

Toll 样受体 4 通过转化生长因子 $\beta 1$ 参与增生性瘢痕形成的机制研究*

范鹏举 杨兴华** 肖目张 龙剑虹 雷少榕

(中南大学湘雅医院整形美容科, 长沙 410008)

摘要 增生性瘢痕是机体在创伤后过度修复的表现形式之一, 其发病机制并不十分明确. 最近有证据显示, 成纤维细胞能在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的作用下, 激活 toll 样受体 4(toll like receptor-4, TLR-4), 参与调节免疫/炎症反应. 因此, 探索了 TLR-4 在增生性瘢痕的产生中可能起到的作用. 利用荧光定量 PCR 检测证实, 在体外培养的原代增生性瘢痕成纤维细胞(hyperplastic scar fibroblast, HSFB)中 TLR-4 和骨髓分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)的表达高于正常皮肤成纤维细胞(normal skin fibroblast, NFB). 用 LPS 处理 NFB 和 HSFB 24 h, 发现 TLR-4、MyD88 和转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta 1$)、I 型前胶原在 mRNA 和蛋白质水平的表达均上调. MTT 也证实 LPS 促进体外培养的 HSFB 的增殖效应强于 NFB. 然而, 在 HSFB 中采用 siRNA 干扰 MyD88 后, 再用 LPS 处理, 与干扰对照组相比, MyD88、TGF- $\beta 1$ 和 I 型前胶原的表达均明显减弱. 结果表明, 在皮肤成纤维细胞激活 TLR-4 信号通路, 能引起促炎细胞因子 TGF- $\beta 1$ 的产生, 同时促进细胞增殖, 而干扰 MyD88, 能抑制 LPS 刺激后这些细胞因子的表达.

关键词 成纤维细胞, 脂多糖, toll 样受体 4, 骨髓分化因子 88, 转化生长因子 $\beta 1$

学科分类号 R622

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00057

增生性瘢痕(hyperplastic scar)的防治一直是整形外科研究的重点, 但有关其形成的生物学机制并不十分明确. 目前认为, 增生性瘢痕是机体在创伤后修复过程中, 以成纤维细胞为主的修复细胞过度合成胶原(collagen)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)等细胞外基质, 且这些基质降解、塑形出现障碍而产生的. 因此, 调控瘢痕组织中成纤维细胞增殖、减少瘢痕中胶原的形成以及加速瘢痕中胶原的分解与吸收一直为首要的研究方向. 近来有研究显示, 成纤维细胞参与了对促炎信号的免疫反应, 成纤维细胞可作为免疫调节细胞参与类风湿性关节炎及其他组织器官的纤维化过程^[1]. 在损伤组织中, 成纤维细胞可通过两种信号通路调节免疫细胞浸润, 一条信号通路为 CD40 及其配体^[2], 另一条信号通路则涉及到 toll 样受体(toll-like receptor, TLRs)及其配体^[3-4].

TLRs 是一组存在于细胞膜或细胞小室膜上的跨膜蛋白, 能识别保守的病原相关分子, 如细菌脂

多糖(lipopolysaccharide, LPS)、细菌脂蛋白、CpG DNA 或病毒双链 RNA. 目前已有数十类 TLRs 在动物和人类的不同细胞中被发现^[5]. TLRs 配体激活的信号通路通过连接子如骨髓分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)传导, 激活核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)等信号通路, 导致细胞因子转录和共刺激分子的表达. 已有研究证实, 多种组织来源的成纤维细胞均可表达 TLRs. 如牙龈成纤维细胞能表达 TLR1-9, 类风湿关节炎的滑液成纤维细胞中, TLR-3 和 TLR-4 的表达高于正常细胞^[6]. 还发现肝星状细胞表达 TLR-4^[7], 且 LPS 能通过 TLR-4 下调转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β)的信号伪

* 国家自然科学基金资助项目(30772254).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-87953014/13974913256, E-mail: yxhl123@yahoo.cn

收稿日期: 2011-02-10, 接受日期: 2011-04-18

受体(bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor, BAMBI), 从而导致 TGF- β 通路的激活, 增强肝纤维化和肝损伤^[8]. TGF- $\beta 1$ 介导的信号通路在瘢痕形成中起着关键性作用, 成纤维细胞外环境 TGF- $\beta 1$ 浓度的增高进一步刺激成纤维细胞 TGF- β 受体表达, 后者形成的异二聚体复合物通过磷酸化 R-Smads 使其与 Co-Smads 形成多聚体, 转运至胞核, 上调靶基因胶原的表达, 而细胞外基质胶原的过度沉积又加重增生性瘢痕的形成.

