

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000405

家族性圆柱瘤基因在病理性瘢痕中的表达

唐小清, 贺光照, 俞泽浩

(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨家族性圆柱瘤基因(cylindromatosis, CYLD)在病理性瘢痕组织及成纤维细胞中的表达及意义。**方法:**收集临床手术切除的皮肤标本 72 例,分为正常皮肤组(20 例)、正常瘢痕组(14 例)、瘢痕疙瘩组(25 例)、增生性瘢痕组(13 例)。免疫组织化学技术(SP 法)和 Western blot 检测各组织中 CYLD 蛋白的表达情况并对结果进行差异比较;另收集瘢痕疙瘩、增生性瘢痕及周围正常皮肤组织各 10 例,采用组织块贴壁法进行原代成纤维细胞培养,Western blot 测定 CYLD 蛋白在 3 种成纤维细胞中的表达情况。**结果:**①免疫组化结果表明 CYLD 蛋白在 A 组(0.762 ± 0.039)与 B 组(0.721 ± 0.042)中的阳性表达明显高于 C 组(0.173 ± 0.069)与 D 组(0.213 ± 0.072), ($F=213.832, P=0.000$);C 组、D 组分别与 A 组比较(P 值均为 0.000),C 组、D 组分别与 B 组比较差异均具有统计学意义(P 值均为 0.000);②Western blot 结果显示 CYLD 蛋白在正常皮肤(0.550 ± 0.030)与正常瘢痕组织(0.442 ± 0.016)中的表达明显高于瘢痕疙瘩(0.068 ± 0.013)与增生性瘢痕(0.178 ± 0.009) ($F=424.685, P=0.000$);③CYLD 蛋白在正常成纤维细胞(0.564 ± 0.037)中的表达同样明显高于瘢痕疙瘩(0.240 ± 0.022)与增生性瘢痕成纤维细胞(0.256 ± 0.038) ($F=90.306, P=0.000$)。**结论:** CYLD 蛋白在病理性瘢痕成纤维细胞中的表达低于正常皮肤与正常瘢痕,说明 CYLD 的低表达可能与病理性瘢痕的形成具有一定的关系。

【关键词】病理性瘢痕;家族性圆柱瘤基因;成纤维细胞**【中图分类号】**R619.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-21

Expression of cylindromatosis in human pathological scars

Tang Xiaqing, He Guangzhao, Yu Zehao

(Department of Plastic and Burning Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and significance of cylindromatosis(CYLD) in pathological scar tissues and fibroblasts. **Methods:** Seventy-two skin specimens were collected from clinical patients and were divided into normal skin group(20 samples), normal scar group(14 samples), Keloids group(25 samples) and hypertrophic scars group(13 samples). Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the protein expression of CYLD in each group and the results were compared. Keloids, hypertrophic scars and surrounding normal skin tissues(10 specimens of each group) were collected for primary fibroblasts culture with tissue adherent method. Expressions of CYLD protein in the three kinds of fibroblasts were detected by Western blot. **Results:** The results of immunohistochemistry showed that the positive expressions of CYLD protein in group A and group B were significantly higher than those in group C and group D($F=213.832, P=0.000$). There were statistically significant differences in expression of CYLD protein between group A and groups C, D($P=0.000$) and between group B and groups C, D($P=0.000$). ②Results of Western blot showed that the expression of CYLD protein in normal skin tissues and normal scars tissues were higher than those of keloids and hypertrophic scars($F=424.685, P=0.000$). ③Expressions of CYLD protein in normal skin fibroblasts were also significantly higher than those of keloid fibroblasts and hypertrophic scars fibroblasts($F=90.306, P=0.000$). **Conclusion:** Expression of CYLD protein in pathological scar fibroblasts is lower than that of normal skin, indicating that the low expression of CYLD may play an important role in the formation of pathological scar.

