文章编号:1000-5404(2006)03-0239-04

论著

脂溢性角化病皮损的表皮中TGF-βⅠ型和Ⅱ型受体表达下调

李 颖,何 威,林自华,阎国富,何云志,黄 海 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨转化生长因子-β受体(transforming growth factor β receptor, TGF-βR)在脂溢性角化病皮损中表达水平的变化及其意义。**方法** 采用实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR)和S-P免疫组织化学技术分别检测脂溢性角化病及正常对照皮肤中Ⅰ型和Ⅱ型TGF-β受体(TGF-βRⅠ,TGF-βRⅡ)的表达。**结果** TGF-βRⅠ和TGF-βRⅡ在脂溢性角化病皮损表皮中的表达较正常表皮显著降低。**结论** 脂溢性角化病皮损中表皮TGF-β受体表达下调有助于表皮细胞的异常增生,促进了该表皮肿瘤的形成。

关键词: 脂溢性角化病;转化生长因子-β;转化生长因子-β受体
中图法分类号: R322.99; R341; R758.73 **文献标识码:** A

Downregulation of TGF-β receptors in epidermis of *seborrheic keratosis*

LI Ying, HE Wei, LIN Zi-hua, YAN Guo-fu, HE Yun-zhi, HUANG Hai (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of transforming growth factor beta receptors (TGF-βRⅠ, TGF-βRⅡ) in the epidermis of *seborrheic keratosis* (SK). **Methods** Twenty-five pieces of SK skin including 14 from face and 11 from trunk were from 25 SK patients, 11 male and 14 female, mean age 57.3 years, whose average course of disease was 3.7 years. Another 24 of matched location were from 24 healthy individuals underwent plastic surgery, 10 male and 14 female, average age 44 years. All pieces of skin were divided into two parts, one for SP immunohistochemisty and one for real-time PCR. Quantitative real-time PCR and SP immunohistochemical techniques were utilized to assess the expression of TGF-βRⅠ and TGF-βRⅡ in the epidermis of *seborrheic keratosis* and normal control skin. **Results** The two methods respectively proved the mRNA and protein expression levels of TGF-βRⅠ and TGF-βRⅡ in the epidermis of *seborrheic keratosis* were significantly reduced in comparison with those of normal control skins. **Conclusion** Downregulation of TGF-β receptors may interfere with TGF-β signaling, and contribute to formation of aberrant hyperplastic epidermis in seborrheic keratosis.

Key words: *seborrheic keratosis*; TGF-β; TGF-β receptors

迄今为止,脂溢性角化病(*seborrheic keratosis*, SK)的发生机制尚不完全清楚。既往研究已表明,转化生长因子-β(TGF-β)在维持表皮内环境稳定、参与上皮组织肿瘤发生和发展等方面具有重要作用[1]。鉴于SK的典型病理改变呈现出显著的表皮增生,我们设想SK增生的角质形成细胞是否可能存在TGF-β信号转导途径异常,导致TGF-β所具有的抑制表皮增生的作用不能发挥。为此,我们采用实时定量聚合酶链式反应(real-time PCR, RT-PCR)和链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(S-P)免疫组织化学技术对SK皮损中Ⅰ型和Ⅱ型TGF-β受体(TGF-βRⅠ、TGF-βRⅡ)的表达情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象及其临床资料

以SK皮损为研究对象,正常皮肤为对照,所有标本均在局麻下以刀切法取材。从我院皮肤科门诊收集SK皮损25例,其中男性11例,女性14例,平均年龄57.3岁,平均病程3.7年,发生于面部14例,发生于躯干部11例,所有皮损既往均未接受任何治疗,SK之诊断均经病理检查证实。24例正常皮肤取自接受美容或整形外科手术的个体,其中男10例,女14例,平均年龄44岁,面部皮肤14例,躯干皮肤10例。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 主要仪器

