

· 论著 ·

转化生长因子 β II 型受体在病理性瘢痕表皮组织中的基因表达研究

陈铭锐 安纲 刘顺利 魏奉才



【摘要】 目的 了解病理性瘢痕表皮组织中 TGF- β II 型受体(T β R II)的基因表达。方法 20 份病理性瘢痕标本收集于 2007—2009 年济南军区总医院收治的 20 例烧伤或外伤瘢痕患者,于每份瘢痕标本中央和边缘部位分别切取 1 块表皮组织。每例患者留取 1 块距离病变部位 10 cm 以上的正常皮肤组织标本作为自身对照 1。抽取每例患者 1~2 mL 全血并分离提取血清,作为自身对照 2。另取 8 例无病理性瘢痕病史患者术中弃用的 8 份正常皮肤组织标本作为正常对照。生物素-链霉亲和素-过氧化物酶染色法检测 3 种组织标本中 T β R II 的阳性表达。经 PCR-单链构象多态性分析、基因测序,对比观察各标本中 T β R II 的基因表达。对数据行 Fisher 确切概率法检验。结果 免疫组织化学染色结果显示,病理性瘢痕表皮组织标本中 T β R II 阳性表达明显低于自身对照 1 和正常对照组织标本,主要位于表皮的基底层,而棘层、颗粒层和角质层中 T β R II 阳性表达很少或缺失。在自身对照 1、自身对照 2 和正常对照标本中未见 T β R II 基因异常表达;在 8 份病理性瘢痕表皮组织标本中,T β R II 多聚 A 位点的片段出现条带泳动异常,基因测序显示 DNA 片段缺失 1 个 A ($P=0.044$)。结论 病理性瘢痕表皮组织中可能存在 T β R II 基因的异常表达。瘢痕表皮回植可能会增加病理性瘢痕复发的风险,而切取瘢痕患者正常皮肤植皮修复创面可能不会增加瘢痕复发的风险。

【关键词】 受体,转化生长因子 β ; 表皮; 基因表达; 病理性瘢痕

Gene expression of transforming growth factor β receptor II in the epidermis of pathological scar

CHEN Ming-rui*, AN Gang, LIU Shun-li, WEI Feng-cai. *Department of Burns and Plastic Surgery, the General Hospital of Ji'nan Military Command, Ji'nan 250031, China

【Abstract】 **Objective** To study the gene expression of transforming growth factor β receptor II (T β R II) in pathological scar. **Methods** Twenty samples of pathological scar were collected from 20 burn or trauma patients hospitalized in the General Hospital of Ji'nan Military Command from 2007 to 2009. Twenty specimens of epidermal layer were obtained from the middle portion and the edge of pathological scars. Twenty normal skin specimens which were located more than 10 cm away from the lesion sites of 20 patients were collected as self-controls. Serum from 1-2 mL whole blood were obtained from each of the 20 patients for second self-control. Eight normal skin specimens from 8 patients without pathological scar, discarded from un-related operations, were also collected as negative-control. Positive expressions of T β R II in three different skin specimens were determined with biotin-streptavidin-peroxidase staining. Gene expressions of T β R II in all specimens were compared with PCR-single strand conformation polymorphism analysis and gene sequencing. Data were processed with Fisher's exact test. **Results** Positive expression of T β R II in pathological scar epidermis was lower than that in normal skin specimen of patients with pathological scar or normal skin specimen of patients without pathological scar, and T β R II was mainly located in the basal layer of epidermis. Positive expressions of T β R II were seldom found in acanthocytes, granular cells, and cuticle or even non-existing. No abnormality of T β R II was found in normal skin epidermis or serum samples of pathological scar patients or normal skin epidermis of patients without pathological scar. T β R II expressing in 8 specimens of epidermis of pathological scar showed abnormal electrophoresis pattern at poly A fragments band and loss of one A base in DNA fragment ($P=0.044$). **Conclusions** There may be abnormal gene expression of T β R II in pathological scar epidermis. Replantation of epidermis of scar may increase the risk of scar recurrence, while replantation of normal skin of patients with scar on wound may not increase the risk of scar recurrence.

