

网络出版时间: 2018-11-5 15:38 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.020.html>

寻常型银屑病患者皮损中 C/EBP β 表达水平的研究

柳莉丹^{1,2}, 刘红芳², 吉苏云², 李锦意², 张 娇², 王晓华², 陈永锋^{1,2}

摘要 目的 比较寻常型银屑病患者皮损组织及正常对照组组织中 C/EBP β 表达差异,并分析其与银屑病患者 PASI 评分的相关性,探讨其参与银屑病的发病机制。方法 采用免疫组化染色法、实时荧光定量 PCR 技术检测(22 例)寻常型银屑病和(15 例)正常对照组组织中 C/EBP β 蛋白及 mRNA 的表达差异及分布,采用 Pearson 相关性分析评估 C/EBP β 蛋白表达水平及与患者 PASI 评分相关性。结果 免疫组化染色显示银屑病中 C/EBP β 蛋白广泛表达于表皮各层细胞核,以棘层上部及颗粒层为主;正常对照组则可见 C/EBP β 蛋白丰富表达于表皮各层细胞核。C/EBP β 蛋白及 mRNA 表达量明显低于正常对照组($P < 0.05$)。Pearson 相关性分析显示 CEBP β 蛋白表达量与患者 PASI 评分呈负相关性($r = -3.11$, $P < 0.005$)。结论 寻常型银屑病患者皮损中 C/EBP β 表达水平的降低可能参与寻常型银屑病的发病。

关键词 寻常型银屑病;组织;C/EBP β ;免疫组化;聚合酶链反应

中图分类号 R 758.63

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)12-1911-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.020

银屑病是一种以红斑鳞屑为皮肤表现的慢性炎症免疫性疾病,伴有遗传倾向,而转录及转录后水平的研究是银屑病遗传背景研究的热点。CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)是 B-ZIP DNA 结合蛋白家族,其作为转录因子调节许多细胞类型的生长和分化,包括肝细胞、单核细胞、脂肪细胞、角质形成细胞等^[1-2]。C/EBP 通过对靶基因转录的调节,广泛参与细胞增殖与分化、炎症反应、肿瘤的发生与凋亡、

肝脏再生等生理过程。

在以角质形成细胞异常增殖和分化的银屑病中,C/EBP β 如何表达,是否参与了疾病的发生发展过程,目前国内外文献未有报道。为了探讨 C/EBP β 与银屑病的关系,该研究检测了寻常型银屑病患者皮损以及对照组正常皮肤中 C/EBP β 的分布及表达差异性,并分析 C/EBP β 表达水平以及其与病情评价指标的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 22 例寻常型银屑病患者均为 2016 年 12 月~2017 年 5 月广东省皮肤病医院皮肤科门诊患者,临床皮损和病理诊断均符合《临床皮肤病学》第二版寻常型银屑病诊断标准。排除标准:①近 3 个月接受过系统治疗(如糖皮质激素、免疫抑制剂、维 A 酸药物等)、光化学治疗;②合并自身免疫性疾病;③影响本研究的其他皮肤疾病(如炎症性疾病、过敏性疾病、真菌感染性疾病及其他严重的慢性系统性疾病);15 例正常对照组为我院整形外科行整形手术者。两组间性别及年龄匹配。所有入选者签署知情同意书,研究通过本院医学伦理委员会审查。

1.2 主要试剂和仪器 TRIzol 试剂(广州欣励和生物科技有限公司);逆转录试剂盒(PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser);SYBR Prime Ex TaqTM II 均购自日本 TaKaRa 公司;Anti-C/EBP β 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);DAKO 酶标羊抗鼠/兔 IgG 抗体(二抗)[基因科技(上海)有限公司];引物合成及设计(上海生工生物工程股份有限公司);Leica 2135 石蜡病理切片机、Leica 病理组织包埋机(德国 Leica 公司);显微镜(日本 Olympus 公司);凝胶成像仪(上海天能有限公司);NanoDrop 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);light Cycler 480 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.3 方法