【Key words】pathological scar; cylindromatosis; fibroblasts

病理性瘢痕包括瘢痕疙瘩与增生性瘢痕两种,其发病机制错综复杂,目前主要认为它与皮肤成纤维细胞的过度增殖、细胞外基质的过度沉积及胶原

的排列紊乱等有关。病理性瘢痕的治疗方法很多,但效果均较局限,且复发率较高。因此寻求特殊有效的治疗方法一直是整形外科研究的重要课题。家族性圆柱瘤基因(cylindromatosis, CYLD)被认为是一种新的肿瘤抑制基因^[1-2],其基因产物 CYLD 蛋白具有去泛素化酶的活性,可以通过与多种不同的底物蛋白结合诱导其去泛素化,从而产生多种不同的效应。大量研究表明 CYLD 基因的缺失或表达的降

作者介绍:唐小清, Email: 617010089@qq.com,

研究方向:瘢痕的防治。

通信作者:贺光照, Email: glenghz@yahoo.com.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1517.022.html>

(2014-10-30)

低与多种肿瘤的发生^[3]及肝、肺等组织的纤维化密切相关^[4-5]。病理性瘢痕的形成也被认为与皮肤组织的过度纤维化有一定关系,那么 CYLD 基因在病理性瘢痕中的表达如何,其与病理性瘢痕的形成有何关系,目前尚未见相关文献报道。本研究将以人体病理性瘢痕组织及原代培养的成纤维细胞为研究对象,以探究 CYLD 在病理性瘢痕中的表达情况,以期临床病理性瘢痕的治疗找到新的作用靶点。

1 对象和方法

1.1 研究对象

免疫组化标本主要来源于 2012 至 2013 年,重庆医科大学附属第一医院整形美容科手术切除的 72 例标本。分为瘢痕疙瘩(25 例)、增生性瘢痕(13 例)、正常瘢痕(14 例)、正常皮肤组织(20 例)。标本大小为 1.0 cm × 0.8 cm ~ 5.0 cm × 8.0 cm 不等,病程 1~5 年。瘢痕疙瘩组织入选标准:外观充血发红,质硬,有痛痒感,病损超过原皮肤损伤范围向周围侵袭,病程超过 12 个月。增生性瘢痕入选标准:外观充血,发红,质硬,处于增生活跃期,病程 5~10 个月,且二者均无自然消退征象,局部无感染和破溃,术前未接受放疗、激素、抗肿瘤药物等治疗,术后均由病理切片诊断证实。正常皮肤与正常瘢痕组织则来源于男性包皮环切术及其他整形手术所切除的皮肤组织。所取标本均获患者知情同意,并经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、FBS(Hyclone,美国);免疫组化试剂盒及 DAB 显色液(中山金桥,中国);RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(鼎国,中国);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒,预染 Maker(碧云天,中国);兔抗人 CYLD 多克隆抗体(Proteintech,美国);内参 β -actin(abcam,美国);胰蛋白酶、DMSO、羊抗兔 IgG-HRP(博士德,中国);凝胶成像系统(Bio-Rad,美国);倒置显微镜(Leica,德国);高速离心机(Sigma,美国);1815TC 型二氧化碳培养箱(SHELLAB,美国);550 型酶标仪(BIO-RAD,美国)。

1.3 方法

1.3.1 细胞的培养 收集瘢痕疙瘩(K 组)、增生性瘢痕(H 组)及正常皮肤组织(N 组)各 10 例,将收集到的组织放入 DMEM 高糖培养基中带回实验室,超净工作台上去除表皮与皮下脂肪,在用眼科剪将组织剪成 0.5 ~ 1 mm³ 的碎块,用吸

管或镊子将组织块接种到事先涂有一层 FBS 的培养瓶中,组织块间隙在 0.5 cm 左右。置入 37 °C,CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中孵育 1~2 h,待组织块贴壁后,小心加入 3~4 ml 含 15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,继续孵育 3~4 d。以后每 2~3 d 换液 1 次。待细胞生长基本融合成片,密度达 80% 时,按 1:2 进行传代。本研究选用第 3~8 代细胞进行实验。

1.3.2 免疫组织化学 将标本以 10% 甲醛固定,石蜡包埋,常规制备免疫组化石蜡切片。石蜡切片脱蜡入水,3% 过氧化氢孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡,进行抗原热修复,采用免疫组化 SP-AP 法,严格按照试剂盒说明书进行操作。实验结果采用专业图像分析软件 Image Pro Plus 6.0 进行处理。分别挑选高倍镜视野下的成纤维细胞黄染区域作为测量区域(AOI),测得切片上 DAB 显色为棕黄色代表阳性区域的光密度值,每张切片分别随机选取 10 个视野,测量光密度,取其平均值,作为平均光密度值(mean optical density,MOD),并以此代表实验所研究蛋白的表达强度进行分析。

