

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.044.html

## WWP1、p53 在瘢痕疙瘩和正常皮肤中的差异表达及意义

王辉, 桑鹏飞, 王敏, 张锦松, 朱飞

**摘要** 目的 探讨 E3 泛素连接酶 WWP1、p53 在人正常皮肤及瘢痕疙瘩组织中的表达差异, 分析其与瘢痕疙瘩发生是否相关。方法 选取临床切取的瘢痕疙瘩及正常皮肤组织标本各 10 例, 采用免疫组织化学法和 RT-PCR 法分别对组织中 WWP1、p53 蛋白及 mRNA 表达情况进行检测, 并通过 Image-Pro Plus 图像分析系统测定组织蛋白染色后累计光密度值, 以  $\beta$ -actin 为参照计算 mRNA 相对定量, 进而比较分析两组标本中 WWP1、p53 表达是否有差异性。结果 免疫组化染色结果提示, 瘢痕疙瘩标本中 p53 蛋白表达明显低于正常皮肤, 而 WWP1 蛋白沉积明显高于正常皮肤, 同时 p53 及 WWP1 mRNA RT-PCR 检测证实同样结果, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 E3 泛素连接酶 WWP1 及抑癌基因 p53 与瘢痕疙瘩的形成有相关性, 可作为瘢痕疙瘩形成机制及治疗靶点研究的方向。

**关键词** WWP1; p53; 瘢痕疙瘩; 正常皮肤

**中图分类号** R 619.6

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2016)02-0247-04

瘢痕疙瘩是一种表现为皮肤侵袭性生长的病理学修复, 与肿瘤有类似的生物学特性, 有一定的遗传倾向, 由多基因多因素共同作用所致。该疾病好发于胸骨区、肩部、面颈部及耳部等色素沉积的部位, 常见于损伤后的 3 个月~1 年, 轻微创伤即出现瘢痕疙瘩的极有可能有家族史。研究<sup>[1]</sup>表明 E3 泛素连接酶 NEDD4-1 基因可能与瘢痕疙瘩有关。E3 泛素连接酶为 NEDD4 蛋白家族成员之一, 已被证实多种肿瘤中表达异常。研究<sup>[2]</sup>显示肝癌细胞 WWP1 高表达, 而 WWP1 基因敲除后, 肝癌细胞生长受到抑制, 并导致细胞凋亡。为进一步探究 WWP1、p53 与瘢痕疙瘩之间的关系, 该实验通过免疫组织化学法和 RT-PCR 法分别检测瘢痕疙瘩与正常皮肤组织 WWP1、p53 表达并比较是否有差异, 进而探讨二者与瘢痕疙瘩形成是否相关。

2015-11-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30973124); 安徽省自然科学基金(编号: KJ2014A108)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院整形外科, 合肥 230022

作者简介: 王辉, 男, 硕士研究生;

朱飞, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfzfx@163.com

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 选取安徽医科大学第一附属医院整形外科手术切除的经副主任以上医师确诊为瘢痕疙瘩的瘢痕疙瘩标本 10 例, 年龄 10~52 ( $33.1 \pm 9.7$ ) 岁, 其中男 6 例, 女 4 例; 正常皮肤标本 10 例(取自非瘢痕疙瘩植皮患者取皮区的正常皮肤), 年龄 10~52 ( $31.8 \pm 7.4$ ) 岁。按照我院伦理委员会的准则, 以上标本均在获得患者知情同意并签署知情同意书的基础上进行手术切除。切取标本患者术前均无长期外用防治瘢痕药物史, 不伴有肿瘤等其他严重疾病。所取标本分为 2 部分(其中瘢痕疙瘩标本取中心部位), 一部分行实时定量 PCR (Real-time PCR, RT-PCR) 检测标本切取后立即置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 另一部分作免疫组化染色标本于 4% 中性甲醛固定。