1.3.1 一般资料及标本收集 收集患者一般资料(性别、年龄、病程、皮损及临床症状等),评估患者皮损面积和严重程度指数,即 PASI 评分情况。签署

2018-07-16 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81601746);广东省省级科技计划项目(2017A020215193)

作者单位:¹ 安徽医科大学广东皮肤病临床学院皮肤科,广州 510091

² 广东省皮肤病医院皮肤科,广州 510091

作者简介:柳莉丹,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;

王晓华,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wxh_21773@163.com

知情同意后,手术室切除寻常型银屑病患者(22例)皮损组织及对照组(15例)正常皮肤组织,一半10%福尔马林液浸泡后石蜡包埋用于免疫组化,一半生理盐水冲洗后液氮冻存用于PCR检测。

1.3.2 免疫组化染色法检测 取包埋后的组织修剪边缘后装入切片机制作4 μm 切片,烘箱过夜进行脱蜡,脱蜡后将标本进行阻断内源性过氧化物酶,PBS液冲洗后将标本架置于pH 9.0抗原修复液中进行修复(置于微波炉中中高火7 min,中底火15 min),用自来水复温后取适量Anti-CEBP β 抗体用一抗稀释液稀释至合适浓度(稀释浓度1:100)孵育标本30 min,冲洗后滴加二抗孵育20 min,最后进行DAB显色,封片后用显微镜观察C/EBP β 蛋白表达及分布(按照抗体说明书及文献,C/EBP β 阳性表现为胞核出现黄色或棕色的颗粒状物质沉积)。C/EBP β 蛋白表达水平以平均光密度值(Image pro plus 6.0软件分析图像所得)表示。

1.3.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测

①提取组织中总RNA(采用经典TRIzol法,所有操作冰上进行):取出液氮中保存的实验标本,称重后置于研钵研磨组织至粉末状(中途不断加入液氮);向组织内加入适量组织裂解液TRIzol(100 mg组织/1 ml TRIzol),充分研磨混匀后将标本收集于1.5 ml无酶EP管中,冰上静置5 min;向EP管中加入0.2 ml氯仿萃取,剧烈震荡,冰上静置5 min后于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机进行离心(12 000 r/min、20 min),离心后收集上层水相,并加入等体积异丙醇,小心上下混匀6次,进行RNA沉淀;再次将标本置于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中,离心12 000 r/min、10 min,可见EP管底部出现白色沉淀,即为所提取组织中总RNA;除去上清液,加入预冷的75%乙醇进行沉淀清洗,小心上下混匀,防止RNA降解;清洗后去除液体于超净工作台进行风干,最后加入20 μl DEPC水进行RNA溶解,其后用NanoDrop仪检测RNA浓度,按照逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存或用于实时荧光定量PCR实验;②进行实时荧光定量PCR:以GAPDH作为内参,C/EBP β 上游引物:5'-TCTCTGCTTCTCCCTCTGCC-3',下游引物:5'-ACAGCAACAAGCCCGTAGG-3';GAPDH上游引物:5'-AAGTATGACAACAGCCTCAAG-3',下游引物:5'-TCCACGATACCAAGTTGTC-3';采用20 μl 反应体系,在PCR板中分别加入10 μl SYBR Premix Ex Taq、2 μl cDNA、6.4 μl 无RNase水、上下游引物各0.8 μl ,实时荧光定量PCR仪上机检测,软件读

取C/EBP β 及GAPDH的Ct值;对数据进行相对定量分析,利用所测Ct值,计算C/EBP β mRNA相对表达量,本实验中采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量方法对数据进行分析,其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{实验组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$ 。

1.3.4 相关性分析 按照银屑病皮损面积及严重程度指数(psoriasis area and severity index, PASI)评分标准,记录患者PASI评分,并进行Pearson相关性分析,评估皮损组织中C/EBP β 平均光密度与PASI评分相关性。

