

·基础研究·

·论著·

雷帕霉素对体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响

李永峰,朱世泽,郑志芳,王朝阳,吴文艺,蔡玉梅

(福建医科大学附属第二医院整形外科 福建 泉州 362000)

[摘要]目的:雷帕霉素(Rapamycin Rapa)对体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制作用,深入探讨其作用机制。方法:用雷帕霉素的不同药物浓度干预体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞,CCK-8方法检测对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响;免疫组化、RT-PCR和western blot检测干预前后瘢痕疙瘩成纤维细胞中磷酸化的P70s6k、4E-BP1表达情况。结果:CCK-8检测体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞的吸光度,随浓度和时间的增大而减小,各组之间差别具有统计学意义($P < 0.05$);免疫组化(药物浓度取10nmol/L)、RT-PCR和western blot对不同药物浓度(0.1nmol/L、1nmol/L、10nmol/L、100nmol/L)干预前后,基因表达和蛋白表达均下降,各组之间差别具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:雷帕霉素对体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖有明显的抑制作用,也抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞中磷酸化的P70s6k、4E-BP1表达。

[关键词]雷帕霉素;瘢痕疙瘩;成纤维细胞;mTOR;P70s6k;4E-BP1

[中图分类号]R619+.6 **[文献标识码]**A **[文章编号]**1008-6455(2014)03-0207-06

The effect of rapamycin on proliferation of Human Keloids Fibroblasts in vitro

LI Yong-feng,ZHU Shi-ze,ZHENG Zhi-fang,WANG Chao-yang,WU Wen-yi,CAI Yu-mei

(Department of Plastic Surgery,the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University,Quanzhou 362000,Fujian,China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of rapamycin on proliferation of Human keloid fibroblasts in vitro, to further explore the mechanism of it. **Methods** With different concentrations of rapamycin effect on cultured keloid fibroblasts, and CCK-8 assay was adopted to evaluate cell survival.Immunohistochemistry,RT-PCR and western blot were performed to detect the expression of P70s6k and 4E-BP1 before and after intervention. **Results** CCK-8 assay detected the absorbance of keloid fibroblasts, which decreased with the concentrations and time increased.There were significant differences between these groups ($P < 0.05$). IHC (rapamycin concentration 10nmol/L intervention), RT-PCR and western blot results showed that gene expression and protein expression of P70s6k and 4E-BP1 were all decreased in (0.1nmol/L,1nmol/L,10nmol/L,100 nmol/L)rapamycin concentration before and after intervention.There were significant differences between these groups ($P < 0.05$). **Conclusions** rapamycin significantly inhibited the proliferation of Human Keloids Fibroblasts cell in vitro.rapamycin also inhibited the expression of P70s6k and 4E-BP1.

Key words:Rapamycin ;keloid;fibroblast;mTOR ;P70s6k ;4E-BP1

雷帕霉素(Rapamycin Rapa)是一种新型的大环内酯类免疫抑制剂。Rapa的分子式为C₅₁H₇₉N₀₁₃,分子量991ku,为白色固体结晶,熔点为183~185℃,亲脂性,可溶解于甲醇、乙醇、丙酮和

氯仿等有机溶剂,极微溶于水,几乎不溶于乙醚。起初被作为低毒性的抗真菌药物,后来作为治疗器官移植排斥反应试用,从目前动物实验及临床应用的效果看,Rapa是一种疗效好、低毒、无肾毒性的新型

基金项目:福建省教育厅基金资助项目(项目编号:JA09277)

通讯作者:朱世泽,福建医科大学附属第二医院整形外科教授,主任医师。

第一作者李永峰现单位:河南省郑州市文化路86号河南整形美容医院美容外科 邮编:450000。

免疫抑制剂^[1]。近年来研究发现 Rapa 对多种肿瘤有抑制作用,同时还具有神经保护和免疫调节等作用^[2-4]。有研究报道,在体外培养瘢痕疙瘩的成纤维细胞中,抑制哺乳类动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin mTOR)信号途径可以抑制成纤维细胞的生长,当病理性瘢痕成纤维细胞 mTOR 信号途径受到抑制时,增殖细胞核抗原(PCNA)、cyclin D1、纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)胶原纤维和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达都将下降^[5]。因此,本研究拟通过 Rapa 干预成纤维细胞前后,同时观察不同药物浓度下 P70s6k、4E-BP1 的表达情况,进而进一步探讨 Rapa 对瘢痕疙瘩的抑制作用及其形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本 5 例瘢痕疙瘩标本分别来自于泉州市第一医院和福建医科大学附属第二医院整形美容科,术前经患者知情同意,术后病理证实为瘢痕疙瘩,并且患者术前无药物及其他治疗史,无患其他严重疾病。患者年龄 9~28 岁,瘢痕生长时间为 6 个月到 2 年。

