

## · 短篇论著 ·

## 磷酸化 Smad2 和 Smad7 在增生性瘢痕成纤维细胞中的表达

潘姝 利天增 李叶扬 张涛 梁岷

Smads 蛋白家族是近年来发现的转化生长因子(TGF) $\beta_1$ 受体下游信号蛋白,也是目前公认的介导 TGF- $\beta_1$  胞内反应的主要通路。笔者通过检测体外培养的增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)和正常皮肤成纤维细胞(NSF)中磷酸化 Smad2 和抑制性信号介导子 Smad7 的表达差异,拟探讨二者在增生性瘢痕发病机制中的作用。

## 一、材料与方

1. 细胞来源及分组:因增生性瘢痕住院进行整形手术的患者共 6 例,其中男 3 例、女 3 例,年龄 1~35 岁,瘢痕增生时间 3~6 个月。HSF 组标本取自上述患者的瘢痕,部位包括上肢 2 例、面部 4 例;NSF 组标本为相同患者手术后的残余正常皮肤,均经患者知情同意。两种标本分别采用组织块培养法,取第 2~4 代的成纤维细胞进行实验。

2. 磷酸化 Smad2 和 Smad7 的定位:分别取两种细胞种植于载玻片,参照链霉亲和素-生物素复合物(SABC)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)说明书进行实验,以磷酸盐缓冲液代替一抗,设立相应的阴性对照。

3. Smad2 和 Smad7 mRNA 的表达:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法。Smad2(429 bp):上游引物:5'-ATGC-CACGGTAGAAATGAC-3';下游引物:5'-TTGAGCAACGCACT-GAAGG-3'。Smad7(433 bp):上游引物:5'-AGCAGAAATC-CAAGCACC-3';下游引物:5'-CTGGCAGGAAGGGAATAAG-3'。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD)引物(上海生工生物工程有限公司)为内参照,用 IBAS2.0 图像分析系统(德国 Kontron 公司)分析电泳结果,用目的基因与 GAPD 的积分吸光度(A)值之比表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

4. 磷酸化 Smad2 和 Smad7 蛋白表达:采用蛋白质印迹(Western blot)法。常规提取蛋白,以考马斯亮蓝法测定提取蛋白浓度。经 100 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,分别加入 1:1 000 稀释的磷酸化 Smad2 和 Smad7 多克隆抗体,4℃ 过夜。加入 1:2 000 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗,室温作用 1 h,常规方法显影、定影。杂交信号在图像分析系统中进行吸光度(A)值分析。

5. 统计学处理:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,进行成组设计的 *t* 检验。

## 二、结果

1. 磷酸化 Smad2 和 Smad7 定位:磷酸化 Smad2 在 HSF 组位于细胞核,在 NSF 组则主要位于细胞质中。Smad7 在 NSF 组和 HSF 组均位于细胞核内。

2. Smad2 和 Smad7 mRNA 的表达:RT-PCR 产物电泳结果显示,两组细胞在 429、433 及 300 bp 位置上均出现特异性条带,与预期扩增片段的长度相符。提示为特异性 Smad2、

Smad7 与 GAPD cDNA。两组 Smad2、Smad7 mRNA 结果比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同细胞 Smad2 和 Smad7 mRNA 的表达(A 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	Smad2	Smad7
HSF 组	6	1.64 ± 0.16	0.27 ± 0.08
NSF 组	6	1.58 ± 0.18	0.31 ± 0.07

3. 磷酸化 Smad2 和 Smad7 蛋白表达:只能检测到少量 Smad2 和 Smad7,前者 HSF 组含量高于 NSF 组( $P < 0.05$ ),后者两组含量接近( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 不同细胞磷酸化 Smad2 和 Smad7 蛋白的表达(A 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	磷酸化 Smad2	Smad7
HSF 组	6	4.4 ± 2.1	2.2 ± 0.4
NSF 组	6	2.8 ± 1.6*	2.1 ± 0.5