那么, 在皮肤增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast, HSFb)中是否存在 TLR-4 的高表达? TLR-4 通路被激活后能否影响 TGF- $\beta 1$ 通路并影响胶原表达呢? 本研究拟原代培养 HSFb 和正常皮肤成纤维细胞(normal skin fibroblast, NFB), 检测 TLR-4 的表达, 以及在 LPS 刺激下 TLR-4 及其下游 TGF- $\beta 1$ 和 I 型前胶原的表达, 并观察 HSFb 和 NFB 增殖的变化, 以期阐明 TLR-4 在瘢痕形成中的作用, 并为临床防治增生性瘢痕提供一定的科学实验依据.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

LPS 购自 Sigma 公司; TRIZOL 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒为 Promega 公司产品; TGF- $\beta 1$ 和 I 型前胶原羧基末端前肽(picp)ELISA 试剂盒为 Uscnlife 公司产品; 兔抗人 TLR-4 和 MyD88 购自 Abcam 公司.

1.2 标本来源

人体组织取样规程由中南大学湘雅医院伦理委员会批准. 所收集的皮肤组织来源于在中南大学湘雅医院整形美容科就诊的烧伤患者, 征得患者同意, 共收集了 6 例样本, 分别为 3 位患者的增生性瘢痕及周围正常皮肤组织(表 1).

Table 1 Source of human hyperplastic scar and normal fibroblasts

Patient	Age(years)	Sex	Site of biopsy
1	28	F	Hand
2	34	M	Shoulder
3	18	M	Hand

1.3 成纤维细胞原代培养和 LPS 处理细胞

按文献[9]提供成纤维细胞原代培养方法, 除去皮下组织, 用 D-Hanks 缓冲液洗涤 2~3 次, 剪成 1 mm³ 大小的组织块, 接种于涂有胎牛血清的培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后, 缓慢加入含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 3~5 天后, 取出漂浮的组织块, 更换新鲜培养液(1 次/3 天), 待原代培养成纤维细胞满壁后, 0.25%胰蛋白酶消化传代, 实验选用第 3~8 代细胞.

待细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 1×10⁶ 个/瓶接种, 细胞贴壁后, 用无血清培养基饥饿 24 h, 然后将细胞分为两组: 一组为对照组, 加正常培养基; 第二组加入含 LPS(1 mg/L)的培养基. 细胞加药后继续培养 24 h, 然后收集细胞, PBS 洗涤 2 次.

1.4 siRNA 干扰 MyD88 细胞的构建

针对 MyD88 的特异性, siRNA 序列采用 Integrated DNA Technologies software 设计, 并通过 BLAST 确定其只针对一个基因. 2 个针对 MyD88 (accession number in GenBank: NM002468)的 siRNA 序列分别对应 580~604 位点和 907~931 位点(表 2). 序列由上海吉玛公司合成.

Table 2 Target sequences for siRNA

siRNA	Target sequence
Scrambled	AATTCTCCGAACGTGTCACGT
Site 580~604	rGrCrArGrCrArGrCrArGrGrArGrGrCrUrGrArGrAAG
Site 907~931	rGrCrArGrArGrCrArArGrGrArArUrGrUrGrArCrUrCrCAG

待原代培养的细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 1×10⁶ 个/瓶接种, 培养细胞至生长密度为 50%~60%的融合, 分别取 0.4 μ g scrambled RNA

(csiRNA) 和 siRNA 稀释于 100 μ l EC 缓冲液 (QIAGEN)中, 再取 6.4 μ l Enhancer 于 EC 缓冲液中, 室温放置 5 min 后, 取 20 μ l effectene 于含

DNA 的 EC 缓冲液中, 室温下放置 10 min, 再加 1 200 μ l 培养基稀释, 混匀后加至经 D-Hanks 液洗涤后的成纤维细胞中, 培养瓶中培养基总量 4 ml, 置 5% CO₂, 37℃ 条件下培养 24 h 后换液, 48 h 后提取蛋白质检测干扰效果.

1.5 qRT-PCR 检测 TLR-4、MyD88 以及 TGF- β 1、I 型前胶原 mRNA 表达水平

收集上述各组细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA. 采用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光

光度法检测 RNA 的纯度和浓度. 荧光定量 PCR 法扩增各组细胞 TGF β 1 和 I 型前胶原 mRNA. 按定量 RT-PCR 试剂盒的说明取 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA, 然后以 SYBR Green I 作为荧光标记物, 在 Light Cycler 荧光实时定量 PCR 仪(购自德国 Roche 公司)上进行 PCR 反应, 引物序列见表 3. 通过融解曲线分析和电泳确定目的条带, $\Delta\Delta CT$ 法进行相对定量.