1.1.2 主要试剂和仪器:雷帕霉素(分子式 $C_{51}H_{79}NO_{13}$,相对分子质量 914.2,碧云天生物技术公司) DMEM-F12 培养基(GIBCO 公司);新生牛血清(PAA 公司);青链霉素原液(GIBCO 公司) Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒)(碧云天公司);P70s6k 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);4E-BP1 单克隆抗体(Sigma 公司) β -actin 抗体(Santa Cruz 公司) Quant cDNA 第一链合成试剂盒(天根生化科技有限公司)引物合成(上海鼎安生物科技有限公司) PCR 基因扩增仪(ABI 公司,9700);全自动凝胶成像系统(Tocan 公司) RIPA 裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒、UltraECL 底物发光检测试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)。

1.1.2 药物配制 试验时用 DMEM-F12 培养基稀释为实验浓度 0.1nmol/L、1nmol/L、10nmol/L、100nmol/L。

1.2 方法

1.2.1 细胞的体外培养:采取组织块贴壁法进行成纤维细胞的培养。手术切下的瘢痕疙瘩小心去除表皮及皮下脂肪组织,剪成大小约 0.5~1mm³ 的小块,加入少量小牛血清,接种于培养瓶中,在 95%空

气,5%CO₂,37℃,饱和湿度条件下培养 24h,使组织块牢固贴附于瓶壁,然后加入适量含 20%小牛血清、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 DMEM-F12 培养液继续培养,每周换液两次,约 3~4 周,原代培养的细胞生长成单细胞层,几乎覆盖培养瓶进行传代。用 0.25%胰蛋白酶消化至大部分细胞脱离培养瓶,以 1:2 的比例传代培养,每隔 2~3 天用含 20%小牛血清及双抗的 DMEM-F12 培养液换液一次,待细胞铺满瓶底后传代。实验取 3~6 代成纤维细胞。

1.2.2 细胞增殖抑制实验:取对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 5×10^4 /ml,取 200 μ l 接种于 96 孔培养板中。培养 24h 待细胞贴壁后,倒掉培养液,实验组雷帕霉素的终浓度分别为 0.1nmol/L、1nmol/L、10nmol/L、100nmol/L,每种浓度设 5 个平行孔,置 95%空气,5%CO₂,37℃的培养箱内分别培养 24h、48h 和 72h,测定前除对照组外,每种浓度每孔加 CCK-8 测定液 20 μ l,放置细胞培养箱内约 30min 后,于酶标仪 450nm 处测定各孔吸光度 A 值。实验重复 3 次,求平均值。设空白组作为测吸光度调零用。抑制率 = 1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值。

1.2.3 细胞爬片免疫组化检测 P70s6k、4E-BP1:取药物浓度为 10nmol/L 进行定性检测,实验分组为:瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组、瘢痕疙瘩成纤维细胞药物干预组(浓度为 10nmol/L)、正常皮肤成纤维细胞组,取对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 5×10^4 /ml,取 500 μ l 接种于内含有盖玻片的 6 孔培养板中的盖玻片上,培养 12h 待细胞贴壁后,加入培养液继续培养 12h 使细胞生长同步后,倒掉培养液。将细胞按分组情况分别置于不同的培养条件下,继续培养 48h 后取出爬片,4%多聚甲醛 4℃固定 30min, PBS 洗 3min \times 3 次,3%H₂O₂ 孵育 15min,去除内源性过氧化物酶, PBS 缓冲液 3min \times 3 次。P70s6k 多克隆抗体稀释为 1:100,4E-BP1 单克隆抗体稀释为 1:200 的,后按试剂盒操作说明进行,最后并行苏木素复染,同时以 PBS 代替一抗行阴性对照。结果采用生物医学图像分析系统(JD801)进行定量分析,检测平均光密度(AOD)。

