

# NEDD4-1 基因在病理性瘢痕中的表达及意义

张锦松<sup>1</sup> 朱 飞<sup>1</sup> 胡 超<sup>1</sup> 张胜权<sup>2</sup> 杨 森<sup>3</sup>

**摘要** 目的 研究 NEDD4-1 基因在正常皮肤与增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中的表达情况,探讨其在病理性瘢痕发病机制中的作用。方法 收集临床标本 30 例,其中增生性瘢痕 10 例(A 组)、瘢痕疙瘩 10 例(B 组)、正常皮肤 10 例(C 组),采用 Western blot 法和普通 RT-PCR 方法检测 A、B、C 3 组中 NEDD4-1 蛋白和 mRNA 表达情况,并进行统计学分析。结果 在 A、B 组中,NEDD4-1 mRNA 和蛋白均可表达,但表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),两组分别与 C 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 NEDD4-1 基因在病理性瘢痕中均可表达,但 NEDD4-1 的表达与病理性瘢痕的发生机制之间的关系仍需进一步研究。

**关键词** NEDD4-1; GWAS; 病理性瘢痕; 瘢痕疙瘩

**中图分类号** R 392.11

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2014)03-0347-04

NEDD4 基因是 2010 年在日本人群进行瘢痕疙瘩全基因组关联研究(GWAS)中首次发现的与瘢痕疙瘩显著相关的易感基因之一。近来,在日本人群瘢痕疙瘩 GWAS 研究的基础之上,Zhu et al<sup>[1]</sup>对中国汉族人群进行瘢痕疙瘩易感位点的验证性实验发现 NEDD4 基因是与中国汉族瘢痕疙瘩发生显著相关的基因之一,但是其在病理性瘢痕中的具体表达情况尚不清楚。NEDD4-1 是其最重要的一种异构体,NEDD4-1 为抑癌基因第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten,PTEN)的泛素连接酶,其通过蛋白质泛素化途径降解 PTEN,进而调控肿瘤细胞的凋亡和增殖。Kim et al<sup>[2]</sup>研究发现在胃肠肿瘤细胞中 NEDD4-1 表达明显增高。而病理性瘢痕与肿瘤在某些方面上有着很多相似性,许多与恶性肿瘤相关的基因、细胞因子在病理性瘢痕中呈阳性表达,抑癌基因在病理性瘢痕中表达降低。

采用 Western blot 和 RT-PCR 方法检测正常皮肤、增生性瘢痕、瘢痕疙瘩组织中 NEDD4-1 蛋白和 mRNA 表达情况,探讨其表达与病理性瘢痕形成的关系,为揭示病理性瘢痕的发病机制提供一定的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验标本** 收集安徽医科大学第一附属医院整形外科手术切除的病理性瘢痕 20 例(增生性瘢痕 10 例、瘢痕疙瘩 10 例),年龄 10~52(31.63 ± 13.48)岁,其中男 8 例,女 12 例,按照我院伦理委员会的准则,获得收集病情同意。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。对照组:10 例(取自植皮患者取皮区的正常皮肤),身体均无病理性瘢痕存在,且均来自我院整形外科住院患者。患者术前均无长期外用其他防治瘢痕药物史,不伴有肿瘤等其他严重疾病。所取标本分两部分,均立即放置于液氮罐内保存。

**1.1.2 主要试剂** 兔抗人 NEDD4-1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); $\beta$ -actin 单克隆抗体及 Western blot 试剂盒(美国 Sigma 公司);RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司);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 Western blot 检测各组 NEDD4-1 蛋白表达

