

## 瘢痕疙瘩 Fas基因外显子 1~6 基因突变的检测

刘永波,高建华,段红杰(第一军医大学南方医院整形外科,广东 广州 510515)

**摘要:**目的 检测 Fas基因外显子 1~6,探讨 Fas凋亡基因在瘢痕疙瘩组织中的结构异常与临床病理的关系。方法 采用 PCR银染技术,检测 15例瘢痕疙瘩标本 Fas外显子 1~6的基因结构。结果 所检测的 15例瘢痕疙瘩,2例 Fas基因外显子 6出现电泳条带增多,测序证实存在基因突变,为插入突变与点突变的混合型突变,且经同源性分析为一新突变位点。结论 少数瘢痕疙瘩病例 Fas凋亡基因编码的蛋白无功能可能与其编码跨膜区的基因结构异常有关。

**关键词:**瘢痕疙瘩;Fas;单链构象多态性分析;基因突变

中图分类号:Q754 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)01-0061-03

### Detection and analysis of Fas gene exon 1-6 mutations in keloids

LIU Yong-bo,GAOJian-hua,DUANHong-jie

Department of Plastic Surgery, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract** Objective To detect Fas DNA mutations (exon 1-6) in the fibroblasts of patients with keloids, thereby to understand the clinicopathological implications of altered structure of the keloids. Methods PCR followed by single-strand conformational polymorphism analysis and direct DNA sequencing were used to detect Fas gene mutations in 15 patients with keloids. Results Insertion and point mutations were identified on the boundary between intron 5 and exon 6 in two patients, while no Fas mutations were found in the fibroblasts derived from normal skins samples of any of the patients. Conclusion Nonfunction of Fas protein may be related to aberrant gene structure that codes for the transmembrane domain.

**Key words** keloid; Fas; single-strand conformational polymorphism; gene mutation

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<sup>[1]</sup>。

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 25kb的单拷贝基因<sup>[2]</sup>。其野生型基因的产物与 FasL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<sup>[3]</sup>,对肿瘤的发生、发展起抑制作用<sup>[2]</sup>。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 FasMcab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<sup>[4,5]</sup>,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。

#### 1.2 方法<sup>[6]</sup>

1.2.1 外周血 DNA的提取 取外周血 0.5ml,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 0.1mg/ml贮于 -40。

1.2.2 新鲜组织中 DNA的提取 取瘢痕疙瘩或增生

收稿日期:2001-03-20

基金项目:国家自然科学基金(39870807)

作者简介:刘永波(1970-),男,湖南湘潭人,2001年毕业于第一军医大学,硕士,医师,电话:020-85141114-87260

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
FasExon1.1	Forward:5' GACAGGAATGCCCATTTGTGCAACG
	Reverse:5' GAAGCGTCTTTGAACACC
FasExon1.2	Forward:5' GCAAGAGTGACACACAGGT
	Reverse:5' TCACCAGAGGTAGGAGGGTC
FasExon2	Forward:5' GCCAATTTTGGGTGGGTTACACTGG
	Reverse:5' GTGTAACATACCTGGAGG
FasExon3	Forward:5' AGGTGAAAAGAAAGCTAGG
	Reverse:5' GAAATCCAAGATTGGCCTC
FasExon4	Forward:5' CTGCTTATAATTAGCCGC
	Reverse:5' AGTCATCTAGTTGCTTGG
FasExon5	Forward:5' GGCCCTAATTTACAAAAGTGCC
	Reverse:5' GGAAAGGAGGATATAACCGT
FasExon6	Forward:5' ACGGTTATATCCTCCTTTCC
	Reverse:5' GAACAAAGCAAGAACTTACCC

性瘢痕组织约 100mg,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 0.5ml EP 管中 (含 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol/L dNTP 及上、下游引物 7.5pmol/L, pH8.3)。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 30s 58 45s 72 1min,共 35 个循环,最后 72 再延伸 7min。10 μl PCR 反应产物加样于 2% 琼脂糖凝胶,60 V,电泳 30min,紫外灯下观察摄影。

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 6min,立即置于冰上,放 -20 5min 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,400V 10min 后,在 100V 条件下电泳 14h

电泳完毕,取下凝胶,10%乙醇浸泡 5min,1.13% 硝酸浸泡 3 min 后使用 0.012 mol/L 硝酸银浸泡 20 min,再用 0.280mol/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 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 220bp 的荧光带,即为待检产物 (图 1)。

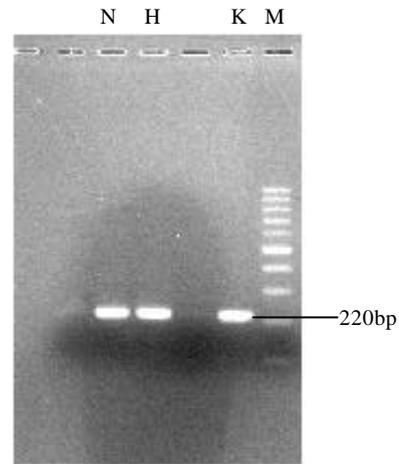


图 1 外显子 6 的 PCR 产物

Fig.1 PCR result of exon 6

M:Maker;K:Keloids;H:Hypertrophicscar;N:Normalskin

### 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。

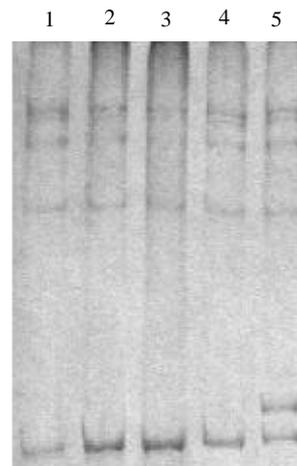


图 2 外显子 6 的 SSCP 图谱

Fig.2 Gel single-strand conformational polymorphism analysis of exon 6

1:Normalskin;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<sup>[7]</sup>,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<sup>[8-10]</sup>。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<sup>[11,12]</sup>。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<sup>[13]</sup>。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 Bcl2 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 abnormallymphocyte 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 M E, Kischkel F C, Scheuerpflug C G, 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.