

网络出版时间: 2020-9-4 09:24 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1448.021.html>

## 寻常型银屑病表皮细胞中 Sp1 的表达及临床意义

钟 维<sup>1,2</sup>, 王冬梅<sup>2</sup>, 刘家蕊<sup>2</sup>, 朱 磊<sup>1,2</sup>, 黄钰淇<sup>2</sup>, 徐文聪<sup>1,2</sup>, 陈永锋<sup>1</sup>

**摘要** 目的 在银屑病和正常对照者的皮肤组织、表皮角质形成细胞(KC)中比较转录因子特殊蛋白(Sp1)的差异化表达,验证其与银屑病的相关性并初步探讨其临床意义。方法

采用免疫组化染色法、实时荧光定量 PCR 技术、Western blot 检测寻常型银屑病组与对照组皮肤组织中 Sp1 在 mRNA 水平及蛋白水平的表达差异及分布情况;采用基因敲降技术对 HacaT 细胞中的 Sp1 基因处理后,检测细胞的增殖功能。结果 免疫组化染色显示 Sp1 在银屑病组较对照组表达高,银屑病组广泛表达于表皮各层细胞核,以棘层和基底层为主。分子研究显示银屑病组 Sp1 在 mRNA 水平及蛋白水平表达量高于对照组( $P < 0.05$ )。对处理后 HacaT 细胞行绝对细胞计数法和 CCK-8 计数法,敲低组细胞生长缓慢,细胞数量减少,提示 Sp1 可促进角质形成细胞增殖。结论 Sp1 与寻常型银屑病的发病可能存在相关性,寻常型银屑病患者皮损中 Sp1 表达水平的增高可能通过促进角质形成细胞增殖作用参与银屑病的发病过程,同时 Sp1 的表达情况可为评价银屑病生物学行为和治疗有效性提供一定参考价值。

**关键词** 寻常型银屑病; Sp1; 角质形成细胞; 皮组织; 增殖中图分类号 R 758.63

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1583-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.021

2020-06-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81804111); 广东省自然科学基金(编号: 2019A1515011202)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学广东皮肤病临床学院皮肤科, 合肥 230032

<sup>2</sup> 广东省皮肤病医院皮肤科, 广州 510091

作者简介: 钟 维, 女, 硕士研究生;

陈永锋, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: gdcyf@163.com

银屑病是一种具有遗传倾向的炎症性增殖性皮肤病,以表皮角质形成细胞过度增殖为特征,其发病机制尚未完全阐明。角质形成细胞(keratinocytes, KC)不仅作为局部免疫反应的终末靶细胞<sup>[1]</sup>,也是抗原递呈细胞,主动参与皮损中 T 细胞的再活化,目前认为与银屑病发病密切相关<sup>[2]</sup>。转录因子特殊蛋白 1(transcription factors specificity protein 1, Sp1)可特异性识别并结合 DNA 中富含 GC 序列<sup>[3]</sup>,其在人体皮肤、子宫等组织内呈结构性表达,许多管家基因及组织特异性基因的启动子区域因富含 GC 序列而受 Sp1 调控<sup>[4]</sup>,从而参与细胞生长和凋亡、细胞周期发展等生理过程<sup>[5]</sup>。Sp1 对 KC 细胞功能的影响及其如何参与银屑病发病的过程,目前国内文献未见报道。该研究通过验证 Sp1 在银屑病表皮中的表达,初步探讨 Sp1 如何调节 KC 细胞导致银屑病的发病机制。

### 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 51 例寻常型银屑病患者均为 2018 年 8 月~2019 年 5 月广东省皮肤病医院皮肤科门诊患者,其中男 41 例,女 10 例,年龄 12~67(47.25 ± 16.6)岁。临床皮损和病理诊断均符合《中国临床皮肤病学》第二版<sup>[6]</sup>寻常型银屑病诊断标准。收集患者一般资料,评估皮损面积和严重程度指数,即 PASI 评分。排除标准:①患有皮炎、类风湿性关节炎、硬皮病等自身免疫系统障碍的患者;②其他对取材具有迷惑性的慢性皮肤病(如过敏性皮炎表