【Key words】 Receptors, transforming growth factor beta; Epidermis; Gene expression; Pathological scar

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.04.016

作者单位:250031 济南军区总医院烧伤整复科(陈铭锐、刘顺利);山东省千佛山医院整形外科(安纲);山东齐鲁医院口腔外科(魏奉才)

瘢痕疙瘩和增生性瘢痕统称为病理性瘢痕,是影响人体外貌美感和造成机体不适的常见因素。有研究表明,瘢痕的形成可能由基因决定而非种族因素所致,因此基因治疗有可能成为防治病理性瘢痕的途径之一^[1]。近年来,TGF 成为瘢痕发病机制研究的热点,且多集中于瘢痕中 Fb 对 TGF 的反应,而有关其受体在瘢痕表皮中的变化及其作用报道甚少。TGF- β II 型受体(T β R II)几乎参与了哺乳动物所有细胞的病理生理过程,依据靶细胞不同而表现出促进或抑制细胞增殖分化作用,例如它能刺激许多间质细胞增殖而抑制正常及恶性上皮细胞增殖,参与细胞分化的调节等。本研究中,笔者通过检测 T β R II 在病理性瘢痕表皮组织中的基因变化,初步分析其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本采集

20 份病理性瘢痕标本收集于 2007—2009 年济南军区总医院收治的 20 例烧伤或外伤瘢痕患者,其中男 10 例、女 10 例,年龄 4~52 岁。瘢痕病程 1 年以上,病损部位多发红,瘢痕高出皮面、质硬,部分伴有挛缩。分别于每份瘢痕标本中央和边缘部位切取 1 块表皮层组织(面积约 1.0 cm²,厚度 3~4 mm)。每例患者留取 1 块距离病变部位 10 cm 以上的正常皮肤组织标本(面积约 0.5 cm²,厚度 2~3 mm)作为自身对照 1。抽取每例患者 1~2 mL 全血并分离提取血清,作为自身对照 2。另收集 8 例无病理性瘢痕病史患者术中弃用的 8 份正常皮肤组织标本作为正常对照,其中男 5 例、女 3 例,年龄 18~60 岁。留取上述标本均征得患者同意。

1.2 主要试剂及仪器来源

Taq 酶购自北京拜尔迪生物技术有限公司,pUC19(marker)、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)混合液购自上海博亚生物技术有限公司,兔抗人 T β R II 单克隆抗体、生物素标记二抗购自美国 Santa Cruz 公司。生物素-链霉亲和素-过氧化物酶(SP)试剂盒及二氨基联苯胺(DAB)试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。JD801 专业数码凝胶成像与分析系统 3.3 购自浙江捷达软件工程有限公司,ABI3730 型自动测序仪购自美国应用生物系统公司。

1.3 SP 法检测 T β R II 的阳性表达

参照 SP 试剂盒说明书操作。将患者病理性瘢痕表皮组织标本及自身对照 1、正常对照组织标本制作成 2 mm × 2 mm × 2 mm 大小组织块,浸蜡包埋,

切片(厚度为 3 μ m)。加入兔抗人 T β R II 单克隆抗体 50 μ L,工作浓度为 1:30,于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,阴性对照用 PBS 代替。加入生物素标记的二抗 50 μ L,工作浓度为 1:100,室温孵育 1 h。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,室温孵育 30 min。DAB 显色,室温孵育 1 h。苏木素复染后冲洗,封片。于光学显微镜下,观察每张组织切片中 T β R II 的表达和分布情况并照相。以细胞膜、细胞质或细胞核内呈现棕黄色颗粒为阳性表达。

1.4 PCR-单链构象多态性分析(SSCP)检测 T β R II 的基因表达

1.4.1 PCR 按照常规酚-氯仿法从患者病理性瘢痕表皮组织标本及自身对照 1、自身对照 2、正常对照组织标本中提取 DNA。根据 Genbank 中人类 T β R II 互补 DNA 序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term>,序列号 bc040499.1),在 T β R II 5'端多聚 A(poly A)位点(709~718 bp)两端使用 Premier 3.0 软件设计引物,由上海博亚生物技术有限公司合成。上游引物序列:5'-AAGCTCCCCTACCAT-GACT-3',下游引物序列:5'-TGCACTCATCAGAGC-TACAG-3',扩增片段长度为 118 bp。在 PCR 反应管中依次加入 100 μ g/ μ L 模板 DNA 2.00 μ L,PCR 缓冲液 5.00 μ L,25 mmol/L Mg²⁺ 1.50 μ L,10 mmol/L dNTP 2.00 μ L,30 μ mol/L 上下游引物各 0.83 μ L,5 U/ μ L Taq 酶 0.40 μ L,然后加入双蒸水至反应体积为 50.00 μ L,扩增多聚 A 序列片段。PCR 循环条件如下:94.0 $^{\circ}$ C 5 min,94.0 $^{\circ}$ C 50 s,59.5 $^{\circ}$ C 30 s,72.0 $^{\circ}$ C 30 s 共计 35 个循环;循环结束后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。最后于 4 $^{\circ}$ C 条件下取出标本,扩增 T β R II 基因片段。

