

过度增生性瘢痕相关基因的研究策略

秦泽莲 鲍卫汉

瘢痕过度增生的机制并未完全阐明。回顾瘢痕疙瘩和增生性瘢痕的临床表现、生物学特征及其他研究资料,人们不由地会想到,为什么有色人种瘢痕过度增生的发生率高于白色人种?为什么对于一般人不引起过度增生反应的微小损伤却能导致某些人产生瘢痕疙瘩?这些人是否存在有利于瘢痕发生的特殊基因条件?这些问题自然使人们关注到基因。

基因表达是调控生命活动的基础。近年的研究已确定了与某些疾病密切相关的基因。有关过度增生性瘢痕相关基因的研究报告层出不穷,这些报告可以大致分为如下几类。

1 比较过度增生性瘢痕与正常皮肤基因表达的变化

从遗传学角度研究瘢痕疙瘩:瘢痕疙瘩发病具有种族性和家族史倾向。国外有瘢痕疙瘩与某些特殊疾病(例如鲁宾斯坦-泰比综合征)伴发的报告。有报道认为瘢痕疙瘩的发生可能与常染色体隐性或显性遗传有关;也有人认为瘢痕疙瘩的发生与 A 型血型有关。Castagnoli 等(Clin Exp Immunol, 1990; Hum Immunol, 1990)发现,瘢痕疙瘩的发生与人类白细胞抗原(HLA)-B₁₄、B₁₁、BW₁₆、BW₃₅、DR₅、DQW₃ 有相关性,然而也有学者认为其间没有联系。有关瘢痕疙瘩遗传方面的资料尚少,目前难以下结论。

从细胞增殖、凋亡调控机制推测基因检测,陆续在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕中发现了某些基因的异常。

单个基因或其蛋白表达量改变,涉及基因有:①原癌基因和抑癌基因;②凋亡相关基因;③生长因子基因;④信号系统相关成分;⑤细胞外基质;⑥其他成分,如肌钙蛋白、E₂F₁ 蛋白、波形蛋白等。发现它们均有变化。

采用单核苷酸多态性分析检测基因的结构变异。国内外的多个研究发现,在瘢痕疙瘩患者的病变组织或培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞中,p53 外显子 4-7 的基因结构存在突变;另外,瘢痕疙瘩 Fas 基因“死亡域”外显子 8-9 区段有杂合性丢失。这些基因的结构变异与其编码的蛋白无功能密切相关。

检测基因在不同胎龄胎儿和少儿皮肤中表达的变化,如多种生长因子、原癌基因、细胞外信号调节激酶 5 (ERK₅)及其上游信号分子有丝分裂原活化蛋白激酶的激酶(MAPKK, MEK₅)、同源异形框基因等基因或其蛋白。

2 基因转染细胞的功能研究

采用脂质体或重组腺病毒介导将目的基因或者其反义寡核苷酸转染细胞,研究转染细胞增殖、细胞凋亡、DNA 合成代谢、胶原蛋白合成等功能状态的变化,探讨基因功能。相关报告有野生型 p16、Fas、Bcl-2、转化生长因子-β₃(TGF-β₃)、p27、MTS₁、结缔组织生长因子(CTGF)等基因。上述报告中不少涉及到创伤愈合及瘢痕基因,已经发现的那些影响因素是否为过度增生性瘢痕发病机制中的重要环节?基因改变既然是瘢痕过度增生的至关重要的原因,有些也可能是其病变反应的表现。在过度增生性瘢痕,尤其是具有某些肿瘤特征的瘢痕疙瘩,众多基因中哪些基因起着关键作用呢?这个问题迫使我们思考应如何才能排查出这些关键基因——瘢痕相关基因。已有一些创伤愈合涉及的已知基因,但还有很多未知数。其他未测基因是否变化更大,其作用孰重孰轻?全面、系统分析和比较病理状态和正常机体的基因表达情况,是解决这一问题的必要步骤。

基因芯片杂交实验就是这样一种方法。采用基因芯片进行系统分析的工作已有一些报告。如王珍祥等用 4 000 个基因的芯片分析了 3 例增生性瘢痕和 3 例正常皮肤样本 RNA,结果发现差异表达基因共 116 个,涉及 13 类基因。陈伟等通过将 8 400 条人类基因的聚合酶链反应(PCR)产物制成微阵列表达谱芯片,筛选瘢痕疙瘩和正常皮肤中差异表达的基因,结果瘢痕疙瘩和正常皮肤间存在差异表达的基因有 402 条,主要涉及胞外基质、运输蛋白、细胞信号和传导蛋白、细胞骨架和运动相关蛋白的基因等。

基因芯片分析工作对于过度增生性瘢痕致病基因的研究是一个极大的进步。但是,基因芯片研究也有必须注意的地方:①正常情况下,人与人之间就存在一定的基因型和基因表达差异,基因芯片杂交实验将会产

