论著

文章编号:1000-5404(2005)20-2060-03

寻常型银屑病皮损区表皮 Smurf2 表达及其意义

孙 芸,何 威,张国威,黎 智,何云志,黄 海,林自华,郑 红 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨寻常型银屑病皮损区 Smad 泛素化调节因子2(Smad ubiquitination regulatory factor 2,Smurf2)的表达及其意义。**方法** 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和 S-P 免疫组化法分别检测寻常型银屑病皮损和对照正常皮肤中 Smurf2 的表达情况。**结果** RT-PCR 显示,寻常型银屑病皮损中 Smurf2 表达水平上调。与对照正常皮肤相比,寻常型银屑病皮损区表皮角质形成细胞 Smurf2 的免疫组化染色显著增强。**结论** 寻常型银屑病皮损区表皮 Smurf2 表达增强。

关键词:银屑病;Smurf2

中图法分类号:R322.991;R394.2;R758.63 **文献标识码**:A

Enhanced expression of Smurf2 in lesional psoriatic epidermis

SUN Yun, HE Wei, ZHANG Guo-wei, LI Zhi, HE Yun-zhi, HUANG Hai, LIN Zi-hua, ZHENG Hong (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf2) in psoriatic lesions. Methods Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and SP immunohistochemical techniques were used to detect the distribution and expression of Smurf2 in psoriatic lesions ($n=22$) and control normal skin specimens ($n=10$). Results RT-PCR results demonstrated that Smurf2 expression was significantly up-regulated in psoriatic lesions. In contrast to the low level or loss of Smurf2 expression in control normal skin, Smurf2 expression by immunocytochemical staining was significantly increased in the keratinocytes of lesional psoriatic epidermis. Conclusion Smurf2 expression was markedly increased in the hyperplasic epidermis of psoriatic lesions.

Key words: psoriasis; Smurf2

皮肤是转化生长因子β(transforming growth factor β, TGFβ)作用的重要靶器官之一。TGFβ 信号从膜受体到胞核的细胞内转导由多种 Smad 蛋白介导和调节,其中 Smad7 是 TGFβ 信号转导途径的负性调节因子[1]。Smad7 结合 Smurf2 形成 E3 泛素连接酶(E3 ubiquitin ligase),后者可参与 TGFβ 受体的降解[2]。寻常型银屑病是皮肤科临床上常见的慢性、复发性、炎症性皮肤病。在该病皮损区的表皮中已发现Ⅰ型和Ⅱ型 TGFβ 受体表达减少或缺失[3-5],提示 TGFβ 信号转导途径障碍参与了寻常型银屑病的发病过程。如上如述,鉴于 Smurf2 具有参与降解 TGFβ 受体的作用,由此我们设想,寻常型银屑病皮损区 TGFβ 受体表达减少或缺失是否与皮损局部 Smurf2 表达水平的改变有关呢?为此,我们采用免疫组化和逆转录-多聚酶链式反应(RT- PCR)扩增技术对寻常型银屑病皮损区 Smurf2 的表达情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象选择及标本处理

以寻常型银屑病患者中慢性斑块型银屑病之皮损为研究对象。出于伦理学的考虑,本研究未采用银屑病患者的正常皮肤为对照,而以非银屑病个体的正常皮肤为对照。研究对象选择标准如下:①寻常型银屑病组所有患者均有典型或较为典型的皮损,并经皮肤病理检查证实具有寻常型银屑病的病理改变;近3个月内未服用糖皮质激素及免疫抑制剂,停止其它系统治疗和光疗法至少1个月,近3周内皮损未行局部治疗。消退期的慢性斑块型银屑病患者不能纳入本研究。②对照组为接受整形外科及骨科手术的非银屑病个体,均无免疫性疾病和系统性疾病。

来自我院皮肤科门诊和病房的寻常型银屑病患者22例,其中男12例,女10例,平均年龄39岁,平均病程2年;以刀切

基金项目:第三军医大学回国人员科研基金资助项目(XG200356)
Supported by the Funds for Personnel Returning from overseas Sponsored by the Third Military Medical University (XG200356)

作者简介:孙 芸(1968-),女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事银屑病发病机制方面的研究。电话:(023)68755629

