

皮肤型红斑狼疮皮损中鳞状细胞癌抗原 1 的表达和意义

方 圣,单 葵,周 汛,陈爱军*,李 惠

(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

[摘要] 目的:研究鳞状细胞癌抗原 1(squamous cell carcinoma antigen-1,SCCA1)在皮肤型红斑狼疮(cutaneous lupus erythematosus,CLE)皮损中的表达和意义。方法:培养原代角质形成细胞,提取蛋白样品采用固相 pH 梯度双向凝胶电泳进行分离,应用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件对图像进行匹配分析,选取差异表达个蛋白质点,经基质辅助激光解吸附飞行时间质谱进行质谱鉴定。并通过免疫印迹验证其表达水平。结果:体外培养角质形成细胞成功,获得重复性较好的双向电泳图谱,和正常皮肤相比,SCCA1 在 CLE 皮损角质形成细胞中表达升高,免疫印迹验证与双向电泳结果一致。结论:SCCA1 在 CLE 皮损角质形成细胞中表达升高,可能与 CLE 的发生发展有关,但 SCCA1 表达升高的具体机制仍需进一步研究。

[关键词] 皮肤型;红斑狼疮;鳞状细胞癌抗原 1;角质形成细胞;蛋白组

[中图分类号] R593.24

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-204-04

The expression and significance of squamous cell carcinoma antigen-1 in cutaneous lupus erythematosus

FANG Sheng, SHAN Kui, ZHOU Xun, CHEN Ai-jun*, LI Hui

(Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical university, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression and significance of squamous cell carcinoma antigen-1 (SCCA1) in keratinocytes from the lesion of cutaneous lupus erythematosus. **Methods:** The keratinocytes were isolated from the human skin and cultured in serum-free media. The total proteins of keratinocytes were separated by 2-dimensional gel electrophoresis. The differential proteins were analyzed using ImageMaster 2D analysis software after staining and identified by MALDI-TOF-MS. The expressional levels of the proteins were further confirmed by Western blot analysis. **Results:** We successfully in vitro cultured human skin primary keratinocytes and established 2-dimensional electrophoresis profiles with high resolution and reproducibility. The SCCA1 protein was up-regulated in the keratinocytes from lesion of CLE compared to the normal group, and the result from both proteomics approach agreed with that of Western blot analysis. **Conclusion:** The SCCA1 protein was up-regulated in the keratinocytes from lesion of CLE, which may be related to the development of CLE. However, the pathogenesis of over expression of SCCA1 need further study.

[Key words] cutaneous; lupus erythematosus; squamous cell carcinoma antigen-1; keratinocyte; proteomics

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 204-207]

鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen,SCCA)是 Kato 等^[1]1977 年首次从宫颈鳞状细胞癌中分离的相关抗原 TA-4 的亚单位,属于丝氨酸蛋白酶抑制物家族成员。SCCA 表达和肿瘤的恶性程度密切相关。最近多项研究提示鳞状细胞癌抗原 1 (squamous cell carcinoma antigen-1,SCCA1)在

角质形成细胞功能和分化中有重要作用,在部分良性皮肤病中表达异常^[2-3]。本研究应用蛋白质组学技术对皮肤型红斑狼疮(cutaneous lupus erythematosus,CLE)皮损进行双向凝胶电泳分离,并采用 ImagingMaster 2D 软件对图像进行系统分析,鉴定 SCCA1 在 CLE 皮损中的表达情况,并通过免疫印迹进一步验证表达,以阐明 CLE 的发病机制,为疾病治疗等提供线索。

[基金项目] 重庆市自然科学基金(cstc2011JJA10039)

*通讯作者, E-mail: cajhx@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本

皮肤组织均来自重庆医科大学附属第一医院皮肤科门诊 CLE 临床确诊患者,皮肤损害的组织病理、免疫荧光观察证实是 CLE 皮肤损害,病史在 6 个月以上,无其他免疫性疾病及全身性疾病。排除标准:排除有肝炎、结核、肺炎、肾功能衰竭、癌症的患者。近 2 个月内未服用影响免疫、结缔组织代谢药物。收集患者共 8 例,男 2 例,女 6 例,年龄 19~44 岁;其中亚急性皮肤型红斑狼疮 3 例,盘状红斑狼疮 4 例,急性皮肤型红斑狼疮 1 例。选择患者自身正常皮肤组织作为实验对照组。本研究获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准,参加人员获知情同意。

