论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0314-04

寻常性银屑病皮损区表皮 Smad4 表达下调

叶超然,何 威,黎 智,杨进清,吴 军,何云志,黄 海 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨转化生长因子β(TGF-β)/Smad信号转导途径中共有Smad(Smad4)在寻常性银屑病皮损中的表达水平及其意义。**方法** 采用反转录-实时定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-Time RT-PCR)和免疫组化技术分别检测寻常性银屑病皮损和正常对照皮肤中Smad4 mRNA及其蛋白质的表达情况。**结果** 寻常性银屑病皮损中Smad4 mRNA及其蛋白质表达水平显著低于正常对照皮肤。**结论** 寻常性银屑病皮损表皮中Smad4表达下调可干扰TGF-β信号转导,有助于寻常性银屑病皮损中表皮增殖状态的形成。

关键词:银屑病;转化生长因子β;共有Smad;Smad4;信号转导

中图法分类号:R322.991;R392.12;R758.63 **文献标识码**:A

Down-regulated expression of Smad4 in lesional psoriatic epidermis

YE Chao-ran, HE Wei, LI Zhi, YANG Jin-qing, WU Jun, HE Yun-zhi, HUANG Hai ([1]Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of common-partner Smad—Smad4 in psoriatic lesions. Methods The skin of psoriatic lesion from 21 patients visiting our out-patient clinic or admitted in Department of Dermatology of our hospital (13 males and 8 females, aged 10 – 67 years old, averaging 33.7) and the normal skin from 20 healthy subjects who underwent plastic surgery or bone surgery (13 males and 7 females, aged 13 – 59 years old, averaging 29.3). Quantitative real-time PCR and immunohistochemical technique were used to detect the expression levels of Smad4. Results The protein and mRNA expression levels of Smad4 were significantly lower in psoriatic lesions than those in normal control skin. Conclusion Down-regulated expressions of Smad4 in psoriatic epidermis might contribute to the formation of hyperplastic epidermis in psoriatic lesions through blocking TGF-β signal transduction.

Key words: psoriasis; TGF-β; common-partner Smad; Smad4; signal transduction

寻常型银屑病(以下简称银屑病)是临床常见的复发性、炎症性皮肤病,以角质形成细胞(KC)过度增殖和皮损局部炎细胞浸润为基本病理特征。皮肤是转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)作用的重要靶器官。既往研究发现,寻常性银屑病皮损表皮中并存着TGF-β信号转导途径所属多个重要环节的障碍,如TGF-β[1]及其受体[2,3],某些调节因子如Smad泛素化调节因子(Smurf)[4,5]与Smad7[6]表达的异常。在其他某些以表皮过度增生为特点的非银屑病皮肤病的研究中,也发现了TGF-β信号途径所属多环节障碍并存的情况,如脂溢性角化病皮损区TGF-β受体[7]、多种Smad[8,9]和Smad泛素化调节因子(Smurf)[10]表达水平的异常。这种TGF-β信号转导途径所属多环节障碍并存可能是某些皮肤病表皮过度增生的共有机制。我们由此设想,在寻常性银屑病皮损中很可能还存在TGF-β途径另一个重要环节的障碍——共有Smad(Smad4)的表达异常。为此,我们应用免疫组化技术和反转录(RT)-实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-Time RT-PCR)技术对Smad4蛋白及其mRNA在寻常性银屑病皮损中的表达情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象及其纳入标准 收集寻常性银屑病患者的

基金项目:第三军医大学回国人员科研基金(XG200356)
Supported by the Scientific Research Funds of Third Military Medical University for Returned Overseas Personnel (XG200356)

作者简介:叶超然,男,四川省彭州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事TGF-β信号转导在银屑病发病机制方面的研究。电话:(023)68755739,E-mail:yechaor@163.com

通信作者:何 威,电话:(023)68755739,E-mail:weihegj@yahoo.com

收稿日期:2007-09-10;修回日期:2007-12-06

斑块状皮损,以非银屑病个体的正常皮肤为对照。纳入标准如下:①寻常性银屑病组所有患者均有典型或较为典型的皮损,并经皮损组织病理检查证实具有寻常性银屑病的组织病理改变;近 3 个月内未服用过糖皮质激素及免疫抑制剂,停止其他系统治疗和光疗法至少 1 个月,近 3 周内皮损未进行过局部治疗。消退期的慢性斑块状银屑病患者不纳入本研究。②对照组为接受整形外科或骨科手术的非银屑病患者,均无免疫性疾病和系统性疾病。

