

· 基础研究 ·

TNF- α 及其受体 TNF- α R₁ mRNA 在增生性
瘢痕组织中的表达及意义

章建林 林子豪 江华 袁相斌 赵耀中 吴建明 朱晓海 吴宏

【摘要】目的 从基因水平探讨 TNF- α 和 TNF- α R₁ 在增生性瘢痕组织中的作用,为增生性瘢痕的基因治疗探索一条有效途径。方法 以正常瘢痕为对照,利用 RT-PCR 技术分别检测 1 年以上增生性瘢痕组织中成纤维细胞 TNF- α 及 TNF- α R₁ mRNA 的表达情况。结果 在增生性瘢痕组织中, TNF- α mRNA、TNF- α R₁ mRNA 表达的相对值分别为 (1.28 ± 0.55) 和 (1.02 ± 0.13) , 均明显低于正常瘢痕组织 ($P < 0.05$)。结论 提示 TNF- α 在正常伤口的愈合过程中起着重要的作用,增生性瘢痕的形成可能与组织中 TNF- α 和 TNF- α R₁ 表达低下有关。基因治疗可提高早期增生性瘢痕中 TNF- α 的含量或靶细胞膜上 TNF- α R₁ 的数量与活性,可能成为预防增生性瘢痕发生的一条有效途径。

【关键词】 增生性瘢痕组织; 肿瘤坏死因子; 肿瘤坏死因子受体; 基因表达

The expression of TNF- α mRNA and TNF- α R₁ mRNA in hypertrophic scars and its significance ZHANG Jian-lin, LIN Zi-hao, JIANG Hua, YUAN Xiang-bin, ZHAO Yao-zhong, WU Jian-ming, ZHU Xiao-hai, WU Hong. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of PLA, Shanghai 200003, China

【Abstract】 Objective To explore the role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and its receptor (TNF- α R₁) in hypertrophic scar at the gene level. Methods The expression of TNF- α mRNA and TNF- α R₁ in hypertrophic scars was tested by semiquantitative reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) method and was compared with that in the normal scars. Results The expression ratios of TNF- α mRNA and TNF- α R₁ in hypertrophic scars were (1.28 ± 0.55) and (1.02 ± 0.13) , respectively, which were significantly lower than those in the normal ones. Conclusion The results suggested that TNF- α might play an important role in the process of wound healing and that the formation of hypertrophic scar might be due to the lack of TNF- α or the down-regulation of TNF- α R₁. Therefore, it was reasonable to increase the level of TNF- α or up-regulate the amount of TNF- α R₁ by using gene therapy in the early stage of hypertrophic scar development.

【Key words】 Hypertrophic scar; Tumor necrosis factor; Tumor necrosis factor receptor; Gene expression

增生性瘢痕组织中细胞因子 TNF- α 蛋白水平的研究证实,随着增生性瘢痕的愈合与成熟,抗 TNF- α 单克隆抗体染色阳性细胞百分比相对增加,但仍较正常瘢痕组织低^[1]。而 TNF- α 及其受体 TNF- α R₁ 基因在增生性瘢痕组织中的表达目前未见文献报道。为此,我们收集伤口愈合 1 年以上的增生性瘢痕组织标本,利用半定量逆转录 PCR 分析增生性瘢痕组织的表达,探讨 TNF- α 及其受体 TNF- α R₁ mRNA 在增生性瘢痕发生、发展过程中的作用,为临床上最终治愈增生性瘢痕提供实验基础。

材料和方法

一、组织标本

本实验所有增生性瘢痕组织及正常瘢痕组织均取自长征医院整形外科住院患者,年龄 18 ~ 41 岁;伤口愈合 12 个月后的增生性瘢痕组织 20 例,正常瘢痕组织 10 例。患者术前未长期服用免疫调节剂,无长期局部外用瘢痕药物治疗史,不伴肿瘤及自身免疫性疾病。采用甲基纤维素包埋,液氮保存。