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。两组组间比较采用两独立样本的 t 检验;定性资料的统计分析采用 χ^2 检验;相关分析采用Pearson相关性分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验对象基本资料分析 22例寻常型银屑病患者中,男13例,女9例;年龄17~78(40.95 $\pm$ 16.609)岁;病程3个月~30年,平均(7.7 $\pm$ 7.438)年;PASI评分为2.4~18.8分。15例正常对照组,男7例,女8例;年龄19~58(31.33 $\pm$ 11.848)岁。寻常型银屑病患者与正常对照者在性别($\chi^2 = 0.734$, $P > 0.05$)、年龄构成上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 寻常型银屑病患者与对照组组织中CEBP β 表达及分布 免疫组化染色法定位CEBP β 在寻常型银屑病皮损中广泛分布于表皮各层细胞胞核,以棘层上部及颗粒层为主,正常对照组则可见CEBP β 强烈表达于表皮各层细胞的胞核(图1);CEBP β 平均光密度值(0.204 $\pm$ 0.582)低于对照组(0.273 $\pm$ 0.439),差异具有统计学意义($t = -3.894$, $P < 0.001$)。见图2。

2.3 寻常型银屑病与正常对照组组织中CEBP β mRNA表达量 RT-PCR方法检测组织中CEBP β mRNA表达量,结果表明:寻常型银屑病患者CEBP β mRNA(0.48 $\pm$ 0.302)表达量低于正常对照组(0.754 $\pm$ 0.194),差异具有统计学意义($t = -3.11$, $P < 0.005$)。见图3。

2.4 组织中CEBP β 表达量与患者PASI评分相关性分析 22例寻常型银屑病患者PASI评分为(4.196 $\pm$ 0.895),相关性分析显示组织中CEBP β 蛋白的表达与患者PASI评分呈负相关性($r = -0.642$, $P < 0.005$)。见图4。

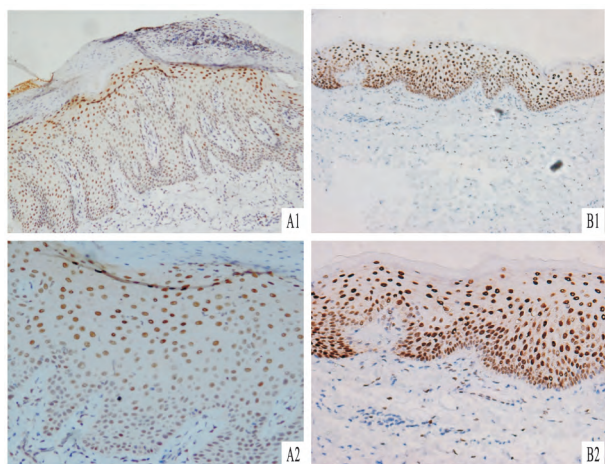


图1 银屑病组与正常对照组中 C/EBPβ 表达

A: 银屑病组; B: 正常对照组; 1: ×100; 2: ×200

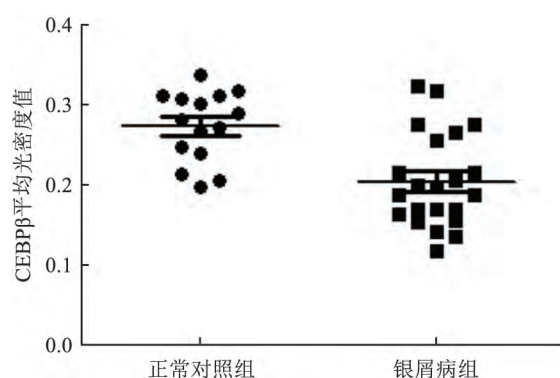


图2 银屑病组患者与正常对照组组织中 CEBPβ 平均光密度值

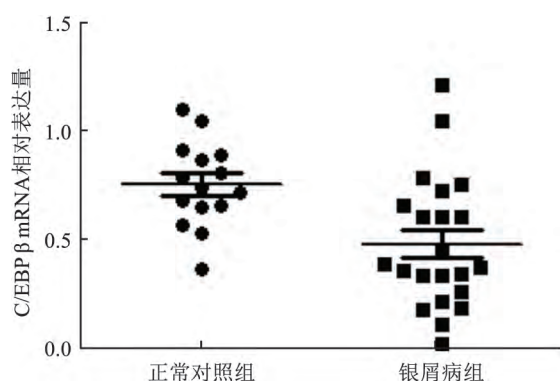


图3 银屑病组患者与正常对照组组织中 CEBPβ mRNA 表达量

3 讨论

银屑病是一种多基因参与的红斑鳞屑性皮肤病,通过免疫介导的共同通路最后引起角质形成细胞发生增殖的慢性炎症免疫性疾病。CCAAT 增强子结合蛋白(C/EBP)是在肝脏、脂肪组织、血液细胞和内分泌腺分化过程中选择性表达的碱性区域/亮氨酸拉链(bZIP)转录因子^[3],包括6个家族