1.1.2　临床资料及标本处理　　来自我院皮肤科门诊及病房的寻常性银屑病患者 21 例,其中男性 13 例,女性 8 例,年龄 10 ~67 岁,平均 33.7 岁,病程 5 个月至 6 年,平均 2.5 年,其皮损标本取自躯干或四肢的典型皮损。我院接受整形外科及骨科手术的非银屑病患者 20 例,其中男性 13 例,女性 7 例,年龄 13 ~59 岁,平均 29.3 岁,取其躯干或四肢部位的正常皮肤为对照。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、石蜡包埋,另 1 份立即置于液氮中冻存,备提取 RNA 使用。

1.1.3　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),石蜡切片机、倒置光学显微镜及 Qwin 真彩图像分析系统均为德国 Leica 公司产品。

1.1.4　主要试剂　　PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒和 SYBR® Premix Ex *Taq*™ 试剂盒(TaKaRa 公司),Trizol Isolation Reagent(Invitrogen 公司),鼠抗人 Smad4 单克隆抗体 sc-7966(Santa Cruz Biotechnology 公司),即用型 EliVision™plus 免疫组化试剂盒 KIT-9901(福建迈新生物技术有限公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　组织总 RNA 提取　　参照 Trizol Isolation Reagent 说明书,从液氮冻存的组织标本中抽提总 RNA。提取过程中的所有容器和移液器吸头均经焦碳酸二乙酯(DEPC,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,判定总 RNA 纯度,并测定总 RNA 的浓度。同时取适量 RNA 行琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶成像分析仪(Alpha Innotech 公司)观察,以验证所抽提的组织总 RNA 的质量。

1.2.2　引物设计与合成　　检索 NCBI GenBank 数据库,依据 PCR 引物设计原则,利用 Oligo 6.0 软件设计引物。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照校准基因,其上游引物:5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,下游引物:5′-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3′,扩增产物 142 bp。目的基因 Smad4 的上游引物:5′-GGACCGGATTACCCAAGACAGA-3′,下游引物:5′-CTGCAATCGGCATGGTATGAAG-3′,扩增产物 112 bp。由 TaKaRa 公司进行引物合成。

1.2.3　反转录合成 cDNA　　参照 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒说明,依次加入总 RNA 1 μg,5 × PrimeScript™ Buffer 4 μl,PrimeScript™ RT Enzyme Mix Ⅰ 1 μl,Oligo dT Primer(50 μmol/L) 1 μl,Random 6 mers(100 μmol/L) 1 μl,最后用 RNAse Free dH_2O 补充至 20 μl 反应体系,轻微离心后,按以下条件进行逆转录反应:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。所得 cDNA 产物用于 Real-Time PCR。

1.2.4　Real-Time PCR 检测 Smad4 mRNA 的表达水平　　分别取银屑病皮损及正常对照皮肤总 RNA 的反转录产物 cDNA 进行平行试验。参照 SYBR Premix Ex *Taq*™ 试剂盒说明,各反应体系内依次加入 SYBR® Premix Ex *Taq*™(2 ×,内含 *Taq* DNA 聚合酶、$MgCl_2$、dNTP Mixture、SYBR® Green Ⅰ以及反应缓冲液,厂家已经按照最佳比例配成上述反应成分的预混液) 25 μl,各对引物 0.2 μmol/L × 1 μl,ROX Reference Dye(50 ×) 1 μl,cDNA 模板 4 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 反应扩增仪中进行反应。扩增条件为 95 ℃ 10 s,95 ℃ 5 s、56 ℃ 34 s,72 ℃ 45 s,共 45 个循环。设置熔解曲线检测自 55 ~95 ℃的熔解温度以验证产物的特异性,另行琼脂糖凝胶电泳再次确认扩增反应产物的单一性。

1.2.5　免疫组化法　　检测 Smad4 蛋白表达水平。将 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,以一抗(鼠抗人 Smad4 单克隆抗体,抗体的工作浓度为 1∶50)4 ℃孵育过夜,另以 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。以二抗(酶标抗鼠/兔聚合物,EliVision™plus 免疫组化试剂)37 ℃孵育 30 min。上述过程中,除正常山羊血清外,其余各步骤之后均用 PBS 充分震荡漂洗。最后应用 DAB 工作液避光显色,显微镜下观察染色程度。Smad4 蛋白的阳性着色表现为细胞质被染成浅黄色至棕黄色,细胞核可有黄染。将免疫组化染色的组织切片行显微照相后,应用 Qwin 真彩图像分析系统(德国 Leica 公司)检测照片中表皮区域的免疫组化染色情况,以测出的平均灰度值表示显色强度。所测出的平均灰度值越低,表明切片上免疫组化阳性反应染色越深,即所测蛋白表达水平越高;而平均灰度值越高,表明切片上免疫组化阳性反应的染色越浅,即所测蛋白表达水平越低。

