文章编号:1000-5404(2007)23-2219-04

论著

脂溢性角化病皮损区受体活化 Smad 的变化

杨 扬,何 威,李 颖,何云志,黄 海,林自华,吴 军,杨进清 (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(transforming growth factor-β, TGF-β)信号转导通路中受体活化 Smads(Smad2, Smad3)在脂溢性角化病皮损区的表达及其意义。**方法** 采用反转录-实时定量聚合酶链式反应(RT and quantitative Real-Time PCR)和免疫组化技术分别检测脂溢性角化病皮损和正常对照皮肤中 Smad2 及 Smad3 的 mRNA 和 Smad1/2/3 及磷酸化 Smad2/3(p-Smad2/3)蛋白的表达情况。**结果** 与正常对照皮肤组相比,脂溢性角化病皮损中 Smad2、Smad3 的 mRNA 以及 Smad1/2/3、p-Smad2/3 的表达水平下降。**结论** 脂溢性角化病中受体活化 Smads(Smad2、Smad3)和 p-Smad2/3 表达下调可阻断 TGF-β 信号转导,可能使 TGF-β 抑制上皮增生的作用不能有效发挥,从而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;转化生长因子β;受体活化 Smad;Smad2;Smad3;p-Smad2/3;信号通路
中图法分类号: R329-33; R730.23; R739.5 **文献标识码:** A

Down-regulation of receptor-activited Smads in seborrheic keratosis

YANG Yang, HE Wei, LI Ying, HE Yun-zhi, HUANG Hai, LIN Zi-hua, WU Jun, YANG Jin-qing (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of receptor-activited Smads (Smad2, Smad3) and phosphorylated Smad2,3 (p-Smad 2/3) in seborrheic keratosis. **Methods** The skin tissues of seborrheic keratosis from 45 patients (25 males and 20 females, average age: 57.6 years, average course of disease: 3.8 years) who received no treatment before and normal skin tissues from 40 patients (22 males and 18 females, average age: 48 years) undergoing plastic surgery in our hospital were examined for the mRNA levels of Smad2 and Smad3 by quantitative real-time PCR, and the protein levels of Smad1/2/3 and p-Smad2/3 by immunohistochemistry. **Results** The mRNA levels of receptor-activited Smads (Smad2, Smad3) and the protein levels of Smad1/2/3, p-Smad2/3 were significantly down-regulated in the skin tissues of seborrheic keratosis in comparison with control tissues. **Conclusion** Down-regulation of receptor-activited Smads (Smad2, Smad3) and p-Smad2/3 might interfere TGF-β signal transduction pathway and contribute to formation of aberrant hyperplastic epidermis in seborrheic keratosis.

Key words: seborrheic keratosis; TGF-β; receptor-activited Smad; Smad2; Smad3; p-Smad2/3; signal transduction pathway

脂溢性角化病(seborrheic keratosis,SK)是好发于老年人的常见良性表皮增生性肿瘤。TGF-β 信号转导途径中某些环节(TGF-β、TGF-β 受体、Smad7、Smurf)的异常参与了脂溢性角化病的发生和发展[1-3]。在以往研究基础上我们推测,脂溢性角化病中 TGF-β 信号转导途径障碍很可能还涉及该信号通路的其他一些环节,如 Smad 家族中受体活化 Smad 的表达。为此,我们应用 RT-PCR 和免疫组化技术对受体活化 Smad 中主要与 TGF-β 信号转导相关的 Smad2 及 Smad3 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: 杨 扬(1981-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事TGF-β在皮肤肿瘤发生中的作用等方面的研究。电话:(023)68755629,E-mail: yangyang81@sohu.com
通讯作者: 何 威,电话:(023)68755739,E-mail:weihegj@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-07-10;**修回日期:** 2007-07-28