Table 3 PCR primers for target gene

Target gene	Sense	Antisense
TLR-4	GGCCATTGCTGCCAACAT	CAACAATCACCTTTCGGCTTTT
MyD88	TCGATGCCTTCATCTGCTATTG	CGGATCATCTCCTGCACAAA
TGF- β 1	GAGGCGGTGCTCGCTTTGTA	TTGTTGCGGTCCACCATTAGC
I procollagen	GTTCGTCCTTCTCAGGGTAG	TTGTCGTAGCAGGGTTCCTT
GAPDH	ATCAAGATCATTGCTCCTCTGAG	CTGCTTGCTGATCCACATCTG

1.6 Western blot 法测定 TLR-4 和 MyD88 的表达

收集各组细胞, 消化后加入预冷的细胞裂解液, 置冰上 30 min, 4℃、12 000 g 离心, 取上清液进行蛋白质分光光度仪定量(BCA 法), 每组取 30 μ g 蛋白质加热变性后, 10% SDS-PAGE 分离, 电转移至 PVDF 膜上, 含 5%脱脂奶粉的 TBS 缓冲液封闭 1 h, 分别加入 1:1 000 稀释的兔抗人 TLR-4 和 MyD88 多克隆抗体, 4℃ 孵育过夜. 用含吐温-20 的 TBS 缓冲液洗膜 3 次, 相应加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔第二抗体, 室温下孵育 1 h. TBST 洗膜 3 次, 化学发光法(ECL)检测条带. β -肌动蛋白作为内参照.

1.7 ELISA 法检测 TGF- β 1、I 型前胶原的表达

取对数生长期增生性瘢痕及正常皮肤成纤维细胞, 0.25%胰蛋白酶消化, 10%胎牛血清 DMEM 培养液调整细胞浓度, 接种 10⁴ 个/ml 的细胞悬液至 96 孔板中, 待细胞贴壁后换成含 0.5%胎牛血清的培养基培养 24 h 以使细胞同步化, 处理组加入 LPS(1 mg/L), 每组 3 个复孔. 处理 24 h 后, 各组取上清 50 μ l 用于人 TGF- β 1 和 I 型前胶原 ELISA 检测, 操作步骤参照试剂说明书进行, 酶联免疫仪 450 nm 处测吸光度值.

1.8 MTT 法检测细胞增殖

接种 10⁴ 个/ml 的细胞悬液至 96 孔板中, 待细胞贴壁后换成含 0.5%小牛血清的培养基培养 24 h, 以使细胞同步化, 处理组加入 LPS(1 mg/L) 处理 24 h, 随后每孔加入 20 μ l MTT(5g/L), 继续培养 4 h 后去除培养基, 加入 150 μ l DMSO 室温振荡混匀 30 min, 使结晶物成分溶解, 使用酶标仪在 490 nm 波长测定各孔的吸光度值, 并记录结果. 每组细胞设阴性对照 1 孔, 11 个平行孔, 并重复进行 3 次实验.

1.9 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据显著性检验用方差分析, 并进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 qRT-PCR 检测 HSFB 和 NFB 中 TLR-4 和 MyD88 的表达

待原代培养的 HSFB 和 NFB 生长至对数生长期时, 收集细胞, 并按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, qRT-PCR 检测 HSFB 和 NFB 中 TLR-4 及其衔接子 MyD88 的表达, 结果显示在 HSFB 中 TLR-4 和 MyD88 的表达高于 NFB(图 1).

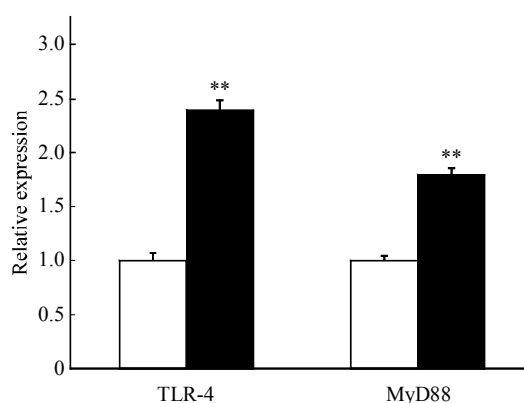


Fig. 1 The mRNA expression of TLR-4 and MyD88 in dermal fibroblasts

Total RNA was extracted from 3 paired NFB and HSFB, and was used to assess the expression of TLR-4 and MyD88 by quantitative real time RT-PCR. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, $**P < 0.01$). □: NFB; ■: HSFB.

