

抗氧化剂对人皮肤瘢痕成纤维细胞及其中的吡啶连接链形成的影响

胡耀棠 熊良俭 梁秉中 温冠清

【摘要】 目的 应用人皮肤瘢痕组织的成纤维细胞培养物测试抗氧化剂对吡啶连接链形成的抑制作用,从而筛选出有效而且不损害细胞的抗氧化剂,以应用于增生瘢痕的临床治疗。方法 用烧伤病人皮肤瘢痕组织培养成纤维细胞,在第8代传代培养物中加入自由基生成系统及不同的抗氧化剂:超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化酶、谷胱甘肽、去铁铵,而对照组不加任何作用物。在37℃作用4h后,显微镜下观察细胞的形态变化并测定细胞及其上清液的吡啶连接链含量。结果 从各实验组成纤维细胞中测出的吡啶连接链的含量均低于对照组,尤其以过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和去铁铵为显著($P < 0.05$),而其中只有在加入过氧化氢酶的细胞培养物能保持正常的细胞形态,其余的抗氧化剂则出现明显的细胞损害,表现在细胞膜破坏、细胞溶解。结论 过氧化氢酶等5种抗氧化剂都能有效地抑制吡啶连接链的形成,在临床应用上首选过氧化氢酶,因其既能有效地清除自由基从而抑制吡啶连接链的形成,而且不损害细胞形态结构。

【关键词】 瘢痕,肥大性; 成纤维细胞; 抗氧化药; 吡啶类

The effects of antioxidants on pyridinoline cross linkage formation in human fibroblasts culture from hypertrophic scars WU Haytong*, HUNG Laungkim, LEUNG Pingchung, WAN Koonching. *Department of Orthopaedics & Traumatology, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of antioxidants on the pyridinoline crosslink formation in human fibroblasts culture from hypertrophic scars. The role of these antioxidants in reducing the level of pyridinoline crosslinks in-vitro without damaging the cells has important implications. These antioxidants can be applied for the treatment of hypertrophic scars. **Methods** 9 cases of hypertrophic scar biopsies were taken from burn patients. The specimens were explant culture for 7 days. Isolated fibroblasts from these explant cultures were subcultured for 8 passages. At the last passage, the cultures were subjected to a free radical generating system and were added different antioxidants. The supernatant and cells were collected after 4 hrs of incubation and the concentration of pyridinoline crosslinks was determined using Pyrilink kit. **Results** When the fibroblast cultures were subjected to free radicals and antioxidants, all samples showed a decrease in pyridinoline crosslinks concentration. The more potent antioxidants found in this study were catalase, superoxide dismutase and desferrioxamine. Particularly catalase which did not damage the cells. **Conclusion** The antioxidants used in this study were found to be effective in reducing the concentration of pyridinoline crosslinks. The best agent is catalase, which did not damage the cells and could be considered for clinical use.

【Key words】 Cicatrix, hypertrophic; Fibroblasts; Antioxidants; Pyridines

消除增生瘢痕一直是整形外科中难以解决的问题。瘢痕形成的机制仍不十分清楚,不少文章曾报导,从外伤到增生瘢痕的形成过程中伴有吞噬细胞的激活和自由基的释放^[1-4],自由基对存在于胶原纤维间的吡啶连接链的形成有密切关系^[5,6],而这种吡啶连接链大量地存在于瘢痕组织中^[7-10]。我们采用体外细胞培养方法,探讨应用抗氧化剂清除自由基以减少吡啶连接链形成的可能性,为寻找有效的

抗氧化剂预防和治疗增生瘢痕提供实验依据。

材料与方法

一、材料

1. 瘢痕组织的来源:增生瘢痕组织取自香港威尔斯亲王医院的烧伤病人,共9例。其中女性4例,男性5例,年龄4~39岁。所有病例的瘢痕部位均在上肢,瘢痕形成时间最短1年半,最长5年。瘢痕组织是在病者接受瘢痕松解整形手术时采取,术前征得病人同意并签署提供瘢痕组织作研究之用的同

作者单位:香港中文大学矫形外科及创伤学系(胡耀棠、熊良俭、梁秉中);香港理工大学护理及医疗科学系(温冠清)

