



瘢痕疙瘩Fas基因外显子1~6基因突变的检测

瘢痕疙瘩是指人体某处皮肤损伤后引发或自发产生的胶原异常积聚所致的过度瘢痕化。它不同于增生性瘢痕,表现为过度生长,超过原伤口界限,侵犯临近组织,自始至终不退化,单纯手术切除后易复发。瘢痕疙瘩的发病机制较为复杂,近年来的研究表明,人体内瘢痕疙瘩成纤维细胞对生长因子的需求量以及对生长抑制因子的反应都与正常成纤维细胞不同,但具体机制仍不清楚[1]。

Fas基因属于肿瘤抑制基因,人Fas基因组DNA位于染色体10q23上,是全长为25 kb 的单拷贝基因[2]。其野生型基因的产物与Fas L或Fas单抗,引起Fas分子三聚化,传导死亡信号入胞内,引导 Fas阳性表达细胞的凋亡[3],对肿瘤的发生、发展起抑制作用[2]。这在肿瘤的研究领域比较成熟,但在瘢痕领域中尚未涉及。

我们前阶段实验研究发现,瘢痕疙瘩成纤维细胞虽然有高表达的Fas凋亡受体,但在Fas Mcab作用下不能正常凋亡;又对其Fas介导的死亡信号传递进行研究,发现死亡信号的传导阻滞出现在通道的上游[4][5],后又证实上游通道阻滞问题在于凋亡基因结构的改变,即Fas外显子8~9的基因有突变。提示瘢痕疙瘩形成与Fas这一凋亡基因突变有关。为深入了解其突变的发生率和规律,拟对Fas基因外显子1~6进行检测。通过对编码瘢痕疙瘩成纤维细胞Fas蛋白膜外区及跨膜区的基因结构的研究来探讨导致这种无功能Fas分子的可能机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 标本 本实验所有瘢痕疙瘩和增生性瘢痕组织及外周血均取自南方医院整形外科手术患者,均经临床及病理诊断证实。瘢痕疙瘩患者15例,男8例,女7例,病变部位分别为耳垂及前胸;增生性瘢痕患者12例,男8例,女4例,病变部位分别位于足背和肘部;患者年龄22~28岁;同时以患者自身正常皮肤及外周血为正常对照。

1.1.2 实验分组 本实验分为3组,分别为瘢痕疙瘩组、增生性瘢痕组及正常皮肤对照组。每组分别检测其组织及外周血标本中Fas分子的基因结构。

1.1.3 引物设计 见表1, 由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 *Fas* 基因外显子 1~6 引物序列Tab.1 Primer sequence of *Fas* gene exon 1-6

Name of exon	Primer sequence
<i>Fas</i> Exon 1.1	Forward: 5' GACAGGAATGCCCATTTGTG CAACG
	Reverse: 5' GAAGCGTCTT TGAACACC
<i>Fas</i> Exon 1.2	Forward: 5' GCAAGAGTGACACACAGGT
	Reverse:5' TCACCAGAGGTAGGAGGGTC
<i>Fas</i> Exon 2	Forward: 5' GCCAATTTTG GGTGGGTTACTACTGG
	Reverse: 5' GTGTAACATA CCTGGAGG
<i>Fas</i> Exon 3	Forward: 5' AGGTGAAAGGAAAGCTAGG
	Reverse: 5' GAAATTCCAAGATTGGCCTC
<i>Fas</i> Exon 4	Forward: 5' CTGCTTATAA TTAGCCGC
	Reverse:5' AGTCATCTAG TTGCTTGG
<i>Fas</i> Exon 5	Forward: 5' GGCCCCTAATTTACAAAGTGCC
	Reverse: 5' GGAAAGGAGGATATAACCGT
<i>Fas</i> Exon 6	Forward: 5' ACGGTTATATCCTCCTTTCC
	Reverse: 5' GAACAAAGCA AGAACTTACCC

1.2 方法[6]

1.2.1 外周血DNA的提取 取外周血0.5 ml，加入红细胞裂解液裂解，蛋白酶K消化后，再用酚-氯仿抽提法提取。提取的DNA用紫外分光光度计测定含量和纯度，并将其稀释至0.1 mg/ml贮于-40℃。

1.2.2 新鲜组织中DNA的提取 取瘢痕疙瘩或增生性瘢痕组织约100 mg，于玻璃匀浆器中碾碎，蛋白酶K消化后，再用酚-氯仿抽提法提取。提取的DNA用紫外分光光度计测定含量和纯度，并将其稀释至0.1 μg/μl贮于-40℃。

