significantly inhibited. Collagen I was highly expressed in the control group, which was significantly higher than that in the botulinum toxin type A and U0126 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Botulinum toxin type A can inhibit the ERK/MAPK signaling pathway and increased fibroblasts apoptosis, decreased proliferation activity and collagen I secretion.

Key words Botulinum toxin type A; Hypertrophic scar; Fibroblast; ERK; MAPK

增生性瘢痕是一种病理性瘢痕,其形成原因与成

纤维细胞的异常增殖和胶原蛋白过度沉积多密切相关。增生性瘢痕的治疗方式众多,但目前尚无一种方法可完全治愈,手术治疗亦不能达到根治目的且易复发^[1]。A型肉毒毒素(botulinum toxin type A,BTXA)是一种神经毒性药物,可持久抑制神经肌肉接头处乙酰胆碱的释放,从而导致肌肉松弛麻痹。临幊上先后

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260291)

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院烧伤整形科

通讯作者:马少林,主任,教授,博士生导师,电子信箱: mashaolinxj

@126.com

被应用治疗眼睑痉挛、斜视、面神经痉挛以及医学美容领域如瘦脸、牙龈外露、面部除皱等^[2]。但近年来国内外一些研究,通过离体细胞及动物实验以及临床研究均表明:BTXA 可有效抑制增生性瘢痕成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成,在治疗增生性瘢痕以及瘢痕疙瘩中疗效良好,其具体机制尚不明确^[3,4]。有研究表明,成纤维细胞的增殖与 ERK/MAPK 信号通路密切相关^[5]。本研究拟通过观察 BTXA 对瘢痕成纤维细胞的增殖、凋亡和胶原蛋白合成的作用,以及对 ERK/MAPK 信号通路的影响,为从阻断信号转导通路角度治疗增生性瘢痕提供理论依据。

材料与方法

1. 实验仪器与试剂:A 型肉毒毒素(兰州生物制品研究所),DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、PBS 缓冲液、青霉素、链霉素及胰酶均来源于美国 Hyclone 公司,羊抗人 I 型胶原蛋白(collagen I)抗体(美国 Santa Cruz 公司),兔抗人 p-ERK1/2 抗体、兔抗人 ERK1/2 抗体以及 HRP 标记羊抗兔 IgG 均采购于(英国 Abcam 公司),CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂以及羊抗人 GAPDH 抗体均采购于武汉博士德公司,U0126(美国 MCE 公司),Western blot 系统为美国 Bio-Rad 公司生产。

2. 标本来源:试验中所用的瘢痕组织均取自在新疆医科大学第一附属医院烧伤整形外科同期住院的 10 例烧伤患者手术时所切除的增生性瘢痕,其中男性 5 例,女性 5 例,均为汉族,患者年龄 18~38 岁,平均年龄 27.8 岁,增生性瘢痕的判定:经病理检查确定为增生性瘢痕,瘢痕增生活跃期的判定:均为烧伤愈合后创面瘢痕持续性增生 3~12 个月,瘢痕突出于皮肤表面发红,并伴有明显的痒、痛症状。所有患者均无严重系统性疾病或接受抗瘢痕药物治疗,均未 3 个月内未接受青霉素、抗肿瘤药物、类固醇激素治疗以及放射线治疗。所有患者均签署知情同意书,并通过笔者区院伦理委员会审议通过。

3. 成纤维细胞培养及处理:将术中切取的增生性瘢痕组织于无菌超净台内以 PBS 缓冲液漂洗 3 遍,去除残留的血液及其他混杂异物,仔细切除表皮及与之相连的部分瘢痕组织,以防止表皮细胞混杂。将增生性瘢痕组织修剪成 1mm×1mm×1mm 的小组织块,均匀接种于培养皿内,缓慢加入 DMEM 培养液(10% FBS, 50mg/L 抗坏血酸, 1% 青霉素和链霉素),在 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度条件下的培养箱中培

