

核转录因子 Sp1 在手术创伤后腹膜组织中的表达和意义

张安平, 张连阳, 向德兵

张安平, 张连阳, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042
向德兵, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科 重庆市 400042
项目负责人: 张安平, 400042, 重庆市大坪长江支路 10 号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科. anping_zhang@163.com
电话: 023-68757248
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-03-02

摘要

目的: 探讨人核转录因子 Sp1 在手术创伤后腹膜组织中的活性改变与腹膜粘连形成之间的关系。

方法: 采用凝胶电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测手术创伤后不同时间的人腹膜组织核转录因子 Sp1 表达水平。Masson 染色观察腹膜组织中胶原纤维的变化。

结果: 手术创伤后 30 min 核转录因子 Sp1 被活化, 随着手术时间延长, Sp1 在创伤腹膜组织中的表达水平逐渐升高, 存在差异显著性($P < 0.01$)。随手术时间的延长腹膜组织中胶原纤维增加。

结论: 核转录因子 Sp1 的活化对于腹膜粘连形成具有一定的作用。

张安平, 张连阳, 向德兵. 核转录因子 Sp1 在手术创伤后腹膜组织中的表达和意义. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1466-1468
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1466.asp>

0 引言

自 1853 年 Virchow 报道腹膜粘连以来, 问题非但未得到解决, 相反随择期手术的增多而日益严重。腹膜粘连形成是腹部外科手术常见的并发症之一。常可导致严重并发症, 包括肠梗阻、不孕和疼痛等; 并增加术中并发症和再次手术的难度。其腹膜粘连形成的分子机制尚不清楚。核转录因子 Sp1 启动胶原的合成和表达, 在纤维化过程中起重要作用。我们采用凝胶电泳迁移率改变分析法(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)测定手术创伤后不同时间的人腹膜组织中 Sp1 的表达及水平, 为特异性调控 Sp1 而抑制腹膜粘连形成找到一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 以我科 40 例直肠癌手术患者为对象, 根据不同的分组获取腹膜组织。开腹后立即自切口左侧 2.0 cm 处锐性切取腹膜组织为正常腹膜组。手术后分别于 30 min、1、2、3、4 h, 自切口右侧 2.0 cm 处锐性切取腹膜组织为创伤腹膜组。切除腹膜组织面积大小为 1.5 cm ×

1.5 cm。获取组织立即液氮保存备用。

1.2 方法

1.2.1 腹膜组织核蛋白的提取和 Sp1 探针的标记 参照 NE-PER™ 核蛋白抽提试剂盒(美国 PIERCE 公司)提供的方法提取各组腹膜组织中的核蛋白, 以 Bradford 法测定核蛋白浓度后分装于 -70°C 保存备用。参照 Sp1NUSHIFT 检测试剂盒(加拿大 GENEKA 公司)标记 Sp1 双链寡核苷酸探针, 在 T_4 多核苷酸激酶作用下, 以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标记其 5' 端, 经 MicroSpin™G25 分离柱纯化后, 测定探针放射活性。

1.2.2 腹膜组织核转录因子 Sp1 的 DNA 结合活性及特异性检测 参照 Sp1NUSHIFT 检测试剂盒(加拿大 GENEKA 公司), 将下列试剂加入 0.5 mL 的 Eppendorf 管内: DNA 结合缓冲液 4 μL ; 核蛋白提取物 10 μg ; 4°C 孵育 20 min, 加入已标记寡核苷酸双链探针 1 μL ; 4°C 继续孵育 20 min, 加入 4 μL 加样缓冲液, 混匀, 加样。并进行 Sp1 的特异性竞争抑制实验, 设两组特异性对照检测, 一组加入 50 倍未标记的特异寡核苷酸探针, 另一组加入 50 倍未标记的变异寡核苷酸探针。在 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 2 h、180 V, 干胶, 放射自显影。应用 BandsScan 分析软件对电泳条带进行灰度测定, 计算平均光密度(A), 以各条带的 A 值表示核转录因子的活性。