1.3　统计学方法

1.3.1　Real-Time PCR 数据分析　　所得的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Livak 等[11] 的 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法进行分析。$2^{-\triangle\triangle CT}$ 值是 Smad4 mRNA 在银屑病皮损组/正常皮肤组中表达水平的相对比值。

$$\triangle CT = CT_{Smad4} - CT_{GAPDH}$$

$$\triangle\triangle CT = \triangle CT_{银屑病} - \triangle CT_{正常皮肤}$$

1.3.2　免疫组化数据分析　　对免疫组化染色图像经过灰度值检测所得的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对寻常性银屑病皮损与正常对照皮肤组进行两组间均数的比较,采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　Real-Time PCR 结果

ABI 7500 型荧光定量 PCR 反应扩增仪自动根据基因片段扩增产物的实时荧光强度绘制待测基因的扩增曲线和熔解曲线。利用上述 Smad4 和 GAPDH 引物所扩增的基因片段比照熔解曲线,显示了扩增的一致性。在此仅展示 Smad4 的熔解曲线及扩增曲线(图 1),GAPDH 熔解曲线及扩增曲线从略。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)。

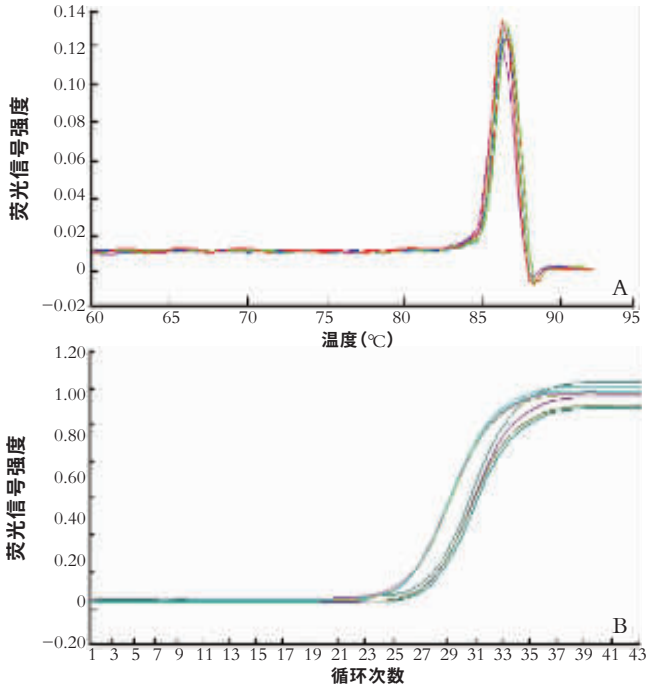
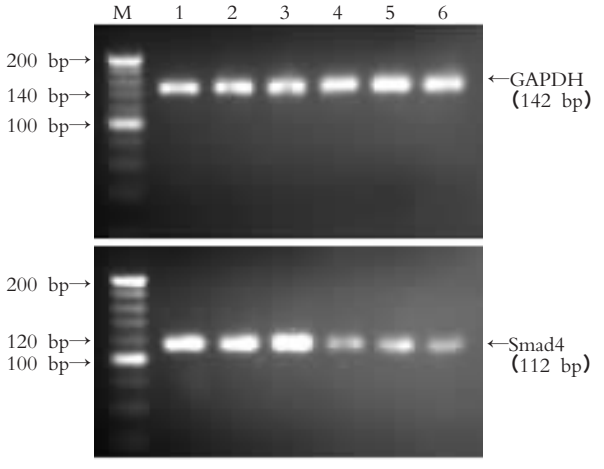


图1 Real-Time PCR 检测 Smad4 mRNA 表达的熔解曲线(A)和扩增曲线(B)



