文章编号:1000-5404(2005)08-0779-03

论著

PAI-3在正常成人皮肤中的表达及作用的初步研究

张 诚,杨 恬,曾益军 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨PAI-3在成人皮肤中的表达,为进一步研究PAI-3在皮肤表皮增殖、分化中的作用及机制提供基础。**方法** 采用免疫组织化学技术和RT-PCR检测PAI-3和uPA在成人皮肤中的表达。**结果** 检测到PAI-3 mRNA及uPA mRNA的表达,PAI-3在正常成人皮肤组织中主要位于表皮的基底层、颗粒层和棘层,在分化程度较高的表皮角质形成细胞(keratinocyte, KC)中,其表达增强,而uPA主要位于皮肤表皮的基底层。**结论** PAI-3在正常成人皮肤中有表达并与表皮KC的分化有关。

关键词: PAI-3;uPA;皮肤
中图法分类号: R322.99; R345.63; R394.2 **文献标识码**: A

Expression and function of plasminogen activator inhibitor-3 in normal adult skin

ZHANG Cheng, YANG Tian, ZENG Yi-jun (Department of Cytobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of plasminogen activator inhibitor-3 (PAI-3) in normal adult skin. **Methods** Immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expressions of PAI-3 and uPA. **Results** mRNA of PAI-3 and uPA were detected. PAI-3 was mainly expressed in stratum basale, stratum spinosum and stratum granulosum, and its expression enhanced in the well differentiated keratinocytes of the epidermis. uPA was located in basal layer. **Conclusion** PAI-3 exists in normal adult skin and is related with the differentiation of epidermal keratinocytes.

Key words: plasminogen activator inhibitor-3; urokinase type plasminogen activator; skin

PAI-3(plasminogen activator inhibitor-3)又称蛋白C抑制剂(protein C inhibitor, PCI),是一个相对非特异性的肝素连接的血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员之一,开始时被描述为抗凝血蛋白抑制剂,抑制激活的蛋白质C,后来发现抑制其它的凝血和纤溶蛋白酶,包括凝血酶、凝血酶-凝血酶调节蛋白复合物、Xa因子、XIa因子、血浆激肽释放酶、组织型纤溶酶原激活剂、尿激酶型纤溶酶原激活剂等,并且与其靶酶形成稳定的复合物,在凝血、纤溶、细胞迁移、肿瘤侵袭转移及生殖中具有重要作用[1,2]。但PAI-3主要抑制激活的蛋白质C和tcu-PA(two-chain urokinase type plasminogen activator)[1,3],在以前的实验研究中发现uPA在基底角质形成细胞(keratinocyte, KC)的增殖和迁移过程中起作用,并有研究表明PAI-3能够与促进上皮组织分化的维甲酸连接的作用[4]。PAI-3是否参与KC的增殖与分化及机制目前在国内外还没有报道。本实验研究PAI-3在成人皮肤中的表达,为进一步探讨PAI-3在KC增殖、分化中的作用及机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 组织来源

所有标本均来源于西南医院泌尿外科手术切除的正常成人皮肤组织和肝脏组织。

1.2 仪器

RM2135型冰冻切片机;S.A.67120型纯水系统;T2A型凝胶成像系统;DB80220-33型PCR仪;DYY-Ⅲ6B稳亚稳流型水平电泳仪;DU-800紫外分析仪。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 抗PAI-3单克隆抗体购自TC公司,抗uPA单克隆抗体购自American diagnostica公司,S-P试剂盒及DAB试剂盒为福州迈新公司产品。具体步骤为:取外科手术切除的皮肤组织,将标本切成小块并置于滤纸上,使组织平铺后迅速置于4%多聚甲醛中固定;30%蔗糖脱水后冰冻切片,厚度为7 mm。S-P免疫组化检测按常规方法进行。阴性对照:0.01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270671,30371383)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270671, 30371383)
作者简介:张 诚(1975-),男,四川省遂宁市人,硕士研究生,主要从事皮肤上皮化方面的研究。E-mail:chzhang2003@hotmail.com,电话:(023)68752259
通讯作者:杨 恬,E-mail:tiany@163.net,电话:(023)68752260
收稿日期:2004-12-29;修回日期:2005-01-23

