[文章编号] 1000- 4718(2005)01- 0011- 05

不同胎龄的胎儿和少儿皮肤中 bax, bcl- 2 和 p53 基因表达的变化*

陈 伟[1], 付小兵[1], 葛世丽[2], 周 岗[1], 姜笃银[1], 孙同柱[1], 韩 冰[1], 盛志勇[1]
([1]解放军 304 医院全军创伤修复重点实验室, 北京 100037; [2]军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

[摘 要] **目的**: 探讨凋亡相关基因 bax, bcl- 2 和 p53 在不同胎龄的胎儿皮肤和少儿皮肤组织中表达的变化特征及其可能的生物学意义。**方法**: 运用末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺口标记技术(TUNEL)检测 18 例不同胎龄(13- 32 周)的胎儿皮肤和 6 例少儿皮肤组织中细胞凋亡的变化后, 提取这些皮肤组织中的总 RNA, 分离 mRNA, 用 RT- PCR 方法检测 bax, bcl- 2 和 p53 基因在不同组织中的表达变化特征。**结果**: 随着胎儿的生长发育, 皮肤组织中的细胞凋亡率逐渐增加。在早期妊娠胎儿的皮肤中, bcl- 2 基因表达水平较高, 随着胎龄的增加, bcl- 2 基因的转录本含量逐渐降低, 在少儿的皮肤组织中, 这种基因的表达量明显低于早期妊娠胎儿皮肤($P < 0.01$)。与 bcl- 2 基因不同, 在早期妊娠胎儿皮肤组织中, p53 基因表达水平较低, 而在晚期妊娠胎儿和少儿的皮肤内, 该基因表达较强, 而 bax 基因在不同发育时期的胎儿和少儿皮肤组织中表达差异不显著($P > 0.05$)。**结论**: 晚期妊娠胎儿和少儿皮肤组织中细胞增殖减缓, 细胞趋向分化或凋亡的增加可能与 p53 基因表达增强, bcl- 2 表达降低相关; 而 p53 表达降低, bcl- 2 表达升高可能是早期妊娠胎儿皮肤中细胞凋亡较少的机制之一。

[关键词] 基因, bax; 基因, bcl- 2; 基因, p53; 胎儿皮肤; 细胞凋亡
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

皮肤是机体最大的器官, 覆盖全身, 具有营养和保护体内组织各器官的功能。在皮肤发生过程中, 皮肤干细胞和短暂扩增细胞快速分裂增殖, 产生大量细胞的同时, 皮肤组成细胞不断凋亡、脱落, 维持皮肤结构的相对稳定。细胞凋亡(apoptosis)是由凋亡相关基因编码的蛋白调节控制。Bax 蛋白能够促进细胞凋亡, 而 Bcl- 2 则抑制凋亡的发生[1]。抑癌蛋白 P53 具有多种生物活性, 在抑制细胞增殖的同时, 诱导细胞凋亡或分化[2,3], 因此 bax、bcl- 2 和 p53 基因表达的变化对细胞凋亡的发生起着十分重要的调节作用。目前关于这 3 种凋亡相关基因在不同发育时期皮肤中的表达变化还没有报道, 对这一问题的阐明, 将有助于从深层次上了解皮肤发生、发育的分子机制, 同时也为促进皮肤创面修复提供发育学上的依据。

材 料 和 方 法

1 标本来源及制备

由本院妇产科提供因创伤等意外因素终止妊娠的胎儿背部全层皮肤, 共 18 例, 胎龄(embryo gestational age, EGA)为 13- 32 周, 其中 EGA- 13 周, 15 周, 17 周, 21 周, 23 周, 25 周, 28 周, 30 周和 32 周各 2 例。根据胎儿发生的不同时期, 将胎儿皮肤标本分为 3 类: 早期妊娠胎儿皮肤(EGA 13- 17 周), 中期妊娠胎儿皮肤(EGA 21- 25 周)和晚期妊娠胎儿皮肤(EGA 28- 32 周)。对应的 6 例少儿皮肤为整形手术少儿患者供皮区的全层皮肤, 男 4 例, 女 2 例, 年龄 4- 12 岁。取材部位未经任何药物处理, 并经病人或病人家属同意。标本经无菌取材后, 一部分立即液氮冻存, 用于进行逆转录- 多聚酶链反应(RT- PCR), 检测基因表达变化; 另一部分标本经 10% 中性甲醛液固定, 脱水, 石蜡包埋后切片, 进行组织形态学观察和细胞凋亡检测。