1 材料与方法

1.1 临床资料

以脂溢性角化病皮损区为研究对象,以正常皮肤为对照,所有标本均在局麻下以刀切法获取。从本科门诊或病房收集脂溢性角化病患者45例,其中男性25例,女性20例,平均年龄57.6岁,平均病程3.8年,发生于面部31例、躯干部14例,所有皮损既往未接受任何治疗,脂溢性角化病的诊断均经病理检查证实。40例正常皮肤标本取自我院门诊接受美容整形外科手术的个体,其中男性22例,女性18例,平均年龄48岁,包括面部皮肤25例,躯干皮肤15例。每一标本取材后均立即分成2份,1份置于10%甲醛磷酸缓冲液中固定后,行常规脱水、透明和石蜡包埋;另1份立即置于液氮中冻存备用。

1.2 主要仪器

ABI 7500 型荧光定量 PCR 反应扩增仪(美国 ABI 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

鼠抗人 Smad1/2/3 单克隆抗体 sc-7960 和兔抗人 p-Smad2/3

多克隆抗体 sc-11769(美国 Santa Cruz 公司),即用型 EliVision™ plus 免疫组化试剂盒 KIT-9001(福建迈新生物技术有限公司),Tripure Isolation 试剂(美国 Roche 公司),RT Reagent 试剂盒和 SYBR® Premix Ex *Taq*™(日本 TaKaRa 公司)。

1.4 引物设计

依据荧光定量 PCR 引物设计原则[4]设计引物。人 Smad2 的正义引物:5′-TTCCAGACTTTGTGCTGTCCAGTAA-3′,反义引物:5′-AGGGCAGAGGCTCCACTGAGTA-3′,扩增片段为 120 bp;人 Smad3 的正义引物:5′-AAACCAGGCTGGCTAAACAAGTG-3′,反义引物:5′-GCAACAGCAGCAGTGAAGGTG-3′,扩增片段为 179 bp;以三磷酸甘油醛脱氢酶(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。由日本 TaKaRa 公司合成以上所有引物。

1.5 组织总 RNA 的提取

参照 Tripure Isolation 试剂说明书的具体步骤,从组织中抽提总 RNA。抽提组织总 RNA 过程中的所有容器和移液器吸头均经焦碳酸二乙酯(Sigma 公司)水处理,以灭活 RNA 酶。应用 DU800 紫外分光光度仪(Beckman 公司)测定 $D(260)/D(280)$ 值以判定组织总 RNA 纯度,并取适量 RNA 行琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶成像分析仪观察,以验证所抽提的组织总 RNA 的质量。

1.6 反转录合成 cDNA

参照 RT Reagent Kit 反转录试剂盒说明书,依次加入总 RNA 500 ng、5 × ExScript™ Buffer 2 μl、dNTP 混合剂(各 10 mmol/L) 0.5 μl、Random 6 mers(100 mmol/L) 0.5 μl、ExScript™ RTase(200 U/μl) 0.25 μl、RNA 酶抑制剂(40 U/μl) 0.25 μl, ddH_2O 补至总反应体系为 10 μl,充分混匀后置于常规 PCR 仪中,设定温度为 42 ℃ 15 min,然后 95 ℃ 2 min 使反转录酶失活,所得 cDNA 产物置于 -20 ℃冰箱中保存备用。

1.7 Real-Time PCR

参照 SYBR® Premix Ex *Taq*™ 试剂盒(TaKaRa 公司)说明书,依次加入模板 cDNA 200 ng、各对引物 0.2 μmol/L 1 μl、2 × SYBR® Premix Ex *Taq*™(内含 *Taq* DNA 聚合酶、$MgCl_2$、dNTP Mixture、SYBR® Green Ⅰ以及反应缓冲液,各反应液出厂时已定) 25 μl, 灭菌 ddH_2O 补至总体积为 50 μl, 混匀并轻微离心后置于 ABI 7500 型荧光定量 PCR 反应扩增仪中进行 Real-Time PCR 反应。50 μl 反应体系内含模板 cDNA 500 ng,扩增条件为 94 ℃ 30 s,每个循环设 94 ℃ 30 s,61 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,共 40 个循环。设置熔解曲线,检测 55 ~ 95 ℃的熔解温度,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产物的单一性,采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法对实时定量 PCR 结果进行数据分析。$\triangle CT_{Smad2} = CT_{Smad2} - CT_{GAPDH}$, $\triangle CT_{Smad3} = CT_{Smad3} - CT_{GAPDH}$, $\triangle\triangle CT = \triangle CT_{病变} - \triangle CT_{对照}$,差别倍数 $= 2^{-\triangle\triangle CT}$[4]。