取冻存的瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、正常皮肤组织各 0.1 g,分别放置于 3 个研磨器中,按照细胞裂解液试剂盒说明书分别加入适量的细胞裂解液(RIPA)和蛋白酶抑制剂(PMSF),0~4℃冰上研磨成蛋白匀浆,匀浆在转速为 8 000 r/min 离心机中离心 10~15 min,取上清液备用。BCA 法测定蛋白浓度,12% SDS-PAGE 电泳后,湿转法将目的蛋白转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,兔抗人 NEDD4-1 单克隆抗体 4℃孵育过夜,TBS 缓冲液(TBST)漂洗 3 次,每次 10 min;加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)2 h,ECL 发光液显色。以等量蛋白质上样  $\beta$ -actin 对照,每个样本至少重复 3 次。

**1.2.2 RT-PCR 法检测各组 NEDD4-1 基因的表达** 从 -80℃液氮罐中取出瘢痕疙瘩组织、增生性瘢

2013-11-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30973124)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup>整形外科、<sup>3</sup>皮肤科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学生物化学教研室,合肥 230032

作者简介:张锦松,男,硕士研究生;

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

痕组织、正常皮肤组织各约 100 mg 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 1 ml 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 ( $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ )。根据浓度取 1  $\mu$ g 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。NEDD4-1 上游引物: 5'-GCATGTTTGGCCATCCTCCCA-3',下游引物: 5'-AGCCAGGCTTGCAAGAATTAG-3',扩增片段为 295 bp; GAPDH 上游引物: 5'-AGATCATCAG-CAATGCCTCCTG-3',下游引物: 5'-ATGGCATG-GACTGTGGTCATG-3',扩增片段为 109 bp。扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 72  $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min, 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 13.0 分析软件进行统计学处理。mRNA 及蛋白的表达数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异检验采用方差分析,两两比较用  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 Western blot 检测** 利用 Image Pro 4.5 软件分析 Western blot 结果显示, NEDD4-1 蛋白在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕及正常皮肤中均可表达,但 3 组之间差异无统计学意义 ( $F = 2.52, P > 0.05$ )。其中 NEDD4-1 蛋白大小为 120 ku,内参  $\beta$ -actin 的大小为 42 ku。见图 1。

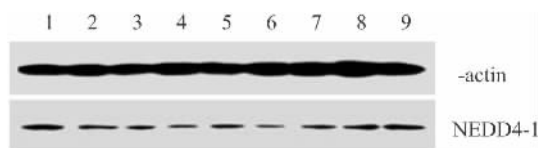


图1 NEDD4-1 及内参 Western blot 检测结果

1~3: 正常皮肤组织; 4~6: 增生性瘢痕组织; 7~9: 瘢痕疙瘩组织

**2.2 RT-PCR 检测** 用 TRIzol 试剂将 3 组标本提取出 RNA 后,经检测正常皮肤组、增生性瘢痕组及瘢痕疙瘩组  $OD_{260}/OD_{280}$  比值在 1.7~2.0,比值符合要求,可以作为 RT-PCR 反应模板。RT-PCR 法结果表明: NEDD4-1 基因在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕及正常皮肤中均可表达,但 3 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。实验结果与 Western blot 检测结果相同,见图 2、3。

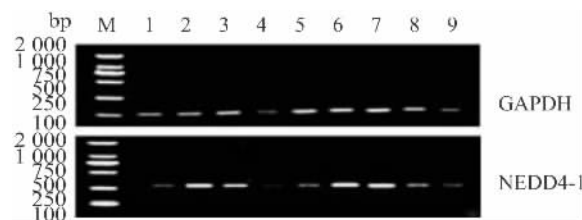


图2 NEDD4-1 及内参 PCR 产物电泳图

1~3: 正常皮肤组织; 4~6: 增生性瘢痕组织; 7~9: 瘢痕疙瘩组织

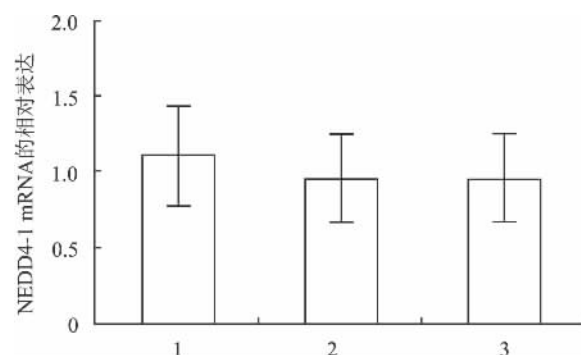


图3 NEDD4-1 mRNA 在正常皮肤、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织中的表达情况

