

肿瘤侵犯相关蛋白自分泌运动因子在瘢痕疙瘩中的表达**

张军波, 牙祖蒙

Expression of autocrine motility factor in keloid

Zhang Jun-bo, Ya Zu-meng

Abstract

BACKGROUND: Autocrine motility factor (AMF) exhibits an improved expression in tumor cells, and it can enhance cell growth, invasion and metastasis. But keloid has biological characteristics of malignant tumor.

OBJECTIVE: To know about the expression of AMF in keloid, hypertrophic scar and normal scar tissues.

METHODS: Each 20 cases of keloid, hypertrophic scar and normal scar were studied, and three kinds of scar tissues were selected. The distribution and relative expression of AMF in the three kinds of scar tissues were assessed by immunofluorescence. Protein and mRNA level of AMF in scar tissues were analyzed by western blot and real-time PCR methods.

RESULTS AND CONCLUSION: In tissue, protein and mRNA levels, normal scar and hypertrophic scar tissues showed low expression of AMF. In distribution and relative expression, there was no significant difference between the normal scar and hypertrophic scar tissues. However, the keloid tissues showed significantly higher expression of AMF than normal scar and hypertrophic scar tissues in the three levels ($P < 0.01$). These findings suggest that AMF is highly related to tumor biological characteristics of keloid.

Zhang JB, Ya ZM. Expression of autocrine motility factor in keloid. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(20): 3663-3666. [http://www.crtcr.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 肿瘤侵犯相关蛋白自分泌运动因子在肿瘤细胞中表达量增高, 并可增强肿瘤细胞的生长、侵犯和转移能力, 而瘢痕疙瘩具有恶性肿瘤生物学特性。

目的: 了解肿瘤侵犯相关蛋白自分泌运动因子在人体瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、生理性瘢痕组织中的表达情况。

方法: 生理性瘢痕、增生性瘢痕、瘢痕疙瘩患者各 20 例, 切取 3 种瘢痕组织; 用组织免疫荧光染色法观测 3 种瘢痕组织中自分泌运动因子的分布及相对表达量; 用蛋白质免疫印迹法和荧光定量 PCR 检测 3 种瘢痕组织中的自分泌运动因子蛋白水平和基因水平的表达。

结果与结论: 在组织水平、蛋白水平、基因水平上, 生理性瘢痕和增生性瘢痕组织中自分泌运动因子的表达较低, 且二者分布及相对表达量差异无显著性意义, 而瘢痕疙瘩组织中, 自分泌运动因子在 3 个水平上的表达强度明显增高, 与前者比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。结果提示自分泌运动因子与瘢痕疙瘩的肿瘤生物学特征有着密切的关系。

关键词: 肿瘤侵犯相关蛋白; 瘢痕疙瘩; 自分泌运动因子; 蛋白质免疫印迹法; 荧光定量 PCR

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.20.012

缩略语: AMF: autocrine motility factor, 自分泌运动因子

张军波, 牙祖蒙. 肿瘤侵犯相关蛋白自分泌运动因子在瘢痕疙瘩中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3663-3666. [http://www.crtcr.org http://cn.zglckf.com]

Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Zhang Jun-bo★, Studying for master's degree, Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
zhangjunbo0924@163.com

Corresponding author: Ya Zu-meng, Doctor, Professor, Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
yazumeng@163.com

Supported by: General Program of the National Natural Science Foundation of China, No. 81071596*

Received: 2011-12-30
Accepted: 2012-03-04

0 引言

瘢痕疙瘩是常见的病理性瘢痕, 一经发生会引起局部外观的严重毁损和功能障碍。由于发病机制不清, 因而治疗效果不理想。研究表明瘢痕疙瘩具有明显的恶性肿瘤生物学特征^[1-2], 因此, 从肿瘤学的角度去研究瘢痕疙瘩有望获得关键性突破。自分泌运动因子 (autocrine motility factor, AMF) 是一种由肿瘤细胞产生和分泌的细胞因子, 在恶性肿瘤细胞中呈过度表达^[3-5], 具有增强肿瘤细胞增殖、抗凋亡、活动、侵犯和转移的能力^[6-7], 同时能提高肿瘤组织的血管化。这些生物效应与瘢痕疙瘩的生物学特征极其吻合, 提示AMF在瘢痕疙瘩

的发病机制中可能起着重要甚至于关键性的作用。研究自分泌运动因子在瘢痕疙瘩发病机制中的作用是一项有意义的探索, 但目前国内外均未见相关报道。本文通过检测人瘢痕疙瘩组织中AMF的表达情况, 以初步了解AMF在瘢痕疙瘩形成机制中的作用。