1.8 EliVision™ plus 免疫组化法

4 μm 厚石蜡切片按常规脱蜡至水,按 EliVision™ plus 试剂盒说明进行免疫组化染色,所用一抗(抗体的工作浓度均为 1∶50)4 ℃孵育过夜,另用 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。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,其余各步骤完成后均用 PBS 轻度震荡,漂洗 3 次,每次 5 min。最后应用 DAB 工作液避光显色,光镜下观察染色程度。Smad1/2/3 蛋白的阳性着色表现为细胞质被染成浅黄色和棕黄色;p-Smad2/3 蛋白的阳性着色表现为细胞质和细胞核被染成浅黄色、棕黄色、棕褐色。将免疫组化结果进行显微照相后,使用 Qwin 真彩图像分析系统(德国 Leica 公司)测定和判断照片中阳性区域的单位面积百分比来表示免疫组化染色结果。

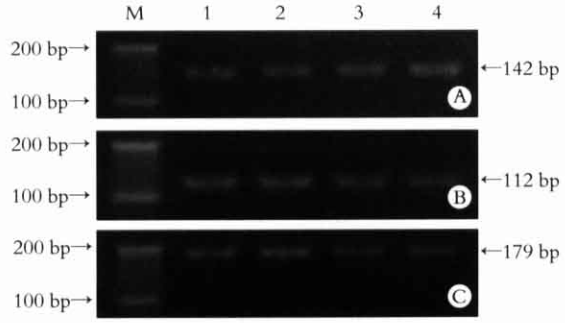
1.9 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 Smad2 和 Smad3 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 Smad2、Smad3 和 GAPDH 引物所扩增出的基因片段,经比照扩增曲线,显示了扩增的一致性,且具有平台期。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)。与正常皮肤对照组相比,Smad2 和 Smad3 在脂溢性角化病组中的 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 值分别为 0.55 和 0.59,即 Smad2 和 Smad3 在脂溢性角化病皮损中的表达水平分别相当于它们在正常皮肤中表达水平的 55% 和 59%。



A: GAPDH; B: Smad2; C: Smad3

M: 标准;1、2: 正常皮肤组;3、4: 脂溢性角化病组

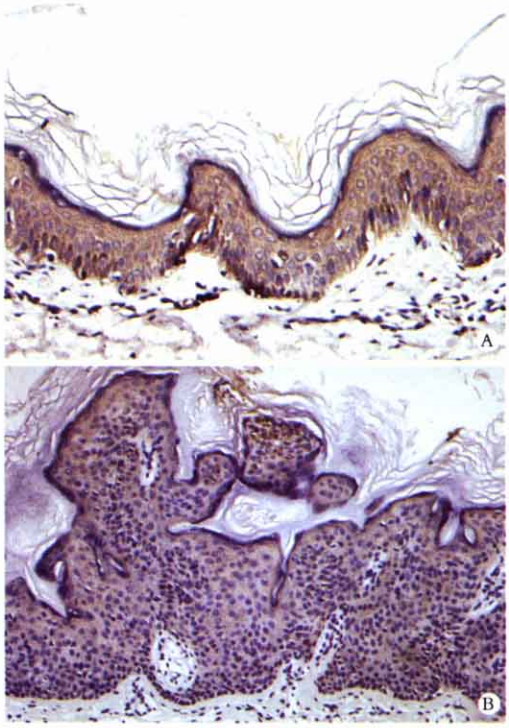
图 1 正常皮肤组和脂溢性角化病皮损中 Smad2 和 Smad3 mRNA Real-time PCR 扩增电泳图