1.2.3 腹膜组织的 Masson 染色 腹膜组织石蜡切片常规脱蜡入水, 用天青石溶液染细胞核 20 min 后水洗, Masson 红染液 10 min 后水洗, 10 mL 醋酸水溶液 1 min, 5 g/L 亮绿, 镜下观察至变绿后快速脱水透明封片。

统计学处理 实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, SPSS10.0 软件 t 检验。

2 结果

2.1 各组腹膜组织中 Sp1 活性变化 创伤腹膜组的核转录因子 Sp1 活性均明显高于正常腹膜组($P < 0.01$)。随手术创伤时间的延长其活性逐渐升高。提示手术创伤时间越长, Sp1 激活越明显(表 1, 图 1)。

2.2 Sp1 抑制性竞争实验 结果见(图 2), 第 3 泳道采用 50 倍未标记的特异寡核苷酸显示完全被抑制, 条带消失。第 4 泳道采用 50 倍未标记的变异寡核苷酸显示不被抑制。与第 1、2 泳道相比, 显示出结合的特异性。

2.3 腹膜组织的胶原纤维变化 随着手术创伤时间的延长, 转录因子 Sp1 被活化, 腹膜组织中的胶原层增厚, 胶原纤维增生, 纤维细胞粗大、排列紊乱, 这种表现在手术后 30 min 则可观察到(图 3: A-D)。

表1 腹膜组织 Sp1 活性变化(mean±SD)

组别	n	0 h	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h
正常腹膜组	40	31.2 ± 8.3					
创伤腹膜组	40		61.2 ± 11.6	88.4 ± 15.8	104.6 ± 15.3	122.4 ± 27.1	134.6 ± 18.4

P < 0.01 vs 正常腹膜组.

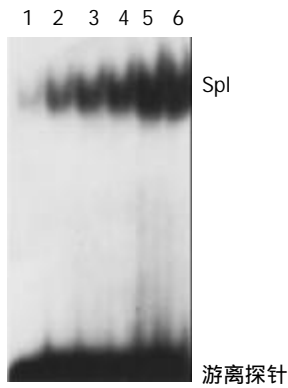


图1 腹膜组织的 Sp1 活性(EMSA). 1: 正常腹膜组; 2、3、4、5、6; 创伤腹膜组: 分别为 30 min、1、2、3、4 h.

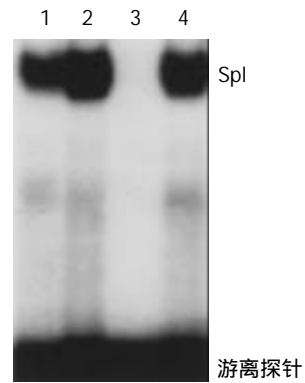


图2 Sp1 抑制性竞争实验. 1: 正常腹膜组; 2: 创伤腹膜组; 1 h; 3: 加入 50 倍未标记特异寡核苷酸; 4: 加入 50 倍未标记变异寡核苷酸.

