论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0760-03

整合素 β1 在人表皮细胞株 HaCaT 增殖中影响的研究

闫德雄,苏踊跃,唐红英,梁光萍,陈 建,罗向东 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨β1整合素对表皮细胞增殖的影响。**方法** 将重组整合素β1小干扰RNA表达载体(siIntegrinβ1)转染到HaCaT细胞株中,应用免疫印迹(Western blotting)方法检测靶基因的抑制情况,应用细胞计数法检测表皮细胞增殖情况。**结果** 重组siIntegrinβ1转染HaCaT细胞株能够抑制靶基因整合素β1的表达,抑制细胞增殖。**结论** 在人表皮细胞株HaCaT中抑制整合素β1表达可抑制HaCaT增殖,为进一步研究整合素在表皮细胞中的基因表达调控奠定了基础。

关键词: 整合素β1;表皮细胞;增殖;RNA干扰
中图法分类号: R322.991;R329.28;R394.3 **文献标识码:** A

Effect of integrin β1 on proliferation of HaCaT cell line

YAN De-xiong, SU Yong-yue, TANG Hong-ying, LIANG Guang-ping, CHEN Jian, LUO Xiang-Dong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of integrin β1 on proliferation of epidermal cells. **Methods** Recombinant RNA interference expression vector of integrin β1 (siIntegrin β1) were transfected into HaCaT cell line. The integrin β1 protein expression was observed by Western blotting and the cell proliferation were determined with cell counting. **Results** The transfection of siIntegrin β1 into HaCaT cells could suppress integrin β1 gene expression specifically, and inhibit cell proliferation. **Conclusion** The supression of integrin β1 gene expression can inhibit the proliferation of HaCaT cells.

Key words: integrin β1; epidermal cell; proliferation; RNA interference

整合素作为黏附分子家族中的一员,由α和β亚基在细胞表面经非共价键连接的异型二聚体,两个亚基都有一个较长的细胞外片段、跨膜片段和较短的细胞内片段;细胞外片段介导细胞之间、细胞与基质的黏附,将细胞外信号传递到细胞内,其在细胞增殖与分化、细胞凋亡、细胞迁移、细胞间信号转导、血管的发生以及肿瘤的发生等起重要作用。小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)是21个核苷酸的双链RNA分子,能够在mRNA水平特异性封闭或抑制基因的表达,具有介导哺乳动物细胞基因沉默的强大功能[1]。研究表明,整合素β1在表皮干细胞中高表达时,整合素β1通过介导表皮干细胞与基底膜的黏附,而抑制其分化[2,3];本室前期研究表明小干扰RNA在表皮干细胞中能抑制整合素β1的表达,抑制其克隆形成率[4];整合素β1是否影响表皮细胞株HaCaT的增殖尚少见报道,本实验将重组整合素小干扰RNA载体转染到表皮细胞株HaCaT,检测其对靶基因的抑制情况,并对整合素β1对表皮细胞株增殖的影响进行探索,为进一步研究整合素β1在表皮细胞株HaCaT的基因表达调控奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞的培养

用于本实验的人表皮细胞株(HaCaT)来源于The American Type Culture Collection (ATCC),细胞用GIBCO公司的无血清培养基(Defined Keratinocyte-SFM 10744-019)在37 ℃、5% CO_2培养。

1.2 细胞的转染

本室前期分别构建整合素β1小干扰RNA载体siIntegrin-1、siIntegrin-2[4]。当HaCaT细胞达到70% ~80%的融合时,采用Dotap试剂(Roche公司)分别转染siIntegrin-1、siIntegrin-2和空载体pSilencer3.1/H1,组别设置如下:转染SiIntegrin-1组,SiIntegrin-2组,pSilencer3.1/H1组。转染方法参照Dotap说明书。

1.3 稳定转染细胞株的压力筛选和建立

转染SiIntegrin-1、SiIntegrin-2和pSilencer3.1/H1的细胞48 h后加入潮霉素(Hygromycin B, Roche公司)筛选,浓度为200 μg/ml,持续筛选3周,直到转染成功的细胞克隆形成,将克隆转移到另一个六孔板,继续加压筛选,连续传代,扩大培养。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270672,10332060)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270672, 10332060)

