

反式玉米素对 HaCaT 细胞迁移及水通透性的影响

蒋洁瑶¹ 纪超¹ 张美华¹ 毕志刚^{2*}

[摘要] 目的: 评价反式玉米素(Trans-Zeatin, tZ)对 HaCaT 细胞的迁移和水通透性的影响。方法: RNA 干扰实验;载有钙黄绿素的 HaCaT 细胞执行水的通透性测量。结果: 反式玉米素缓解了 UV 导致的 HaCaT 细胞迁移能力的下降;并改善了 HaCaT 细胞由 UV 介导的水通透性的下降。结论: 经 Trans-Zeatin 处理后可上调角蛋白细胞中小鼠水通道蛋白 3(AQP3)的表达,促进 HaCaT 细胞的迁移和改善水的通透性。

[关键词] 反式玉米素; 水通道蛋白 3; 细胞迁移; 水通透性

The impact of trans-zeatin on the migration and water permeability of HaCaT cell

JIANG Jie-yao, JI Chao, ZHANG Mei-hua, et al. Department of Dermatology of Venereology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210000

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of trans-zeatin on the migration and water permeability of HaCaT cells. **Methods:** RNA interference (RNAi) experiments; Cells were loaded with calcein and water permeability measurement was performed. **Results:** tZ attenuates UV-induced down-regulation of migration in cultured skin keratinocytes (HaCaT cells). tZ attenuates UV-induced downregulation of water permeability in cultured skin keratinocytes (HaCaT cells). **Conclusion:** we found that tZ treatment, which upregulates AQP3 expression, enhances cell migration and water permeability in keratinocytes.

[Key words] trans-zeatin; aquaporins-3; cell migration; water permeability

光老化最主要的特征之一就是皮肤水分的流失。暴露在紫外线中皮肤会变得干燥,出现鳞屑。暴露于 UVB 后出现的缺水状态会破坏皮肤角质层的功能,比如皱纹的形成和伤口的延迟愈合。^{1,2} AQPs 是小的(~30 kDa/个)疏水的完整胞膜蛋白家族中一员,广泛在动植物中表达,迄今为止已有 13 种被证明存在于哺乳动物中。研究证明除了在 HaCaT 细胞中,角质层水合作用受损及伤口细胞迁移延迟亦存在于 AQP3 敲除的老鼠中。³⁻⁵ 文献报道 UV 可引起皮肤角蛋白细胞(HaCaT 细胞)及皮肤成纤维细胞中 AQP3 表达的下调,在体外实验中发现 AQP3 表达的下调可导致皮肤脱水及伤口细胞迁移延迟,^{6,7} 全反式维 A 酸作为一种抗皮肤老化剂可通过抑制 AQP3 的退化而减少紫外线引起的伤口细胞迁移延迟及水分的丢失。⁶ 从玉米须中提纯出来的玉米素是一类促细胞分裂的植物生长因子,⁸ 反式玉米素的状态较稳定,被视为玉米素的活

性形式。⁹ 大量证据证明玉米素具有许多生物学效应,比如在人体系统有抗细胞凋亡、抗氧化、保持年轻化和抗衰老效能。¹⁰ 本研究旨在研究反式玉米素对细胞的迁移能力及水的通透性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 实验所用抗体分别为兔抗 AQP3 抗体购自美国 Chemicon 公司,单克隆鼠抗 β -肌动蛋白抗体和 tZ 购自中国 Sigma 公司。山羊抗兔 HRP 的 IgG 抗体和山羊抗鼠 HRP 的 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养^{3,11} 永生的人类角蛋白细胞(HaCaT cells)以 DMEM 为培养基,加入 10% 胎牛血清(FBS),青、链霉素,4 mol/L 谷氨酰胺,5% CO₂, 37℃ 孵育。当细胞密度达到 0.5×10^6 个/L 时用新鲜培养基进行传代,然后用于实验。

1.2.2 蛋白质免疫印迹法¹¹ 分别收集不同组的 HaCaT 细胞,用冰 PBS 漂洗 2 遍,加入预冷的细胞裂解液,4℃ 30 min,低温离心 10 min 后取上清,测定蛋白浓度。取总蛋白 20 μ g 或 10 μ g β -肌动蛋白,加入等量上样缓冲液,95℃ 煮沸 5 min,以 10% SDS-聚丙

