

转化生长因子 β 在增生性瘢痕形成中的作用及其信号转导机制

张选奋 鲁开化 柳大烈

深达真皮网状层的创伤尤其是烧伤愈合后容易形成增生性瘢痕 (hypertrophic scar, HS), HS 组织中含有大量胶原等细胞外基质 (ECM) 和新生血管。和其他细胞因子相比,转化生长因子 (TGF) β 在 HS 形成中作用尤为突出。

一、TGF- β 与瘢痕形成

TGF- β 由巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞 (Fb) 和血管内皮细胞产生,经蛋白酶裂解或酸处理后活化。TGF- β 分子质量 25×10^3 ,是借二硫键连接的二聚体,有 $\beta_1 \sim \beta_3$ 5 个亚型,各亚型间有 70% ~ 80% 的氨基酸同源,其生物学作用有刺激 Fb 合成胶原等 ECM、抑制基质蛋白酶活性并增强胶原酶抑制剂表达、强烈趋化 Fb 和炎症细胞、刺激 Fb 增殖、抑制上皮细胞生长和加速血管形成等,但对恶性细胞增殖有明显的抑制作用。此外,TGF- β 能促进 Fb 产生白细胞介素 (IL) 6,促进 Ca^{2+} 内流并提高胞内三磷酸肌醇 (IP_3) 水平进而活化蛋白激酶 C (PKC),而 Ca^{2+} 内流促进剂 A_{23187} 、PKC 活化剂佛波醇 (PMA) 也促进 IL-6 的产生,推测 TGF- β 经活化 PKC 促进 IL-6 的生成。但 TGF- β 可抑制 γ 型干扰素 (IFN) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的产生,而 IL-6 的许多生物学作用与 TNF- α 相同,TGF- β 对 IL-6 和 TNF- α 产生的相反作用对细胞增殖和凋亡的意义有待研究。许多研究证实,HS 组织中 TGF- β 和胶原表达同时增高。

Zhang 等^[1]的研究证明,人体烧伤后形成的 HS 中,TGF- β_1 和 I、III 型前胶原 mRNA 显著增加,而正常皮肤既无 TGF- β_1 mRNA 表达,也无明显的胶原蛋白合成,且 HS 患者血清中 TGF- β_1 高于正常人。瘢痕内注射 IFN- $\alpha_2\beta$ 在逐渐软化瘢痕的同时,TGF- β_1 含量也降到正常水平^[2],由此可见,血清和创伤局部大量的 TGF- β_1 与 HS 形成明显相关。

人前 2/3 胎龄的皮肤创伤后很少形成瘢痕,亦无 TGF- β 表达,加入 TGF- β 后则呈瘢痕愈合。Sullivan 等^[3]移植胎儿和成人皮肤到大鼠皮下的实验中,胎儿皮肤无瘢痕愈合亦无 TGF- β_1 mRNA 表达,而成人皮肤出现瘢痕且有 TGF- β_1 mRNA 表达;外源性的 TGF- β_1 使胎儿皮肤瘢痕愈合,其中 Fb 有 TGF- β_1 mRNA 表达;瘢痕大小与 TGF- β_1 、TGF- β_2 的浓度呈正相关。人胎儿皮肤 Fb 被 TGF- β_1 刺激可明显上调胶原基因的表达^[4],也能产生 TGF- β_1 ^[5]。提示胎儿和成人的 Fb 无明显区别,并进一步证实 TGF- β_1 刺激瘢痕形成。TGF- β_1 和 TGF- β_2 的抗体可减少 Fb 合成 ECM 并减少瘢痕形成。Younai 等^[6]使用 Fb 的三维培养法研究也证实了 TGF- β_1 的作用:瘢痕疙瘩、HS 的 Fb 合成胶原量分别是健康人皮肤的 12 倍和 3 倍;5 ng/ml TGF- β_1 能使瘢痕疙瘩 Fb 胶原合成量增加 2.7 倍,而 HS 和正常皮肤则没有增加;50 ng/ml 可中和各亚型 TGF- β 的抗体,使瘢痕疙瘩 Fb 胶原减少 40%,而 HS 和正常 Fb 的胶原合成量降低,差异无显著性意义。TGF- β_1 刺激瘢痕形成可能存在浓度差异性,Garner 等^[7]证明 TGF- $\beta_1 \leq 1$ ng/ml 对 HS 和正常皮肤 Fb 的刺激作用存在明显差异,浓度升高时差异不明显,提示 Fb 表面的受体数量、亲和性及特异性存在不同。此外,TGF- β 也能够活化其本身 mRNA 的转录及 TGF- β 受体 (T β R)-I、T β R-II 在 Fb 中的表达^[8]。