1.2.3 PCR 扩增及电泳检测 将4 μl DNA提取液加入到含总体积30 μl PCR反应体系的0.5 ml EP管中(含10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP及上、下游引物7.5 pmol/L, pH 8.3)。覆盖石蜡油后，94℃变性5 min，加入0.75 U Taq 酶，进入PCR扩增循环，条件为：94℃ 30 s、58℃ 45 s、72℃ 1 min，共35个循环，最后72℃再延伸7 min。10 μl PCR反应产物加样于2%琼脂糖凝胶，60 V，电泳30 min，紫外灯下观察照相。

1.2.4 SSCP 分析 取PCR 扩增产物8 μl加入变性剂10 μl，充分混匀后瞬间离心，97℃变性6 min，立即置于冰上，放-20℃ 5 min后加入到预冷的8%聚丙烯酰胺凝胶电泳，快速上样，同时在电泳槽的上槽内加TBE缓冲液冰块，400 V 10 min后，在100 V条件下电泳14 h。

电泳完毕，取下凝胶，10%乙醇浸泡5 min，1.13%硝酸浸泡3 min后使用0.012 mol/L硝酸银浸泡20 min，再用0.280 mol/L碳酸钠并0.019%甲醛震荡至条带出现，最后使用醋酸浸泡2 min，制成干胶保存，照相。

结果判定：在本实验中，瘢痕疙瘩组织与对照组比较，若出现等位基因条带的增多，则可能有基因突变。

1.2.5 DNA序列分析 经SSCP分析可疑的 PCR 扩增片段经纯化后送检，由全自动测序仪(Promega)完成该片段的序列分析。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳分析

所有样品DNA经PCR扩增后，均可以得到相应大小片段的目的DNA。在EB 的作用下，紫外灯下可见PCR扩增出来的相应DNA片段大小为220 bp的荧光带，即为待检产物(图1)。

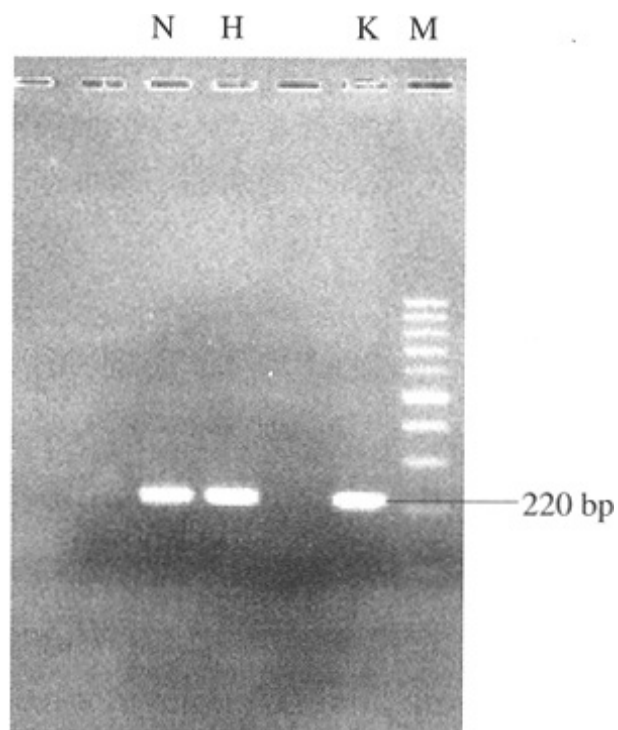


图1 外显子6的PCR产物

Fig.1 PCR result of exon 6

M: Maker; K: Keloids; H: Hypertrophic scar; N: Normal skin

2.2 SSCP分析

经PCR-SSCP检测，2例(2/15)瘢痕疙瘩组织中外显子6出现等位基因条带增多(图2)，提示存在基因突变。无论是在组织标本还是在外周血标本中均未见异常条带的存在。

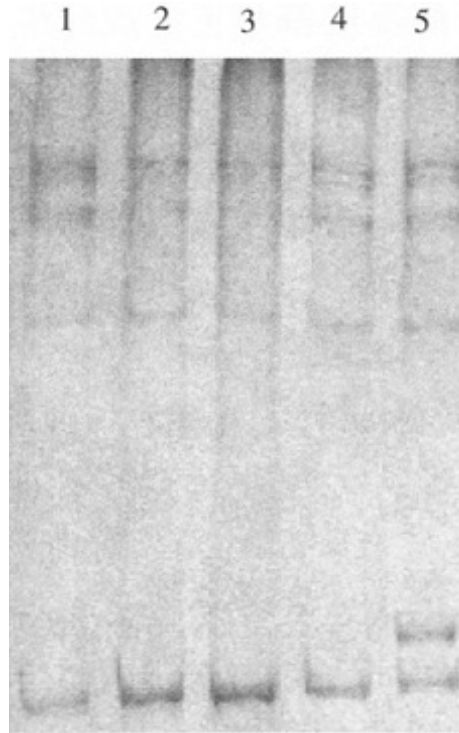


图2 外显子6的SSCP图谱

Fig.2 Gel single-strand conformational polymorphism analysis of exon 6
 1: Normal skin; 2: Blood of a patient with hypertrophic scar; 3: Hypertrophic scar; 4:
 Blood of a patient with keloids; 5: Keloids