主要仪器:倒置光学显微镜(德国Leica公司),DU-800紫外分光光度仪(美国Beckman公司),Rotor Gene 2000型荧光定

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371298)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371298)
作者简介: 李 颖(1978-),女,江西省九江市人,硕士研究生,医师,主要从事TGF-β信号转导在皮肤肿瘤发生中作用方面的研究。电话:(023)68755629, E-mail:liyingliyiran@yahoo.com.cn
通讯作者: 何 威,电话:(023)68755629,E-mail:weihegj@yahoo.com.
收稿日期: 2005-09-07;**修回日期:** 2005-12-31

量PCR反应扩增仪(美国Corbett公司),Chemi Imager™5500型凝胶成像分析仪(美国Alpha Innotech公司)。

1.3 主要试剂

Tripure Isolation Reagent(美国Roche公司);RT Reagent和SYBR® *Premix Ex Taq*™(TaKaRa Biotechnology Co., Ltd);兔抗人TGF-βRⅠ多克隆抗体(BA0294)和兔抗人TGF-βRⅡ多克隆抗体BA0526(武汉博士德生物技术有限公司);即用型Ultra-Sensitive™ S-P免疫组化染色试剂盒KIT-9710(福州迈新生物技术有限公司)。

1.4 组织总RNA提取

参照Tripure Isolation Reagent说明书要求从组织中抽提总RNA。RNA抽提过程中所有容器及移液吸头均经焦碳酸二乙酯(美国Sigma公司)水处理,以灭活RNA酶。用紫外分光光度计分别检测RNA样品在260 nm与280 nm时的吸光度值,根据$D(260)/D(280)$比值判定RNA纯度。另取适量RNA进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像分析仪观察,以验证RNA样品的质量。

1.5 引物设计

按照荧光定量PCR引物设计原则[2]设计引物。检索NCBI GenBank数据库,所设计引物分别针对不同的外显子,以GAPDH作为内参照校准基因。primier 5.0软件设计PCR引物,合成TGF-β-RⅠ(NM_004612)正义:5′-GCAGTAAGACATGATTCAGCCACAG-3′,反义:5′-CAATGGAACATCGTCGAGCAA-3′,扩增片段190 bp;TGF-β-RⅡ(NM_003242)正义:5′-TCGTCCTGTGGACGCGTATC-3′,反义:5′-GAAACTTGACTGCACCGTTGTTG-3′,扩增片段102 bp;GAPDH(NM_002046)正义:5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,反义:5′-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3′,扩增片段142 bp。由TaKaRa Biotechnology Co., Ltd合成PCR引物。

1.6 反转录合成cDNA

参照RT Reagent说明,依次加入总RNA 500 ng、5×M-MLV 2μl、dNTP Mixture 0.5 μl、oligo(dT) 0.5 μl、M-MLV Rnase 0.25 μl、Rnase Inhibitor 0.25 μl,ddH_2O补至总反应体系为10 μl,轻微离心后,置于42 ℃恒温金属水浴箱15 min后,迅速放置于99 ℃恒温金属水浴箱5 min使反转录酶失活,所得cDNA产物保存于-20℃冰箱待用。

1.7 RT-PCR

1.7.1 验证实验 梯度稀释模板cDNA(10、10^2、10^3、10^4、10^5)后加入50 μl的Real-time PCR反应体系中,其中含模板cDNA(0.02、0.2、2、20、200 ng)、各对引物0.2 μmol/L、2×SYBR® *Premix Ex Taq*™(内含Taq DNA聚合酶、$MgCl_2$、dNTP Mixture、SYBR® Green I以及反应用缓冲液,各反应液内容物出厂时已设定)25 μl,灭菌ddH_2O补至终体积50 μl,混匀并瞬时离心,置于Rotor Gene 2000型荧光定量PCR扩增仪内。扩增条件为95 ℃ 10 s,每一循环95 ℃ 5 s、60 ℃ 20 s,共45个循环。设置融解曲线检测自65 ℃至95 ℃的融解温度以验证产物的特异性,另将反应产物经琼脂糖凝胶电泳再次确认其单一性。计算△CT(域循环数)=CT(目的基因)-CT(内参照基因),以稀释度为横坐标,△CT为纵坐标,得出斜率为0.096。当斜率<0.1,视为目的基因和内参照基因扩增效率近似相等,可以采用$2^{-\triangle\triangle CT}$法进行数据分析。

