

• 论著 •

瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中胸腺素 $\beta 4$ 基因表达变化及其意义

聂芳菲 吴江群 秦泽莲

【摘要】 目的 观察病理性瘢痕中胸腺素 $\beta 4$ (TMSB4)mRNA 的表达水平,探讨其表达水平与病理性瘢痕形成的关系。**方法** 以组织块培养法于体外培养原代成纤维细胞。采用半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术,比较瘢痕疙瘩、增生性瘢痕和正常皮肤组织及其培养的 3 组成纤维细胞中 TMSB4 mRNA 表达水平的变化。**结果** 在上述 3 种组织中,TMSB4 mRNA 在瘢痕疙瘩中的表达量显著少于在增生性瘢痕和正常皮肤中的表达 (P 均 < 0.01),瘢痕疙瘩 TMSB4 mRNA 表达的平均值比增生性瘢痕减少 66.98%,比正常皮肤减少 62.48%。在上述 3 种组织培养的成纤维细胞中,TMSB4 mRNA 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达量显著少于增生性瘢痕,平均减少 27.13% ($P < 0.01$);比在正常皮肤成纤维细胞中的表达平均减少 16.07%,但差异无显著性。**结论** TMSB4 mRNA 在瘢痕疙瘩组织及其培养的成纤维细胞中的表达说明其与瘢痕疙瘩形成密切相关;TMSB4 mRNA 在瘢痕疙瘩中表达减少可能是瘢痕疙瘩发病的重要致病因素之一。

【关键词】 胸腺素 $\beta 4$; 瘢痕疙瘩; 增生性瘢痕; 半定量逆转录-聚合酶链反应

Expression of thymosin $\beta 4$ mRNA expression in keloid tissues and fibroblasts cultured from keloid and its significance NIE Fang-fei, WU Jiang-qun, QIN Ze-lian. Department of Plastic Surgery, Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China

Corresponding author: QIN Ze-lian (Email: deng_qin@263.net)

【Abstract】 Objective To investigate the relations between thymosin $\beta 4$ and pathologic scars by comparing the mRNA levels of thymosin $\beta 4$ in keloid, hypertrophic scar and normal skin. **Methods** The primary fibroblasts from the patients of keloid (KFB), hypertrophic scar (HFB) and normal skin (NFB, $n=7$) were cultured in vitro with tissue culture system. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to assess the thymosin $\beta 4$ mRNA levels in the tissues and fibroblasts obtained from the patients of three groups. **Results** The mRNA levels of thymosin $\beta 4$ in the keloid tissues were lower than those in the tissues of hypertrophic scar and normal skin (both, $P < 0.01$). The thymosin $\beta 4$ mRNA level in keloid group was lower by 66.98% than hypertrophic scar, and 62.48% than normal skin. In addition, the same significant change was found in the cultured KFB compared with HFB group (the mean value was lower by 27.13%), but no difference was found between KFB and NFB. **Conclusion** Expression of thymosin $\beta 4$ is closely related with keloid. The inadequate expression of thymosin $\beta 4$ may be one of the key factors for keloid formation.

【Key words】 thymosin $\beta 4$; keloid; hypertrophic scar; semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

瘢痕疙瘩和增生性瘢痕是创伤修复过程中组织过度纤维化修复的表现,它们被归类为病理性瘢痕。临床上把皮肤瘢痕增生性病变局限于伤区范围之内者称为增生性瘢痕;而增生性病变超出原伤区或没有明显诱因而发生的、有“肿瘤样生长”倾向、切除后容易复发的病变称为瘢痕疙瘩。瘢痕疙瘩的发病机制非常复杂,有文献报道,胸腺素 $\beta 4$ (thymosin $\beta 4$, TMSB4) 可能参与了血管发生、创伤愈合等机体的反应^[1]。此外,成纤维细胞是瘢痕组织中的主要细胞成分,它在瘢痕的发生、发展和转归中发挥重要作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870848,30170971);
国家教育部“211”工程资助项目

作者单位:100083 北京大学第三医院整形外科

责任作者:秦泽莲,研究员 (Email: deng_qin@263.net)

