

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)04-0371-03

深Ⅱ度烧伤早期及愈后增生性瘢痕组织中 p16 基因表达的甲基化调控

姚庆君¹ 陈璧¹ 胡大海¹ 徐明达¹ 董茂龙¹ 王树森²(第四军医大学西京医院: ¹烧伤外科, ²骨科, 陕西 西安 710033)**Methylation control of p16 gene expression in early phase of deep second degree burn and hypertrophic scar after burn healing**YAO Qing-Jun¹, CHEN Bi¹, HU Da-Hai¹, XU Ming-Da¹, DONG Mao-Long¹, WANG Shu-Sen²¹Department of Burn Surgery, ²Department of Orthopedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the methylation level of p16 gene, one tumor suppressing gene in genome, in early phase of deep second burn and different phases of hypertrophic scars after burn healing. METHODS: Samples of 17 d, 30 d and 44 d were selected as early phase of deep second degree burn and the samples of 4 mo, 8 mo, 18 mo and 32 mo as different phases of hypertrophic scars. Five cases were assigned to each group and the methylation level of p16 gene was observed by methylation specific polymerase chain reaction (MS PCR). RESULTS: The p16 gene methylation level was significantly higher in 17 d and 30 d after burn. It was lower in 4 mo but higher in 18 mo and 32 mo of hypertrophic scars, compared with that in normal skin. CONCLUSION: The high methylation level of p16 gene in early phase of deep second degree burn may promote the wound healing. The low methylation level of p16 gene in 4 mo hypertrophic scars may suppress the rapid growth of hypertrophic scars. But the high methylation level of p16 gene in 8 mo hypertrophic scar may be responsible for the rapid growth of hypertrophic scars.

【Keywords】 burns; cicatrix; hypertrophic; genes; p16; DNA methylation; polymerase chain reaction

【摘要】 目的: 了解深Ⅱ度烧伤愈合早期及愈合后不同时期增生性瘢痕基因组中抑癌基因 p16 甲基化程度。方法: 深Ⅱ度烧伤临床标本取材在烧伤后 17、30、44 d 及愈后 4、8、18、32 mo 增生性瘢痕组织, 每组 5 例, 用 DNA 甲基化特异性 PCR

(methylation-specific PCR, MS PCR) 动态观察基因组中 p16 基因甲基化情况。结果: 与正常组织相比, p16 基因甲基化水平在深Ⅱ度烧伤愈合前 17、30 d 组织中显著增高, 在愈后 4 mo 增生性瘢痕组织中 p16 基因的甲基化水平显著降低, 在 8 mo 以后的增生性瘢痕组织中逐渐增高, 瘢痕增生时间越长, 甲基化程度越高。结论: p16 基因在烧伤愈合早期高甲基化可能与促进愈合有关, 在 4 mo 增生性瘢痕中低甲基化可能对快速的瘢痕增生有抑制作用, 8 mo 以后逐渐增高的甲基化水平可能是瘢痕继续增生的重要原因。

【关键词】 烧伤; 瘢痕; 肥大性; 基因; p16; DNA 甲基化; 聚合酶联反应

【中图分类号】R644

【文献标识码】A

0 引言

DNA 甲基化是真核细胞基因表达调控的重要修饰之一^[1], p16 作为重要的抑癌基因在细胞增殖、分化发育及肿瘤的生长等方面起着重要作用^[2], 运用 DNA 甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MS PCR) 动态观察创伤愈合过程中及愈后增生性瘢痕中 p16 基因甲基化情况, 对理解增生性瘢痕的发生发展具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 取自临床深Ⅱ度烧伤后 17、30、44 d 标本及愈合后 4、8、18、32 mo 增生性瘢痕标本, 对照为正常皮肤组织标本, 男女不限, 年龄 18~45 岁, 每个时间点 5 例标本。亚硫酸氢钠对苯二胺(西安化学试剂厂), DNA 回收试剂盒(北京赛百盛公司), DNA 提取试剂盒(北京鼎国生物科技有限公司), PCR 循环仪(Eppendorf of AG Master 美国), 凝胶成像仪(Alpha Innotech Corporation 美国), BIO-RAD 分光光度计(美国)。