2 组织学观察

石蜡切片脱蜡后用苏木精- 伊红(HE)染色, 在显微镜(Olympus, 日本)下观察皮肤组织结构。

3 细胞凋亡检测

将石蜡切片(厚 5 μm)脱蜡, 梯度乙醇脱水, 甩干后用蛋白酶 K 在 37 ℃条件下孵育 30 min, 然后用 PBS 冲洗 2 次, 加 50 μL 末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺口标记技术(TUNEL)的反应液(德国 Boehringer Mannheim 公司产品), 37 ℃孵育 60 min。在用 PBS 冲洗 3 次后加 50 μL 亲和素辣根过氧化物酶, 37 ℃湿盒放置 30 min, PBS 冲洗 3 次, 最后用 DAB

[收稿日期] 2003- 06- 18 [修回日期] 2003- 09- 23
* [基金项目] 国家重大基础研究规划资助项目(No. G1999054204); 国家自然科学基金重点项目(No. 30230370); 国家自然科学基金资助项目(No. 30170966)
Tel: 010- 66867391; E- mail: chenwei304@yahoo.com

显色 15 min, 苏木素复染并系列脱水封片。在 400 倍光镜下观察, 细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。随机选取 5 个视野, 每个视野观察 100 个细胞, 计数阳性染色细胞数, 并计算细胞凋亡率。

4 皮肤组织总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

提取不同胎龄的胎儿和少儿皮肤中的总 RNA, 用紫外分光分析和凝胶电泳检测所提取总 RNA 的质量和浓度。按照 PolyATtract® mRNA Isolation System 系统分离纯化 mRNA, 紫外分光分析其纯度。

5 bax, bcl- 2, p53 和 β- actin 基因表达的变化

采用 RT- PCR 方法。每份样品取等量 mRNA, 用 Promega 公司的逆转录试剂盒(A3500), 按说明书进行 cDNA 的合成。根据人 bax, bcl- 2, p53 和 β- actin 基因的 cDNA 序列。按照引物设计原则, 用 Primer3.0 引物设计软件设计引物, 并在 Blast 中进行同源性比较。bax 基因的上游引物为: 5′- AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC- 3′, 下游引物: 5′- CCCGGAGGAAGTCCAATGTCC- 3′, 产物长度为 168 bp; bcl- 2 基因的上游引物: 5′- GACTTCGCCGAGATGTCCAG- 3′, 下游引物: 5′- GTGCAGGTGCCGGTTCAGG- 3′, 产物长度为 228 bp; p53 基因的上游引物: 5′- TTCCTCTTCCTACAGTACTA- 3′, 下游引物: 5′- AGTTGCAAACCAGACCTCAG- 3′, 产物长度为 408 bp; β- actin 的上游引物: 5′- ACATCCTCACCCTGAAGTACC- 3′, 下游引物: 5′- ACTGTGTTGGCGTACAGGTC- 3′, 产物长度为 705 bp。PCR 的条件为: 变性, 94 ℃, 3 min; 扩增, 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s; 延伸, 72 ℃, 10 min。每个基因进行 36 个循环。所有样品取等量的模板进行 PCR 扩增。取 PCR 产物 5 μL, 在 1.5% 琼脂糖中电泳后紫外光下扫描; 用凝胶图像分析系统(UVP- GDS800, 英国)对目的基因的表达产物进行灰密度测定。