作者简介:聂芳菲(1980-),女(汉族),山西省晋城市人,硕士研究生,研究方向为创伤愈合。

用。为此,我们拟通过检测并比较病理性瘢痕和正常皮肤组织及其培养的成纤维细胞中 TMSB4 的表达水平,探讨其与病理性瘢痕形成的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源:所用皮肤组织主要来自北京大学第三医院整形外科门诊及病房手术患者,少数来自北京积水潭医院烧伤整形科患者。瘢痕标本为切除的病变组织,正常皮肤为美容手术弃用皮肤。所有取材均在患者知情同意情况下进行。

1.2 分组及组织处理:随机选择 13 例患者瘢痕疙瘩组织、7 例患者增生性瘢痕组织和 7 例患者正常皮肤组织,无菌操作下置于含体积分数为 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养液 (DMEM, 购自美国 Gibco-BRL 公司,内含 100 kU/L 的青霉素和 100 kU/L 的链霉素) 中,置于 4℃ 冰箱中保存,

12 h 内用组织块接种法进行原代培养。

1.3 成纤维细胞的培养:手术切取的皮肤组织在无菌条件下经漂洗、剪碎,培养于含 200 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液中,37 ℃ 下置体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,待其几乎长满成致密单层后,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,以 1:3 传代。实验所用成纤维细胞为第 3~6 代细胞,按取材组织来源分为瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFB)组、增生性瘢痕成纤维细胞(HFB)组和正常皮肤成纤维细胞(NFB)组。

1.4 RNA 提取

1.4.1 组织总 RNA 的提取:组织标本在离体后 10 min 内切成小块,液氮冻存,需长期保存者转移至 -80 ℃ 冰箱中。用 Trizol 试剂(购自 Invitrogen, USA)按照说明书操作要求提取总 RNA。加适量焦碳酸二乙酯(DEPC, Sigma, USA)水溶解,用紫外分光光度计检测波长 260 nm 及 280 nm 处的吸光度值(A₂₆₀和 A₂₈₀),计算 RNA 的浓度和纯度。RNA 含量(mg/L)=A₂₆₀×稀释倍数×40。甲醛变性胶电泳观察 18 S 和 28 S 条带确定提取 RNA 的质量。

1.4.2 成纤维细胞 RNA 的提取:取 3~6 代指数生长期的 KFB、HFB 和 NFB,用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化制成细胞悬液,细胞计数,调整细胞浓度为 5×10⁵/L。将细胞接种于直径 100 mm 的细胞培养皿中,每皿细胞接种量为 2×10⁶ 个,放入培养箱中培养过夜。倾去培养液,用冰预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞 2 次,在直径 100 mm 平皿内加入 8 ml Trizol 试剂,用加样器枪头反复吹打数次,室温放置 15 min,将液体分装到离心管中,加氯仿,以下步骤同组织总 RNA 的提取。

1.5 半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

1.5.1 RT 反应:在 0.2 ml 管内依次加入 5 倍的反转录缓冲液 5 μl, dNTP(10 mmol/L, 购于上海生工生物工程公司)2.5 μl, 寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸(Oligo dT, 0.5 μg/μl, 购于上海生工生物工程公司)2 μl, 核糖核酸酶抑制剂(Rnasin, 40 U/μl, Promega, USA)1 μl, 样本 RNA 2 μg, 禽成髓细胞瘤病毒(AMV)反转录酶(10 U/μl, Invitrogen, USA)3 μl, DEPC 水补足 25 μl 体系。混匀后,42 ℃ 反应 1 h, 然后置冰上备用。

1.5.2 PCR 反应的引物序列:TMSB4 的引物(自行设计,上海博亚公司合成,扩增片断 506 bp)为:上游引物 5'-GAC CAG ACT TCG CTC GTA C-3', 下游引物 5'-CTG CAT TAC AGC CTG CAG G-3'。β-actin 的引物(按文献[2]报道,由上

海生工公司合成,扩增片断 661 bp)为:上游引物 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3', 下游引物 5'-CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG-3'。

1.5.3 PCR 反应:在 0.2 ml 的 PCR 小管中依次加入无核酸酶的水 18.3 μl, 10×PCR 缓冲液 2.5 μl, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 1.5 μl, 10 mmol/L 的 TMSB4 或 β-actin 的上、下游引物各 1 μl, 10 mmol/L 的 dNTP 0.5 μl, 逆转录产物(cDNA)1 μl, TaqDNA 聚合酶(Clontech, USA)1 U, 混匀。按以下条件扩增:95 ℃ 变性 5 min; 94 ℃, 30 s; 58 ℃, 30 s; 72 ℃, 45 s; 30 个循环。再于 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物置 4 ℃ 保存待检。

