

• 文献综述 •

基因芯片技术在增生瘢痕研究中的应用

王 齐 综述 秦泽莲 审核

(北京大学第三医院成形科, 北京 100083)

中图分类号: R619⁺.6

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2007)04-0385-03

创伤愈合伴随瘢痕形成。成纤维细胞(fibroblast, Fb)过度生长增殖, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)局部过量堆积则可形成高于皮肤表面的过度增生性瘢痕, 包括增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)和瘢痕疙瘩(keloid, K)。发生 HS 或 K 的患者可有身体机能受限, 生活质量受到严重影响。关于 HS 和 K 的病理机制研究很多, 但具体机制还不清楚。有关瘢痕相关基因的研究报道已有一些, 尤其是单个基因的报道为多。

1 单个瘢痕相关基因的研究概况

过度增生性瘢痕 Fb 排列紊乱, 极性消失, 体外培养的瘢痕 Fb 生长密度高于正常皮肤^[1,2]。瘢痕疙瘩 Fb 的凋亡指数(apoptosis index, AI)升高, 增殖指数(proliferation index, PI)也升高, AI/PI 比值低于正常, 表明 K 中 Fb 增殖活性绝对升高而凋亡活性相对下降^[3]。巢蛋白(nestin)是一个高分子量中间丝蛋白, 是干细胞的标志之一, 可能也是人真皮成纤维前体细胞的标志物^[4], 在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕真皮中的表达高于正常皮肤及扁平瘢痕^[5], 可能与过度增生性瘢痕成纤维细胞增殖升高有关。介导细胞凋亡的脂肪酸合成酶 Fas 蛋白在 HS 低表达, 在 K 高表达, 但 Fas 蛋白单克隆抗体不能诱导 K 中 Fb 正常凋亡, 表明 Fas 基因可能参与了 HS 发生, K 中 Fb 中 Fas 基因编码区存在突变, Fas 介导的死亡信号传导被阻滞^[6,7]。B 淋巴细胞-2 基因即 Bcl-2 是原癌基因, 编码的 Bcl-2 蛋白是细胞凋亡抑制因子, 能抑制细胞程序性死亡, 在正常皮肤(normal skin, NS)少量表达, HS 和 K 来源的角质形成细胞及血管周围的 Fb 中 Bcl-2 表达明显增强。原癌基因 C-jun 和 C-fos 编码转录激活因子, 在 NS 不表达, 但在 K 和 HS 的 Fb 高表达^[8]。毋巨龙等^[9]的研究表明, 原癌基因 C-myc 和 C-fos 在 HS 中表达强阳性, 编码的蛋白半衰期延长, 促进胶原基因转录, 增加胶原合成与分泌。陈伟等^[10]的研究表明, HS 中 C-myc 蛋白含量明显高于正常皮肤组织, 认为它与 HS 中凋亡细胞增多相关。由此推测, 过度增生性瘢痕中 Fb 过度增殖是其凋亡与增殖失衡的表现, fas 基因低表达和原癌基因的表达或过表达与之有关。

P53 蛋白是一个多功能转录因子, 可调控细胞周期、维持基因组完整性、诱导细胞分化和凋亡。P53 基因突变或 P53 蛋白与其他蛋白相互作用能导致 P53 基因丧失正常生物功能。HS 和 K 中 P53 高表达^[11], K 中 P53 的突变率是 75%^[12], 突变的 P53 编码的 P53 蛋白不能诱导细胞正常凋亡, 细胞增殖过度。

转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β)是比较明确与过度增生性瘢痕有关的基因产物。人体存在 3 种亚型: TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 ^[13]。TGF- β_1 和 TGF- β_2 可促进纤维化, 促使瘢痕形成^[14]。创伤后肉芽组织及 20 个月 HS 的 Fb 中, TGF- β_1 和 TGF- β_2 受体表达强阳性。K 中 TGF- β 浓度明显增高, K 中 Fb 对 TGF- β 敏感性显著增强可能与此有关^[15]。TGF- β_1 通过 AP-1 促进 K 中 Fb 增殖并合成分泌 I 型胶原蛋白^[16]。过度增生性瘢痕的形成可能与大量 Fb TGF- β 受体表达强阳性有关。陈伟等^[17]的研究表明, TGF- β_1 基因低表达与早期胎儿的无瘢痕愈合有关, 而随着其向高表达演进, 无瘢痕愈合消失, 表明它与瘢痕形成相关。