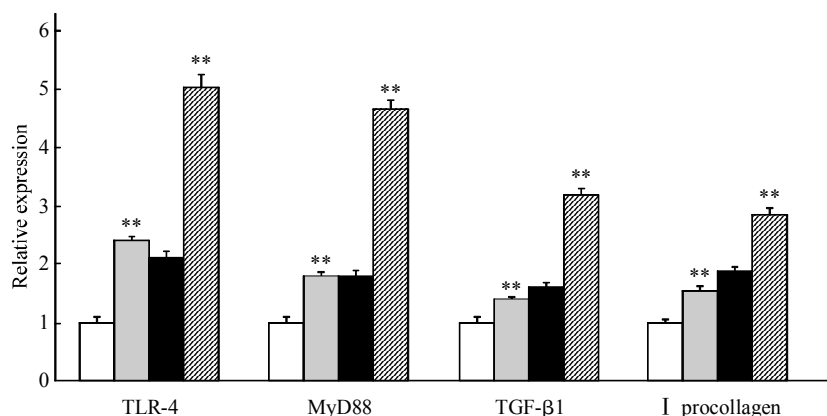


Fig. 2 The mRNA expression of TLR-4, MyD88, TGF- $\beta 1$ and I procollagen in 3 paired fibroblasts from NFB and HSFB, as well as fibroblasts stimulated by LPS

Paired fibroblasts were seeded and grown to 70% confluency, then starved of serum for 24 h, followed by stimulation with 1 mg/L LPS. The expression of TLR-4, MyD88, TGF- $\beta 1$ and I procollagen was assessed by quantitative real time RT-PCR. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, $**P < 0.01$). □: NFB; □: HSFB; ■: NFB+LPS; ▨: HSFB+LPS.

2.3 LPS 对 HSFB 和 NFB 中 TLR-4 和 MyD88 蛋白表达的影响

取原代培养的第 3~8 代细胞, 待细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 1×10^6 个 / 瓶接种: 一瓶为对照组, 加正常培养基; 第二瓶加入含 LPS (1 mg/L) 的培养基。细胞加药后继续培养 24 h, PBS 洗 2 次, 然后收集细胞, 并提取细胞总蛋白, Western blot 检测 LPS 对 HSFB 和 NFB 中 TLR-4 及 MyD88 蛋白的表达, 结果显示, LPS 能增加 TLR-4 及 MyD88 蛋白的表达, 但在 HSFB 中两者的表达增加较 NFB 更显著(图 3)。

2.2 LPS 对 HSFB 和 NFB 中 TLR-4、MyD88 以及 TGF- $\beta 1$ 、I 型前胶原 mRNA 表达的影响

取原代培养的 HSFB 和 NFB 的第 3~8 代细胞, 待细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 1×10^6 个 / 瓶接种, 细胞贴壁后, 用无血清培养基饥饿 24 h, 然后将细胞分为两组: 一组为对照组, 加正常培养基; 第二组加含 LPS (1 mg/L) 的培养基。细胞加药后继续培养 24 h, PBS 洗 2 次然后收集细胞, 并按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, qRT-PCR 检测 LPS 对 HSFB 和 NFB 中 TLR-4、MyD88 以及 TGF- $\beta 1$ 、I 型前胶原 mRNA 的表达, 结果显示, LPS 能增加 TLR-4、MyD88 以及 TGF- $\beta 1$ 、I 型前胶原 mRNA 的表达, 但在 HSFB 中这些基因的表达改变较 NFB 更显著(图 2)。

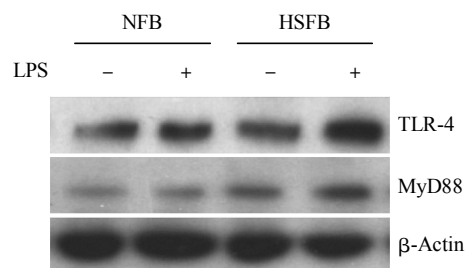


Fig. 3 The protein expression of TLR-4 and MyD88 in NFB and HSFB, as well as fibroblasts stimulated by LPS

Paired fibroblasts were seeded and grown to 70% confluency, then starved of serum for 24 h, followed by stimulation with 1 mg/L LPS. The protein expression of TLR-4 and MyD88 was assessed by Western-blot.

2.4 LPS 对 HSFB 和 NFB 分泌 TGF- β 1 和 I 型前胶原蛋白表达的影响

取对数生长期 HSFB 和 NFB, 接种 10^4 个 /ml 的细胞悬液至 96 孔板, 加入 LPS(1 mg/L)处理 24 h 后, 各组取上清 50 μ l 用于人 TGF- β 1 和 I 型前胶原 ELISA 检测, 结果显示, LPS 能增加细胞上清 TGF- β 1 和 I 型前胶原蛋白的表达, 但在 HSFB 中两者的表达改变较 NFB 更显著(图 4).