1: 正常皮肤组织; 2: 增生性瘢痕组织; 3: 瘢痕疙瘩组织

## 3 讨论

NEDD4 基因位于 15q21.3,其表达产物 E3 泛素连接酶,是由 1 个 C2 域,3 个或 4 个 WW 域和 1 个泛素连接酶 Hect 域组成,在骨骼肌、膀胱、肝脏和皮肤中高度表达<sup>[3]</sup>。而 NEDD4-1 是其中最重要的一种异构体。NEDD4-1 可通过蛋白质泛素化途径降解 PTEN,通过向 PTEN 附加泛素这一分子标志物,促使 PTEN 在蛋白酶体中降解,进而调控肿瘤细胞的凋亡和增殖<sup>[4]</sup>。PTEN 可催化 3、4、5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)去磷酸化,从而抑制 PI3K/Akt 细胞信号转导通路,负调控细胞周期、增殖及促进细胞凋亡等多种生理活动。作为 PTEN 上游靶基因,李季林等<sup>[5]</sup>通过构建 NEDD4-1 shRNA 表达载体研究显示, NEDD4-1 可能通过泛素蛋白体途径降解 PTEN,导致 PI3K/Akt 激活,凋亡受阻,进而导致人胶质瘤的发生。Kim et al<sup>[2]</sup>研究发现在胃肠肿瘤细胞中 NEDD4-1 表达明显增高,而 PTEN 表达则降低,认为 NEDD4-1 可能通过泛素化途径降解 PTEN,从而导致肿瘤的发生。如前所述,许多与恶性肿瘤相关的基因、细胞因子在病理性瘢痕中呈阳性表达,抑癌基因在病理性瘢痕中表达降低。此外,研究<sup>[6-7]</sup>显示 PTEN 是病理性瘢痕发生发展中重要的调控因子,其在病理性瘢痕中表达明显降低。因此,

NEDD4-1 基因的表达可能与病理性瘢痕的发生发展存在密切关系。

日本学者 Nakashima et al<sup>[3]</sup> 通过 GWAS 研究推测认为 NEDD4 遗传变异可能导致 NEDD4 基因表达减少,进而导致 Smad4 表达减少,Smad4 是转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号转导通路中的信息传递因子,在 TGF- $\beta$  生物学效应中发挥重要作用,其减少使 TGF- $\beta$  信号转导通路活性增强,从而增强纤维母细胞核扩散和瘢痕疙瘩的形成。但是最近研究<sup>[8]</sup> 显示 NEDD4 可通过 PTEN/PI3K/Akt 信号通路促进成纤维细胞增殖并增强其侵袭性,造成细胞间接触抑制丧失;NEDD4 基因高度表达可诱导 P27 由细胞核转移至细胞质,并促使其降解,而 P27 是一种周期依赖性蛋白激酶抑制剂,通过抑制细胞周期在细胞接触抑制过程中发挥重要作用;NEDD4 还可促使成纤维蛋白和 I 型胶原过量表达并积聚在细胞外基质中,这些结果表明 NEDD4 可能促进瘢痕疙瘩的形成和发展。同时研究<sup>[8]</sup> 显示 NEDD4 可诱导  $\beta$  连环素( $\beta$ -catenin)在成纤维细胞胞质中积聚,并激活  $\beta$ -catenin 信号转导通路。而有文献<sup>[9]</sup> 表明在瘢痕疙瘩中存在大量  $\beta$ -catenin 积聚。由此推测,NEDD4 表达增高可能会促进瘢痕疙瘩的形成与发展。但是关于在瘢痕疙瘩中 NEDD4 基因表达是否比正常皮肤组织高尚没有明确结果。本研究显示在人类正常皮肤组织、增生性瘢痕及瘢痕疙瘩皮损组织中均检测到 NEDD4-1 基因 mRNA 及蛋白质的表达,但是三者之间 NEDD4-1 mRNA 及蛋白质表达差异无统计学意义。分析原因可能有以下几点:第一,近年来有关瘢痕疙瘩的遗传学研究<sup>[10-11]</sup> 结果显示,瘢痕疙瘩系多基因病,其发病可能与多个易感基因累加效应及环境有关,其中单个易感基因多系微效基因。NEDD4-1 基因可能就是其中之一,其单个基因的微效作用可能不足以决定瘢痕疙瘩的发病。第二,可能与试验样本量相对偏少,选择偏倚有关。第三,也可能是因为 NEDD4-1 基因突变、基因结构改变导致其产物发生了“质”的变化,从而影响瘢痕疙瘩的发生与发展,而其产物“量”的变化在三者之间可能没有差异。