2.2 Smad1/2/3 和 p-Smad2/3 在脂溢性角化病皮损与正常对照皮肤中的表达

EliVision™plus 免疫组化染色显示,Smad1/2/3 蛋白在脂溢性角化病和正常皮肤表皮中的表达均位于细胞质;p-Smad2/3 蛋白在表皮细胞细胞核和细胞质中均有表达,但主要位于细胞核中。本实验中所有受试的正常皮肤的表皮中均有 Smad1/2/3(图 2A)和 p-Smad2/3(图 3A)蛋白的表达,染色强度呈浅黄至黄褐色。其中,颜面部位(曝光区)与躯干部位(非曝光区)的免疫组化染色强度并无明显差别。

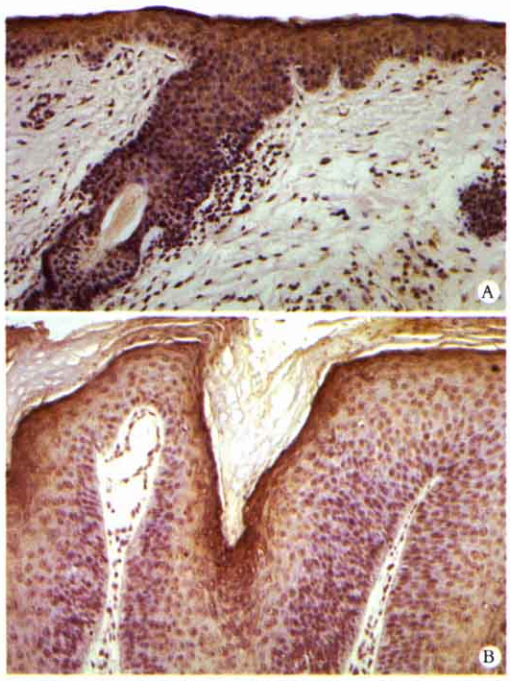
Smad1/2/3 蛋白在受试的脂溢性角化病皮损的表皮中染色呈浅棕黄色(图 2B),其染色强度与正常皮肤组相比明显降低。p-Smad2/3 蛋白在脂溢性角化病皮损的表皮中染色呈浅褐色(图 3B),其染色强度也较正常皮肤组明显降低。应用图像分析系统测得的阳性区域单位面积百分比代表免疫组化染色强度,Smad1/2/3 的染色强度在正常皮肤组为(43.16 ± 4.83),在脂溢性角化病组为(39.93 ± 6.07),两者之间差异具有统计学意义($t = 3.23$, $P < 0.05$);p-Smad2/3 的染色强度在正常皮肤组为(47.07 ± 4.59),在脂溢性角化病组为(44.16 ± 5.04),

两者之间差异具有统计学意义（$t = 2.91$，$P < 0.05$）。结果表明，脂溢性角化病皮损中受体活化 Smad1/2/3 和 p-Smad2/3 蛋白表达较正常皮肤均显著降低。