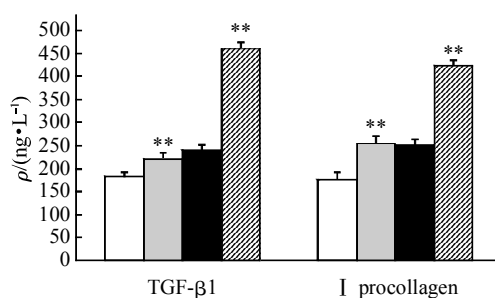


Fig. 4 The protein expression of TGF- β 1 and I procollagen in NFB and HSFB, as well as fibroblasts stimulated by LPS

Paired fibroblasts were seeded and grown to 70% confluency, then starved of serum for 24 h, followed by stimulation with 1 mg/L LPS. The protein expression of TGF- β 1 and I procollagen was assessed by ELISA. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, $**P < 0.01$). $\square$: NFB; $\square$: HSFB; $\blacksquare$: NFB+LPS; $\hatched$: HSFB+LPS.

2.5 LPS 对 HSFB 和 NFB 增殖的影响

接种 10^4 个 /ml 的细胞悬液至 96 孔板中, 随后加入 LPS(1 mg/L)处理 24 h, MTT 检测 LPS 对 HSFB 和 NFB 增殖的影响, 结果显示, LPS 能促进体外培养 HSFB 和 NFB 的增殖, 且在 HSFB 中这种增殖效应强于 NFB(图 5).

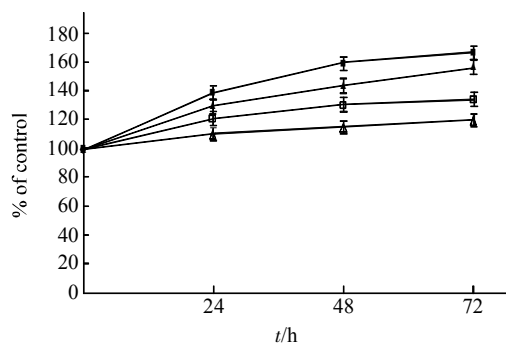


Fig. 5 Effect of LPS on the HSFB and NFB cell proliferation

Paired fibroblasts were seeded, then starved of serum for 24 h, followed by stimulation with 1 mg/L LPS. The cell proliferation was measured by MTT. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, $**P < 0.01$). $\triangle$ — $\triangle$: NFB; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: NFB+LPS; $\square$ — $\square$: HSFB; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: HSFB+LPS.

2.6 HSFB 采用 siRNA 干扰 MyD88 细胞的效果检测

待细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 1×10^6 个 / 瓶接种, 培养细胞至生长密度为 50% ~ 60% 的融合, 分别取 scrambled RNA (csiRNA) 和 siRNA(target sequence site 580 and site 907)转染入细胞, 48 h 后提取蛋白质检测干扰效果. Western blot 结果显示, site 580 and site 907 均能有效干扰 MyD88, 但 site 907 效果优于 site 580(图 6), 后续实验选用 siRNA target sequence site 907.

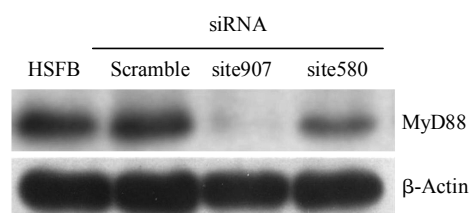


Fig. 6 Effect of MyD88 siRNAs on MyD88 protein expression in HSFB

HSFB were transfected with scrambled RNA and MyD88 siRNA (target sequence site 580 and site 907). The effect of MyD88 siRNAs on MyD88 protein expression was determined by Western blot.

2.7 LPS 对干扰 MyD88 后 HSFB 中 MyD88、TGF- β 1、I 型前胶原 mRNA 表达的影响

取原代培养的 HSFB, 待细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 1×10^6 个 / 瓶, 接种 4 瓶: 一瓶为对照组, 加正常培养基; 第二瓶加含 LPS(1 mg/L)的培养基; 第三瓶先转入 scrambled RNA(csiRNA) 24 h, 加 LPS 继续培养 24 h; 第四瓶先转入 siRNA target sequence site 907 24 h, 加 LPS 继续培养 24 h. PBS 洗 2 次收集细胞, 并按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, qRT-PCR 检测 LPS 对干扰 MyD88 后 HSFB 中 MyD88 以及 TGF- β 1、I 型前胶原 mRNA 表达的影响, 结果显示, LPS 能增加 MyD88 以及 TGF- β 1、I 型前胶原 mRNA 的表达, 但在干扰 MyD88 后, 这些基因的表达改变弱于干扰对照组(图 7).

2.8 LPS 对干扰 MyD88 后 HSFB 中 TGF- β 1、I 型前胶原蛋白表达的影响

取原代培养的 HSFB, 待细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 1×10^6 个 / 瓶, 接种 4 瓶: 一瓶为对照组, 加正常培养基; 第二瓶加含 LPS(1 mg/L)的培养基; 第三瓶先转入 scrambled RNA(csiRNA)

24 h, 加 LPS 继续培养 24 h; 第四瓶先转入 siRNA target sequence site 907 24 h, 加 LPS 继续培养 24 h. ELISA 检测 LPS 对 HSFB 干扰 MyD88 后 TGF- $\beta 1$ 及 I 型前胶原蛋白表达的影响, 结果显示, LPS 能增加细胞上清 TGF- $\beta 1$ 和 I 型前胶原的表达, 但在干扰 MyD88 后, 这些基因的表达改变弱于干扰对照组(图 8).