意书。采集的瘢痕组织是手术过程中必需切除的部分组织。

2. 主要试剂: 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase)、过氧化氢酶 (catalase)、谷胱甘肽过氧化酶 (glutathione peroxidase)、谷胱甘肽 (glutathione)、去铁铵 (desferrioxamine)、抗坏血酸 (ascorbic acid) 和乙二胺四乙酸 (EDTA) 为美国 Sigma 公司产品, 过氧化氢 (hydrogen peroxide) 为德国 Riedel 公司产品, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为德国 Merck 公司产品, DMEM 培养基、新生小牛血清和胰蛋白酶为美国 GIBCO 公司产品, 吡啶连接链试剂盒由美国 Metra Biosystems 公司提供。

二、方法

1. 成纤维细胞培养: (1) 原代组织块培养: 把手术中采取的瘢痕组织放入无菌器皿并移入净化工作台内。在无菌条件下, 剪除瘢痕组织的脂肪, 把瘢痕组织切成约 1 mm^3 小块, 点状接种于直径 60 mm 培养皿中, 并暴露于净化工作台内约 20 min, 待组织块紧贴培养皿底部后, 加入 3 ml 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 置 37°C 含 5% CO_2 的培养箱进行培养, 每周更换新鲜培养液 2 次。(2) 分离成纤维细胞: 培养 7 d 后, 组织块周围长出上皮细胞和成纤维细胞。我们利用成纤维细胞对胰蛋白酶敏感度高于上皮细胞的特点, 于培养物中加入 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min, 把成纤维细胞从培养皿中分离出来 (上皮细胞仍紧贴于培养皿中) 并接种到细胞培养瓶, 置 37°C 培养。(3) 传代培养: 当成纤维细胞生长达到 70% ~ 80% 融合后便进行传代培养, 传代时用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制成细胞悬液, 按等密度分至两个培养瓶中, 加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液于 37°C 培养。大约 2 ~ 3 d 便可传代 1 次。当传代至第 8 代时, 把成纤维细胞定量地接种到 6 个直径 35 mm 的培养皿中, 每培养皿细胞数为 3×10^5 。于 37°C 培养 24 h 后改用不含小牛血清的 DMEM 培养液培养 48 h, 然后进行分组实验。

2. 实验分组: 利用上述定量的成纤维细胞培养物进行下列分组实验。(1) 实验组: 5 皿细胞培养物分别地加入 5 种不同的抗氧化剂, 抗氧化剂在培养物中的最终浓度分别为: $58\ \mu\text{g/ml}$ 超氧化物歧化酶、 $67\ \mu\text{g/ml}$ 过氧化氢酶、 $1\ \text{mmol/L}$ 谷胱甘肽、 $0.38\ \text{mg}$ 谷胱甘肽过氧化酶、 $1\ \text{mmol/L}$ 去铁铵, 随后立即加入自由基生成系统 (在细胞培养物中的最终浓度是 $0.1\ \text{mmol/L}$ Fe^{3+} 、 $0.1\ \text{mmol/L}$ EDTA、 $1.7\ \text{mmol/L}$ 抗坏血酸、 $1\ \text{mmol/L}$ H_2O_2)。(2) 对照组: 细胞培养物不加任何作用物。9 例病人样本, 每例均作 6 组实

验 (5 组实验组和 1 组对照组), 每组实验均做两份。所有培养皿置 37°C 培养 4 h 后, 显微镜下观察及拍照细胞形态, 并分别收集细胞及其上清液作吡啶连接链含量测定。

3. 吡啶连接链含量测定: (1) 水解成纤维细胞: 用 1 ml $6\ \text{mol/L}$ HCl 把成纤维细胞从培养皿中水解分离并移入安瓿中, 置 110°C 水解。(2) 吡啶连接链的测定: 应用吡啶连接链试剂盒, 把已裂解的成纤维细胞作 10 倍稀释, 细胞上清液则不作稀释。50 μl 待检样本及标准对照液分别加入测试板, 再加入 100 μl 碱性磷酸酶于 4°C 作用 3 h, 然后用缓冲液 250 μl 洗 3 次, 再加入 150 μl 磷酸 P-硝苯基, 室温作用 60 min 后加入 100 μl $1\ \text{mol/L}$ NaOH, 中止反应。用美国 Biorad 公司型号 2550 的 EIA 读数仪测定吸光度, 波长 405 nm。

