

• 实验研究 •

增生性瘢痕组织中 TNF-α 基因的表达及其意义

Expression of TNF-α in hypertrophic scars

章建林, 林子豪, 江 华, 袁湘斌, 赵耀忠, 吴建明, 朱晓海, 吴 宏

(第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨 TNF-α 在增生性瘢痕发生、发展过程中的作用。**方法:**以正常瘢痕组织为对照, 利用免疫组织化学染色技术和 RT-PCR 技术检测不同时期的增生性瘢痕组织中 TNF-α 蛋白及基因的表达情况。**结果:**在各组增生性瘢痕组织中, TNF-α、TNF-α mRNA 的表达相对比值均较正常瘢痕明显为低 ($P < 0.05$)。**结论:**在正常创面愈合过程中 TNF-α 发挥重要作用, 增生性瘢痕的形成可能与组织中 TNF-α 表达低下有关。

[关键词] 增生性瘢痕组织; 肿瘤坏死因子; 蛋白表达

[中图分类号] R 619.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0048-03

增生性瘢痕是创面局部上皮化后组织继续增生的病理改变, 以局部炎症、增生、胶原沉积为特点, 近年的研究表明细胞因子在瘢痕的过度形成中起重要作用。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF-α) 主要由激活的单核/巨噬细胞和激活的 T 淋巴细胞产生, 不仅有杀伤肿瘤细胞和在炎症、休克以及自身免疫等病理过程中起重要作用, 而且对成纤维细胞胶原合成与分解代谢也有着重要影响。Peruccio 等^[1]运用免疫组化方法发现, 同正常瘢痕组织相比, 增生性瘢痕组织中 TNF-α 阳性浸润细胞比例明显降低 (增生性瘢痕组织为 8%, 正常瘢痕为 35.4%)。但未对增生性瘢痕中 TNF-α 蛋白水平动态变化及作用机制作出进一步阐述。本研究利用免疫组化和半定量 RT-PCR 分析增生性瘢痕组织中 TNF-α 表达情况, 并以正常瘢痕为对照, 探讨 TNF-α 在增生性瘢痕发生、发展过程中的作用, 为临床增生性瘢痕的治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 组织标本 本实验所有增生性瘢痕组织、正常瘢痕均取自长征医院整形外科住院患者, 年龄 18~41 岁, 均系严重烧伤后局部瘢痕增生, 事先均填写知情同意书并报医学伦理委员会审批。患者在术前无长期服用免疫调节剂和长期局部外用治疗瘢痕药物史, 不伴肿瘤及自身免疫性疾病。创面愈合 1~3、3~6、6~12 及 12 个月后的增生性瘢痕组织各为 10 例, 共 40 例; 取创面愈合 3 年后瘢痕平整, 颜色与正常肤色相近, 无充血、红肿、溃烂的正常瘢痕组织 10 例作为对照。液氮保存。同时抽取 5 例 1~3 个月增生性瘢痕患者的外周静脉血, 提取单核细胞作为培养之用。

1.2 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 Total RNA 试剂盒 (上海华舜生物公司分装), RT-PCR 试剂盒 (Promega, 美国), HPISA-1000 高清晰度图像分析系统 (Olympus, BX50, 日本), RPMI 1640 培养基 (Gibco/BRL, 美

国), Versene 1/5 000, 新生牛血清 (Gibco/BRL, 美国), ELISA 试剂盒 (Endogen, 美国), 鼠抗人巨噬细胞单克隆抗体 (CD11): 1 : 100 (DAKO, 美国); 鼠抗人 T 淋巴细胞单克隆抗体 (CD3): 1 : 30 (DAKO, 美国); 鼠抗人 TNF-α 单克隆抗体: 1 : 100; EnVison 试剂盒 (DAKO, 美国)。

1.3 组织石蜡切片及染色 组织固定、脱水、透明和常规石蜡包埋, 4 μm 连续石蜡切片, 贴在涂有 APES 粘合剂的载玻片上, 56℃ 烤 24 h; 石蜡切片脱蜡至水, PBS 洗, 0.3% H₂O₂ 甲醇液作用 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; TNF-α 和 CD11 需抗原修复: 将切片放入 250 ml 柠檬酸缓冲液 (pH 6.0、0.01 mol/L) 中, MWI 98℃ (Ⅲ档) 10 min, 自然冷却至室温, PBS 洗; 加上上述一抗, 4℃ 过夜, PBS 洗; 滴加 EnVison, 37℃ 湿盒内孵育 30 min, PBS 洗; 依次用 0.05% DAB、0.03% H₂O₂ 显色 8 min, 流水洗; 1% 苏木精染液衬染细胞核, 常规脱水、透明和封固。