胸腺素 β_4 (thymosin β_4 , TMSB4)是一个具有多活性的小分子蛋白, 存在于大多数细胞中, 是肌动蛋白单体螯合剂。受国家自然科学基金的资助, 我们研究了 TMSB4 在瘢痕中的表达^[18]。对 K、HS、NS 组织 TMSB4 的 mRNA 进行 RT-PCR 半定量研究表明, K 组的 TMSB4 和 HS 组及 NS 组相比表达显著减少; 同时对原代培养的 K、HS 及 NS 的 Fb 中 TMSB4 mRNA 进行 RT-PCR 半定量表明, K 组较 HS 组 TMSB4 表达降低。由此推测, TMSB4 的减少使纤维状肌动蛋白向球形肌动蛋白转化障碍, 影响细胞的移动与排列, 导致细胞无序排列, 瘢痕疙瘩形成。

这些报道说明, HS 和 K 的发生涉及很多基因, 单个基因研究有其局限性。基因芯片技术的诞生和发展推动了疾病相关基因的研究。基因芯片技术为过度增生性瘢痕基因机制的研究提供了有力支持, 越来越多的学者将芯片应用到瘢痕研究中去并获得了一些有意义的资料。

2 基因芯片与增生瘢痕

2.1 基因芯片技术

基因芯片(gene chip)技术利用现代探针固相原位合成、照相平板印刷、高分子合成等微电子技术使大量分子生物学技术(包括 DNA、RNA 印迹技术, 探针杂交技术, PCR 等)在一定狭小的空间内完成, 实现了基因表达分析的高速度、高通量、集约化和低成本。它的高度平行、可一次筛选大量基因的特点是以以往任何技术都没有的^[19]。芯片的制作有两种方法, 一是在芯片原位合成寡核苷酸链, 另一是将 PCR 扩增的 cDNA 纯化后点于芯片上^[20]。制作芯片的固相支持物有硅化玻璃和尼龙两种。将比较基因组分别标记不同荧光(Cy3 和 Cy5), 即为探针。探针和芯片杂交后筛选出阳性结果, 结合生物信息学分析阳性基因。通常表达差异高于 2 倍

的基因视为差异表达基因,可能与研究目的相关。芯片设备份点样,以减小个体差异引起的差异倍数的变异;同一芯片上设有相同基因重复点,以排除固相支持物不合格造成的筛选错误。芯片研究的设计多样,可直接比较或间接比较,所产生的变异大小不同,应根据具体要求和研究性质选择^[21]。

2.2 基因芯片技术在瘢痕机制探讨中的应用

基于基因芯片技术的特点,很多学者将其应用到筛选过度增生性瘢痕相关基因的研究中来并且取得了很多前瞻性成果。

2.2.1 基因芯片与增生性瘢痕 马兵等^[22]选取 3 例 HS,应用基因芯片技术筛选 4000 个靶基因在 HS 和自身 NS 的差异表达,筛出基因涉及 13 类,分别是原癌基因和抑癌基因、细胞骨架和运动相关基因、免疫相关基因、细胞信号和传递蛋白相关基因、代谢相关基因等。由此看出,HS 的发生涉及许多基因,彼此相互联系,相互作用,协同或者拮抗,导致 HS 形成。HS 形成后,局部微环境改变,可能激活或抑制某些基因表达。王珍祥等^[23]选取 3 例 HS 和 3 例 NS,筛出 580 个 HS 相关基因,2 次实验重复的差异基因有 186~242 个,共同表达的有 116 个基因,涉及 13 类,分别为原癌基因和抑癌基因,细胞骨架和运动相关、细胞信号和传递蛋白相关、代谢相关、免疫相关、发育相关、蛋白合成翻译、离子通道和运输、细胞周期蛋白、DNA 结合转录、细胞受体、细胞凋亡等基因等,其中大部分还未被研究过。他们的结果再次印证了 HS 形成与多基因相关,基因类型多样,与马兵等^[12]的结果大部分相同;并且提示 HS 的形成由多渠道、多因素控制。2004 年,王珍祥等^[24]选取 4 例烧伤后 6 个月 HS,筛选出 97 个 HS 共同表达的差异基因,还有一些重复出现 1~3 次。共同表达的差异基因与前次类型大体相同,涉及 13 种功能类别,且大部分未曾有功能研究。