**1.1.2 主要试剂** 兔抗人泛素转移酶 E3 WWP1 多克隆抗体、兔抗人 p53 蛋白多克隆抗体、山羊抗兔 IgG 抗体 (Santa Cruz 公司, 美国); DAB 显色试剂盒 (博奥森生物科技有限公司, 北京); RT-PCR 试剂盒 (Promega 公司, 美国); 目的片段及内参引物 (上海生工生物技术有限公司)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学法检测组织中 WWP1、p53 蛋白表达**  $3\text{ }\mu\text{m}$  连续切片, 经过脱蜡后, 置于枸橼酸溶液中, 在  $270\text{ }^{\circ}\text{C}$  下抗原修复; 以 3% 双氧水清除内源性过氧化物酶, PBS 冲洗后加兔抗人泛素转移酶 E3 多克隆抗体及 p53 蛋白多克隆抗体孵育过夜; PBS 冲洗, 山羊抗兔 IgG 抗体于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, PBS 冲洗后, 使用 DAB 试剂盒按照说明书显色。设立阴性对照(不与一抗孵育)。脱水封片后显微镜下观察并拍照。使用 Image-Pro Plus 图像分析系统进行分析, 测定泛素转移酶 E3 及 p53 蛋白累积光密度 (integrated optical density, IOD) 值。光密度 (optical density, OD) 是指光线通过溶液或某一物质前的入射光强度与该光线通过溶液或物质后的透射光强度比值的对数, 而 IOD 则是阳性目标所有像素点

OD值的累计,可以反映目标中总的表达强度,其值越高,说明目标总表达强度越高。

1.2.2 RT-PCR法检测组织中 WWP1、p53 mRNA 表达 从-80℃液氮罐中取出瘢痕疙瘩组织、正常皮肤组织各约100mg分别放入用0.1% DEPC水浸泡并消毒过的匀浆器中,向匀浆器内加入1ml TRIzol RNA提取液,置于冰上。以TRIzol法提取组织中总RNA,并用紫外分光光度计检测RNA浓度和纯度(OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>>1.8)。根据浓度取1μg总RNA,按照逆转录试剂盒操作说明将RNA逆转录为cDNA进行PCR扩增。人β-actin上游引物:5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3',下游引物:5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTG-3',扩增片段长度546bp; WWP1上游引物:5'-ACAGTGGCAATCTCAGCG-3',下游引物:5'-GGCACAAATAACGGAAGT-3',扩增片段长度413bp; p53上游引物:5'-GTCTACCTC-CCGCCATAA-3',下游引物:5'-CATCTCCCAAA-CATCCCT-3',扩增片段长度316bp; 扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s,72℃终末延伸10min,共35个循环。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶分析系统观察并照相,每个样本至少重复3次。

1.3 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行分析,计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用t检验。

## 2 结果

2.1 E3泛素连接酶 WWP1、p53蛋白免疫组化染色 对p53蛋白染色显示,瘢痕疙瘩组织内少见阳性细胞,见图1。瘢痕疙瘩组织中p53蛋白染色IOD值显著减少,差异有统计学意义(P<0.05),见表1。对瘢痕疙瘩及正常皮肤组织泛素连接酶E3 WWP1染色结果分别进行观察,泛素连接酶E3 WWP1染色阳性者胞浆存在棕黄色颗粒沉着,镜下显示正常皮肤组织内少见阳性细胞,见图1。与正常皮肤相比,瘢痕疙瘩组织泛素转移酶E3 WWP1染色IOD值显著增加(P<0.05),见表1。

表1 正常皮肤及瘢痕疙瘩组织 p53、WWP1 免疫组化染色 IOD 值测定结果

项目	IOD 值( $\bar{x} \pm s$ )	t 值	P 值
正常皮肤(p53)	164.11 ± 13.96	3.22	0.005
瘢痕疙瘩(p53)	148.28 ± 6.88		
正常皮肤(WWP1)	129.19 ± 9.19	8.47	<0.001
瘢痕疙瘩(WWP1)	172.32 ± 13.11		

## 2.2 E3泛素连接酶 WWP1、p53的mRNA RT-

PCR检测结果 与正常皮肤相比,瘢痕疙瘩组织泛素连接酶E3 WWP1 mRNA表达水平显著增加,p53 mRNA的表达情况显著减少,差异均有统计学意义(P<0.05, P<0.01)。见图2、3。