养,每 3 天换液 1 次。待组织块周围细胞长成致密单层后,胰酶消化并传代培养,选择 3~6 代的细胞用于后续实验研究。

4. 细胞形态与增殖观察:将原代培养的细胞分成两组,对照组及 A 型肉毒毒素组。取对数生长期的成纤维细胞,以 1×10^4 /孔细胞数种于 96 孔板上,对照组给予 DMEM 培养基,而 A 型肉毒毒素组则给予含有 0.4U/L A 型肉毒毒素的 DMEM 培养基。分别于细胞接种后的第 1、3、5 和 7 天采用 CCK-8 试剂盒检测成纤维细胞增殖情况。最后采用酶标仪读取各孔在 450nm 处的吸光度(A 值)。

5. 流式细胞术检测细胞凋亡率:收集对数生长期原代成纤维细胞,将其以每孔 1×10^5 接种于 6 孔板中。分为对照组及 A 型肉毒毒素组。处理方法同上。24h 后采用胰酶(无 EDTA)消化细胞并收集,PBS 洗 3 遍,100μl binding buffer 重悬细胞后,分别加入 5μl 的 Annexin V-FITC 和 5μl 的 PI 并充分混匀,室温避光下孵育 10min,之后采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

6. Western blot 法检测 A 型肉毒毒素对成纤维细胞中 I 型胶原蛋白及 ERK/MAPK 信号通路的影响:收集对数生长期原代成纤维细胞,将其以每孔 5×10^5 接种于 6 孔板中。分为对照组、A 型肉毒毒素组及 U0126 处理组。U0126 是 MAPK 激酶 MEK1 和 MEK2 的高效选择性抑制剂。处理方法同上。24h 后采用胰酶(无 EDTA)消化细胞并收集,采用 RIPA 裂解液裂解上述 3 组细胞,并提取总蛋白。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 20μg 细胞总蛋白加入上样缓冲液后采用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,后转移至 PVDF 膜。以 50g/L 脱脂奶粉封闭 30min,采用鼠 I 型胶原蛋白,p-ERK1/2,ERK1/2 和 GAPDH 单克隆抗体孵育过夜。次日采用 TBST 洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗,孵育 2h 后,在发光仪上进行发光。根据内参标准计算目标条带相对值,判断蛋白相对表达量。

7. 统计学方法:数据采用 SPSS 17.0 进行统计分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. A 型肉毒毒素对增生性瘢痕成纤维细胞形态及增殖活性影响:对照组成纤维细胞形态呈长梭形,细胞略宽大。而 A 型肉毒毒素处理的成纤维细胞

则表现为细胞体积变小,有些趋向圆形,核质比例下降(图1)。通过CCK-8对对照组及A型肉毒毒素组成纤维细胞增殖检测后发现,随着时间的推移,两组细胞数量均呈逐渐上升趋势。在第1天时,两组细胞数量比较差异无统计学意义,而在接种后的第3、5、7天,两组细胞数量比较差异均有统计学意义,并且A型肉毒毒素组细胞数量显著低于对照组($P < 0.05$),在第7天时,A型肉毒毒素组细胞数量仅为对照组的68.9%(图2)。

