

• 论著 •

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

陈伟 付小兵 葛世丽 孙同柱 姜笃银 周岗 盛志勇

【摘要】 目的 探讨转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 及其转录因子 smad2 和 smad3 基因在不同胎龄的胎儿和出生后机体皮肤组织中表达的变化特征及其可能的生物学意义。**方法** 用病理学技术检测不同发育时期皮肤的结构特征后, 提取 18 例不同胎龄(13~32 周)的胎儿皮肤和 6 例出生后机体皮肤组织的总 RNA 后, 分离 mRNA, 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测这 3 种基因在不同组织中的表达变化规律。**结果** TGF- β_1 、smad2 和 smad3 基因在不同发育阶段的皮肤组织中都有表达。在早期妊娠胎儿的皮肤组织中, TGF- β_1 和 smad2 基因表达较弱, 随着胎龄的增加, 皮肤组织内这两种基因表达逐渐增强, 在出生后机体的皮肤组织中, 这两种基因的表达量分别为妊娠早期皮肤的 1.3 倍和 5.9 倍, 基因表达显著升高($P < 0.05$)。smad3 基因的表达呈不同的变化规律, 在妊娠早期的皮肤组织中, 该基因的表达较强, 随着胎儿的生长发育, 该基因表达逐渐降低, 而在出生后机体的皮肤组织内, smad3 基因表达产物的灰度值又升至 0.272 ± 0.022 , 与早期妊娠胎儿皮肤相比差异不明显($P > 0.05$)。**结论** TGF- β_1 、smad2 和 smad3 基因在不同发育阶段人皮肤组织内都有表达, 显示 TGF- β_1 介导的信号通路可能对皮肤的发生、结构功能的维持以及伤后修复十分重要。在早期妊娠胎儿皮肤中, TGF- β_1 和 smad2 基因低表达可能是胎儿皮肤创面无瘢痕修复的机制之一, smad3 基因在其中的作用还需进一步研究。

【关键词】 转化生长因子- β_1 ; smad2 基因; smad3 基因; 无瘢痕修复; 胎儿皮肤

中图分类号: R322.99; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)04-0206-04

Expression characteristics of transforming growth factor - β_1 in human skin at different development stages of gestation CHEN Wei *, FU Xiao-bing, GE Shi-li, SUN Tong-zhu, JIANG Du-yin, ZHOU Gang, SHENG Zhi-yong. * Key Research Laboratory of Wound Repair, Burns Institute, 304 th Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To investigate gene expression of transforming growth factor - β_1 (TGF- β_1) and its two upstream signalling factors (smad2 and smad3) in fetal skin at different gestational ages and postnatal skin and its potential biological significance. **Methods** Fetal skin samples of human embryo were obtained from spontaneous abortions at different gestational ages ranging from 13 to 32 weeks, and also skin collected from patients undergoing plastic surgery. After morphological characteristics of skin at different developmental stages were examined histologically, gene expressions of TGF- β_1 , smad2 and smad3 in skin specimens at different developmental stages were examined with reverse transcription - polymerase chain reaction analysis (RT-PCR). **Results** Gene expression of TGF- β_1 , smad2 and smad3 could all be detected in fetal skin and skin after birth. In skin from early gestational fetus, gene expressions of TGF- β_1 and smad2 were weak. Along with advance in gestational age, gene expression of these two genes in skin became progressively stronger. In skin from late gestational fetus and skin after birth, the transcription contents of these two genes were significantly increased compared with early gestation fetus ($P < 0.05$). On the contrary, gene expression of smad3 was apparently higher in younger fetal skin versus elder compared with that of late fetal skin ($P < 0.05$). In skins after birth, the levels of smad3 gene expression was elevated to the level similar to that in early gestational fetal skin. **Conclusion** The signal pathway mediated by TGF- β_1 might be involved in regulating development of the skin at embryonic stage and in designating cutaneous structure and function, and also in wound healing after birth. The relative lack in expression of TGF- β_1 and smad2 genes in skins from younger fetuses might contribute to fetal scar-less healing, in which the role of smad3 needs to be further investigated.