NEDD4 基因作为瘢痕疙瘩易感基因,其在瘢痕疙瘩发生发展中所起的作用需进一步研究,后期可以从两个方面入手开展深入研究,一方面,可以加大样本量,减少选择偏倚;另一方面,可以从实验检测和数据库搜索比对来分析 NEDD4 基因结构在 3 组之间是否发生改变。另外,应用先进的外显子测序技术亦将为瘢痕疙瘩易感基因的深入研究提供新的方法。

## 参考文献

- [1] Zhu F, Wu B, Li P, et al. Association study confirmed susceptibility Loci with keloid in the Chinese Han population [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62377.
- [2] Kim S S, Yoo N J, Jeong E G, et al. Expression of NEDD4-1, a PTEN regulator, in gastric and colorectal carcinomas [J]. *APMIS*, 2008, 116(9): 779-84.
- [3] 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.
- [4] Wang X, Trotman L C, Koppie T, et al. NEDD4-1 is a protooncogenic ubiquitin ligase for PTEN [J]. *Cell*, 2007, 128(1): 129-39.
- [5] 李季林, 于如同, 盛罗平, 等. NEDD4-1 shRNA 对 U251 胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2011, 16(8): 366-70.
- [6] 谢 锋, 张正文, 牛扶幼, 等. 病理性瘢痕组织中 IGF-1R、PTEN 及 PCNA 的表达 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2011, 32(4): 472-5.
- [7] 刘 斌, 刘伟峰, 姜任武, 等. PTEN 和 VEGF 在病理性瘢痕中的表达及其相关性研究 [J]. *中国烧伤疮疡杂志*, 2010, 22(3): 209-13.
- [8] Chung S, Nakashima M, Zembutsu H, et al. Possible involvement of NEDD4 in keloid formation; its critical role in fibroblast proliferation and collagen production [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2011, 87(8): 563-73.
- [9] Sato M. Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids [J]. *Acta Derm Venereol*, 2006, 86(4): 300-7.
- [10] 周顺铭, 杨 森, 张学军, 等. 瘢痕疙瘩的临床和流行病学特征 [J]. *安徽医科大学学报*, 2006, 41(3): 346-8.
- [11] Sabatti C, Service S, Freimer N. False discovery rate in linkage and association genome screens for complex disorders [J]. *Genetics*, 2003, 164(2): 829-33.