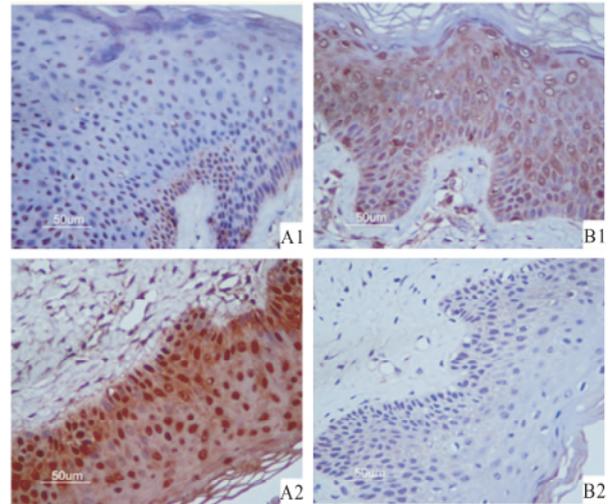


图1 瘢痕疙瘩及正常皮肤组织 p53及 WWP1 免疫组化染色结果 DAB × 400 A: 瘢痕疙瘩; B: 正常皮肤; 1: p53; 2: WWP1

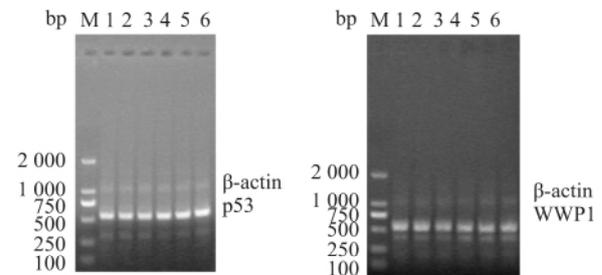


图2 正常皮肤及瘢痕疙瘩组织中 p53、WWP1 mRNA 及内参 β-actin PCR 产物电泳图

1~3: 正常皮肤组织及对应内参的目的条带; 4~6: 瘢痕疙瘩组织及对应内参的目的条带

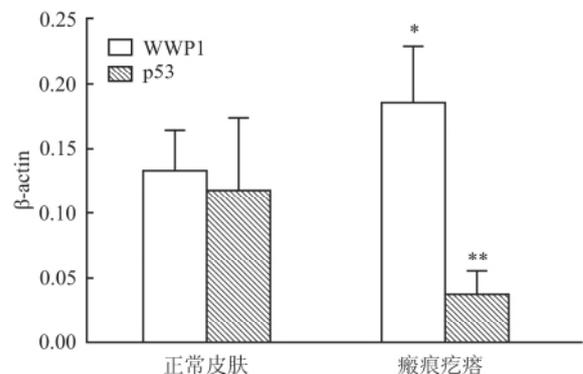


图3 正常皮肤及瘢痕疙瘩组织中 p53、WWP1 mRNA 表达水平与正常皮肤比较: \* P<0.05; \*\* P<0.01

## 3 讨论

瘢痕疙瘩是以局部创伤修复组织进行性生长并

伴有胶原纤维过度产生和沉积为表现的一种严重病理性瘢痕,有肿瘤的某些特征,并有一定遗传倾向,探索肿瘤相关基因及细胞因子对瘢痕疙瘩形成有重要意义。

WWP1 基因位于 8q21, NEDD4 家族部分蛋白已被证实通过泛素化过程参与多种细胞信号通路及肿瘤形成。目前关于瘢痕疙瘩中 WWP1 发病机制的研究极少。本研究利用免疫组化及 RT-PCR 方法发现 WWP1 在瘢痕疙瘩中表达增多,这与在乳腺癌<sup>[3]</sup>、前列腺癌<sup>[4]</sup>等肿瘤所发现的情况一致。Cao et al<sup>[5]</sup>体外培养成纤维细胞研究显示,WWP1 通过泛素-蛋白酶体系统对 p27 进行调控参与细胞周期调控,WWP1 与 p27 之间的变化呈负相关。已知 p27 是一种细胞周期依赖的蛋白激酶抑制剂,通过细胞间接触抑制来完成细胞周期的阻滞作用(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期)。WWP1 过度表达时 p27 水平降低,细胞凋亡延迟,敲除该基因后成纤维细胞出现复制性衰老,p27 蛋白增高<sup>[6-7]</sup>。此外,Cheng et al<sup>[2]</sup>发现肝癌细胞 WWP1 表达水平升高,同时细胞凋亡水平明显降低,利用 siRNA 转染敲除 WWP1 基因后细胞凋亡水平明显升高,p53 表达上调。p53 除有抑制肿瘤的作用外还能介导细胞凋亡,因此推测 WWP1 是通过对其下游的 p53 调控参与细胞的增值、凋亡。本研究同样证实瘢痕疙瘩成纤维细胞 WWP1 表达增多,推测可能也与其对下游调节因子的泛素化异常使成纤维细胞增殖凋亡异常有关。

