

皮肤黑色素瘤细胞中 TGF- β R I 型和 II 型受体表达的研究*

郁博¹,张斌²,苏磊¹,潘敏¹,陈宏泉^{1△}

(1. 青岛大学附属医院皮肤科, 山东青岛 266003; 2. 第三军医大学新桥医院皮肤科, 重庆 400037)

[摘要] 目的 探讨转化生长因子 β 受体(TGF- β R) I、II型在皮肤黑色素瘤细胞中的表达情况。方法 应用反转录-实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)方法,对 TGF- β R I、II型的 mRNA 及其蛋白在人皮肤黑色素瘤 A375 细胞和人正常黑素细胞中的表达进行检测。结果 A375 细胞中 TGF- β R I、II型的 mRNA 和蛋白表达均显著低于正常人黑素细胞。结论 在黑色素瘤细胞的 TGF- β /Smad 信号通路中出现 TGF- β R 表达的下调,可能是皮肤黑色素瘤发病机制之一。

[关键词] 黑色素瘤;受体,转化生长因子 β ;黑素细胞

[中图分类号] R332 R322.61

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)11-1460-03

Research of expression of TGF- β receptor I /TGF- β receptor II in skin malignant melanoma cells*

Yu Bo¹, Zhang Bin², Su Lei¹, Pan Min¹, Chen Hongquan^{1△}

(1. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China;

2. Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of TGF- β receptor I /TGF- β receptor II (TGF- β I /TGF- β II) in human skin malignant melanoma A375 cell line. **Methods** The reverse transcription-real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were utilized to assess the expressions of TGF- β I /TGF- β II in A375 cell line and human normal melanocytes. **Results** The expressions of TGF- β I /TGF- β II mRNA and protein of A375 cells line were significantly lower than those of human normal melanocytes. **Conclusion** The down-regulated expression of TGF- β R in the TGF- β /Smad signal pathway of human skin malignant melanoma may be one of the pathogenesis of skin malignant melanoma.

[Key words] melanoma; receptors, transforming growth factor beta; melanocytes

在皮肤肿瘤的致死率排名中,皮肤黑色素瘤一直高居首位。过去的 50 年间,其发病率增加超出 6 倍,黑色素瘤一旦发生转移,则预后极差,总体 5 年生存率小于 5%,中位生存期为 6~10 个月。其病理变化表现为黑素细胞失控性增殖。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一种具有多项生物学作用的细胞因子。它广泛存在于体内,对大多数上皮细胞具有生长抑制作用。TGF- β 通过其受体(TGF- β R)来发挥重要生物学作用。有研究显示,在眼葡萄膜黑色素瘤组织中存在 TGF- β R 的表达异常^[1-2],提示 TGF- β 信号转导途径的改变与黑色素瘤的发生和发展有较为密切的关系。在人黑色素瘤组织中是否存在 TGF- β R 的表达异常?本实验以体外培养的人恶性黑色素瘤 A375 细胞为研究对象,采用反转录-实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)方法对其 TGF- β R I、II 的 mRNA 及其蛋白在人皮肤黑色素瘤 A375 细胞和人正常黑素细胞中的表达分别进行检测,现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 (1)细胞:人黑色素瘤细胞 A375 细胞系(以下简称 A375 细胞)购自中国科学院上海细胞生物研究所。(2)主要试剂及仪器:DMEM 培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公

司,PrimeScriptTM RT Reagent Kit 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex TaqTM购自日本 TaKaRa Bio 株式会社,抗 TGF- β R I、II 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,Chemi ImagerTM5500 型凝胶成像分析仪购自美国 Alpha Innotech 公司,7500 Real Time 荧光定量 PCR 反应扩增仪购自美国 Applied Biosystems 公司,半干电转仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人皮肤黑素细胞提取参照文献[3]取健康成年人包皮(取自包皮环切术患者)进行消化、分离提取。黑素细胞、A375 细胞培养条件为:5% CO₂ 孵箱 37 °C 饱和湿度环境下孵育,含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,每 2 天更换 1 次培养液。

1.2.2 RT-PCR 检测 细胞总 RNA 提取参照 Trizol(Invitrogen 公司)说明书操作步骤进行,并对所抽提的细胞总 RNA 质量进行验证。引物设计根据荧光定量 PCR 引物设计原则^[4]。TGF- β R I 引物:上游为 5'-GCA GTA AGA CAT GAT TCA GCC ACA G-3',下游为 5'-CAA TGG AAC ATC GTC GAG CAA-3',扩增片段为 190 bp;TGF- β R II 引物,上游为 5'-TCG TCC TGT GGA CGC GTA TC-3',下游为 5'-GAA ACT TGA CTG CAC CGT TGT TG-3',扩增片段为 102 bp;内参校准基