## Expression of NEDD4-1 gene and its significance in pathological scar

Zhang Jinsong, Zhu Fei, Hu Chao, et al

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

**Abstract Objective** To examine the gene expression of NEDD4-1 in pathological scar and explore its effect on

# 强化阿托伐他汀治疗对 PCI 术后肾功能的影响

刘月宾 程自平 赵 韧

**摘要** 目的 探讨强化剂量的阿托伐他汀能否减轻经皮冠脉介入术(PCI)对患者肾功能的影响及减少对比剂致急性肾损伤(CI-AKI)的发生率。方法 将128例接受PCI治疗的患者随机分为2组:强化组( $n=64$ )和对照组( $n=64$ )。强化组术前12~24 h、术后第1天及第2天均口服80 mg阿托伐他汀,对照组术前及术后口服20 mg阿托伐他汀。主要终点事件是CI-AKI的发生率,并观察患者术前24 h和术后24、48、72 h的血清肌酐(Scr)、胱抑素C、肾小球滤过率(eGFR)、尿白蛋白、尿 $\beta$ -2微球蛋白水平。结果 强化组3.1%( $n=2$ )的患者发生CI-AKI,对照组为4.7%( $n=3$ ),两组间差异无统计学意义( $P=1.00$ );术后两组间Scr、胱抑素C、eGFR、尿白蛋白、尿 $\beta$ -2微球蛋白和肌酸激酶(CK)差异均无统计学意义。术后3 d两组谷丙转氨酶(ALT)升高,强化组谷草转氨酶(AST)亦升高( $P<0.05$ ),但均在正常参考值范围内。结论 PCI术前强化阿托伐他汀治疗与常规剂量比较在减轻肾功能损伤和降低CI-AKI发生率方面差异无统计学意义。

**关键词** 阿托伐他汀;经皮冠脉介入治疗;肾功能;对比剂;急性肾损伤

中图分类号 R 981+.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0350-04

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)是由于冠脉粥样硬化致管腔狭窄,影响

心肌的血流灌注,在此基础上可因斑块的不稳定而引起急性心肌梗死、心力衰竭、恶性心律失常、心源性休克,甚至猝死。随着人们生活的改善,生活方式的转变,CHD发病率逐年增加,严重威胁人们的身体健康。现代介入医学的迅猛发展,使其可以被明确诊断,并得到有效治疗。但是经皮冠脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)离不开对比剂的辅助,其引起的急性肾损伤(contrast-induced acute kidney injury, CI-AKI)也随之增多<sup>[1]</sup>,是医院获得性急性肾衰竭的第三大常见原因,约占10%<sup>[2-3]</sup>。国内外许多研究<sup>[4-5]</sup>显示强化他汀治疗可能有助于减少CI-AKI的发生率,但尚无定论。该研究旨在探讨强化他汀治疗能否在PCI术后减轻肾损伤,降低CI-AKI的发生率,从而为临床治疗提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选择2012年11月~2013年10月于安徽医科大学第一附属医院心血管内科行PCI治疗的非ST段抬高性急性冠脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)患者128例,随机分为两组。排除标准为:活动性肝病或肝酶学(aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase, AST/ALT)升高,超过正常上限3倍者;严重肾功能受损者;肌酸激酶(creatinine kinase, CK)超过正常上限5倍者;有他汀类过敏者或既往不能耐受他汀类药物者;对比剂过敏或1周内使用过对比剂者;重度心力衰竭射血分数(ejection fraction, EF) < 30%者;年龄 > 90岁者;感染性疾病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤等。

2013-11-18 接收

基金项目:安徽医科大学第一附属医院青年科学基金培养计划项目(编号:2012KJ18)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

作者简介:刘月宾,女,硕士研究生;

程自平,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: czp8085@sina.com

formation of pathological scar. **Methods** Tissue specimens were collected from 10 cases of hypertrophic scar (group A), 10 cases of keloid (group B) and 10 cases of normal skin (group C) respectively. Western blot and RT-PCR techniques were performed to detect the protein and gene expression of NEDD4-1. **Results** NEDD4-1 mRNA and protein in both group A and B could be expressed, while the difference between the two groups was not significant ( $P>0.05$ ). Moreover, compared with the group C, the difference in gene expression of NEDD4-1 did not reach statistical significance in both group A and group B ( $P>0.05$ ). **Conclusion** In our experimental study, NEDD4-1 gene is present in pathological scar, but further studies in the detailed mechanism are warranted.

**Key words** NEDD4-1; GWAS; pathological scar; keloid