6 统计学处理

借助 SAS 软件对结果进行统计学处理, 各组数据均以平均值 ±标准差($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) 表示。阳性率资料组间采用单因素方差分析。

结　　果

1 组织学观察

光镜下可见不同发育阶段的人皮肤具有典型的组织学结构。在早期妊娠胎儿(胎龄 13 周) 皮肤中, 表皮仅由 3 层表皮细胞组成, 真皮内毛囊开始发育, 而完整的毛囊结构尚未形成; 胎龄 17 周左右, 皮肤出现角化层, 皮脂腺已经发育; 胎龄 21 周左右, 皮肤表皮由 4 层细胞为主, 汗腺、毛囊和皮脂腺等皮肤附属结构已经形成, 但体积细小并不太成熟; 胎龄 25 周以后, 胎儿皮肤表皮细胞层数逐渐增多, 汗腺和毛囊结构日益成熟且数量递增。在少儿皮肤中, 表皮层由多层细胞组成。表皮皮钉(皮脚) 与真皮乳头相互交错, 真皮层内胶原纤维排列整齐, 汗腺、毛囊和皮脂腺等皮肤附属物结构成熟且数量明显增多。

2 胎儿和少儿皮肤组织中细胞凋亡率的变化

在早期妊娠和中期妊娠的胎儿皮肤组织中, 发生凋亡的细胞较少, 凋亡细胞主要分布于表皮层, 凋亡细胞率分别为(1.95 ±0.56) % 和(3.150 ±0.905) % (图 1)。随着胎儿不断生长发育, 皮肤组织中细胞凋亡逐渐增多(图 1)。在晚期妊娠胎儿的皮肤组织中, 凋亡细胞主要为毛囊角质细胞和少量成纤维细胞, 细胞凋亡率为早期妊娠胎儿皮肤的 2.55 倍, 细胞凋亡显著变高($P < 0.01$) (图 1)。在少儿皮肤组织中, 凋亡细胞主要为部分表皮角质细胞和少量的成纤维细胞, 细胞凋亡率为早期胚胎皮肤的 4.58 倍, 有显著差异($P < 0.01$) (图 1)。

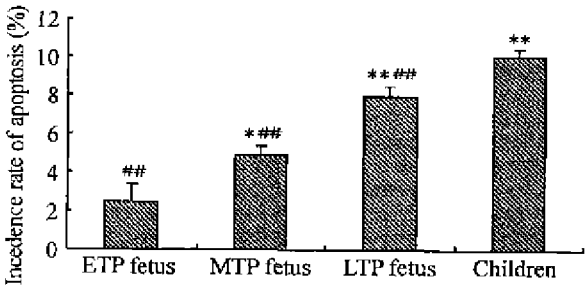

Fig 1 Changes of incidence rate of apoptosis in fetal and children skin. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. ETP: early- trimester pregnancy; MTP: mid- trimester pregnancy; LTP: late- trimester pregnancy. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs* ETP fetus group; ## $P < 0.01$ *vs* children group.

图 1 不同发育时期的皮肤组织中凋亡细胞率的变化

3 胎儿和少儿皮肤组织中 bax 和 bcl- 2 基因表达的变化

如图 2A 和 2B 所示, bax 和 bcl- 2 基因的 mRNA 经过 RT- PCR 扩增后, 得到特异性的 DNA 片段长度分别为 168 bp 和 228 bp。在不同发育阶段的皮肤中, bax 基因都有表达, 但各组皮肤间基因表达差异不显著($P > 0.05$)。抑凋亡基因 bcl- 2 呈不同的表达变化。在早期胚胎皮肤组织中, bcl- 2 基因表达水平较高; 随着胎儿不断的生长和发育, 皮肤组织细胞内该基因表达水平逐渐变低; 在晚期妊娠胎儿的皮肤组织中, 该基因的转录本含量是妊娠早期皮肤的 67%, 基因表达明显低下($P < 0.05$)。在少儿的皮肤组织中, 该基因表达水平进一步降低(表 1)。