1.1.2 主要试剂和设备

胰酶、角质细胞无血清培养基、PBS、Dispase II (美国 Gibco 公司);蛋白质定量试剂盒、IPG 胶条、尿素、CHAPS、SDS、Tris、丙烯酰胺、TMED、过硫酸铵、三氟乙酸甘油、甘氨酸、溴酚蓝、琼脂糖、考马斯亮蓝 R-250 (瑞典 Amersham Biosciences 公司);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL Western blot 检测试剂盒(上海碧云天公司),SCCA1 (8H11)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司)。等电聚焦电泳系统、大型垂直电泳系统、图像扫描仪、图像分析软件(ImageMaster 2D, Platinum 5.0)(瑞典 Amersham Biosciences 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代角质细胞培养

手术切取患者皮损及正常皮肤,0.25%Dispase II 4℃过夜,筛网收集细胞。以无血清培养基调定 1.5×10^6 个/ml 细胞,台盼蓝计数活细胞,在 37℃ 5%CO₂ 90%湿度条件下培养。

1.2.2 角质细胞总蛋白的双向电泳和质谱鉴定

细胞培养 10 d 后,基本联合成片。制备双向电泳蛋白质样品,取 450 μg 蛋白质上样,IPGphor 等电聚焦仪,如下程序:①30 V,10 h 泡涨;②200 V,1 h 除盐;③1 000 V,2 h 除盐;④8 000 V,2 h 线性升压;⑤8 000 V,10 h 等电聚焦。第二向垂直平板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳参数设置:第一步 2.5 W/胶,30 min;第二步 17 W/胶,5 h,考马斯亮蓝染色。Imagescanner II 扫描获取图像进行分析。切取符合差异蛋白质点,后通过基质辅

助激光解吸附飞行时间质谱对蛋白质点进行氨基酸序列分析,用 Mascot 软件查询蛋白数据库,确定被测蛋白质的可能属性及名称。

1.2.3 免疫印迹

裂解液裂解细胞,用 Bio-Rad 方法测定细胞裂解液中蛋白质的浓度。总蛋白定量后,取 50 μg 蛋白量进行 SDS-PAGE 电泳,经转膜封闭后,加入 SCCA1 (8H11)鼠单克隆抗体,4℃过夜。TBST 洗 10 min 后,加入 HRP 标记羊抗鼠二抗,避光室温反应 15 min,TBST 清洗后胶片曝光显色。

1.3 统计学方法

用 SPSS12.0 统计软件包进行分析。所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养

初期细胞悬于培养液中,圆形、均质、透明,24 h 内,细胞开始贴壁,2 d 后细胞足突变短,细胞逐渐变成多角形,7~10 d 细胞逐渐汇合连接成片,11~15 d,细胞完全融合。

2.2 双向电泳图谱特征

获得了重复性较好,分辨率较高的 CLE 及正常皮肤角质形成细胞双向凝胶电泳图谱。皮损组和对照组的平均匹配点数分别为 $1\ 562 \pm 66$ 和 $1\ 647 \pm 71$,匹配率分别均在 80%以上(图 1)。

2.3 差异蛋白的质谱鉴定

利用软件对图像进行综合分析后,获得重复差异表达蛋白点,对差异点进行质谱鉴定。二级串级质谱检测,在皮损组高表达差异点中鉴定出 SCCA1。该点 Mascot 质谱最高得分为 471,余候选分子得分均低。

2.4 SCCA1 蛋白表达水平验证

用 Western blot 免疫印迹法检测 CLE 皮损和正常皮肤角质细胞 SCCA1 表达,发现其在皮损中均表达升高。以 Tubulin 为内参,软件分析比较显色条带的光密度值,图像分析结果显示其在皮损中均表达升高,为 0.656 ± 0.028 ,对照组表达为 0.132 ± 0.013 ,差异有统计学意义($P < 0.05$),与双向电泳的结果一致(图 2)。

3 讨论

SCCA1 是一种分子量大约 45 000 的糖蛋白,早期的研究提示其为木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白激