1.4 光镜观察、定量分析 先后在低倍镜与高倍镜下观察组织结构及细胞特异性染色情况。组织标本连续 3 张切片, 分别用巨噬细胞、T 淋巴细胞和 TNF-α 单克隆抗体染色。每张切片分别观察瘢痕浅层 (表皮、乳头下真皮层) 和瘢痕深层 (网状真皮层) 阳性细胞。DAB 显色的阳性信号呈棕黄色, 背景为淡黄色或无色。高倍镜 (×200) 下同一张切片中分别在瘢痕浅层和瘢痕深层至少各找 5 个视野, 计数每个视野的阳性细胞, 再在其余两张切片相同视野计数每个视野的阳性细胞。TNF-α 阳性细胞的百分比即为 TNF-α 阳性细胞的数目与巨噬细胞和 T 淋巴细胞阳性细胞数目和之比。即:

$$TNF-α(\%) = \frac{TNF-α \text{ 阳性细胞的数目}}{\text{同视野阳性巨噬细胞} + \text{阳性 T 淋巴细胞}} \times 100\%$$

1.5 人类单核细胞的纯化与培养及 TNF-α 含量检测 单核细胞分离采用分层液密度梯度离心法^[2]。用 ELISA 试剂盒检测上清液中 TNF-α 含量。发现 TNF-α 在 LPS 刺激下

[基金项目] 国家自然科学基金 (39970761)。

[作者简介] 章建林 (1972-), 男 (汉族), 博士, 主治医师。

E-mail: zhangjianlin9@hotmail.com

的生成量较没有 LPS 刺激的生成量明显增多。以经过 LPS 刺激的单核细胞提取总 RNA 后的逆转录产物作为阳性对照。

1.6 总 RNA 的提取 采用 TRIzol Reagent 总 RNA 抽提试剂盒, 操作步骤按试剂盒附带的操作指南进行。电泳鉴定所提取 RNA 的完整性。经测所有样本 D_{260}/D_{280} 比值均大于 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/ μ l, -70°C 储存。

1.7 引物设计^[3] 应用 PC gene 软件(6.8 版)辅助设计引物。注意上、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 -actin 作为内源性内参照。TNF- α 基因上游引物: 5'-CGA GTG ACA AGC CTG TAG C-3', 与 TNF- α 基因 cDNA 第 403~421 脱氧核苷酸同源; 下游引物: 5'-CCT TCT CCA GCT GGA GAG C-3', 与 TNF- α 基因 cDNA 第 747~765 脱氧核苷酸互补。扩增产物长 363 bp。 β -actin 上游引物: 5'-GTG GGG CGC CCC CAG CCA- 3'; 下游引物: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC- 3'。扩增产物长 540 bp。引物由中科院生化所合成。

1.8 PCR 循环数 TNF α mRNA 扩增循环数为 28, β -actin mRNA 扩增循环数为 26。

1.9 RT-PCR 反应 每标本取 2 ml 总 RNA, 根据试剂盒提供的实验条件改进后进行 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, 以培养单核细胞 TNF- α mRNA 与 β -actin mRNA 的比值作为参照值, 标本 TNF- α mRNA 与 β -actin mRNA 的比值与该参照值的比值代表 PCR 扩增产物的相对含量, 测定并比较增生性瘢痕与正常瘢痕 TNF- α 表达的变化。

1.10 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验和方差分析, 用 SPSS 9.0 统计软件进行处理。

2 结果

2.1 瘢痕组织中 TNF- α 的免疫组化检测结果 T 淋巴细胞和巨噬细胞在早期瘢痕增生组织内浸润均非常丰富。巨噬细胞呈圆形、椭圆形或不规则形状, 体积较大, 核呈圆形或椭圆形, 胞质内有时可见吞噬颗粒; T 淋巴细胞呈圆形, 体积明显比巨噬细胞小。表皮、乳头下真皮层和网状真皮层均可见阳性细胞。随着瘢痕的成熟, 组织内这些免疫细胞浸润逐渐减轻。增生性瘢痕组织的 TNF- α 阳性细胞的平均百分比显著低于正常瘢痕组织(t 检验, $P < 0.01$), 且随着愈合时间的延长逐渐增高(方差分析, $P < 0.01$, 表 1)。

