文章编号:1000-5404(2007)10-0911-04

论著

脂溢性角化病皮损区 Smurf1 和 Smurf2 表达增强

李 颖[1],何 威[1],何云志[1],黄 海[1],王亚丽[2],杨 扬[1] ([1]第三军医大学新桥医院:[1]皮肤科,[2]病理科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨脂溢性角化病皮损区 Smad 泛素化调节因子 1 和 2(Smad ubiquitination regulatory factor 1 and 2, Smurf1, 2)的表达及其意义。**方法** 采用实时定量聚合酶链式反应(quantitative Real-time PCR,RT-PCR)和免疫组织化学技术分别检测脂溢性角化病皮损和对照正常皮肤中 Smurf1 和 2 的表达情况。**结果** 与对照正常皮肤相比,脂溢性角化病皮损中 Smurf1 和 2 表达水平上调。**结论** 脂溢性角化病皮损中 Smurf1 和 2 的过度表达可干扰转化生长因子 β(transforming growth factor-β, TGF-β)信号转导通路,可能使 TGF-β 抑制上皮增生的作用不能有效发挥,促进了脂溢性角化病表皮的过度增生。

关键词: 脂溢性角化病;Smurf1;Smurf2;转化生长因子 β;信号通路
中图法分类号: R322.99; R392.3; R758.730.2 **文献标识码:** A

Increased expression of Smurf1 and Smurf2 in seborrheic keratosis

LI Ying[1], HE Wei[1], HE Yun-zhi[1], HUANG Hai[1], WANG Ya-li[2], YANG Yang[1] ([1]Department of Dermatology, [2]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Smad ubiquitination regulatory factor 1 and 2 (Smurf1, Smurf2) in the seborrheic keratosis. **Methods** Quantitative Real-Time PCR and immunohistochemical techniques were used to assess the expression of Smurf1 and Smurf2 in seborrheic keratosis and normal control skin. **Results** The expression levels of Smurf1 and Smurf2 in the epidermis of seborrheic keratosis that affected 65 cases (27 male and 38 female, average age: 58.5 years, average course of disease: 4.1 years) admitted to our hospital, were markedly increased in comparison with those of normal control skins from the 30 subjects (10 male and 20 female, average age: 47 years) who underwent plastic surgery. **Conclusion** Overexpressions of Smurf1 and Smurf2 interfere in TGF-β signaling and contribute to formation of aberrant hyperplastic epidermis in seborrheic keratosis.

Key words: seborrheic keratosis; Smurf1; Smurf2; TGF-β; signal transduction pathway

转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)在维持上皮组织内环境的稳定方面发挥重要作用。正常情况下,TGF-β 对于包括表皮细胞在内的上皮细胞具有抑制增生的作用[1]。老年人面部常见良性表皮肿瘤-脂溢性角化病的典型病理改变为表皮细胞的失控性过度增生。已有研究者[2]对脂溢性角化病进行了 TGF-β 表达水平的研究,他们发现,在脂溢性角化病皮损区 TGF-β 表达水平升高。可是为什么皮损区表达升高的 TGF-β 并不能抑制脂溢性角化病角质形成细胞的过度增殖呢?研究结果还提示,脂溢性角化病皮损区存在 TGF-β/Smads 信号转导途径的障碍,TGF-β 受体在脂溢性角化病皮损区表达下调或缺失[2,3]。而 Smad 泛素化调节因子 1 和 2(Smad ubiquitination regulatory factor1 and 2, Smurf1,2)不仅参与对 TGF-β 受体的降解,还可通过其他多种途径对 TGF-β 信号转导途径发挥着负反馈调节的作用[4-7]。由此我们设想,脂溢性角化病皮损区 TGF-β 受体表达减少或缺失是否与皮损局部 Smurf1 和 Smurf2 表达水平的改变有关呢?为此,我们采用 RT-PCR 和免疫组织化学技术对 Smurf1 和 Smurf2 在脂溢性角化病中的表达情况进行了研究。

基金项目: 国家自然科学基金(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,博士研究生,医师,主要从事 TGF-β 信号转导在皮肤肿瘤发生中的作用方面的研究。电话:(023)68755629, E-mail: liying_7886@yahoo.com.cn
通讯作者: 何 威,电话:(023)68755629,E-mail: weihegj@yahoo.com.
收稿日期: 2006-09-18;**修回日期:** 2007-01-30