* 基金项目:山东省科技发展计划资助项目(2011YD18012);山东省自然科学基金资助项目(ZR2010HM022);山东省中医药科技资助项目(2011-199)。作者简介:郁博(1976-),副主任医师,博士后,主要从事黑色素瘤发病机制与 TGF- β /Smad 信号通路的研究工作。△ 通讯作者, Tel: (0532)82911215; E-mail: chhq6198@163.com。

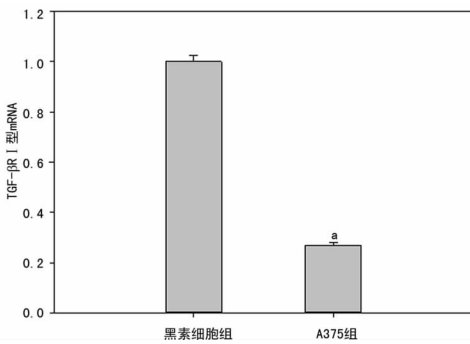
因 GAPDH 引物:上游为 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3',下游为 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3',扩增片段:142 bp。反转录合成 cDNA:根据 RT Reagent Kit 反转录试剂盒说明书,温度设定为 42 °C 15 min,然后 95 °C 2 min使反转录酶失活,所得 cDNA 产物保存备用于-20 °C 冰箱中。RT-PCR 反应:50 μL 反应体系内含模板 cDNA 200 ng,扩增条件为 95 °C 预变性 10 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,共 40 个循环。分别设置融解曲线检测自 65~95 °C 的融解温度,以验证产物的特异性。

1.2.3 Western blot 检测 参照文献[5]常规进行。分别取 A375 细胞(A375 组)和正常黑素细胞(黑素细胞组)的总蛋白 40 μg,上样至 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳后,电转到 PVDF 膜上,再用 5% 的脱脂奶粉室温下封闭 60 min,TBS 洗膜,分别加入用 0.5% 的 BSA 稀释的一抗(工作浓度为 1:200),4 °C 孵育过夜后,TBS 洗膜,加入辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗(1:1000)孵育 1 h,TBST(TBS+0.1% Tween20)洗膜。此后按 DAB 显色试剂盒说明书操作显色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。RT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析^[4]: $\Delta CT_{TGF-\beta R I \text{ or } II} = CT_{TGF-\beta R I \text{ or } II} - CT_{GAPDH}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT(A375 \text{ 组}) - \Delta CT(\text{黑素细胞组})$,差别倍数= $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。Chemi ImagerTM5500 型凝胶成像分析仪对 Western blot 显色结果摄影,内参照为 β-actin。TGF-βR I、II 型蛋白的相对表达量以 TGF-βR I、II 型分布与 β-actin 条带的光密度比值(以 $\bar{x} \pm s$ 表示)代表。对两组数据进行 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

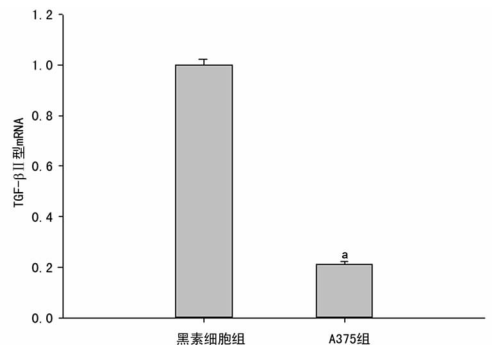
2.1 细胞中 TGF-βR I、II 型 mRNA 的表达检测 与 A375 组(设为 100%)相比,黑素细胞组 TGF-βR I、II 型 mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 2.126 ± 0.130 、 4.282 ± 0.226 。黑素细胞组的 TGF-βR I、II 型 mRNA 表达量分别是 A375 细胞的(2.126 ± 0.130)、(4.282 ± 0.226)倍,A375 组的 TGF-βR I、II 型 mRNA 表达水平显著低于黑素细胞组($P<0.05$),见图 1、2。



^a: $P<0.05$,与黑素细胞组比较。

图 1 两组细胞 TGF-βR I 型 mRNA 相对表达量比较

2.2 细胞中 TGF-βR I、II 型蛋白质的表达检测 黑素细胞组、A375 组 TGF-βR I 型蛋白质相对表达量分别为 0.669 ± 0.078 、 0.413 ± 0.067 ($t=2.654$, $P<0.05$)。黑素细胞组、A375 组 TGF-βR II 型蛋白质相对表达量分别为 0.831 ± 0.167 、 0.212 ± 0.056 ($t=5.668$, $P<0.01$)。A375 组中 TGF-βR I、TGF-βR II 蛋白质表达量明显低于黑素细胞组,见图 3。