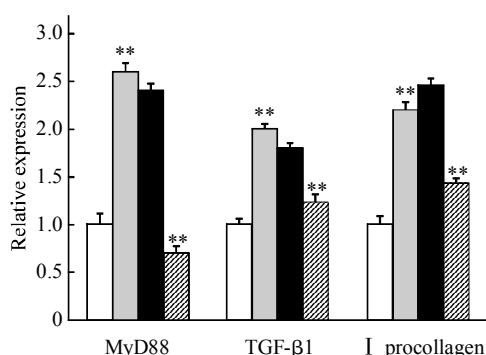


Fig. 7 Effect of MyD88 siRNAs on LPS-stimulated HSFB mRNA levels of MyD88, TGF- $\beta 1$ and I procollagen

HSFB were seeded, grown to 70% confluence, and transfected with MyD88 siRNA 907 or csiRNA after 24 h, then stimulated with 1 mg/L of LPS for another 24 h. The cells were harvested and total RNA extracted. The effect of MyD88 siRNAs on mRNA levels for MyD88, TGF- $\beta 1$ and I procollagen in LPS-stimulated HSFB was assessed by real time RT-PCR. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, $**P < 0.01$). □: HSFB; ■: HSFB+LPS; ■: HSFB+csiRNA+LPS; ▨: HSFB+MyD88 siRNA+LPS.

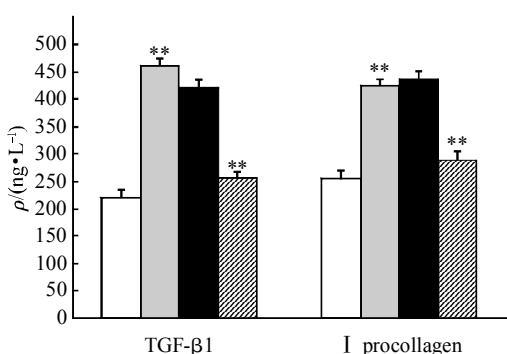


Fig. 8 Effect of MyD88 siRNAs on LPS-stimulated HSFB protein levels of MyD88, TGF- $\beta 1$ and I procollagen

HSFB were seeded, grown to 70% confluence and transfected with MyD88 siRNA 907 or csiRNA after 24 h, and then stimulated with 1 mg/L of LPS for another 24 h. The cells were harvested and total protein extracted. The effect of MyD88 siRNAs on protein levels for TGF- $\beta 1$ and I procollagen in LPS-stimulated HSFB was assessed by ELISA. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, $**P < 0.01$). □: HSFB; ■: HSFB+LPS; ■: HSFB+csiRNA+LPS; ▨: HSFB+MyD88 siRNA+LPS.

3 讨 论

增生性瘢痕的形成涉及到细胞和细胞因子之间复杂的相互作用, 尽管其发病机制仍未完全阐明, 但前期研究已证实, 组织的迁延性炎症反应及细胞增殖速度加快是促成增生性瘢痕形成的主要因素^[10], 而皮肤成纤维细胞能产生多种炎性细胞因子^[11], 我们推测其参与了炎症过程, 并与增生性瘢痕形成有着密切联系.

TLRs 是重要的模式识别受体, 参与机体对多种微生物的宿主防御. TLRs 的激活能导致细胞因子、趋化因子等产生, 并上调共刺激分子和黏附分子的表达, 从而参与先天免疫和获得性免疫反应^[12]. 已有研究显示, TLRs 能在多种皮肤细胞中表达, 如表皮的角质细胞和朗格汉斯细胞、真皮免疫系统细胞(如巨噬细胞、T 和 B 细胞、柱状细胞)以及皮肤微脉管系统的内皮细胞^[13]. 本研究通过检测 TLRs 家族成员 TLR-4 在皮肤成纤维细胞的表达, 证实了 TLR-4 及其下游连接子 MyD88 在皮肤成纤维细胞中也存在表达.