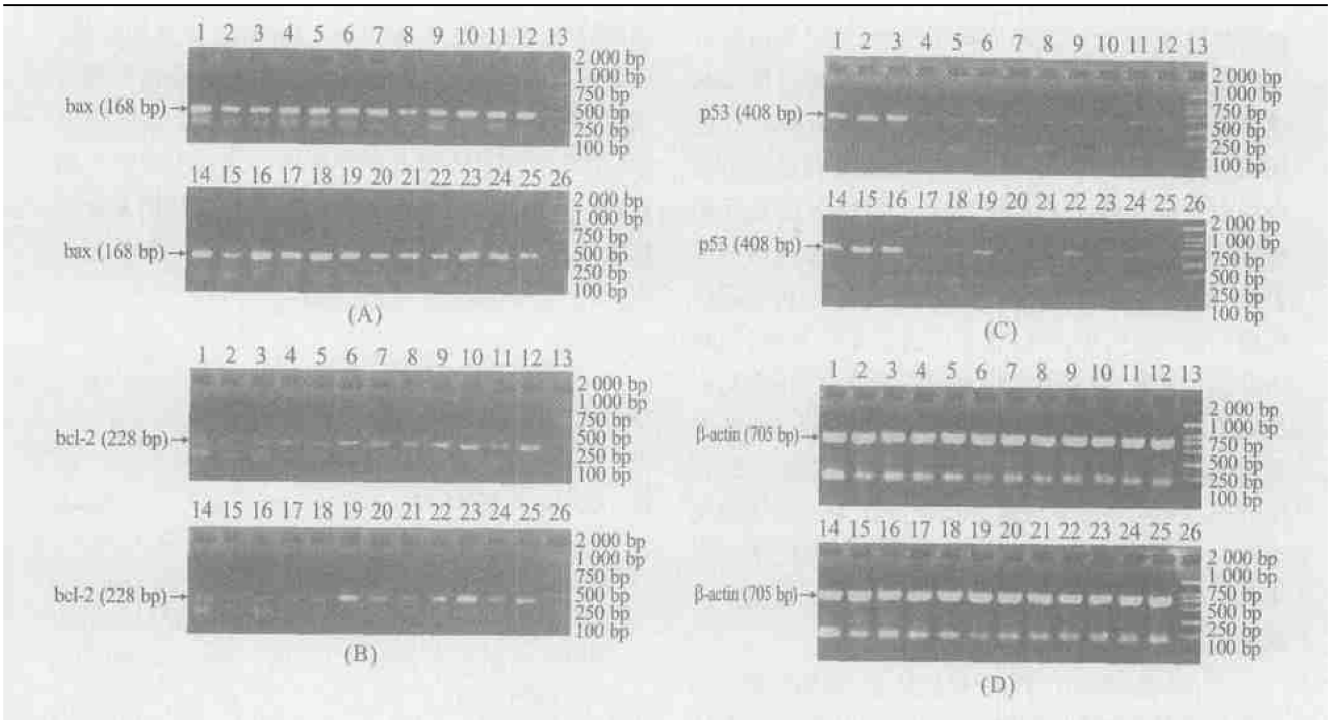

Fig 2 RT- PCR products of bax(A), bcl- 2(B), p53(C), β- actin(D) mRNA in fetal and children skin. 1- 3, 14- 16: children; 4- 6, 17- 19: late gestational fetus; 7- 9, 20- 22: middle gestational fetus; 10- 12, 23- 25: early gestational fetus; 13, 26: DL2000 DNA marker.