4. 结果处理: 按上述方法完成了对 9 例烧伤病人瘢痕组织的所有实验和测定。测定结果经计算机 SPSS 软件用 t 检验法作统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

结 果

一、吡啶连接链含量

结果显示从所有组别的成纤维细胞中测出的吡啶连接链含量均比上清液高出 6 ~ 7 倍 (表 1)。当成纤维细胞培养物中加入自由基生成系统及其不同的抗氧化剂后, 从各实验组成纤维细胞中测出的吡啶连接链含量均低于对照组, 尤以超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和去铁铵组为显著 ($P < 0.05$)。但从培养上清液中测出的吡啶连接链含量, 各实验组与对照组之间差异均无显著意义 ($P > 0.05$)。

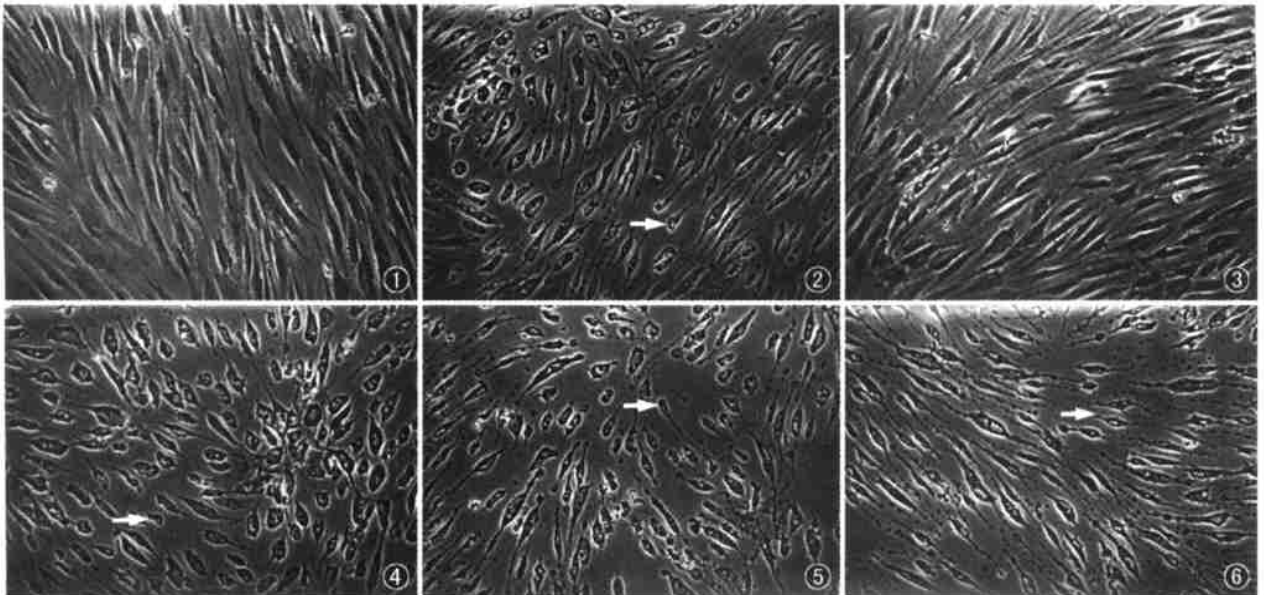
表 1 吡啶连接链含量比较 ($\bar{x} \pm s$, nmol/L)

组别	例数	上清液中	成纤维细胞中
1 对照组 (不加反应物)	9	55 ± 17	389 ± 48
2 超氧化物歧化酶组	9	56 ± 26	$272 \pm 40^*$
3 过氧化氢酶组	9	38 ± 13	$288 \pm 42^*$
4 谷胱甘肽组	9	68 ± 25	287 ± 54
5 谷胱甘肽过氧化酶组	9	49 ± 24	308 ± 60
6 去铁铵组	9	48 ± 17	$274 \pm 42^*$