作者简介: 闫德雄(1978-),男,内蒙古自治区鄂尔多斯市人,硕士研究生,主要从事整合素β1调控机制的方面的研究。电话:(023)68754149-8082, E-mail:wsbts@126.com
通讯作者: 罗向东,E-mail:luoxd2005@163.com

收稿日期: 2005-11-14;**修回日期:** 2006-01-04

1.4　Western blotting 检测 integrin β1 表达

转染 48 h 后，细胞用预冷的 PBS 洗 3 次，4 ℃下用细胞裂解缓冲液 RIPA 裂解细胞 15 ~ 20 min，4 ℃离心（10 000 r/min）15 min，收获细胞裂解上清液作 Western blotting。用 BCA 法（Pierce 公司）进行蛋白定量，以保证每孔的加样量一致。经 SDS-PAGE 电泳、转膜、4 % 脱脂奶粉封闭 2 h，加鼠抗人 Integrinβ1 单克隆抗体（稀释比例 1∶500，购自 Santa），4 ℃孵育过夜，加羊抗鼠二抗（稀释比例 1∶3 000，购自 Santa）显影。

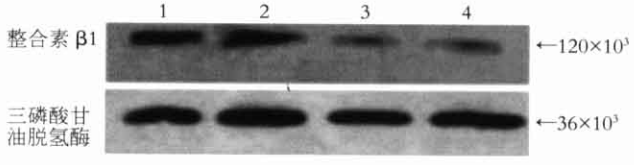
1.5　整合素 β1 对表皮细胞株 HaCaT 增殖的影响

将稳定转染 SiIntegrin-1 、SiIntegrin-2 的 HaCaT、转染 pSilencer3.1/H 对照质粒 HaCaT 细胞和正常 HaCaT 细胞用含 Definded karetioncyte-SFM 培养基稀释成 2.0×10^4/ ml，接种 24 孔板，每孔 1 ml，设 3 个复孔，置 37 ℃、5% 的 CO_2 的孵箱中培养。每 24 小时消化细胞计数，直至第 6 天，以时间为横坐标，细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线。

2　结果

2.1　Western blotting 检测 RNA 干扰后 Integrinβ1 表达水平的改变

结果显示，转染 siIntegrin 质粒到 HaCaT 后，Integrinβ1 的表达水平明显降低。两个靶点都可以抑制 Integrinβ1 的表达，其中 siIntegrin-2 抑制效率要高于 siIntegrin-1 靶点一（图 1）。



1：未转染的 HaCaT；2：转染空载体 Slicencer3.1/H1；3：转染 siIntegrin-1 载体；4：转染 siIntegrin-2 载体

图 1　siIntegrinβ1 转染对表皮细胞株 HaCaT 整合素 β1 表达的影响

2.2　细胞生长曲线

计数法结果显示，转染 SiIntegrin-1 、SiIntegrin-2 的 HaCaT 较转染 pSilencer3.1/H 对照质粒 HaCaT 细胞和未转染 HaCaT 细胞生长曲线右移，说明转染干扰载体的 HaCaT 增殖能力下降；SiIntegrin-2 较 SiIntegrin-1 明显，差异有显著性（$P < 0.05$）；转染 pSilencer3.1/H 对照质粒 HaCaT 细胞和未转染 HaCaT 增殖能力无显著差异（图 2）。

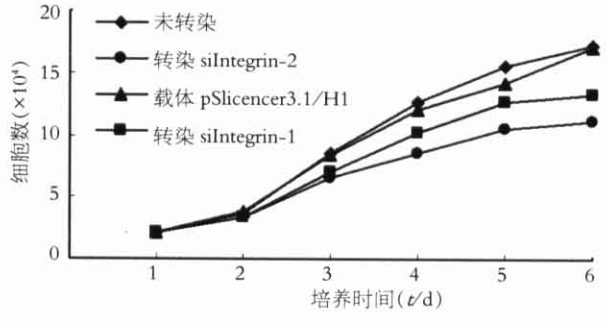


图 2　整合素 β1 小 RNA 干扰载体转染 HaCaT 后对其增殖的影响

3　讨论

整合素（integrin）是一种分布在细胞表面的跨膜糖蛋白，由 α 和 β 亚基在细胞表面经非共价键连接的异型二聚体，属黏附分子家族；根据 β 亚基，整合素分为 8 类（β1-β8）；β1 亚基和 10 种不同的 α 亚基组成异二聚体（α1-α9、αv）[5]，在人类 β1 亚基根据细胞质内结构域分为 5 个亚型（β1A、β1B、β1C、β1C-2、β1D）[6]，β1A 几乎在所有的组织表达除了骨组织和心肌组织，β1D 在骨组织和心肌组织中表达；β1B 和 β1C 在人类少数组织中表达，到目前为止没在鼠类中发现。整合素 β1 在细胞增殖与分化、细胞凋亡、细胞迁移、信号转导、血管的发生以及肿瘤的发生等起重要作用[5]。