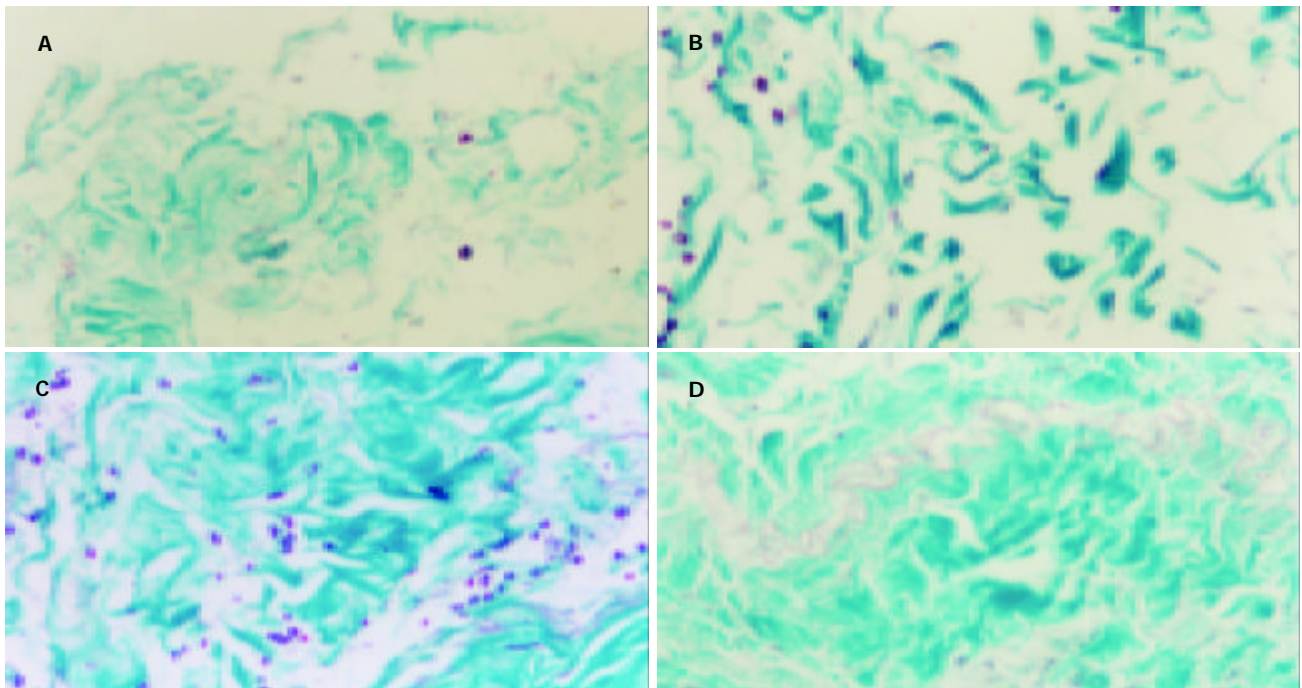


图3 腹膜组织胶原染色 Masson 染色 × 200. A: 正常腹膜组 × 200; B: 30 min 创伤腹膜组 × 200; C: 2 h 创伤腹膜组 × 200; D: 4 h 创伤腹膜组 × 200.

3 讨论

Sp1 是 Sp/SKLF (specificity protein/Krüppel-like factor, 特异性蛋白 / Krüppel 样因子) 转录因子家族中最早被克隆的因子, 由三个保守的 Cys2His2 锌指特异结合而形成, 三个锌指形成转录因子的 DNA 连接区域. 通常认为 Sp1 是通过 GC 或 GT 盒调节而控制所有基因的转录. Ihn et al^[1] 研究表明在硬皮病的纤维母细胞中 Sp1 的磷酸化增强与 I 型胶原的表达增高相关, Sp1 通过特异的 GC 盒与 I 型 α2 胶原 (COL1A2) 启动子特异性结合, Sp1 激活 COL1A2 启动子, 促进胶原的表达. Artlett et al^[2] 报

道 Sp1 和近端的 COL1A2 启动子连接可激活 COL1A2 的活动. 以细胞或信号特异性的方式改变转录因子的相对量或 DNA 结合活性, 均可控制 COL1A2 启动子的转录, 说明 Sp1 在结缔组织生理和病理调节中起重要作用. 在表皮伤口愈合过程中如 Sp1 的过度活化可出现瘢痕疙瘩并转变成恶性胶原肿瘤, 表现为纤维母细胞过度分化、白细胞浸润、胶原合成明显增强^[3]. Haase et al^[4] 在研究放射诱导的肺纤维化过程中在早期观察到 Sp1 短期增加, 此后维持稳定直到放射后 1 mo. 在放射后 2 mo, Sp1 mRNA 水平维持稳定. 在 II 型肺细胞、肺泡巨噬细胞中发现 Sp1

蛋白,从而导致在肺纤维化过程中纤维母细胞的增生明显增强. Rippe et al^[5]发现在肝纤维化中, Sp1 与 COL1A2 启动子结合增强,促进了 Ito 细胞的活化,使肝纤维化进一步发生. 在肝纤维化实验中可观察到 Sp1 和 NF- κ B/Sp1 开关元件的亲合力增加. 实验显示光神霉素阻碍 Sp1 与该位点的结合,可使人纤维母细胞中细胞外基质 (ECM) 的形成和降解基因激活之间的平衡发生改变,从而抑制胶原的产生. 以上研究说明 Sp1 在纤维化过程中起重要作用.