mol/L PBS代替一抗进行免疫组化染色。

1.3.2 RT-PCR RT-PCR反应试剂盒购于TaKaRa公司，PAI-3、uPA及内参G3PDH引物由上海博亚生物工程公司合成。PAI-3：正义链5′-CGA GTC GGG AAC CAG AGC AG-3′，反义链5′-TGG GTG GAA GCA ATC ATC ATA GAG-3′；uPA：正义链5′-GAG GGT GAA CGA CAA TAG C-3′，反义链5′-AAA GGG ACA TCT ATG TGA AAG T-3′；内参G3PDH：正义链5′-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3′，反义链5′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3′。具体步骤：所有材料、设备及试剂事先用DEPC水处理，真、表皮的分离及总RNA的提取按照文献[5]操作，DU-800紫外分光光度仪测RNA含量。按说明书进行RT-PCR操作。1.5%琼脂糖凝胶电泳后在T2A凝胶成像系统中鉴定PCR产物。

2 结果

2.1 免疫组化结果

正常成人皮肤组织在鼠抗人的单克隆抗体PAI-3为1∶100的工作浓度时，PAI-3位于表皮的基底层、颗粒层和棘层，在分化程度较高的表皮KC中，其表达增强，阳性染色位于细胞的胞浆和胞膜上(图1)，而uPA为1∶100的工作浓度时，主要位于皮肤表皮的基底层(图2)。0.01 mol/L PBS代替一抗进行免疫组化染色对照，结果在表皮的全层染色均为阴性。

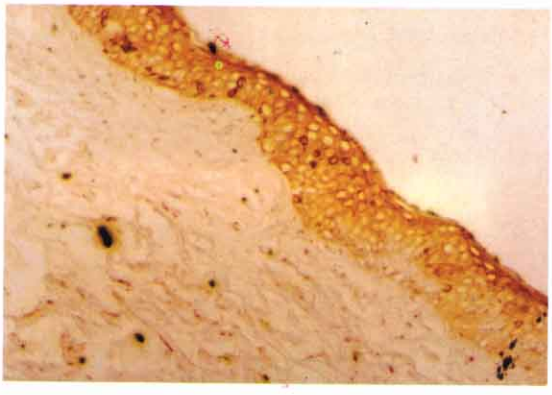


图1 PAI-3在正常成人皮肤中的免疫组化检测结果 (S-P×100)

Fig 1 Immunohistochemistric results of PAI-3 in normal adult skin (S-P ×100)

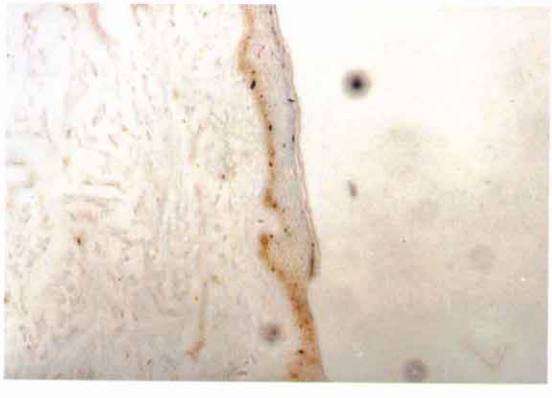
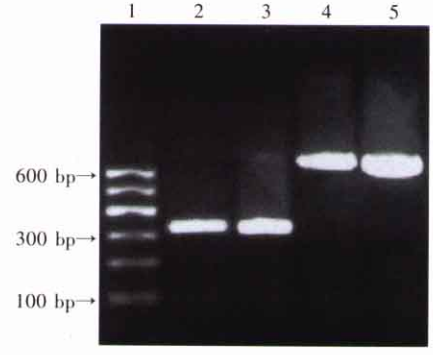