图 2 不同发育阶段皮肤组织中(A) bax, (B) bcl- 2, (C) p53 和(D)β- actin 基因表达的 RT- PCR 结果

表 1 在不同发育时期的皮肤组织中 bax, bcl- 2 和 p53 基因的转录本含量变化

Tab 1 The changes of transcript contents of bax, bcl- 2 and p53 in skin from different developmental stages ($\bar{x} \pm s$. $n = 6$)

Group	Early gestational fetus	Middle gestational fetus	Late gestational fetus	Childern
bax	0.391 ±0.032	0.364 ±0.044	0.416 ±0.017	0.398 ±0.077
bcl- 2	0.412 ±0.052##	0.360 ±0.016*##	0.276 ±0.109*	0.254 ±0.032**
p53	0.053 ±0.009##	0.051 ±0.028##	0.079 ±0.019*##	0.178 ±0.01**
β- actin	0.634 ±0.091	0.663 ±0.024	0.645 ±0.014	0.657 ±0.024

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs* early gestational fetus group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ *vs* children group

4 胎儿和少儿皮肤组织中 p53 和 β- actin 基因表达的变化

如图 2C 和 2D 所示, p53 和 β- actin 基因表达产物通过 RT- PCR 方法得到的特异性 DNA 片段长度分别为 408 bp 和 705 bp。在所有被检测的不同胎龄的胎儿皮肤和少儿皮肤组织中, 这两种基因都有表达。在妊娠早期的皮肤组织内, p53 基因表达水平较低, RT- PCR 产物的灰密度值仅为(0.053 ±0.009)。随着胎儿不断生长发育, 皮肤组织内 p53 基因表达逐渐变高。在少儿的皮肤组织中, p53 基因转录本的灰密度值为晚期妊娠胎儿皮肤的 2.25 倍。基因表达显著变强($P < 0.01$)(表 1)。在不同发育阶段的皮肤组织中, 作为内参的 β- actin 基因都呈强阳性表达, 但该基因的表达量没有显著差异($P > 0.05$)(表 1)。

讨 论

本研究发现, 在妊娠早期和中期的胎儿皮肤组织内, 皮肤表皮层仅由少数几层细胞组成, 真皮层结构简单, 发生凋亡的细胞较少; 而在晚期妊娠胎儿和成人皮肤中, 皮肤表皮层和真皮层增厚, 真皮层内皮肤附属结构数量增多, 结构日益成熟, 细胞凋亡率明显升高, 发生凋亡的细胞主要为角质形成细胞和部分成纤维细胞。这显示, 在发育早期和中期的皮肤中, 皮肤干细胞快速分裂增殖, 产生大量的细胞, 这些细胞向表皮层和真皮层迁移的过程中, 细胞逐渐成熟, 形成终末分化细胞, 这些细胞一方面形成新的结构和组织, 引起表皮层和真皮层日趋增厚; 另一方面这些细胞还分化形成皮肤的附属器官, 使皮肤的结构和功能逐渐成熟。在晚期妊娠胎儿和少儿的皮肤组织中, 由于皮肤特别是真皮的结构和功能已经或基本成熟, 皮肤干细胞增殖分化的同时, 部分衰老多余的细胞发生凋亡, 使皮肤处于相对稳定的动态平衡状态中。

以往的研究表明, 急性损伤可以导致 Bcl- 2 蛋白表达增强, 启动机体的抗损伤机制, 对组织损伤后生理

及功能的恢复有重要的意义[4]。在难愈性皮肤溃疡组织中, Bcl- 2 蛋白表达降低的同时, bax 表达增强, 由此引起细胞凋亡增多, 创面愈合延迟或不愈合的发生[5]。因此 Bax 和 Bcl- 2 两种蛋白相互调控、协同作用对机体结构功能的维持, 以及创伤后修复具有十分重要的作用[6,7]。本结果显示, 在早期妊娠胎儿皮肤组织中, bcl- 2 基因表达水平较高, 随着胎儿生长发育, 该基因表达水平逐渐降低, 在少儿皮肤组织中, bcl- 2 基因表达进一步减弱; 而 bax 基因在胎儿皮肤发育过程中表达没有明显变化。这表明, bax/ bcl- 2 mRNA 含量的比值可作为组织细胞发生凋亡水平的标志, 同时也表明, 在皮肤发育过程中, bax/ bcl- 2 mRNA 含量的比值逐渐降低可能是皮肤组成细胞凋亡率逐渐升高的机制之一。