1 材料与方法

1.1 临床资料

以脂溢性角化病皮损为研究对象，正常皮肤为对照，所有标本均在局麻下以刀切法取材。从我院皮肤科门诊和病房共收集脂溢性角化病皮损65例，其中男性27例，女性38例，平均年龄58.5岁，平均病程4.1年，发生于面部者37例，躯干部28例，所有皮损既往均未接受任何治疗，脂溢性角化病之诊断均经病理检查证实。30例正常皮肤取自接受美容或整形外科手术的个体，其中男性10例，女性20例，平均年龄47岁，面部皮肤17例，躯干皮肤13例。每一标本取材后均立即分为两份，一份置于10%福尔马林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

Rotor Gene 2000型荧光定量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

兔抗人Smurf1多克隆抗体（H-60）sc-25510（美国Santa Cruz公司），兔抗人Smurf2多克隆抗体（H-50）sc-25511（美国Santa Cruz公司），EliVision™ plus免疫组化试剂盒KIT-9901（福州迈新生物技术有限公司），Tripure Isolation试剂（美国Roche公司），RT Reagent和SYBR® Premix Ex *Taq*™（日本TaKaRa Bio株式会社）。

1.4 引物设计

按照荧光定量PCR引物设计原则[8]设计引物。人Smurf1正义引物：5′-GGTGGCACTGCACTCCTAGAAC-3′，反义引物：5′-GCGCGGACCCAAAGTAGAAC-3′，扩增片段为130 bp；人Smur2正义引物：5′-TGCACTAACAACCTGCCGAAAG-3′，反义引物：5′-CTTGTCATTCCACAGCAAATCCAC-3′，扩增片段为136 bp；GAPDH作为内参照校准基因，其正义引物：5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′，反义引物：5′-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3′，扩增片段为142 bp（TaKaRa Biotechnology Co., Ltd合成PCR引物）。

1.5 组织总RNA提取和反转录合成cDNA

参照Tripure Isolation Reagent说明书要求从组织中抽提总RNA。根据$D(260)/D(280)$比值判定RNA纯度。参照RT Reagent说明，依次加入总RNA 1 μg，5×M-MLV buffer 4 μl，dNTP Mixture 1 μl，Random 6 mers 1 μl，M-MLV Rnase 0.5 μl，Rnase Inhibitor 0.5 μl，ddH_2O补至总反应体系为20 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 ℃冰箱中待用。

1.6 Real-time PCR

参照文献[2]进行RT-PCR检测脂溢性角化病组与正常皮肤组Smurf1和Smurf2的表达。50 μl反应体系内含模板cDNA 200 ng，扩增条件为95 ℃ 10 s，每1循环95 ℃ 5 s、62 ℃ 20 s，共45个循环。设置融解曲线检测自65～95 ℃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，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法对Real-time PCR实验结果进行数据分析。$\Delta CT_{Smurf1} = CT_{Smurf1} - CT_{GAPDH}$，$\Delta CT_{Smurf2} = CT_{Smurf2} - CT_{GAPDH}$，$\Delta\Delta CT = \Delta CT$对照$ - \Delta CT$病变，差别倍数$= 2^{-\Delta\Delta CT}$[8]。

1.7 EliVisionTM plus免疫组化法

4 μm厚石蜡切片按常规脱蜡至水，按EliVision™ plus免疫组化试剂盒说明进行。一抗（抗体的工作浓度均为1∶50）4 ℃孵育过夜，另用PBS液代替一抗作阴性对照；酶标抗鼠/兔聚合物（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，镜下观察。Smurf1和Smurf2的阳性着色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。

1.8 统计学处理

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，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 Smurf1和Smurf2 mRNA在脂溢性角化病皮损与正常对照皮肤中的表达

利用上述Smurf1、Smurf2和GAPDH引物所扩增的基因片断经比照融解曲线，显示了扩增的一致性（图1）。琼脂糖凝胶电泳也显示PCR扩增片段与所设计大小一致（图2）（Smurf2的扩增曲线和融解曲线与Smurf1的类似，故省略）。