成员,其中C/EBPβ可参与调控炎症细胞因子IL-α、IL-1β、IL-6、IL-17、IL-36α和INF-γ等的表达^[4-6],而这些细胞因子在银屑病炎症反应中起到重要作用。

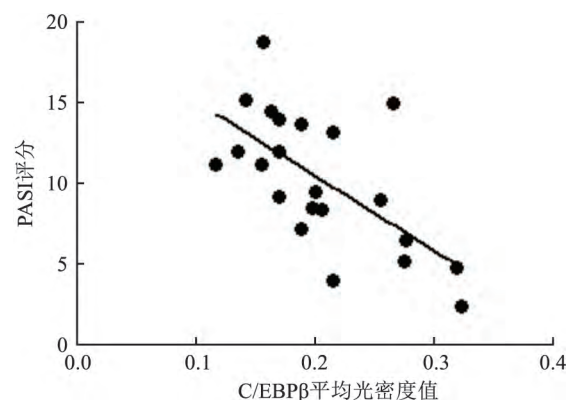


图4 银屑病皮损中 C/EBPβ 平均光密度值与患者 PASI 评分的相关性

C/EBPβ 也称作核因子白细胞介素-6(nuclear factor for IL-6, NF-IL6),由于该基因 mRNA 有4个转录起始点,故该蛋白包括 LAP^{*}、LAP 和 LIP 三种主要亚型,其中 LAP^{*}、LAP 为转录激活因子,而 LIP 为转录抑制因子^[7]。C/EBPβ 在小鼠和人表皮中高度表达在1997年已被提及,House et al^[8]发现 C/EBPβ 丰富的表达于小鼠皮肤、毛囊及皮脂腺中,主要表达在基底层上部的三种角质形成细胞的细胞核内,且比已知表达高水平 C/EBP 的其他组织中观察到的水平更高。Zhu et al^[9]研究发现在 C/EBPβ 缺乏的原代角质形成细胞中,早期分化标志角蛋白 K1 和 K10 的表达明显增加,表皮是由角质形成细胞构成的复层鳞状上皮,表明该转录因子在复层鳞状分化中可能起作用^[8]。Oh et al^[10]在皮肤癌研究中发现 C/EBPβ 可参与诱导 p53 的表达和细胞凋亡,同时 Zhu et al^[11]在小鼠试验中,证实 C/EBPβ 是化学诱导的皮肤乳头状瘤形成所必需的。

本研究显示正常皮肤组织中 C/EBPβ 均一表达于表皮全层细胞核,而银屑病皮损中 C/EBPβ 则主要表达在分化的上皮层,表皮分化过程中需要基因参与调控,推测 C/EBPβ 可能具有参与调控银屑病表皮异常分化的能力。免疫组化显示银屑病组 C/EBPβ 的蛋白表达水平低于正常对照组,同时 RT-PCR 亦发现银屑病皮损中 mRNA 的表达量与皮损中蛋白表达一致,结合 C/EBPβ 蛋白在银屑病及正常对照组均表达于细胞核,以上均提示 C/EBPβ 可

能是在转录水平发挥其调控作用。本研究与既往实验^[12-13]均表明正常表达水平的 C/EBP β 是表皮角质形成细胞分化所必须的,其表达水平的下调可能参与了银屑病角质形成细胞的异常分化,但具体机制仍需进一步验证。C/EBP β mRNA 及蛋白水平变化均提示在银屑病表皮的增殖和分化中其可能发挥抑制作用,这可能与 C/EBP β 的亚型 LIP 发挥转录抑制作用相关。为进一步研究 C/EBP β 与银屑病的相关性,本研究分析了组织中 C/EBP β 蛋白的表达与银屑病皮损面积和严重程度指数(PASI 评分)的相关性,结果显示其表达与 PASI 评分呈负相关性,进一步说明了 C/EBP β 可能参与银屑病皮损中角质形成细胞异常增殖的过程,可作为一种反映银屑病皮损严重程度的指标。