A：正常皮肤组；B：脂溢性角化病组

图 2　Smad1/2/3 在正常皮肤组和脂溢性角化病组皮损中的表达　（EliVision™plus × 200）



A：正常皮肤组；B：脂溢性角化病组

图 3　p-Smad2/3 在正常皮肤组和脂溢性角化病组皮损中的表达　（EliVision™plus × 200）

3　讨论

TGF-β 超家族在胚胎发育、细胞分化、免疫反应及生长控制等一系列生理过程中发挥重要的作用[5]。TGF-β 在人类细胞中包括 TGF-β_1、TGF-β_2、TGF-β_3 3 种分别被不同基因编码的异构体亚型。它们均属于细胞生长、分化的调控因子，对上皮细胞主要具有生长抑制作用。在细胞信号转导中，TGF-β_1、TGF-β_2、TGF-β_3 与其相应受体结合并通过其下游信号传递分子如 Smad 蛋白使其信号下传并参与目的基因的表达和调控。Smad 家族是 TGF-β 超家族信号转导通路中参与细胞内信号转导或调节的重要分子[6]，分为受体活化 Smad（Smad1、Smad2 和 Smad3）、共有 Smad（Smad4）和抑制性 Smad（Smad7）3 类。其中，作为受体活化 Smad，Smad1 介导了骨形态发生蛋白（BMP）的信号转导，Smad2 和 Smad3 及其磷酸化形式介导了 TGF-β 信号在细胞质中的转导；Smad4 可与 p-Smad 2/3 形成复合物，移位入细胞核参与目的基因的表达；Smad7 作为负性调节因子具有调节和抑制 TGF-β 信号转导的作用。以上各类 Smad 蛋白相互作用和影响共同参与并维持细胞中 TGF-β 信号转导途径的稳定。既往研究已表明脂溢性角化病皮损区表皮 TGF-β 及其受体表达水平有变化[2]，在本研究中我们的研究兴趣主要集中在 TGF-β 受体下游与 TGF-β 信号转导相关的受体活化 Smad 中 Smad2 与 Smad3 的表达情况。

动物实验表明，与野生型小鼠相比，Smad2$^{+/-}$转基因小鼠更易形成低分化表皮肿瘤[7]；TGF-β 主要是通过 Smad3 进而调节角质形成细胞的生长抑制作用[8]，从而抑制表皮肿瘤的发生。此外，小鼠皮肤诱癌实验也显示 Smad2 和 Smad3 蛋白在表皮肿瘤中的表达下调或缺失。大量研究均表明，包括 Smad2 与 Smad3 在内的多种 Smad 蛋白表达水平的改变与皮肤肿瘤的发生和发展有密切关系[9]。

本研究采用鼠抗人 Smad1/2/3 单克隆抗体进行的免疫组化染色，结果显示脂溢性角化病皮损区表皮 Smad1/2/3 表达较正常皮肤组显著减弱，由于此单抗与 Smad1、Smad2 和 Smad3 3 种受体活化 Smad 均有交叉反应性，因此可部分反映包括 Smad2 和 Smad3 在内的受体活化 Smad 在蛋白水平的表达下调。RT-PCR 结果进一步证实，与正常皮肤组相比，Smad2 和 Smad3 mRNA 在脂溢性角化病皮损区的表达也显著下调。除了发现脂溢性角化病皮损区 Smad2 和 Smad3 在 mRNA 和蛋白水平均有表达下调外，免疫组化染色还显示 Smad2 和 Smad3 磷酸化形式的蛋白量也显著减少。这些结果提示，脂溢性角化病皮损区表皮中以 Smad2、Smad3 为代表的受体活化 Smad 表达下调以及其磷酸

化形式的蛋白量的减少同样可导致TGF-β信号转导通路发生障碍，干扰TGF-β抑制上皮细胞异常增殖作用的有效发挥，从而有助于该表皮肿瘤的发生和发展。综合既往研究[2,3]和本研究结果可以发现，脂溢性角化病中确实存在着TGF-β信号转导通路的多个环节障碍，包括TGF-β受体表达下调、Smad7和Smurf表达上调、受体活化Smad(Smad2和Smad3)表达下调及其磷酸化形式的蛋白量的减少。

脂溢性角化病的发病机制涉及皮肤老化和紫外线辐射等多种因素。我们推测，脂溢性角化病皮损的角质形成细胞中很可能同时存在着多种相关基因表达和调控的异常，即有促进角质形成细胞增殖的相关基因表达上调，还有抑制上皮细胞增殖作用的相关基因表达下调，如TGF-β信号转导相关的受体活化Smad的表达下调。脂溢性角化病的形成便可能是这些基因表达变化及其相互作用的综合效应。

参考文献：

[1] 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 Clin Invest, 2005, 115(7): 1714-1723.

[2] 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.