1.2.4 RT-PCR 检测 P70s6k、4E-BP1 基因的表达情况:Trizol 一步法提取细胞总 RNA,分别抽提正常皮肤成纤维细胞组、瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组、瘢痕疙瘩成纤维细胞药物干预组(0.1nmol/L、1nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L),成纤维细胞的总

RNA, 调整 RNA 为 1mg/L, 以 Beta-actin (β -actin) 为内参对照, 进行 RT-PCR 检测。P70s6k 引物序列为: 上游引物 5'GGGTGGAGGATG-CATGTAT3', 下游引物 5'ACACAAACATAGATGAACCCAT3', 产物为 452bp; 4E-BP1 引物序列为: 上游引物 5'CCTGATGGAGTGTGGGAACCT3', 下游引物 5'CGGAAGGAAGGGTTCGT3', 产物为 463bp; 内参 Beta-actin (β -actin) 引物序列为: 上游引物 5'CTGGGACGACATGGAGAAA3', 下游引物 5'AAGGA-AGGCTGGAAGAGTGC3', 产物为 564bp。循环条件: 预变性 94°C 5min, 变性 94°C 30s, 退火(P70s6k 为 59°C, 4E-BP1 为 61°C)30s, 延伸 72°C 1min, 循环 35 次, 终延伸 72°C 5min, 4°C 保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像分析系统观察, 拍照并进行分析, 其代表数值为平均灰度值, 代表相应基因的表达量, 并除以 β -actin 的平均灰度值, 所得数值作为各扩增产物的 mRNA 相对表达量。

1.2.5 Western blot 检测 P70s6k、4E-BP1 蛋白的表达情况: 将同步培养的正常皮肤成纤维细胞组、瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组、瘢痕疙瘩成纤维细胞药物干预组 (0.1nmol/L、1nmol/L、10nmol/L、100nmol/L), 干预 48h 后取出细胞, 吸掉培养基, 加入裂解液, 在冰上裂解细胞提取总蛋白, 进行蛋白定量, 根据 SDS-PAGE 上样量需要, 调整蛋白浓度, 100°C 煮沸变性 5min。根据目的蛋白的分子量, 配制 12% 分离胶凝胶, 浓缩胶浓度为 5%。浓缩胶恒压 90V, 约 20min; 分离胶恒压 150V, 电泳至溴酚蓝到凝胶底部。半干转膜, 按照电流 1.2mA/cm² 膜面积, 恒流转膜 0.45 μ m 孔径 PVDF 膜, 转膜时间 1.5h。转膜后用丽春红染色试剂对膜染色, 观察转膜效果。室温将膜浸没在 Western blot 封闭液中, 封闭 30min, 1:100 的 P70s6k 多克隆抗体及 1:200 的 4E-BP1 单克隆抗体 4°C 孵育过夜, 然后与 1:2000 的羊抗兔 IgG (H+L)HRP 二抗室温孵育 40min, 与 ECL 反应曝光、显影、定影, 凝胶成像分析系统观察, 拍照并进行分析。以 β -actin 作为内参进行校正,

分别计算出各组成纤维细胞中磷酸化的 P70s6k 和 4E-BP1 蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理: 应用统计软件 SPSS11.5 进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和成组 *t* 检验对结果进行统计学检验, 组间两两比较采用 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rapa 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的抑制作用: 以 Rapa 不同药物浓度对瘢痕疙瘩成纤维细胞进行干预, 检测平均光密度 (AOD)。实验结果显示不同药物浓度对瘢痕疙瘩成纤维细胞均有抑制作用, 并且呈现随药物浓度增大, 抑制作用越强, 随作用时间越长, 抑制作用越明显的整体趋势, 表现出时间与浓度的依赖关系。