M:DNA 标准;1~3:正常对照皮肤;4~6:寻常性银屑病皮损

图2 Real-Time PCR 检测正常皮肤和寻常性银屑病皮损中 Smad4 表达的琼脂糖凝胶电泳图

ABI 7500 型荧光定量系统 SDS 软件相对定量分析:银屑病皮损组 $\triangle CT_{银屑病} = (6.216 \pm 0.409)$,正常对照皮肤组 $\triangle CT_{正常皮肤} = (4.276 \pm 0.160)$,$\triangle\triangle CT = \triangle CT_{银屑病} - \triangle CT_{正常皮肤} = 1.940$,相对比值 $2^{-\triangle\triangle CT} = 0.261$。说明 Smad4 mRNA 在寻常性银屑病皮损中的表达水平仅仅是正常皮肤中的 0.261 倍,提示寻常性银屑病皮损中 Smad4 mRNA 表达水平显著低于正常对照皮肤。

2.2 免疫组化结果

Smad4 蛋白在正常对照皮肤和寻常性银屑病皮损中的表达情况如图 3 所示。应用前述 Qwin 真彩图像分析系统,对两组表皮区 Smad4 免疫组化染色强度进行灰度值检测,正常对照皮肤组的灰度值为(170.14±11.92),寻常性银屑病皮损表皮的灰度值为(193.24±10.55),两组灰度值的差异具有统计学意义($t = 6.577$, $P < 0.01$),提示 Smad4 蛋白在寻常性银屑病皮损表皮中的表达较正常对照皮肤显著下调。

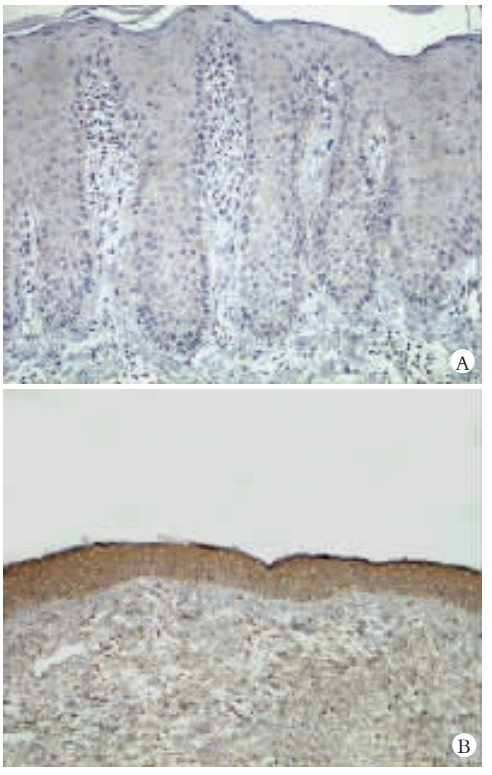


图3 Smad4 在银屑病皮损表皮(A)与正常对照皮肤(B)中的表达(EliVision™plus 法 ×200)

3 讨论

寻常型银屑病的病理特点是角质形成细胞增殖过度及分化失控,角化不全伴角化过度、大量炎症细胞浸润、血管异常增生。该病有多基因遗传背景,发病机制涉及到免疫、炎症、细胞增殖与凋亡、神经介质等等多方面因素,但其根本的原因迄今仍在探索。

转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)超家族由多种相关蛋白组成,除了包含 TGF-β 亚家族以外,还有活化素(activins)、抑制素(inhibins)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMPs)、果蝇 Dpp(Decapentaplegic complex)、缪勒氏抑制物质(Mullerian inhibitor substance,MIS)和生长分化因子(growth differentiation factors,GDFs)等分泌型多肽分子。TGF-β 超家族在胚胎发育、细胞分化、免疫反应及生长控制等过程中具有广泛的生物学活性[12]。对皮肤而言,TGF-β 有抑制角质形成细胞增殖、维持表皮内环境稳定的功能。TGF-β 信号从细胞外进入细胞内的过程由其跨膜受体(TβR)介导。Smad 家族是一组负责在细胞内转导和调节 TGF-β 信号的重要蛋白质分子[13],可以将 TGF-β 信号由细胞膜进一步转导入细胞核内。Smad 家族主要由受体活化 Smad(包括 Smad1、

Smad2、Smad3、Smad5 和 Smad8)、共有 Smad(Smad4)和抑制性 Smad(包括 Smad6 和 Smad7)三类组成[14]。其中 Smad1、Smad5 和 Smad8 主要负责 BMP 途径的信号转导,而 Smad2 和 Smad3 主要参与 TGF-β 途径的信号转导。TGF-β 与细胞膜上的Ⅱ型受体结合后,可将Ⅰ型受体 GS 结构域磷酸化而激活其丝氨酸/苏氨酸激酶活性,活化的 I 型受体可诱导 Smad2/3 磷酸化形成 p-Smad2/3,继而与 Smad4 结合形成异三聚体或四聚体,并进入细胞核内调节目的基因的表达。而 Smad7 是 TGF-β 信号通路中的负性调节因子。Smad 家族中的多个成员共同参与了 TGF-β 信号的细胞内转导和调节过程。其中 Smad 4 是迄今为止在哺乳动物体内发现的唯一的共有 Smad,是 DPC4(deleted in pancreatic cancer, locus4)基因的蛋白产物,DPC4 / Smad4 基因由 2680 个碱基组成,包含 11 个外显子,编码由 522 个氨基酸组成的蛋白质。Smad 4 在 TGF-β 超家族信号转导过程中发挥"共用桥梁"的作用。

