

# 病理性瘢痕中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/核糖体40S小亚基S6蛋白激酶的 表达\*

袁德品<sup>1,2</sup>, 牛扶幼<sup>1</sup>, 陈旻静<sup>1</sup>, 王喜梅<sup>1</sup>, 李永涛<sup>1,2</sup>

## Expression of mammalian target of rapamycin/P70S6K in pathologic scars

Yuan De-pin<sup>1,2</sup>, Niu Fu-you<sup>1</sup>, Chen Min-jing<sup>1</sup>, Wang Xi-mei<sup>1</sup>, Li Yong-tao<sup>1,2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** In recent years, related research has shown that mammalian target of rapamycin/P70S6K (mTOR/P70S6K) signaling pathway has a role in tumor formation. Pathologic scar, especially the keloid scar, with the nature of some tumors, therefore mTOR/P70S6K signal pathway may be of great significance in the formation of pathological scars.  
**OBJECTIVE:** To investigate the role of mTOR/P70S6K signalling pathway in pathologic scars.  
**METHODS:** SP immunohistochemical method was used to detect the expressions of phosphated mTOR (p-mTOR) and phosphated P70S6K (p-P70S6K) p-mTOR and p-P70S6K in keloid, hypertrophic scar, non-pathologic scar and normal skin tissues. All the scar tissues were taken from the patients who were diagnosed clearly by the clinic, and they were confirmed by pathology.  
**RESULTS AND CONCLUSION:** The positive rates of p-mTOR and p-P70S6K in keloid and hypertrophic scars were higher compared with the two control groups ( $P < 0.05$ ). There was a highly positive correlation between p-mTOR and p-P70S6K expression in pathologic scars ( $r=0.482$ ,  $P < 0.05$ ). The activation of mTOR/P70S6K signalling pathway might be involved in the formation of pathologic scar, and the factors of it may cooperate to promote the progress of pathologic scars.

Yuan DP, Niu FY, Chen MJ, Wang XM, Li YT. Expression of mammalian target of rapamycin/P70S6K in pathologic scars. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(50): 9333-9336. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:**近年研究表明哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/核糖体40S小亚基S6蛋白激酶(mammalian target of rapamycin/P70S6K, mTOR/P70S6K)信号通路在某些肿瘤形成过程中具有一定作用。病理性瘢痕特别是瘢痕疙瘩具有某些肿瘤的性质,因此该信号通路在病理性瘢痕形成中可能具有重要作用。  
**目的:**观察mTOR/P70S6K信号通路在病理性瘢痕中的作用。  
**方法:**采用免疫组织化学SP法检测磷酸化mTOR/P70S6K(p-mTOR和p-P70S6K)在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、非病理性瘢痕及正常皮肤组织中的表达水平。实验所取瘢痕组织来自临床上诊断明确的瘢痕患者。  
**结果:**瘢痕疙瘩和增生性瘢痕组织中p-mTOR和p-P70S6K阳性表达率高于非病理性瘢痕及正常皮肤组( $P < 0.05$ )。p-mTOR和p-P70S6K表达呈正相关( $r = 0.482$ ,  $P < 0.05$ )。结果提示mTOR/P70S6K信号通路的激活参与了病理性瘢痕的形成过程,且mTOR和P70S6K之间具有协同作用。  
**关键词:**哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;核糖体40S小亚基S6蛋白激酶;瘢痕疙瘩;增生性瘢痕;组织构建  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.50.006

袁德品, 牛扶幼, 陈旻静, 王喜梅, 李永涛. 病理性瘢痕中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/核糖体40S小亚基S6蛋白激酶的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50):9333-9336. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

病理性瘢痕包括瘢痕疙瘩和增生性瘢痕,主要表现为成纤维细胞过度增生和细胞外基质的过度聚集,而成纤维细胞的增殖/凋亡调控失调则是病理性瘢痕形成的重要因素<sup>[1]</sup>。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞生长调控中处于核心地位<sup>[2]</sup>。核糖体40S小亚基S6蛋白激酶(p70S6K)是mTOR的直接底物,可以整合氨基酸、能量、生长因子所激发的信号通路,借以调控细胞生长、增殖和细胞周期<sup>[3]</sup>。既