【Key words】 transforming growth factor - β_1 ; smad2 gene; smad3 gene; scarless healing; fetal skin

CLC number: R322.99; Q786 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)04-0206-04

基金项目: 国家重点基础研究规划项目(973)资助(G1999054204); 国家自然科学基金重点项目(30230370); 国家自然科学基金项目(30170966)

作者单位: 100037 北京, 解放军第三〇四医院全军创伤修复重点实验室(陈伟, 付小兵, 孙同柱, 姜笃银, 周岗, 盛志勇); 军事医学科学院放射医学研究所(葛世丽)

作者简介: 陈伟(1972-), 男(汉族), 安徽省安庆市人, 医学博士, 助理研究员, 从事创伤修复发生机制与防治研究, 发表论文 40 余篇。

早期妊娠胎儿皮肤创面愈合后一般不形成瘢痕,而妊娠晚期和出生后机体皮肤伤口愈合常为有瘢痕愈合,这一变化的机制目前尚不清楚。以往的研究表明,胎儿所处的无菌、湿润和低氧环境对皮肤创面修复结局影响较小,而细胞因子浓度变化在其中可能起着十分重要的作用^[1,2]。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)作为组织纤维化的重要调控蛋白,其基因表达增强,蛋白含量持续升高,可能会影响创面愈合后组织的重建,促进瘢痕形成。属于 smads 家族成员的 smad2 和 smad3 能介导 TGF- β_1 引起的信号通路,将胞外刺激传递到细胞核内,调节特异基因表达^[3,4]。目前,关于不同发育阶段皮肤组织中 TGF- β_1 及其信号分子 smad2 和 smad3 基因表达变化的研究还鲜有报道,阐明这一规律,有利于深入揭示 TGF- β_1 调节皮肤发育、维持其结构和功能的机制,以及早期妊娠胎儿皮肤创面无瘢痕愈合的部分奥秘。

1 材料与方法

1.1 标本来源及制备:由本院妇产科提供因创伤等意外因素终止妊娠的胎儿背部全层皮肤,共 18 例,胎龄 (embryo gestational age, EGA) 为 13~32 周,其中 EGA-13、15、17、21、23、25、28、30 和 32 周各 2 例。根据胎儿发生的不同时期,将胎儿皮肤标本分为 3 类:早期妊娠胎儿皮肤 (EGA-13~17 周),中期妊娠胎儿皮肤 (EGA-21~25 周) 和晚期妊娠胎儿皮肤 (EGA-28~32 周)。对应的 6 例正常皮肤为因整形手术而取的人背部或上肢正常皮肤,其中男 4 例,女 2 例,年龄 4~16 岁。取材部位未经任何药物处理并经患者同意。标本经无菌取材后,一部分立即存于液氮中冻存,用于进行逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR),检测基因表达;另一部分标本经体积分数为 10% 的中性甲醛液固定,脱水,石蜡包埋后切片,进行组织形态学观察。

1.2 不同发育阶段皮肤的组织学观察:石蜡切片脱蜡后用苏木素-伊红 (HE) 染色,显微镜 (Olympus, 日本) 下观察组织结构。

1.3 皮肤组织总 RNA 的提取和 mRNA 的分离:提取不同胎龄的胎儿和出生后机体皮肤中的总 RNA,采用紫外分光分析和凝胶电泳检测所提取总 RNA 的质量和浓度。按照 PolyATtract[®] mRNA Isolation System 系统分离纯化 mRNA,紫外分光分析纯度。

1.4 TGF- β_1 、smad2、smad3 和 β -actin 基因表达变化:采用 RT-PCR 方法,每份样品取等量的

mRNA,用 Promega 公司的逆转录试剂盒 (A3500),按说明书进行 cDNA 的合成,根据人 TGF- β_1 、smad2、smad3 和 β -actin 基因的 cDNA 序列,按照引物设计原则,用 Primer3.0 引物设计软件设计引物,并在 Blast 中进行同源性比较。引物由上海博亚生物技术有限公司合成,选择适当的退火温度 (T_m),按程序进行相应模板的 PCR 反应。PCR 的条件为:变性:94 °C、3 min;扩增:94 °C、30 s; T_m 30 s, 72 °C、30 s;延伸:72 °C、10 min;每个基因进行 38 个循环。所有样品取等量的模板进行 PCR 扩增。取 PCR 产物 5 μ l,在质量分数为 1.5% 的琼脂糖中电泳后紫外光下扫描;采用凝胶图像分析系统 (UVP-GDS800, 英国) 对目的基因的表达产物进行灰度测定。