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:810701297 和 81101188)

作者单位:1 南京医科大学第一附属医院皮肤性病科,江苏南京,210000

2 南京医科大学附属明基医院,江苏南京,210000

* 通信作者

烯酰胺凝胶进行电泳,电泳结束后,将蛋白转印到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,再用10%脱脂奶粉室温下封闭60 min, TBS洗膜3次,共15 min,加入第一抗体(抗AQP3抗体;抗 β -肌动蛋白抗体),4℃过夜后, TBS洗膜3次,共15 min,加入辣根过氧化酶标记的抗兔和抗鼠的IgG抗体孵育1 h, TBS洗膜。此后按显色试剂盒说明书操作显色。

1.2.3 体外细胞迁移分析 如前描述,³ 十二孔板先预涂一层聚赖氨酸(30 μ g/mL),随后进一步用BSA封闭。充足的经血浆饥饿的HaCaT细胞平铺于十二孔板,在吸附1~2 h后可以立刻铺满管中。用针在每个孔板涂层中刮一相同面积的线状划痕。用PBS清洗3次以吸取漂浮的细胞。培养基中包含0.2% FBS不作处理36 h。培养基中加入丝裂霉素C(10 μ g/mL)以防止细胞增殖。不同条件下的划痕区各拍10张典型的图片,为评估细胞的迁移,将各个条件下的10张图片中的无细胞区用标尺测量其距离,利用平均间隙去量化划痕间距。

1.2.4 RNA干扰试验 HaCaT细胞放在不含抗生素的培养基中培养4天。在转染前将HaCaT细胞种植在六孔板中1天,第2天即可长满至60%~70%。RNA干扰实验,12 μ L FuGene6 稀释入88 μ L的DMEM中于室温下放置5 min。然后取10 μ L的20 μ M双链RNA混入含有FuGene6的培养基中再在室温下孵育30 min待复合物的形成以做AQP3 RNAi。最后复合物被加入包含2 mL培养基的孔中,2 mL的培养基中加入最终浓度为100 nM的AQP3 siRNA。以上处理48 h后用Western blotting分别测定AQP3蛋白的表达。

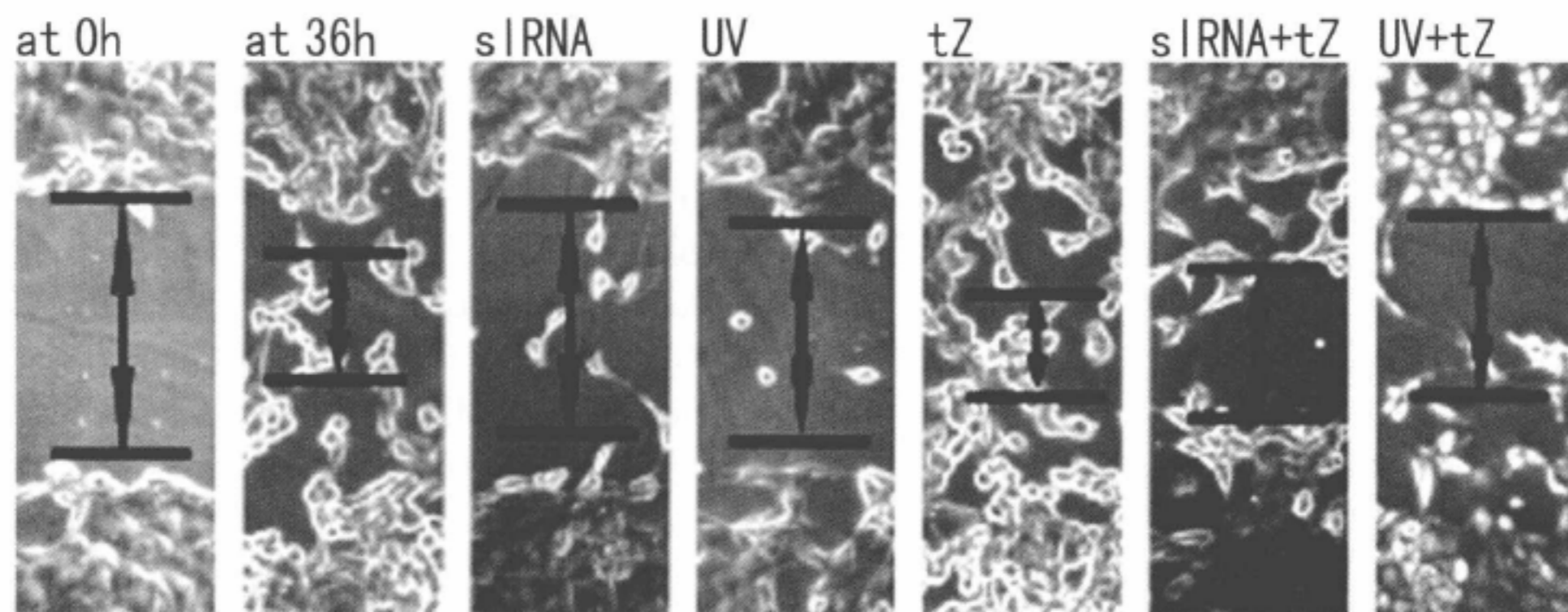
1.2.5 透水性的测量 水的通透性的测定是使用之前文献描述的比较完善的方法。¹²含有HaCaT细胞的盖玻片装在密闭的灌注槽内放置于Zeiss荧光显微镜下观察。细胞载有钙黄绿素进行水的通透性测量,载有钙黄绿素的细胞暴露于含有20 μ M的钙黄绿素-