1.2 方法

1.2.1 基因组提取 约 500 mg 组织剪碎后加入 200 μL 5 mol/L KI 匀浆, 氯仿、异戊醇抽提蛋白, 乙醇沉淀 DNA, DNA 溶于 40 μL 水中, 检测 A 值及 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值, 确定浓度和纯度。

1.2.2 p16 基因启动子区 5' CpG 甲基化状态检测

① 亚硫酸氢钠修饰: 1 μg DNA 溶于 20 mL 水中, 以

收稿日期 2004-04-19; 修回日期 2004-11-22

作者简介 姚庆君(1968-) 男(汉族), 吉林省九台市人, 博士, 主治医师, 讲师。Tel. (029) 83375297 Email. qingjun@fmmu.edu.cn

新配制的 0.2 mol/L NaOH 使 DNA 变性,加入 12 μ L 10 mmol/L 对苯二酚、208 μ L 亚硫酸氢钠修饰,50 $^{\circ}$ C 孵育 16 h,用 DNA 提取试剂盒纯化,加 0.3 mol/L NaOH 终止反应,乙醇沉淀 DNA,溶于 40 μ L 双蒸水中,-20 $^{\circ}$ C 保存;② 甲基化 PCR 扩增:参照文献 [3] 合成二对引物:分别为 p16 野生型(p16^W) 甲基化引物(p16^M) p16^W 上游引物序列为 cagagggtggggcg-gaccgc,下游引物序列为 cagagggtggggcg-gaccgc p16^M 上游引物序列为 ttattagagggtggggcg-gaccgc,下游引物序列为 gacccegaaccgcgaccgtaa;PCR 反应体积为 25 μ L:10 mmol/L dNTP 2 μ L,10 \times buffer 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L,上下游引物各 1 μ L,Taq DNA 聚合酶 1 μ L,DNA 模板 100 ng,其余水补足至 25 μ L PCR 反应退火温度均为 65 $^{\circ}$ C,p16^W 产物片段大小为 140 bp,p16^M 为 150 bp;DNA 未被亚硫酸氢钠修饰时 p16^W 引物扩增出产物,否则可被 p16^M 引物扩增;③ PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖电泳,PCR 产物在凝胶成像后存成 TIFF 格式图像文件,在 Koda Digital Science 1D 灰度扫描软件测定各 PCR 产物平均灰度值,p16 基因甲基化水平 = p16^M 平均灰度值/p16^W 平均灰度值。

统计学处理:数据经第四军医大学开发的 SPLM 统计软件处理,对各时间点 p16 基因甲基化水平的均数比较用方差分析,两两比较,用 Dunnet-*t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 最适循环数的选择 以 p16^W PCR 产物与循环数之间做研究,在 17、20、23、26、29、32、35 循环间,PCR 产物与循环数之间均有线性关系存在(17 个循环以下肉眼不能看到条带),我们选择 32 个循环,在 DNA 未被亚硫酸氢钠修饰时,各时间点 p16^W PCR 产物见 Fig 1。DNA 被亚硫酸氢钠修饰时,各时间点 p16^W 未扩增出 PCR 产物。

表 1 创伤愈合前、后瘢痕组织中 p16 基因启动因子与 CpG 岛甲基化水平

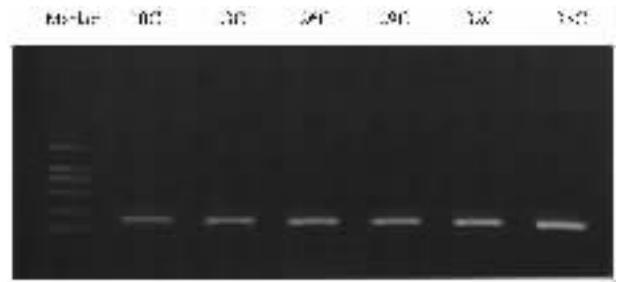
Tab 1 Methylation level of promoter and CpG island of p16 gene before wound healing and in the hypertrophic scar after wound healing

Time after burn	17 d	30 d	44 d	4 mo	8 mo	18 mo	32 mo
Methylation level	46.3 \pm 2.1 ^b	52.8 \pm 2.7 ^b	34.6 \pm 1.4	14.7 \pm 1.1 ^b	34.2 \pm 1.5	43.6 \pm 2.6 ^b	48.4 \pm 2.3 ^b

^b $P < 0.01$ vs normal skin(30.7 \pm 1.8).