1.7.2 RT-PCR检测SK组与正常皮肤组TGF-βRⅠ和TGF-βRⅡ的表达 50 μl反应体系内含模板cDNA 200 ng,其余反应成分、扩增条件及融解曲线的设置均同验证实验。采用$2^{-\triangle\triangle CT}$法对RT-PCR实验结果进行数据分析。$\triangle CT_{TGF\text{-}\beta R\,I} = CT_{TGF\text{-}\beta R\,I} - CT_{GAPD}$,$\triangle CT_{TGF\text{-}\beta R\,II} = CT_{TGF\text{-}\beta R\,II} - CT_{GAPD}$,$\triangle\triangle CT = \triangle CT_{正常} - \triangle CT_{SK}$,差别倍数$=2^{-\triangle\triangle CT}$[2]。

1.8 S-P免疫组化法

4 μm厚石蜡切片按常规脱蜡至水;新鲜配置3% H_2O_2甲醇液孵育15min以阻断内源性过氧化物酶活性,经漂洗后行柠檬酸液微波热修复抗原15 min;正常山羊血清37 ℃孵育15 min;滴加一抗(抗体的工作浓度均为1∶100)后4 ℃孵育过夜,另用PBS液代替一抗作阴性对照;滴加生物素化二抗,37 ℃孵育30 min;上述过程中,除正常山羊血清外,其余各步骤后均以PBS轻度振荡漂洗5 min共3次。最后滴加DAB工作液后避光显色,显微镜下检查DAB显色至合适程度后依次水洗、苏木精复染5 min、PBS返蓝、脱水、透明,最后行中性树胶封片。TGF-βRⅠ和TGF-βRⅡ的阳性着色均表现为细胞膜及细胞质染成浅黄色、棕黄色、棕褐色。将免疫组化染色结果行显微照相后,用德国Leica公司Qwin真彩图像分析系统对照片中免疫组化染色情况进行分析,以测定阳性表达区域的灰度值表示免疫组化染色强度。

1.9 统计学处理

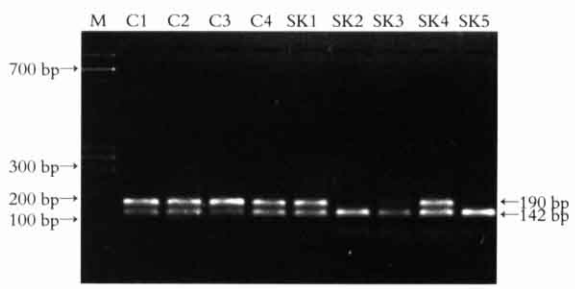
Real-time PCR及免疫组化结果经图像分析所得的计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,对SK皮损与对照正常皮肤两组间均数的比较采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 TGF-βRⅠ和TGF-βRⅡ mRNA在SK与正常对照皮肤中的表达

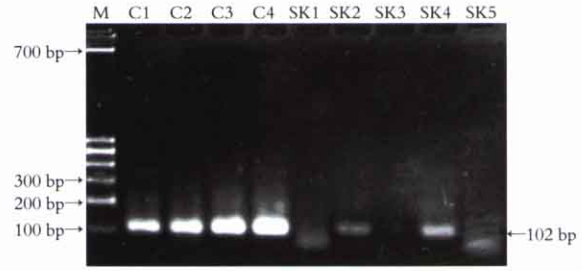
利用上述TGF-βRⅠ、TGF-βRⅡ和GAPDH引物所扩增的基因片段经比照融解曲线,显示了扩增的一致性。琼脂糖凝胶电泳也显示PCR扩增片段与所设计大小一致(图1、2)。