乙酰氧基甲酯的300 mosM PBS(137 mM NaCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.35)中5 min, 30℃下载有钙黄绿素的细胞用药物孵育10 min。随后的水通透性的测定则在10℃时进行以减少水通过质膜类脂质双分子层的弥散。为测定水的通透性,用冷300 mosM PBS灌注细胞5 min,在同样的温度下改成150 mosM PBS(62 mM NaCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.35)灌注液进行灌注。随后细胞的荧光强度图片每2 min记录1次(0, 2, 4 and 6 min),用488 nm波长以及515~525 nm波长显像,以测定各个细胞中钙黄绿素荧光在胞质区的时间过程来进行分析。荧光强度则由BioTek Gen 5系统测定。荧光强度半衰期的演绎可作为水通透性的比较指标。水通透性实验要求6个随机视野下至少需要100个细胞来量化相对荧光强度。

1.3 统计学方法 本文数据以均数 \pm 标准差表示,每个实验至少独立重复3次。对照组和实验组的实验数据进行统计学*t*检验分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 反式玉米素改善UV诱导的HaCaT细胞迁移能力的下降 我们检测在UV照射过的皮肤角蛋白细胞中AQP3丢失对其起作用的影响。如图1所示,在角蛋白细胞中AQP3与伤口的细胞迁移能力有关。加入AQP3的siRNA的HaCaT细胞迁移能力明显被抑制。*tZ*的预处理缓解了经紫外线照射过的人类皮肤角蛋白细胞AQP3丢失介导的细胞迁移能力的下降。*tZ*预处理特异性诱导AQP3的表达,增强了HaCaT细胞的迁移能力。这些结果清楚地指明*tZ*在体外试验中逆转了角蛋白细胞的AQP3的丢失,抑制了UV引起的细胞迁移能力的下降。



分别予 siRNA、UV、*tZ*、siRNA + *tZ*、UV + *tZ* 处理 HaCaT 细胞 36 h 后检测空白区域的间隙以评估细胞迁移能力,予 siRNA 和 UV 处理的细胞迁移能力明显下降,予 *tZ* 处理的细胞迁移能力大于未处理组,且能改善经 siRNA 和 UV 处理的细胞的迁移能力