1.5.4 PCR 产物定量:取 PCR 产物 8 μl, 在质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, DNA 分子质量标准(Marker)采用北京鼎国公司的 SD003(条带分别为 800、700、600、500、400、300 bp)。利用凝胶成像分析系统(BioRad, GelDoc 2000, USA)扫描各目标条带紫外光吸收量(Vol)。测算每个患者标本组织扩增的 TMSB4 电泳条带紫外光吸收量 Vol 值及其内参照(β-actin)条带(661 bp)的紫外光吸收量 Vol 值, 以其比值代表每个样本 TMSB4 的相对表达量, 统计实验各组 Vol 比值的平均值。

1.5.5 PCR 产物鉴定:PCR 产物每组各取 1 例送北京华大中生科技发展有限公司测序, 以证实扩增产物为 TMSB4 基因。

1.6 统计学处理:实验各组的 Vol 比值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用 SPSS 10.0 统计学专用分析软件进行统计学处理。均数差异的组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最适循环数的选择:只有当 PCR 正处于线性扩增范围内时, PCR 产物的信号才与初始模板的拷贝数成比例。而 TMSB4 的扩增动力学显示, 当循环数小于 36 时, PCR 产物与循环数之间呈线性关系(图 1)。因此我们选择 28 作为 PCR 反应的循环数。

2.2 TMSB4 mRNA 表达(图 2, 表 1):瘢痕疙瘩的 TMSB4 mRNA 表达比增生性瘢痕减少 66.98%, 比正常皮肤减少 62.48%。TMSB4 mRNA 在瘢痕疙瘩组织中的表达较增生性瘢痕和正常皮肤均明显减少(P 均 < 0.01); 而增生性瘢痕和正常皮肤组织间比较, TMSB4 mRNA 表达量差异无显著性。在培养的 3 种成纤维细胞中, TMSB4 mRNA 在 KFB 中

的表达显著少于 HFB ($P < 0.01$), 其平均值减少 27.13%; TMSB4 mRNA 在 KFB 中的表达量虽然比 NFB 减少 16.07%, 但差异无统计学意义。

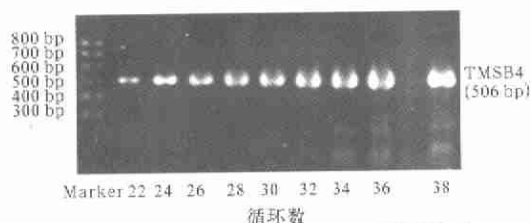


图 1 不同循环数对 TMSB4 PCR 产物的影响

Figure 1 Electrophoretogram of TMSB4 in different cycle numbers

表 1 瘢痕疙瘩、增生性瘢痕和正常皮肤组织及其培养的成纤维细胞中 TMSB4 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 mRNA expressions of TMSB4 in the tissue of keloid, hypertrophic, normal skin and the fibroblasts cultured from those tissue in vitro ($\bar{x} \pm s$)

组织来源	例数 (例)	组织的 $\text{Vol}_{\text{TMSB4}} / \text{Vol}_{\beta\text{-actin}}$	细胞的 $\text{Vol}_{\text{TMSB4}} / \text{Vol}_{\beta\text{-actin}}$
瘢痕疙瘩组织	13	0.350 ± 0.285	0.940 ± 0.170
增生性瘢痕组织	7	$1.060 \pm 0.702^*$	$1.290 \pm 0.250^*$
正常皮肤组织	7	$0.933 \pm 0.334^*$	1.120 ± 0.140