二、试剂和仪器

Ultrospec3000 分光光度仪 (Pharmacia Biotech, 美国),凝胶扫描成像分析仪 (Bio-Rad550, 美国),PCR 基因扩增仪 2400 (Perkinelmer, 美国),TRIzol Reagent 总 RNA 提取试剂盒 (上海产),RT-PCR 提取试剂盒 (Promega, 美国),HPISA-1000 高清晰度图像分析系统 (Olympus, BX50 型, 日本),Universal16R 型离心机 (Hettich-Zentrifugen, 德国)。

三、总 RNA 的提取

采用 TRIzol Reagent 总 RNA 提取试剂盒,操作步

基金项目:国家自然科学基金 (No. 39970761)

作者单位:200003 上海,解放军第二军医大学附属长征医院整形外科

骤按试剂盒附带的操作指南进行。电泳鉴定提取 RNA 的完整性。经测定,所有样本 OD_{260}/OD_{280} 均大于 1.8,提示样品纯度较高,无明显蛋白污染。统一调整总 RNA 浓度为 0.5 mg/1 ml, -70°C 储存。

四、引物设计

应用 6.8 版 PCgene 软件辅助设计引物^[2]。将上、下游引物设计在不同的外显子上,以免 RNA 中污染的基因组 DNA 扩增出假阳性结果。 β -肌动蛋白(β -actin)作为内源性内参照。TNF- α 基因上游引物为 5'-CGA GTG ACA AGC CTG TAG C-3',与 TNF- α 基因 cDNA 基因库第 403 ~ 421 脱氧核苷酸同源;下游引物为 5'-CCT TCT CCA GCT GGA GAG C-3',与 TNF- α 基因 cDNA 基因库第 747 ~ 765 脱氧核苷酸互补,扩增产物长 363 bp。TNF- α R_1 引物为 5'-CCA TCT GCT GCA CCA AGT GCC A-3'(上游),5'-AAT CCT GCG TGG CAG TTA CAC A-3'(下游),扩增产物长 347 bp。 β -肌动蛋白引物序列为 5'-GTG GGG CGC CCC CAG CCA-3'(上游),5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'(下游),扩增产物长 540 bp。引物由中科院生化所合成。

五、PCR 循环数

TNF- α 、TNF- α R_1 mRNA 扩增循环数均为 28,而 β -Actin mRNA 扩增循环数为 26。

六、RT-PCR 反应

每个标本取 2 ml 总 RNA,根据试剂盒提供的实验条件进行 RT-PCR 反应。取固定量的 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶扫描成像分析仪处理系统进行光密度扫描,求出电泳条带的平均光密度,用目的基因 mRNA 与标本 β -Actin mRNA 的比值代表 PCR 扩增产物的相对含量,测定并比较增生性瘢痕组织与正常瘢痕组织中 TNF- α 和 TNF- α R_1 表达情况。

七、统计学分析

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,用 SPSS 9.0 统计软件进行处理。

结 果

一、增生性瘢痕与正常瘢痕组织中 TNF- α 与 β -Actin mRNA 的表达

20 例增生性瘢痕组织中 TNF- α mRNA 表达相对值平均为 (1.28 ± 0.55) ,10 例正常瘢痕组织为 (1.56 ± 0.66) ,增生性瘢痕 TNF- α mRNA 较正常瘢痕含量显著降低($P < 0.05$)。电泳结果见图 1。