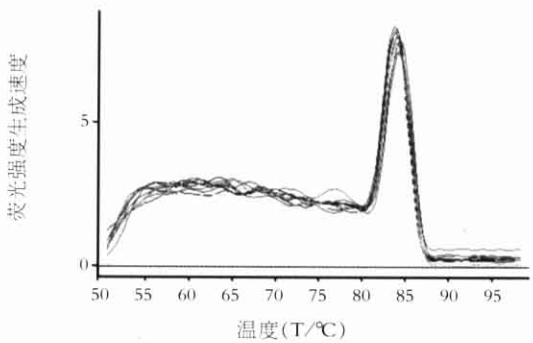
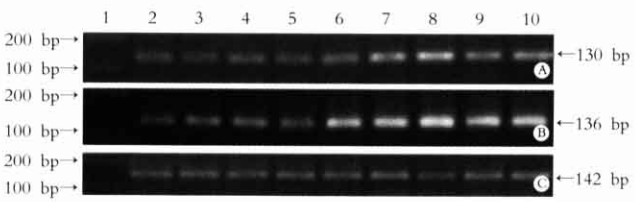


图1 脂溢性角化病和对照正常皮肤Smurf1 mRNA Real-time PCR扩增融解曲线图



A：Smurf1；B：Smurf2；C：GAPDH

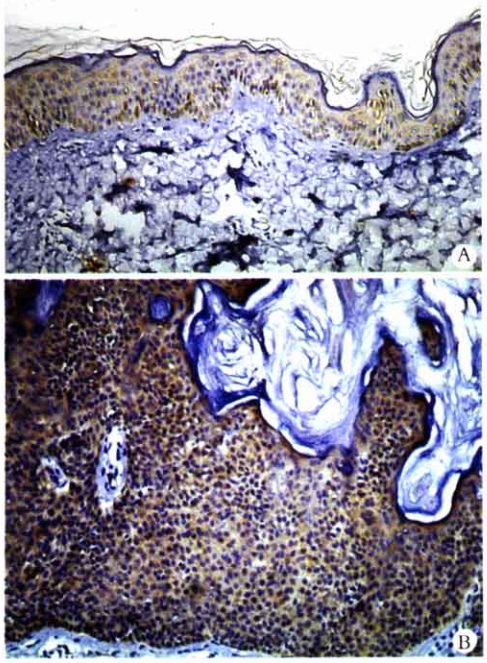
1：DL1000标准；2-5：对照正常皮肤；6-10：脂溢性角化病皮损

图2 SK和对照正常皮肤Smurf1和Smurf2 mRNA Real-time PCR扩增电泳图

Smurf1 和 GAPDH 组间 $2^{-\Delta\Delta CT}=3.76$，Smurf2 和 GAPDH 组间 $2^{-\Delta\Delta CT}=4.26$，$2^{-\Delta\Delta CT}$ 大于 2 即差别倍数大于 2，表明脂溢性角化病与正常对照皮肤两组间 Smurf1 和 Smurf2 mRNA 表达水平有显著差异，即脂溢性角化病中 Smurf1 和 Smurf2 mRNA 表达水平显著高于正常对照皮肤。

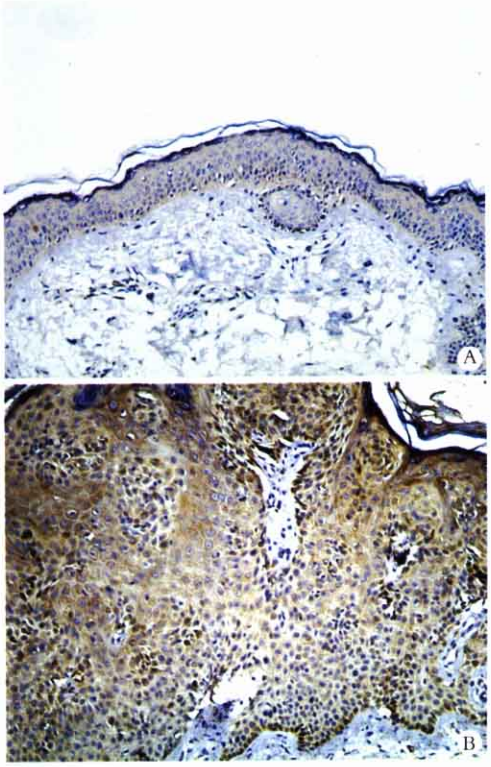
2.2　Smurf1 和 Smurf2 蛋白在脂溢性角化病皮损与正常对照皮肤中的表达