综上所述,本实验初步证实了 C/EBP β 与银屑病发病存在相关性,为后续研究提供了新的实验基础和研究方向。然而 C/EBP β 在银屑病中是否通过调控细胞因子或者炎症信号通路进而发挥调控作用仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Oh H S, Smart R C. Expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms[J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 110(6): 939-45.
- [2] Maytin E V, Habener J F. Transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 110(3): 238-46.
- [3] Tamura I, Asada H, Maekawa R, et al. Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(11): 5612-21.
- [4] Nerlich A, Ruangkittikul N, Laarmann K, et al. C/EBP β is a transcriptional key regulator of IL-36 α in murine macrophages[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(8): 966-78.
- [5] Ruddy M J, Wong G C, Liu X K, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor- α is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2559-67.
- [6] Li H, Gade P, Xiao W, et al. The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta[J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(6): 407-18.
- [7] van der Krieken S E, Popeijus H E, Mensink R P, et al. CCAAT/enhancer binding protein β in relation to ER stress, inflammation, and metabolic disturbances[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 324815.
- [8] House J S, Zhu S, Ranjan R, et al. C/EBP α and C/EBP β are required for Sebocyte differentiation and stratified squamous differentiation in adult mouse skin[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9837.
- [9] Zhu S, Oh H S, Shim M, et al. C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and, keratin 1 and keratin 10 expression[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 7181.
- [10] Oh W J, Rishi V, Orosz A, et al. Inhibition of CCAAT/enhancer binding protein family DNA binding in mouse epidermis prevents and regresses papillomas[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1867-76.
- [11] Zhu S, Yoon K, Sterneck E, et al. CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(1): 207-12.
- [12] Lopez R G, Garcia-Silva S, Moore S J, et al. C/EBPalpha and beta couple interfollicular keratinocyte proliferation arrest to commitment and terminal differentiation[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(10): 1181-90.
- [13] Crish J F, Gopalakrishnan R, Bone F, et al. The distal and proximal regulatory regions of the involucrin gene promoter have distinct functions and are required for *in vivo* involucrin expression[J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(2): 305-14.

Study on the expression of C/EBP β in the lesions of patients with psoriasis vulgaris

Liu Lidan^{1,2}, Liu Hongfang², Ji Suyun², et al

(¹Dept of Dermatology, Guangdong Institute of Skin Disease Clinical, Anhui Medical University, Guangzhou 510091; ²Dept of Dermatology, Dermatology Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510091)

Abstract Objective To compare the expression of C/EBP β in the psoriasis vulgaris tissue and the normal control group, and to analyze the correlation between the expression of C/EBP β and the PASI score of patients with psoriasis, and to explore the pathogenesis of psoriasis. **Methods** C/EBP β protein and mRNA expression levels of tissues from 15 psoriasis and 10 healthy controls were determined by immunohistochemistry and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and analyzing the correlation between the expression of C/EBP β and PASI of patients. **Results** Immunohistochemistry showed that C/EBP β was widely expressed in the

网络出版时间: 2018-11-5 15:38 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.021.html>