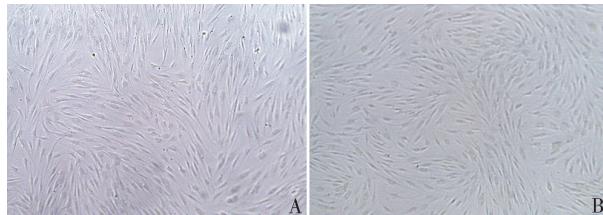


图1 两组增生性瘢痕成纤维细胞形态

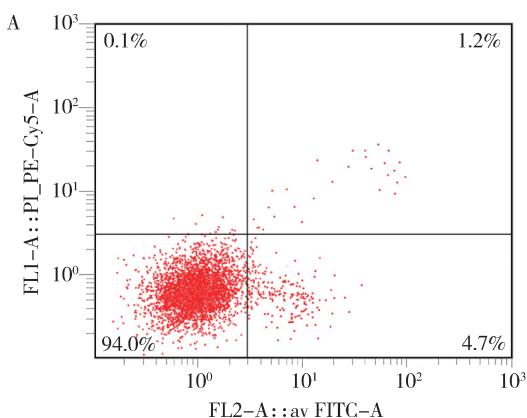


图2 人增生性瘢痕成纤维细胞增殖曲线

两组比较,* $P < 0.05$

2. A型肉毒毒素对增生性瘢痕成纤维细胞凋亡的影响:通过流式术对两组人增生性瘢痕成纤维细胞的凋亡情况进行检测,结果显示,对照组细胞凋亡比率为5.9%,而A型肉毒毒素组成纤维细胞的凋亡比率为35.9%,显著高于对照组(图3)。

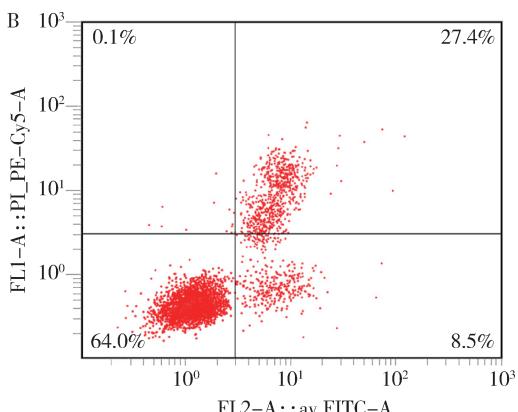


图3 两组人增生性成纤维细胞凋亡流式结果

A. 对照组; B. A型肉毒毒素组

3. A型肉毒毒素对成纤维细胞中I型胶原蛋白及ERK/MAPK信号通路的影响:各组成纤维细胞I型胶原蛋白,总ERK1/2,p-ERK1/2及GAPDH蛋白表达Western blot法检测结果如图4所示。通过条带灰度值的定量分析,结果显示,3组成纤维细胞的总ERK1/2蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而p-ERK1/2在对照组则仍显著高表达,但A型肉毒毒素组和U0126组的p-ERK1/2则显著受抑制,且低表达。I型胶原蛋白则在对照组中高表达,显著高于A型肉毒毒素组和U0126组($P < 0.05$)。详见图4、图5。

讨 论

真皮损伤后常常引起增生性瘢痕,这是一种常见的皮肤纤维化疾病。其成因则是成纤维细胞的过度

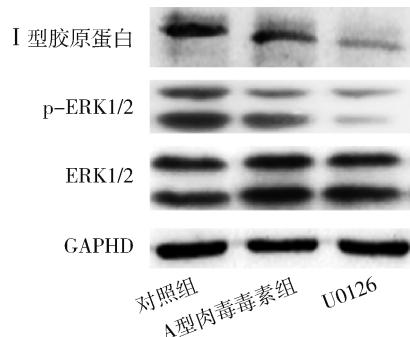


图4 各组成纤维细胞的蛋白表达Western blot法检测结果

增殖,分泌的胶原蛋白大量沉积导致皮肤纤维化病变。增生性瘢痕常常会引起不适的外观及瘙痒感,并且特殊部位的增生性瘢痕则会导致组织器官的变型,甚至影响关节部位的正常生理功能,给患者带来了沉