Gene Expression Omnibus (GEO) database was retrieved to analyze the expression of G3BP1 mRNA in breast cancer resistant cell lines. 41 specimens of Luminal-like breast tumor were collected and divided into three groups: primary endocrine resistance group, secondary endocrine resistance group and sensitive group. The expression of G3BP1 protein in each group was analyzed by immunohistochemical staining. **Results** GEO database showed the expression of G3BP1 mRNA in endocrine therapy resistant cell lines was higher than that in sensitive cell lines ( $P < 0.05$ ). The expression of G3BP1 protein in primary endocrine resistance group was higher than that in secondary endocrine resistance group (84.62% vs 30.00%,  $P < 0.01$ ) and sensitive group (84.62% vs 28.60%,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** G3BP1 is closely related to endocrine therapy resistance in breast cancer. The high expression of G3BP1 may lead to primary endocrine resistance.

**Key words** breast cancer; endocrine therapy resistance; G3BP1

现、细菌感染性皮肤病、真菌侵犯性疾病等);③近3个月接受过外用中强效糖皮质激素治疗(如丙酸氯倍他索乳膏、曲安奈德尿素乳膏等)、光化学治疗[如长波紫外线(ultraviolet A,UVA)、窄谱中波紫外线(ultraviolet B,UVB)、补骨脂素(psoralen,PUVA)等光照治疗]、系统性治疗的患者(如糖皮质激素、免疫抑制剂类药物等)。54例对照组为广东省皮肤病医院行整形手术的健康受试者,其中男25例,女29例,年龄12~76( $33.88 \pm 15.75$ )岁,两组间性别及年龄相对匹配。研究方案根据赫尔辛基宣言的原则设计和实施,并经本院伦理审查委员会批准。在志愿者签署知情同意后对其进行活组织检查,每人选取1 cm×1 cm皮肤组织。

细胞实验标本来源为人永生表皮细胞株Hacat(BNCC100433)(永生非肿瘤性KC),购自北纳创联生物科技有限公司。

**1.2 主要试剂和仪器** 兔抗人-Sp1单克隆抗体(一抗)(#9389,1:2 000,美国Cell Signaling Technology公司);DAKO酶标羊抗兔IgG抗体(二抗)(#ab672,1:5 000,美国Abcam公司);GAPDH(#ab37168,1:4 000,美国Abcam公司);Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX Transfection Reagent(美国Thermo Fisher Scientific公司);Nano Drop仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);Light Cycler 480 PCR仪(瑞士Roche公司);BIO-RAD多色实时PCR检测系统(美国Bio-Rad公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 HE染色及免疫组化** 取患者皮肤组织制成蜡块做4 μm切片待用;脱蜡后于3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>染缸内室温孵育10 min,将玻片浸入1×抗原修复液中加热20 min;滴加50 μl兔抗人-Sp1抗体(1:100),4℃过夜孵育;滴加二抗(1:500),37℃水浴20 min;镜下显色后复染3 min;镜下观察Sp1蛋白的表达及分布(按照抗体说明书及文献,Sp1阳性表现为细胞内出现黄棕色颗粒状物质沉积)。Sp1蛋白表达水平以Image J软件检测平均光密度值(average optical density,AOD)表示。

**1.3.2 实时荧光定量聚合酶链式反应(real time quantity polymerase chain reaction,RT-qPCR)** ①提取组织中的总RNA(所有操作冰上进行):组织称重后研磨至粉末状;加入TRIzol试剂充分裂解;加氯仿萃取,离心20 min后取上清液,并加入等体积异丙醇混匀;再次离心见白色沉淀物即组织总RNA;加入DEPC水溶解RNA沉淀物;用NanoDrop仪检