注:与 HSF 组比较,\*  $P < 0.05$

## 三、讨论

增生性瘢痕是以成纤维细胞为主的细胞成分过度增殖和以胶原为主的细胞外基质过度沉积的皮肤纤维化疾病。TGF- $\beta_1$  是与瘢痕形成最密切的细胞因子。Smads 是 TGF- $\beta_1$  的下游信号蛋白,Smad2 和 Smad7 分别起正性和负性调节作用。已知在增生性瘢痕中 TGF- $\beta$  I、II 型受体明显增加<sup>[1]</sup>。随着胎儿生长发育,Smad2 基因表达水平逐渐升高,显示 Smad2 基因低表达可能是胎龄较小的胎儿皮肤无瘢痕愈合的机制之一<sup>[2]</sup>。因此我们推测,Smad2 信号通路在细胞内异常持续地激活和(或)Smad7 抑制作用逐渐减弱,是增生性瘢痕形成的原因。

Smads 在细胞核内的正确定位是信号转导的前提。NSF 组只有少量磷酸化 Smad2 表达且位于细胞质中;HSF 组磷酸化 Smad2 表达量增多且位于细胞核中,表明其可持续激活靶基因转录,导致增生性瘢痕的形成。Takagawa 等<sup>[3]</sup>用博来霉素诱导硬皮病动物模型,其成纤维细胞中 Smad2 和 Smad3 被持续激活;Mori 等<sup>[4]</sup>在对硬皮病及 NSF 的研究中也观察到此现象。Smad2 的持续激活,可能在启动和促进组织纤维化的过程中发挥重要作用。但本次研究结果显示,Smad2 mRNA 的水平在 HSF 组及 NSF 组中差异无统计学意义,表明体外培养的 HSF 中不存在 Smad2 的转录增多现象,磷酸化 Smad2 水平增高可能不是通过增加 Smad2 mRNA 的转录水平实现的。

Smad7 的产生缺陷,可导致扩大或持续的 TGF- $\beta_1$  反应。曾有作者用反义核酸阻断 NSF 中 Smad7 的作用,使 TGF- $\beta_1$  刺激胶原基因转录增加<sup>[5]</sup>。本实验中 Smad7 mRNA 和蛋白表达的水平及定位,两组细胞差异无统计学意义,提示在 HSF 组中不存在 Smad7 的表达缺陷,但其 Smad7 功能是否正

作者单位:510220 广州市红十字会医院烧伤科(潘姝、李叶扬、张涛、梁岷);中山大学附属第一医院烧伤科(利天增)

常尚需进一步研究。

参 考 文 献

1 Schmid P, Itin P, Cherry G, et al. Enhanced expression of transforming growth factor- $\beta$  type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol*, 1998, 152:485 - 493.

2 陈伟, 付小兵, 葛世丽, 等. 胎儿和出生后机体皮肤内转化生长因子- $\beta_1$  基因表达的变化. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 206 - 209.

3 Takagawa S, Lakos G, Mori Y, et al. Sustained activation of fibroblast

transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol*, 2003, 121:41 - 50.

4 Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblast. *Arthritis Rheum*, 2003, 48:1964 - 1978.

5 陈颖伟, 李定国. Smad7 和组织器官纤维化. *上海第二医科大学学报*, 2005, 25:131 - 133, 160.

(收稿日期:2005-09-09)

(本文编辑:王旭)

· 技术与方法 ·

# 分析仪测定大面积烧伤患者嗜碱粒细胞假性升高原因分析

王丕明 许振宗 毛庆学 李云 郝莹

五分类全自动血细胞分析仪的广泛应用,给烧伤救治工作带来了许多方便,但有时在分析大面积烧伤患者白细胞分类时,发生与实际分类不相吻合的情况,在分析报告上往往提示嗜碱粒细胞分类假性升高。由于大面积烧伤患者皮肤屏障受损严重,极易发生重度感染,白细胞分类在患者的病情判断、治疗过程中非常重要。为探明分析仪测定值出现误差的原因,笔者作了相关调查,现报告如下。