综合上述观点,TGF- β 及其抗体的作用尽管被多数研究支持,但也存在一些争议,这可能与实验对象、方法以及观察数量等不同有关,且体内试验涉及如全身状态、创伤局部的环境及细胞、ECM 与众多细胞因子之间的相互影响等因素。创伤后机体必然作出修复创伤的一系列反应,除了研究较多的细胞外环境及细胞功能的变化外,细胞内的信号转导及细胞间的“通讯”也必然会发生改变。故加强瘢痕中细胞成分的信息传递研究,将有助于加深对瘢痕形成机制的了解,亦有可能阐明 Fb 敏感性的差异并

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院整形科中心 (张选奋、鲁开化);第一军医大学珠江医院整形科 (柳大烈)

确定“瘢痕体质”的生物学基础。已经证实透明质酸(hyaluronic acid, HA)、核心蛋白聚糖(decorin)和硫酸皮肤素蛋白多糖Ⅱ能结合并灭活TGF- β_1 ,从而抑制瘢痕形成^[6,7],而T β R-Ⅲ本身是一种蛋白多糖,是否结合TGF- β 后产生抑制信号需进一步研究。

瘢痕过度增生常伴随瘢痕挛缩,其机制尚不完全清楚。目前认为,瘢痕内及周围的胶原蛋白等纤维网架与Fb和肌成纤维细胞(myofibroblast, MFb)的骨架系统(微管、微丝和中间丝等)连接而形成纤维细胞网络。MFb的 α -平滑肌蛋白(α -SMA)聚合和解聚产生收缩力,借上述纤维网传遍整个瘢痕组织,为瘢痕挛缩的基本过程。TGF- β 刺激该过程的诸多环节,如刺激Fb增殖并合成大量胶原、诱导肉芽组织和正常Fb表达 α -SMA并增加MFb的数量^[9,10]、漂浮和固定的胶原基质收缩^[11]等。

二、TGF- β 的信号转导

1. T β R: T β R有T β R-Ⅰ、T β R-Ⅱ和T β R-Ⅲ3个亚型,分子质量分别为 53×10^3 、 $(70 \sim 85) \times 10^3$ 和 $(250 \sim 350) \times 10^3$ ^[12]。T β R-Ⅰ和T β R-Ⅱ为糖蛋白,结构相似,由小的富含半胱氨酸的胞外区和主要为激酶的胞内区构成。T β R-Ⅰ在近膜区尚有富含甘氨酸和丝氨酸残基的GS区。T β R的亚型均能与其特异地结合,但TGF- β_1 与T β R亲和性比TGF- β_2 大10~80倍。T β R-Ⅲ(endoglin)为蛋白多糖,与TGF- β_1 、TGF- β_2 和TGF- β_3 的亲合力相似,但TGF- β_1 和TGF- β_3 为主要配体,T β R-Ⅲ本身无蛋白激酶活性,在信号转导中的作用有待研究。

2. TGF- β 与T β R-Ⅰ、T β R-Ⅱ结合: TGF- β_1 与T β R-Ⅱ的胞外区结合,不仅活化T β R-Ⅱ的蛋白激酶,而且寡聚化(TGF- β_1 分子的1条链和T β R-Ⅱ的2个分子);T β R-Ⅰ被吸引到此复合体并与TGF- β_1 的另一条链结合,T β R-Ⅰ的GS区被T β R-Ⅱ磷酸化而活化形成异源六聚体,与受体胞浆部分相互作用而稳定^[12]。T β R-Ⅰ决定细胞内信号的特异性。TGF- β_2 和T β R-Ⅰ或 β 蛋白聚糖(betaglycan,一种辅助性跨膜蛋白聚糖)联合才能和T β R-Ⅱ高亲和性地结合。T β R和骨形态发生蛋白类(bone morphogenetic protein, BMP)受体激酶区的9个氨基酸序列不同。而T β R-ⅠGS区Ser165的突变能强化T β R-Ⅰ在增殖、抑制和基质积累方面的信号,但弱化凋亡信号^[13]。T β R-Ⅱ低表达或不表达时,TGF- β 无抗细胞增殖作用但仍能诱导基质沉积,而T β R-Ⅰ的活化对两种反应是必需的^[14]。可见,抗细胞增殖比诱导基质积累需要更有效的刺激。激酶区的丝氨

酸残基(Ser 213和Ser 409)的磷酸化对T β R-Ⅱ的活性是必需的,而Ser 416的磷酸化可抑制T β R-Ⅱ的信号^[15],T β R-Ⅱ还可在酪氨酸残基上发生自身磷酸化,因此它是双重活化的蛋白激酶^[16]。