图1 反式玉米素改善UV诱导的HaCaT细胞迁移能力的下降

2.2 反式玉米素改善了 HaCaT 细胞由 UV 介导的水通透性下降 我们接下来检验 tZ 对 HaCaT 细胞的水的通透性的影响(图 2)。预期中,UV 照射导致 AQP3 的丢失,降低了 HaCaT 细胞的水的通透性。而 tZ 特异性增加 AQP3 的表达及水的通透性,缓解了 UV 引起的水的通透性的下降。如图 2 所示:纵轴为相对荧光强度:4 组 HaCaT 细胞:未处理组;80 μM 的 trans-Zeatin、20 mJ/cm^2 UV、UV + trans-Zeatin 预处理细胞 24 h,然后按照上文所述方法于 0,2,4 and 6 min 时记录各组细胞的荧光强度。单纯紫外线照射的细胞组的荧光强度最大,予 trans-Zeatin 处理的细胞荧光强度最弱,且弱于对照组,水的通透性与荧光强度成反比。

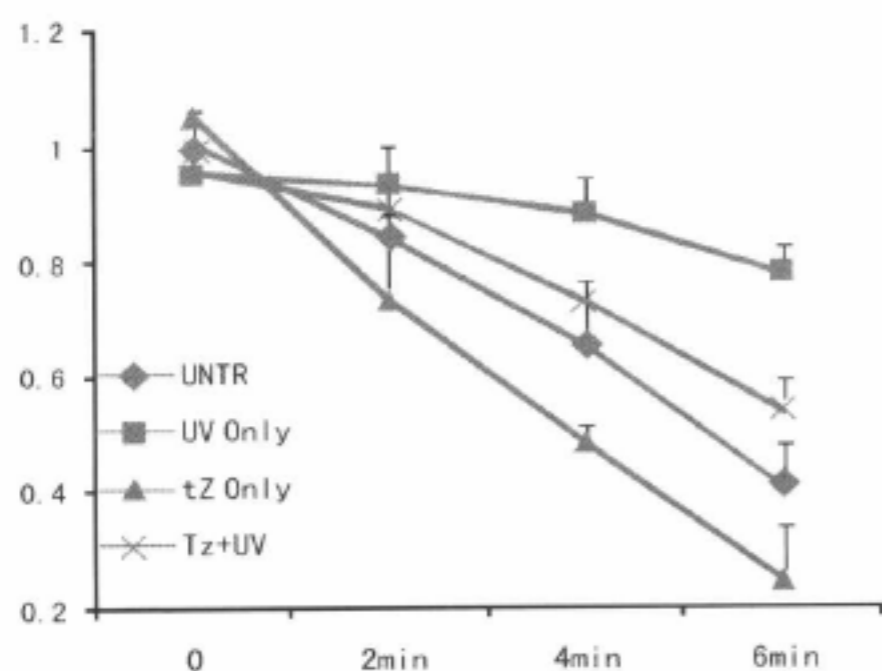


图 2 反式玉米素对 HaCaT 细胞水通透性的影响

3 讨论

紫外线照射是皮肤光老化的主要原因,UV 所致的皮肤光老化的表现有皮肤脱水和伤口的延迟愈合。使用针对 AQP3 的 siRNA 处理 HaCaT 细胞,证明了 AQP3 影响了人体皮肤角蛋白细胞的迁移能力。本文中 HaCaT 细胞的迁移能力为单纯用 tZ 处理组 > 对照组 > Tz + 紫外线照射组 > 单纯紫外线照射组。紫外线辐射过的角质细胞,与对照组的细胞相比 AQP3 蛋白较少,与未处理的细胞相比细胞迁移能力降低,反式玉米素逆转了这一过程,由此可见反式玉米素是潜在的皮肤光老化的防止剂,对抗 UV 引起的 AQP3 的丢失、细胞迁移能力的下降和水通透性下降。迄今为止,对于玉米素在人体系统的生物学效应关注的比较少。在这项研究中,我们研究反式玉米素对抗 UV 引起的皮肤光老化的保护机制。发现反式玉米素能抑制 UV 诱导的 AQP3 的丢失,缓解 UV 诱导的细胞迁移能力的降低和水的通透性下降。AQP3 可以转运水、甘油、尿素,对于表皮的屏障作用、水的保存有很大的意义。而在皮肤老化过程中,角质层变薄,皮肤水合能力降低,水分丧失增加;皮肤组织细胞的水分减少,细胞皱缩、老化、使皮肤出现细小皱纹。研究发现,哺乳动物皮肤中 AQP3 的缺失可同样导致皮肤干燥,角质层水合作用下降,皮肤弹性下降,以及皮肤屏障修复延迟,伤口愈合延迟。这就进一步提示 AQP3 参与

