DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.025
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)03-0251-03

论著

C-mer 在增生性瘢痕中表达与意义

王珍祥,李世荣,吴 军 (第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

提 要:目的 原癌基因 *C-mer* 与增生性病变关系密切。本研究探讨它在增生性瘢痕中所起的作用及意义。方法 收集瘢痕作为研究对象,利用原癌基因 *C-mer* 的基因特异片段制成寡核苷酸探针,与瘢痕组织切片和成纤维细胞爬片原位杂交,统计学处理后分析其变化规律。结果 早期增生性瘢痕中 *C-mer* 基因的探针在组织细胞中有较强阳性的反应,而非增生瘢痕则阳性反应较低,正常皮肤则更少。将增生性瘢痕与非增生瘢痕对比,二者差别特别显著。成纤维细胞爬片杂交结果存在相同的结果。结论 原癌基因 *C-mer* 与瘢痕增生之间存在密切关系。同时,抑制该基因的表达,有望实现减轻瘢痕增生。

关键词:增生性瘢痕;细胞骨架基因;原癌基因;*C-mer*
中图法分类号:R394.2;R619.6 文献标识码:A

Expression of protooncogene *C-mer* in hypertrophic scar and its significance

WANG Zhen-xiang, LI Shi-rong, WU Jun (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of protooncogene *C-mer* in hypertrophic scar and its significance. Methods Specimens were collected from patients. Oligonucleotide probe made using the specific fragment of protooncogene *C-mer* was hybridized with the frozen slices of scar tissues and cultured fibroblasts. Changes of gene expression were detected by *in situ* hybridization. Results Stronger *C-mer* expression was found in scar tissue than that in normal tissue ($P<0.01$). *C-mer* expression in hypertrophic scar was significantly stronger than that in non-hypertrophic scar ($P<0.01$). Conclusion Overexpression of protooncogene *C-mer* is closely associated with hypertrophic scar. Inhibition of *C-mer* expression may attenuate the formation of hyperplastic scar.

Key words: hypertrophic scar; cytoskeleton gene; protooncogene; *C-mer*

增生性瘢痕形成的分子生物学机制的研究仍处于资料积累阶段,没有深入系统的了解[1]。增生性瘢痕作为一种增生疾病,在分子机制上有多种基因的异常变化[2]。原癌基因 *C-mer* 是1994年发现的一种新基因,属于胺酸激酶AXI超家族,与增生性病变关系密切。本研究探讨原癌基因(*C-mer*)在增生性瘢痕形成与发展中基因分布特点与变化趋势以及在增生性瘢痕中所起的作用及意义,为发现治疗增生性瘢痕的新方法寻求理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集

所有病例均来自重庆市属医院,男女不限,年龄2~57岁,增生性瘢痕24例,扁平瘢痕24例,按伤后3、6、9、12个月不同时间分组编号。所取标本增生性瘢痕特点为早期外观发红充血、质硬、突出皮肤1 cm以上,有典型的挛缩症状。扁平瘢痕为突出皮肤不超过0.3 cm,无收缩,另设正常皮肤对照12例。标本均在手术中切取,并征得患者同意。

1.2 试剂

武汉博士德公司提供,寡核苷酸探针特异性片段序列为:原癌基因(*C-mer*) 5′-GGCCAGGCAAAGGAGAAAGAAGATCCAGGC-GTGGCAAAGAAGTGGCAGGAAGAGTCGAAG-GGCGCTTCTCATTCTCATGGATCTTCTTCA-3′。

1.3 瘢痕组织切片原位杂交

操作按试剂盒提供的步骤进行。切片厚度20 μm,经4%多聚甲醛固定,新鲜配制的0.5%的H_2O_2/甲醇灭活内源性过氧化物酶,胃蛋白酶消化暴露mRNA核酸片段,预杂交液处理,寡核苷酸探针37 ℃杂交过夜,滴加封闭液,分别用碱性磷酸酶标记的地高辛抗体、SABC、生物素化过氧化物酶处理,DAB试剂盒显色,梯度酒精脱水,透明,DPX封片,镜检。