就TGF-βRⅠ而言,SK组$\triangle CT_{TGF\text{-}\beta R\,I} = 7.12 \pm 1.90$,正常对照皮肤组$\triangle CT_{TGF\text{-}\beta R\,I} = 4.53 \pm 1.88$,$\triangle\triangle CT = \triangle CT_{正常} - \triangle CT_{SK} = -2.49$,$2^{-\triangle\triangle CT} = 5.62$。就TGF-βRⅡ而言,SK组$\triangle CT_{TGF\text{-}\beta R\,II} = 6.78 \pm 1.88$,正常皮肤$\triangle CT_{TGF\text{-}\beta R\,II} = 4.13 \pm 1.85$,$\triangle\triangle CT = \triangle CT_{正常} - \triangle CT_{SK} = -2.65$,$2^{-\triangle\triangle CT} = 6.28$。对SK组与正常对照皮肤组进行比较,不论是TGF-βRⅠ还是TGF-βRⅡ,其$2^{-\triangle\triangle CT}$值均大于2,即差别倍数大于2,表明上述两组间mRNA的表达有显著差异。即SK皮损TGF-βRⅠ和TGF-βRⅡ的mRNA表达水平显著低于正常对照皮肤。



M: DNA标准; C1-4: 对照正常皮肤; SK1-5:脂溢性角化病皮损

图1 SK和对照正常皮肤TGF-βRⅠ mRNA RT-PCR扩增电泳结果

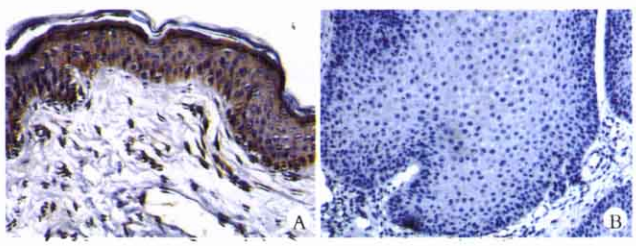


M：DNA 标准；C1－4：对照正常皮肤；SK1－5：脂溢性角化病皮损

图 2　SK 和对照正常皮肤 TGF-βRⅡ mRNA RT-PCR 扩增电泳结果

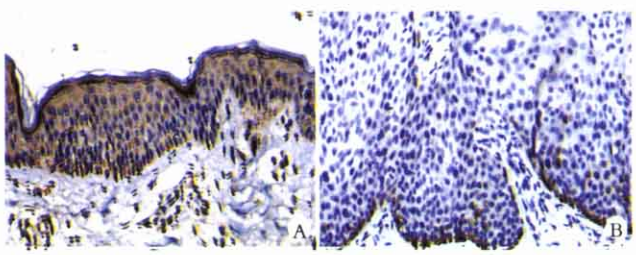
2.2　TGF-βRⅠ和 TGF-βRⅡ蛋白在 SK 与对照正常皮肤中的表达

免疫组化染色显示，所有受试的正常对照皮肤的表皮均有 TGF-βRⅠ和 TGF-βRⅡ表达，染色呈棕黄至黄褐色。其中，颜面部位（曝光区）和躯干部位（非曝光区）TGF-βR 的表达强度并无明显差别。在所有受试的 SK 标本中，有 17 例皮损的表皮显示 TGF-βRⅠ表达缺失，15 例皮损的表皮显示 TGF-βRⅡ表达缺失，在其余 SK 皮损的表皮中 TGF-βRⅠ和 TGF-βRⅡ仅有轻度表达，染色为淡黄至棕黄色；对于一些边缘带有较多正常皮肤的 SK 皮损标本的观察也发现，SK 皮损边缘正常皮肤的 TGF-βRⅠ表达明显强于皮损区者有 4 例，TGF-βRⅡ表达明显强于皮损区者有 3 例（图 3、4）。



A：正常皮肤；B：脂溢性角化病

图 3　TGF-βRⅠ在 SK 皮损和对照正常皮肤中的表达　（S-P ×400）



A：正常皮肤；B：脂溢性角化病

图 4　TGF-βRⅡ在 SK 皮损和对照正常皮肤中的表达　（S-P ×400）

经图像分析系统测得的灰度值代表染色强度，TGF-βRⅠ染色强度在 SK 组皮损区表皮为 180.55 ± 10.99，在正常对照皮肤组的表皮为 165.89 ± 10.67，二者有显著差异（$P < 0.05$）；TGF-βRⅡ染色强度在 SK 皮损区表皮为 188.09 ± 15.20，在正常对照皮肤组的表皮为 169.79 ± 14.01，两者也有显著差异（$P < 0.05$）。