2.3 基因序列分析

2例基因突变均位于内含子5与外显子6交界区，序列从TATG到AATGT，为插入突变与点突变的混合型突变。

3 讨论

瘢痕疙瘩的治疗是目前整形外科界最棘手的问题之一。近年来，关于瘢痕疙瘩形成机制的研究虽然取得一些进展，但目前仍不能从根本上解释瘢痕疙瘩发生的具体机制。前阶段我们的实验研究发现：瘢痕疙瘩成纤维细胞虽然有高表达的Fas受体，但在Fas Mcab作用下不能正常凋亡，同时通过研究证实Fas介导的死亡信号传递阻滞。据此，我们认为瘢痕疙瘩成纤维细胞的Fas受体可能处于无功能状态。

Fas基因突变包括遗传突变和体细胞突变。Fas基因遗传突变导致人类自身免疫淋巴增生综合征(autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS)的发病[7]，多发性骨髓瘤及白血病病人肿瘤细胞中均能检测到Fas基因的体细胞突变[8][9][10]。本实验发现瘢痕疙瘩成纤维细胞Fas基因的突变也属于体细胞突变。发生在编码蛋白膜外区1~5外显子的Fas基因突变可造成无表达或突变蛋白[11][12]。如果信号肽后立即出现终止突变，则无Fas蛋白表达。CRD1, CRD2, CRD3为半胱氨酸富含区，是FasL结合的必须位点，如果突变发生在这3个区域内，则突变蛋白不能与FasL结合，产生细胞凋亡缺陷。发生在编码蛋白跨膜区外显子6的基因突变如导致转录提前终止，则无完整的Fas蛋白表达，而产生可溶性Fas蛋白。

我们运用PCR-SSCP技术及基因序列分析检测了15例瘢痕疙瘩Fas基因外显子1~6的基因突变。外显子1~5未检测到突变，这段基因编码的Fas蛋白膜外区序列正常。有2例瘢痕疙瘩在外显子6与内含子5交界区存在突变，突变类型为混合型突变，点突变后紧接插入突变。其确切的功能尚不清楚，由于插入1个碱基，改变转录时的阅读框，可能影响翻译时的剪切，导致无完整的跨膜区；跨膜区的缺陷导致该病例瘢痕疙瘩成纤维细胞无Fas蛋白表达，Fas蛋白介导凋亡的功能丧失，而外周血中检测到可溶性Fas蛋白。其余的13例瘢痕疙瘩成纤维

细胞都有完整的Fas蛋白表达,且不影响Fas蛋白与Fas mAb的结合。根据本实验结果,瘢痕疙瘩成纤维细胞Fas蛋白无功能与Fas蛋白膜外区无关,少数病例可能有跨膜区缺陷。

结合我们以往的实验,所检测的15例瘢痕疙瘩Fas基因突变高发区为外显子8、9 [13]。外显子8和9编码Fas蛋白膜内区,这段基因存在多个突变位点,其直接的后果是此段基因编码的蛋白功能丧失,瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡缺陷,寿命延长,导致瘢痕疙瘩大量胶原积聚。而外显子6的突变只影响跨膜区,不影响Fas蛋白的膜内区。因此,瘢痕疙瘩成纤维细胞Fas蛋白无功能主要与Fas蛋白膜内区缺陷相关。本实验突变位点经同源性分析未找到相同的突变,是一个新的突变位点。增生性瘢痕、正常皮肤及所有样本的外周血标本均未发现异常,而瘢痕疙瘩组织标本Fas蛋白则存在功能缺陷,这种异常与其基因突变关系非常密切,对研究瘢痕疙瘩分子生物学发病机制及其防治有着重要的意义。

参考文献:

- [1] 汪良能, 高学书. 整形外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 318-35.
- [2] Cheng J, Liu C, William J, et al. Characterization of human Fas gene exon/intron organization and promoter region [J]. J Immunol, 1995, 154: 1239-45.
- [3] Iris B, Henning W, Peter H, et al. Structure of the human APO-1 gene[J]. Eur J Immunol, 1994, 24: 3057-62.
- [4] 鲁峰, 高建华, 黎小间, 等. Fas介导下瘢痕成纤维细胞的死亡信号转导的研究[J], 中华医学美容外科杂志, 2000, 6(1): 31-3.
Lu F, Gao JH, Li XJ, et al. "Death signal transduction" mediated by Fas on fibroblast derived from pathological scars[J]. Chin J Med Aesth, 2000, 6(1): 31-3.
- [5] 黎小间, 高建华, 鲁峰. 病理性瘢痕成纤维细胞Fas受体及Bcl-2蛋白的表达[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(3): 231-2.
Li XJ, Gao JH, Lu F. Expression of apoptosis-related Fas antigen and Bcl-2 protein in fibroblasts derived from hypertrophic scar and keloid[J]. J First Mil Med Univ, 2000, 20(3): 231-2.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 401-5.
- [7] Bettinardi A, Brugnoli D, Quiros-Roldan E, et al. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis[J]. Blood, 1997, 89(3): 902-9.
- [8] Sadahiro T, Ken-ichiro E, Hitoshi S, et al. Mutation of CD95(Fas/Apo1) gene in adult T-cell leukemia cells[J]. Blood, 1998, 91(15): 3935-42.
- [9] Terry H, Ning Q, Ibrahim B, et al. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma[J]. Blood, 1997, 90(11): 4266-70.
- [10] Michael C, Wang J, Janet K, et al. Clinical, immunologic and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis [J]. Blood, 1997, 89(4): 1341-8.
- [11] Akshay k, Jason R, Chu J, et al. The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95(Fas/Apo-1) mutation[J]. J Clin Invest, 1999, 103: 355-63.
- [12] Peter ME, Kischkel FC, Scheuerpflug CG, et al. Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex [J]. Eur J Immunol, 1997, 27(5): 1207-12.
- [13] 刘永波, 高建华, 鲁峰. 瘢痕疙瘩Fas基因(外显子7-9)突变的检测[J]. 解放军医学杂志, 2000, 25: 269.

参考文献:

- [1] 汪良能, 高学书. 整形外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 318-35.
- [2] Cheng J, Liu C, William J, et al. Characterization of human Fas gene exon/intron organization and promoter region [J]. J Immunol, 1995,154: 1239-45.
- [3] Iris B, Henning W, Peter H, et al. Structure of the human APO-1 gene[J]. Eur J Immunol, 1994, 24: 3057-62.
- [4] 鲁 峰, 高建华, 黎小间, 等. Fas介导下瘢痕成纤维细胞的死亡信号转导的研究[J], 中华医学美容外科杂志, 2000, 6(1): 31-3.
Lu F, Gao JH, Li XJ, et al. "Death signal transduction" mediated by Fas on fibroblast derived from pathological scars[J]. Chin J Med Aesth, 2000, 6(1): 31-3.
- [5] 黎小间, 高建华, 鲁 峰. 病理性瘢痕成纤维细胞Fas受体及Bcl-2蛋白的表达[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(3): 231-2.
Li XJ, Gao JH, Lu F. Expression of apoptosis-related Fas antigen and Bcl-2 protein in fibroblasts derived from hypertrophic scar and keloid[J]. J First Mil Med Univ, 2000, 20(3): 231-2.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 401-5.
- [7] Bettinardi A, Brugnoli D, Quiros-Roldan E, et al. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis[J]. Blood, 1997, 89(3): 902-9.
- [8] Sadahiro T, Ken-ichiro E, Hitoshi S, et al. Mutation of CD95(Fas/ Apo1) gene in adult T-cell leukemia cells[J]. Blood, 1998, 91(15): 3935-42.
- [9] Terry H, Ning Q, Ibrahim B, et al. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma[J]. Blood, 1997, 90(11): 4266-70.
- [10] Michael C, Wang J, Janet K, et al. Clinical, immunologic and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis [J]. Blood, 1997, 89(4): 1341-8.
- [11] Akshay k, Jason R, Chu J, et al. The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95(Fas/Apo-1) mutation[J]. J Clin Invest, 1999, 103: 355-63.
- [12] Peter ME, Kischkel FC, Scheuerpflug CG, et al. Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex [J]. Eur J Immunol, 1997, 27(5):1207-12.
- [13] 刘永波, 高建华, 鲁 峰. 瘢痕疙瘩Fas基因(外显子7-9)突变的检测[J]. 解放军医学杂志, 2000, 25: 269.