研究表明，整合素 β1 在表皮干细胞中高表达，整合素 β1 对表皮干细胞定位于基底膜壁龛（Niche）具有重要作用，整合素 β1 表达量的下降，伴随着表皮干细胞从壁龛脱离，进而分化。因整合素 β1 在增殖旺盛的细胞中高表达，通常做为细胞增殖潜力的标志[7]，近年来一直被人们关注。但对整合素 β1 基因表达调控的研究甚少，Piero[8] 研究表明整合素有两个调控序列，但哪些转录因子参与了整合素 β1 基因调控未见文献报道。整合素 β1 在表皮细胞增殖分化中的调节作用尚不明确，本实验选择表皮细胞株 HaCaT，采用 RNAi 方法干预整合素 β1 的表达，建立整合素 β1 稳定下调表达的细胞模型，初步鉴定整合素 β1 对表皮细胞增殖的影响，以期为该基因启动子活化、转录调节的研究奠定基础。

RNA 干扰是后基因组时代出现的反向遗传学技术，它具有操作简单，特异性强，周期短等优点。本室前期研究表明将构建好的整合素 β1 小干扰 RNA 载体转染原代表皮干细胞，能够降低整合素 β1 的表达：将其转染干细胞，与未转染的干细胞除传代培养，比较两者之间的克隆形成率，发现转染整合素 β1 的干细胞克隆形成率低于为转染的干细胞，两者有显著差异[4]。本实验通过转染构建好的整合素 β1 小干扰 RNA 载体转染人表皮细胞株 HaCaT，结果显示转染组整合素 β1 表达下调，同时 HaCaT 细胞生长曲线右移，提示降低 HaCaT 中整合素 β1 表达，可抑制 HaCaT 增殖，说明整合素 β1 能影响表皮细胞 HaCaT 的增殖。以 HaCaT 细胞株为模型，对整合素 β1 表达调控机制的研究正在进行中。

参考文献：

[1] LEIRDAL M, SIOUD M. Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 295 (3): 744 - 748.

[2] JENSEN U B, LOWELL S, WATT F M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis [J]. Development, 1999, 126 (11): 2409 - 2418.
[3] GAMBARDELLA L, BARRANDON Y. The multifaceted adult epidermal stem cell[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15 (6): 771 - 777.
[4] 唐红英, 伍素华, 罗向东, 等. 整合素β1小干扰RNA载体构建及其在表皮干细胞干扰效应检测[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26 (23): 2120 - 2022.
[5] BRAKEBUSCH C, HIRSCH E, POTOCNIK A, *et al*. Genetic analysis of β1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules[J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt 23): 2895 - 2904.
[6] MORO L, GRECO M, DITONNO P, *et al*. Transcriptional regulation of the β1C integrin splice variant in human prostate adenocarcinoma [J]. Int J Oncol, 2003, 23(6): 1601 - 1606.
[7] VAN-DUIJNHOVEN M W, VAN-DE-KERKHOF P C, PASCH M C, *et al*. The combination of the Zenon labeling technique and microscopic image analysis to study cell populations in normal and psoriatic epidermis[J]. J Cutan Pathol, 2005, 32 (3): 212 - 219.
[8] PIERO C, LORENZO S , CRISTINA P, *et al*. Human β 1-integrin gene expression is regulated by two promoter regions[J]. J Biol Chem, 1993, 268 (7): 5148 - 5155.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)08-0762-01