通讯作者:何 威,E-mail:xqderma@mail.xqhospital.com.cn

收稿日期:2005-04-22;修回日期:2005-09-05

法从腰背或下肢的典型皮损处取材。非银屑病个体 10 例，男 5 例，女 5 例，平均年龄 25 岁，其腰背及下肢部位的对照正常皮肤由我院整形外科及骨科手术获得。每一标本取材后均立即分为两份，一份置于 10% 甲醛磷酸缓冲液中固定后按常规脱水、透明并行石蜡包埋，另一份立即放入液氮中冻存备用。

1.2　主要试剂

兔抗人 Smurf2（H-50）多克隆抗体：sc-25511（Santa Cruz Biotechnology，Inc.），过氧化物酶标记的链霉卵白素（S-P）免疫组化试剂盒：Histostain™-Plus Kits（北京中山生物技术在限公司）。异硫氰酸胍和焦碳酸二乙酯（Sigma 公司），RT-PCR 试剂盒：TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0（TaKaRa Biotechnology Co.，Ltd）。

1.3　PCR 引物及合成

检索 NCBI GenBank 数据库，应用 DNAstar 软件设计人 Smurf2 和 β-actin 的 PCR 引物，由上海生物工程技术服务有限公司合成。人 Smurf2 引物序列如下：上游引物：5′-AGTATCCCTGTTAATGAAGAAAAT-3′，下游引物：5′-GTATAAATAGAGTCCTGGGTAAAT-3′；内参对照 β-actin 引物序列如下：上游引物：5′-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3′，下游引物：5′-TAGCTCTTCTCCAGGGAGGA-3′。利用上述引物经 PCR 可扩增出 576 bp 的人 Smurf2 DNA 片段和 460 bp 的人 β-actin DNA 片段。

1.4　组织 RNA 的提取

分别称取 0.1 g 的银屑病皮损及对照正常皮肤，按常规采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA，行 RNA 电泳检测其质量。用 DU800 型紫外分光光度计（美国 BeckMan 公司）检测 D（260）与 D（280）的 D 值，根据 $D(260)/D(280)$ 判定 RNA 纯度。

1.5　RT-PCR

利用上步提取的标本 RNA，按 TaKaRa RNA PCR Kit 说明进行逆转录（RT）反应，所得 cDNA 再用 PTC-200 型 PCR 仪（美国 MJ Research 公司）分别扩增人 Smurf2 和 β-actin 的 DNA 片段，其中 β-actin 为 RT-PCR 的内参对照。PCR 反应体系 50 μl，PCR 循环参数如下：94 ℃ 预变性 3 min；每循环 94 ℃ 30 s、53 ℃ 30 s、72 ℃ 50 s，共 30 个循环反应；72 ℃ 延伸 5 min。1.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.6　免疫组化

用 S-P 法免疫组化染色技术检测皮肤标本中的 Smurf2 表达。4 μm 厚石蜡切片按常规脱蜡至水，用 3% 过氧化氢作用 20 min 以阻断内源性过氧化物酶活性，经漂洗后行抗原热修复 20 min，漂洗后加正常山羊血清 37 ℃ 封闭 1 h；吸去山羊血清，滴加 1∶50 的兔抗人 Smurf2 多克隆抗体（一抗）4 ℃ 孵育过夜，以后按 S-P 法常规依次加生物素化羊抗兔 IgG（二抗）室温孵育 30 min，再滴加过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液室温下作用 30 min，以上每一步骤后均行 PBS 漂洗 5 min × 3 次，最后滴加 DAB 工作液，避光显色 3 ~ 4 min 后水洗，经苏木精复染、水洗、干燥并封片。实验设 PBS 替代一抗作为空白阴性对照。镜检结果判断：细胞出现棕黄色颗粒为染色阳性。按免疫组化染色结果判定常规进行半定量分级：无阳性着色细胞为（－），阳性着色细胞比例在 20% 以下者为（＋），在 20% ~ 50% 为（＋＋），大于 50% 为（＋＋＋）。