1 材料和方法

设计: 组织学对照实验。

时间及地点: 实验于2010-09/2011-08在重庆医科大学生命科学院完成。

材料: 瘢痕组织来源于重庆医科大学附属第一医院和附属第二医院整形美容科60例患者, 生理性瘢痕组织、增生性瘢痕组织、瘢痕

重庆医科大学附属第二医院整形美容科, 重庆市400010

张军波★, 男, 1985年生, 重庆市人, 汉族, 重庆医科大学在读硕士。
zhangjunbo0924@163.com

通讯作者: 牙祖豪, 博士, 教授, 重庆医科大学附属第二医院整形美容科, 重庆市400010
yazumeng@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)20-03663-04

收稿日期: 2011-12-30
修回日期: 2012-03-04
(20111230007/M·T)

疙瘩组织各20例。男30例, 女30例, 患者年龄最大45岁, 最小18岁, 中位年龄31岁。

诊断标准: 生理性瘢痕为距上次创伤3年以上的稳定瘢痕, 增生性瘢痕为创伤后显著增生, 但生长范围局限, 无浸润性生长; 瘢痕疙瘩为创伤后显著增生, 呈浸润性生长, 有瘙痒等自觉症状并在手术后复发。将切除的瘢痕组织分块后立即放入液氮中保存备用。

方法:

组织免疫荧光染色: 将组织从液氮中取出, 立即冰冻切片, 厚度10 μm , 切片风干, 丙酮固定30 min, 然后放入PBS中洗涤3 min取出。滴加体积分数为10%山羊血清室温下封闭30 min, 去除多余血清, 滴加鼠抗人AMF单克隆抗体(购自美国Abcam公司, 货号: ab66340), 稀释比例为1:100, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS洗10 min $\times$ 3次。滴加二抗, 二抗为FITC荧光素标记的羊抗鼠多克隆IgG抗体(购自美国Abcam公司, 货号: ab6785), 稀释比例为1:200, 避光湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBS溶液洗5 min $\times$ 3次。50%甘油封固, 荧光显微镜下观察并摄片。由已知阳性切片作阳性对照, 以PBS替代第一抗体作阴性对照。

Western Blot测定3种瘢痕组织中AMF在蛋白水平的表达量: 提取组织中的总蛋白, 测定浓度, 加入上样buffer煮沸5 min, 配胶、上样、电泳, 转膜、封闭。鼠抗人AMF单克隆抗体(同免疫荧光一抗)稀释比例为1:2 000, 鼠抗人GAPDH多克隆抗体(购自中国上海碧云天生物技术有限公司, 货号: AG019)稀释比例为1:2 000, 均4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗10 min $\times$ 3次。HRP标记的兔抗鼠多克隆IgG二抗(购自美国Abcam公司, 货号: ab6728)稀释比例为1:5 000, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, TBST洗10 min $\times$ 3次。滴加ECL化学发光试剂, 显影、摄片。

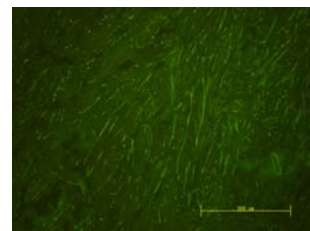
荧光定量PCR测定3种瘢痕组织中AMF在mRNA水平的表达量: 从液氮中取出组织, 按总RNA抽提试剂盒(购自日本TaKaRa公司, 货号: D9108A)操作说明抽提总RNA; 用分光光度计测定总RNA浓度; 按照反转录试剂盒(购自日本TaKaRa公司, 货号: DRR047S)操作说明进行总RNA的反转录, 反转录的cDNA于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。AMF和GAPDH的PCR引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成, AMF引物: 5'-gcg tct ggt atg tct cca aca-3'和5'-tgg tct cct ggg tag taa agg tc-3'; GAPDH引物: 5'-ctt tgg tat cgt gga agg act c-3'和5'-gta gag gca ggg atg

atg ttc t-3'。按照荧光定量PCR试剂盒(购自日本TaKaRa公司, 货号: DRR820A)操作说明进行加样。上样、编板, PCR反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s, 40个循环, 最后65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。以生理性瘢痕中AMF的表达量为参照, 所得结果为3种瘢痕组织中AMF在mRNA水平的相对表达量。