往对mTOR及其上游蛋白如PI3K和AKT等的研究证实其在瘢痕形成过程中发挥一定作用<sup>[4-5]</sup>,而mTOR/P70S6K信号通路和病理性瘢痕关系的研究则少有报道。磷酸化mTOR/P70S6K(p-mTOR和p-P70S6K)分别是mTOR和P70S6K在体内的活性形式,实验通过对p-mTOR和p-P70S6K在病理性瘢痕中表达的检测,探讨mTOR/P70S6K信号通路在病理性瘢痕形成中的作用。

## 1 对象和方法

**设计:** 病例对照, 体外实验。

<sup>1</sup>Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; <sup>2</sup>Open Laboratory of Key Discipline of Clinical Medical Sciences, Institutions of Henan Province High Learning, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Yuan De-pin★, Studying for master's degree, Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Open Laboratory of Key Discipline of Clinical Medical Sciences, Institutions of Henan Province High Learning, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
yuandepin@126.com

Chen Min-jing, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
chenmj67@yahoo.com.cn

Yuan De-pin and Chen Min-jing contributed equally to this paper

Correspondence to:  
Niu Fu-you, Professor,  
Chief physician,  
Master's supervisor,  
Department of Plastic  
Surgery, First  
Affiliated Hospital of  
Zhengzhou University,  
Zhengzhou 450052,  
Henan Province,  
China  
niufuyou@zzu.deu.cn

Received: 2010-06-21  
Accepted: 2010-09-11

<sup>1</sup> 郑州大学第一附属医院整形外科, 河南省郑州市 450052; <sup>2</sup> 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 河南省郑州市 450052

袁德品★, 男, 1984年生, 河南省商丘市人, 汉族, 郑州大学医学院在读硕士, 主要从事瘢痕形成机制及临床治疗方面的研究。  
yuandepin@126.com

并列第一作者: 陈昱静, 女, 1967年生, 河南省洛阳市人, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 1990年河南医科大学毕业, 主要从事瘢痕形成机制及临床治疗。  
chenmj67@yahoo.com.cn

通讯作者: 牛扶幼, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事瘢痕形成机制及临床治疗。郑州大学第一附属医院整形外科, 河南省郑州市 450052  
niufuyou@zzu.edu.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225  
(2010)50-09333-04

收稿日期: 2010-06-21  
修回日期: 2010-09-11  
(20100521011/WJ·Z)

**时间及地点:** 实验于2009-07/2010-03在河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室完成。

**材料:**

**标本来源:** 实验标本均来自2008-07/2010-03郑州大学第一附属医院整形外科住院患者。共4组。其中瘢痕疙瘩患者20例, 男9例, 女11例, 年龄3.5~35.0岁, 病程6个月~12年, 分别取材于耳部、胸部、腋窝部及左上肢部; 增生性瘢痕患者20例, 男12例, 女8例, 年龄7.5~19.0岁, 病程9个月~7年, 分别取材于面颈部、肩背部、腋窝部及上肢部; 非病理性瘢痕患者20例, 男13例, 女7例, 年龄7~56岁, 病程11个月~18年, 取材于面颈部、双上肢、右小腿及右下腹部; 正常皮肤取自美容手术切除和全厚皮片移植剩余的全厚皮, 共20例, 男11例, 女9例, 年龄5.5~46.0岁。所有患者均无皮肤疾病、结缔组织病、传染病、恶性肿瘤和其他重要脏器疾病, 术前无放疗、激光治疗及免疫治疗史。根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》, 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书<sup>[6]</sup>。

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
兔抗人 p-mTOR, p-P70S6K 抗体 SP9001 通用二抗试剂盒, DAB 显色剂	美国 Bioworld 公司 北京中杉金桥生物 技术有限公司
倒置显微镜	德国 Leica 公司