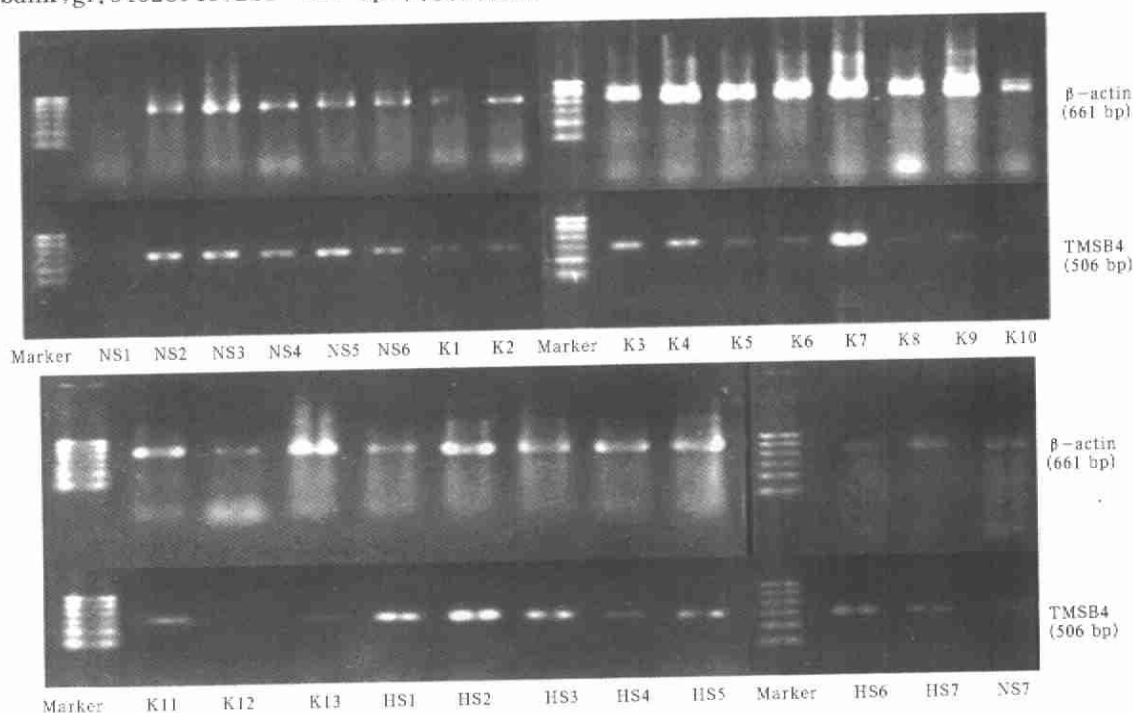
注: 与瘢痕疙瘩组织比较: $^* P < 0.01$

3 讨论

基于瘢痕发生与某些基因异常相关的认识, 我们在前期工作中构建了增生性瘢痕组织比瘢痕疙瘩组织高表达的反向消减 cDNA 基因文库, 并从这个文库中筛选到了一个与 TMSB4 基因部分序列 (genebank, gi: 34328943, 241~627 bp) 高度同源的

基因片断。Northern 杂交实验证实它在瘢痕疙瘩中表达显著减少 (待发表)。由于尚未明确其全长基因序列, 我们暂且称其为类胸腺素 $\beta 4$ 因子。那么, 类胸腺素 $\beta 4$ 因子是否是来自 TMSB4 基因的部分基因片断呢? 本实验结果显示, TMSB4 在瘢痕疙瘩中表达明显少于增生性瘢痕的表达, 这与我们所建立的瘢痕疙瘩和增生性瘢痕组织消减杂交文库中筛选获得的类胸腺素 $\beta 4$ 因子的表达情况相同。提示如果类胸腺素 $\beta 4$ 因子不是一个独立的因子, 它就极有可能是来自 TMSB4 基因的部分基因片断, 也就是说, 类胸腺素 $\beta 4$ 因子可能是 TMSB4 基因。但是, 其身份仍有待于进一步的实验研究。另外, NFB 中 TMSB4 基因表达量和另两组细胞表达量的关系与组织中该基因表达量结果不完全一致, 推测可能与组织中细胞成分复杂, 不同细胞表达该基因的量不同有关。复杂细胞成分与单一细胞成分涉及的基因表达量检测结果因此可能表现不同, 但其机制还需进一步研究。

TMSB4 是一个体内含量丰富而功能复杂的蛋白质, 通过影响肌动蛋白多聚化与解聚的动态平衡^[1], 影响各种细胞的动力与功能状态, 发挥促进血管发生、加速伤口愈合^[2]等作用。TMSB4 在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中的表达差异明显, 表明 TMSB4 参与了瘢痕的形成, 并且提示 TMSB4 表达减少可能是瘢痕疙瘩发生、发展的重要因素之一, 推断其发病机制如下。



meta-1

注: K 为瘢痕疙瘩, HS 为增生性瘢痕, NS 为正常皮肤组织, 数字为序号

图 2 瘢痕疙瘩、增生性瘢痕和正常皮肤组织 TMSB4 和 β -actin 基因的 PCR 产物电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of TMSB4 and β -actin in the tissues of keloid, hypertrophic and normal skin

