

· 瘢痕的形成与防治 ·

核心蛋白多糖及其 mRNA 在正常皮肤和增生性瘢痕组织中的表达

张志 刘琰 章雄 许伟石

【摘要】 目的 检测不同时期增生性瘢痕组织中核心蛋白多糖的含量及其 mRNA 的表达水平,探讨核心蛋白多糖含量的变化与其合成的关系。方法 取 10 例手术剩余的正常皮肤、包皮和 22 例手术切除的瘢痕组织作标本,采用免疫组织化学和蛋白免疫印迹法检测核心蛋白多糖在标本组织中的含量及其分布,用原位杂交技术检测其 mRNA 表达水平。结果 正常皮肤的真皮中核心蛋白多糖含量丰富,mRNA 呈低表达。增生性瘢痕组织中核心蛋白多糖含量在 6 个月内(18 403 ± 7193)极少,7~12 个月(42 937 ± 9662)逐渐增加,13~36 个月(86 231 ± 16 285)持续增加,36 个月以后(130 943 ± 17 458)其含量与正常皮肤比较,差异无显著性意义($P > 0.05$);其 mRNA 水平在 6 个月内低于正常,7~12 个月呈高表达,13~36 个月呈持续高表达,36 个月后逐渐下降至正常皮肤表达水平。结论 增生性瘢痕组织中核心蛋白多糖减少的主要原因是其合成减少,核心蛋白多糖的增加与瘢痕组织稳定的时间相一致,提示核心蛋白多糖的延迟出现可能与增生性瘢痕的形成有关。

【关键词】 皮肤; 瘢痕; RNA,信使; 核心蛋白多糖

The content of decorin and its mRNA expression in normal human skin and hyperplastic scars ZHANG Zhi, LIU Yan, ZHANG Xiong, XU Wei-shi. Burn Institute of Shanghai, Rui Jin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the content of decorin and its mRNA expression in normal human skin and hyperplastic scars at different stages, so as to explore the relationship between the change of decorin and its synthesis. Methods Scar tissue samples from 22 patients undergoing scar excision and 10 specimens of normal skin or prepuce were obtained. The content and distribution of decorin in the tissue samples were determined with immunohistochemistry and Western blot, and the expression of decorin mRNA was detected by in situ hybridization. Results The content of decorin was rich in the normal skin dermis with lower expression of the mRNA. In contrast, the decorin content was scarce in hyperplastic scars (HS) within 6 months, but increased gradually beginning from 7 to 12 months, and increased continuously for 13 to 36 months. There was no difference between the decorin content in normal skin and that in HS after 36 months ($P > 0.05$). Furthermore, the mRNA expression level in HS tissue was lower than that in normal skin within 6 months, but increased from 7 to 12 months. The mRNA expression continuously increased during 13 to 36 months and then returned to the level similar to that in normal skin thereafter. Conclusion The decrease of decorin in hyperplastic scar was resulted primarily from reduced synthesis. The increase in decorin level coincided with the time of scar tissue stabilization, which implied that the delayed appearance was correlated with the formation of HS.

【Key words】 Skin; Scar; RNA, messenger; Decorin

瘢痕是人体皮肤烧(创)伤愈合后出现的一种特有的病理现象,缺乏弹性的瘢痕组织常出现挛缩,严重限制了关节和肢体的活动,并影响患者的外观。在增生性瘢痕形成过程中,创面过度的炎症反应和纤维活性增加打破了细胞外基质成分间的平衡。蛋白多糖的成分改变或代谢异常与瘢痕形成和纤维化的病理过程有密切关系^[1]。核心蛋白多糖(decorin)是细胞外基质中一种富含亮氨酸的小分子蛋白多糖,在正常皮肤的真皮中含量最丰富,而在增生性瘢痕组织中含量极低或无,在成熟瘢痕组织中其含

量与正常真皮组织相当^[2]。阐明核心蛋白多糖与增生性瘢痕的关系,对认识增生性瘢痕形成的机制有重要意义。本研究通过蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫组织化学的方法分析不同时期瘢痕组织中核心蛋白多糖含量的变化,并用原位杂交技术检测其 mRNA 表达水平,探讨核心蛋白多糖含量变化与其合成的关系。