3. 胞内介导子——Smad:迄今已发现9种Smad蛋白可传递TGF- β 信号,按功能分为3组^[17]:(1)通道限定性Smad:Smad₂和Smad₃,参与主动特异性信号传递。(2)共同介导子Smad₄,参与TGF- β 家族的信号转导。(3)拮抗性Smad:Smad₆和Smad₇,作为无效诱饵抑制信号转导。Smad由400~500氨基酸组成,分子质量为 $(42 \sim 60) \times 10^3$,有N端的MH₁区和C端的MH₂区2个高度保守区,中间以富含脯氨酸连接。MH₁区有结合DNA特殊序列活性和对MH₂区的负性调节作用,即阻止Smad₂、Smad₃、Smad₄形成异源寡聚体。MH₂区负责转活化和同源或异源寡聚化。在非活化状态,MH₂区和MH₁区互相结合,受体活化后,分子开放,MH₂区才能发挥作用^[12]。

4. 胞内信号转导及调节:T β R-Ⅱ激酶活化形成六源异聚体后,再结合并活化Smad₂和Smad₃C端的Ser-Ser-X-Ser(SSXS)区,使其和N端打开,允许Smad₄与之结合并最大程度的活化,这已被¹²⁵I标记的TGF- β 交叉连接T β R-Ⅱ及Smad₂、Smad₃的共免疫沉淀实验所证实^[18]。Smad₂和Smad₃与T β R的结合是T β R-Ⅱ激酶活性依赖性的。因此,Smad₂-Smad₃-Smad₄形成了稳定的复合体,其转位进入核内,活化转录因子或(和)与DNA结合蛋白结合,启动靶基因转录^[12]。Smad₄缺乏SSXS序列,它既不能直接结合T β R,也不能被T β R活化。Smad₆和Smad₇结构上与其他Smad不同,但Smad₆N端有36%氨基酸与Smad₄相同。Smad₆和Smad₇的复合体可直接与T β R-TGF- β 复合体结合但不被T β R磷酸化,因而不能使Smad₄与之结合,阻止信号的下传;并阻止T β R-TGF- β 与Smad₂和Smad₃结合,起抑制作用^[12]。此外,拮抗性Smad₆和限定性Smad₄竞争与T β R-Ⅰ的结合,且结合后更稳定。TGF- β 还可诱导Smad₆和Smad₇的mRNA表达。以上这些均为TGF- β 信号通道的负反馈抑制机制。和其他信号通道一样,调节TGF- β 信号传递的速度和特异性的关键机制是限定信号分子如Smad的亚细胞定位。Tsukazaki等^[19]证实SARA(smada anchor for receptor activation,一种能吸引Smad₂和Smad₃到T β R的锚定蛋白)决定Smad₂的亚细胞分布,SARA C端的FYVE区介导其自身的定位并与Smad₂连结从而锚

定 Smad₂。但 Smad₂ 不影响 SARA 的定位,而 SARA 和 T β R- II 定位于相同的亚细胞域,SARA 的突变子能与 Smad₂ 连结但其自身导致 Smad₂ 的亚细胞定位错误,从而强烈抑制 TGF- β 诱导的转录反应^[20]。SARA 的 FYVE 区还直接和 T β R 复合体相互作用,但不能和 Smad₁ (BMP 的信号介导子) 连结,这可能是 TGF- β 信号通道中,通过促进特殊底物磷酸化和定位而防止无关的“交谈”来提高信号的有效性和选择性的机制之一。

其他信号通道的关系:细胞微环境由复杂物质构成,细胞必然对其中的各种物质作出反应,反应的信号是由不同的信号通路转导的,因此,各信号通路间必然存在相互影响和协调。TGF- β 可活化 GF 活化的激酶,但不清楚它与 TGF- β 生物学效应间的关系。Ras 和 Rac 也参与 TGF- β 通路。在一些细胞型如乳腺癌细胞中,细胞信号调控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)₁ 和 ERK₂ 以及应激活化的蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK) 或 JunN-末端激酶 (Jun N-terminal kinase, JNK) 也可被 TGF- β 活化且与其负性增殖调节相关;受体酪氨酸激酶介导的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活化对 Smad 连接器有激活作用但对其转位进入核内有抑制作用^[12]。此外, TGF- β 和 Smad₃ 能提高维生素 D 受体 (VDR) 的配体依赖性活化,而无催化活性的 T β R- I 则有抑制作用;1,25 双羟 D₃ [1,25 (OH)₂ D₃] 能提高 MH₁ 介导的 Smad₃ 和 VDR 形成复合体^[21],提示 Smad₃ 和 VDR 通道中存在“交谈”,但 TGF- β 和 VDR 共同作用的结果是协同或拮抗,取决于不同组织中 Smad 或 VDR 通道信号分子的含量。由此可见,各信号通道间普遍存在如电话网一般的“交谈”,细胞如何实现信号转导的特异性、经济性、时效性以及信号的放大和消失,细胞又如何综合不同的刺激信号等问题有待进一步深入研究。