二、增生性瘢痕与正常瘢痕组织中 TNF- α R_1 与 β -Actin mRNA 的表达

20 例增生性瘢痕组织中 TNF- α R_1 mRNA 表达相对值平均为 (1.02 ± 0.13) ,正常瘢痕组织为 $(1.41 \pm$

0.07),增生性瘢痕 TNF- α R_1 mRNA 较正常瘢痕含量显著降低($P < 0.05$)。电泳结果见图 2。

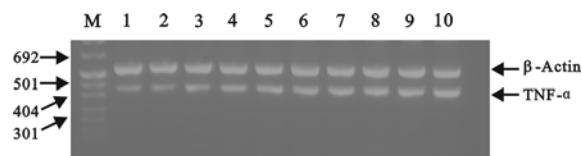


图 1 增生性瘢痕组织及正常瘢痕中 TNF- α 和 β -Actin RT-PCR 产物琼脂糖电泳

注:M 为 DNA 标记物;1,2,3,4,5 为 12 个月后的增生性瘢痕组织;6,7,8,9,10 为正常瘢痕组织双重 RT-PCR 产物

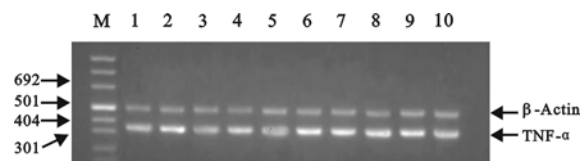


图 2 增生性瘢痕组织及正常瘢痕中 TNF- α R_1 和 β -Actin RT-PCR 产物琼脂糖电泳

注:M 为 DNA 标记物;1,2,3,4,5 为 12 个月后的增生性瘢痕组织;6,7,8,9,10 为正常瘢痕组织双重 RT-PCR 产物

讨 论

TNF- α 主要由激活的单核细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞产生,不仅能杀伤肿瘤细胞,而且在炎症、休克及自身免疫等病理过程中起着重要的作用,还能影响成纤维细胞胶原合成与分解代谢。目前已证实,在增生性瘢痕的演化过程中,TNF- α 抗体阳性染色细胞百分率逐渐升高,但与正常瘢痕比较,仍显著降低^[1]。这说明 TNF- α 可能在增生性瘢痕的发生、发展过程中起着重要的作用。与正常瘢痕比较,增生性瘢痕组织中 TNF- α 抗体阳性细胞减少,可能是由于产生 TNF 的细胞,如巨噬细胞和激活的 T 淋巴细胞功能性活动降低,或者存在多种 TNF 抑制物^[3]。我们利用半定量 RT-PCR 检测增生性瘢痕组织中 TNF- α mRNA 的表达情况,发现其较正常瘢痕明显降低,提示 TNF- α 基因转录水平低下,即巨噬细胞和激活的 T 淋巴细胞功能低下可能是增生性瘢痕组织中 TNF- α 蛋白水平低下的真正原因。

TNF- α 对成纤维细胞具有双向调节作用,即低浓度的 TNF- α 可刺激成纤维细胞增殖,而高浓度的 TNF- α 则抑制成纤维细胞的增殖。其原因可能与不同浓度的 TNF- α 作用于成纤维细胞介导不同的信号传导途径有关。Duncan 等^[4]认为,低浓度 TNF- α 能明显促进人皮肤成纤维细胞的增殖及 I、III 型胶原和聚氨基多糖的合成。但后来的体外实验发现,TNF- α 能促进成纤维细胞的增殖,却抑制胶原的合成。Boyce 等^[5]在研究胎儿无瘢痕愈合机制时发现,高浓度

的透明质酸可激活组织中巨噬细胞合成并释放大量的 TNF- α , TNF- α 作用于鼠成纤维细胞使胶原酶合成增加、胶原降解, 最终使瘢痕局限化。Zhang 等^[6]发现, TNF- α 能促进人滑膜成纤维细胞增殖, 使胶原酶合成增加, 导致胶原降解。大量体外实验证实, 高浓度 TNF- α 抑制成纤维细胞增殖, 使胶原等细胞外基质合成减少, 组织中沉积减少。因此推测高浓度 TNF- α 通过 TNFR₁ 相关死区蛋白质 (TNF receptor-1 associated death domain protein, TRADD) 介导信号传递, 导致成纤维细胞的凋亡, 抑制成纤维细胞的增殖, 使成纤维细胞数量减少, 胶原等细胞外基质的分泌减少, 细胞外基质沉积也减少^[7]。