资料与方法

1. 标本来源:正常皮肤组织 10 例,来源于烧伤患者整形术中剩余的正常皮肤和包皮;增生性瘢痕组织 22 例,取自手术切除的瘢痕组织。瘢痕形成时

作者单位:200025 上海第二医科大学瑞金医院烧伤科

间: ≤6 个月 6 例、7~12 个月 5 例、13~36 个月 5 例、>36 个月 6 例。将各标本冷冻保存备用。

2. Western blot 检测: 冷冻组织标本经三去污裂解液裂解后, 12 000 × g 离心 30 min, 弃沉淀, 上清液采用 Bradford 法测定总蛋白含量。行质量浓度 6.0% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 加样蛋白含量为 50 μg。电转移转印迹至硝酸纤维膜, 经体积分数 1.0% 封闭缓冲液室温封闭 1 h 后, 加入鼠抗人核心蛋白多糖一抗, 浓度为 1 μg/ml, 置室温 1 h。三乙醇胺-缓冲盐溶液(TBS)漂洗, 加入 1:500 稀释的羊抗鼠 IgG-碱性磷酸酶二抗, 室温放置 1 h, TBS 漂洗, 氮蓝四唑/5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(华美生物工程公司)底物显色 30 min。采用 Gelworks 3.01 版图像分析软件进行分析, 以相应蛋白条带的平均吸光度(A)值表示核心蛋白多糖的相对含量。

3. 免疫组织化学检测: 冷冻切片用丙酮固定 30 min, 用体积分数 3.0% 双氧水室温孵育 10 min 消除内源性过氧化物酶。正常羊血清阻断非特异性抗体结合位点(室温 10 min), 加 1:200 稀释的鼠抗人核心蛋白多糖一抗(美国 R&D 公司), 4℃ 孵育 18 h。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 滴加稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(丹麦 DAKO 公司), 37℃ 孵育 30 min。PBS 冲洗, 用二氨基联苯胺(DAB)显色和苏木素复染。

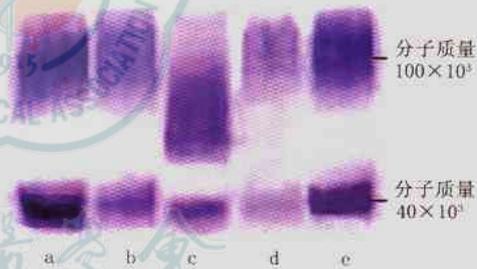
4. 原位杂交分析: 试剂盒购自武汉博士德公司。探针经地高辛标记, 针对人核心蛋白多糖靶基因的 mRNA 序列为: 5'-ATGGAAATCAGACAGTACCTG-GCACAGTGG-3', 5'-AAGTTGAGACTGTTGCTGAAA-TTGCAAGAG-3', 5'-CCTTCTAGACTTCAGACCACA-GACAACCTG-3'。冷冻切片用质量浓度 4.0% 多聚甲醛(含质量浓度 0.1% 的焦碳酸二乙酯(DEPC))固定 30 min, 体积分数 0.5% 双氧水/甲醇室温孵育 30 min 消除内源性过氧化物酶, 质量浓度 3.0% 胃蛋白酶室温消化 1 min, 暴露 mRNA 核酸片段, DEPC 水清洗。用柠檬酸钠缓冲液平衡 15 min 后, 加入预杂交液 40℃ 孵育 2 h, 随后加入含有探针的杂交液, 盖上原位杂交专用盖玻片, 40℃ 杂交 20 h。充分清

洗后, 依次滴加: 封闭液 37℃ 30 min、生物素化鼠抗地高辛 37℃ 60 min、链霉亲和素 37℃ 20 min、生物素化过氧化物酶 37℃ 20 min, TBS 清洗, DAB 显色, 苏木素复染。经 Image-Pro Plus 软件分析, 阳性细胞率 = 阳性细胞数 ÷ 成纤维细胞总数 × 100%。