由于受损病人的伤口容易被革兰氏阴性细菌感染, 从而产生大量 LPS^[14], 而 LPS 为 TLR-4 的配体, 且研究显示, 在烫伤组织, TLR-4 能促进微脉管炎症^[15], 因此, 我们研究了 TLR-4 在皮肤增生性瘢痕形成中的作用, 发现在增生性瘢痕成纤维细胞中, TLR-4 的表达高于正常皮肤成纤维细胞, 提示在创伤愈合过程中, TLR-4 的高表达可能促进了增生性瘢痕的形成. 同时还发现, MyD88 在增生性瘢痕组织中表达亦有上调. MyD88 为 TLRs 信号通路的重要组成部分, MyD88 缺陷小鼠对所有 TLR 的配体均不再产生促炎细胞因子^[16], 因此, MyD88 是 TLR 家族成员信号通路所必需的连接分子. MyD88 在增生性瘢痕组织中表达上调, 说明在增生性瘢痕成纤维细胞中, TLR-4 信号通路已经被激活. TLR-4 被激活后, 可通过其连接子 MyD88 导致 NF- κ B 和 MAPK 激活^[17-19], 我们的实验发现, 在 TLR-4 被 LPS 激活后, MyD88 表达明显上调, 且伴随有 TGF- $\beta 1$ 和 I 型前胶原的表达增加, 进一步说明在增生性瘢痕成纤维细胞中, TLR-4 的活性增强, 且细胞内信号通路被激活. 有研究显示, TLR-4 基因敲除后的小鼠对 LPS 无反应, 说明 TLR-4 可以作为革兰氏阴性菌诱导的败血症的治疗靶标^[20]. 当我们采用 siRNA 特异性干扰 TLR-4 下游连接子 MyD88 的表达后, TGF- $\beta 1$ 表达明显降

低,但由于 MyD88 并未被完全干扰,因此 TGF- β 1 的表达也未完全抑制,提示 MyD88 可作为 TLR-4 信号通路中调节促炎细胞因子表达的靶标. TLR-4 在胞浆内的信号传递途径分为 MyD88 依赖性和非依赖性两种. MyD88 依赖性途径能导致促炎免疫反应,这可能是在本研究中 TLR-4 促进了增生性瘢痕形成的主要途径. 而 MyD88 非依赖性途径则是导致抗病毒免疫反应,可能对增生性瘢痕的形成作用并不明显.

TGF- β 是迄今为止人们了解最多,与创伤愈合、瘢痕形成及多种纤维化性疾病关系最密切的细胞因子. TGF- β 1 由创伤部位的血小板及成纤维细胞释放,影响着炎症反应、血管发生、重新形成上皮、细胞外基质的沉积和重构. 研究显示,在多种人类纤维化疾病以及实验性纤维化过程中均存在 TGF- β 1 表达上调和胶原合成增加^[21-22]. 以小鼠胚胎发生过程为模型,发现 I 型胶原蛋白基因表达与细胞外 TGF- β 1 分布呈正相关^[23]. 应用短暂的腺病毒转染到体外培养的成纤维细胞中,检测到 TGF- β 1 可激活 I 型胶原蛋白启动子的转录,而抑制 TGF- β 1 的表达后, I 型胶原的表达也减少^[24]. 这些研究成果提示我们,如果能用一定的干预措施降低创伤愈合过程中 TGF- β 1 表达,就有可能控制增生性瘢痕的发生、发展. 在本次实验中,采用 siRNA 干扰的方法特异性干扰 TLR-4 信号通路中 MyD88 的表达,再用 LPS 刺激,发现干扰 MyD88 后不仅 TGF- β 1 表达明显降低, I 型前胶原的产生也显著减少,提示,在增生性瘢痕成纤维细胞中阻断 TLR-4 信号通路,通过降低 TGF- β 1 的表达和减少细胞外基质的产生来抑制增生性瘢痕的发生发展.

本研究证实,皮肤成纤维细胞表达 TLR-4 和其胞内信号分子,且在增生性瘢痕成纤维细胞中的表达增高. LPS 刺激成纤维细胞可增加其下游 TGF- β 1 及 I 型前胶原的表达,导致受损组织持续的炎症反应,胶原产生增多且细胞增殖加速,最终促进增生性瘢痕形成. 而在增生性瘢痕成纤维细胞中,采用 MyD88 siRNA 处理,能显著抑制由 LPS 引起的 TGF- β 1 和 I 型前胶原蛋白表达增加. 因此,阻断 TLRs 信号通路有可能成为防治增生性瘢痕的新策略.

