论著

文章编号:1000-5404(2008)08-0746-04

Trappin-2 对 HaCaT 细胞及银屑病跨膜模型增殖的抑制作用

阎 衡,翟志芳,周春丽,钟 华,郝 飞 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 构建 Trappin-2 的真核表达体系,初步探讨 Trappin-2 对 HaCaT 细胞及银屑病跨膜模型增殖的影响。**方法** 采用 DNA 重组技术构建 Trappin-2 的表达载体 pIRES2-EGFP-Trappin-2,通过脂质体法转染人宫颈癌 HeLa 细胞。将 Trappin-2 高表达上清加入 HaCaT 细胞及银屑病跨膜模型中,通过^{3}H-TdR 掺入法、MTT 法、流式细胞术及组化染色 Ki67 检测对增殖的影响。**结果** Trappin-2 作用后 MTT 和 cpm 值变化率显示 Trappin-2 可抑制 HaCaT 细胞的代谢与 DNA 合成,同时可使 HaCaT 细胞 G_2+S 期细胞比例下降,而 G_1 期细胞比例增加。Trappin-2 可下调银屑病皮损 Ki67 表达水平。**结论** 成功将 Trappin-2 基因转染 HeLa 细胞,并进行有效表达,初步证实 Trappin-2 具有抑制 HaCaT 细胞及银屑病跨膜模型增殖的特性。

关键词: Trappin-2;真核表达;HaCaT 细胞;器官培养;增殖
中图法分类号: R341;R394.2;R758.63 **文献标识码**: A

Trappin-2 inhibits the proliferation of HaCaT cells and transwell psoriatic skin organ culture models

YAN Heng, ZHAI Zhi-fang, ZHOU Chun-li, ZHONG Hua, HAO Fei (Department of Dermatology and Venereology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a eukaryotic expression vector of Trappin-2 gene and investigate its effect on the proliferation of HaCaT cells and transwell psoriatic skin organ culture models. Methods The pIRES2-EGFP-Trappin-2 expression vector was constructed by DNA recombinant technique and transfected into HeLa cells with lipofectamine™2000, then the supernatant containing Trappin-2 was added to HaCaT cells and transwell psoriatic skin organ culture models. ^{3}H-TdR incorporation, MTT method, cell cycle analysis and expression of Ki67 were used to examine their proliferation. Results Trappin-2 significantly inhibited the proliferation of HaCaT cells. Trappin-2 significantly decreased the proportion of the cells in G_2+S phase. Trappin-2 reduced the Ki67 expression in psoriatic skin models. Conclusion pIRES2-EGFP-Trappin-2 could be successfully transfected into HeLa cells, and the expressed Trappin-2 inhibits the proliferation of HaCaT cells and psoriatic skin models.

Key words: Trappin-2; eukaryotic expression; HaCaT cells; organ culture; proliferation

Trappin-2 蛋白为含有 117 个氨基酸的相对分子质量为 12.3×10^3 的分泌蛋白,编码基因位于 20q12.1-13.1,属于 Trappin 家族[1]。Trappin-2 蛋白主要由角质形成细胞及上皮细胞分泌,是一种内源性中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)抑制剂,通过降解 NE 有效地抑制 NE 活性。对于 Trappin-2 蛋白的研究目前更多关注于其作为内源性、特异性弹性蛋白酶抑制剂,所具有的抗菌和抗炎性损伤双重作用[2]。国外研究表明 Trappin-2 蛋白还参与了某些细胞的增殖调控。本研究构建了 Trappin-2 真核表达载体,进而观察高表达 Trappin-2 上清液对 HaCaT 细胞及银屑病跨膜器官培养模型增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 T_4DNA 连接酶、*Taq* 聚合酶、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司;PCR 引物由北京赛百盛生物技术公司合成。Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;G418 购自 Promega 公司。Trappin-2 的 ELISA 试剂盒购自荷兰 HyCult 公司。人宫颈癌 HeLa 细胞株、永生化角质形成细胞 HaCaT 细胞株及质粒 pIRES2-EGFP 由我科实验室保存。角质形成细胞无血清培养