人 p53 基因位于 15 号染色体上, 其编码的 P53 蛋白与细胞凋亡密切相关。在 bax 基因 5'- 端非转录区域(5'- untranscriptional region, 5'- UTR) 的核苷酸序列上, 含有 P53 蛋白的特异性结合位点[5'- PuPuPuC (A/T) (T/A) GpyPyPy- 3'], P53 蛋白与其相结合后, 可促进 bax 基因表达。另外, 在 bcl- 2 等凋亡抑制因子的基因上存在有 P53 蛋白的负反应元件(negative- response element), P53 蛋白能够抑制 bcl- 2 基因转录。同时, P53 蛋白还能够激活 caspases 家族成员, 使细胞不可逆转地发生凋亡[8]。本研究发现, 在胎儿皮肤发育过程中, p53 基因表达变化的规律与皮肤组成细胞凋亡逐渐增强相一致。这显示, 晚期妊娠胎儿和少儿皮肤组织中细胞凋亡增多可能与 p53 基因表达升高密切相关。其机制可能是由于 p53 基因表达增强, 蛋白含量升高, 通过抑制 bcl- 2 基因表达, 从而提高 bax/ bcl- 2 mRNA 含量的比值, 诱导细胞趋向凋亡。由于 P53 蛋白同时还具有抑制细胞增殖, 促进细胞分化的功能。在少儿皮肤组织中 p53 基因表达显著升高还可能与该基因表达产物促进细胞分化形成具有特异结构和功能的终末分化细胞有关, 但具体机制尚不清楚, 需进一步深入研究。

[参 考 文 献]

[1] Park JP, Hockenbery DM. bcl- 2, a novel regulator of apoptosis[J]. J Cell Biochem, 1996, 60(1): 12- 15.

[2] Ko LJ, Prives C. P53: puzzle and paradigm[J]. Gene Develop, 1996, 10(5): 1054- 1072.

[3] Nagata M, Takenaka H, Shibagaki R, et al. Apoptosis and p53 protein expression increase in the process of burn wound healing in guinea- pig skin[J]. Br J Dermatol, 1999, 140(3): 829- 838.

[4] 付小兵, 杨银辉, 孙同柱, 等. 缺血再灌注诱导 bcl- 2 基因表达及其对肠道细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 459- 461.

[5] 陈 伟, 付小兵, 孙同柱, 等. 皮肤溃疡伤口中 Bax 和 Bcl- 2 蛋白含量的变化及其与溃疡发生的关系[J]. 中国临床康复, 2001, 5(12): 54- 55.

[6] 马 毅, 何晓顺, 陈规划, 等. 肝脏缺血再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(7): 1005- 1008.

[7] 陆俊羽, 姚 伟, 钱桂生, 等. Bcl- 2, Bax 在 NHE- 1 抑制导致的大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(7): 317- 320.

[8] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. A model for p53- induced apoptosis[J]. Nature, 1997, 389(2): 300- 305.

Characteristics of bax, bcl- 2 and p53 gene expression in children and fetal skin at different developmental stages

CHEN Wei[1], FU Xiao- bing[1], GE Shi- li[2], ZHOU Gang[1], JIANG Du- yin[1], SUN Tong- zhu[1], HAN Bing[1], SHENG Zhi- yong[1]

([1] Key Research Laboratory of Wound Repair, 304th Hospital of PLA, Beijing 100037, China; [2] Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100850, China)