比较上述几例芯片研究,有很多共同点。芯片均为 PCR 扩增的靶基因 DNA 点于固相基底制成。其优点是研究者可依兴趣任意选取基因库设计芯片;但缺点是,扩增的 DNA 片段长度不一,影响杂交效果,结论可靠性下降。某些差异基因未完全重复,可能由于个体差异造成不同部位瘢痕相关基因不全相同,也可能是假阳性。

以上研究中的 HS 均为早期瘢痕,早期和中晚期 HS 与 NS 相比差异表达基因不尽相同^[25]。 α -SMA 在 3 个月和 6 个月的 HS 中表达显著高于 9 个月和 12 个月的 HS ($P < 0.01$),而 9 个月和 12 个月的 HS 与 NS 相比,表达无显著差异。表明不同病程 HS 基因表达不尽相同,了解这些差异有益于指导临床治疗及预后判断。

Paddock 等^[26]选取成人和儿童 HS 各 2 例筛选 HS 相关基因表明,儿童和成人 NS 基因表达谱相同,配对比较筛出 35 个差异表达基因,儿童组与成人组相同。研究采用间接比较法,且做芯片显著性分析 (significance analysis of microarrays, SAM) 以减小非配对比较产生的假阳性。间接法与直接法各有利弊:前者产生变异较后者大^[27],假阳性机会多,须做 SAM;后者操作简单,数据获得和统计处理工作简便,但获得的资料可能不够全面。

Dasu 等^[28]选取 5 例原代培养的 HS Fb,采用间接法筛选 HS 相关基因,并研究了 IL-6 刺激前后 HS Fb 和正常 Fb 差异表达基因。研究表明,正常 Fb 和 HS Fb 表达基因相同,HS Fb 较正常 Fb 有 12 个基因表达上调,14 个下调;HS Fb

受 IL-6 作用后 33 个基因表达改变,正常 Fb 有 57 个表达改变,其中 15 个与 HS 相同。差异表达基因涉及的类别为编码结构蛋白的基因、发育相关基因、细胞凋亡相关基因、转录因子基因、生长因子基因等。瘢痕 Fb 和瘢痕组织的基因表达不完全相同,但瘢痕的主要成分是 Fb 及其分泌的 ECM,两者的基因表达有很大的一致性。IL-6 在 HS 中表达量增加^[29],能刺激 Fb 增殖^[30,31]。IL-6 作用于正常 Fb 和 HS Fb 的基因不全相同,不同的基因可能与 IL-6 介导 HS 形成密切相关。

2.2.2 基因芯片与 K K 不同于 HS,通常无退行性变,部分由微小创伤引起,切除后易复发。K 有家庭聚集现象,提示 K 和遗传关联^[32]。K 也是多基因相关疾病。陈伟等^[33]选取 3 例 K,筛出 402 条 K 和 NS 表达差异基因,包括原癌基因、抑癌基因、信号转导因子基因、凋亡相关基因等,其中 19 条与胶原合成及代谢相关,41 条编码生长因子及其受体。王春梅等^[34]选取 2 例 K 和 1 例 NS,取其初代培养 Fb,筛选两者表达差异的肿瘤相关基因表明,耳垂 K Fb 表达 8 个特异基因,胸部 K Fb 表达 17 个特异基因,共同表达 3 个特异基因。由此可见,不同部位 K 的 Fb 基因表达不全相同,K 分子机制存在差异。

基因芯片技术的诞生及应用给研究者们很大裨益,但其成本很高,限制了推广。因此,基因芯片设计就很重要,要确保在选取较少样本和芯片的情况下得到尽可能全面而准确的信息。正常情况下,人与人之间的基因表达谱存在差异,因此,对于生理和病理差异的判断需借助一定的样本量数据和统计学检验。另外,基因芯片技术还存在特异性、敏感性不足^[35,36]的缺陷。过度增生性瘢痕的发生机制很复杂,部位、性别等因素都可能会影响 K 和 HS 的发生^[32]。不同个体存在很大差异,样本例数过少势必会影响芯片结果的可靠性。基因芯片研究的设计必须严谨,样本的采集也要力求规范,而图像采集和数据统计处理工作也是很重要的。