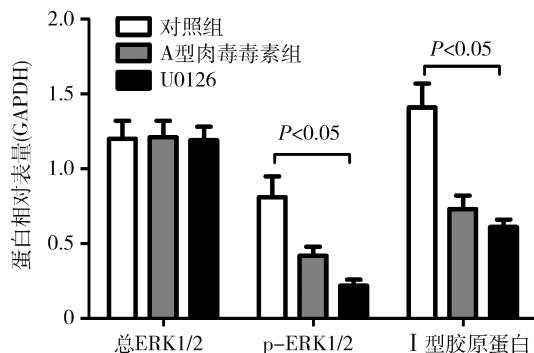


图 5 各组成纤维细胞的蛋白相对表达量

重的心理负担^[6]。术后是增生性瘢痕发生的重要时期,给临床预防和治疗带来了极大的困难。目前临床对于增生性瘢痕的治疗方法主要有放疗、压力疗法、中药、激光、分子防治及肉毒毒素等^[7]。

A 型肉毒毒素是一种具有神经毒性的药物,它能够拮抗胆碱能的神经末梢的钙离子,使得乙酰胆碱不能从神经末梢释放,导致肌纤维收缩受限,最终萎缩。还有研究发现 A 型肉毒毒素还能够在非神经末梢部位,例如腺体和平滑肌上抑制神经递质的释放。近年来有学者将 A 型肉毒毒素用于增生性瘢痕的预防和治疗,它能够有效的抑制增生性瘢痕的体积,使其变软,松弛,最终挛缩程度改变^[8,9]。然而其如何发挥有效的抑制效果,研究甚少。在本研究中,笔者将临幊上遇到的手术切除的人增生性瘢痕进行消化并体外分离培养出成纤维细胞。通过细胞增殖活性检测,笔者发现 A 型肉毒毒素组和对照组成纤维细胞的增殖是呈逐渐增加趋势,在接种后的第 3、5、7 天,A 型肉毒毒素组细胞数量显著低于对照组($P < 0.05$),在第 7 天时,A 型肉毒毒素组细胞数量仅为对照组的 68.9%。这表明 A 型肉毒毒素能够有效的抑制成纤维细胞的增殖活性。

通过对细胞形态的观察,笔者发现对照组成纤维细胞形态呈长梭形,细胞略宽大。而 A 型肉毒毒素处理的成纤维细胞则表现为细胞体积变小,有些趋向圆形,核质比例下降。李卫华等^[10]也采用 A 型肉毒毒素干预成纤维细胞,在第 6 天时,细胞数量仅为对照组的 79.3%。这一结果与笔者的研究结果相吻合。那么这种增殖活性的抑制是否伴随着成纤维细胞的凋亡增加?笔者随后又采用流式细胞术对对照组和 A 型肉毒毒素干预的成纤维细胞进行凋亡分析。对照组细胞凋亡比率为 5.9%,而 A 型肉毒毒素组成纤维细胞的凋亡比率为 35.9%。这充分表明 A

型肉毒毒素能显著增加成纤维细胞的凋亡比例。于波等人的研究也表明 A 型肉毒毒素能够显著促进成纤维细胞凋亡^[11]。

ERK 包括 ERK1 和 ERK2,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键,其中 ERK1 和 ERK2 的相对分子质量分别为 44kDa 和 42kDa。磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而介导 Elk-1、ATF、NF-κB、Ap-1、c-fos 和 c-Jun 的转录活化并参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、胶原蛋白表达和细胞癌变等多种生物学反应。然而 A 型肉毒毒素抑制成纤维细胞增殖,促进凋亡的机制知之甚少。本研究发现,对照组、A 型肉毒毒素组和 U0126 组成纤维细胞的总 ERK1/2 蛋白相对表达量差异无统计学意义,而 p-ERK1/2 在对照组则仍显著高表达,但 A 型肉毒毒素组和 U0126 组的 p-ERK1/2 则显著受抑制,且低表达。I 型胶原蛋白则在对照组中高表达,显著高于 A 型肉毒毒素组和 U0126 组。这也充分表明在 A 型肉毒毒素可能通过 ERK/MAPK 信号途径而发挥作用。同时 ERK/MAPK 信号通路在成纤维细胞生成 I 型胶原蛋白中发挥着重要作用^[12]。这一机制的发现,为 A 型肉毒毒素治疗增生性瘢痕奠定了一定的理论基础,未来如何将 A 型肉毒毒素结合其作用机制更好地应用于临幊,还需要更多的基础和临床研究来揭示^[13~16]。

