

· 基础研究 ·

皮肤伤口愈合中转化生长因子 β 信号转导分子的表达

邱振中, 李锐, 魏振雪

【摘要】 目的: 观察转化生长因子 β (TGF- β) 的信号转导分子 Sand 2、Sand 3、Sand 4 在伤口愈合中的变化特点, 初步探讨其变化的意义。方法: 在伤后 1、3、5、7、10、15、20、30 天取伤口肉芽组织, 每个时相点 8 份, 用 Western blot 检测 Sand 2、Sand 3、Sand 4 的变化。结果: 伤后 Sand 2、Sand 3 出现两次高表达, 第一次发生在伤后 1 天~3 天, 第二次出现在伤后 10 天~15 天。Sand 4 高表达出现在伤后 10 天~15 天。结论: Sand 2 和 Sand 3 在炎症期的高表达提示 TGF- β , Sand 2 和 Sand 3 与炎症反应的启动、结束有密切关系; Sand 2、Sand 3 与 Sand 4 的高表达与肉芽组织大量合成胶原的时相一致; TGF- β 和它的下游信号分子 Sand 2、Sand 3 与 Sand 4 可能与增生性瘢痕形成密切相关。

【关键词】 伤口愈合; 信号传导; 转化生长因子 β

【中图分类号】 R751; R318 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726(2003)03-0173-03

Expression of transforming growth factor (TGF- β) signal transducer molecules during the course of skin wound healing QIU Zhen-zhong, LI Rui, WEI Zhen-xue, Dept. of Burns, The 3rd PLA Hospital, Baoji, Shaanxi Province 721004, China

【Abstract】Objective: To investigate the characteristics and significance of the expression of TGF- β signal transducer molecules sand 2, sand 3 and sand 4 during the course of skin wound healing. **Method:** At days 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 and 30 post wounding, 64 wound tissue specimen were collected and the expression of sand 2, sand 3 and sand 4 were compared using Western blot method. **Result:** There were 2 waves of high expression of sand 2 and sand 3. The first wave occurred at days 1 to 3 post wounding and the second wave at days 10 and 15 post wounding. The wave of high expression of sand 4 occurred at days 10 to 15 post wounding. **Conclusion:** High expression of TGF- β sand 2 and sand 3 in the inflammatory stage indicates that it is closely related to the initiation and termination of the inflammation. High expression of sand 2, sand 3 and sand 4 at days 10 to 15 post wounding is consistent with the synthesis of collagen during the course of skin wound healing. These indicate that TGF- β and its downstream signal molecules sand 2, sand 3 and sand 4 might be involved in hyperplastic scar formation.

【Key words】 wound healing; signal transduction; transforming growth factor beta

增生性瘢痕的发生受许多细胞因子的影响, 其中转化生长因子 β (TGF- β) 可能起着十分重要的作用^[1]。我们试图探讨 TGF- β 的信号转导分子 Sand 2、Sand 3、Sand 4 在伤口愈合中的变化规律, 并初步探讨其变化的意义。

一、材料和方法

1. 材料 64 份标本均取自我院住院患者

开放伤创面肉芽组织, 在伤后 1、3、5、7、10、15、20、30 天取伤口肉芽组织, 每个时相点 8 份。患者家属均签署了知情同意书并提供标本。患者年龄 22 岁~57 岁。所有取材部位常规换药, 内层生理盐水湿纱布包扎。标本无菌取材后, 立即置于液氮中保存备用。