参 考 文 献

- [1] Burman A, Haworth O, Bradfield P, *et al.* The role of leukocyte-stromal interactions in chronic inflammatory joint disease. *Joint Bone Spine*, 2005, **72**(1): 10-16
- [2] Buckley C D, Pilling D, Lord J M, *et al.* Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*, 2001, **22**(4): 199-204
- [3] Zhang Z, Artelt M, Burnet M, *et al.* Dexamethasone attenuates early expression of three molecules associated with microglia/macrophages activation following rat traumatic brain injury. *Acta Neuropathol*, 2007, **113**(6): 675-682
- [4] Mempel M, Kalali B N, Ollert M, *et al.* Toll-like receptors in dermatology. *Dermatol Clin*, 2007, **25**(4): 531-540
- [5] Miqqin S M, O'Neill L A. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukocyte Biology*, 2006, **80**(2): 220-226
- [6] Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, *et al.* Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, **58**(12): 3684-3692
- [7] Iimuro Y, Seki E, Son G, *et al.* Role of innate immune response in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, **22** (Suppl 1): S57-58
- [8] Seki E, De Minicis S, Osterreicher C H, *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*, 2007, **13**(11): 1324-1332
- [9] Wang J, Dodd C, Shankowsky H A, *et al.* Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Invest*, 2008, **88** (12): 1278-1290
- [10] Bellemare J, Roberge C J, Bergeron D, *et al.* Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol*, 2005, **206**(1): 1-8
- [11] Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, *et al.* Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (Prevotella intermedia) and *Bacteroides* (Porphyromonas) gingivalis induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun*, 1992, **60** (11): 4932-4937
- [12] Nishiya T, Defranco A L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *BiolChem*, 2004, **279** (18): 19008
- [13] Miller L S, Modlin R L. Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol*, 2007, **29**(1): 15-26
- [14] Armour A D, Shankowsky H A, Swanson T, *et al.* The impact of nosocomially-acquired resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a burn unit. *J Trauma*, 2007, **63**(1): 164-171
- [15] Breslin J W, Wu M H, Guo M, *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to microvascular inflammation and barrier dysfunction in thermal injury. *Shock*, 2008, **29**(3): 349-355
- [16] Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, **3**(11): 1-16
- [17] Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, 2001, **15**(18): 2321-2342
- [18] Dong C, Davis R J, Flavell R A. MAP kinases in the immune

- response. *Annu Rev Immunol*, 2002, **20**: 55–72
- [19] Wang J, Ford H R, Grishin A V. NF-kappaB-mediated expression of MAPK phosphatase-1 is an early step in desensitization to TLR ligands in enterocytes. *Mucosal Immunol*, 2010, **3**(5): 523–534
- [20] Beutler B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, **270**: 109–120
- [21] Ghosh A K. TGF- β signaling and its inhibition: implication in fibrosis. *Current Enzyme Inhibition*, 2010, **6**(2): 54–56
- [22] Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol*, 2010, **37**(1): 11–25
- [23] Zhang W, Ou J W, Yutaka Inagaki, *et al.* Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2 (I)-collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem*, 2000, **275**(50): 39237–39245
- [24] Ghosh A K, Mori Y, Dowling E, *et al.* Trichostatin-A blocks TGF- β -induced collagen gene expression in skin fibroblasts: Involvement of Sp1. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, **354**(2): 420–426

Toll Like Receptor-4 Involved in The Mechanism of Hyperplastic Scarring *via* TGF- β^*

FAN Peng-Ju, YANG Xing-Hua**, XIAO Mu-Zhang, LONG Jian-Hong, LEI Shao-Rong

(Department of Plastic & Esthetic Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract Hyperplastic scar, a fibroproliferative disorder, complicates wound healing. Although the pathogenesis is not well understood, prolonged inflammation is a known contributing factor. Emerging evidence suggests that fibroblasts regulate immune/inflammatory responses through toll-like receptor 4 (TLR-4) activated by lipopolysaccharide (LPS), leading to nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) activation, cytokine gene transcription and co-stimulatory molecule expression and resulting in inflammation. So the possible roles of TLR-4 in hyperplastic scar formation need to be explored. Paired normal and hyperplastic scar tissue was collected and dermal fibroblasts isolated and cultured. Quantitative RT-PCR of pairs of fibroblasts demonstrated mRNA levels for TLR4 and its legend myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in hyperplastic scar fibroblasts (HSFB) were increased significantly compared with normal fibroblasts (NFB). When paired normal and HSFB were stimulated with LPS, significant increases in mRNA and protein levels for TLR-4, MyD88, transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta 1$) and I procollagen were detected. However, when transfected with MyD88 small interfering RNA (siRNA) in HSFB, then stimulated with LPS, a significant decrease in mRNA and protein levels for these molecules compared to only LPS-stimulated fibroblasts was detected. In comparison, a scramble siRNA transfection did not affect mRNA or protein levels for these molecules. Results demonstrate LPS stimulates proinflammatory cytokine expression in dermal fibroblasts and MyD88 siRNA eliminates the expression. Therefore, controlling inflammation and manipulating TLR signaling in skin cells may result in novel treatment strategies for hyperplastic scar.

Key words fibroblasts, LPS, TLR-4, MyD88, TGF- $\beta 1$

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00057

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30772254).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-87953014/13974913256, E-mail: yxhl123@yahoo.cn

Received: February 10, 2011 Accepted: April 18, 2011