表 1 增生性瘢痕组织内 TNF- α 阳性细胞的检测

($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

部位	增生性瘢痕创面愈合时间(t /month)				正常瘢痕
	1~3	4~6	7~12	>12	
浅层	5.10 \pm 1.30	7.60 \pm 2.93	11.53 \pm 3.21	11.84 \pm 2.83	29.56 \pm 4.38**
深层	4.77 \pm 0.76	7.54 \pm 3.01	10.39 \pm 1.55	14.64 \pm 3.62	30.13 \pm 5.19**
平均	4.93 \pm 1.01	7.53 \pm 1.17	10.96 \pm 2.06	13.24 \pm 1.19	29.84 \pm 4.31**

** $P < 0.01$ 与增生性瘢痕组比较

2.2 增生性瘢痕组织中 TNF- α mRNA 表达 1~3、4~6、7~12、12 个月后的增生性瘢痕组织中 TNF- α mRNA 表达相

对值分别为 0.51 \pm 0.24、0.76 \pm 0.48、1.02 \pm 0.47、1.28 \pm 0.55, 正常瘢痕组为 1.56 \pm 0.66(图 1)。

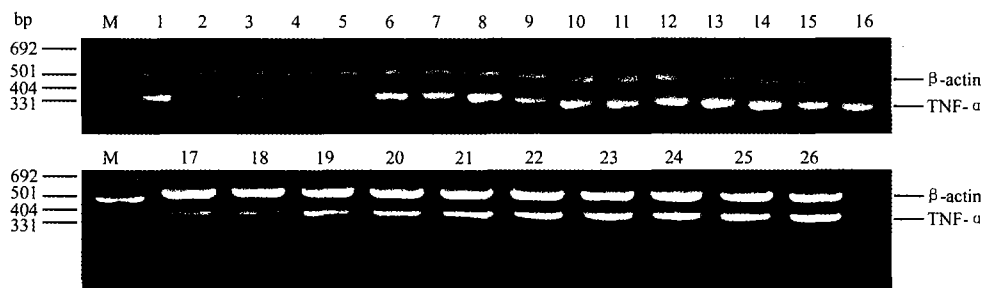


图 1 增生性瘢痕组织及正常瘢痕中 TNF- α mRNA 和 β -actin RT-PCR 产物

M: Marker; 1: 阳性对照; 2、3、4、17、18: 1~3 个月增生性瘢痕; 5、6、7、19、20: 4~6 个月增生性瘢痕; 8、9、10、21、22: 7~12 个月增生性瘢痕; 11、12、13、23、24: 12 个月后增生性瘢痕; 14、15、16、25、26: 正常瘢痕组织

3 讨论

本实验发现, 无论 T 淋巴细胞还是巨噬细胞在早期瘢痕

增生组织内浸润均非常丰富, 同时随着瘢痕的成熟, 组织内这些免疫细胞浸润逐渐减轻, 这与 Martin 等^[4]的发现相符合。但是, 增生性瘢痕组织中 TNF- α 的阳性细胞的百分比

呈阶段性递增趋势,即巨噬细胞分泌 TNF- α 的功能有所增强,但与正常瘢痕比仍显著降低。这说明 TNF- α 在增生性瘢痕的发生、发展过程中可能起重要作用。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 细胞功能性活动的降低,或存在多种 TNF 抑制物的缘故^[1]。

利用半定量 RT-PCR 检测增生性瘢痕演化过程的不同阶段组织中 TNF- α mRNA 的动态表达情况,发现随着增生性瘢痕的成熟,TNF- α mRNA 的含量逐渐增高,1~3、4~6、7~12、12 个月以上组间差异显著,但与正常瘢痕两两比较仍显较低。这说明 TNF- α 基因转录水平低下即巨噬细胞和激活的 T 细胞功能低下才是增生性瘢痕组织中 TNF- α 蛋白水平低下的真正原因。而随着增生性瘢痕的逐渐成熟,基因转录水平也相应升高,表明巨噬细胞和激活的 T 细胞功能逐渐增强。这可能是与抑制巨噬细胞或 T 细胞功能的因素逐渐消除(如肾上腺素、糖皮质激素等含量下降^[5]),而同时 INF- γ 等^[6]水平下降却较为缓慢有关。