2. Sand 2、Sand 3、Sand 4 的测定。(1) 肉芽组织总蛋白的提取。将组织块在液氮中碾成粉末, 加入预冷的 RIPA 液 [150mmol/L

万方数据

NaCl, 50mmol/L TrisHCl, pH7.4, 体积分数为 1% 的 NP-40, 1mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 1mmol/L 乙二醇四乙酸酯 (EGTA), 1g/L SDS, 5mmol/L 二巯基糖 (DTT), 5mmol/L 氟化钠 (NaF), 1mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 10ug/ml leupeptin, 10ug/ml 蛋白酶抑制剂 (aprotinin), 10ug/ml 碘乙酸胺 (iodoacetamide)] 匀浆, 冰浴中振摇 1h, 15000g 低温离心 10min, 留取上清液, 考马斯亮蓝试剂 (美国 Bio-Rad 公司) 测定蛋白浓度。(2) SDS-PAGE 电泳: 配制 12g/L 丙烯酰胺的分离胶, 3g/L 丙烯酰胺的浓缩胶。上样量为 50ug, 确定每孔加样蛋白质总量相等。选用已预先染色的标准蛋白质。30V 电泳至样品完全进入分离胶, 150V 继续电泳 6~7h, 结束电泳, 取出凝胶。(3) 蛋白质印迹和化学发光显色: 参考《分子克隆实验指南》的方法进行, 冷室中 22mA 恒流电转移 14h。根据标准蛋白的位置, 确定待测蛋白的所在区域, 切割硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜在室温下放置 30min, 经与含 5g/L 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液 (PBS) 保育 2h 以上后, 再与 Sand 3 抗体、Sand 4 抗体 (美国 Santa Cruz 公司) 摇动保育 1h, 抗体按 1:1000 配制。用含体积分数为 0.5% Triton X-100 的 PBS 洗膜 3 次; 与辣根过氧化物酶偶联的二抗 (美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司) 摇动保育 40min, 二抗浓度为 1:5000, 膜洗净后, 用 ECL (enhanced chemiluminescence detection kit, 美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司) 试剂显示蛋白印迹带。

二、结果

1. 伤口愈合过程中 Sand 2、Sand 3 的变化: 伤口愈合过程中 Sand 2、Sand 3 呈规律性变化, 伤后出现两次高表达, 第一次发生在伤后 1 天~3 天, 第二次出现在伤后 10 天~15 天。

2. 伤口愈合过程中 Sand 4 的变化: Sand 4 高表达出现在伤后 10~15 天, 与 Sand 2、Sand 3 第二次高表达同步。

三、讨论

Sand 是细胞内特异转导 TGF- β 调控信息的信号传递分子^[2]。Sand 2、Sand 3 属受体调节 Sand, 配体与受体结合后, 即可磷酸化 Sand 2、Sand 3, 使其激活。Sand 4 是共用 Sand, 当 Sand 2、Sand 3 激活磷酸化后必须与 Sand 4 形成复合物, 才能迁移至细胞核中促进靶基因表达。

TGF- β 是一种多功能的细胞因子, 与创伤修复和修复后组织重建的关系十分密切^[3]。TGF- β 与细胞膜上具有 Ser/Thr 激酶活性的 TGF- β 受体-II 特异性结合后, 促进受体-I, II 相互聚合形成二聚体, 磷酸化 Sand 2 或 Sand 3 因子, 使其活化, 激活后的 Sand 2 或 Sand 3 因子通过其梭基端的 MH2 结构域与共同介导的 Sand 4 相互作用, 形成异聚体进入细胞核内, 特异性结合在目的基因启动子上的 Sand 结合元件上, 调控特异的基因转录和翻译。因此, TGF- β 生物活性与 Sand 2、Sand 3 基因表达的变化密切相关^[4]。本实验观察到, 伤口愈合过程中 Sand 2、Sand 3 伤后出现两次高表达, 第一次高表达发生在伤后 1 天~3 天炎症期, 提示 Sand 2 和 Sand 3 与炎症反应的启动、结束有密切关系。

Ashcroft^[5]等研究发现, 去除 Sand 3 基因小鼠的皮肤伤口愈合过程中, 局部单核/巨噬细胞浸润明显减少, 上皮化进程加速, 纤维化程度降低。体外实验也证实皮肤成纤维细胞中 Sand 3 的活性被封阻后, TGF- β 不能诱导 I 型胶元的合成。凝胶迁移实验也证实 Sand 3 共聚物也能与 I 型胶元启动子结合, 促进胶元基因表达^[6,7]。本实验发现, Sand 2、Sand 3 在伤口愈合过程中出现两次高表达, 第二次高表达出现在伤后 10 天~15 天, 且 Sand 4 与 Sand 2、Sand 3 第二次高表达同步增加; 而伤后 10 天~15 天正是大量合成胶元, 肉芽组织向瘢痕组织过度的阶段; 提示 TGF- β 和其下游信号分子 Sand 2、Sand 3 与 Sand 4 可能与增生性瘢痕形成密切相关。