测RNA浓度;达标后使用逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA;②实时荧光定量PCR:以GAPDH为内参,Sp1前引物:5'-CCTTCAGGGATTTCCAAC-3',后引物:5'-GTCCAAAAGGCATCAGGTA-3';GAPDH前引物:5'-TGTTTCGTCATGGGTGTGAAC-3',后引物:5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3';采用20 μl反应体系,在无RNA酶八联管中分别加入10 μl SYBR Prime Ex Taq<sup>TM</sup>、1 μl cDNA、7 μl DEPC水、前后引物各1 μl,采用BIO-RAD多色实时PCR检测系统行RT-qPCR实验,循环阈值(cycle threshold value,Ct)值通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算倍数变化。

**1.3.3 Western blot** 提取组织总蛋白后选择10% SDS-PAGE胶,加样后恒压电泳;转PVDF膜后再次恒流电泳;取出PVDF膜转至封闭液中浸泡,恒温37℃摇床匀速摇60 min;取膜置于一抗稀释液(Sp1 1:2 000,GAPDH 1:4 000)中4℃冰箱过夜;次日清洗后浸泡于羊抗兔IgG抗体(1:5 000)中37℃摇床孵育60 min;置于暗房用胶片显影。

**1.3.4 si-RNA基因敲降技术** 合成即用型化学合成双链小分子RNA(short interfering RNA,siRNA):将Hacat细胞计数后按 $3 \times 10^4$ 个/孔铺板,置于培养箱过夜使细胞贴壁后密度达到50%;使用Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX Transfection Reagent(#13778150)按说明书制备成转染复合物混合液,按比例加入相应体积混合液于培养基中;置于37℃CO<sub>2</sub>培养箱培养24~96 h,显微镜下观察Hacat细胞生长情况,以备下一步实验。

**1.3.5 绝对细胞计数法** 按实验计划接种适合数量的细胞后行siRNA基因敲降实验;用0.05%胰蛋白酶-EDTA消化Hacat细胞,制成单个细胞悬液;在光学显微镜下计算细胞密度:每毫升原液中的细胞数=4部分细胞数的平均数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数。通过比较Sp1敲低组和对照组之间的细胞数目差异值,研究Sp1对细胞增殖功能的影响。

**1.3.6 CCK-8计数法** 以Hacat细胞5 000个/孔铺96孔板为例:细胞消化后计数,以5 000个/孔铺96孔板,每孔约100 μl细胞悬液;置于37℃CO<sub>2</sub>培养箱过夜;按照实验设计要求转染siRNA后置于培养箱48 h;次日每孔加入10 μl CCK-8试剂,严格避光置于培养箱孵育4 h;使用酶标仪双波长测定OD值(检测波长450~490 nm,参比波长600~650 nm)。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 13.0软件进行数据统计分析,实验符合正态分布的定量资料,均采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述。两组间比较采用两独立样本的t检

验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Sp1 蛋白在银屑病组和对照组皮组织中的表达及分布** 免疫组化染色法定位 Sp1 在寻常型银屑病患者皮损中广泛分布于表皮各层细胞胞核,以棘层和基底层为主;在对照组皮肤中主要定位于棘层细胞胞核中,银屑病组中染色强度与范围高于对照组(图 1)。Sp1 的平均光密度值在银屑病组高于对照组,差异有统计学意义( $n = 24$ ,  $P = 0.0127$ )。见图 2A。