1.3.3 Western blot 测定 CYLD 蛋白在各组织及细胞中的表达 提取各组织和细胞的总蛋白,测定蛋白浓度,再加入 1/5 体积的上样缓冲液沸水煮 5 min,置于 -20 °C 冰箱备用。各样品按 50 μ g/孔上样,SDS-PAGE 电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶 37 °C 封闭 1 h,一抗(1:1 000 稀释)4 °C 孵育过夜。次日 TBST 漂洗 10 min × 3 次后,加入二抗(1:3 500 稀释)37 °C 孵育 1 h,再用 TBST 漂洗 10 min × 3 次,加入 ECL 显色液显色。以 β -actin 为内参,应用图像分析软件对特异性条带做定量分析,以目标条带与内参的灰度值比反映蛋白相对表达量。

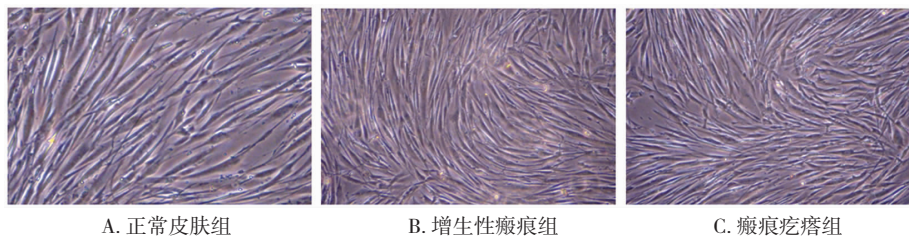
1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理和分析。数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞的形态

成功培养出瘢痕疙瘩、增生性瘢痕及正常皮肤成纤维细胞。三者在体外培养及生长的过程基本相同,在形态学上具有相似的表现,呈典型的长梭状,部分表现为三角状,细胞核呈类圆形或是长椭圆形,核仁一个或数个不等,细胞浆向两极突起。正常皮肤成纤维细胞排列具有一定的方向性,有时可成螺旋形排列。瘢痕疙瘩及增生性瘢痕成纤维细胞排列紊乱,极性消失,有明显的交叉重叠现象。这些均符合成纤维细胞的生长特点(图 1)。



A. 正常皮肤组

B. 增生性瘢痕组

C. 瘢痕疙瘩组

图 1 正常皮肤与瘢痕疙瘩及增生性瘢痕成纤维细胞的形态学比较 (SP, 200 ×)

Fig.1 Morphology of fibroblasts in normal skin, keloids and hypertrophic scars (SP, 200 ×)

2.2 免疫组化检测 CYLD 蛋白在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、正常瘢痕、正常皮肤组织中的表达

CYLD 蛋白的阳性染色为棕黄色,主要定位于细胞胞核及胞浆中。在表皮细胞、内皮细胞及成纤维细胞中均有表达(见图 2)。CYLD 蛋白在正常皮肤(0.762 ± 0.039)与正常瘢痕(0.721 ± 0.042)中的免疫组化评分明显高于瘢痕疙瘩(0.173 ± 0.069)和增生性瘢痕(0.213 ± 0.072),差异具有统计学意义($F=213.832$, P 值均为 0.000)(见表 1),而正常皮肤与正常瘢痕之间($P=0.192$)、瘢痕疙瘩与增生性瘢痕之间($P=0.198$)CYLD 蛋白表达无明显差别。

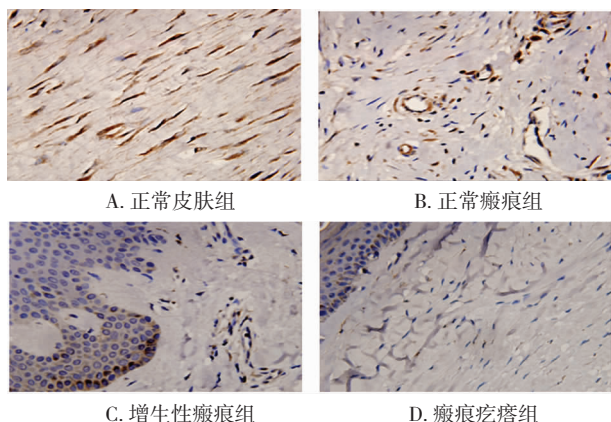


图 2 免疫组化检测各组中 CYLD 蛋白的表达 (SP, 200 ×)

Fig.2 Protein expression of CYLD in each group detected by immunohistochemistry (SP, 200 ×)

表 1 免疫组化检测 CYLD 蛋白在各组织中表达及结果分析 ($\bar{x} \pm s$)