1.5 统计学处理:借助 SAS 软件对结果进行统计学处理,各组结果均以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。阳性率组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察:光镜下可见不同发育阶段胎儿和成人皮肤切片均含有完整的表皮、真皮和部分皮下肌肉。在胎儿发育早期 (妊娠 13 周),皮肤表皮仅由 2~3 层表皮细胞组成,真皮内汗腺开始发育,而完整的毛囊结构尚未形成;妊娠 17 周左右,真皮层出现一个个上皮细胞团,这可能是正在发育的毛囊结构;妊娠 21 周左右,皮肤表皮由 3~4 层表皮细胞组成,汗腺、毛囊和皮脂腺等皮肤附属结构已经形成,但体积细小并不太成熟;妊娠 25 周以后,胎儿皮肤表皮细胞层数逐渐增多,汗腺和毛囊结构日益成熟且数量递增。在出生后机体的皮肤组织中,表皮层由多层细胞组成。表皮皮钉 (皮脚) 与真皮乳头相互交错,真皮层内胶原纤维排列整齐,汗腺、毛囊和皮脂腺等皮肤附属结构成熟且数量增加。

2.2 胎儿皮肤和出生后机体皮肤组织中 smad2 和 smad3 基因表达的变化:如图 1A 和 1B 所示,smad2 和 smad3 基因表达产物通过 RT-PCR 方法得到的特异性 DNA 片段长度分别为 752 bp 和 319 bp。在所有被检测的不同胎龄胎儿和出生后机体皮肤组织中,这两种蛋白的基因都有表达。在妊娠早期的皮肤组织内,smad2 基因表达水平较低,随着胎儿不断地生长发育,皮肤组织内该基因表达逐渐增强,在妊娠后期和出生后机体的皮肤组织中,smad2 基因表达产物的灰度值分别升至为妊娠早期皮肤的 6.6 倍和 5.9 倍,差异显著 ($P < 0.01$)。smad3 基因表达呈不

同的变化规律。在妊娠晚期的皮肤组织中, smad3 基因转录本的灰度值与妊娠早期皮肤相比明显降低 ($P < 0.01$), 而在出生后机体皮肤组织中, 该基因表达有所回升, 灰度值与妊娠早期皮肤相比差异不显著 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 在不同发育时期的皮肤组织中 TGF- β_1 、smad2、smad3 和 β -actin 基因的转录本含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 Transcript contents of TGF- β_1 , smad2, smad3 and β -actin in skin at different developmental stages ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TGF- β_1	smad2	smad3	β -actin
早期妊娠胎儿	0.511 $\pm$ 0.116 [#]	0.027 $\pm$ 0.007 [#]	0.308 $\pm$ 0.061	0.634 $\pm$ 0.091
中期妊娠胎儿	0.648 $\pm$ 0.054 [*]	0.099 $\pm$ 0.047 ^{**}	0.189 $\pm$ 0.055 ^{**}	0.663 $\pm$ 0.024
晚期妊娠胎儿	0.656 $\pm$ 0.052 [*]	0.179 $\pm$ 0.020 ^{**}	0.122 $\pm$ 0.006 ^{**}	0.645 $\pm$ 0.014
出生后机体	0.684 $\pm$ 0.047 [*]	0.158 $\pm$ 0.027 ^{**}	0.272 $\pm$ 0.022	0.657 $\pm$ 0.024

注: 与早期妊娠胎儿组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与出生后机体组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

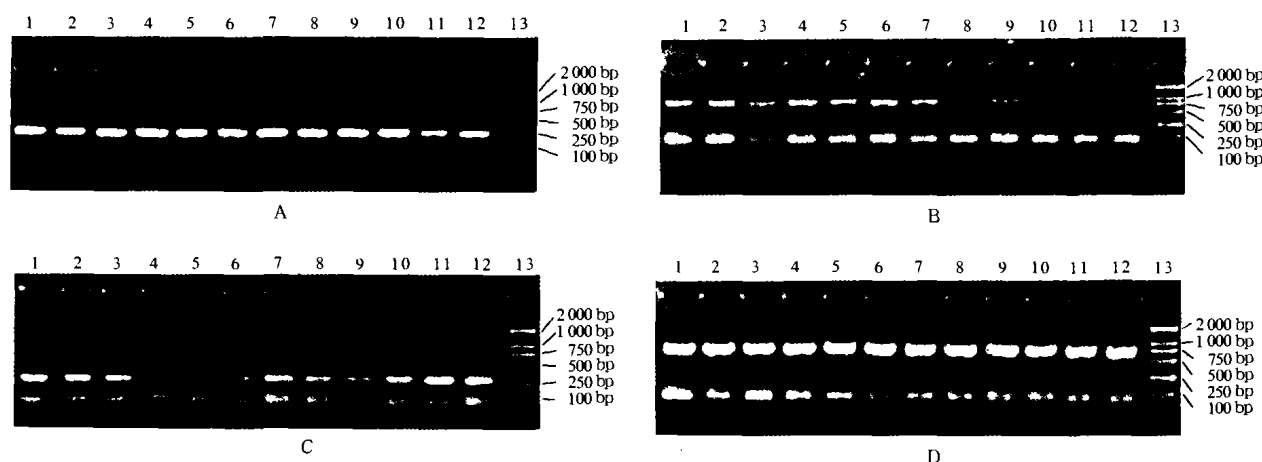
2.3 胎儿皮肤和出生后机体皮肤组织中 TGF- β_1 和 β -actin 基因表达的变化: 如图 1C 和 1D 所示, TGF- β_1 和 β -actin 基因的 mRNA 经过 RT-PCR 扩增后, 所得特异性 DNA 片段长度分别由 275 bp 和 705 bp 组成。在早期妊娠胎儿的皮肤组织中, TGF- β_1 基因表达水平较低, 随着胎儿不断地生长和发育, 皮肤组织内该基因表达水平逐渐升高。在出生后机体的皮肤组织中, TGF- β_1 基因的转录本含量进一步增大。在不同发育阶段的皮肤组织中, 作为内参的 β -actin 基因都有表达, 并且该基因的表达量没有显著性变化 ($P > 0.05$, 表 1)。