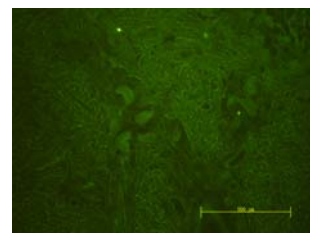
统计学分析: 运用SPSS 13.0 for windows统计软件包对实验数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行两样本均数的 t 检验和方差分析。

2 结果

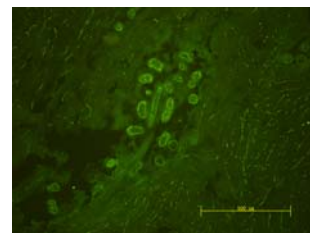
2.1 组织免疫荧光染色结果 阴性结果显示未着色, 阳性结果可见3种瘢痕组织从表皮到真皮各层细胞广泛着色, 表皮层主要位于各细胞的胞浆内, 真皮层则沿胶原纤维广泛分布。生理性瘢痕和增生性瘢痕组织着色很弱, 呈弱阳性, 而瘢痕疙瘩组织着色明显强于前两者, 呈强阳性, 见图1。



a: Normal scar



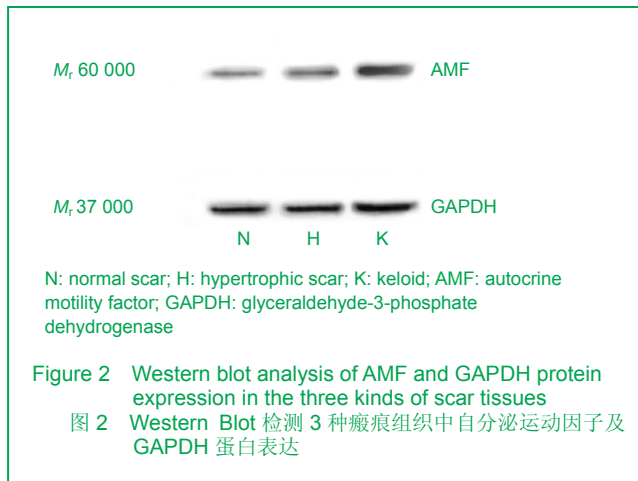
b: Hypertrophic scar



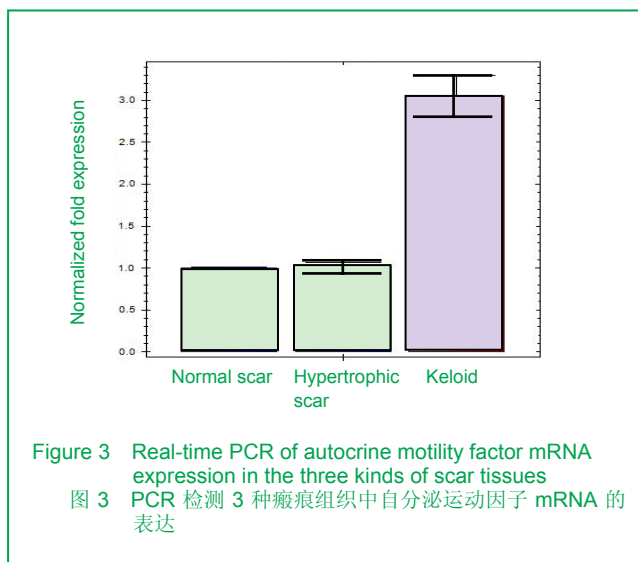
c: Keloid

Figure 1 The distribution and relative expression of autocrine motility factor in the three kinds of scar tissues (Immunofluorescence, $\times 400$)
图1 自分泌运动因子在3种瘢痕组织中的分布及相对表达量(IF, $\times 400$)

2.2 Western Blot检测结果 可见在蛋白水平上, 3种瘢痕组织中均有AMF表达, 但在生理性瘢痕和增生性瘢痕组织中表达较低, 且二者差异无显著性意义($P > 0.05$)。瘢痕疙瘩组织呈高水平表达, 与生理性瘢痕及增生性瘢痕比较, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 见图2。



2.3 荧光定量PCR检测结果 以生理性瘢痕组织中AMF在mRNA水平的表达量为参照, 增生性瘢痕与其相比差异无显著性意义($P > 0.05$); 而瘢痕疙瘩则显著增高($P < 0.01$), 见图3。



3 讨论

AMF最初是由人黑色素瘤细胞株A2058血清培养基中分离、纯化出的一种由肿瘤细胞产生和分泌的细胞因子, 后来发现该因子在正常细胞和肿瘤细胞均有表达, 但在肿瘤细胞中呈过度表达, 其相对分子质量为60 000; 其受体AMFR为一种细胞表面糖蛋白, 相对分子质量为78 000^[3, 8-9]。当AMF和AMFR发生特异性