用 EliVision™ plus 免疫组化法检测 Smurf1 与 Smurf2 在脂溢性角化病中的表达情况。Smurf1 在 47 例脂溢性角化病皮损中呈阳性表达，染色强度呈棕黄至黄褐色（图 3B）；正常皮肤表皮及真皮内微血管可见 Smurf1 的阳性表达，染色强度呈浅棕黄色（图 3A）。Smurf2 在 46 例脂溢性角化病皮损中呈阳性表达，染色强度呈棕黄至黄褐色（图 4B）；正常皮肤表皮及真皮内微血管可见 Smurf2 的阳性表达，染色强度呈浅棕黄色（图 4A）。经图像分析系统测得的灰度值代表染色强度。脂溢性角化病组 Smurf1 的灰度为（165.64 ± 8.35），Smurf1 在对照正常皮肤组的灰度为[（172.14 ± 7.51），$t=3.79$，$P<0.01$]。脂溢性角化病组 Smurf2 的灰度为（167.72 ± 8.20），Smurf2 在对照正常皮肤组的灰度为[（173.31 ± 7.34），$t=3.32$，$P<0.01$]。通过对免疫组化染色结果的分析可以得出结论，脂溢性角化病中 Smurf1 和 Smurf2 的表达较正常皮肤均显著增强。



A：正常皮肤；B：脂溢性角化病

图 3　Smurf1 在脂溢性角化病皮损和对照正常皮肤中的表达　（Elivison™ plus × 200）



A：正常皮肤；B：脂溢性角化病

图 4　Smurf2 在脂溢性角化病皮损和对照正常皮肤中的表达　（Elivison™ plus × 200）

3　讨论

TGF-β 的信号转导首先需要 TGF-β 与其膜受体复合物（TGF-βRI 和 TGF-βR Ⅱ）结合，从膜受体到细胞核的细胞内信号转导则由多种 Smad 蛋白介导和调节。Smads 蛋白受跨膜受体磷酸化并结合成复合物，经细胞质移位入核，启动或调控特定基因的转录，从而发挥 TGF-β 维持表皮内环境稳定的作用。然而，核内 Smad 复合物的积聚则会导致基因转录的过度活化。因此，Smads 的适当降解必然是调控 Smads 蛋白的一个重要的问题。降解 R-Smads 泛素连接酶的发现[9]揭示了 Smads 在调控基因转录的同时受泛素-蛋白水解酶复合体的降解，在泛素蛋白酶体作用体系中，E3 泛素连接酶起关键作用。其中，TGF-β/Smads 信号转导途径相对应的 E3 泛素连接酶成员被称为 Smad 泛素化调节因子（Smurf），包括 Smurf1 和 Smurf2[10]。

Fukuchi 等[11]用免疫组织化学和免疫印迹方法对 80 例食管鳞状细胞癌患者病检组织及食管鳞状细胞系进行的研究表明：食管鳞癌病损中 Smurf2 的高表达与肿瘤的浸润、淋巴结转移和低生存率相关，Smurf2 和 Smad2 呈负相关。Subramaniam 等[12]发现 RNF11 在乳腺癌细胞中高度表达，通过对 RNF11 的定向诱突

变发现，RNF11 的功能结构域 PY 基序的酪氨酸残端必须首先和 Smurf2 结合才能发挥作用。Smurf 干扰 TGF-β 信号途径的作用主要包括以下几方面：①Smurf 通过与 I-Smad 相互作用，降解 TGF-β 受体。I-Smad 中的 Smad7 可募集 Smurf 到活化的 TGF-βR Ⅰ，导致该受体降解，进而阻碍 TGF-β 配体与其受体的结合[6]。②Smurf 通过与 R-Smads 相互作用，降解 R-Smads。Smurf 可直接与 R-Smads 结合，诱导 R-Smads 降解；Smurf 还可以与细胞核内 R-Smads-Smad4 复合物结合，介导 R-Smads-Smad4 复合物的降解；羧基末端磷酸化的 Smad3 在完成核内转录激活使命后，在 E3 家族成员中的 SCF/Roc1 的辅助下转运出核，在胞质中可被 Smurf 降解[4]。③Smurf 通过对 R-Smads 的降解，阻碍 TGF-β 信号在细胞内的转导，进一步控制 TGF-β 信号强度。Smurf 与 Smad7 一起，参与 Co-Smad 即 Smad4 的降解[13]。④Smurf 通过对 Smad 通路调节蛋白的降解来间接调节 TGF-β/Smads 通路。例如，作为转录辅助抑制因子的 SnoN 基因，通过与核内的 Smad2/3-4 复合物结合，来抑制 Smads 的转录活性。而 SnoN 的泛素化同时又受到 Smurf2 的介导[7]。