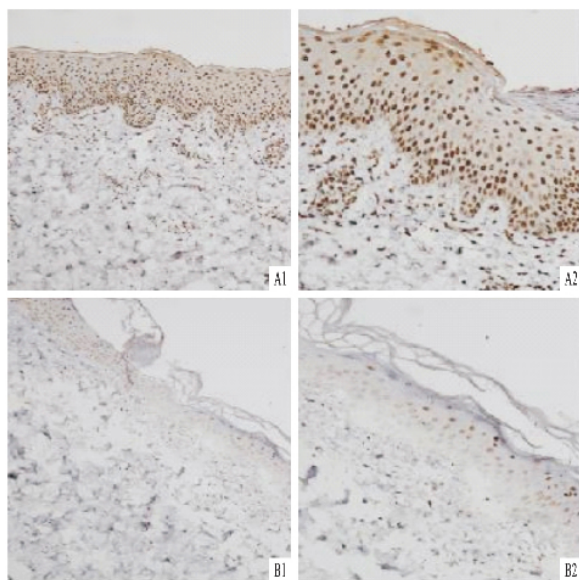


图 1 银屑病组和对照组皮组织 Sp1 的表达

A1、A2: Sp1 在银屑病皮组织中的表达  $\times 100$ ; B1、B2: Sp1 在对照组皮组织中的表达  $\times 200$

**2.2 Sp1 mRNA 水平的表达** RT-qPCR 检测皮组织中 Sp1 mRNA 表达量,结果显示 Sp1 mRNA 在两组中均有表达,但寻常型银屑病组 Sp1 mRNA 表达量高于对照组,两组差异有统计学意义( $n = 25$ ,  $P = 0.0057$ )。见图 2B。

**2.3 Sp1 蛋白水平的表达** Western blot 检测银屑病组和对照组皮组织中 Sp1 蛋白的表达差异,结果表明 Sp1 mRNA 在两组中均有表达,但寻常型银屑病组 Sp1 mRNA 表达量高于对照组,两组差异具有统计学意义( $n = 56$ ,  $P < 0.0001$ )。见图 2C、2D。

**2.4 细胞水平验证 Sp1 的功能** 由于银屑病原代 KC 培养困难,故使用 Hacat 细胞系替代(永生非肿瘤性 KC,为目前公认可替代 KC 完成功能实验的细胞系)。通过 siRNA 基因敲降技术降低 Hacat 细胞 Sp1 的表达(图 3A),并应用 Western blot 检测证

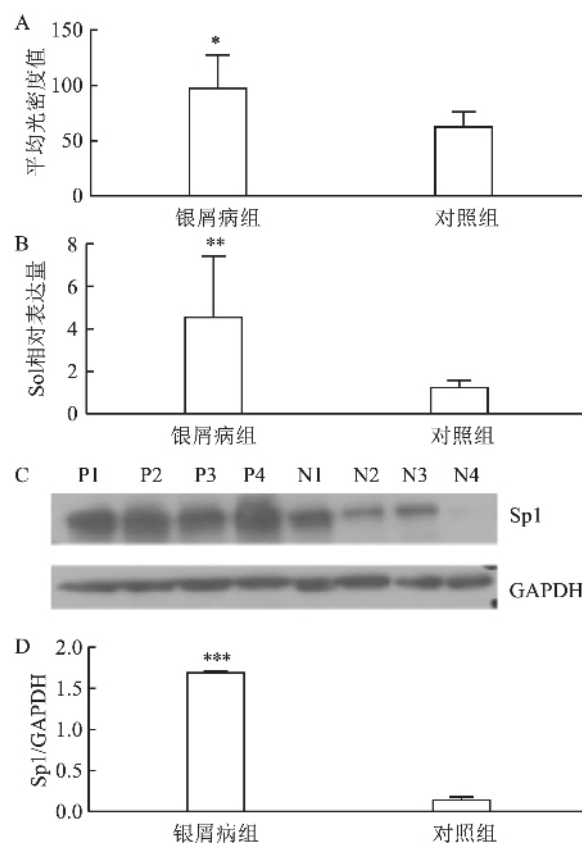


图 2 Sp1 在银屑病组和对照组皮组织中的差异性表达图示

A: 银屑病组和对照组中 Sp1 免疫组化定量分析;与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; B: 两组间 Sp1 mRNA 的表达差异统计;与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; C: 两组 Sp1 蛋白的差异表达; P1 ~ P4: 银屑病组样本编号; N1 ~ N4: 对照组样本编号; GAPDH 为内参; D: 两组 Sp1 蛋白表达差异统计;与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.0001$