**实验方法:**

**免疫组化SP染色:** 各组织取下后, 用体积分数10%的甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm连续切片。实验严格按照SP染色试剂盒说明书进行操作。切片脱蜡、梯度乙醇脱水, PBS冲洗3次, 每次5 min; 柠檬酸抗原修复10 min, 自然冷却, PBS冲洗3次, 每次5 min; 体积分数3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶, 室温20 min, PBS冲洗3次, 每次5 min; 滴加山羊血清50 μL/片, 室温封闭内源性生物素20 min, 甩除勿洗, 滴加 p-mTOR, p-P70S6K多克隆抗体50 μL/片 (1:100), 4℃过夜; PBS冲洗3次, 每次5 min, 滴加二抗50 μL/片, 37℃ 30 min, PBS冲洗3次, 每次5 min; 滴加辣根酶标记卵霉链白素50 μL/片, 37℃ 30 min, PBS冲洗3次, 每次5 min, DAB显色。苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。PBS代替一抗作为阴性对照。

**结果判定:** 德国Leica显微照像系统采集图

像, 采用Biosens Digital Imaging System v1.6对所采集的图像进行分析。p-mTOR和p-P70S6K阳性细胞呈棕黄色染色, 评分标准按Shimizu法<sup>[7]</sup>, 据每张切片阳性细胞的着色强度不同, 按无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计0, 1, 2, 3分; 阳性着色面积按无着色、着色面积小于1/3, 1/3~2/3和大于2/3分别计0, 1, 2, 3分。据评分之和判断结果: ≥3为阳性。

**设计、实施、评估者:** 设计为第一、二作者, 实施为第一、三、四、五作者, 评估者为全部作者, 均经过系统科研培训。

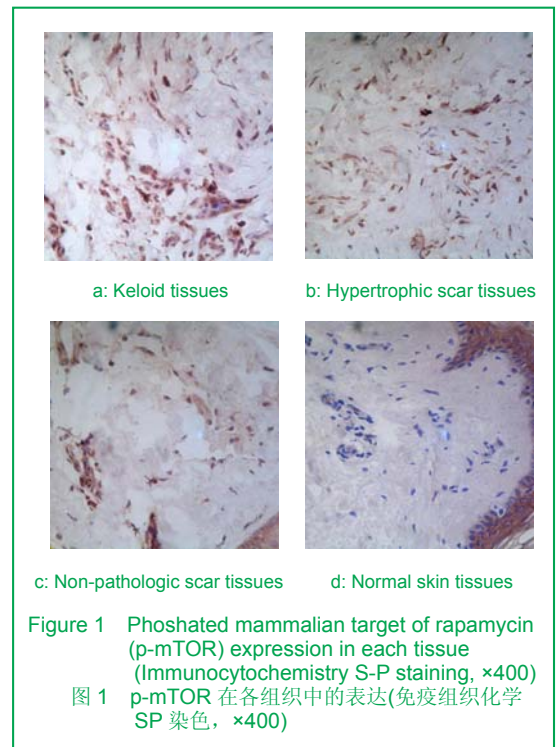
**主要观察指标:** 瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、非病理性瘢痕及正常皮肤组织中p-mTOR和p-P70S6K的表达情况。病理性瘢痕组织中p-mTOR和p-P70S6K的表达关系。