作者单位:100083 北京大学第三医院整形外科

作者简介:秦泽莲(1959-),女(土家族),重庆石柱土家族自治县人,研究员,硕士研究生导师。

生大量的差异基因。何为正常的生理差异,何为病理差异,这可能需要借助一定的样本量数据和统计学检验才能区分判断。②目前已发现 3 万多条基因及片断,芯片杂交的实验成本高,难以采用全基因芯片进行较多例样本的比较。③基因芯片仅能检测已知基因或片断,其特异性、敏感性尚有不足。

抑制性消减杂交是另一种可以用来全面、系统地分析和比较病理状态及对照样本基因表达情况的基因研究方法。通过消减杂交方法可以排除两个对比样本差别小的基因,捕捉两者表达明显不同的差异基因;通过连接载体、转化细菌,建立消减杂交文库;筛选获得差异基因克隆;通过测序、比对,分析基因核苷酸序列结构,明确基因身份。张波等以此方法构建了胎兔皮肤创伤消减文库并初步筛选出 61 个差异表达基因。瘢痕是人类创伤愈合所必需的,人们并不希望影响正常愈合所需基因的活动,而是关注过度增生的致病基因。瘢痕疙瘩易感基因显然是瘢痕疙瘩的重要致病因素(尤其是对于有家族史的患者而言)。回顾瘢痕疙瘩和增生性瘢痕的临床表现、生物学特征及其他研究资料,我们以为,瘢痕疙瘩相关基因中的一些基因可能也是导致增生性瘢痕的关键基因。我们试图从搜寻瘢痕疙瘩易感基因着手探索瘢痕易感基因。在国家自然科学基金(39870848,30170971)的资助下,我们选择典型病例,利用以 PCR 为基础的抑制性消减杂交方法,忽略皮肤正常愈合所有的基因变化,捕捉瘢痕疙瘩和增生性瘢痕表达明显不同的差异基因;建立和筛选了两个瘢痕疙瘩和增生性瘢痕组织差异表达基因文库(上调和下调基因文库),获得了数十个差异表达基因。

无论是芯片杂交实验还是抑制性消减杂交实验,在用典型病例标本筛选出差异基因以后均应该通过 Northern 杂交、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western 杂交或者定制芯片杂交等实验方法,将初步筛选出的差异基因扩大病例标本量进行筛选,以验证确定瘢痕相关基因。随之而来,基因敲除或者基因转染对细胞功能影响的基因功能学研究将是必不可少的。

总之,由于分子生物学技术的发展,对过度增生性瘢痕相关基因的研究有了长足的进步,随着新技术的不断产生,势必推动瘢痕过度增生和创伤愈合的基因学研究更深入地发展,更有助于揭示创伤愈合及瘢痕过度增生的机制。

(收稿日期:2004-12-24)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

2003 年度中国科技论文统计结果

2004 年 12 月 7 日公布的 2003 年度中国科技论文统计结果显示,我国科技论文占世界论文总数的 5.1%,继续处在美、日、英、德之后,位列世界第五。临床医学这次共有 67 312 篇论文,在国内无论是论文数还是被引频次都是最高的学科。此次共有 425 种医药卫生类期刊进入 2003 年影响因子分类排序,被分别分入基础医学综合类、军事医学与特种医学、临床医学、药、预防医学和中医中药学共六大类,各类影响因子较高的前 3 种期刊分列如下:

学科	排序	期刊	影响因子	学科	排序	期刊	影响因子
基础医学 综合类	1	中华医院管理杂志	1.152	中医中药学	1	中国中西医结合杂志	0.600
	2	中国危重病急救医学	1.017		2	中国中西医结合急救杂志	0.513
	3	中华医学杂志	0.827		3	中草药	0.483
军事医学与 特种医学	1	中华放射学杂志	0.926	药 学	1	中国新药与临床杂志	0.647
	2	中国内镜杂志	0.752		2	中国药理学报	0.646
	3	中华航空航天医学杂志	0.587		3	中国药科大学学报	0.575
临床医学	1	世界华人消化杂志	2.924	预防医学	1	中华结核和呼吸杂志	1.540
	2	World J of Gastroenterology	2.633		2	中华传染病杂志	1.435
	3	护理研究	1.506		3	中华流行病学杂志	1.293

另外,根据中国科学技术期刊综合评价指标体系,采用分层分析法,由专家打分确定了重要指标的权重,对各学科的每种期刊进行了综合评定,评出了第三届中国百种杰出学术期刊,其中医药卫生类期刊 21 种,分别为:北京大学学报医学版、世界华人消化杂志、药学报、中国危重病急救医学、中国药理学报、中国中西医结合杂志、中华病理学杂志、中华儿科杂志、中华耳鼻喉科杂志、中华放射学杂志、中华骨科杂志、中华护理杂志、中华检验医学杂志、中华结核和呼吸杂志、中华口腔医学杂志、中华内科杂志、中华神经科杂志、中华外科杂志、中华眼科杂志、中华医学杂志、中华肿瘤杂志。