三、展望

创伤后各种细胞特别是 Fb、上皮细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和炎症细胞,处于含有各种不同浓度和活性的细胞因子以及 ECM 等众多物质的微环境中,如何产生刺激或抑制 Fb 增殖及合成 ECM 的信号,有无特殊的 Fb 克隆诱生等问题,需在体内多因素共同存在时研究,这也有助于阐明瘢痕形成或无瘢痕愈合的机制。尽管 TGF- β 有促进瘢痕形成的作用,但并非惟一因素,而抗 TGF- β 抗体有抗瘢痕形成的作用,用于人体可引起免疫反应等

副作用。细胞间及细胞内信息传递的研究扩大了探索范围,研究细胞信号转导通路和调控机制以及与细胞生物功能间的关系,针对细胞因子如 TGF- β 的活化与失活、封闭或诱导 T β R 表达、调节受体激酶活性、影响通道限定性 Smad₃ 和抑制性 Smad₄ 的活性和定位及其后的转录调节等各个环节,使用激活、抑制或基因突变等手段干预,使细胞能适时适度地增殖、分化和凋亡以及加强或弱化合成和分解功能,有可能达到既能迅速再生愈合,又不形成瘢痕的目的。

参 考 文 献

- 1 Zhang K, Carner W, Cohen L, et al. Increased I and III collagen and transforming growth factor- β ₁ mRNA and protein in hypertrophic scar. *J Invest Dermatol*, 1995, 104:750 - 754.
- 2 Redget EE, Shankowsky HA, Pannu R, et al. Transforming growth factor- β in thermally injured patients with hypertrophic scar: effects of interferon α ₂ β . *Plast Reconstr Surg*, 1998, 102:1317 - 1328.
- 3 Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, et al. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in TGF- β . *J Pediatr Surg*, 1995, 30:198 - 202.
- 4 Lorenz HP, Chang J, Longaker MT, et al. Transforming growth factor- β ₁ and β ₂ synergistically increase expression of collagen type I and type III in fetal but not adult fibroblasts. *Surg Forum*, 1993, 79:723 - 725.
- 5 Chang J, Longaker MT, Lorenz HP, et al. Fetal and adult sheep fibroblast TGF- β ₁ gene expression in vitro: effects of hypoxia and gestational age. *Surg Forum*, 1993, 79:720 - 722.
- 6 Younai S, Nichter LS, Wellisz T, et al. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor- β in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. *Ann Plast Surg*, 1994, 33:148 - 154.
- 7 Garner WL, Karmiol S, Rodriguez JL, et al. Phenotypic differences in cytokine responsiveness hypertrophic scar versus normal dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 1993, 101:875 - 878.
- 8 Gold LI, Sung JJ, Siebert JW, et al. Type I (R I) and type II (R II) receptors for transforming growth factor- β isoforms are expressed subsequently to transforming growth factor- β ligands during excisional wound repair. *Am J Pathol*, 1997, 150:209 - 222.
- 9 Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, et al. Transforming growth factor- β ₁ induces α -smooth muscle actin expression in granulation myofibroblasts. *J Cell Biol*, 1993, 122:103 - 115.
- 10 Yakozeki M, Baba Y, Shimokawa H, et al. Interferon-gamma inhibitors the myofibroblastic phenotype of rat palatal fibroblasts induced by transforming growth factor-beta1 in vitro. *FEBS-Lett*, 1999, 442:61 - 64.
- 11 Piscatell SJ, Michaels BS, Gregory P, et al. Fetal fibroblast contraction of collagen matrices in vitro: the effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- β . *Ann Plast Surg*, 1994, 33:38 - 45.
- 12 Heldim CH, Miyazono K, Dijke PT. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997, 390:465 - 471.
- 13 Soucheilnytskyi S, Dijke PT, Miyazono K, et al. Phosphorylation of ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β ₁ induced cellular responses. *EMBO J*, 1996, 15:6231 - 6240.
- 14 Sanker SN, Mahooti BL, Bensen TL, et al. Modulation of TGF- β receptor levels on microvascular endothelial cells during vitro angiogenesis. *J Clin Invest*, 1996, 97:1436 - 1446.