3 讨论

TGF- β_1 是一种多功能的细胞因子, 与细胞膜上的受体特异性结合后, 能激活细胞内 smad2 和 smad3 介导的信号通路, 诱导细胞内目的基因表达

和蛋白合成^[5]。TGF- β_1 能够刺激成纤维细胞增殖, 抑制表皮细胞生长, 促进胶原等胞外基质大量合成和在胞外无规律沉积, 趋化成纤维细胞和炎症细胞向伤口聚集, 诱导肉芽组织生长, 在促进创面修复以及修复后组织的改建过程中起重要作用^[6,7]。因此, 研究 TGF- β_1 及其下游信号分子在不同发育时期皮肤组织中的基因表达变化对探讨 TGF- β_1 影响皮肤生长发育和早期妊娠胎儿皮肤创面无瘢痕愈合将具有重要的意义。本研究表明, TGF- β_1 、smad2 和 smad3 基因在不同发育时期的皮肤组织内都有阳性表达, 并且 TGF- β_1 和 smad2 表达量随着皮肤的不断成熟而逐渐增加。这显示皮肤的生长发育、表型和功能的维持可能都需要 TGF- β_1 介导的信号通路参与, 并且内源性 TGF- β_1 可能是皮肤修复与再生的重要内源性调控因子。

在胎儿发育早期, 皮肤伤口不发生收缩, 愈合后也不形成瘢痕; 在妊娠中期, 皮肤伤口开始出现收缩, 愈合后形成类似瘢痕样结构; 在妊娠晚期胎儿以及出生后机体皮肤中, 创面愈合后伴随着瘢痕的形成^[8]。以往的研究发现, 将 TGF- β_1 细胞因子注入兔胚胎皮下组织后, 可引起伤口愈合形成增生性瘢痕, 而外加 TGF- β_1 的中和性抗体则抑制出生后机体皮肤损伤后瘢痕的形成, 因此妊娠早期胎儿无瘢痕愈合可能与 TGF- β_1 密切相关^[9]。本研究发现, 在早期妊娠胎儿皮肤中, TGF- β_1 和 smad2 基因表达较低, 随着胎儿皮肤不断生长发育, 这两种基因表达逐渐升高, 在妊娠晚期和出生后机体皮肤中, 这两种基因表达显著增强。这显示, TGF- β_1 和 smad2 基因低表达可能是胎龄较小的胎儿皮肤无瘢痕愈合的机制之一。



1~3: 出生后机体; 4~6: 晚期妊娠胎儿; 7~9: 中期妊娠胎儿; 10~12: 早期妊娠胎儿; 13: DL2000 DNA marker

图 1 不同发育时期的皮肤组织中 TGF- β_1 (A)、smad2 (B)、smad3 (C) 和 β -actin (D) 基因表达的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR analysis of TGF- β_1 (A), smad2 (B), smad3 (C) and β -actin (D) in skin at different developmental stages