^a: $P<0.05$,与黑素细胞组比较。

图 2 两组细胞 TGF-βR II 型 mRNA 相对表达量比较

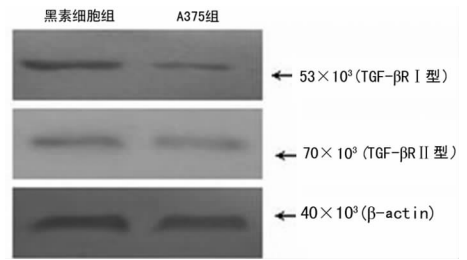


图 3 两组细胞 TGF-βR I、II 型蛋白质表达图

3 讨 论

TGF-β 是一种多功能蛋白,可以影响多种细胞的生长,分化、细胞凋亡及免疫调节等功能。TGF-β 包括 3 个亚型,TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3^[6-7]。TGF-β 可以与细胞表面的 TGF-βR 结合而激活其受体,从而启动了信号传导级联而导致多种生物化学变化。TGF-β 具有 I 型和 II 型两种跨膜信号传递受体,其受体内部含有丝氨酸/苏氨酸激酶活性。TGF-βR 在机体组织、细胞中广泛分布。皮肤作为人体组织的最大器官,是 TGF-β 发挥作用的重要靶器官。

对于多种肿瘤的形成与发展,TGF-β 可表现出截然相反的两种作用,在肿瘤发生的早期阶段表现抑制作用,而在肿瘤侵袭、转移及扩散的晚期阶段表现为促进及加剧的作用^[8-9]。通过细胞处于 G₁ 期以其保持在非增殖状态,从而对肿瘤细胞发挥抑制作用。这种抑制功能是通过 TGF-β/Smad 信号通路传导 TGF-βR 和多种 Smad 蛋白来发挥的^[10-11]。此外,激活某些重要的细胞周期关键基因会导致肿瘤细胞的生长抑制,也是因为这些关键基因是 TGF-β/Smad 信号通路的下游靶点^[11-13]。另外,在正常上皮细胞中几种促进细胞周期停滞的基因的表达,也能被 TGF-β 所调控。肿瘤细胞趋于丧失 TGF-β 对肿瘤抑制作用的反应能力,从而加速了肿瘤的发生与进展。通过加速肿瘤新生血管的形成、免疫逃逸/抑制、增进肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用来促进肿瘤的侵袭、扩散和转移,是 TGF-β 在促进肿瘤发生机制方面主要的作用^[14]。

目前研究发现在恶性黑色素瘤组织中 TGF-β/Smad 信号通路中的多种重要成分-TGF-β、TGF-βR 及部分 Smad 蛋白出现表达异常^[1-2],提示在黑色素瘤的发生和发展过程中,TGF-β/Smad 信号转导途径的多个环节的改变可能是其发病机制的重要原因之一。本研究通过比较体外培养的人黑色素瘤 A375 细胞及人正常黑素细胞中 TGF-βR I、II 型基因及蛋白质的表达,发现 A375 细胞的 TGF-βR I、II 型的表达均出现明显降

低。由于 TGF- β 信号是通过其受体-TGF- β R 来介导的, TGF- β R 的存在是 TGF- β /Smads 信号下传的必要条件, 如果 TGF- β R 表达水平降低或丧失, 则 TGF- β 信号传导受阻, 无法发挥 TGF- β 维持细胞内环境稳定性。在癌基因启动和抑癌基因功能丧失等多种相关因素的共同作用下, 黑色素瘤细胞自身出现 TGF- β 抑制作用缺失, 可导致黑色素瘤细胞的特征性病理改变, 出现异常黑色素细胞的失控性异常增殖及浸润、扩散。因此, 本实验为黑色素瘤细胞出现异常增殖的机制研究提供了一定的依据。