1.4.2 SSCP 将步骤 1.4.1 所获 PCR 产物行垂直电泳,凝胶银染。用 JD801 专业数码凝胶成像与分析系统 3.3 分析凝胶条带,判断有无基因突变,即将条带位置异常者视为 SSCP 阳性。SSCP 阳性结果者重复“电泳、凝胶银染、条带分析”步骤测定 1 次。

1.5 基因测序

将 SSCP 阳性表达的 PCR 产物纯化,用化学发光的双脱氧法在 ABI3730 型自动测序仪上直接测序。将测序结果与 Genbank 中人类 T β R II 互补 DNA 序列进行比对,筛选出不一致的变异基因标本再重复测序 1 次。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件,对各组织基因测序结果行 Fisher 确切概率法检验。 $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 TβR II 的阳性表达

免疫组织化学染色显示,在自身对照 1 和正常对照皮肤组织标本中,TβR II 阳性颗粒主要位于表皮的基底层、颗粒层、棘层、角质层、汗腺、毛囊及小血管内皮细胞,其中基底层表达最强。病理性瘢痕组织表皮变薄,颗粒层、棘层层次不清,汗腺等皮肤附属器结构被破坏或消失,TβR II 阳性表达弱于前述 2 种正常皮肤组织,主要位于表皮的基底层,而棘层、颗粒层和角质层中 TβR II 阳性表达很少或缺失。见图 1。

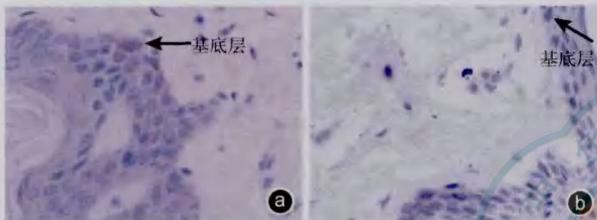


图 1 免疫组织化学染色检测 TGF-β II 型受体的阳性表达 生物素-链霉亲和素-过氧化物酶 × 200。a. 瘢痕患者正常皮肤组织标本,阳性颗粒主要位于表皮各层及皮肤附件,基底层表达最强(←);b. 病理性瘢痕表皮组织标本,表皮各层阳性表达明显减弱,主要位于基底层(←),皮肤附件未见表达

2.2 PCR-SSCP

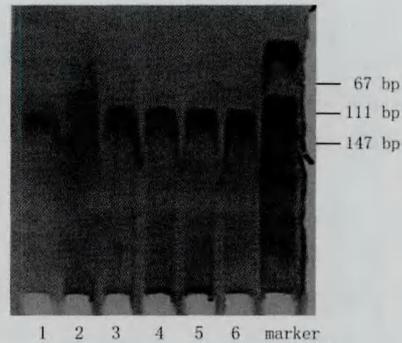
8 份病理性瘢痕表皮组织标本中 TβR II 多聚 A 位点的片段出现条带泳动异常(图 2)。自身对照 1、自身对照 2 和正常对照标本中未出现异常泳动条带。重复实验结果与此一致。

2.3 基因测序

与 Genbank 的 TβR II 互补 DNA 序列比对,8 份病理性瘢痕表皮组织标本中 TβR II 多聚 A 位点发生缺失突变,即前者有 10 个 A,后者有 9 个 A,由此显示 DNA 片段缩短(图 3);3 种作为对照的标本中 TβR II 基因测序未见异常。重复测序结果与此一致。此结果经 Fisher 确切概率法检验,差异有统计学意义($P = 0.044$)。