国内外已有研究发现寻常性银屑病皮损表皮中 TGF-β_1、TGF-β_2[1] 及 TGF-β 受体[2,3] 表达下调或缺失,说明了 TGF-β 信号途径与该病具有的密切联系。在此基础上,本研究进一步观察了在寻常性银屑病皮损中 TGF-β 受体下游的共有 Smad-Smad4 蛋白及其 mRNA 的表达水平。Real-Time 荧光定量 PCR 结果表明,与正常对照皮肤相比,寻常性银屑病皮损中 Smad4 mRNA 的表达水平显著下调;免疫组化结果也显示银屑病皮损表皮中 Smad4 蛋白表达水平较正常皮肤显著下调。既往研究已发现 Smurf 和 Smad7 一起,可参与对 Smad4 的降解[15]。本课题组在前期研究中还曾发现,寻常性银屑病皮损表皮中 TGF-β 信号通路的抑制性调节因子 Smurf[4,5] 和 Smad7[6] 表达上调。因此,银屑病皮损表皮中既存在着 Smad4 本身表达水平的下调,还可能存在着由表达上调的 Smurf 和 Smad7 而诱导的 Smad4 蛋白的降解增加。作为 TGF-β 超家族信号转导通路中重要的共有环节,Smad4 的表达水平一旦下调,可能从总体上制约该信号向下游的转导,即可阻断 TGF-β 信号对角质形成细胞过度增殖的抑制作用。由此可见,Smad4 mRNA 及其蛋白表达水平的变化在银屑病表皮细胞 TGF-β 信号转导通路的调控链条上是一个具有承上启下作用的关键环节。

综合诸多研究结果可表明,在寻常性银屑病皮损中确实存在着 TGF-β 信号转导途径的多个环节的障碍,包括 TGF-β 受体表达下调,Smurf 和 Smad7 表达上调,Smad4 mRNA 及其蛋白表达水平下调。上述 TGF-β 信号转导途径中多个环节的障碍使得 TGF-β 对角质形成细胞过度增殖的抑制作用难以有效发挥,从而有助于寻常性银屑病皮损中角质形成细胞过度增殖状态的发生和发展。

(致谢:感谢第三军医大学新桥医院中心实验室张克斌主任、光丽霞教授、张国斌老师、何晓梅技师、彭锦技师在本课题研究中给予的大力支持和热忱帮助!)

参考文献:

[1] Flisiak I, Chodynicka B, Porebski P, *et al*. Association between psoriasis severity and transforming growth factor beta1 and beta2 in plasma and scales from psoriatic lesions[J]. Cytokine, 2002, 19(3): 121 – 125.

[2] 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 Dermatol, 1998, 138(1): 57 – 62.

[3] 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.

[4] 孙　芸, 何　威, 张国威, 等. Smad 泛素化调节因子 1 在寻常性银屑病皮损区的表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(3): 164 – 165.

[5] 孙　芸, 何　威, 张国威, 等. 寻常型银屑病皮损区表皮 Smurf2 表达及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20): 2060 – 2062.

[6] 孙　芸, 何　威, 张国威, 等. 寻常性银屑病皮损表皮中 Smad7 表达的检测及其临床意义[J]. 临床皮肤科杂志, 2006, 35(1): 3 – 5.

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

[8] 杨　扬, 何　威, 李　颖, 等. 脂溢性角化病皮损区受体活化 Smad 的变化[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(23): 2219 – 2222.

[9] 杨　扬, 何　威, 何云志, 等. 脂溢性角化病、基底细胞癌和鳞状细胞癌中几种 Smad 蛋白质表达的检测[J]. 临床皮肤科杂志, 2007, 36(7): 423 – 425.

[10] 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.

[11] 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.

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

[13] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors[J]. Genes Dev, 2005, 19(23): 2783 – 2810.

[14] Feng X H, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005, 21: 659 – 693.

[15] 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.

(编辑　王　红)