通过本实验研究, 说明 TGF- β R 表达水平的降低可能既存在于机体的黑色素瘤组织中, 也出现在体外培养的人黑色素瘤细胞株中。推测 TGF- β R 的异常表达可能参与了黑色素瘤的发生和发展过程中, 也或许为黑色素瘤细胞本身内在所固有的表现。因此在体外培养条件下, 人黑色素瘤 A375 细胞仍然持续表达此信号通路异常的特质。但机体黑色素瘤中 TGF- β R 表达降低的原因并不清楚, 是否可以推测: 黑色素瘤组织中存在多种促使或抑制黑素细胞生长、增殖、凋亡及分化的基因发生改变, 而 TGF- β R 表达的降低可能是其中原因之一。在多种促癌基因和抑癌基因异常调节的协同作用下, 异常黑素细胞出现失控性异常增殖。研究黑色素瘤细胞中的 TGF- β /Smad 信号转导的表达, 是为进一步深入系统了解黑色素瘤的发病机制奠定基础。

参考文献

- [1] 李鹏程, 张虹, 丁正平, 等. TGF- β R 和 Smad4 蛋白在葡萄膜黑色素瘤中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(1): 35-36.
- [2] 武犁, 邢怡桥, 李鹏程, 等. TGF- β 1/TGF- β R II 和 Smad4 在葡萄膜黑色素瘤中的表达[J]. 眼科新进展, 2005, 25(3): 240-241.
- [3] 徐前喜, 杜娟, 朱铁君, 等. 体外培养正常人黑素细胞 TGF- β 1 及其 I 型受体的表达[J]. 中国麻风皮肤病学杂志, 2006, 22(5): 353-355.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2 (-

Delta Delta C (T)). Methods[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

- [5] 郁博, 何威, 张斌, 等. 肿瘤坏死因子- α 对角质形成细胞株 HaCaT 细胞糖皮质激素受体表达的影响[J]. 临床皮肤科杂志, 2010, 39(5): 279-282.
- [6] Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A. Insights into the transforming growth factor- β signaling pathway in cutaneous melanoma[J]. Ann Dermatol, 2013, 25(2): 135-144.
- [7] Peng WM, Maintz L, Allam JP, et al. Attenuated TGF- β 1 responsiveness of dendritic cells and their precursors in atopic dermatitis[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(5): 1374-1382.
- [8] Oshimori N, Fuchs E. The harmonies played by TGF- β in stem cell biology[J]. Cell Stem Cell, 2012, 11(6): 751-764.
- [9] 朱冰, 张新定. TGF- β /Smads 信号转导通路与脑胶质瘤的研究进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(24): 2457-2459.
- [10] Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular pathways: targeting the TGF- β pathway for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(17): 4514-4521.
- [11] Lan HY, Chung AC. TGF- β /Smad signaling in kidney disease[J]. Semin Nephrol, 2012, 32(3): 236-243.
- [12] Zi Z, Chapnick DA, Liu X. Dynamics of TGF- β /Smad signaling[J]. FEBS Lett, 2012, 586(14): 1921-1928.
- [13] Hneino M, François A, Buard V, et al. The TGF- β /Smad repressor TG-interacting factor 1 (TGIF1) plays a role in radiation-induced intestinal injury independently of a Smad signaling pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35672.
- [14] Yamada Y, Mashima H, Sakai T, et al. Functional roles of TGF- β 1 in intestinal epithelial cells through Smad-dependent and non-Smad pathways[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(5): 1207-1217.

(收稿日期: 2014-07-11 修回日期: 2015-01-24)

(上接第 1459 页)

- [9] Yeom JS, Kim WJ, Choy WS, et al. Leakage of cement in percutaneous transpedicular vertebroplasty for painful osteoporotic compression fractures[J]. Bone Joint Surg Br, 2003, 85(1): 83-89.
- [10] 赵凤东, 范顺武, Patricia Dolan, 等. 腰椎终板骨折特点及相关因素的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(16): 1132-1135.
- [11] Klazen CA, Venmans A, de Vries J, et al. Percutaneous vertebroplasty is not a risk factor for new osteoporotic compression fractures; results from vertos II [J]. Neuro-radiol, 2010, 31(20): 1447-1450.
- [12] Lin WC, Cheng TT, Lee YC, et al. New vertebral osteo-

porotic compression fractures after percutaneous vertebroplasty; retrospective analysis of risk factors[J]. Vasc Interv Radiol, 2008, 19(8): 225-231.

- [13] Al-Ali F, Barrow T, Luke K. Vertebroplasty: what is important and what is not[J]. Neuroradiol, 2009, 30(14): 1835-1839.
- [14] Tseng YY, Yang TC, Tu PH, et al. Repeated and multiple new vertebral compression fractures after percutaneous transpedicular vertebroplasty[J]. Spine, 2009, 34(19): 1917-1922.

(收稿日期: 2014-11-10 修回日期: 2015-01-28)