2.2 细胞爬片的免疫组化检测细胞中 P70s6k、4E-BP1 蛋白表达情况: 取药物浓度为 10 nmol/L 进行定性检测, 实验分组为: 正常皮肤成纤维细胞组、瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组、瘢痕疙瘩成纤维细胞药物干预组。镜下见 P70s6k 主要表达在胞质内, 核内有少量表达, 瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组胞质染色为棕黄色 (图 1), 强阳性表达, 较正常皮肤成纤维细胞组表达明显增强, 瘢痕疙瘩成纤维细胞药物干预组胞质染色为浅黄色 (图 2), 表达较瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组减弱; 正常皮肤成纤维细胞组胞质染色为浅棕色 (图 3), 弱阳性表达。镜下见 4E-BP1 主要表达在胞质内, 核内也有少量表达, 瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组胞质染色为棕黄色 (图 4), 强阳性表达, 较正常皮肤成纤维细胞组表达明显增强, 瘢痕疙瘩成纤维细胞药物干预组胞质染色为浅黄色 (图 5), 表达较瘢痕疙瘩成纤维细胞非药物干预组减弱; 正常皮肤成纤维细胞组胞质染色为浅棕色 (图 6), 弱阳性表达。P70s6k 药物干预组阴性对照, 胞质淡染 (图 7), 浅蓝色; 4E-BP1 药物干预组阴性对照, 胞质淡染 (图 8), 淡蓝色。通过对各组的 AOD 进行统计学分析, 结

表 1 CCK-8 法检测 Rapa 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的抑制作用

浓度(nmol/L)	24h AOD 值	48h AOD 值	72h AOD 值	24h 抑制率(%)	48h 抑制率(%)	72h 抑制率(%)
0(对照)	0.423 \pm 0.017	0.584 \pm 0.012	0.674 \pm 0.015	---	---	---
0.1	0.407 \pm 0.012	0.511 \pm 0.013*	0.539 \pm 0.016*	3.79	12.5	20.0
1	0.387 \pm 0.064 [▲]	0.490 \pm 0.022*	0.456 \pm 0.022*	8.52	16.1	32.3
10	0.381 \pm 0.048 [▲]	0.403 \pm 0.021*	0.367 \pm 0.013*	10.0	31.0	45.7
100	0.316 \pm 0.028*	0.333 \pm 0.007*	0.353 \pm 0.017*	25.3	43.1	47.6

注: 统计分析: [▲] $P < 0.05$ 相对对照组; * $P < 0.01$ 相对对照组

表 2 P70s6k、4E-BP1 在各组中的表达情况

组别	P70s6k 组中 AOD 值	4E-BP1 组中 AOD 值
瘢痕非加药	0.414 ± 0.010	0.434 ± 0.005
瘢痕加药	0.335 ± 0.018 [▲]	0.332 ± 0.015 [▲]
正常细胞	0.376 ± 0.041 [*]	0.374 ± 0.044 [*]

注 加药物组与非加药物组比较 :[▲] $P < 0.01$;正常细胞组与瘢痕疙瘩非加药物组比较 :^{*} $P < 0.01$

表 3 细胞中 P70s6k、4E-BP1 的 mRNA 在各组的表达情况

浓度 nmol/L	P70s6k 半定量值	4E-BP1 半定量值
正常细胞 0	0.488 ± 0.015 [▲]	0.356 ± 0.006 [▲]
瘢痕疙瘩 0	0.794 ± 0.007	0.705 ± 0.006
瘢痕疙瘩 0.1	0.688 ± 0.013 [*]	0.380 ± 0.002 [*]
瘢痕疙瘩 1	0.448 ± 0.013 [*]	0.278 ± 0.077 [*]
瘢痕疙瘩 10	0.301 ± 0.004 [*]	0.191 ± 0.003 [*]
瘢痕疙瘩 100	0.238 ± 0.012 [*]	0.083 ± 0.004 [*]

注 : 正常细胞组与瘢痕疙瘩非加药组比较 :[▲] $P < 0.01$; 0.1nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L 四种不同药物浓度组分别与瘢痕疙瘩非加药组比较 :^{*} $P < 0.01$ 。

果显示 P70s6k 和 4E-BP1 蛋白在各组中表达有显著性差异 $P < 0.01$ 具有统计学意义(表 2)。

2.3 RT-PCR 检测 Rapa 对 P70s6k、4E-BP1 基因表达的影响 按实验要求分别对各组细胞进行 RNA 的提取 ,并进行纯度的鉴定 ,测得各样品的 OD260/OD280 比值均在 1.8~2.1 之间 RNA 样品的纯度较好。进行 RT-PCR 实验 RT-PCR 产物进行电泳跑胶 ,应用凝胶成像分析系统对各个组别电泳图拍照 (图 9、图