参考文献

- 1 徐少俊,王志刚,鲍卫汉. 瘢痕疙瘩不同部位成纤维细胞生长实验研究. 中华外科杂志,1997,35(12):772.
- 2 Luo S, Benathan M, Raffoul W, et al. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(1): 87-96.
- 3 陕声国,张端莲,侯祚琼,等. 瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和凋亡状态. 中华皮肤科杂志,2000,33(4):280.
- 4 乔薇,陈东明,秦荣生,等. 巢蛋白在人真皮成纤维细胞中的表达. 中国微外科杂志,2006,6(5):389-391.
- 5 赵霞,马勇光,陈东明,等. 巢蛋白 (nestin) 在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中的表达. 中国微外科杂志,2006,2(6):142-144.
- 6 鲁峰,高建华,黎小间. Fas 介导下瘢痕成纤维细胞的死亡信号转导的研究. 中华医学美容外科杂志,2000,6(1):31-33.
- 7 黎小间,高建华,鲁峰. 病理性瘢痕成纤维细胞 Fas 受体及 Bel-2 蛋白的表达. 第一军医大学学报,2000,20(3):231-233.
- 8 Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, et al. Expression of Bcl-2, p53, C-jun and C-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. J Dermatol Sci, 1999, 22: 31-37.
- 9 毋巨龙,李荟元,李世荣. 增生性瘢痕 C-myc 和 C-fos 蛋白的表达. 第四军医大学学报,2002,23(10):928-931.
- 10 陈伟,付小兵,孙同柱,等. 增生性瘢痕组织中 p53 和 c-myc 蛋白含量的变化及其对瘢痕内细胞凋亡发生的影响. 中国危重病

- 急救医学, 2002, 14(2): 100-103.
- 11 Aya T, Mitsuo H, Hideyuki T, et al. Expression of p53 family in scars. *J Dermatol Sci*, 2004, 34: 17-24.
 - 12 刘旺, 蒋游晖, 李友良, 等. 瘢痕疙瘩成纤维细胞 p53 基因突变的研究. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(2): 85-87.
 - 13 吕远东, 罗少军. TGF- β 与病理性瘢痕. *中华整形外科杂志*, 2001, 17(2): 117-119.
 - 14 Yang G, Lim I, Phan T, et al. From scarless fetal wounds to keloids: molecular studies in wound healing. *Wound Rep Reg*, 2003, 11: 411-417.
 - 15 Schmid P, Itin P, Cherry G, et al. Enhanced expression of transforming growth factor- β type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol*, 1998, 152: 485-493.
 - 16 Chang W, Seong S, Su H, et al. A transcriptional factor decoy against AP-1 suppresses TGF- β 1-induced type I collagen gene expression in cultured keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 2005, 37: 49-51.
 - 17 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 β 1 基因表达的变化. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(4): 206-209.
 - 18 聂芳菲, 吴江群, 秦泽莲. 瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中胸腺素 β 4 基因表达变化及其意义. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(2): 80-83.
 - 19 Schena M, Heller R, Thieriault T, et al. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol*, 1998, 16: 301-306.
 - 20 Aittokallio T, Kurki M, Nevalaninen O, et al. Computational strategies for analyzing data in gene expression microarray experiments. *J Bioinform Comput Biol*, 2003, 1: 541-586.
 - 21 Churchill G. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet*, 2002, 32: 490-496.
 - 22 马兵, 吴军, 易绍萱, 等. 表达基因谱芯片筛选烧伤后增生性瘢痕相关基因的研究. *中华创伤杂志*, 2001, 17(6): 334-337.
 - 23 王珍祥, 吴军, 李世荣. 增生性瘢痕相关基因的筛选. *实用美容整形外科杂志*, 2002, 13(2): 74-76.
 - 24 王珍祥, 吴军, 李世荣. 增生性瘢痕与正常皮肤差异基因的筛选. *中华美学美容杂志*, 2004, 10(3): 155-157.
 - 25 Wu J, Ma B, Yi S, et al. Gene expression of early hypertrophic scar tissue screened by means of cDNA microarrays. *J Trauma*, 2004, 57: 1276-1286.
 - 26 Paddock H, Schultz G, Baker H, et al. Analysis of gene expression patterns in human postburn hypertrophic scars. *J Burn Care Rehabil*, 2003, 24: 371-377.
 - 27 Yang Y, Speed T. Design issues for cDNA microarrays experiments. *Genetics*, 2002, 3: 579-588.
 - 28 Dasu M, Hawkins H, Barrow R, et al. Gene expression profiles from hypertrophic scar fibroblasts before and after IL-6 stimulation. *J Pathol*, 2004, 202: 476-485.
 - 29 Ueyama M, Maruyama I, Osame M, et al. Marked increase in plasma interleukin-6 in burn patients. *J Lab Clin Med*, 1992, 120: 693-698.
 - 30 Mateo R, Reichner J, Albina J. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol*, 1994, 266: 1840-1844.
 - 31 Saba A, Kaidi A, Godziachivili V, et al. Effects of interleukin-6 and its neutralizing antibodies on peritoneal adhesion formation and wound healing. *Am Surg*, 1996, 62: 569-572.
 - 32 鲍卫汉. *实用瘢痕学*. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 76-86.
 - 33 Chen W, Wu X, Sun X, et al. Analysis of differentially expressed genes in keloids and normal skin with cDNA microarray. *J Surg Res*, 2003, 113: 208-216.
 - 34 王春梅, 百东古比, 张启旭, 等. 瘢痕疙瘩成纤维细胞的基因组学研究. *中华整形外科杂志*, 2005, 21(4): 299-301.
 - 35 秦泽莲, 鲍卫汉. 过度增生性瘢痕相关基因的研究策略. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(2): 65-66.
 - 36 Mantripragada K, Buckley P, Stahl T, et al. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet*, 2004, 20(2): 87-94.