3 讨论

创面异常愈合形成增生性瘢痕或瘢痕疙瘩等病理性瘢痕,过去认为表皮在此病理过程中仅起次要作用,因此通常称其为“真皮病”。而近年来研究显示,创面愈合是一个牵涉表皮、真皮、内皮细胞、炎症反应的复杂过程,是表皮与间充质相互异常作用的



注:marker 为 pUC19;1. 瘢痕患者正常皮肤组织标本;2. 病理性瘢痕表皮组织标本,条带泳动出现异常;3. 无病理性瘢痕病史患者的正常皮肤组织标本;4,5,6. 为瘢痕患者血清标本

图 2 PCR-单链构象多态性分析检测患者 4 种标本 TGF-β II 型受体的基因表达

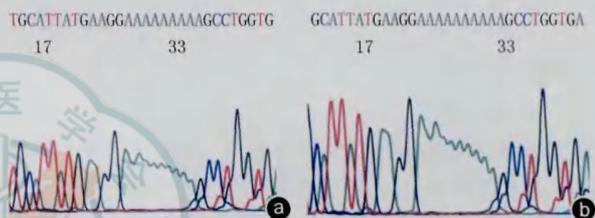


图 3 基因测序分析 2 种组织标本 TGF-β II 型受体多聚 A 长度。a. 病理性瘢痕表皮组织标本,多聚 A 长度为 9 bp;b. 瘢痕患者正常皮肤组织标本,多聚 A 长度为 10 bp

结果,表皮细胞和 Fb 与瘢痕形成密切相关^[2]。表皮中的 KC 可通过对真皮细胞行为的影响,潜在影响 Fb 行为,从而在增生性瘢痕的病理性纤维变性过程中具有重要作用^[3]。在伤口愈合期间,表皮细胞通过 Smad 蛋白、磷脂酰肌醇-3 激酶、TGF-β 和结缔组织生长因子等通路促进纤维化或瘢痕形成。如果上述信号通路异常,上皮细胞可强烈刺激静止状态的 Fb 引起其内部结构改变,使它具有活性并停留在活化阶段,参与细胞因子间的自分泌循环并维持纤维化^[4]。Wang 等^[5]研究证实,未分化的 KC 具有维持正常表皮与真皮相互作用和抑制真皮纤维化的能力,未分化 KC 的缺乏或减少可参与病理性纤维化的发生,导致伤口过度愈合从而形成病理性瘢痕。

与细胞增殖周期相关的基因如 p53 突变在瘢痕疙瘩中已被证实^[6]。有研究表明 TβR II 是一种新的抑癌基因。TβR II 表达异常发生在肿瘤形成的早期,主要表现为 TβR II 基因改变及其功能失活^[7]。McCaffrey 等^[8]报道 TβR II 表达减少、TβR I 不变时,TGF-β₁ 抗细胞增殖作用消失,而诱导基质积聚作用仍存在,说明 TβR II 在抗细胞增殖过程中作用更重要。研究表明,与正常组织 Fb 比较,瘢痕疙瘩 Fb 中

TGF- β_1 和 TGF- β_2 水平增加,而 TGF- β_3 和 T β R II 水平显著降低^[9]。蔡景龙等^[10]观察到瘢痕疙瘩 Fb 中 T β R II 多聚 A 位点片段出现缺失突变,认为 T β R II 失活在瘢痕疙瘩中可能通过类似肿瘤的机制引起 Fb 表型的某些改变,而未形成恶性转化,但也可引起 Fb 的限制性增殖。本研究以病理性瘢痕表皮和血清为对象,探讨其中是否存在基因异常表达。

早期曾有部分学者认为,瘢痕疙瘩等病理性瘢痕与血清的某些异常改变有关。一些肿瘤学研究也表明,TGF 在肺癌等肿瘤患者血清中的表达水平异常^[11]。本研究显示瘢痕患者血清中 T β R II 未见异常表达,但并不排除可能存在其他异常。

目前病理性瘢痕的治疗仍以手术为主。瘢痕皮回植是把瘢痕组织切除后,保留瘢痕表皮及其下少量纤维组织回植于瘢痕切除的创面^[12]。这一术式应用于临床尚存在争议。本研究结果显示,病理性瘢痕表皮组织中 T β R II 阳性颗粒表达明显弱于正常皮肤,部分标本中 T β R II 多聚 A 位点的片段出现条带泳动异常,基因测序显示 DNA 片段缩短,提示将带有 T β R II 异常表达的病理性瘢痕表皮移植修复创面,可能促进受区 Fb 生长。本研究结果表明,瘢痕患者自体正常皮肤中未见 T β R II 的异常表达,由此推测选取瘢痕患者正常皮肤进行移植并不增加瘢痕复发的风险。

参考文献

- [1] 吴宗耀. 烧伤瘢痕的防治难点. 中华烧伤杂志, 2004, 20(2): 67-68.