产前诊断 Dandy-Walker 综合征 1 例

王 琳,常 青,江 露 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

1 临床资料

患者,30岁,2005年10月15日因孕35周,B超提示胎儿Dandy-Walker综合征,要求引产入院。孕4产1,自然流产4次,均在孕3个月内流产。足月产3次,新生儿均在出生后12 h内死亡。2005-10-08日孕34周在我院行彩色B超检查:双顶径83 mm,头围288 mm,腹围256 mm,小脑横径50 mm,侧脑室后角6 mm。胎儿脑部:颅骨呈圆形光环,脑中线居中,双侧脑室对称。两侧丘脑室可见。小脑蚓部未见显示,后颅窝池增宽,间距3.3 mm。胎儿腹部内脏:肝、胃、右肾、膀胱可见。左肾肾窦分离,间距11 mm。脐动脉2条。右手小鱼际旁可见范围17 mm×9 mm的赘生指。胎儿核磁共振(MRI):胎儿大脑实质未见异常信号,脑沟裂增宽,双侧侧脑室体部、颞部、三角区扩大,发育不良,后颅窝扩大,见囊状水样信号,四脑室轻度扩大,与后颅窝囊性信号相通,大脑上抬,小脑蚓部缺如,脑干未见明显异常,中线结构无移位。诊断意见:考虑Dandy-Walker综合征。羊水及脐血染色体检查未发现异常。于2005-10-17日行息隐加米索前列醇引产术,10月19日分娩一男死胎,双手及双足均有6指,共24指,面部外观无畸形。病理检查:①Dandy-Walker综合征。②多指、趾畸形。

2 讨论

Dandy-Walker综合征是一种罕见的先天性颅内或合并颅外发育异常,发生率约1/30 000。典型的Dandy-Walker综合征以小脑蚓部缺失,第四脑室和颅后窝池扩张为特征,约1/3伴脑积水。Dandy-Walker综合征常伴发于50多种遗传综合征。典型Dandy-Walker畸形产后病死率高(约20%),存活者常在1岁内出现脑积水或其他神经系统症状,40%~70%患者出现智力和神经系统功能发育障碍。Dandy-Walker畸形越典型,预后不良的可能性越大。现在认为该病的发病机制是在胚胎发育的第6或第7周前菱脑的综合发育畸形,其病因未明,有作者认为Dandy-Walker综合征的发生可能与宫内风疹、巨细胞病毒或弓形虫感染、服用华法林和饮酒有关[1]。Dandy-Walker综合征可有多种先天性颅内、外畸形。颅内畸形可有第四脑室出孔闭锁,小脑延髓池扩大,脑室系统扩大,中脑水管狭窄,小脑两半球分离,蚓部发育不全或缺如等;颅外畸形可有先天性心脏血管畸形,泌尿生殖系统畸形,其他畸形如肠旋转不良、唇裂、多指(趾),指(趾)弯曲等[2]。此外可有染色体异常(尤多见于伴有颅外畸形的病例),其中以18三体、21三体和13三体最常见。本例除颅内畸形外还合并多指(趾)。Russ等[3]报道15例产前诊断Dandy-Walker综合征中除4例终止妊娠外,11例新生儿中有6例死亡,死亡率为55%,在死亡的6例中有5例(83)合并颅外畸形;5例存活者随访60个月,其中4例做了分流手术,但均有不同程度的智力障碍。所以,产前一旦确诊Dandy-Walker综合征,应立即引产。彩色B超及胎儿MRI可协助产前诊断,有不明原因的反复自然流产史或新生儿死亡史,应在孕20~22周行彩超及胎儿MRI,明确诊断后及时引产。

关键词:Dandy-Walker综合征;先天性颅内发育异常;胎儿畸形
中图法分类号:R714.53 文献标识码:B

参考文献:

[1] ESTROFF J A, SCOTT M R, BENACERRAF B R. Dandy-Walker variant: prenatal sonographic features and clinical outcome[J]. Radiology, 1992, 185(3): 755 - 758.
[2] CORNFORD E, TWINING P. The Dandy-Walker syndrome: the value of antenatal diagnosis[J]. Clin Radiol, 1992, 45(3): 172 - 174.
[3] RUSS P D, PRETORIUS D H, JOHNSON M J. Dandy-Walker syndrome: a review of fifteen cases evaluated by prenatal sonography[J]. Am J Obstet Gynecol, 1989, 161(2): 401 - 406.

(编辑 陈聪连)

作者简介:王 琳(1964 -),女,四川省巴中市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事高危妊娠方面的研究,发表论文21篇。电话:(023)68765399

收稿日期:2005-12-26;修回日期:2006-01-25