5. 统计学处理: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用方差分析。

结 果

1. Western blot 检测均结果: 正常皮肤和增生性瘢痕组织中核心蛋白多糖均有 2 条带, 一条在分子质量 40×10^3 处, 与其核心蛋白分子质量一致; 另一条在分子质量 100×10^3 处, 与完整的核心蛋白多糖分子质量一致。7~12 个月瘢痕中核心蛋白多糖的含量($42\ 937 \pm 9662$)比 ≤6 个月的含量($18\ 403 \pm 7193$)高($P < 0.05$); 13~36 个月瘢痕中的核心蛋白多糖含量($86\ 231 \pm 16\ 285$)比 7~12 个月的高($P < 0.05$); >36 个月瘢痕的核心蛋白多糖含量($130\ 943 \pm 17\ 458$)明显高于 13~36 个月的瘢痕($P < 0.01$), 但与正常皮肤的含量($143\ 532 \pm 18\ 737$)比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。见图 1。



注: a, b, c, d, e 依次为正常皮肤和 12, 31, 66 个月的瘢痕
图 1 正常皮肤和不同时期瘢痕中核心蛋白多糖的 Western blot 检测结果

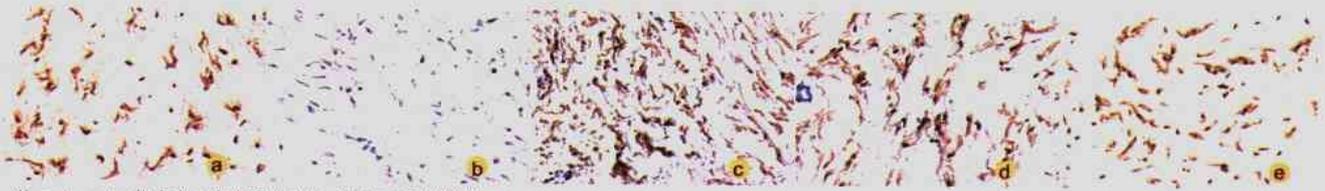
Fig 1 Two strips of decorin in the normal human skin and scar at different stages

2. 免疫组织化学检测结果: 正常皮肤中, 核心蛋白多糖在真皮层着色强, 表皮层未见着色(图 2a); ≤6 个月的瘢痕染色很淡, 分布于真皮深层(图 2b); 7~12 个月的瘢痕染色淡, 真皮浅层亦着色(图 2c); 13~36 个月的瘢痕染色稍强(图 2d); >36 个月的瘢痕染色增强, 与正常皮肤相似(图 2e)。



注: a, b, c, d, e 依次为正常皮肤和 3, 12, 31, 66 个月的瘢痕
图 2 正常皮肤和不同时期瘢痕中核心蛋白多糖的分布 DAB × 400

Fig 2 Distribution of decorin in normal human skin and scar at different stages DAB × 400



注: a, b, c, d, e 依次为正常皮肤和 3, 12, 31, 66 个月的瘢痕

图 3 正常皮肤和不同时期瘢痕中核心蛋白多糖的 mRNA 表达 DAB × 400

Fig 3 Decorin mRNA expression in normal human skin and scar at different stages DAB × 400

3. 原位杂交结果: 核心蛋白多糖的 mRNA 表达见于真皮层, 表皮层没有阳性细胞; ≤ 6 个月的瘢痕中阳性细胞极少, 着色较淡; 7 ~ 12 个月瘢痕中阳性表达细胞数显著增加; 13 ~ 36 个月瘢痕中持续高表达; > 36 个月的瘢痕阳性表达细胞数明显减少。≤ 6 个月的瘢痕组织中阳性细胞率为 (5.70 ± 5.19)%, 低于正常皮肤 (10.80 ± 4.03)% ($P < 0.05$); 7 ~ 12 个月为 (25.07 ± 9.15)%, 13 ~ 36 个月为 (29.68 ± 12.47)%, 均明显高于正常皮肤和 ≤ 6 个月瘢痕组织中的阳性细胞率 ($P < 0.01$); 但 7 ~ 12 个月与 13 ~ 36 个月间差异无显著性意义 ($P > 0.05$, $P = 0.52$); > 36 个月的瘢痕组织中阳性细胞率为 (12.58 ± 4.49)%, 低于 13 ~ 36 个月的瘢痕组织 ($P < 0.05$), 但与正常皮肤比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$, $P = 0.42$)。见图 3。

