

2 詹剑华,李光金,李国辉,等. CD3AK 细胞提高烧伤患者细胞免疫功能的研 究. 中华烧伤杂志,2001,17:159-162.

3 苗明三,主编. 实验动物和动物实验技术. 北京:中国中医药出版社,1997. 335.

4 陈光星,刘清平,黄青春,等. 通痹灵对于 IL-2 及其受体 α 链影响的体内外研究. 上海免疫学杂志,2003,23:184-186,189.

5 Han TH, Lee SY, Kwon JE, et al. The limited immunomodulatory effects of escharectomy on the kinetics of endotoxin, cytokines, and adhesion molecules in major burns. Mediators Inflamm,2004,13:241-

246.

6 Jordan S. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. Microb Infect,2002,4:1545-1558.

7 程晋,田增爵. SLE 患者 AMLR 与 T 细胞 Ia 抗原的改变及意义. 免疫学杂志,1994,10:37-39.

(收稿日期:2005-09-30)

(本文编辑:张红)

转化生长因子 β_1 II 型受体 CA 重复序列基因在人正常皮肤和瘢痕疙瘩中的表达

樊树强 蔡景龙 安纲

瘢痕疙瘩的生物学特性类似于肿瘤。最近研究表明,转化生长因子 β_1 II 型受体 (transforming growth factor- β_1 receptor II, T β R II) 是一种新的抑癌基因,而肿瘤细胞中最常见的是该基因表达异常^[1]。本研究主要是通过改变 T β R II 基因突变的热点 CA 重复序列,以检测瘢痕疙瘩成纤维细胞是否存在与肿瘤细胞同样的基因突变。

一、资料与方法

1. 主要试剂和仪器:蛋白酶 K(上海博亚生物技术有限公司),Taq 酶和琼脂糖(北京拜尔迪生物技术公司),PCR 仪(美国 MJ Research 公司,PTC-200 型),ABI 3730 型自动测序仪(美国应用生物系统公司)。

2. 标本收集及细胞培养:瘢痕疙瘩组织标本取自笔者单位需行整形术的患者 20 例,其中男 8 例、女 12 例,年龄 5~62 岁[(28±10)岁],瘢痕形成时间为 3~26 年[(8±4)年]。所选试验对象均符合病程超过 2 年、病变超过损伤范围并具有持续生长及痛痒等临床特征,已经病理学科确诊。正常皮肤组织标本取自手术剩余皮肤,分别为乳房缩小术胸前壁 3 例、重睑术上睑 3 例、包皮环切术包皮 1 例及腹壁整形术腹壁 1 例,其中男 3 例、女 5 例,年龄 8~52 岁[(29±8)岁]。收集上述标本(患者均知情同意)进行常规成纤维细胞培养。

3. 引物的设计与合成:按常规酚-三氯甲烷法提取成纤维细胞 DNA,根据 GeneBank 上人类 T β R II cDNA 序列^[2],在 CA 重复序列(1 931~1 936)位点两侧使用 Premier 3.0 软件设计上游引物:5'-TTTGGATCTCTTTCCCGCTA-3',下游引物:5'-CTCCAGCTCACTGAAGCGTT-3',扩增产物长度为 120.0 bp。

4. PCR 及单链构象多态性(SSCP)分析:PCR 体系:模板 DNA(100 g/L)2 μ l,PCR 缓冲液 5 μ l, Mg²⁺ (25 mmol/L)1.5 μ l,三磷酸脱氧核(糖核)苷(dNTP,10 mmol/L)2 μ l,引物浓度均为 30 μ mol/L,体积 0.83 μ l,Taq 酶(5 U/ μ l)0.4 μ l,加双蒸水至反应体积为 50 μ l,加样过程中置于冰块上以防止 Taq 酶变性。离心后放入 PCR 仪。将获得的产物进行 10 g/L

琼脂糖凝胶水平电泳和 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。凝胶银盐液染色,行 SSCP 分析后采用捷达 JD801 专业数码凝胶成像分析系统 3.3(江苏省捷达软件工程有限公司)判断有无基因突变。条带位置泳动异常者为 SSCP 阳性。

5. PCR 产物的测序:将 PCR 产物纯化后,在 ABI 3730 型自动测序仪上测序,鉴定基因突变位点和类型,并采用 Chromas 软件(上海英骏生物技术有限公司)查看所得基因图谱。

二、结果

1. 瘢痕疙瘩组织标本 CA 重复序列位点中有 1 块 SSCP 阳性,表现为泳动速度快、迁移率高(第 5 泳道),DNA 大小和迁移率分别为 118.6 bp、61%;其他瘢痕疙瘩 DNA 大小为 119.8、120.0 bp,迁移率均为 62%。正常皮肤组织标本 DNA 为 120.0 bp,其迁移率为 62%。见图 1。



图 1 SSCP 分析显示瘢痕疙瘩组织标本 CA 重复序列位点有 1 块泳动异常。marker 为 pUC19;1,2,4,5,6 泳道为瘢痕疙瘩;3 泳道为正常皮肤

2. 瘢痕疙瘩和正常皮肤组织标本成纤维细胞的 T β R II CA 重复序列基因测序未检出异常,测序图谱与 GeneBank 同一位点的基因组序列一致。见图 2,3。



图 2 正常皮肤组织 CA 重复序列与 GeneBank 中登记的序列一致



图 3 瘢痕疙瘩组织 CA 重复序列未见异常,与正常皮肤组织一致

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271348)

作者单位:250033 济南,山东大学医学院附属第二医院美容整形烧伤中心

通信(讯)作者:蔡景龙, Email: caijinglong@126.com, 电话: 0531-85875079