3　讨论

TGF-β 是具有调节细胞生长与分化、结缔组织重塑、免疫反应和血管再生等作用的多功能细胞因子。对表皮而言，TGF-β 可抑制角质形成细胞增殖，在维持表皮内环境稳定方面发挥重要作用[1]。TGF-β 信号由其Ⅰ型和Ⅱ型跨膜受体介导。多种 Smad 蛋白是 TGF-β 信号从膜受体到细胞核的细胞内转导分子或调节分子[3]。在表皮表达显性阴性 TGF-βRⅡ的转基因鼠中，其失活在化学性诱癌的早期阶段可通过加速细胞周期调控的丧失而促进皮肤肿瘤的发生[4]。在基因开关 TGF-β 小鼠经化学诱导形成的乳头瘤（良性）向癌（恶性）发展的进行期，TGF-βⅠ转基因的诱导性表达通过引起 TGF-β 受体和 Smad 表达下调也可促进乳头瘤的迅速恶变和转移[5]。由此表明，TGF-β 受体表达水平的下调在实验动物皮肤肿瘤发生发展中的作用。

本研究从 mRNA 和蛋白质表达水平分析了 SK 皮损中 TGF-β 受体的表达情况，发现无论是在 mRNA 水平或蛋白质水平，TGF-βRⅠ和 TGF-βRⅡ的表达均显著下调。我们认为，这种现象的生物学意义在于 TGF-βRⅠ和 TGF-βRⅡ表达下调可能导致角质形成细胞内 TGF-β 信号转导减弱，使得 TGF-β 抑制角质形成细胞增殖的作用难以发挥，失去 TGF-β 抑制作用的角质形成细胞则可不断增殖，从而有助于 SK 所特有的表皮异常过度增生性病理改变的形成。因此，本研究结果至少可以部分解释 SK 皮损中表皮异常过度增生的机制。Lange 等[6]也发现，与正常皮肤相比，TGF-βRⅠ在一些日光性角化病、SK、基底细胞癌和鳞状细胞癌等良性或恶性表皮肿瘤中也有表达下调的趋势。Han 等[7]的研究结果与我们的结果类似，在其检测的 34 例人皮肤鳞状细胞癌皮损中，19 例（56%）TGF-βRⅡ表达下降或缺失；而 TGF-βRⅡ在 8 例正常皮肤中均为强阳性。本研究采用的 Real-time PCR 方法具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量较准确、速度快、全封闭反应等优点[2]。比较 CT 法较绝对定量法而言，引入内参对照以便对结果进行控制，避免了绘制标准曲线可能带来的误差。

SK 的发生机制迄今并不完全清楚，其中皮肤老化和紫外线辐射的作用常被人们提及。在活体上进行的 UVB 照射实验表明，紫外线辐射也可引起 TGF-β/Smad 信号转导途径障碍[7]。然而，对于本研究结果显示的脂溢性角化病皮损表皮 TGF-β 受体表达下调的始动原因尚难确定。我们推测，SK 皮损的角质形成细胞很可能存在着多种细胞生长、增殖相关基因表达的

改变，即促进角质形成细胞增殖的相关基因表达上调，而抑制角质形成细胞增殖的相关基因表达下调，脂溢性角化病表皮异常过度增生便可能是这些基因表达改变综合效应的结果。

参考文献：

[1] WANG X J. Role of TGFbeta signaling in skin carcinogenesis[J]. Microsc Res Tech, 2001, 52(4): 420-429.

[2] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25 (4): 402-408.

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

[4] GO C, HE W, ZHONG L, *et al*. Aberrant cell cycle progression contributes to the early-stage accelerated carcinogenesis in transgenic epidermis expressing the dominant negative TGFbetaRII[J]. Oncogene, 2000, 19(32): 3623-3631.

[5] WEEKS B H, HE W, OLSON K L, *et al*. Inducible expression of transforming growth factor beta1 in papillomas causes rapid metastasis [J]. Cancer Res, 2001, 61(20): 7435-7443.