p53 基因是一种公认的抑癌基因,位于染色体 17q13.1,既往与肿瘤发病机制的研究众多。对瘢痕疙瘩 p53 基因差异性的研究结论尚未统一,但普遍认为 p53 功能的缺失可能促使成纤维细胞凋亡异常<sup>[8]</sup>。本实验显示瘢痕疙瘩组织中 p53 表达较正常皮肤减少,这可能正是 p53 蛋白无法执行细胞凋亡致成纤维细胞有较高增殖活性的原因。WWP1 表达水平增高的同时 p53 表达降低并非偶然,Laine et al<sup>[9]</sup>对小鼠纤维母细胞 WWP1、p53 基因研究表明,WWP1 通过泛素化介导 p53 蛋白从细胞核输出,p53 发挥促细胞凋亡及抑癌作用是在细胞核内完成,因此泛素化抑制了 p53 基因的转录活性,此外 WWP1 对 p53 的调节独立于 MDM2。这种泛素化为非经典的泛素化途径,结果并非将蛋白降解,而是通过泛素化修饰 p53 蛋白并增加其稳定性,但泛素化了的 p53 蛋白无生物功能。

本实验就 WWP1、p53 在瘢痕疙瘩的表达进行研究,表明 p53 表达减少,而 WWP1 表达增多。p53

功能缺失在乳腺癌、胃癌<sup>[10]</sup>等肿瘤常见,p53 多以突变体形式存在,且这种突变体表达明显升高,但本研究显示瘢痕疙瘩中 p53 表达较正常组织明显减少,这至少说明在瘢痕疙瘩中 p53 功能缺失,实验对 WWP1 水平检测,发现表达明显增高,这一现象在其他肿瘤中亦存在<sup>[11]</sup>,且有证据表明 WWP1 通过泛素化修饰 p53 蛋白,因此推测瘢痕疙瘩的形成中成纤维细胞异常增殖可能与 p53 功能缺失有关,而 WWP1 能够通过 p53 的调控来实现细胞周期的控制,除此之外是否还有其他途径作用于 p53 使其功能缺失尚无确切证据,待将来有关此方面的研究更加深入。

### 参考文献

- [1] Nakashima M, Chung S, Takahashi A, et al. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population [J]. *Nat Genet* 2010; 42(9): 768-71.
- [2] Cheng Q, Cao X, Yuan F, et al. Knockdown of WWP1 inhibits growth and induces apoptosis in hepatoma carcinoma cells through the activation of caspase3 and p53 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014; 448(3): 248-54.
- [3] Yeung B, Ho K C, Yang X, et al. WWP1 E3 ligase targets LATS1 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer cells [J]. *PLoS One* 2013; 8(4): e61027.
- [4] 汪治宇, 刘荣凤, 丁妍, 等. 泛素连接酶 WWP1 和 Smurfs 在前列腺癌组织中的表达及其与骨转移的关系 [J]. *中国现代医学杂志* 2012; 22(20): 66-70.
- [5] Cao X, Xue L, Han L, et al. WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (WWP1) delays cellular senescence by promoting p27Kip1 degradation in human diploid fibroblasts [J]. *J Biol Chem* 2011; 286(38): 33447-56.
- [6] Polyak K, Kato J Y, Solomon M J, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest [J]. *Genes Dev* 1994; 8(1): 9-22.
- [7] Levenberg S, Yarden A, Kam Z, et al. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry [J]. *Oncogene* 1999; 18(4): 869-76.
- [8] Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, et al. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars [J]. *J Dermatol Sci* 1999; 22(1): 31-7.
- [9] Laine A, Ronai Z. Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1 [J]. *Oncogene* 2007; 26(10): 1477-83.
- [10] Yeung B, Ho K C, Yang X. WWP1 E3 ligase targets LATS1 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer cells [J]. *PLoS One* 2013; 8(4): e61027.
- [11] Zhao L, Huang J, Zhang H, et al. Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase WWP1 [J]. *Stem Cells* 2011; 29(10): 1601-10.