1.7　图像分析

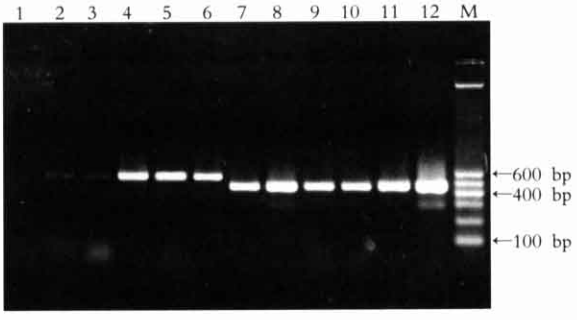
用德国 Laica 公司 Qwin 真彩图像分析系统对免疫组化染色结果进行分析，以测定阳性表达区域的灰度值表示 Smurf2 染色强度。用 Chemi Imager™ 5500 型凝胶成像分析仪（美国 Alpha Innotech 公司）测定 PCR 产物电泳图像中特异 DNA 片段的灰度值，计算出每一个标本 Smurf2/β-actin 灰度值的比值。

1.8　统计学处理

对免疫组化及 RT-PCR 结果进行图像分析所得的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对银屑病皮损与对照正常皮肤两组间均数的比较采用 SPSS V12.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

利用 RT-PCR 检测寻常型银屑病皮损与对照正常皮肤标本中的 Smurf2 表达，其电泳结果见图 1。RT-PCR 电泳结果经凝胶扫描系统分析处理后所得的 Smurf2/β-actin 灰度值比值在寻常型银屑病皮损组为（0.866 4 ± 0.231 0），在对照正常皮肤组为（0.044 5 ± 0.028 0），结果表明寻常型银屑病皮损 Smurf2 的 mRNA 表达水平显著高于对照正常皮肤（$P < 0.01$）。

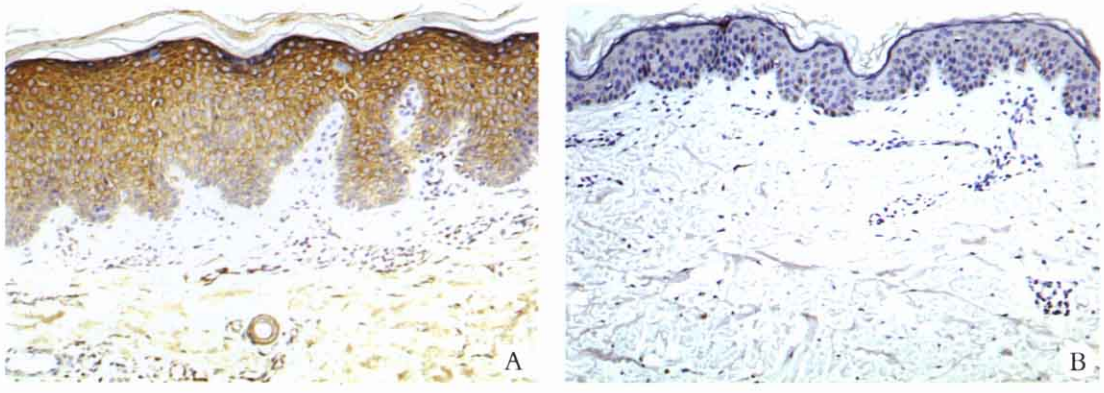


M：DNA ladder marker；1 - 3：Smurf 2 expression in control normal skin；4 - 6：Smurf2 expression in psoriatic lesions；7 - 9：β-action expression in control normal skin；10 - 12：β-actin expression in psoriatic lesions

图 1　RT-PCR 检测 Smurf2 在寻常型银屑病皮损区和对照正常皮肤中的表达

Fig 1　Smurf2 expression in psoriatic lesions and control normal skin by RT-PCR

免疫组化检测显示，Smurf2 在所有受试的寻常型银屑病皮损区表皮中均有不同程度表达，其中在半数的皮损标本中呈强阳性表达，其余为中度阳性或弱阳性表达。Smurf2 阳性表达主要见于棘层和颗粒层的角质形成细胞的胞浆内（图 2a）。与寻常型银屑病皮损中 Smurf2 表达上调迥然不同，Smurf2 在对照正常皮肤中的表达较弱，基本上为阴性（图 2b）。利用图像分析系统对免疫组化染色强度进行分析，寻常型银屑病皮损区表皮 Smurf2 染色强度为（191.844 ± 9.545），对照正常皮肤组为（182.732 ± 6.408），Smurf2 在寻常型银屑病皮损区的表达明显高于对照正常皮肤（$P < 0.05$）。