参考文献

- 胡丽,李伟. 增生性瘢痕的发病机理和预防进展[J]. 中国美容医学,2013,22(5):607~610
- Ziade M, Domergue S, Batifol D, et al. Use of botulinum toxin type A to improve treatment of facial wounds: a prospective randomised study[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2013, 66(2):209~214
- 王玉玲,万德芬. 痤理性瘢痕形成的细胞分子生物学研究[J]. 中国美容医学,2006,15(12):1422~1425
- Xiao Z, Zhang M, Liu Y, et al. Botulinum toxin type a inhibits connective tissue growth factor expression in fibroblasts derived from hypertrophic scar[J]. Aesthetic Plast Surg, 2011, 35(5):802~807
- Caliskan E, Gamsizkan M, Acikgoz G, et al. Intralesional treatments for hypertrophic scars: comparison among corticosteroid, 5-fluorouracil and botulinum toxin in rabbit ear hypertrophic scar model[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(8):1603~1608
- 王琳,邹宁正,傅敏刚,等. A 型肉毒毒素注射治疗瘢痕疙瘩顽固性痛痒的临床研究[J]. 组织工程与重建外科杂志,2009,5(5):286~288
- 马立国,饶颖慧,吴春涛,等. 两种方法联合放疗治疗瘢痕疙瘩的疗效比较[J]. 河北医药,2010,32(14):1868~1870

(下转第 74 页)

性^[10]。

本研究以 2997 例社区轻中度高血压患者为研究对象,进行了为期 6 个月的治疗,其中空腹血糖受损、糖尿病患者分别为 346、335 例。研究结果显示,尼群洛尔治疗具有不同血糖代谢状况的轻中度高血压患者,均具有良好的血压控制效果,正常糖耐量组、空腹血糖受损组、糖尿病组降压总有效率分别为 87.8%、90.8%、86.6% ($P > 0.05$)。以血压 $< 140\text{mmHg}/90\text{mmHg}$ 为达标,则 3 组治疗 6 个月后达标率分别为 85.9%、92.1%、82.3% ($P < 0.01$),糖尿病组达标率较低。但是仍然达到了 80% 以上。研究期间 3 组患者收缩压分别下降了 22.7 ± 12.6 、 23.7 ± 11.4 、 $22.5 \pm 13.2\text{mmHg}$,舒张压分别下降 12.4 ± 8.7 、 13.4 ± 8.4 、 $12.8 \pm 9.6\text{mmHg}$,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

在为期 6 个月的治疗中,3 组具有不同血糖代谢状态的高血压患者心率分别下降了 7 ± 9 、 7 ± 9 、 8 ± 9 次/分。心率可反映交感神经兴奋性,心率加快、心收缩力加强,容易引起心脏左室肥厚,而左心室肥厚的高血压病人猝死率明显增加,因此,在高血压的治疗中需要对心率进行控制。尼群洛尔的 β 受体阻断剂成分具有对抗交感活性、抗心肌缺血和抗心律失常的作用,其对心率的作用与钙拮抗剂互补。研究显示,具有不同血糖代谢状况的原发性高血压患者服用尼群洛尔后,总胆固醇、HDL-C、LDL-C 变化比较差异无统计学意义,三酰甘油、空腹血糖差异无统计学意义 ($P < 0.05$),其中,空腹血糖受损、糖尿病患者 TG 均下降,血糖正常者无变化,同时前二者血糖下降,而后者略有升高。治疗期间 3 组患者不良反应发生率分别为 5.7%、3.8%、5.7% ($P > 0.05$),多数为