总之, Sand 2 和 Sand 3 在炎症期的高表达, 以及 Sand 2、Sand 3 与 Sand 4 的高表达与肉芽组织大量合成胶元的时相一致; 说明 TGF- β 和它的下游信号分子 Sand 2、Sand 3、Sand

4 可能与炎症反应的启动、结束有密切关系；与增生性瘢痕形成密切相关。

参考文献

- [1] 付小兵. 生长因子促(抑)创伤修复的临床应用与展望[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14: 365-368.
- [2] Roberts AB. TGF-beta signaling from receptors to nucleus[J]. Microbes Infect, 1999, 1: 1265-1273.
- [3] Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, et al. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta[J]. J Pediatr Surg, 1995, 30: 198-203.
- [4] Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators[J]. Curr Opin Cell Biol, 2000, 12: 235-243.
- [5] Ashcroft GS, Roberts AB. Loss of Smad 3 modulates wound healing[J]. Cytokine Growth Factor Rev,

2000, 11: 125-131.

- [6] Chen S J, Yuan W, Mori Y, et al. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3[J]. J Invest Dermatol 1999, 112: 49-57.
- [7] Poncelet AC, Schnaper HW. Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta-induced alpha 2(1) collagen expression in human glomerular mesangial cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 6983-6992.

【作者简介】

邱振中(1973—),男(汉族),安徽省阜阳市人,上海第二军医大学毕业,学士学位,主任,主治医师。

李锐(1973—),女(汉族),辽宁省大连市人,兰州军区医学高等专科学校毕业,护士长,护师。

魏振雪(1973—),男(汉族),安徽省宿州市人,总后勤部医学高等专科学校毕业,住院医师。

(收稿日期:2002-11-13;修回日期:2003-01-14)

关于评选第六届全国烧伤创疡科技进步奖的通知

中国中西医结合学会烧伤专业委员会拟于2004年5月在广西南宁召开第六届全国烧伤创疡学术会议,届时将在会上评选和颁发第六届全国烧伤创疡科技进步奖。现将有关事宜通知如下:

一、申报材料

1. 应用MEBT/MEBO临床工作总结(一千字左右,加盖本单位公章);
2. 能说明本单位开展MEBT工作的病例图片和录像带;
3. 撰写学术论文题目,其中在正式刊物上发表和会议交流论文数;
4. 由本地区、本部门主管单位授予文明单位、最佳单位、信得过单位等荣誉称号证书(复印件)。

二、评选条件:

1. 在推广普及以原位干细胞培植再生技术为基础的再生医学方面的基础研究、教学、临床医疗、护理工作中成绩显著,并有明显的社会效益和经济效益者。
2. 在结合本职工作实际,认真钻研学习再生医学新技术,并应用于临床,工作水平有较大提高者。
3. 在应用烧伤治疗新技术中不断总结提高,并有一篇以上专业学术水平较高的论文在正式刊物上发表者。
4. 临床应用新技术救治成批重症烧伤病人有较系统的工作程序和总结,成功救治大面积烧伤病人,并被评审为“烧伤康复明星”者优先。
5. 应用烧伤治疗新技术每年收治住院烧伤创疡病人在150人次以上,治愈率达到90%以上,未出现严重差错事故者。

三、申报办法:

1. 申报截止日期:2004年3月31日,以当地邮戳为准。
2. 申报材料报中国烧伤创疡科技中心办公室,地址:北京市宣武区广义街7号乐凯大厦1104室,邮编:100053,联系人:邢颖,联系电话:010-63042423, E-mail: periodical@mebo.com