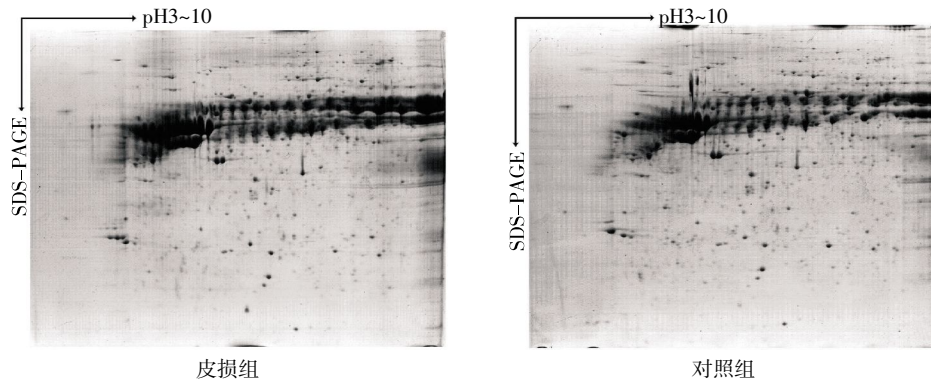
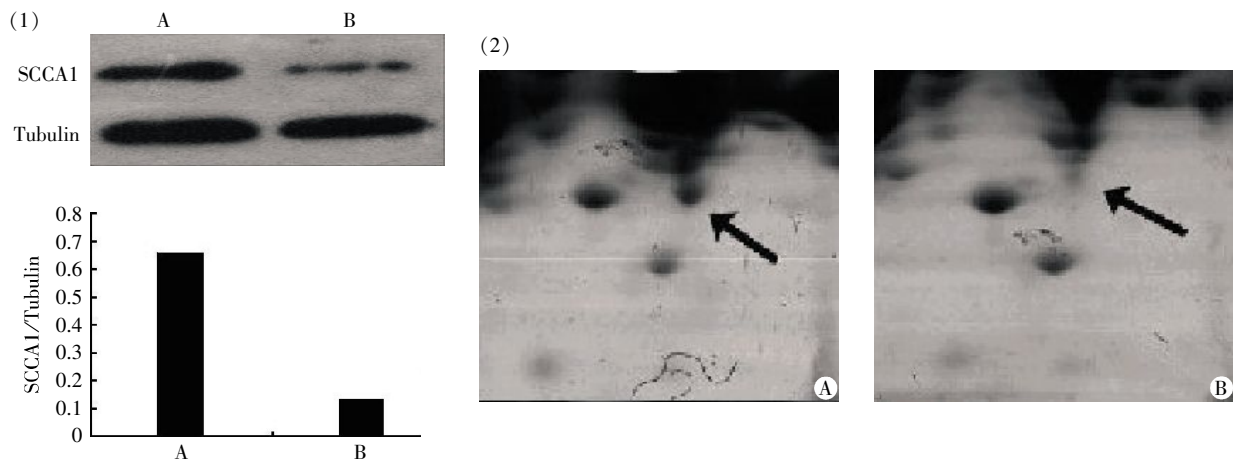


图 1 CLE 皮损和正常对照皮肤角质形成细胞总蛋白双向电泳图谱

Figure 1 Representative 2-DE maps of keratinocytes from CLE lesion and normal skin



(1)Western blot 检测 SCCA1 蛋白表达水平;(2)SCCA1 在双向电泳图谱上的差异表达。A:皮损组;B:对照组。

图 2 CLE 皮损和正常对照皮肤角质形成细胞的 SCCA1 蛋白表达

Figure 2 The expression of SCCA1 protein in keratinocytes from CLE lesion and normal skin

酶的抑制物。哺乳动物中的木瓜蛋白酶类半胱氨酸蛋白酶即属于组织蛋白酶,它是一类主要存在于溶酶体中的胞内蛋白酶,其与细胞凋亡关系密切,已发现组织蛋白酶等能直接或间接地激活细胞凋亡的主要蛋白酶 Caspase。SCCA1 的表达增高可以增强肿瘤细胞抗程序性死亡能力,与恶性肿瘤的转归和发生发展密切相关^[4]。相关研究提示 SCCA1 同样可以在一些良性疾病中表达升高,如肺部疾病、肝炎、肾功能衰竭、肺结核和胸腔积液等^[5-6],故在本研究中去除了相关疾病,以减少实验误差。考虑到部分 CLE 患者发展成为系统性红斑狼疮或者与其重叠,本研究选择病程 6 个月内仍不够条件诊断系统性红斑狼疮的病例。

近期研究认为 SCCA1 在部分皮肤疾病中同样表达升高。Kudo 等^[2]的研究提示在天疱疮患者疱液中 SCCA1 表达上调。Takeda 等^[3]发现 SCCA 在银屑病患者血清中同样表达升高,并且与病情成正相关,但是引起 SCCA1 表达异常的机制仍需进一步研