轻中度不良反应。

本研究结果显示,尼群洛尔用于治疗具有不同血糖代谢状况的轻中度原发性高血压患者,具有较好的治疗效果和安全性,可用于血糖代谢正常、空腹血糖受损以及糖尿病患者的高血压治疗。

志谢:感谢江苏吉贝尔药业有限公司对本研究的大力支持。

参考文献

- 李立明,饶克勤,孔灵芝,等.中国居民 2002 年营养与健康状况调查[J].中华流行病学杂志,2005,26(7):478-484.
- Gao Y, Chen G, Tian H, et al. Prevalence of hypertension in China: a cross-sectional study[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e65938.
- Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9):948-959.
- 孙宁玲,王鸿懿,霍勇.我国高血压专病门诊患者血压控制及糖代谢调查现状分析[J].中华内科杂志,2013,52(8):654-658.
- 刘燕春.复方尼群洛尔片治疗原发性高血压的疗效分析[J].中国医药指南,2012,10(15):526-527.
- 黄高忠,吴宗贵,朱鼎良,等.复方尼群洛尔片治疗轻中度原发性高血压的疗效和安全性及剂量配比[J].中华全科医师杂志,2010,9(2):95-99.
- 陈祚,王增武,王馨,等.尼群洛尔治疗社区轻中度原发性高血压的疗效和安全性[J].中华高血压杂志,2014,22(5):445-450.
- 赵文惠,肖建中,杨文英.不同糖耐量状态人群高血压治疗状况分析[J].中华医学杂志,2012,92(36):2550-2552.
- Su DF, Xu LP, Miao CY, et al. Two useful methods for evaluating antihypertensive drugs in conscious freely moving rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25:148-151.
- Xie HH, Miao CY, Jiang YY, et al. Synergism of atenolol and nitrindipine on hemodynamic amelioration and organ protection in hypertensive rats[J]. J Hypertens, 2005, 23:193-201.

(收稿日期:2016-11-30)

(修回日期:2016-12-23)

(上接第 29 页)

- 蔡景龙.不同类型瘢痕的临床特点与手术方法选择[J].组织工程与重建外科杂志,2007,3(3):126-128.
- Sepehr A, Chauhan N, Alexander AJ, et al. Botulinum toxin type a for-facial rejuvenation: treatment evolution and patient satisfaction [J]. Aesthetic Plast Surg. 2010;34(5):583-586.
- 李卫华,李德水,高玉伟,等. A 型肉毒毒素可抑制人增生性瘢痕成纤维细胞增殖和胶原蛋白的合成[J].中国组织工程研究,2012,16(20):3667-3670.
- 于波,陈敏亮,刘文阁. A 型肉毒毒素对增生性瘢痕成纤维细胞的影响[J].中国美容医学,2008,17(1):72-75.
- 胡永斌,宗豫蓉,冯德云,等. p38/ERK 激酶调控 TGF- β 1 诱导的 HLF-02 细胞 I 型胶原表达及 MMP-2 活力[J].中华劳动卫生职业病杂志,2006,24(2):77-80.

- 朱力,王恒樑,黄留玉.肉毒毒素研究进展[J].生物技术通讯,2005,16(2):186-190.
- 王琳,邹宁正,范志宏.肉毒毒素 A 对大鼠皮肤及创面组织中 SP、CGRP、TGF- β 1 和 α -SMA 的影响[J].中华整形外科杂志,2009,25(1):50-53.
- Zhibo X, Miaobo Z. Botulinum toxin type A affects cell cycle distribution of fibroblasts derived from hypertrophic scar[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2008, 61(9):1128-1129.
- Zhang DZ, Liu XY, Xiao WL, et al. Botulinum Toxin type A and the prevention of hypertrophic scars on the maxillofacial area and neck: a Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0151627.

(收稿日期:2017-01-04)

(修回日期:2017-01-17)