目前认为 TNF- α 对成纤维细胞具有双向作用:低浓度时可以刺激成纤维细胞增殖,高浓度时则抑制成纤维细胞增殖。其原因可能与不同浓度 TNF- α 作用于成纤维细胞介导不同的信号转导途径有关。Ducan 等^[7]认为低浓度 TNF- α 对人皮肤成纤维细胞增殖有明显的促进作用,并促进 I、III 型胶原和聚氨基酸的合成。但以后的体外实验发现 TNF- α 能促进成纤维细胞的增殖,但对胶原合成是抑制的。Boyce 等^[8]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巨噬细胞合成及释放大量的 TNF- α ,TNF- α 作用于鼠成纤维细胞导致胶原酶合成增加、胶原降解,最终使瘢痕局限化。Zhang 等^[9]发现 TNF- α 能促进人滑膜成纤维细胞增殖,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,胶原等细胞外基质合成减少,组织中沉积减少。推测高浓度 TNF- α 通过 TRADD 介导信号传递,最终导致成纤维细胞的凋亡,从而抑制成纤维细胞的增殖。因为成纤维细胞数目减少,分泌胶原等细胞外基质随之减少,细胞外基质沉积也就减少^[10]。另外,Fedyk 等^[11]发现巨噬细胞分泌 TNF- α 直接抑制成纤维细胞表达基质衍生因子(SDF-1),导致真皮结构的稳定性降低。

既然 TNF- α 基因转录水平降低能导致增生性瘢痕形成,那么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,然后转移至受体细胞或细菌,经过筛选、培养最后得到 TNF- α cDNA 的克隆株,将为临床治疗增生性瘢痕提供有良好应用前景的疗法。人 TNF- α

双顺反子逆转录病毒载体的构建及其在成纤维细胞中的表达,产生局部高浓度 TNF- α 朝着这个方向迈进了一大步^[12]。

(致谢:本实验完成于全军重点实验室第二军医大学长海医院烧伤外科分子生物学实验室)

[参考文献]

[1] Peruccio D,Castagnolic C,Stella M, *et al.* Altered biosynthesis of tumor necrosis factor(TNF) alpha is involved in postburn hypertrophic scars[J]. *Burn*,1994,20(2):118-121.

[2] 巴德年.当代免疫学技术与应用[M].北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社,1998.156-158.

[3] 杨景山.医学细胞化学与细胞生物学技术[M].北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社,1990.6-16.

[4] Martin CW,Muir IF. The role of lymphocyte in wound healing [J]. *Br J Plast Surg*,1990,43(6):655-662.

[5] Joyce D,Steer J,Abraham L. Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function;control of TNF-alpha secretion[J]. *Inflamm Res*,1997,46(11):447-451.

[6] Xing Z,Zganiacz A,Santosuosso M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection; IL-12 and IFN gamma induction[J]. *J Leukoc Biol*,2000,68(6):897-902.

[7] Duncan MR,Berman B. Differential regulation of collagen, glycosaminoglycan, fibronectin and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin-1 α and β and TNF- α and β [J]. *J Invest Dermatol*,1989,92(5):699-706.

[8] Boyce DE,Thomas A,Hart J, *et al.* Hyaluronic acid induces tumor necrosis factor- α production by human macrophages *in vitro*[J]. *Br J Plast Surg*,1997,50(5):362-368.

[9] Zhang HG,Huang N,Liu D, *et al.* Gene therapy that inhibits nuclear translocation of nuclear factor KB results in tumor necrosis factor α -induced apoptosis of human synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*,2000,43(5):1094-1105.

[10] Kitson J,Raven T,Jiang YP, *et al.* A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis[J]. *Nature*,1996,384(6607):372-375.

[11] Fedyk ER,Jones D,Critchley HO, *et al.* Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing[J]. *J Immunol*,2001,166(9):5749-5754.

[12] Lai GH,Tang ZY,Chen SS. The construction of human TNF- α bicistronic retroviral vector and its expression in fibroblasts [J]. *Chin J Bioch Mol Biol*,1998,14(3):274-279.

[收稿日期] 2004-07-15 [修回日期] 2004-11-15

[本文编辑] 贾泽军,孙岩