脂溢性角化病又称老年疣，好发于老年人。因此皮肤老化在发病机制中常被人们提及。研究表明 Smurf2 可引起端粒的缩短，而端粒长度的缩短可引起细胞衰老[14]。我们的 RT-PCR 和免疫组化研究均发现：脂溢性角化病皮损区表皮存在着 Smurf1 和 Smurf2 表达增强。我们推测，脂溢性角化病皮损区表皮 Smurf 表达增加的意义有可能在于通过上述多方面干扰 TGF-β 信号转导途径，阻断 TGF-β 对角质形成细胞增殖的抑制作用，从而促进了脂溢性角化病皮损区表皮过度增殖之病理特征的形成。

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

[3] 李 颖，何 威，林自华，等. 脂溢性角化病皮损的表皮中 TGF-β Ⅰ型和Ⅱ型受体表达下调[J]. 第三军医大学学报，2006，28(3)：239-242.

[4] Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, *et al*. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(5): 1431-1443.

[5] Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, *et al*. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 *via* CREB-binding protein/p300 recruitment[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8343-8350.

[6] Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, *et al*. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(16): 12477-12480.

[7] Mizuide M, Hara T, Furuya T, *et al*. Two short segments of Smad3 are important for specific interaction of Smad3 with c-Ski and SnoN[J]. J Biol Chem, 2003, 278(1): 531-536.

[8] 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.

[9] Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, *et al*. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation[J]. Nature, 1999, 400(6745): 687-693.

[10] Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation[J]. Oncogene, 2004, 23(11): 2071-2078.

[11] Fukuchi M, Fukai Y, Masuda N, *et al*. High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(24): 7162-7165.

[12] Subramaniam V, Li H, Wong M, *et al*. The RING-H2 protein RNF11 is overexpressed in breast cancer and is a target of Smurf2 E3 ligase[J]. Br J Cancer, 2003, 89(8): 1538-1544.

[13] Moren A, Imamura T, Miyazono K, *et al*. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases[J]. J Biol Chem, 2005, 280(23): 22115-22123.

[14] Zhang H, Cohen S N. Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence[J]. Genes Dev, 2004, 18(24): 3028-3040.

（编辑 王 红）

（上接 910 页）

坦索罗辛一般被认为是治疗前列腺增生引起下尿路梗阻的专用药物，但是，坦索罗辛除对前列腺平滑肌具有明显的松弛作用外，对尿路的 α 受体中的 α1a、α1d 有明显的阻断作用，从而导致输尿管、尿道括约肌和逼尿肌松弛；据此，Kakizaki 等[2] 对尿路综合征的患者采用坦索罗辛治疗取得很好效果；杨小华等[3] 对坦索罗辛在尿路作用的研究发现，口服坦索罗辛不受食物的影响，可被消化道完全吸收，口服后 10 min 起效，60 min 达到血浓度峰值，平均尿流率增加 1.1 ml/s，排尿期后尿道管径增宽 0.6 mm。后尿路径和尿流率的增加会提高输尿管通流性，辅以阿托品是增加尿道平滑肌，尤其是尿道括约肌的松弛，更有利于结石的排除。坦索罗辛对外周血管有一定的扩张作用并引起血压下降，可以对抗阿托品的升压和增快心率作用，尤其适合在伴有高血压的输尿管结石患者中使用。

关键词：输尿管结石；盐酸坦索罗辛；肾绞痛
中图法分类号：R693.405 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李仲廉. 临床疼痛治疗学[M]. 第 2 版. 天津：天津科学技术出版社，2000：416-417.

[2] Kakizaki H, Koyanagi T. Current view and status of the treatment of lower urinary tract symptoms and neurogenic lower urinary tract dysfunction[J]. BJU Int, 2000, 85(Suppl 2): 25-30.

[3] 杨小华，严光义，齐书武. 坦索罗辛治疗前列腺增生后尿流率及排尿期后尿道管径的改变[J]. 临床泌尿外科杂志，2001，16(6)：228.

（编辑 汪勃俭）