本研究结果还显示,在不同发育阶段的皮肤组织中,皮肤的组成和结构具有特征性的变化。在早期胚胎的皮肤组织中,皮肤结构简单,细胞层数较少,smad3 基因表达较强;随着胎龄的增加,皮肤组织的细胞层数明显增多,皮肤附属器开始成熟并逐渐增加,smad3 基因表达渐渐降低;在晚期胚胎的皮肤中,皮肤结构和功能都基本成熟,smad3 基因表达降至最低,在出生后机体皮肤组织中,smad3 基因表达又恢复到早期妊娠胎儿皮肤中的水平。这显示,smad3 介导的信号通路可能与早期胎儿皮肤细胞快速增殖、创面愈合较快相关,而在出生后机体皮肤中,随着皮肤结构和功能的完全成熟,smad3 可能又与 smad2 一起参与调控 TGF- β_1 引起瘢痕的发生和形成,但具体机制还不清楚,需进一步深入研究。

参考文献:

- 1 Samues P, Tan A K W. Fetal scarless wound healing [J]. J Otolaryngol, 1999, 28(2): 296-302.
- 2 陈伟,付小兵,孙同柱,等. 胎儿和成人皮肤组织中 bFGF、c-fos 和 c-myc 基因转录与翻译的变化及其与创面无瘢痕愈合的关系 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(2): 96-99.

- 3 Chen Wei, Fu Xiaobing, Sheng Zhiyong. Review of current progress in the structure and function of Smad proteins [J]. J Chin Med, 2002, 115(3): 446-50.
- 4 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /smad signaling system [J]. EMBO J, 2000, 19: 1745-1754.
- 5 Evans R A, Tian Y C, Steadman R, et al. TGF- β 1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of smad proteins [J]. Exp Cell Res, 2003, 282(2): 90-100.
- 6 Cowin A J, Holmes T M, Brosnan P, et al. Expression of TGF- β and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds [J]. Eur J Dermatol, 2001, 11(5): 424-431.
- 7 陈伟,付小兵,孙同柱,等. 溃疡组织中转化生长因子- β 异构体与其受体含量的变化及其对创面修复的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(2): 93-95.
- 8 Chin G S, Kim W J H, Lee T Y, et al. Differential expression of receptor tyrosine kinases and that in fetal and adult rat fibroblasts: toward defining scarless versus scarring fibroblast phenotypes [J]. Plast Reconstr Surg, 1999, 105(3): 972-979.
- 9 Shah M, Foreman D M, Ferguson M W. Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring [J]. J Cell Sci, 1995, 108(5): 985-1002.

(收稿日期: 2003-06-01 修回日期: 2004-02-01)

(本文编辑: 李银平)

• 方法介绍 •

危重患者抢救过程中口咽通气道固定的改进

郑泓 李妍 李月

【关键词】 人工气道; 固定方法; 改进

中图分类号: R459.7 文献标识码: B 文章编号: 1003-0603(2004)04-0209-01

人工气道的建立是危重患者抢救的重要方法之一,也是围手术期麻醉患者保持呼吸道通畅的基本措施。在危重患者抢救过程中,一些患者不需要做气管插管或气管切开;或需要进行气管插管,但不具备插管的条件,这时可选用口咽通气道法。它是用特殊管道插入咽部,使舌根前移,达到解除呼吸道梗阻的目的。

对口咽通气道传统的固定方法是将胶布缠绕牙垫顶部,贴在面颊的两侧。但在临床应用中我们发现,这种固定方法存在着许多弊端:①由于咽部刺激,造成

作者单位: 071000 河北省保定市第一中心医院急诊科

作者简介: 郑泓(1966-),女(汉族),河北省保定市人,主管护师。

口咽分泌物增加溢出,使得固定在周围的胶布黏性下降,易使口咽通气道脱出。②浅昏迷或渐清醒的患者不易忍受刺激,如固定不牢固可用舌抵出。③由于口咽通气道需每日更换清洗,撤去胶布时存在许多不便。④有些对胶布过敏者,粘贴处易出现过敏性皮炎或破溃。

针对上述情况我们对口咽通气道的固定方法进行了一些改进:①将通气道翼缘两侧各打一个小孔。②将绷带(长度以能绕至颈后为准)从一侧小孔的上端向下端穿入,而从另一侧下端向上穿出。见图 1。

使用方法:当气管插管等管道插入通气道后,将绷带绕至患者颈后部固定,再用胶布固定面部两侧的绷带(胶布过

敏者用纸胶布)。

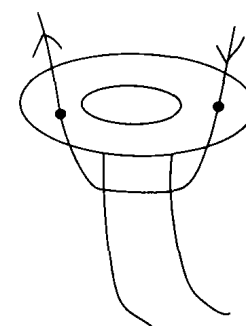


图 1 口咽通气道固定方法

改进后的固定方法优点如下:①此方法简单易行,可以防止脱落。②对胶布过敏者此方法极佳。

(收稿日期: 2004-03-04)

(本文编辑: 李银平)