(收稿日期: 2006-10-10)

(修回日期: 2006-12-28)

(责任编辑: 王惠群)

(上接第 384 页)

- 16 Nandate K, Ogata M, Nishimura M, et al. The difference between intramural and arterial partial pressure of carbon dioxide increases significantly during laparoscopic cholecystectomy: the effect of thoracic epidural anesthesia. *Anesth Analg*, 2003, 97(6): 1818-1823.
- 17 Nguyen NT, Anderson JT, Budd M, et al. Effects of pneumoperitoneum on intraoperative pulmonary mechanics and gas exchange during laparoscopic gastric bypass. *Surg Endosc*, 2004, 18(1): 64-71.
- 18 方驰华, 王友荣, 邓明福, 等. CO₂ 气腹腹腔镜胆囊切除术后肩部疼痛原因及治疗. *肝胆外科杂志*, 1997, 5(2): 97-99.
- 19 Grande M, Tucci CF. Systemic acute-phase response after laparoscopic and open cholecystectomy. *Surg Endosc*, 2002, 16(2): 313-316.
- 20 Malik E, Buchweitz O, Muller Steinhart M, et al. Prospective evaluation of the systemic immune response following abdominal, vaginal, and laparoscopically assisted vaginal hysterectomy. *Surg Endosc*, 2001, 15(5): 463-466.
- 21 曾和平, 叶吉祥, 潘芳芳, 等. 赵宜宝腹腔镜胆囊切除术对机体应激反应的影响. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(1): 35-37.
- 22 Sietses C, Havenith CE, Eijssbouts QA, et al. Laparoscopic surgery preserver monocyte-mediated tumor cell killing in contrast to the conventional approach. *Surg Endosc*, 2000, 14: 456-460.
- 23 Larsen JF, Ejstrup P, Svendsen F, et al. Systemic response in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy using gasless or carbon dioxide pneumoperitoneum: a randomized study. *J Gastrointest Surg*, 2002, 6(4): 582-586.
- 24 Polat C, Yilmaz S, Serteser M, et al. The effect of different intraabdominal pressures on lipid peroxidation and protein oxidation status during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc*, 2003, 17(11): 1719-1722.
- 25 Myre K, Rostrup M, Buanes T, et al. Plasma catecholamines and haemodynamic changes during pneumoperitoneum. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1998, 42(3): 343-347.
- 26 Hirvonen EA, Nuutinen LS, Vuolteenaho O. Hormonal responses and cardiac filling pressures in head-up or head-down position and pneumoperitoneum in patients undergoing operative laparoscopy. *Br J Anaesth*, 1997, 78(2): 128-133.

(收稿日期: 2006-10-08)

(修回日期: 2006-12-21)

(责任编辑: 李贺琼)