结合后, 具有增强肿瘤细胞的生长、侵犯和转移的能力^[6-7, 10]。

浸润性生长是瘢痕疙瘩最显著的恶性肿瘤特征之一, 这是由于成纤维细胞增殖、迁移和侵袭能力增强的结果; 而AMF能显著提高肿瘤细胞和NIH-3T3成纤维细胞的增殖、活动迁移及侵袭能力^[6-12]。其机制如下: AMF经其受体AMFR介导, 激发Rho-GTPase家族中RhoA和Rac1的活性, 而该家族中下游信号蛋白JNK1和JNK2的活性也因此上调, 从而影响细胞的增殖、分泌等过程, 并导致细胞骨架重排, 进而增加细胞的迁移性^[6-7, 9]; AMF还能通过激活12-lipoxygenase(12-脂氧化酶, 12-LOX)-PKC通路使细胞膜整合素发生转位, 进而增强细胞的黏附, 扩散和侵犯能力^[9-10, 13-14]。

瘢痕疙瘩另一个显著的特征是具有明显的血管化, 组织血管密度高, 毛细血管很丰富, 这也与恶性肿瘤相似。Funasaka等^[15]的研究发现, 肿瘤细胞表达的AMF能促进酪氨酸激酶Flt-1(一种血管内皮生长因子受体)的表达, 后者与血管内皮生长因子受体结合促进血管内皮细胞的增殖, 从而催生血管形成。Salem等^[16-17]的研究表明丰富的血供为瘢痕疙瘩的生长提供物质基础, 是瘢痕疙瘩发病机制的一个重要环节。

另外, 瘢痕疙瘩的成纤维细胞抗凋亡能力明显强于有自限性瘢痕的成纤维细胞, 因此, 呈现无限性生长的特性^[1-2, 18]。而AMF的一个显著生物学效应就是增强细胞的抗凋亡性能^[3, 7]。

可见, 瘢痕疙瘩的生物学特性与AMF的生物学效应极其吻合。这种吻合让作者思考: AMF与瘢痕疙瘩有何关联? 在其发病机制中扮演怎样的角色? 通过何种机制发挥作用? 本实验结果显示, 在组织水平、蛋白水平以及基因水平上, AMF在瘢痕疙瘩组织的表达水平均显著高于生理性瘢痕和增生性瘢痕, 说明AMF与瘢痕疙瘩有着密切的关系。这一研究结果的意义在于: ①有助于瘢痕疙瘩发病机制的深入了解。可以推断, 高水平表达的AMF可能通过特异性受体介导, 使瘢痕疙瘩中成纤维细胞的迁移、抗凋亡能力增强, 从而呈现浸润性、无自限性生长的特征。同时通过血管化效应, 促进瘢痕疙瘩组织内毛细血管增生, 呈现血管密度增高和充血特征, 为成纤维细胞的无限性生长提供物质基础。②有助于增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的鉴别诊断。目前两者的鉴别诊断主要靠临床表现差异加以区分, 在组织病理学上, 二者并无显著性或特异性的差别。可以认为, AMF的高水平表达是瘢痕疙瘩组织细胞区别于增生性瘢痕的一个特性, 为两者的鉴别诊断添加了一个新的有特异性的指标。③阻断AMF的生物学作用可能会提高瘢痕疙瘩的治疗质量。AMF在瘢痕疙瘩发病机制中如何发挥作用? 二者之间有着何种密切关系? 仍在进一步观察研究。