究。然而,SCCA1 在皮肤结缔组织疾病的相关研究,未见类似文献报道。

Katagiri 等^[7]研究发现,SCCA1 在曝光部位明显高表达,且通过 JNK1 途径抑制角质细胞凋亡。研究者进一步提示高表达 SCCA1 转基因小鼠局部皮肤角质细胞虽然出现角化不全和肥厚,却可以耐受高能量 UVB 照射而未出现变性,同等剂量的 UVB 照射普通对照小鼠,其表皮角质细胞出现明显的坏死和变性。红斑狼疮(lupus erythematosus, LE)是一种好发于女性的自身免疫性疾病,临床表现多样,皮肤是 LE 最常受累的器官之一^[8]。紫外线照射被认为参与了 CLE 的发生发展。紫外线通过上调 P53 分子的表达^[9],诱导自然杀伤细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞通过多种途径释放穿孔素和颗粒酶,以及激活 Fas 和 Fas 受体促进角质形成细胞凋亡^[10-11]。CLE 患者多伴有光敏感,本文猜测 SCCA1 的高表达可能同时是一种机体的保护机制,从而减轻 CLE 皮损内角质细胞的变性坏死。由此可见,SCCA1 在表皮的表

达及其作用是复杂的。

SCCA1 表达升高的机制仍不明确。特异性皮炎是一种典型的 Th2 型细胞因子主导的皮肤病,白介素 (IL)-4、IL-5 和 IL-13 水平在患者体内明显升高,并且与病情的严重程度相关^[12]。SCCA1 在特异性皮炎患者表达升高,研究还提示 SCCA1 可以作为反应 Th2 型细胞因子活跃的相关标志物^[13]。因此,SCCA1 的表达与 Th2 型细胞因子关系密切。LE 皮损内的细胞因子主要以干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 IL-5 为主,未见明显的 IL-4 和 IL-13 表达^[14-15]。因此,猜测 IL-5 可能是诱导 SCCA1 产生的细胞因子之一。

总之,本研究鉴定和发现了 SCCA1 在 CLE 皮损角质形成细胞高表达,并通过免疫印迹验证其表达水平。SCCA1 在表皮的表达及其作用是复杂的。一方面,SCCA1 可能作为一种保护机制,减轻紫外线对 CLE 皮损角质细胞的负面影响,另一方面 SCCA1 也可能通过参与炎症过程介导皮损形成。引起 SCCA1 表达升高的具体机制仍待进一步研究,可能与细胞因子的失衡和刺激有关。

[参考文献]

[1] Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 1977, 40(4): 1621-1628

[2] Kudo H, Yarnamoto M, Miyachi Y, et al. Increased serum levels of squamous cell carcinoma related antigen in pemphigus[J]. *Br J Dermatol*, 1988, 118(4): 471-474

[3] Takeda A, Higuchi D, Takahashi T, et al. Overexpression of serpin squamous cell carcinoma antigens in psoriatic skin[J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 118(1): 147-154

[4] Molina R, Torres MD, Moragas M, et al. Prognostic significance of SCC antigen in the serum of patients with head and neck cancer[J]. *Tumour Biol*, 1996, 17(2): 81-89

[5] Turato C, Ruvoletto MG, Biasiolo A, et al. Squamous cell carcinoma antigen-1(SERPINB3) polymorphism in chron-

ic liver disease[J]. *Dig Liver Dis*, 2009, 41(3): 212-216

[6] Komiyama Y, Ikuta A, Ozaki T, et al. Case of spuriously high level of squamous cell carcinoma antigen in patient without carcinoma--HPLC and ultrafiltration are useful to analyze the true value[J]. *Rinsho Byori*, 2010, 58(1): 30-34

[7] Katagiri C, Nakanishi J, Kadoya K, et al. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase [J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(7): 983-990

[8] Tebbe B, Orfanos CE. Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 1997, 6(2): 96-104

[9] Pablos JL, Santiago B, Galindo M, et al. Keratinocyte apoptosis and p53 expression in cutaneous lupus and dermatomyositis[J]. *J Pathol*, 1999, 188(1): 63-68

[10] Lowin B, Hahne M, Mattmann C, et al. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways[J]. *Nature*, 1994, 370(6491): 650-652

[11] Nakajima M, Nakajima A, Kayagaki N, et al. Expression of Fas ligand and its receptor in cutaneous lupus: Implication in tissue injury [J]. *Clin Immunol Immunopath*, 1997, 83(3): 223-229

[12] Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, et al. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(8): 1103-1111

[13] Mitsuishi K, Nakamura T, Sakata Y, et al. The squamous cell carcinoma antigens as relevant biomarkers of atopic dermatitis[J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(10): 1327-1333

[14] Carneiro JR, Fuzii HT, Kayser C, et al. IL-2, IL-5, TNF- α and IFN- γ mRNA expression in epidermal keratinocytes of systemic lupus erythematosus skin lesions[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66(1): 77-82

[15] Stein LF, Saed GM, Fivenson DP. T-cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1997, 36(2 Pt 1): 191-196

[收稿日期] 2011-08-26