## 脂联素分子构成在代谢正常肥胖人群中的变化

孙 燕, 王佑民, 周换丽

**摘要** 目的 初步探讨代谢正常肥胖(MHO)人群中脂联素(APN)分子构成的变化及临床意义,分析MHO人群代谢正常的原因,并探讨其与MHO的相关性。方法 根据纳入标准选取成年人161例,分为MHO组( $n=52$ )、肥胖伴代谢综合征(MS)组( $n=52$ )、正常对照组( $n=57$ )。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定患者血清总APN、高分子量脂联素(HMW-adp)浓度,并分析其分子构成在MHO人群中的变化及相关临床意义。结果 ①与正常对照组相比,肥胖伴MS组及MHO组血清总APN、HMW-adp均明显降低( $P < 0.01$ );②MHO组总APN、HMW-adp较肥胖伴MS组明显升高( $P < 0.01$ );③MHO组HMW-adp/总APN(H/A)较肥胖伴MS组及正常对照组均升高( $P < 0.05$ );④多元逐步回归

分析显示体质指数(BMI)、腰围、餐后2h血糖(2hPBG)是总APN的重要危险因素,腰围、2hPBG是HMW-adp的阴性预测因子,而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)是其唯一的阳性预测因子,而H/A的主要影响因素却是BMI、腰围、HDL-C。结论 APN分子构成在MHO人群中呈高水平状态,该人群代谢之所以正常可能与这两种因子的保护作用有关,尤其HMW-adp。由此可以认为血清总APN、HMW-adp的检测可作为定量检测MHO人群及其转归以及判断预后的指标。

**关键词** 代谢正常肥胖;肥胖伴代谢综合征;脂联素分子构成;总脂联素;高分子量脂联素

中图分类号 R 589.25; R 392.114

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0250-05

2015-11-06 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:1206c0805034)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院内分泌科,安徽省内分泌代谢病省级实验室,合肥 230001

作者简介:孙 燕,女,硕士研究生;

王佑民,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: youminwang@21.cn.com

随着研究的深入,人们发现肥胖个体存在不同亚群,有些肥胖个体代谢指标并无异常,通常称之为代谢正常肥胖(metabolically healthy but obese, MHO)<sup>[1]</sup>,其以胰岛素敏感性高为主要特征。有研究<sup>[2]</sup>表明,MHO是一种低度炎症状态,但尚未达到

## Different expression and significance of WWP1 and p53 in keloid and normal skin

Wang Hui, Sang Pengfei, Wang Min, et al

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** The purpose of the study was to detect the expression of E3 ubiquitin ligase WWP1 and p53 in human normal skin and keloid tissues and its correlation with the occurrence of keloid. **Methods** 10 cases of keloid tissues and 10 cases of normal skin were recruited. The expressions of WWP1 and p53 in the keloid group and the controls were measured using immunohistochemical methods. And the mRNA expression of WWP1 and p53 in the two groups were detected by RT-PCR methods. We also measured integrated optical density (IOD) of the proteins by Image-Pro Plus analysis system, and calculated the relative quantity of mRNA referring to  $\beta$ -actin, then made a comparative analysis of the two groups for the expressions of WWP1, p53. **Results** The immunohistochemical results showed that the expression of p53 protein in keloid was significantly lower compared with the controls, and WWP1 protein deposition was significantly higher than that of normal skin. The mRNA expression of p53 and WWP1 was detected by RT-PCR and confirmed the same results. All the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** E3 ubiquitin ligase WWP1 and anti oncogene p53 is related to the formation of keloid, which provides a new direction of the mechanism and new targets for the treatment of keloid.

**Key words** WWP1; p53; keloid; normal skin