1.4 瘢痕成纤维细胞原位杂交

取瘢痕与正常皮肤组织,洗尽血迹,剪成1 mm×1 mm×1 mm大小组织块,加10%小牛血清的DMEM培养液在37 ℃,5% CO_2 培养至长出纤维细胞,传至第2代。将经处理消毒的盖玻

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054204)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054204)
作者简介:王珍祥(1966-),男,湖北省黄州市人,博士,主治医师,主要从事瘢痕与神经再生方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754000-73091
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006
收稿日期:2003-06-16;修回日期:2003-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

片置于直径 10 cm 的培养皿内，盖玻片上滴加消化的成纤维细胞，继续培养至 90% 融合。取出盖玻片，4% 多聚甲醛固定 45 min，按上述原位杂交步骤反应显色。

1.5 统计学处理

采用 Mias 图像分析系统采集数据，SPLM 软件包行方差分析。

2 结果

C-mer 阳性细胞分布及特点：寡核苷酸探针杂交阳性为细胞着紫蓝色，着色越深，表明反应越强烈。本实验中，早期瘢痕中 *C-mer* 基因的探针在组织细胞中有较强阳性的反应，而晚期瘢痕则阳性反应较低，正常皮肤则更少，见图 1。*C-mer* 基因不仅在成纤维细胞中有阳性表达，而且在血管壁内也存在阳性显色。另外，阳性成纤维细胞在早期为胞浆、胞核均强的着色，其后，胞浆着色逐渐变淡，直至阴性，胞核仍可辨别。



图 1 3 个月增生性瘢痕中 *C-mer* 的阳性细胞 （ISH× 200）

Fig 1 Positive cells of *C-mer* expression in hypertrophic scar 3 months after burn （ISH× 200）

三种组织标本的对比观察：增生性瘢痕 3～6 个月 *C-mer* 的表达无论阳性细胞的数量，反应的着色程度，明显强于 9～12 个月增生性瘢痕、非增生瘢痕与正常皮肤。将增生性瘢痕与非增生瘢痕对比，两者差别特别显著，见表 1。

表 1 *C-mer* 寡核苷酸探针在组织中阳性表达（*A*，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Positive expression of *C-mer* in three tissues tested by oligonucleotide probe（*A*，$\bar{x}\pm s$）

Scar	*n*	Time after burn (months)			
		3	6	9	12
Hypertrophic	6	0.404 1±0.037 3*△	0.391 2±0.033 5*△	0.234 2±0.026 1△	0.174 3±0.021 1
Non-hypertrophic	6	0.253 7±0.027 1△	0.226 5±0.023 9△	0.176 8±0.015 4	0.136 9±0.011 8
Skin	6	0.027 4±0.004	0.027 4±0.004	0.027 4±0.004 0	0.027 4±0.004 0

*：$P<0.01$，*vs* non-hypertrophic and skin；△：$P<0.01$，*vs* groups of 3，6，9 months after burn

成纤维细胞爬片杂交结果：并非所有的成纤维细胞均有阳性着色，早期增生性瘢痕的成纤维细胞明显多于非增生瘢痕，而正常皮肤阳性细胞则极少。其中，3～6 个月增生性瘢痕的成纤维细胞内胞核、胞浆均有很强的阳性信号，明显强于非增生瘢痕，正常皮肤的成纤维细胞内信号极弱，见表 2。

表 2 瘢痕成纤维细胞爬片 *C-mer* 阳性表达百分比（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Percentage of positive expression of *C-mer* in scar fibroblasts（%，$\bar{x}\pm s$）

Scar	*n*	Time after burn (months)			
		3	6	9	12
Hypertrophic	6	31±4*△	29±4*△	16±1*△	9±1△
Non-hypertrophic	6	16±3*	12±2*	6±1*	2±1

*：$P<0.01$，*vs* non-hypertrophic and skin；△：$P<0.01$，*vs* groups of 3，6，9 months after burn