注: *与对照组比较 $P < 0.05$

二、细胞形态变化

抗氧化剂对成纤维细胞的影响程度从光学显微镜下 (图 1) 中可以清楚看到, 除了对照组和实验组中的过氧化氢酶组能保持正常的成纤维细胞形态之外, 其余各实验组均出现不同程度的细胞损害——



注: ①对照组(不加反应物) ②超氧化物歧化酶组 ③过氧化氢酶组 ④谷胱甘肽组 ⑤谷胱甘肽过氧化酶组 ⑥去铁铵组

图1 成纤维细胞在加药后4h的显微镜下形态学变化,除了对照组和过氧化氢酶组保持正常成纤维细胞形态外,其余④组和去铁铵组的细胞均受损害,细胞膜破坏,细胞溶解(箭头所示) ×100

细胞膜破坏、细胞溶解。

讨 论

本实验结果发现吡啶连接链绝大部分都存在于成纤维细胞中,只有少量释放到培养液。本实验所用的自由基生成系统产生大量的羟基,它们除了对细胞膜产生过氧化损害作用之外,同时还破坏细胞的DNA分子。本研究中应用的抗氧化剂都能有效地抑制吡啶连接链的形成,但只有过氧化氢酶能有效地保护成纤维细胞免受自由基生成系统产生的羟基对细胞的伤害,而保持成纤维细胞的正常形态;其余的抗氧化剂均出现细胞膜破坏,细胞溶解等细胞损害的表现。然而,如何在临床上应用这种有效地抑制吡啶连接链的形成而不损害细胞的抗氧化剂去治疗增生瘢痕,仍需要作进一步的实验研究。

近期有文章报道,利用电渗药物的方法治疗增生瘢痕^[11, 12];为此我们构思今后的研究方向将会是利用电渗方法把抗氧化剂渗入皮肤瘢痕组织中清除自由基,以抑制吡啶连接链的形成,吡啶连接链是存在于胶原纤维间的连接链,随着吡啶连接链的减少,胶原纤维的数目亦会随之降低,从而达到预防和治疗增生瘢痕的目的,而临床上首选的抗氧化剂应该是过氧化氢酶,因其既能有效地清除自由基而且不损害细胞。

参 考 文 献

- 1 Castagnoli C, Trombotto G, Ondei S, et al Characterization of T-cell subsets infiltrating post-bum hypertrophic scar tissues. *Bums*, 1997, 23: 565-572
- 2 Rosen GM, Pou S, Ramos CL, et al Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J*, 1995, 9: 200-209
- 3 Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, et al Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27: 617-622
- 4 Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med*, 1978, 298: 659-668
- 5 Wan KC, Evans JH. Free radical involvement in hypertrophic scar formation. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26: 603-608
- 6 Wan KC, Lewis WH. Study of free iron and pyridinoline in hypertrophic scars and normal skin. *Br J Biomed Sci*, 1996, 53: 196-203
- 7 Inalsingh CH. An experience in treating five hundred and one patients with keloids. *Johns Hopkins Med J*, 1974, 134: 284-290
- 8 Moriguchi T, Fujimoto D. Crosslink of collagen in hypertrophic scar. *J Invest Dermatol*, 1979, 72: 143-145
- 9 Linares HA. From wound to scar. *Bums*, 1996, 22: 339-352
- 10 Wan KC, Chow TC. Age-related changes in the concentration of pyridinoline cross-links in human skin. *Ann Clin Biochem*, 1999, 36: 666-668
- 11 Shigeki S, Murakami T, Yata N, et al Treatment of keloid and hypertrophic scars by iontophoretic transdermal delivery of tranilast. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1997, 31: 151-158
- 12 Zhao L, Hung LK, Choy TT. Delivery of medication by iontophoresis to treat post-bum hypertrophic scars: investigation of a new electronic technique. *Bums*, 1997, 23 (Suppl1): S27-29.

(收稿日期: 2001-10-15)
(本文编辑: 刘雪松)