[3] 李 颖，何 威，何云志，等. 脂溢性角化病皮损区Smurf1和Smurf2表达增强[J]. 第三军医大学学报，2007，29(10)：911-914.

[4] 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.

[5] Rahimi R A, Leof E B. TGF-beta signaling: a tale of two responses[J]. J Cell Biochem, 2007, 102(3): 593-608.

[6] 陈 琛，叶冬梅，邵淑娟，等. 转化生长因子-β/Smad信号通路研究进展[J]. 医学分子生物学杂志，2006，3(2)：126-128,132.

[7] Tannehill-Gregg S H, Kusewitt D F, Rosol T J, *et al*. The roles of Smad2 and Smad3 in the development of chemically induced skin tumors in mice[J]. Vet Pathol, 2004, 41(3): 278-282.

[8] Kretschmer A, Moepert K, Dames S, *et al*. Differential regulation of TGF-beta signaling through Smad2, Smad3 and Smad4[J]. Oncogene, 2003, 22(43): 6748-6763.

[9] Bornstein S, Hoot K, Han G W, *et al*. Distinct roles of individual Smads in skin carcinogenesis[J]. Mol Carcinog, 2007, 46(8): 660-664.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)23-2222-01

男性乳腺癌患者的心理分析及对策

黄红梅，陈显春 （第三军医大学西南医院乳腺中心，重庆 400038）

男性乳腺癌较少见，在欧洲的发病率是1/100 000，占所有乳腺癌的1%[1]，其肿瘤转移早，预后较差。患者一旦知晓确诊为乳腺癌，会产生严重的心理负担及一系列心理问题。我院从2003年3月至2006年12月共收治4例男性乳腺癌患者，通过良好的护患交流，了解患者心理问题，并给予心理护理，取得了良好的效果，现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组4例男性乳腺癌患者，年龄最大81岁，最小63岁，平均69.25岁。4例中有1位因家庭经济原因放弃手术，其他3位均行乳腺癌改良根治术，术后经病理检查证实均为乳腺癌。

1.2 常见的心理问题

患者一旦得知患乳腺癌，无论采取哪种治疗手段均会使患者产生心理负担，导致一系列心理问题。患者均经历震惊、否认、抑郁、对抗治疗及适应这几个痛苦的心理过程，其常见的心理问题主要表现在对自身疾病的怀疑、否认、恐惧、沮丧、自卑、焦虑、抑郁、对抗治疗。

1.3 产生心理问题的原因

①传统观念认为乳腺癌应该是女性疾病，男性一旦患乳腺癌心理就难以接受，更易出现焦虑、抑郁，甚至轻生。②相关知识缺乏：几乎所有人谈“癌”色变，认为癌症是不治之症。有些患者对有关乳腺癌知识不甚了解，主观猜疑，臆想，由于知识缺乏而带来恐惧不安，加重了心理负担[2]。③担心手术：如手术后体形改变——乳房缺如，有损男人尊严，还有担心术后肢体功能不能恢复，造成劳动力减弱或丧失，影响自我实现，加重家庭负担。④担心复发：放疗、化疗引起的毒副作用使患者时刻体会乳腺癌的存在，常担心复发。

1.4 护理措施

对于患者的真实病情，特殊情况应采取适度保密的措施。对于已得知病情的患者，应主动与其沟通交流，为其讲解相关的疾病知识，对其提出的问题给予慎重、科学、耐心地解答，并给予安慰与鼓励，使其对乳腺癌有正确的认识。对于极度悲观与失望的患者要分析原因，做好心理安慰的同时向患者介绍有关乳腺癌治疗新进展以及已取得成功的典型病例，并介绍患同种疾病并治疗效果及心态较好的患者相互认识，促进患者之间

（下转2229页）

作者简介：黄红梅(1980-)，女，重庆市人，护师，主要从事乳腺疾病临床护理方面的研究。电话：(023)65324997

收稿日期：2007-03-13；修回日期：2007-03-23