3 讨论

人类与哺乳动物在皮肤损伤达到一定程度均可有瘢痕形成。然而，与哺乳动物有所不同，人类皮肤损伤修复却可能产生过多的瘢痕组织。确切地讲，人类皮肤损伤有 4 种愈合方式：①胎儿皮肤无瘢痕愈合；②正常成人非增生性瘢痕愈合；③部分病例增生肥厚瘢痕愈合；④ Keloid 病人在轻微损伤时出现超越损伤范围的瘢痕反应。后二者也叫增生性瘢痕（HS）和瘢痕疙瘩（keloid），发生为两种特殊类型瘢痕有别于正常瘢痕。动态观察增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的临床过程和组织学演变过程，则可发现两者的发生与发展的沿袭了皮肤创伤愈合过程的各个阶段（炎症期、增生期、重塑期），其中某个阶段明显延长[3]。增生性瘢痕的病理学特征是炎症反应，成纤维细胞明显增生，胶原合成分泌亢进及细胞外基质堆积。在增生性瘢痕的形成过程中有着极其复杂的细胞活动与物质代谢的异常，但其病理学特点类似于良性肿瘤，即增生到一定阶段后停止生长。与良性肿瘤不同，瘢痕的动物模型的缺乏或难以复制瘢痕，极大限制了对瘢痕形成与影响因素的控制性研究。虽然经过长期的研究，在分子水平对瘢痕形成的认识还处于资料积累阶段，没有系统深入的认识，也无突破性的成果[4]。

随着分子生物学的迅速发展，基因组功能的研究日益受到重视，基因与疾病的关系得到更加深入的认识[5]。人类的多种疾病，包括孟德尔遗传病，多因素疾病和获得性遗传病多直接或间接地与基因有关。人类疾病是基因组信息与环境因子相互作用的结果。现代疾病研究的核心是阐明疾病的发生机制，为临床提供新的诊断、治疗和预防手段。实际上人类基因组计划 HGP 的直接始动因素就是要从整体上，而不是零碎地解决肿瘤等疾病的分子遗传学问题。增生性瘢痕作为一种增生疾病，在分子机制上有些方面类似于良性肿瘤。在肿瘤的研究中已发现多种基因的异常变化，并将肿瘤归结为基因病。由此类推，增生性瘢痕中，也会存在异常表达的基因，并由这些基因推动其发生发展。

近年来，在创伤愈合中的细胞凋亡现象备受关注，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞凋亡不仅参与正常创伤愈合的组织重建而且与增生性瘢痕的形成、消退密切相关, 调控细胞凋亡可能是增生性瘢痕防治的一条新途径。Ladin 等[6] 在病理性瘢痕组织及其培养成纤维细胞中, p53、bcl-2 和原癌基因 c-myc 蛋白的表达增强, 并伴有细胞凋亡率的降低; 杨银辉等[7] 报道, 在 8 例生性瘢痕组织中, B cell lymphoma/leukemia-2(bcl-2)表达的阳性率为 100%, bcl-2 associated protein(bax)、原癌基因 c-myc 在增生性瘢痕组织及其培养成纤维细胞中亦有表达。这些研究结果为从分子水平调控细胞凋亡, 并以此来治疗增生性瘢痕提供了线索; Desmoulier 等[8] 报道, c-myc 通过增强野生型中 p53(wtp53)的表达来诱导成纤维细胞凋亡, c-myc 在大鼠动脉血管平滑肌细胞中表达能诱导连续的细胞增殖或凋亡。Evan 等[9] 研究表明, c-myc 蛋白诱导无血清培养成纤维细胞的凋亡; 抑癌蛋白 p53 是细胞 DNA 损伤的感受器和细胞内凋亡信号的传递者。动物实验表明, wtP53 过度表达将导致撒离血清鼠成纤维细胞的大量凋亡, p53 通过转录依赖性和非依赖性二种机制来诱导细胞凋亡, 机制的采用取决于细胞类型和凋亡刺激种类。这些结果表明原癌与抑癌基因参与了增生性瘢痕的形成与发展。