图2 uPA在正常成人皮肤中的免疫组化检测结果 (S-P×100)

Fig 2 Immunohistochemistric results of uPA in normal adult skin (S-P ×100)

2.2 RT-PCR

组织总RNA提取后，测$D(260)/D(280)$值为1.8，表明提取的总RNA较纯，可以用于RT-PCR，以cDNA为模板，用设计的引物进行PCR扩增，2%琼脂糖凝胶电泳后在T2A凝胶成像系统鉴定PCR产物，可以见到在正常人表皮组织中PAI-3 mRNA在311 bp处呈现清晰的条带并且无引物二聚体出现(图3)，而以前的文献报道，运用RNA探针进行原位杂交在皮肤组织中没有检测到PAI-3 mRNA的表达，为进一步确定是否存在PAI-3 mRNA表达，本研究中同时检测了人的肝脏组织中PAI-3 mRNA的表达，结果检测到PAI-3 mRNA的表达(图3)，由于PAI-3 mRNA主要在人的肝脏中合成，表明成人皮肤组织中确实存在PAI-3 mRNA的表达。同时检测了uPA mRNA在成人皮肤及肝脏组织中的表达，结果检测到uPA mRNA在638 bp处呈现清晰的条带(图3)。



1：DNA marker；2：PAI-3 in skin；3：PAI-3 in liver；4：uPA in skin；5：uPA in liver

图3 PAI-3 mRNA及uPA mRNA在正常成人皮肤中的检测结果

Fig 3 PAI-3 mRNA and uPA mRNA in normal adult skin by electrophoresis

3 讨论

PAI-3在人的肝脏、胰腺、心脏、卵巢、睾丸、肾脏的管状上皮、血小板等多个器官和组织中表达，但在成人皮肤组织中的表达很少报道。本研究表明PAI-3在正常成人的皮肤组织表皮的基底层、颗粒层和棘层表达，这与以前的文献[6]报道相一致。本研究表明，PAI-3在分化程度较高的表皮KC中，其表达增强，同时检测到PAI-3 mRNA的表达。

在以往的研究中发现，PAI-3广泛地在良性前列腺上皮组织中表达，在表层细胞表达相当强烈，在高度恶性前列腺肿瘤组织中没有表达[7]。同样，PAI-3在肾癌组织中的表达较正常肾脏组织明显低得多，而PAI-3 mRNA在正常肾脏上皮组织中表达，在恶性组织及肿瘤细胞系Caki-1 cells中没有表达[8]。本研究同样提示，PAI-3主要集中在表皮分化程度较高的细胞中。

另外，有研究表明，uPA与表皮KC的增值分化密切相关，PAI-3具有抑制tcu-PA的作用[1]，外源性加入

的 PAI-3 抗体对 uPA 诱导细胞侵袭力的增强具有明显的抑制作用[8]，野生型的 PAI-3 具有促进细胞移动和粘附的作用[2]。我们在以前的实验中研究显示，uPA 及 PAI-3 在胎儿的生长发育过程中呈阳性表达，并且随着胎龄的增加，表达增强，而我们在本实验中显示，PAI-3 及 uPA 在表皮的基底层表达，因此，推测 PAI-3 可能通过调节 uPA 的分泌或抑制 uPA 与 uPAR 结合来调控表皮 KC 的增殖、分化作用。

有研究表明，PAI-3 能够与促进上皮组织分化的维甲酸相结合[4]。本研究表明，PAI-3 主要集中在表皮分化程度较高的 KC 细胞中，因此，推测 PAI-3 可能通过蛋白酶及蛋白酶抑制剂以外的非酶性方式参与表皮 KC 的增殖、分化作用，但 PAI-3 是否参与表皮 KC 的增殖、分化及作用机制仍然不清楚，有待进一步的深入探讨与研究。

参考文献：

[1] Schwartz B S, Espana F. Two distinct urokinase-serpin interactions regulate the initiation of cell surface-associated plasminogen activation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(21): 15278 - 15283.

[2] Palmieri D, Lee J W, Juliano R L, *et al*. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(43): 40950 - 40957.