3 讨论

DNA 甲基化是一种碱基修饰,关闭了基因的表达

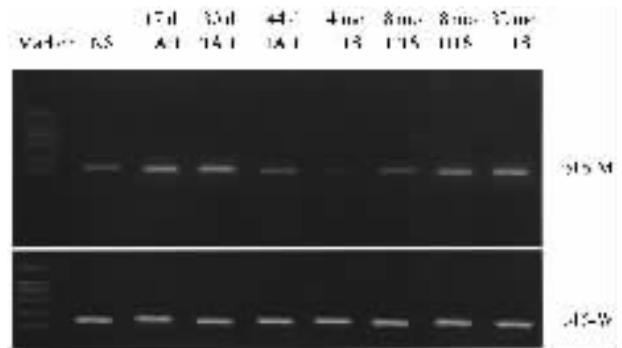


C : one amplify cycle.

Fig 1 p16^W PCR products increase with the increase of amplification cycles

图 1 p16^W PCR 产物随扩增循环数增加

2.2 甲基化水平 与正常组织相比,p16 基因在伤后 17、30 d 甲基化水平增高($P < 0.01$),在愈后 4 mo 增生性瘢痕组织中显著降低($P < 0.01$),在 18、32 mo 的长时间增生性瘢痕组织中甲基化水平增高($P < 0.01$)。p16 基因甲基化水平在烧伤愈合早期及愈后不同时间的增生性瘢痕组织中不断变化。p16^M 与 p16^W PCR 产物电泳结果见 Fig 2,各时间点甲基化水平见 Tab 1。



NS : normal skin ;TAB : tissue after burn ;HTS : hypertrophic scar.

Fig 2 Analysis of p16^M and p16^W PCR products with agarose electrophoresis

图 2 p16^M 与 p16^W PCR 产物琼脂糖电泳结果

活性,DNA 甲基化程度与基因表达调控密切相关,参与了细胞生长、发育过程及染色体印记、X 染色体失

活等调控,基因启动子及其周围区域内 CpG 甲基化是众多基因实现去表达(沉默)和基因印记的重要途径,在分化发育中,不同组织中的相同基因通过甲基化的改变实现其生物各功能及其细胞表型的改变^[4,5]。通过测定启动子 CpG 周围碱基甲基化状态了解基因是否去表达,为在 DNA 水平研究基因表达提供了重要途径。p16 基因位于人类第 9 号染色体,p16 蛋白可使细胞周期阻滞(arrest),与细胞增殖、分化发育、肿瘤生长有重要关系,p16 基因的突变、缺失、及其高 DNA 甲基化在肿瘤的发生、发展中有重要作用^[6-8]。在创伤愈合中细胞增殖存在正与负两种调控细胞周期的平衡因素,p16 是一种重要的负性调控因子,了解烧伤愈合过程中及烧伤后增生性瘢痕组织中 p16 基因的甲基化程度,对丰富创伤愈合理论及瘢痕过度增生机制可能具有重要意义。甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR,MS PCR)是检测基因组 DNA 甲基化水平的常用方法^[9]。MS-PCR 能灵敏检测出 1/1000 细胞中发生了甲基化,扩增出目的片段的多少反映了该组织中甲基化水平。以 p16-W 为参照,与各组间 p16-M 相比较,能客观反映每组的甲基化程度。