TMSB4 通过改变细胞骨架结构,影响细胞的生物学行为^[3]。Safer 等^[4,5]提出 TMSB4 在血小板中是G-肌动蛋白的螯合蛋白;Nagamalleswari等^[1]研究也证明,TMSB4 是成纤维细胞中最主要的肌动蛋白螯合蛋白。肌动蛋白是构成微丝的主要成分,单体的肌动蛋白(1 个分子单位)称为球形肌动蛋白(G-肌动蛋白),在有 ATP 存在时,它能聚合并成长的双链,称为纤维状肌动蛋白(F-肌动蛋白);与相同的单位结合形成多聚体^[6];并辅以其他蛋白质组成微丝,微丝不稳定,F-肌动蛋白和 G-肌动蛋白能不断相互转化^[7]。在 F-肌动蛋白和 G-肌动蛋白的转化过程中,细胞可实现各种状态的变化。研究表明,维持细胞正常形状对细胞的增殖分化是非常重要的。细胞培养时,改变培养底物的黏附性质,可以调节细胞的形状;细胞伸展性减弱的同时,DNA 合成下降,说明细胞形状对基因的表达有一定影响。而细胞表面的接触和细胞形状的改变,都是通过细胞骨架成分,把信息传导至核内而引起细胞一系列的生物化学反应^[8]。肌动蛋白的多聚化是各种细胞运动(如趋化、神经生长运动、细胞扩散、血小板激活)所必需的^[9]。而影响肌动蛋白多聚化与解聚的 TMSB4 自然可以影响各种细胞的动力。TMSB4 可以通过影响 G-肌动蛋白与 F-肌动蛋白之间的转化而影响到细胞的形态、运动、基因表达与功能状态。我们推测 TMSB4 的表达减少,可能使从 F-肌动蛋白向 G-肌动蛋白的转化发生障碍,微丝不能很好地解聚以致大量沉积,从而影响细胞的移动与

排列,最终引起细胞无序排列,瘢痕疙瘩形成。

我们的初步研究结果已提示 TMSB4 与瘢痕疙瘩形成有关。但 TMSB4 的诸多功能中究竟是哪些功能影响了瘢痕疙瘩的生成?它在瘢痕疙瘩形成中的具体作用机制是什么?TMSB4 与其他瘢痕相关因素有何关系?这些疑问均有待于深入研究。进一步研究 TMSB4 在瘢痕的表达情况将有助于揭示瘢痕发生机制及为寻找瘢痕治疗药物提供新思路。

参考文献:

- 1 Nagamalleswari K, Safer D. Sequestered actin in chick embryo fibroblasts[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 209: 63-67.
- 2 Philip D, Goldstein A L, Kleinman H K. Thymosin beta4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development[J]. Mech Ageing Dev, 2004, 125: 113-115.
- 3 翟晓梅. 瘢痕发病情况及易感基因组织定位研究[D]: [学位论文]. 北京: 北京大学, 2003.
- 4 Safer D, Golla R, Nachmias V T. Isolation of a 5-kilo-dalton-actin-sequestering peptide from human bloodplatelets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 2536-2540.
- 5 Safer D, Elzinga M, Nachmias V T. Thymosin b4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 4029-4032.
- 6 杨抚华, 主编. 医学细胞生物学概论[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1991. 276-281.
- 7 韩贻仁, 主编. 分子细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988. 235.
- 8 张迺衡, 主编. 医学分子生物学[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1999. 263-267.
- 9 Mitchison T J, Cramer L P. Actin-based cell motility and cell locomotion[J]. Cell, 1996, 84: 371-379.

(收稿日期: 2004-12-02 修回日期: 2004-12-22)

(本文编辑: 郭方, 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅 2005 年《中国中西医结合急救杂志》

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一,由《中西医结合实用临床急救》杂志更名),是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊,已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊,64 页,国际通用 16 开大版本,80 克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2005 年的订阅手续,邮发代号:6-93,定价:每期 6.9 元,全年 41.4 元。

《中国中西医结合急救杂志》已经进入俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、“em120.com 危重病急救在线”以及国家中医药管理局“中国传统医药信息网”(http://www.Medicine China.com)。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。

(期刊编辑部)