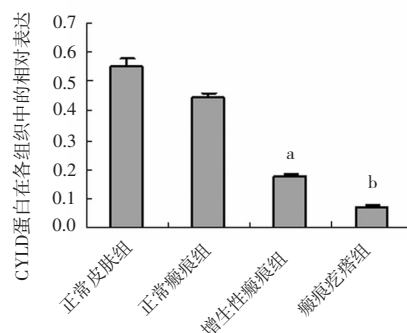
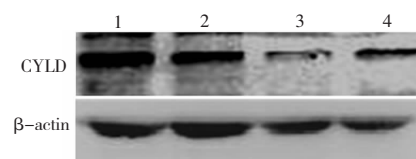
Tab.1 Protein expression of CYLD in each group detected by immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CYLD	F 值	P 值
正常皮肤组	20	0.762 ± 0.039	213.832	0.000
正常瘢痕组	14	0.721 ± 0.042		
瘢痕疙瘩组	25	0.173 ± 0.069^a		
增生性瘢痕组	13	0.213 ± 0.072^a		

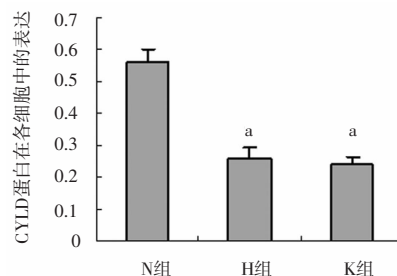
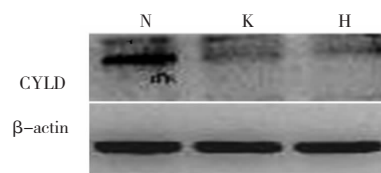
注: a, 瘢痕疙瘩、增生性瘢痕与正常皮肤比较 $P < 0.05$; b, 瘢痕疙瘩、增生性瘢痕与正常瘢痕比较 $P < 0.05$

2.3 Western blot 检测 CYLD 基因在组织及细胞中的表达

蛋白电泳结果显示:在 4 种皮肤组织蛋白中均检测到 CYLD 的表达,但 CYLD 蛋白在瘢痕疙瘩(0.068 ± 0.013)与增生性瘢痕组织(0.178 ± 0.009)中的相对表达明显低于正常皮肤(0.550 ± 0.030)与正常瘢痕组织(0.442 ± 0.016),差异具有统计学意义($F=424.685$, $P=0.000$)(图 3A)。在细胞实验中,同样发现 CYLD 在瘢痕疙瘩(0.240 ± 0.022)与增生性瘢痕(0.256 ± 0.038)成纤维细胞中的表达较正常皮肤成纤维细胞(0.564 ± 0.037)明显降低($F=90.306$, P 值均为 0.000),而瘢痕疙瘩与增生性瘢痕成纤维细胞比较,差异无统计学意义($P=0.581$)(图 3B)。



A. CYLD 蛋白在 4 种组织中的表达情况



B. CYLD 蛋白在 3 种成纤维细胞中的表达情况

注:图 A 为 CYLD 蛋白在各组织中的表达情况, a 表示增生性瘢痕与正常皮肤及正常瘢痕比较 $P < 0.05$; b 表示瘢痕疙瘩与正常瘢痕及正常皮肤比较 $P < 0.05$; 图 B 为 CYLD 蛋白在成纤维细胞中的表达, N 为正常皮肤成纤维细胞组, K 为瘢痕疙瘩组, H 为增生性瘢痕组, a 表示 K、H 组与 N 组比较 $P < 0.05$

图 3 Western blot 检测各组织及细胞中 CYLD 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.3 Protein expression of CYLD in tissues and fibroblasts detected by Western blot ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

病理性瘢痕的形成是伤口愈合过程中多种原因所导致的瘢痕成纤维细胞的异常增殖、细胞外基质的过度沉积及胶原排列紊乱、呈浸润性生长的一种体表纤维化疾病^[6]。其发生与遗传、种族、肤色、受伤部位等均具有一定的关系^[7]。CYLD 是近几年发现