15 Luo KX, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF-β receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J*, 1997, 16:1970-1981.

16 Lawler S, Feng XH, Chen RH, et al. The type II transforming growth factor-β receptor autophosphorylation not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Bio Chem*, 1997, 272: 14850-15859.

17 Shi YG, Wang YF, Jayaraman L, et al. Crystal structure of a Smad MH₁ domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-β signaling. *Cell*, 1998, 94:585-594.

18 Marcias SM, Hoodless PA, Pirone R, et al. MADR₂ is a substrate of

the TGF-β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, 1996, 87:1215-1224.

19 Tsukazaki T, Chiang T, Davidson A, et al. SARA, a FYVE domain protein that recruits smad₂ to the TGF-β receptor. *Cell*, 1998, 95: 779-791.

20 Ten D, Heldin CH. An anchor for activation. *Nature*, 1999, 397: 109-110.

21 Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, et al. Convergence of transforming growth factor-β and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, 1999, 283:1317-1321.

(收稿日期:2002-10-10)

(本文编辑:苟学萍)

· 病例报告 ·

手部超声能烧伤三例

唐新辉 林才宇

近年来,随着超声波塑料焊接机在塑料、皮革等生产行业中的广泛应用,出现了一种特殊原因的烧伤:超声能烧伤,关于其诊治方法国内鲜见报道。笔者单位 2001~2002 年收治 3 例超声能烧伤患者,现报告如下。

例 1 男,19 岁。操作超声波塑料焊接机时不慎致右手第 2~4 指烧伤,伤后 1 周入院。查体:右手第 2,3 指的第 2,3 指节干性坏死,第 4 指末节有 1.5 cm × 2.0 cm Ⅲ度创面(图 1)。在右臂丛麻醉及腹部局部浸润麻醉下,行右手第 2,3 指坏死部分截除及右手第 4 指创面扩创,腹部带蒂皮瓣修复术。术后 21 d 断蒂,切口愈合良好,右手第 2,3 指的第 2,3 指节遗留有缺损。



图 1 超声能致右手手指Ⅲ度烧伤

例 2 男,27 岁。操作超声波塑料焊接机时致左手烧伤,伤后 8 h 入院。查体:左手背第 2~5 掌指关节处有 4 个近圆形创面,直径为 1.2~2.0 cm,其上有皮革样灰黄色焦痂形成。患者当时拒绝手术治疗,换药 40 d 后创面未愈,肉芽创面形成,经行中厚皮片移植术后愈合,但第 2~5 指掌指关节活动轻度受限。

例 3 男,32 岁。操作超声波塑料焊接机时致左手第 2~5 指被烧伤,创面(1.0~1.5)cm × (1.8~2.0)cm,其中第 2 指末节完全坏死,其余均为Ⅲ度创面。急诊行坏死组织清

除术,采用 4 个腹部带蒂皮瓣进行修复,术后 21 d 断蒂,愈合良好,外观、功能不受影响(图 2)。



图 2 左手第 2~5 指超声能烧伤腹部带蒂皮瓣修复术后

讨论 (1)超声能烧伤的致伤原理:塑料工件与皮肤接触后形成接合面,在超声能的作用下,两者在接合面处剧烈摩擦,超声能转化为热能,产生 800℃ 以上的高温,加上超声波具有较强的穿透性,导致组织在极短时间内被深度烧伤。(2)本组患者烧伤特点:均在用手操作超声波塑料焊接机时致伤,故均为手部深度烧伤,且部位散在,分界明显,对手的功能影响大,易导致功能障碍或残废。(3)治疗:处理手部烧伤时,应注意加速伤口愈合,尽量减少后遗症的发生,减轻畸形程度,另应强调早期功能锻炼,最大限度地恢复手的功能^[1]。本组例 1 伤后 7 d 方就诊,导致部分截指,遗留残废;例 2 拒绝早期手术,遗留有功能障碍;例 3 行急诊手术,功能、外形恢复较好。提示手部超声能烧伤后早期就诊、早期手术为其主要治疗原则。(4)预防:手部超声能烧伤易导致功能障碍或残废,预防其发生尤为重要。良好的岗前培训、严格遵守操作管理规程、严防在疲劳状态下操作机器,对预防此类烧伤具有重要意义。

参 考 文 献

1 黎黎,主编.烧伤治疗学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1995. 364-369.

(收稿日期:2002-04-26)

(本文编辑:罗勤)

作者单位:318050 台州,路桥广济医院烧伤科(唐新辉现在广州市芳村区人民医院整形美容科,510370)