4 参考文献

- [1] Wolfram D, Tzankov A, Püzl P, et al. Hypertrophic scars and keloids—a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg.* 2009;35(2):171-181.
- [2] Butler PD, Longaker MT, Yang GP. Current progress in keloid research and treatment. *J Am Coll Surg.* 2008;206(4):731-741.
- [3] Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, et al. Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(4):749-759.
- [4] Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, et al. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. *Cancer Res.* 2010;70(22):9483-9493.
- [5] Fairbank M, St-Pierre P, Nabi IR. The complex biology of autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and its receptor, the gp78/AMFR E3 ubiquitin ligase. *Mol Biosyst.* 2009;5(8):793-801.
- [6] Tsutsumi S, Gupta SK, Hogan V, et al. Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling. *Cancer Res.* 2002;62(15):4484-4490.
- [7] Tsutsumi S, Hogan V, Nabi IR, et al. Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts. *Cancer Res.* 2003;63(1):242-249.
- [8] Yang Y, Cheng XR, Zhang GR, et al. Autocrine motility factor receptor is involved in the process of learning and memory in the central nervous system. *Behav Brain Res.* 2012;229(2):412-418.
- [9] Timar J, Trikha M, Szekeres K, et al. Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* 1996;56(8):1902-1908.
- [10] Chiu CG, St-Pierre P, Nabi IR, et al. Autocrine motility factor receptor: a clinical review. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8(2):207-217.
- [11] Funasaka T, Haga A, Raz A, et al. Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(1):118-128.
- [12] Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, et al. Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor activities by the poly(ADP-ribose) polymerase family-14. *Cancer Res.* 2007;67(18):8682-8689.
- [13] Araki K, Shimura T, Yajima T, et al. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor promotes melanoma cell migration through ERK activation dependent on autocrine production of interleukin-8. *J Biol Chem.* 2009;284(47):32305-32311.

- [14] Wang L, Hou G, Xue L, et al. Autocrine motility factor receptor signaling pathway promotes cell invasion via activation of ROCK-2 in esophageal squamous cell cancer cells. *Cancer Invest.* 2010;28(10):993-1003.
- [15] Funasaka T, Haga A, Raz A, et al. Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells. *Int J Cancer.* 2002;101(3):217-223.
- [16] Salem A, Assaf M, Helmy A, et al. Role of vascular endothelial growth factor in keloids: a clinicopathologic study. *Int J Dermatol.* 2009;48(10):1071-1077.
- [17] Wu WS, Wang FS, Yang KD, et al. Dexamethasone induction of keloid regression through effective suppression of VEGF expression and keloid fibroblast proliferation. *J Invest Dermatol.* 2006;126(6):1264-1271.
- [18] Robles DT, Moore E, Draznin M, et al. Keloids: pathophysiology and management. *Dermatol Online J.* 2007;13(3):9.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金面上项目(81071596)。

作者贡献: 由全体作者共同参与课题的设计、实施与评估, 并对文章负责。

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。

伦理要求: 患病个体完全知情同意将自己的组织标本用于本研究, 实验经重庆医科大学伦理委员会批准。

文章要点: 瘢痕疙瘩具有恶性肿瘤生物学特性, 自分泌运动因子具有增强肿瘤细胞的生长、侵犯和转移能力, 结合已有的文献报道, 作者推断自分泌运动因子在瘢痕疙瘩中的表达也有增高, 其与瘢痕疙瘩的肿瘤生物学特征有密切关系。

Mesh 词表词汇实用例句: “培养技术-Culture Techniques”

例句: The experiments proved upside cells all sensitive to the Dengue viruses and the Aedes albopictus C6/36 cell is the best. With the development of new colony cells culture, the tissue culture techniques of Dengue virus become more and more important.

译文: 实验结果证明白纹伊蚊 C6/36 细胞、Ap 61 细胞、LLC MK2 细胞、Vero 细胞、BHK 2 1/3 1 细胞均为登革病毒敏感细胞, 其中白纹伊蚊 C6/36 细胞敏感性较高。随着新的克隆细胞株的体外培养技术的成熟, 组织培养已成为登革病毒分离、鉴定的毒力测定中必不可少的一种常规实验技术。

例句: Animal cell culture techniques played an important role in the studies of the structure and function of cells, and tissue differentiation and formation.

译文: 动物细胞培养技术为研究细胞的形态、结构、功能与遗传特性, 揭示细胞分裂、组织分化、器官组织形成等生命科学领域的基本问题

题发挥了巨大作用。

例句: In this paper, Populus davidiana Dode was used as experimental material. We established regenerative system by means of

材料, 利用植物组织培养技术建立快繁再生系统。

英文主题词	Culture Techniques
英文注释	Methods of maintaining or growing biological materials in controlled laboratory conditions. These include the cultures of CELLS; TISSUES; organs; or EMBRYO in vitro. Both animal and plant tissues may be cultured by a variety of methods. Cultures may derive from normal or abnormal tissues, and consist of a single cell type or mixed cell types.
中文主题词	培养技术
中文注释	在受控实验室条件下维持或培育生物学材料的方法。包括细胞、组织、器官或胚胎的体外培养。动物和植物组织可能通过多种方法培养。培养物来源于正常或异常组织并由单细胞型或混合细胞型组成。

plant tissue culture techniques.

译文: 以山杨(Populus davidiana Dode)为实验