实 Sp1 表达已被成功敲降,最后采用 CCK-8 计数法统计实验组和对照组的细胞数量(图 3B),采用绝对细胞计数法记录各组之间 Hacat 细胞的生长曲线(图 3C),结果表明实验组 Hacat 细胞增殖功能受到抑制,Sp1 的表达降低能够抑制 Hacat 细胞的增殖,即反向证明 Sp1 可影响角质形成细胞增殖。本实验两组间差异具有统计学意义。

## 3 讨论

银屑病是一种多基因参与的红斑鳞屑性皮肤病,通过免疫介导的多条通路最终引起 KC 增殖的慢性炎症性免疫性疾病。其病理特征为表皮角化过度、棘层增厚、真皮炎症<sup>[7]</sup>。银屑病的发病机制累及多环节多通路,目前普遍认为 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  轴在银屑病的发病中起重要作用<sup>[8]</sup>。TNF 直接或间接诱导产生 IFN- $\gamma$ ,后者通过与相应受体结合启动 3 条主要的免疫调控通路: NF- $\kappa$ B 活

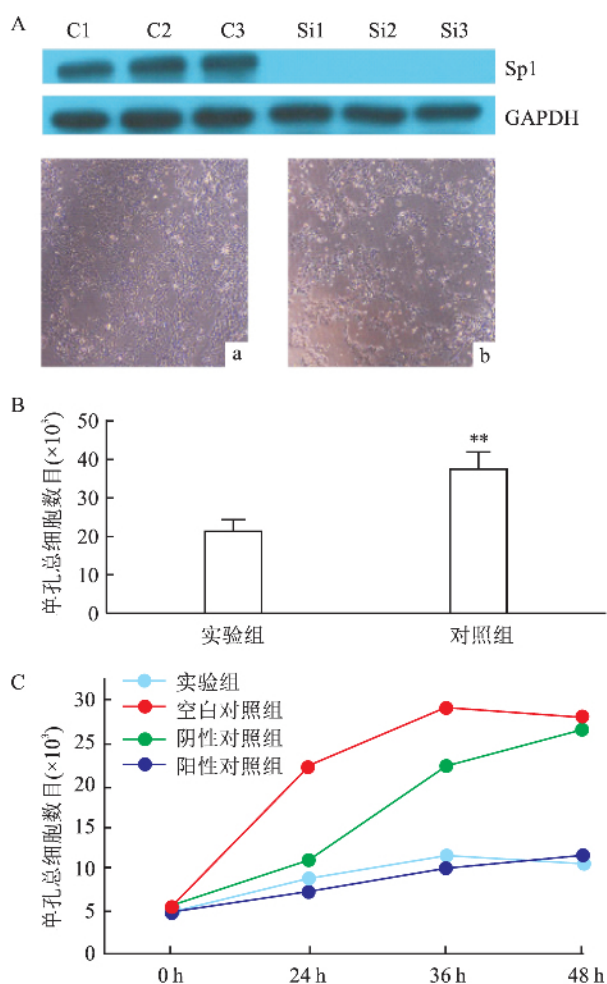


图3 对照组和敲低 Sp1 实验组统计分析结果

A: 镜下敲低效果对比图; C1 ~ C3: 对照组复孔; Si1 ~ Si3: 实验组敲低 Sp1 基因的复孔; GAPDH: 内参; a: 对照组培养 48 h 镜下细胞形态及数量 × 100; b: 实验组培养 48 h 镜下细胞形态及数量 × 100; B: 实验组(敲低 Sp1 组)与对照组 CCK-8 计数对比图; 与对照组比较: \*  $P < 0.005$ ; C: HacaT 细胞生长曲线图