A: Overexpression of Smurf2 in lesional psoriatic epidermis; B: Control normal skin

图2 免疫组化法检测 Smurf2 在寻常型银屑病皮损区和对照正常皮肤中的表达 (S-P×200)

Fig 2 Smurf2 expression in psoriatic lesions and control normal skin by immunochemical staining (S-P×200)

3 讨论

TGFβ 可抑制角质形成细胞增殖,在维持皮肤内环境稳定方面发挥重要作用。TGFβ 信号由其Ⅰ型和Ⅱ型跨膜受体介导。多种 Smad 蛋白是 TGFβ 信号从膜受体到胞核的细胞内转导分子或调节分子[1]。Smad 家族可分为受体活化 Smads(Receptor-activited Smads, R-smads)、共有 Smad(Common Smad, Co-Smads)即 Smad4、抑制性 Smad(Inhibitory smad, I-Smad)共3类。在 I-Smad 中起主要作用的是 Smad7。当 TGFβ 配体与其受体复合物中的Ⅱ型受体结合后,磷酸化并激活Ⅰ型受体的丝氨酸/苏氨酸激酶,活化的Ⅰ型受体可磷酸化 R-Smads,后者与 Smad4 形成复合物,移位至细胞核内调节目的基因表达。国内和国外研究均已明确发现,寻常型银屑病皮损区表皮Ⅰ型和Ⅱ型 TGFβ 受体表达减少或缺失[3~5],提示 TGFβ 信号转导途径障碍参与了银屑病的发病过程。一旦银屑病皮损区表皮 TGFβ 受体表达减少或缺失,导致 TGFβ 信号转导途径障碍,TGFβ 抑制角质形成细胞增殖的作用将难以发挥,失去 TGFβ 抑制的角质形成细胞则可不断增殖,从而有助于银屑病皮损特有的表皮增生性病理改变的形成。

被称为 Smad 泛素化调节因子的 Smurf,其生物学作用是与 Smad 密切相关的。Smurf2 参与调节 TGFβ 信号转导途径的作用包括以下几方面:①Smurf2 通过与 I-Smad 中的 Smad7 结合而形成 E3 泛素连接酶,可降解 TGFβ 受体。Smad7 可将 Smurf2 从胞核内募集至胞浆,再与活化的 TGFβ 受体结合,导致该受体降解,从而阻碍 TGFβ 配体与其受体的结合[2]。②Smurf2 可降解 R-Smad 中的某些成员,阻碍 TGFβ 信号在细胞内的转导,进一步控制 TGFβ 信号强度。例如,对于 R-Smad 中的 Smad2,Smurf2 具有介导蛋白酶体依赖性的降解作用[6,7]。我们的 RT-PCR 和免疫组化研究发现,寻常型银屑病皮损区表皮存在着 Smurf2 表达增强。我们推测,寻常型银屑病皮损区表皮 Smurf2 表达增加的意义有可能在于通过上述两个方面干扰 TGFβ 信号转导途径,阻断 TGFβ 对角质形成细胞增殖的抑制作用,从而促进了银屑病皮损区表皮过度增殖之病理改变的形成。

参考文献:

[1] Itoh S, Itoh F, Goumans M J, *et al*. Signaling of transforming growth factor-b family members through Smad proteins[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(24): 6954-6967.

[2] Kavsak P, Rasmussen R K, Causing C G, *et al*. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGFb receptor for degradation[J]. Mol Cell, 2000, 6(6): 1365-1375.

[3] Doi H, Shibata M A, Kiyokane K, *et al*. Downregulation of TGFbeta isoforms and their receptors contributes to keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris[J]. J Dermatol Sci, 2003, 33(1): 7-16.

[4] Leivo T, Leivo I, Kariniemi A L, *et al*. Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors Ⅰ and Ⅱ is seen in lesional but not non-lesional psoriatic epidermis[J]. Br J Dermato, 1998, 138(1): 57-62.

[5] 高春芳, 郑茂荣, 顾 军, 等. 银屑病表皮转化生长因子β受体Ⅰ和Ⅱ原位表达的研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2002, 31(1): 24-25.

[6] Zhang Y, Chang C, Gehling D J, *et al*. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(3): 974-979.

[7] Lin X, Liang M, Feng X H. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling[J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36818-36822.

(编辑 王 红)