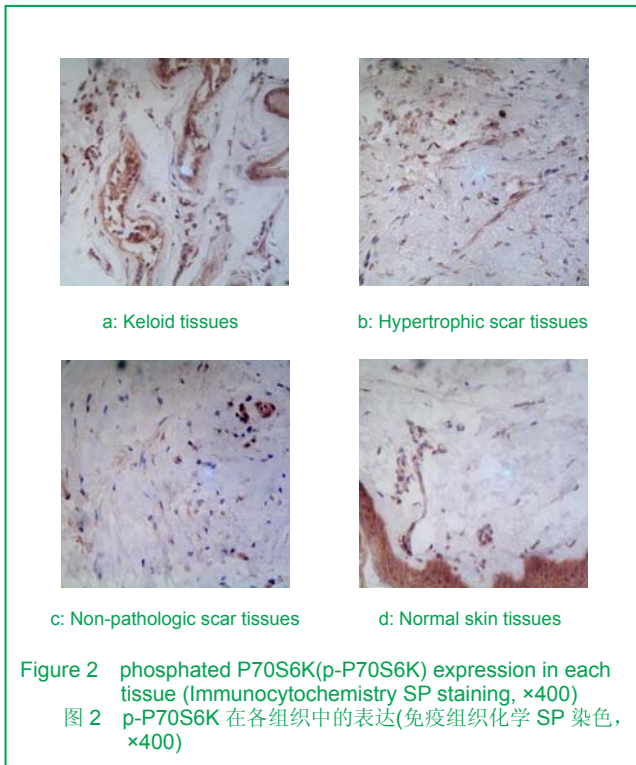
**统计学分析:** 以SPSS 16.0软件包进行统计分析。各组织中蛋白表达阳性率采用行×列表χ<sup>2</sup>检验、χ<sup>2</sup>分割检验, 病理性瘢痕中p-mTOR和p-P70S6K的表达关系采用关联性分析。检验水准α=0.05。

**2 结果**

**2.1 参与者数量分析** 所有纳入对象80例均经病理常规证实为不同类型瘢痕组织, 全部进入结果分析。

**2.2 病理性瘢痕、非病理性瘢痕和正常皮肤中 p-mTOR和p-P70S6K的表达** 见图1, 2。





p-mTOR和p-P70S6K在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕组织中主要表达于成纤维细胞胞质及部分胞核中,呈棕黄色(图1a, b, 图2a, b)。非病理性瘢痕少量表达(图1c, 图2c),正常皮肤组织中偶见少数细胞呈阳性反应(图1d; 图2d)。

瘢痕疙瘩组织中p-mTOR和p-P70S6K表达阳性率(75%和80%)及增生性瘢痕组织中p-mTOR和p-P70S6K表达阳性率(75%和65%)显著高于非病理性瘢痕(20%和10%)和正常皮肤组织(10%和5%),差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

**2.3 病理性瘢痕组织中p-mTOR和p-P70S6K表达的关系** 病理性瘢痕组织中p-mTOR和p-P70S6K的表达呈正相关( $r=0.482$ ,  $P < 0.05$ ), 见表1。

表1 病理性瘢痕组织中p-mTOR与p-P70S6K表达的关系  
Table 1 Relationship between p-mTOR and p-P70S6K in pathologic scars

p-mTOR	p-P70S6K		<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-		
+	26	4	0.482	0.001
-	3	7		

p-mTOR: phosphated mammalian target of rapamycin; p-P70S6K: phosphated P70S6K

### 3 讨论

mTOR是Heitman等<sup>[8]</sup>于1991年在分析不同啤酒醇

母突变体对雷帕霉素抵抗作用的差别时发现的,是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,被其上游信号PI3K和Akt激活后,通过增加特异性mRNA的翻译而在不同水平上控制蛋白质合成<sup>[9]</sup>。mTOR可磷酸化下游底物P70S6K的第389位苏氨酸残基,使其活性上升。p70S6K是一种核糖体蛋白激酶,活化后能够磷酸化激活核糖体40S小亚基S6蛋白,而S6蛋白可提高含5'-TOR(5'-terminal oligopyrimidine tract)的mRNA的翻译效率<sup>[10]</sup>,促进蛋白质的合成,介导细胞生长和增殖。

病理性瘢痕的形成和成纤维细胞的增殖/凋亡调控失调密切相关。有研究表明PI3K/Akt信号通路在增生性瘢痕成纤维细胞转分化过程中具有重要的作用,活化的PI3K/Akt可能通过TSC1/2复合物进一步激活其下游分子mTOR和P70S6K,启动蛋白质的翻译<sup>[5-11]</sup>。

p-mTOR和p-P70S6K分别是mTOR和P70S6K在体内的活性形式,更能反映mTOR/P70S6K信号通路的激活状态,实验们通过免疫组织化学SP法检测到p-mTOR和p-P70S6K在病理性瘢痕组中的表达明显高于非病理性瘢痕组和正常皮肤组,说明病理性瘢痕中存在异常活化的mTOR/P70S6K信号通路,这与mTOR/P70S6K信号通路在成纤维细胞增殖中的相关研究相符<sup>[12]</sup>,也在一定程度上说明mTOR/P70S6K信号通路和病理性瘢痕形成有着密切的关系。