与正常组织相比,创伤愈合前 17 d 时,p16 基因甲基化水平显著增高,使 p16 基因表达量降低,符合创伤愈合促进细胞分裂、增殖的需要,这种情况在创伤愈合后仍然存在,在伤后 30 d 时,深 II 度烧伤创面已愈,p16 基因的高甲基化可能与创面封闭后组织的继续改建相适应;之后 p16 基因的甲基化水平逐渐降低,在伤后 44 d 时接近正常组织水平,在愈后 4 mo 的增生性瘢痕组织中出现了显著降低,使 p16 基因表达逐渐增高,对处于增殖、参与改建的细胞有“刹车”作用,与促细胞增殖的因素相适应。在深 II 度创伤愈合后增生性瘢痕组织中,p16 基因的甲基化程度逐渐增高,瘢痕增生时间越长,p16 基因的甲基化程度越高,分析可能创面愈合后,组织改建继续进行,细胞增殖需要正性与负性两种因子失衡,降低负性因子的表达,可能是体内更节约的方式,所以在增生的瘢痕组织中通过 p16 基因的甲基化来实现负性调控因子的降低,改建时间越长,抑癌基因 p16 的甲基化修饰程度越高,增生性瘢痕持续的时间及 p16 基因的甲基化程度相关,抑癌基因的甲基化可能是增生性瘢痕不能迅速转为平稳瘢痕的重要原因,增生性瘢痕中可能存在增殖与抑制细胞增殖两种因素的不平衡,因此检测

稳定瘢痕及瘢痕疙瘩中 p16 基因甲基化水平与增生性瘢痕相比较具有重要意义,这将在以后的实验中进一步研究。

【参考文献】

- [1] Popiela A, Keith G, Borzecki A, et al. The meaning of the methylation of genomic DNA in the regulation of gene expression levels[J]. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004 25(2): 145-149.
- [2] Sherr CJ. Principles of tumor suppression[J]. *Cell* 2004 ;116(2): 235-246.
- [3] 刘晓颖,汪惠国,鲁云霞,等. p16 基因甲基化特异检测方法的建立及其初步应用[J]. *安徽医科大学学报* 2002 37(1): 18-21.
Liu XY, Wang HG, Lu YX, et al. Establishment and preliminary application of methylation specific method for detecting p16 gene[J]. *Acta Univ Med Anhui* 2002 37(1): 18-21.
- [4] Kusy S, Larsen CJ, Roche J. p14(ARF), p15(INK4b) and p16(INK4a) methylation status in chronic myelogenous leukemia[J]. *Leuk Lymphoma* 2004 45(10): 1989-1994.
- [5] Sakuma K, Chong JM, Sudo M, et al. High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma[J]. *Int J Cancer* 2004 112(2): 273-278.
- [6] 孙永柱,崔鹏程,陈文弦,等. 外源性 p16 基因稳定转染对喉癌细胞周期和增殖的影响[J]. *第四军医大学学报* 2003 24(4): 331-334.
Sun YZ, Cui PC, Chen WX, et al. Effects of exogenous p16 gene on the cell cycle and proliferation of Hep-2 laryngeal cancer cell line[J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2003 24(4): 331-334.
- [7] 鲁建国,林晨,黄志强,等. p16 和 p53 基因及顺铂联用对胆管癌细胞系 QBC939 的生长抑制作用[J]. *第四军医大学学报*, 2002 23(21): 1923-1925.
Lu JG, Lin C, Huang ZQ, et al. Inhibitory effects of human cholangiocarcinoma cell line by recombinant adenoviruses p16 and p53 transduction[J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2002 23(21): 1923-1925.
- [8] 金向阳,金明,王中琨,等. 转染野生型 MTS1 基因的膀胱癌细胞中 p16 蛋白的可控表达及意义[J]. *第四军医大学学报* 2000 ; 21(11): 1330-1332.
Jin XY, Jin M, Wang ZK, et al. Controlled expression and significance of p16 protein in bladder carcinoma cells transfected wild type MTS1[J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2000 21(11): 1330-1332.
- [9] 范保星,张开泰,吴德昌. DNA 甲基化检测方法[J]. *国外医学遗传分册* 2002 25(2): 99-101.
Fan BX, Zhang KT, Wu DC. Detecting methods of DNA methylation[J]. *Foreign Med Sci · Sect Hered* 2002 25(2): 99-101.

编辑 袁天峰