化和炎症的产生; MAPK(促分裂元活化蛋白激酶)通路活化 KC 的分化增殖、细胞的死亡信号,从而在同一个细胞内通过凋亡和抗凋亡信号共同调节,引起多种调控 KC 生长分化的细胞因子异常表达,导致免疫介导下 KC 过度增殖最终发生银屑病<sup>[9]</sup>。

Sp1 是 Sp 家族的重要成员之一,其成员与 3 个相邻的 Cys2His2 型锌指共享高度保守的 DBD(序列同一性超过 65%),因此它们以重叠的特异性和亲和力结合到 GC 或 GT 盒上。其成员包括 Sp1、Sp3、Sp4,其中 Sp1 在人体皮肤、子宫等组织内呈结构性表达,许多管家基因及组织特异性基因的启动子区域因富含 GC 序列而受 Sp1 调控。其参与细胞生长和凋亡、细胞周期发展、血管生成和转移等生理过

程<sup>[10]</sup>,是细胞周期的关键调控因子<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>表明肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 的表达可通过 SP 家族中 Sp1 和 Sp3 相互作用而调控,尤其是 Sp1 的正向调控起主要作用。其在胃癌、胰腺癌、结肠癌和肺癌等多种肿瘤中特异性高表达,与肿瘤的浸润和转移密切相关,其表达强度与肿瘤患者的愈后呈正相关<sup>[13]</sup>。目前对于 Sp1 在银屑病中发挥的作用仍然知之甚少。

本研究免疫组化染色显示 Sp1 广泛表达于皮肤组织表皮层细胞胞核,其中寻常型银屑病皮损中 Sp1 表达以棘层和基底层为主,且染色强度与范围高于对照组,此层细胞受参与表皮增殖分化的基因调控,故明确 Sp1 与寻常型银屑病的发生存在相关性,可能参与调控银屑病表皮异常增殖分化的过程。为进一步探究其在分子水平的表达,通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测 Sp1 在 mRNA 水平和蛋白水平皆有差异性表达,且寻常型银屑病皮损中 Sp1 表达量高于对照组,再次从两方面正向验证 Sp1 与寻常型银屑病存在密切的相关性。为了解 Sp1 的表达对 KC 功能的影响,反向验证 Sp1 与银屑病的关系,采用 siRNA 基因敲降技术抑制 HacaT 细胞中 Sp1 的表达,结果表明 Sp1 的表达降低能够抑制 HacaT 细胞的增殖。由此证明 Sp1 与 KC 增殖功能具有相关性。结合文献,推测 Sp1 通过正向调控 TNF $\alpha$  的表达,从而诱导产生 IFN- $\gamma$ ,后者启动 3 条主要的免疫调控通路,发挥 IFN- $\gamma$ /TNF- $\gamma$  轴在银屑病发病中的重要作用。

综上所述,本研究丰富了银屑病发病机制的通路,明确了 Sp1 与银屑病发病机制的相关性,为日后的研究以 Sp1 的表达量作为银屑病生物学行为和治疗有效性的生物学指标的研究提供了实验基础和研究方向。近年来随着生物制剂靶向药物的推广,未来拟增加动物实验研究 Sp1 是否在咪喹莫特小鼠银屑病模型中影响 KC 的增殖,通过涂抹型的 Sp1 抑制剂观察其对银屑病小鼠模型的治疗作用,有望为寻常型银屑病的治疗提供新靶点。

## 参考文献

- [1] Wang W, Yu X, Wu C, et al. IL-36gamma inhibits differentiation and induces inflammation of keratinocyte via Wnt signaling pathway in psoriasis [J]. Int J Med Sci, 2017, 14 (10): 1002-7.
- [2] Pfaff C M, Marquardt Y, Fietkau K, et al. The psoriasis-associated IL-17A induces and cooperates with IL-36 cytokines to control keratinocyte differentiation and function [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 1-13.