[ABSTRACT] AIM: To investigate gene expression of bax, bcl- 2 and p53 in fetal skin at different gestational ages and children skin in order to explore their potentially biological significance. **METHODS:** Apoptosis in skin specimens was determined by terminal deoxynucleotidy transferase mediated dUTP- biotin nick- end labeling technique (TUNEL). Gene expressions of bax, bcl- 2 and p53 in skin at different developmental stages was examined with reverse transcription- polymerase chain reaction (RT- PCR). **RESULTS:** Along with fetal growth and development, the incidence rate of apoptosis was increased progressively in skin. In skin from early gestational fetus, bcl- 2 was strongly ex-

pressed. This gene expression was progressively decreased with increment in gestational age. In children skin, the mRNA content of this gene was significantly reduced compared with fetal skin ($P < 0.01$). By contrast, the mRNA content of p53 was less in early gestational fetal skin versus late gestation fetal and children skin. During gestation, bax gene expression was indistinguishable among skin from different developmental stages. **CONCLUSION:** The elevation of p53 gene expression and the ratio of bax/bcl-2 mRNA contents results in increment of cell differentiation or apoptosis in elder fetal and children skin, while the reduction of p53 gene expression and the ratio of bax/bcl-2 mRNA contents might be involved in excessive cellular proliferation and depressive apoptosis in younger fetal skin.

[KEY WORDS] Genes, bax; Genes, bcl-2; Genes p53; Fetal skin; Apoptosis

---

中国病理生理学会举办“2005年全国病理生理学教学研讨会”征文通知

为适应和推动我国21世纪“病理生理学”课程教学改革和教学研究活动的发展,中国病理生理学会决定于2005年5月11日至15日在广西南宁市召开“中国病理生理学会2005年全国病理生理学教学研讨会”。此次会议由中国病理生理学会主办,广西医科大学承办。研讨会将为病理生理学工作者提供报告病理生理学教学研究成果和交流教学经验的机会。会议还拟邀请病理生理学界知名学者就病理生理学的教学和教材问题作专题报告,欢迎大家踊跃向会议投寄论文摘要,通过评审,优秀论文将推荐到学术期刊发表。

一、会议时间:

2005年5月11日至5月15日

二、会议地点:

南宁市广西医科大学

三、会议论文摘要的征集范围:

1. 病理生理学教材建设的经验与教训
2. 病理生理学理论课教学内容和教学方法的改革
3. 病理生理学实验课教学内容和教学方法的探讨
4. 病理生理学双语教学问题
5. 医学院校长学制病理生理学教学
6. 病理生理学精品课程建设经验交流
7. 病理生理学多媒体教学课件建设介绍

四、论文摘要的格式要求:

1. 凡符合上述研讨会主题的征集范围,且未在正式刊物上公开发表的论文或摘要均可投稿。

2. 应征论文或摘要一式两份,内容包括文题、作者、单位、城市、邮编、责任作者的电子邮件地址(如有的话)和正文,如为摘要字数限800字(含标点符号)以内。题目用黑体四号字居中打印;作者与题目之间空一行,两位及两位以上作者时,姓名之间空一字,不加标点,用楷体五号字居中打印;作者单位、城市和邮编用宋体小五号字居中打印;正文第一行与作者单位之间空一行,用宋体五号字两端对齐打印,每段首行缩进二字(见稿样)。

3. 征文截止时间:2005年3月15日(以邮截为准)。稿件采用与否,均不退稿,请自留底稿。

4. 投寄会议的论文摘要,每篇审稿费及刊登费100元,随论文摘要一并通过邮局汇寄至广西医科大学病理生理教研室 文进 收,邮编:530021(请在汇款单附言中注明:病生教学会审稿费及第一作者姓名)。收据报到时一起开。此外,请同时将论文摘要用E-mail传送至:wenjing102@sina.com或bskxc@yahoo.com.cn 。不邮寄审稿费者,其稿件将不被评审。

五、其他

热烈欢迎大陆各院校病理生理学工作者、教学管理工作者参加会议! 热烈欢迎港、澳、台同行以及海外学者参加,无论提交论文与否,均欢迎参加会议。

中国病理生理学会

2004年12月