腹膜粘连与皮肤瘢痕形成和某些脏器的慢性纤维化类似,均以纤维增生为基础,已发现在角肌细胞的基因中存在功能性 Sp1 结合位点. 我们的研究发现在手术创伤后,人体腹膜组织中的 Sp1 的活性随着时间的延长而逐渐增强,且腹膜组织在创伤后其胶原纤维增生,胶原的合成增加而分解降低,使人在手术创伤后腹膜粘连形成. 因此,Sp1 的活化在腹膜粘连形成中具有一定的作用,但所依赖的信号通路以及在腹膜组织中的结合位点尚有待进一步研究.

Verrecchia et al^[6]研究发现阻断 Sp1 可广泛抑制体内和体外 ECM 基因的表达,Sp1 与 ECM 基因的基础表达

有关,可能在纤维化过程中起重要作用. 敲除 Sp1 可有效抑制 ECM 基因表达,这为治疗纤维化提供了一个选择治疗的手段. 通过调控 Sp1 的表达可能阻断纤维化进程,从而防止腹膜粘连形成.

4 参考文献

- 1 Ihn H, Ihn Y, Trojanowska M. Sp1 phosphorylation induced by serum stimulates the human alpha2(I) collagen gene expression. *J Invest Dermatol* 2001;117:301-308
- 2 Artlett CM, Chen SJ, Varga J, Jimenez SA. Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF- κ B/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix Biol* 1998;17:425-434
- 3 Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, Arrindell S, Russell S, Trupin J, Richmond A. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2000;8:371-382
- 4 Haase M, Geyer P, Appold S, Schuh D, Kasper M, Muller M. Down-regulation of SP1 DNA binding activity in the process of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Biol* 2000;76:487-492
- 5 Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology* 1995;22:241-251
- 6 Verrecchia F, Rossert J, Mauviel A. Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo: implications for the treatment of tissue fibrosis. *J Invest Dermatol* 2001;116:755-763

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

凋亡抑制基因 survivin 在食管鳞癌中的表达及其与 p53 基因表达相关性研究

高思海, 赵金平, 潘铁成, 李 军

高思海, 赵金平, 潘铁成, 李军, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 高思海, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科. gshai@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-62300305
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-02-21

摘要

目的: 探讨凋亡抑制基因 survivin 在食管鳞癌组织中的表达, 及其与 p53 表达的相关性.

方法: 应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(S-P法), 检测 survivin 和 p53 基因在 12 例正常食管组织及 90 例食管鳞癌组织中的表达.

结果: Survivin 基因在正常食管组织中不表达, 90 例食管鳞癌组织中, 64 例表达阳性, 占 71.1%. 高分化组(I -

II 级)及临床早期(I - II 期)病例食管癌的 survivin 基因表达阳性率为 61.7%(37/60), 低分化组(III - IV 级)及临床晚期(III - IV 期)病例为 83.3%(25/30), 二者比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 食管鳞癌组织中 p53 蛋白表达阳性、阴性者中, survivin 基因表达阳性率分别为 75.9%(41/54)、22.2%(8/36), 二者比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); survivin 基因表达阳性率与食管鳞癌的病理分级和临床分期呈正相关, 与食管鳞癌组织中 p53 蛋白表达密切相关.

结论: Survivin 基因的异常表达而引起的细胞凋亡抑制, 在食管鳞癌的发生中起重要作用, 其表达与食管鳞癌组织中 p53 蛋白的异常表达密切相关.

高思海, 赵金平, 潘铁成, 李军. 凋亡抑制基因 survivin 在食管鳞癌中的表达及其与 p53 基因表达相关性研究. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1468-1470
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1468.asp>