VIP 在肝癌中的表达及与巨噬细胞极化的相关性的研究

王 涛, 葛勇胜, 刘文斌, 束清华, 石 旭

摘要 目的 探讨肝细胞癌(简称肝癌)组织中血管活性肽(VIP)表达及其与癌组织中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)极化的关系。方法 使用免疫组化的方法检查 90 例肝癌组织标本中癌组织和癌组织 2 cm 以外正常组织内的 VIP 蛋白的表达情况,及相应炎症细胞中 TAM 和两个亚型标志物 CD68、CD206、CD11c 蛋白表达情况; Western blot、实时定量 PCR(qRT-PCR)法检测 VIP 在 20 对新鲜冰冻标本肝癌及癌旁正常组织中的相对表达量。结果 Western blot 和 qRT-PCR 检测结果显示在蛋白和 mRNA 水平上,肝癌组织中 VIP 的相对表达量均高于癌旁组织($P < 0.01$)。免疫组化显示 VIP 在肝癌组织中阳性表达率为 80% (72/90),显著高于癌旁正常组织的阳性表达率 29% (26/90)。VIP 在肝癌组织中的表达和患者临床因素中肝硬化、年龄相关性有统计学意义($\chi^2 = 12.63, 4.756, P < 0.05$)。而与肝癌患者的肿瘤包膜、肝癌 TNM 分期、肿瘤大小等其他临床病理特征相关性无统计学意义;肝癌组织中 VIP 的表达强度与 TAM 标志物 CD68 和 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 的表达强度呈正相关性,而与 M1 型巨噬细胞标志物 CD11c 呈负相关性。结论 VIP 在肝癌组织中表达高于癌旁组织,其表达与患者肝硬化及患者年龄相关,提示 VIP 与肝癌的发生和发展有一定关系;VIP 可能促进 TAM 向 M2 型极化来影响肝癌的生长。

关键词 肝细胞癌; VIP; TAM

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1915-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.021

2018-07-26 接收

基金项目 安徽省自然科学基金(编号:1308085MH147);安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号:16040804011)

作者单位 安徽医科大学附属省立医院肝脏外科、肝胆胰外科安徽省重点实验室,合肥 230001

作者简介 王 涛,男,硕士研究生;

葛勇胜,男,博士,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ahslyygs@163.com

肝细胞癌(简称肝癌)是消化系统最常见的实体肿瘤之一^[1],原发性肝癌患者由于多药耐药而预后较差^[2],患者总体复发率达到 70%。虽然肝癌的诊断和治疗手段不断提升,但其结果仍不理想,早期对肝癌所形成的认识以及评价重点为以临床背景作为基础的配套肿瘤分期(如: BCLC 以及 TNM 分期)。而近些年来肿瘤微环境的概念越来越得到人们的重视,其在肿瘤的预后及评价中发挥重要作用,免疫细胞作为肿瘤微环境的肿瘤组成部分^[3],免疫细胞中的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)被发现起着越来越重要作用。TAM 一般可以界定为两个基础分类:经典激活的促炎症 M1 型,替代性 M2 型。前期研究^[4]表明: M2 型巨噬细胞在肝癌患者晚期阶段的表达显著高于 M1 型巨噬细胞,并且影响其预后。那是什么原因会导致晚期肝癌中 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞表达的差异促使进一步探究。

血管活性肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是由 28 个氨基酸组成的多肽,血管活性肠肽具有广泛的生理作用,涉及各个系统。研究^[5]显示 VIP 与恶性肿瘤的关系密切,如:一些恶性肿瘤组织中 VIP 含量增加,能调节 $TNF\alpha$, IL-6, IL-12 和 INOS,参与肿瘤的免疫逃逸,其原理可能与巨噬细胞的极化有关。然而, VIP 与肝癌的关系鲜有报道,该研究通过该研究通过 Western blot 法和实时定量 PCR 法检测 VIP 在肝癌组织和癌旁组织中的表达,同时免疫组化染色检测肝癌组织和癌旁组织中 VIP 及巨噬细胞标志物 CD68, M1 巨噬细胞标记物 CD11c 以及 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 的表达,初步探讨肝癌组织中 VIP 的表达及其与巨噬细胞极化的关系。

nucleus of each layer of epidermis, mainly in the upper part of stratum spinosum and granular layer. In normal control group, C/EBP β was abundantly expressed in the nucleus of each layer of epidermis. C/EBP β protein and mRNA expression was significantly decreased in psoriasis compared to the normal control($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that C/EBP β protein expression was negatively correlated with PASI score($r = -0.604, P = 0.017$). **Conclusion** The decrease of C/EBP β expression may participate in the development of psoriasis.

Key words psoriasis vulgaris; tissue; C/EBP β ; immunohistochemistry; PCR