皮肤衰老的过程,反式玉米素可增加 AQP3 的表达,改善细胞迁移能力和水通透性,这一发现有助于预防和治疗皮肤光老化。

参 考 文 献

- 1 Roupe G. Skin of the aging human being. *Lakartidningen*, 2001, 98 (10): 1091 - 1095.
- 2 Weiss JS, Ellis CN, Headington JT, et al. Topical tretinoin in the treatment of aging skin. *J Am Acad Dermatol*, 1988, 19(2): 169 - 175.
- 3 Cao C, Sun Y, Healey S, et al. EGFR - mediated expression of aquaporin - 3 is involved in human skin fibroblast migration. *Biochem J*, 2006, 400(2): 225 - 234.
- 4 Ma T, Hara M, Sougrat R, et al. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin - 3. *J Biol Chem*, 2002, 277(19): 17147 - 17153.
- 5 Yang B, Ji C, Kang J, et al. Trans - Zeatin inhibits UVB - induced matrix metalloproteinase - 1 expression via map kinase signaling in human skin fibroblasts. *Int J Mol Med*, 2009, 23(4): 555 - 560.
- 6 Cao C, Wan S, Jiang Q, et al. All - trans retinoic acid attenuates ultraviolet radiation - induced down - regulation of aquaporin - 3 and water permeability in human keratinocytes. *J Cell Physiol*, 2008, 215(2): 506 - 516.
- 7 Ji C, Cao C, Lu S, et al. Curcumin attenuates EGF - induced AQP3 up - regulation and cell migration in human ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(5): 857 - 865.
- 8 Koenig RL, Morris RO, Polacco JC. tRNA is the source of low - level trans - Zeatin production in methylobacterium spp. *J Bacteriol*, 2002, 184(7): 1832 - 1842.
- 9 Kulaeva ON, Karavaiko NN, Selivankina S, et al. Receptor of trans - Zeatin involved in transcription activation by cytokinin. *FEBS Lett*, 1995, 366(1): 26 - 28.
- 10 Rattan SI, Sodagam L. Gerontomodulatory and youthpreserving effects of Zeatin on human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. *Rejuvenation Res*, 2005, 8(1): 46 - 57.
- 11 Zhang QS, Maddock DA, Chen JP, et al. Cytokine - induced p38 activation feedback regulates the prolonged activation of Akt cell survival pathway initiated by reactive oxygen species in response to UV irradiation in human keratinocytes. *Int J Oncol*, 2001, 19(5): 1057 - 1061.
- 12 Cao C, Healey S, Amaral A, et al. ATP - sensitive potassium channel: A novel target for protection against UV - induced human skin cell damage. *J Cell Physiol*, 2007, 212(1): 252 - 263.
- 13 Hara - Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin - 3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. *Biol Cell*, 2005, 97(7): 479 - 486.
- 14 Ma T, Hara M, Sougrat R, et al. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin - 3. *J Biol Chem*, 2002, 277(19): 17147 - 17153.
- 15 Hara M, Ma T, Verkman AS. Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin - 3 - deficient mice may account for impaired skin hy-

dration, elasticity, and barrier recovery. J Biol Chem, 2002, 277 (48):46616-46621.

16 Hara M, Verkman AS. Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-

deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(12):7360-7365.