[3] Odet F, Guyot R, Leduque P, *et al*. Evidence for similar expression of protein C inhibitor and the urokinase-type plasminogen activator system during mouse testis development[J]. Endocrinology, 2004, 145(3): 1481 - 1489.

[4] Jerabek I, Zechmeister Machhart M, Binder B R, *et al*. Binding of retinoic acid by the inhibitory serpin protein C inhibitor[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(22): 5989 - 5996.

[5] Longley J, Ding T G, Cuono C, *et al*. Isolation, detection, and amplification of intact mRNA from dermatome strips, epidermal sheets, and sorted epidermal cells[J]. J Invest Dermatol, 1991, 97(6): 974 - 979.

[6] Krebs M, Uhrin P, Vales A, *et al*. Protein C inhibitor is expressed in keratinocytes of human skin[J]. J Invest Dermatol, 1999, 113(1): 32 - 37.

[7] Cao Y, Becker C, Lundwall A, *et al*. Expression of protein C inhibitor (PCI) in benign and malignant prostatic tissues[J]. Prostate, 2003, 57(3): 196 - 204.

[8] Wakita T, Hayashi T, Nishioka J, *et al*. Regulation of carcinoma cell invasion by protein c inhibitor whose expression is decreased in renal cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2004, 108(4): 516 - 523.

（编辑　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2005)08-0781-01

个案与短篇

初发性复发性高原肺水肿血浆 VEGF 变化的研究

Changes of plasma VEGF level in patients suffering from primary and recurrent high altitude pulmonary edema

王洪斌，李素芝，江成剑，郑必海，姚文新，周晓波　（西藏军区总医院全军高山病研究中心实验室，拉萨 850003）

高原肺水肿（HAPE）是快速进入高原后，由于缺氧引起的以肺间质或/和肺泡内液体聚集过多的急性重症高原病。其发病机制尚未完全清楚，主要有缺氧性肺动脉高压、钠水潴留、肺毛细血管栓塞及其应激衰竭[1]等。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）能增加微血管的通透性，使血管内皮细胞分裂与增殖，促进血管再生，在许多疾病的病理生理过程中发挥特殊作用[2]。为此对 HAPE 的 VEGF 进行了测定，分析如下。

1　对象与方法

1.1　研究对象

28 例 HAPE 为 2003 年 10 月至 2004 年 3 月收治的住院患者。其分为两组：初次发病的 HAPE（简称为 pHAPE）18 例；反复多次发生的 HAPE（简称为 rHAPE）10 例。另设健康对照组 16 人，均为男性，汉族。平均年龄：pHAPE 组，20 岁；rHAPE 组，32 岁；对照组，19 岁。rHAPE 发生次数：2 次者 2 例，3 次者 3 例，4 次者 3 例，5 次者 2 例，平均发生 3.5 次。

1.2　实验方法

治愈前后和对照组，分别抽静脉血，肝素抗凝，分离血浆，置 -70 ℃冰箱中保存。待标本收齐后，以 ELISA 法测定血浆 VEGF，试剂由深圳晶美生物工程有限公司提供。

1.3　统计学方法

VEGF 测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，治疗前后及组间比较用 t 检验。

2　结果

经 VEGF 测定 pHAPE 组治疗前（80.93 ± 11.03）显著高于治疗后（70.85 ± 13.78）（$P < 0.05$），rHAPE 组治疗前（102.79 ± 20.21）显著高于治疗后（83.83 ± 9.263）（$P < 0.01$）。对照组（64.43 ± 8.03）与 pHAPE 治疗前相比，$P < 0.01$，治疗后 $P > 0.05$。对照组与 rHAPE 相比 $P < 0.05$，$P < 0.01$。

（下转 785 页）

作者简介：王洪斌（1958-），男，四川省乐山县人，副主任医师，副教授，主要从事高原医学方面的研究。发表论文 31 篇。电话：（0891）6253206

收稿日期：2004-08-30；修回日期：2004-10-12