增生性瘢痕组织中 TNF- α 含量极低, 低浓度的 TNF- α 刺激成纤维细胞增殖, 促进胶原酶的合成增加, 导致瘢痕中的主要成份——胶原降解, 使增生性瘢痕的演化趋向于正常瘢痕。我们认为, TNF- α 基因逆转录水平降低可能是导致增生性瘢痕形成、发展的重要原因之一。用基因工程的方法将逆转录得到的 TNF- α cDNA 基因与质粒或病毒等基因载体整合, 转移至受体细胞或细菌, 经过筛选、培养, 可得到 TNF- α cDNA 的克隆株, 使基因治疗为临床治愈增生性瘢痕提供了可能。

我们通过对增生性瘢痕组织中 TNF- α R₁ 基因水平进行测定, 发现增生性瘢痕组织中 TNF- α R₁ mRNA 有稳定的表达。RT-PCR 半定量分析显示, 增生性瘢痕 TNF- α R₁ mRNA 的表达与正常瘢痕组织相比, 差异有显著性意义。这可能是因为受体表达水平的调控与细胞因子的含量呈正相关, TNF- α 在增生性瘢痕组织中的相对含量低于正常瘢痕组织, 使受体水平下调。同时也可能与增生性瘢痕组织中存在糖皮质激素、IL-1 等抑制其表达的物质等有关^[8]。

TNF- α 通过与成纤维细胞表面高亲和力的特异性受体 TNFR₁ 和 TNFR₂ 结合后发挥其生物学效应。虽然生物学效应的发挥是由两类受体共同参与介导, 但 TNF- α 的绝大部分生物学效应是通过 TNFR₁ 起主导作用, 而 TNFR₂ 起信号转导作用^[9]。因此, 成纤维细胞膜上 TNF- α R₁ 的数目及亲和力强弱直接

影响 TNF- α 的作用。通过基因转染技术将细胞因子受体 TNF- α R₁ 基因导入增生性瘢痕的成纤维细胞中, 使原本对 TNF- α 生物学作用不敏感或敏感性较差的靶细胞的敏感性提高, 有利于细胞因子 TNF- α 发挥更强的治疗作用, 从而进一步促进胶原酶的合成, 使细胞外基质中胶原沉积减少, 抑制增生性瘢痕的形成^[10], 可成为临床上治疗增生性瘢痕的有效途径。

参 考 文 献

- 1 章建林, 林子豪, 刘麒, 等. 增生性瘢痕的形成与组织中肿瘤坏死因子含量相关性的研究. 中国临床康复杂志, 2002, 6: 1125-1126.
- 2 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物学技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990. 6-16.
- 3 Peruccio D, Castagnolic C, Stella M, et al. Altered biosynthesis of tumor necrosis factor (TNF) alpha is involved in postburn hypertrophic scars. Burn, 1994, 20: 118-121.
- 4 Duncan MR, Berman B. Differential regulation of collagen, glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin1-alpha and beta and tumor necrosis factor-alpha and beta. J Invest Dermatol, 1989, 92: 699-706.
- 5 Boyce DE, Thomas A, Hart J, et al. Hyaluronic acid induces tumor necrosis factor-alpha production by human macrophages in vitro. Br J Plast Surg, 1997, 50: 362-368.
- 6 Zhang HG, Huang N, Liu D, et al. Gene therapy that inhibits nuclear translocation of nuclear factor kappa B results in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of human synovial fibroblasts. Arthritis Rheum, 2000, 43: 1094-105.
- 7 Kitson J, Raven T, Jiang YP, et al. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. Nature, 1996, 384: 372-375.
- 8 Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. J Leukoc Biol, 2000, 68: 897-902.
- 9 Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, et al. Mice deficient for the 55 KD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell, 1993, 73: 457-467.
- 10 胡晓昊, 孙晓文, 许纯孝. 肿瘤坏死因子受体基因转移增强 TNF 杀伤肿瘤细胞基因研究. 医学研究生学报, 2001, 14: 343-346.

(修回日期: 2003-10-28)

(本文编辑: 吴倩)