- [3] Su F, Geng J, Li X, et al. Sp1 promotes tumor angiogenesis and invasion by activating VEGF expression in an acquired trastuzumab resistant ovarian cancer model [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 2677–84.
- [4] O'Connor L, Gilmour J, Bonifer C. The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease [J]. *Yale J Biol Med*, 2016, 89(4): 513–25.
- [5] 姜蔚蔚, 张春雷. 银屑病发病机制相关信号通路研究进展 [J]. *中国麻风皮肤病杂志* 2018, 34(6): 378–81, 384.
- [6] 赵 辨. 中国临床皮肤病学 [M]. 2 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010: 1104–26.
- [7] Zhang C, Xiao C, Dang E, et al. CD100-Plexin-B2 promotes the inflammation in psoriasis by activating NF- $\kappa$ B and the inflammasome in keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(2): 375–83.
- [8] Mylonas A, Conrad C. Psoriasis: classical *vs* paradoxical. The Yin-Yang of TNF and type I interferon [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2746.
- [9] Furue K, Ito T, Furue M. Differential efficacy of biologic treatments targeting the TNF- $\alpha$ /IL-23/IL-17 axis in psoriasis and psoriatic arthritis [J]. *Cytokine*, 2018, 111: 182–8.
- [10] Zeng C, Sang Y, Wang F Y, et al. Opposing roles of C/EBP $\alpha$  and eEF1A1 in Sp1-regulated miR-122 transcription [J]. *RNA Biol*, 2020, 17(2): 202–10.
- [11] Bisson F, Paquet C, Bourget J M, et al. Contribution of Sp1 to telomerase expression and activity in skin keratinocytes cultured with a feeder layer [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(2): 308–17.
- [12] Encarnacao P C, Ramirez V P, Zhang C, et al. Sp sites contribute to basal and inducible expression of the human TNIP1 (TNF $\alpha$ -lpha-inducible protein 3-interacting protein 1) promoter [J]. *Biochem J*, 2013, 452(3): 519–29.
- [13] Chen Y, Feng J, Zhao S, et al. Long-term engraftment promotes differentiation of alveolar epithelial cells from human embryonic stem cell derived lung organoids [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(19): 1339–49.

## Expression and clinical significance of Sp1 in keratinocytes of psoriasis vulgaris

Zhong Wei<sup>1,2</sup>, Wang Dongmei<sup>2</sup>, Liu Jiarui<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Dermatology, Guangdong College of Dermatology, Anhui Medical University Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Dermatology, Guangdong Dermatology Hospital, Guangzhou 510091)

**Abstract** *Objective* Differential expression of the transcription factor Sp1 was compared in skin tissues and epidermal keratinocytes of psoriasis and normal controls to verify its correlation with the pathogenesis of psoriasis and to explore its clinical significance. *Methods* Immunohistochemical staining, real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression and distribution of Sp1 in mRNA and protein levels in skin tissues of psoriasis vulgaris group and normal control group; After processing Sp1 gene in Hacat cells, the cell proliferation function was detected. *Results* Immunohistochemical staining showed Sp1 expression was higher in the psoriasis group than that in the normal control group. The psoriasis group was widely expressed in the nucleus of each layer of the epidermis, mainly in the spinous layer and basal layer. Molecular studies showed the expression of Sp1 in mRNA and protein levels of psoriasis group was significantly higher than that of normal control group ( $P < 0.05$ ). After treatment with gene knockdown technology, Hacat cells were subjected to absolute cell counting and CCK-8 counting. The cells in the knockdown group grew slowly and the number of cells decreased, suggesting that Sp1 could promote the proliferation of keratinocytes. *Conclusion* There may be a correlation between Sp1 and the pathogenesis of psoriasis. The high expression of Sp1 in the skin lesions of patients with psoriasis may participate in the pathogenesis of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes. At the same time, the expression of Sp1 can provide some reference values for evaluating the biological behavior and treatment effectiveness of psoriasis.

**Key words** psoriasis vulgaris; Sp1; keratinocytes; skin tissue; proliferation