相关研究表明瘢痕疙瘩和增生性瘢痕在组织病理学、遗传学等方面存在一定程度的差异<sup>[13-14]</sup>,然而本实验中p-mTOR和p-P70S6K在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中表达阳性率无明显差异,一方面提示mTOR/P70S6K信号通路虽参与病理性瘢痕的形成,而在增生较为活跃的瘢痕疙瘩中没有明显的表达;另一方面可能是二者确实存在差异,但由于样本量有限、现有检测方法等条件限制,未能体现mTOR/P70S6K信号通路在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕形成机制中的具体差异,需要进一步研究。

实验中p-mTOR和p-P70S6K关联性分析表明,p-mTOR和p-P70S6K在病理性瘢痕中的表达呈正相关,p-mTOR激活其下游重要靶点P70S6K,磷酸化为p-P70S6K,而p-P70S6K促翻译活性高于P70S6K,更有效地增强蛋白质合成,加速成纤维细胞生长,促进病理性瘢痕形成。有研究表明,p-mTOR和p-P70S6K在子宫内膜癌、宫颈癌和食管癌等恶性肿瘤中的表达也呈正相关<sup>[15-17]</sup>,证明两者在促进细胞生长等方面具有协同作用。

综上所述,mTOR/p70S6K信号通路在病理性瘢痕中异常激活,同时mTOR和p70S6K表达呈正相关,提示深入探讨mTOR/p70S6K信号通路与病理性瘢痕的关系,可能对病理性瘢痕的发生机制研究及临床防治有着积极的意义。

4 参考文献

[1] Bellemare J, Roberge CJ, Bergeron D, et al. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol.* 2005;206(1):1-8.

[2] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin(TOR): all integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene.* 2004;23(18):3151-3171.

[3] Shamji AF, Nghiem P, Sehreiber SL. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Molcell.* 2003;12(2):271-280.

[4] Song NN, Niu FY, Wang XM, et al. *Zhongguo Meirong Yixue.* 2009;18(11):1633-1634.  
宋宁宁,牛扶幼,王喜梅,等. ILK,PI3K,PTEN 蛋白在病理性瘢痕中的表达[J].中国美容医学,2009,18(11):1633-1634.

[5] Liu JY, Li SR. *Zhongguo Meirong Yixue.* 2008;17(3):395-397.  
刘剑毅,李世荣. PI3K/AKT信号通路在CTGF促增生性瘢痕成纤维细胞转分化中的作用[J].中国美容医学,2008,17(3):395-397.

[6] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.

[7] Shimizu M, Saitohy, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol.* 1990;21(6):607-612.

[8] Heitman J, Mowa NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991;253(5022): 905-909.

[9] Guan SY, Zhang SQ, Li QL, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(24):4738-4741.  
关尚一,张少生,李秋利,等.mTOR/p70s6k通路运动诱导的肌肉蛋白质合成[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(24):4738-4741.

[10] Ji J, Gu TT, Zheng PS. Xi'an Jiaotong Daxue Xuebao (Yi Xue Ban). 2010;31(1):10-13.  
冀静,顾婷婷,郑鹏生.mTOR/p70S6K信号通路在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J].西安交通大学学报(医学版),2010,31(1):10-13.

[11] Li LH, Qu Y, Mao M, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi.* 2008;22(9):1102-1107.  
李丽华,屈艺,毛萌,等.新生鼠缺血缺氧性脑损伤时三磷酸肌醇激酶信号通路及缺氧诱导因子1 $\alpha$ 的调节[J].中国修复重建外科杂志,2008,22(9):1102-1107.