讨 论

本研究采用 Western blot 方法检测不同标本中核心蛋白多糖的含量, 结果较准确、可靠。其结果表明, 核心蛋白多糖在正常真皮组织中分布广泛且含量丰富, 增生性瘢痕早期核心蛋白多糖含量减少, 随着时间的推移, 瘢痕经历增生、稳定和成熟的过程, 核心蛋白多糖含量逐渐增加, 最终恢复到正常皮肤水平。

Scott 等^[3]报道, 培养的瘢痕成纤维细胞核心蛋白多糖的 mRNA 表达水平低于正常皮肤成纤维细胞。本研究中, 瘢痕组织核心蛋白多糖的 mRNA 水平在 ≤ 6 个月呈低表达, 7 ~ 12 个月表达量显著增高, 一直持续到瘢痕成熟, 以后逐渐下降到正常皮肤组织表达水平。由此说明, 增生性瘢痕早期核心蛋白多糖的减少主要是其合成减少引起的。瘢痕增生 6 个月后其表达显著高于正常皮肤, 提示瘢痕成熟过程中需要核心蛋白多糖。在正常皮肤和 > 36 个月的成熟瘢痕中, 核心蛋白多糖染色强, 但仅有少量细胞表达 mRNA。提示成熟瘢痕对核心蛋白多糖的需求减少, 因而合成能力下降。有研究表明, 转化生

长因子 β_1 (TGF- β_1) 可在体外下调核心蛋白多糖的合成^[31]。≤ 6 个月的瘢痕核心蛋白多糖和 mRNA 表达水平低, 可能与创(烧)伤后局部产生的或循环中的 TGF- β_1 增加, 导致核心蛋白多糖基因在伤后“沉默”或延迟活化有关。

虽然根据目前的研究还不能判定核心蛋白多糖减少是瘢痕增生的结果还是原因, 但核心蛋白多糖已知的生物学活性强烈支持后者。核心蛋白多糖在调节胶原原纤维直径和侧链排列中对形成纤维和纤维束起关键作用, 剔除核心蛋白多糖基因的小鼠皮肤胶原原纤维厚薄不均、外形不规则并呈随意排列^[4], 其特征与增生性瘢痕中的胶原原纤维一致。核心蛋白多糖可结合 TGF- β_1 并中和其部分活性, 是 TGF- β_1 的天然拮抗剂^[5]。皮肤缺损深及真皮深层时会造成核心蛋白多糖丢失, 而在愈合过程中核心蛋白多糖合成减少将导致其在修复组织中的含量不足, 这两者可能是瘢痕增生的重要因素。核心蛋白多糖是天然蛋白质, 无副作用, 可在创面局部应用, 或上调其基因表达如基因转染, 或添加到组织工程皮肤支架中, 在防治增生性瘢痕中可能有一定的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Molecular and cellular aspects of fibrosis following thermal injury. *Hand Clin*, 2000, 16:271-287.
- 2 Sayani K, Dodd CM, Nedelec B, et al. Delayed appearance of decorin in healing burn scars. *Histopathology*, 2000, 36:262-272.
- 3 Scott PG, Dodd CM, Ghahary A, et al. Fibroblasts from post-burn hyperplastic scar tissue synthesize less decorin than normal dermal fibroblasts. *Clin Sci*, 1998, 94:541-547.
- 4 Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, et al. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*, 1997, 136:729-743.
- 5 胡大海, 陈壁, 曹茂开, 等. 重组融合饰蛋白拮抗转化生长因子 β_1 刺激增生性瘢痕成纤维细胞增殖的作用. *中华创伤杂志*, 2001, 17:330-333.

(收稿日期: 2003-07-04)

(本文编辑: 苟学萍)