- [2] Bellemare J, Roberge CJ, Bergeron D, et al. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol*, 2005, 206(1):1-8.
- [3] 陈苏丽, 刘流. 上皮细胞-干细胞在创伤愈合中的作用. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):1092-1096.
- [4] Moulin V, Larochelle S, Langlois C, et al. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inducers. *J Cell Physiol*, 2004, 198(3):350-358.
- [5] Wang X, Liu Y, Deng Z, et al. Inhibition of dermal fibrosis in self-assembled skin equivalents by undifferentiated keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 2009, 53(2):103-111.
- [6] 肖志波, 郝立君, 任立宏, 等. wt-P53 蛋白对人瘢痕疙瘩成纤维细胞端粒酶活性的影响. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(7):702-706.
- [7] Parekh TV, Gama P, Wen X, et al. Transforming growth factor beta signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition. *Cancer Res*, 2002, 62(10):2778-2790.
- [8] McCaffrey TA, Consigli S, Du B, et al. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest*, 1995, 96(6):2667-2675.
- [9] Bran GM, Goessler UR, Schardt C, et al. Effect of the abrogation of TGF-beta1 by antisense oligonucleotides on the expression of TGF-beta-isoforms and their receptors I and II in isolated fibroblasts from keloid scars. *Int J Mol Med*, 2010, 25(6):915-921.
- [10] 蔡景龙, 安纳, 徐斌, 等. 单发性和多发性瘢痕疙瘩转化生长因子- β_1 II 型受体 Poly A 位点基因突变研究. 中华整形外科杂志, 2006, 22(1):41-43.
- [11] 王芙蓉, 李云霞, 秦毅强. 肺癌患者血清 TGF- β_1 水平的检测及临床意义. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(9):11-12.
- [12] 邓恩, 黄木平, 邱世国, 等. 瘢痕皮片回植的临床应用观察. 广东医学院学报, 2003, 21(3):269-270.

(收稿日期:2012-02-06)
(本文编辑:莫愚)

· 科技快讯 ·

应用耳后皮瓣修复耳缺损

耳廓的修复需要充分考虑美观,根据耳缺损大小、部位和累及组织,可以采用多种方法修复。为了更好地修复耳廓,作者设计了一种改进的双侧全厚皮肤耳后皮瓣并应用于 3 例患者耳缺损的修复。该耳后皮瓣使创面易于包扎,术后外观好。术中及术后均无严重并发症发生。所有患者对治疗结果满意。该方法为修复耳廓局部组织缺损提供了一种较好的选择。

王成, 迪拉娜, 编译自《Aesthetic Plast Surg》, 2012, 36(3):623-627; 张国安, 审校

皮肤扩张器置入术在烧伤瘢痕畸形治疗中的应用

过去,采用皮片和邻近或远隔部位皮瓣移植修复烧伤后瘢痕畸形等后遗症,对供区损伤大,美学效果不理想。现今,皮肤软组织扩张器的应用改善了以上问题,该技术可以提供邻近部位与正常皮肤质地、颜色、组织功能、敏感性基本一致的皮瓣。2006—2010 年黎巴嫩 Jeitawe 医院烧伤中心收治 14 例 6~50 岁烧伤后瘢痕畸形患者,应用皮肤扩张器进行治疗。皮肤扩张区域分布于头皮、前额、颈部、躯干以及上下肢。扩张器置于筋膜层,常规应用抗生素并引流。置入术后 2 周开始扩张,平均扩张 3 个月。14 例患者中罕见并发症,瘢痕得以改善,功能及美学效果均较满意。本组患者中 7 例行 2 次扩张。

赵冉, 编译自《Ann Burns Fire Disasters》, 2011, 24(2):77-81; 张国安, 审校