[12] Li XM, Yang ZC, Chen CY, et al. *Xiandai Yufang Yixue.* 2008;35(18): 3582-3584.  
李小明,杨作成,陈淳媛,等.mTOR/p70S6K信号通路及NIH3T3成纤维细胞增殖[J].现代预防医学,2008,35(18):3582-3584.

[13] Pan H, Guo SZ. *Zhongguo Meirong Yixue.* 2008;17(2):298-302.  
潘华,郭树忠.增生性瘢痕与瘢痕疙瘩的鉴别诊断研究进展[J].中国美容医学,2008,17(2):298-302.

[14] Zhang G, Luo SJ, Zuo YX, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(28):5523-5526.  
张刚,罗少军,左永祥,等.增生性瘢痕与瘢痕疙瘩DNA 拷贝数变化的差异分析[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(28):5523-5526.

[15] Zou L, Zhang JX, Li DD. *Shandong Yiyao.* 2009;49(14):75-76.  
邹玲,张菊新,李丹丹.良恶性子宫内膜病变组织中p-mTOR及p-P70S6K的表达及意义[J].山东医药,2009,49(14):75-76.

[16] Garcia-Maceira P, Mateo J. Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signalling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy. *Oncogene.* 2009;28(3):313-324.

[17] Hou G, Xue L, Lu Z, et al. An activated mTOR/p70S6K signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR. *Cancer Lett.* 2007;253(2):236-248.

来自本文课题的更多信息--

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 实验通过对 p-mTOR 和 p-P70S6K 在病理性瘢痕中表达的检测, mTOR/p70S6K 信号通路在病理性瘢痕中异常激活, 同时 mTOR 和 p70S6K 表达呈正相关, 具有创新意义。

**设计或课题的倚倚与不足:** 如正常 5 岁儿童皮肤与 45 岁成人皮肤的细胞增殖相关基因的表达本身就存在差异, 会影响结果。③病理性瘢痕组病程跨度太大, 如增殖期 (6 个月) 与瘢痕稳定后增生性瘢痕成纤维细胞增殖相关基因的表达多不同, 而该论文中跨度达 12 年。今后实验将不断完善。

**提供临床借鉴的价值:** 根据本文结果, 更深入的探讨 mTOR/p70S6K 信号通路与病理性瘢痕的关系, 可能对病理性瘢痕的发生机制研究及临床防治有着积极的意义。

CRTER 杂志组织构建栏目关于“反转录腺病毒载体构建”研究的组稿内容

- 新型骨形态发生蛋白2反转录病毒载体的构建及活性检测
- 反转录病毒载体介导转化生长因子 $\beta$ 1基因体外转染兔膝关节软骨细胞的表达
- Wnt7b重组反转录病毒载体的构建及其在C3H10T1/2中的表达
- 构建人csp-B核基质结合区克隆及其介导的反转录载体
- 人端粒酶反转录酶和绿色荧光蛋白融合基因慢病毒表达载体的构建
- 半定量反转录-聚合酶链反应分析大鼠不同组织肌肉生长抑制素基因的表达
- $\beta$ -分泌酶底物肽反转录病毒载体及其包装细胞株的构建
- 牛sox2基因的克隆及重组反转录病毒载体的构建
- 反转录病毒载体介导猪MHC II分子在猪骨髓细胞中的表达
- 反转录病毒载体G\_1NaCIX的构建及其在离体细胞中的表达
- PRS载体介导的表达CTGF-SiRNA反转录病毒载体的构建
- PRS-CTGF-SiRNA反转录病毒载体及包装细胞株的构建
- 重组反转录病毒载体携带乙型肝炎病毒载体的构建与表达
- 组织特异性启动子SM22 $\alpha$ 反转录病毒载体的构建和效率
- HSV-tk和H60基因重组反转录病毒载体的构建及鉴定
- 携带同源盒基因HOXA9的反转录病毒载体的构建和鉴定
- 淫羊藿苷经NF- $\kappa$ B信号通路干预大鼠免疫衰老的作用及机制
- CHO细胞MAR片段的克隆及其反转录载体的构建