[6] LANGE D, PERSSON U, WOLLINA U, *et al*. Expression of TGF-beta related Smad proteins in human epithelial skin tumors[J]. Int J Oncol, 1999, 14 (6): 1049-1056.

[7] HAN G, LU S L, LI A G, *et al*. Distinct mechanisms of TGF-beta1 mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis[J]. J Clini Invest, 2005, 115(7): 1714-1723.

[8] QUAN T, HE T, KANG S, *et al*. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/Smad pathway in human skin *in vivo*[J]. J Invest Dermatol, 2002, 119(2): 499-506.

（编辑　王　红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)03-0242-01

外伤性大脑间纵裂硬膜下血肿4例

陈立朝，许民辉，邹咏文，陈广鑫　（第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科，重庆 400042）

外伤性大脑间纵裂血肿（traumatic interhemispheric subdural hematomas，TISH）是一种相对少见的特殊的外伤性硬膜下血肿，Airmg 和 Erans 在1940年尸检中发现这种罕见的血肿类型，Jobobe 于1955年首次报道TISH个案。目前仍只有少数报道[1]。现将我科近10年收治的4例TISH结合文献加以讨论，旨在提高对TISH的诊治水平，降低TISH患者的病残率和病死率。

1　临床资料

例1，患者男性，25岁，于就诊前6 h骑摩托车摔伤，当时出现大事不省，约30 min后清醒，不能回忆受伤时情况，30 min后又陷入大事不省状态，入院查体：意识呈浅昏迷状态，GCS评分8分，肢体无瘫痪。头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿，量约60 ml。急诊行开颅大脑间纵裂内血肿清除术，术中探查见出血来源于桥静脉断裂，术后第2天清醒，复查头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿基本消失。患者恢复良好出院。

例2，患者男性，38岁，于就诊前7 d被摩托车撞倒，右额部着地，伤后清醒，伤后当时行头颅CT检查未见异常。于就诊前1 d出现右下肢运动障碍，入院查体：意识清醒，右下肢肌力Ⅲ级，GCS评分14分。头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿，量约40 ml。因家属拒绝手术，经非手术治疗半个月后，右下肢肌力恢复至Ⅴ级，复查头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿明显缩小，量约30 ml。3个月后来院复查，右下肢肌力仍为Ⅴ-级；6个月后来院复查，右下肢肌力恢复至Ⅴ级。

例3，患者女性，58岁，于就诊前10 d下楼梯时摔倒，当时出现大事不省，约20 min后清醒，不能回忆受伤时情况，伤后当时行头颅CT检查未见异常。于就诊前5 h出现双下肢运动障碍伴小便失禁，入院查体：意识清醒，左下肢肌力Ⅲ级，右下肢肌力Ⅱ级，GCS评分14分。头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿，量约30 ml。经非手术治疗1个月后，左下肢肌力恢复至Ⅴ-级，右下肢肌力恢复至Ⅳ级，无小便失禁，复查头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿明显缩小，量约15 ml。3个月后来院复查，左下肢肌力仍为Ⅴ-级，右下肢肌力仍为Ⅳ级；6个月后来院复查，左下肢肌力恢复至Ⅴ级，右下肢肌力恢复至Ⅴ-级。

例4，患者女性，68岁，于就诊前12 d行走时摔伤，当时出现大事不省，约30 min后清醒，不能回忆受伤时情况，伤后当时行头颅CT检查未见异常。于就诊前2 d出现左下肢运动障碍，入院查体：意识清醒，左下肢肌力Ⅲ级，GCS评分14分。头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿，量约20 ml。经非手术治疗40 d后，左下肢肌力恢复至Ⅴ-级，复查头颅CT提示：大脑间纵裂内血肿明显缩小，量约15 ml。6个月后来院复查，右下肢肌力仍为Ⅴ-级。

（下转246页）

作者简介：陈立朝（1971-），男，湖南省沅江市人，硕士，主治医师，主要从事脑外伤及脑血管病临床方面的研究，发表论文15篇，电话：(023)68757243，E-mail：chenlizhao1971@163.com

收稿日期：2005-01-22；修回日期：2005-06-18