患者资料:收集本院烧伤住院患者 100 例,其中男 57 例、女 43 例,年龄 2 ~ 68 岁。将浅 II、深 II 度烧伤面积之和 < 30% 或 III 度面积 < 10% TBSA 的患者划分为小面积烧伤,共 42 例;浅 II、深 II 度烧伤面积之和  $\geq$  30% 或 III 度烧伤面积  $\geq$  10% TBSA,且合并休克、吸入性损伤、并发症或有较重复合伤的患者划分为大面积烧伤,共 58 例。

仪器与检测方法:晨 6:00 采集患者空腹静脉血 2 ml,乙二胺四乙酸二钾抗凝。将 MEK-7222 型全自动血细胞分析仪(日本光电公司)进行严格校准,2 h 内行血常规检查;同时用显微镜目测计数,并推血涂片,行瑞氏染色和过氧化物酶染色,方法参照《全国临床检验操作规程》第 2 版。用这两种染色法进行白细胞分类和区分中性粒细胞与嗜碱粒细胞。所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,两种方法之间行 *t* 检验。

检测结果:两种检测方法比较,小面积烧伤患者白细胞

分类各项数据差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1;大面积烧伤患者白细胞分类中除白细胞计数值差异无统计学意义( $P > 0.05$ )外,中性粒细胞和嗜碱粒细胞计数及比例差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 2。

讨论 嗜碱粒细胞的细胞质中存在大小不等的嗜碱性颗粒。五分类血细胞分析仪根据粒细胞形态、内部结构、核质比、胞内颗粒大小及紧密度等特征,通过体积(volume)、导电性(conductivity)、光散射(scatter)技术而达到分类目的。大面积烧伤患者血液中中性粒细胞发生中毒性改变,细胞质内出现中毒颗粒,其大小不等、分布不均、染色较深,外观与嗜碱性颗粒相似,同时由于核分叶减少、核固缩、染色质呈圆块状、核质比失调,令仪器不能正确区分中性粒细胞和嗜碱粒细胞,误将中性粒细胞计为嗜碱粒细胞,从而造成嗜碱粒细胞假性升高。分析仪法具有检测快速、方便的特点,但对一些大面积烧伤患者进行白细胞分类时结果不够准确;目测计数法比较繁琐,但比较准确,排除了仪器对颗粒辨识不清而误将中性粒细胞内的中毒颗粒计为嗜碱性颗粒的情况。因此对于大面积烧伤患者,在采用仪器法对其进行白细胞分析的同时,应做瑞氏染色进行手工分类,以免给临床医师提供错误信息,影响患者治疗。

表 1 两种方法检测小面积烧伤患者白细胞分类结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

检测方法	标本数 (个)	白细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞比例	嗜碱粒细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	嗜碱粒细胞比例
分析仪法	42	11 $\pm$ 6	9 $\pm$ 5	0.81 $\pm$ 0.08	0.70 $\pm$ 0.20	0.062 $\pm$ 0.008
显微镜目测计数法	42	12 $\pm$ 7	9 $\pm$ 6	0.78 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.30	0.066 $\pm$ 0.009

表 2 两种方法检测大面积烧伤患者白细胞分类结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

检测方法	标本数 (个)	白细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞比例	嗜碱粒细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	嗜碱粒细胞比例
分析仪法	58	25 $\pm$ 9	15 $\pm$ 5	0.60 $\pm$ 0.08	8.100 $\pm$ 2.800	0.310 0 $\pm$ 0.040 0
显微镜目测计数法	58	25 $\pm$ 8	22 $\pm$ 8*	0.92 $\pm$ 0.08*	0.800 $\pm$ 0.020*	0.032 0 $\pm$ 0.000 5*

注:与分析仪法比较, \*  $P < 0.01$

(收稿日期:2005-09-13)

(本文编辑:赵敏)

作者单位:250014 济南,武装警察部队山东省总队医院检验科