10)和检测各样本条带的灰度值 ,并进行半定量的统计学分析。实验结果显示 P70s6k 和 4E-BP1 的 mRNA 在各组中表达有明显差异 $P < 0.05$,具有统计学意义(表 3)。

2.4 Western Blot 检测 Rapa 对 P70s6k、4E-BP1 蛋白表达的影响 Western Blot 印记法检测 P70s6k、4E-BP1 蛋白表达水平 结果如图(图 11 图 12) ,并用凝胶成像分析系统对膜上条带进行拍照和检测各样本条带的灰度值 ,进行半定量的统计学分析。结果显示细胞中 P70s6k 和 4E-BP1 的蛋白在各组中表达具有明显的差异 具有统计学意义 $P < 0.05$ (表 4)。

表 4 细胞中 P70s6k、4E-BP1 的蛋白在各组的表达情况

浓度 nmol/L	P70s6k 半定量值	4E-BP1 半定量值
正常细胞 0	0.362 ± 0.012 [▲]	0.942 ± 0.039 [▲]
瘢痕疙瘩 0	0.795 ± 0.014	1.228 ± 0.069
瘢痕疙瘩 0.1	0.700 ± 0.011 [*]	0.705 ± 0.015 [*]
瘢痕疙瘩 1	0.399 ± 0.012 [*]	0.578 ± 0.015 [*]
瘢痕疙瘩 10	0.342 ± 0.006 [*]	0.414 ± 0.012 [*]
瘢痕疙瘩 100	0.211 ± 0.019 [*]	0.293 ± 0.007 [*]

注 : 正常细胞组与瘢痕疙瘩非加药组比较 :[▲] $P < 0.01$; 0.1nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L 四种不同药物浓度组分别与瘢痕疙瘩非加药组比较 :^{*} $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验应用不同浓度 (0.1nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L) 的 Rapa 处理体外培养的



图 1 P70s6k 在非加药组表达(40×)

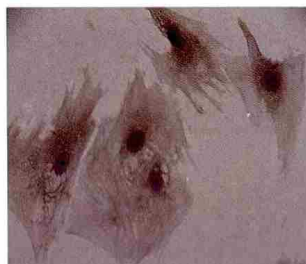


图 2 P70s6k 在加药组表达(40×)



图 3 P70s6k 在正常细胞表达(40×)

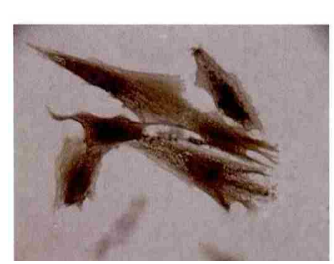


图 4 4E-BP1 在非加药组表达(40×)

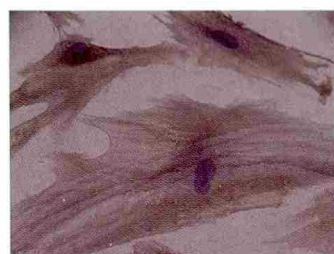


图 5 4E-BP1 在加药组表达(40×)



图 6 4E-BP1 在正常细胞组表达(40×)



图 7 P70s6k 加药组阴性对照(40×)



图 8 4E-BP1 加药组阴性对照(40×)

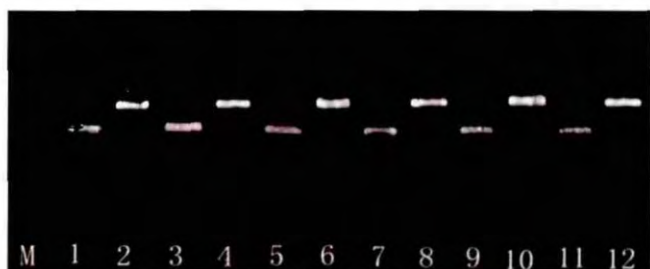


图 9 P70s6k 及内参条带 RT-PCR 产物电泳图 (M 为 Marker, 箭头所示从下到上分别为 100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp 2、4、6、8、10、12 为内参条带, 1 为正常皮肤细胞条带, 3 为瘢痕疙瘩非加药条带, 5、7、9、11 加药浓度分别为 0.1nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)。



