

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  $\alpha$  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 $\beta_1$ 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  $\beta_1$  II 型受体 (transforming growth factor- $\beta_1$  receptor II, T $\beta$ 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<sup>[1]</sup>。本研究主要是通过改变 T $\beta$ 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 $\beta$ R II cDNA 序列<sup>[2]</sup>,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'-TTTGGATCTCTTCCCGCTA-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  $\mu$ l,PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)1.5  $\mu$ l,三磷酸脱氧核(糖核)苷(dNTP,10 mmol/L)2  $\mu$ l,引物浓度均为 30  $\mu$ mol/L,体积 0.83  $\mu$ l,Taq 酶(5 U/ $\mu$ l)0.4  $\mu$ l,加双蒸水至反应体积为 50  $\mu$ 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 $\beta$ 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

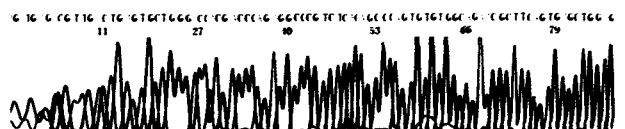


图 3 瘢痕疙瘩组织 CA 重复序列未见异常,与正常皮肤组织一致

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

三、讨论

瘢痕疙瘩的发生、发展受多种细胞因子的调节,其中对转化生长因子 β(TGF-β)研究得比较多而深入。它是促进瘢痕增生作用最强的多肽生长因子,其中 TGF-β<sub>1</sub> 和 TGF-β<sub>2</sub> 具有促进瘢痕形成的作用。研究表明,TGF-β<sub>1</sub> 及其 TβR II 与组织创伤愈合和瘢痕形成关系密切<sup>[3-5]</sup>,TβR II 的变化显著地影响着 TGF-β 的功能<sup>[6,7]</sup>。为此,TGF-β<sub>1</sub> 及 TβR II 成为人们研究瘢痕疙瘩的热点。

现已证实, TβR II 存在于人类细胞膜表面,是与 TGF-β<sub>1</sub> 有高度亲和力的特异性蛋白,一种新的抑癌基因<sup>[1]</sup>。TβR II 表达常发生在肿瘤早期,主要表现为它的基因改变及功能失活。众多学者认为,TβR II 基因的外显子中 CA 重复序列是基因突变的高发位置,在结肠癌细胞中的发生率较高<sup>[8]</sup>。最常见的突变是,TβR II 基因 1 931 ~ 1 936 位点核苷酸的 CA 重复序列在 6 个碱基 GTGTGT 之间插入了一个 GT 序列,导致了移码突变,从而导致由 29 个氨基酸组成的强碱性 C 末端取代了 33 个氨基酸组成的弱酸性 C 末端,这表明 TβR II 基因突变造成了蛋白表达产物 C 末端序列的改变,影响其在细胞膜表面的表达。

本研究通过 SSCP 分析观察到,瘢痕疙瘩组织 TβR II 的 CA 重复序列突变热点较正常皮肤组织缺失约 1.0 bp,而基因测序并未检出异常,提示瘢痕疙瘩成纤维细胞 TβR II 在 CA 重复序列上可能存在肿瘤组织样的基因移码突变。有待

扩大样本作进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 1 Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell, 2000, 103: 295 - 309.
- 2 邹璠. 转化生长因子 β<sub>1</sub> 及其 II 型受体在结直肠癌中的表达. 实用肿瘤学杂志, 2004, 18: 255 - 258.
- 3 Loeys BL, Chen J, Neptune ER, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFβR I or TGFβR II. Nat Genet, 2005, 37: 275 - 281.
- 4 Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH, et al. International clinical recommendations on scar management. Plast Reconstr Surg, 2002, 110: 560 - 571.
- 5 王丹茹, 刘伟, 张涤生. Smad 与创伤愈合. 中华整形外科杂志, 2004, 20: 149 - 152.
- 6 吕洛, 陈玉林, 章庆国. 增生性瘢痕转化生长因子 β 及其受体的分布及表达. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 30 - 33.
- 7 全玉竹, 庄洪兴, 章庆国, 等. 转化生长因子 β R II 抗体对皮肤成纤维细胞抑制作用的研究. 中华整形外科杂志, 2003, 19: 377 - 379.
- 8 Li F, Cao Y, Townsend CM Jr, et al. TGF-beta signaling in colon cancer cells. World J Surg, 2005, 29: 306 - 311.

( 收稿日期: 2005 - 10 - 19 )

( 本文编辑: 莫愚 )

· 技术与方法 ·

改良人脱细胞真皮基质对成纤维细胞

I 型前胶原 mRNA 表达的影响

孙红 车鹏程 戚孟春

主要试剂和仪器: hoechst 33258 购自美国 Sigma 公司, 鼠抗人波形蛋白抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, β 肌动蛋白、I 型前胶原引物购自上海博亚生物技术有限公司。IX71 型荧光显微镜购自日本 Olympus 公司, PCR 扩增仪购自德国 Eppendorf 公司。

人脱细胞真皮基质 (ADM) 的制备与成纤维细胞 (Fb) 的培养: 选取捐献的健康人尸体全厚皮肤, 采用高渗氯化钠溶液-NaOH 消蚀法<sup>[1]</sup> 制备改良的人 ADM 备用。另取手术剩余的人正常皮肤 (患者知情同意), 采用胶原酶消化培养法, 以 2.5 g/L dispase II 于 4 ℃ 消化 8 ~ 10 h, 分离真皮, 1 g/L I 型胶原酶消化、过滤、离心、接种, 于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。取 2 ~ 3 代 Fb 制成悬液 (含量为 2 × 10<sup>6</sup>/ml), 然后将 0.5 ml 细胞悬液缓慢滴加于预湿的 ADM 上; 另将部

分 Fb 接种于 6 孔培养板作对照, 一并置于培养箱培养 4 h 后, 缓慢补加培养液 1.5 ml, 每 2 ~ 3 天换液 1 次。

检测指标: (1) 培养 7 d 时, 采用 hoechst 33258 染色, 于荧光显微镜下观察接种于两种不同材料上的 Fb 细胞核的形态学变化。(2) 培养 7 d 时, 将 ADM 制成组织切片。取部分切片用生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (SP) 染色, 加入鼠抗人波形蛋白抗体工作液于 4 ℃ 过夜, 以 1: 25 稀释 FITC 标记的抗小鼠 IgG, 37 ℃ 下放置 30 min, 并设阳性及阴性对照; 另取部分切片于透射电镜 (荷兰 Philips 公司) 下观察。(3) 采用 Trizol 分离试剂提取两种 Fb 的总 RNA。RT-PCR 体系与条件同常规, 应用 PCR 扩增仪扩增。内参照 β 肌动蛋白的上游引物为 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 下游引物为 5'-ATCATGTTTGTAGACCTTCAACA-3'; I 型前胶原上游引物为 5'-CCCCCTCCCAGCCACAAAG-3', 下游引物为 5'-TCT-TGGTCGGTGGGTGACTCT-3'。PCR 完成后, 取 5 μl 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 将电泳条带用凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司) 成像, 以 Quantity One 分析软件对其作半定量分析, 以 I 型前胶原与内参照 β 肌动蛋白的吸光度 (A) 值比值表示 I 型前胶原 mRNA 的相对表达量, 均重复测定 5

作者单位: 063000 河北唐山, 华北煤炭医学院病理学教研室 (孙红), 口腔医学系 (戚孟春); 华北煤炭医学院附属医院整形外科 (车鹏程)