原癌基因 *C-mer* 是 1994 年发现的一种新基因, 属于胺酸激酶 AXI 超家族, 在 T 与 B 淋巴细胞中有一定的阳性表达, 而淋巴瘤或淋巴肿大时表达明显增强, 与增生性病变关系密切。在体外培养的 T、B 细胞株少有表达, 但肿瘤的 T、B 细胞株均有大量的阳性产物。本实验显示, 增生挛缩的瘢痕组织细胞中原癌基因 *C-mer* 的表达信号强、分布广, 与瘢痕的形成与发展过程基本相同, 并且在体外培养的瘢痕成纤维细胞爬片中阳性率百分比也很高, 而非增生性瘢痕它的表达很快降到低水平, 正常皮肤中则难以看到, 结合原癌基因 *C-mer* 的功能特点, 该基因的高表达在瘢痕增生与收缩中可能起到重要作用。

参考文献:

[1] Waki E Y. Effects of phamacologic agents on human keloids implanted in athymic mice[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1999, 117(3): 1177—1189.

[2] Eisen M B, Brown P O. DNA array for analysis of gene expression[J]. Methods Enzymol, 1999, 302(1): 179—192.

[3] Mchugh A A, Fowlkes B J, Maevsky E I, *et al*. Biomechanical alterations in normal skin and hypertrophic scar after thermal injury[J]. J Burn Care Rehabil, 1997, 18(3): 104—108.

[4] Kischer C W, Pindur J, Shetlar M R, *et al*. Impants of hypertrophic scars and keloids into the nude (athymic) mouse: viability and morphology[J]. J Trauma, 1989, 29(5): 672—677.

[5] Castagnoli C, Stella M, Berthod C, *et al*. TNF production and hypertrophic scaring[J]. Cell Immunol, 1993, 147(1): 51—59.

[6] Ladin D A, Hou Z, Patel D, *et al*. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts[J]. Wound Repair Regen, 1998, 6(1): 28—37.

[7] 杨银辉, 付小兵, 李金岳, 等. Bcl-2 在增生性瘢痕和溃疡中的表达特征与意义[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(4): 302—304.

[8] Desmeuliere A, Redard M, Darby L, *et al*. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar [J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 56—62.

[9] Evan G I, Wyllie A H, Gibert C S, *et al*. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-mycprotein[J]. Cell, 1992, 69(1): 119—130.

(编辑　张　宁)

(上接 248 页)

加强烧伤留观病房的感染预防: 文献[1] 显示, 由于留观病房陪护、家属人员流动过大, 病室的空气含菌量明显高于监护室和治疗室, 为预防烧伤感染, 采取 3 以下针对性的控制措施。①通风早晚各 1 次, 每次 30 min。②夜间紫外线消毒 1 次, 每次 30~60 min。③控制陪伴数。每床留观病人的陪伴控制在 2 人以内。④含氯制剂拖地早晚各 1 次。⑤终末处理: 病人出院后病房行空气熏蒸消毒。

后勤保障: 留观病人因病情重、变化快, 取药、血浆、做各项化验检查较多, 为保障此项措施能尽快得到落实, 我们采用由护理保障中心统一拿取, 获得了满意的效果。

合理排班: 烧伤病人早期病情变化快, 工作量大, 在正常排班的情况下, 需临时增加 5:00~8:00, 19:00~23:00 的加强班, 既缓解值班护士的工作压力, 又便于各种治疗护理措施的落实。

特殊病人的处理: 需急诊手术的病人, 不由急诊医生经管, 而是按照病人救治轮转表上安排进行, 这样既解决了手术需要人员多, 又保证了病人病情观察及治疗方案的连续性。

制定烧伤早期救治流程: 收治大面积烧伤病人, 我科护士均按以下流程: 卫生整顿→测体重→抽血(合血、血常规、血生化检查)输液→吸氧、心电监护→皮试(青霉素、破伤风)→测体温→导尿→测血压、脉搏、呼吸、取体温表。用物准备除心电监护外均放在同一治疗车上推入病房。

开展留观病房 3 年, 共收治留观烧伤病人 452 例, 大面积烧伤 45 例, 急诊手术 10 例, 留观 1~3 d 收住院 389 例, 占 86%。年收容量增长率为 219%, 取得了较好的社会效益和经济效益, 值得推广。

关键词: 烧伤留观; 管理
中图法分类号: R473.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 黄先勇. 急诊环境与留观患者医院感染发生率的关系[J]. 中华感染学杂志, 2002, 12(2): 129—130.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net