的一种肿瘤抑制基因,其编码的蛋白具有去泛素化酶活性,CYLD 蛋白的一个重要的特点是它可以通过与多种信号分子结合,诱导其去泛素化,从而抑制相关信号通道的转导,以达到抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用^[8-10]。大量研究表明,CYLD 基因的缺失或蛋白活性的降低与多种肿瘤如皮肤黑色素瘤^[11]、乳腺癌^[12]、肺癌^[13]、前列腺癌^[14]等的发生密切相关。另有研究表明 CYLD 在抑制组织纤维化等方面也具有一定的作用。Nikolaou 等^[4]发现 CYLD 基因活性的降低对小鼠肝纤维化的形成具有一定的促进作用。Lim 等^[5]证实 CYLD 可通过去泛素化 Akt 上的 K63 多聚泛素化链,降低 Smad3 的稳定性,从而抑制 TGF- β 信号通道的传导,阻止博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化的形成。而 TGF- β /Smads 被认为是病理性瘢痕发病机制中一条重要的信号通路,该通路的主导因子 TGF- β 1 是一种多功能的细胞因子,参与创面愈合过程的所有阶段,是病理性瘢痕形成过程中的关键效应因子^[15]。而病理性瘢痕的形成与皮肤组织的过度纤维化密切相关,除此之外,它与肿瘤的生长也具有某些相似的特性,如细胞的过度增殖及向周围正常组织呈浸润生长等。CYLD 在病理性瘢痕中的表达如何,它与病理性瘢痕的形成是否有关目前尚不清楚。

本实验收集临床切除的瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、正常皮肤、正常瘢痕 4 种皮肤组织,通过免疫组化及 Western blot 检测各组织中 CYLD 蛋白的表达情况。结果表明 CYLD 蛋白在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中的表达均明显低于正常皮肤和正常瘢痕。为了进一步证实这一结果,本实验又收集正常皮肤、瘢痕疙瘩、增生性瘢痕组织进行原代成纤维细胞的培养,通过 Western blot 检测了 CYLD 蛋白在 3 种皮肤成纤维细胞中的表达情况,结果同样发现 CYLD 在病理性瘢痕成纤维细胞中的表达明显低于正常皮肤成纤维细胞。由此推测 CYLD 蛋白的低表达可能与病理性瘢痕的形成具有一定的关系。

由于 CYLD 基因自身可受到许多因素的影响与调控,如 CYLD 基因自身启动子上可发生异常的甲基化或乙酰化^[13]、基因转录后可受到磷酸化或泛素化修饰等^[16],从而降低 CYLD 基因的活性及蛋白表达,抑制其功能的发挥,因此 CYLD 在病理性瘢痕中低表达的原因尚不清楚。另外,本实验研究证实 CYLD 在病理性瘢痕中的表达明显低于正常皮肤与正常瘢痕,那么通过药物或基因过表达等方法上调 CYLD 在病理性瘢痕中的表达能否从一定程度上抑制其生长还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, et al. Loss of the cyclin-dromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF- κ B[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 797-801.
- [2] Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, et al. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by Deubiquitination[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 801-805.
- [3] Massoumi R. CYLD: a deubiquitination enzyme with multiple roles in cancer[J]. *Future Oncol*, 2011, 7(2): 285-297.
- [4] Nikolaou K, Tsagaratou A, Eftychi C, et al. Inactivation of the deubiquitinase CYLD in hepatocytes causes apoptosis, inflammation, fibrosis, and cancer[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(6): 738-750.
- [5] Lim JH, Jono H, Komastu K, et al. CYLD negatively regulates transforming growth factor- β signalling via deubiquitinating Akt[J]. *Nat Commun*, 2012(3): 771.
- [6] Vander Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation[J]. *Burns*, 2009, 35(1): 15-29.
- [7] Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP. Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1989, 84(5): 827-837.
- [8] Massoumi R. Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work[J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(7): 392-399.
- [9] Sun SC. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF- κ B activation and diverse biological processes[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(1): 25-34.
- [10] Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, et al. CYLD inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF- κ B signaling[J]. *Cell*, 2006, 125(4): 665-677.
- [11] Ke H, Augustine CK, Gandham VD, et al. CYLD inhibits melanoma growth and progression through suppression of the JNK/AP-1 and β 1-integrin signaling pathways[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(1): 221-229.
- [12] Hayashi M, Jono H, Shinriki S, et al. Clinical significance of CYLD downregulation in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 143(3): 447-457.
- [13] Zhong S, Fields CR, Su N, et al. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer[J]. *Oncogene*, 2007, 26(18): 2621-2634.
- [14] Kikuno N, Shiina H, Urakami S, et al. Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(3): 552-560.
- [15] Liu W, Wang DR, Cao YL. TGF- β : a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(1): 123-136.
- [16] Reiley W, Zhang M, Wu XF, et al. Regulation of the Deubiquitinating Enzyme CYLD by I B kinase gamma-dependent phosphorylation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(10): 3886-3895.

(责任编辑:冉明会)