图 10 4E-BP1 及内参条带 RT-PCR 产物电泳图 (M 为 Marker, 箭头所示从下到上分别为 100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp 2、4、6、8、10、12 为内参条带, 1 为正常皮肤细胞条带, 3 为瘢痕疙瘩非加药条带, 5、7、9、11 加药浓度分别为 0.1nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)。



图 11 P70s6k 蛋白表达情况(1 为正常细胞 2 瘢痕疙瘩非加药 3、4、5、6 药物浓度分别为 0.1nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)。

瘢痕疙瘩成纤维细胞我们发现, 在同一时间内, 瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制率随药物浓度的增大而

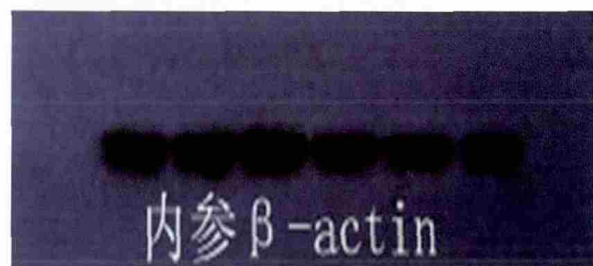
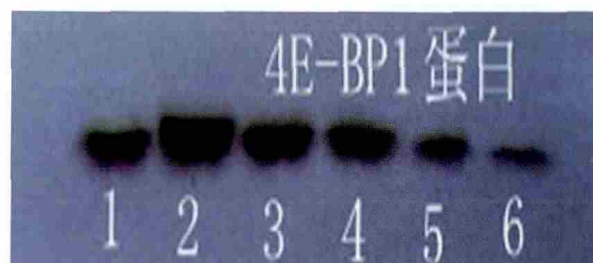


图 12 4E-BP1 蛋白表达情况 (1 为正常细胞 2 瘢痕疙瘩非加药 3、4、5、6 药物浓度分别为 0.1nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)。

增大, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 Rapa 对瘢痕疙瘩成纤维细胞具有明显的抑制其增殖和生长, 诱导其凋亡的作用。大量的研究表明, mTOR 信号途径在多个肿瘤细胞的增殖^[2-4]和多种胶原蛋白合成中发挥重要作用^[6], 瘢痕疙瘩是创伤延迟愈合期间, 由于过量结缔组织的沉积形成的超出最初损伤范围的增殖性瘢痕组织, 目前虽然不能确定其确切的发病机制, 也没有普遍有效的治疗药物, 但大量的研究证明, 成纤维细胞是瘢痕疙瘩的效应细胞。近年来有研究报道, 抑制 mTOR 信号途径, 可以抑制成纤维细胞的生长, 胶原纤维合成下降^[5]。

mTOR(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)特异性抑制剂 Rapa 能够破坏 mTOR 及其联结蛋白的相互作用, 抑制 mTOR 活性, 使由 mTOR 引起的下游 P70s6k 和 4E-BP1 磷酸化受阻, 并且 Rapa 还能削弱 mTOR 和 4E-BP1 的相互作用^[7-8], 通过抑制真核起始因子 4E-结合蛋白 -1 (4E-BP1), 阻止了真核起始因子 eIF-4E 的释放和转录, 通过抑制 P70s6k 的活化, 阻遏核糖体蛋白 S6 的磷酸化, 减少核糖体 / 转录蛋白的合成, 抑制细胞生长增殖^[9]。Rapa 对瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖抑制作用明显, 且呈剂量 - 效应和时间 - 效应关系。本实验也表明 Rapa 对 mTOR 具有明显的抑制作用, 并随药物浓度增大抑制作用越强, 瘢痕疙瘩加药组较瘢痕疙瘩非加药组中由 mTOR 激活磷酸化的 P70s6k 和 4E-BP1 表达下降。瘢痕疙瘩非加药组和正常皮肤组在同一的培养条件、培养

相同的时间下, 瘢痕疙瘩非加药组较正常皮肤组中磷酸化的 P70s6k 和 4E-BP1 明显存在过表达, 也验证了 mTOR 信号途径在瘢痕疙瘩形成中扮演着重要角色, 磷酸化的 P70s6k 和 4E-BP1 的过表达可能是成纤维细胞持续增殖形成瘢痕疙瘩的机制之一。

阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡是一些化疗药物作用肿瘤的重要机制, 正常细胞和肿瘤细胞的都有赖于细胞周期的运行, 肿瘤治疗的中心环节就是干扰肿瘤细胞的细胞周期, 从而使肿瘤细胞增殖速率减慢或诱导细胞走向凋亡。瘢痕疙瘩的产生是多种因素参与的成纤维细胞的过度增殖造成的, 临床上认为瘢痕疙瘩是高分化肿瘤。Rapa 可通过阻断肿瘤细胞中关键 mRNA 的翻译, 破坏细胞周期蛋白、CDK 抑制剂在细胞周期的平衡, 导致细胞周期停滞和细胞凋亡^[10]。近年有研究报道 Rapa 通过抑制 P27 介导的 cdk-2 细胞周期素的激活和 DNA 的合成, 显著降低 S 期激酶相关蛋白 2 (Skp2) mRNA 和蛋白质的水平, 使细胞生长停滞于 G₁ 期^[11-12]。因此笔者认为 Rapa 对瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制作用, 也是通过阻滞瘢痕疙瘩成纤维细胞 G₁ 期向 S 期的进程, 造成 G₁ 期细胞堆积阻滞, 调控蛋白质翻译而控制细胞周期相关的周期蛋白的产生和调节真核起始因子 eIF-4E 的释放和转录及核糖体 / 转录蛋白的合成水平, 使瘢痕疙瘩成纤维细胞停滞在 G₁ 期, 进而诱导凋亡。

Rapa 是链霉菌属丝状菌发酵产生的一种具有抗真菌作用的大环内酯类抗生素, 起初被用为低毒性的抗真菌药物, 1977 年发现 Rapa 具有免疫抑制作用, 1989 年开始把 Rapa 作为治疗器官移植排斥反应的新药进行试用, 1999 年美国 AHP 公司把它成功开发为比环孢素活性强 100 倍、肾毒性最低、唯一不诱发肿瘤发生, 用于器官移植抗排斥强效免疫抑制剂新药投放市场。最近研究发现 Rapa 不仅是新型免疫抑制剂, 而且有广泛的抗肿瘤作用^[2]。美国国立癌症研究所等机构研究发现 Rapa 对众多肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、白血病、肺癌、肾癌等, 均有明显抑制作用。瘢痕疙瘩是一种体表的增生性疾病, 目前仍没有切实有效的药物, Rapa 以其经济、方便、副作用少等优点, 极其可能成为新的、经济有效的抗瘢痕疙瘩药品。

Rapa 对瘢痕疙瘩成纤维细胞抑制作用的研究, 为瘢痕疙瘩的临床药物治疗提供一个新思路, 对 P70s6k 和 4E-BP1 的抑制作用及其对下游效应因子

影响的分子机制, 需要进一步探讨, 有利于揭示瘢痕疙瘩形成的确切机制。

[参考文献]

- [1] Granger DK, Cromwell JW, Chen SC, et al. Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oral rapamycin monotherapy[J]. *Transplantation*, 1995, 59(2):183.
- [2] Stephan S, Datta K, Wang E, et al. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20):6993-7000.
- [3] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression[J]. *Oncogene*, 2004, 23(18): 3151-3171.
- [4] Huang S, Shu L, Dilling MB, et al. Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21 (Cip1) [J]. *Mol Cell*, 2003, 11(6): 1491-1501.
- [5] Ong CT, Khoo YT, Mukhopadhyay A, et al. mTOR as a potential therapeutic target for treatment of keloids and excessive scars [J]. *Exp Dermatol*, 2007, 16(5):394-404.
- [6] Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, et al. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events[J]. *Cell*, 2005, 123(4):569-580.
- [7] Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery[J]. *Cell*, 2002, 110(2):163-175.
- [8] Yue W, Wang J, Li Y, et al. Farnesylthiosalicylic acid blocks mammalian target of rapamycin signaling in breast cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(5):746-754.
- [9] Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, et al. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation[J]. *EMBO J*, 1996, 15(3):653-664.
- [10] Dutcher JP. Mammalian target of rapamycin inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(18):6382-6387.
- [11] Shapira M, Kakiashvili E, Rosenberg T, et al. The mTOR inhibitor rapamycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(4):46.
- [12] Sabatini DM, Pierchala BA, Barrow RK, et al. The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(38): 20875-20878.

[收稿日期]2011-04-13 [修回日期]2014-01-22

编辑 / 张惠娟