(收稿:2012-06-26 修回:2012-12-01)

· 经验交流 ·

儿童过敏性紫癜 61 例临床分析

孙越英 李晓燕

过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP)是一种毛细血管变态反应性疾病,小儿多见,临床表现为皮肤瘀点、瘀斑,有的累及胃肠道、肾脏和关节等。其中肾脏最容易受损,肾损害的发生与否直接关系到患儿的预后。¹因此,对小儿过敏性紫癜进行临床分析具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本中心 2010 年 5 月至 2011 年 5 月过敏性紫癜患儿 61 例,其中男 38 例,占 62.30%,女 23 例,占 37.70%;年龄 3~14 岁,其中 3~6 岁 21 例,占 34.42%,7~10 岁 23 例,占 37.70%,11~14 岁 17 例,占 27.86%。

1.2 研究方法

1.2.1 采用统一设计的调查表格对病例资料进行整理,其中包括姓名、性别、年龄、病程、发病原因等方面。剔除标准:①有先天性疾病者;②心、脑、肝等存在严重疾病者;③不能遵医嘱的患者。

1.2.2 质量控制 为保证数据质量的可靠性,对收集的数据进行核查,抽取 10% 的数据与原始资料进行对照,检查是否存在数据错误,对存在错误的地方进行修正。

1.2.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计资料的录入和分析,对总体数据进行统计描述,不同率的比较采用

χ^2 检验, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 临床检查分析 血常规:白细胞计数升高者有 24 例,占 39.34%,血红蛋白下降者 8 例,占 13.11%;尿常规异常者 19 例,占 31.47%;大便常规异常者 7 例,占 11.47%。

2.2 临床表现 出现皮肤症状的小儿过敏性紫癜患儿占 100%,其中典型的紫癜性皮疹最多;出现消化道症状的 29 例,占 47.54%,主要表现为腹痛、腹泻和呕吐等;出现肾脏症状者有 20 例,占 32.78%,多数表现为血尿、蛋白尿和管型尿,伴血压增高及浮肿;出现关节症状的有 12 例,占 19.67%,表现为不同部位的关节肿痛,主要累及膝、踝、肘、腕等大关节,伴有活动受限。对各组的比例进行卡方检验,发现各组之间的比例差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

小儿过敏性紫癜好发于 3 周岁以上小儿。春秋季节多发,易复发。其发病的原因是多方面的²:①感染因素,最常见的细菌感染为 β 溶血性链球菌,其次为金黄色葡萄球菌、结核杆菌、伤寒杆菌、肺炎球菌和假单胞菌等,以上呼吸道炎症较为多见。②食物因素,主要是机体对动物性异体蛋白过敏所致,鱼、虾、蟹、蛤、蛋、鸡和牛奶等。③药物因素,如氯霉素、链霉素、异烟肼、氨基比林、阿司匹林、磺胺类药物均有引起本病的可能。此外,昆虫咬

伤、植物花粉、寒冷、外伤等也可引起。治疗上主要以针对病因、抗过敏及解痉、止痛等对症处理,缓解症状。首先,要加强休息,寻找病因,补充维生素;其次,进行对症治疗,有荨麻疹或血管神经性水肿时,应用抗组胺药物和钙剂,腹痛时应用解痉剂,消化道出血时应禁食,可静脉滴注西咪替丁。为缓解症状急症期的腹痛和关节痛需要静脉滴注地塞米松、甲泼尼龙。³糖皮质激素对腹型、关节型 HSP 效果显著,但不能防止病情反复及肾损害的发生。有研究认为甲泼尼龙对重症腹型过敏性紫癜患者的治疗效果优于地塞米松。本组 3 例消化道出血的患者应用潘生丁为抗凝剂,可阻止血小板聚集和血栓形成,改善微循环,对过敏性紫癜肾炎疗效佳。感染是其最常见的发病诱因,因此早期、合理使用抗生素不容忽视,但要慎重选药。此外,复方丹参具有明显的活血化瘀作用,可保护血管正常的功能状态。

参 考 文 献

- 1 胡亚美,江载芳,诸福棠.实用儿科学.第 7 版.北京:人民卫生出版社,2002.688-690.
- 2 张琴.过敏性紫癜的免疫学异常.国际免疫学杂志,2007,30(1):62.
- 3 陈泽莹.甲基强的松龙治疗小儿重症过敏性紫癜腹型 20 例疗效观察.华北煤炭医学院学报,2010,12(1):74.

(收稿:2011-12-20 修回:2012-02-11)

作者单位:河北省衡水市哈励逊国际和平医院, 053000