作者简介:阎 衡,女,天津市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事银屑病方面的研究。电话:(023)68754491, E-mail: xtailai@yahoo.com.cn
通信作者:郝 飞,E-mail: haofei@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-07-10;修回日期:2008-01-14

基为 Gibco 公司产品。Ki67 单抗、通用型 ABC 试剂盒及 DAB 显色剂均购自中山公司。

1.1.2　皮肤标本来源　　8 例银屑病皮损标本均来自寻常型银屑病患者,男性 5 例,女性 3 例,年龄 23 ~ 58 岁,病程 2 ~ 25 年,均在躯干部位取材。

1.2　方法

1.2.1　重组质粒 pIRES2-EGFP-Trappin-2 的构建和鉴定　　设计引物用于扩增含自身信号肽序列的 Trappin-2 cDNA 片段。上游引物:5′-CCGGAATTCATGAGGGCCAGCAGCTT-3′,引入 *Eco*R Ⅰ 酶切位点;下游引物:5′-CGCGGATCCTCACTGGGGAACGAAACAG-3′,引入 *Bam*H Ⅰ 酶切位点。以 HaCaT 细胞的总 RNA 为模板,进行 Touchdown PCR,反应条件:98 ℃变性 10 s,71 ℃(每 1 个循环减温 0.5 ℃)退火 15 s,72 ℃延伸 40 s,共进行 22 个循环;然后,98 ℃变性 10 s,60 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 40 s,共 20 个循环。用限制性内切酶切割 PCR 产物和 pIRES2-EGFP,回收含 Trappin-2 cDNA 片段和载体片段,纯化后连接,采用菌落 PCR 和限制性内切酶对重组子进行初步鉴定,将可疑阳性重组子的质粒送上海生工公司测序。所构建的重组真核表达载体被命名为 pIRES2-EGFP-Trappin-2。

1.2.2　瞬时转染 HeLa 细胞及鉴定　　采用脂质体(Lipofectamine™ 2000)介导的方法将 pIRES2-EGFP-Trappin-2 和空载体 pIRES2-EGFP 各 4 μg 转染 HeLa 细胞,48 h 后予 0.6 g/L G418 筛选 7 d。以只加转染液的细胞为阴性对照组。Trappin-2 基因表达的鉴定:①增强型绿色荧光蛋白(EGFP)表达的检测:转染 36 h 后,激光共聚焦显微镜(LSM510 META,德国 Zeiss 公司)下观察阳性细胞;②RT-PCR 检测 Trappin-2 mRNA 的表达;③ELISA 法检测 Trappin-2 在细胞上清液中的表达。

1.2.3　Trappin-2 对 HaCaT 细胞增殖的影响　　实验分组:转染 pIRES2-EGFP-Trappin-2 上清液组,3 倍稀释的转染 pIRES2-EGFP-Trappin-2 上清液组,转染 pIRES2-EGFP 上清液组,及只加转染液的细胞上清液组作为对照。在各组上清液作用下,孵育 HaCaT 细胞 24 h,参照文献[3]进行如下实验。①MTT 实验:计算变化率 = [实验组 D(490)/对照组 D(490)] × 100%。② ^{3}H-TdR 掺入实验:并计算变化率 = (实验组 cpm/对照组 cpm) × 100%。

1.2.4　Trappin-2 对 HaCaT 细胞周期的影响　　转染 pIRES2-EGFP-Trappin-2 上清液及转染 pIRES2-EGFP 上清液作用于 HaCaT 细胞 24 h 后,用 FACscan 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson)测定细胞周期。并计算细胞增殖指数 PI = $(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)$。

1.2.5　Trappin-2 对银屑病跨膜器官培养模型 Ki67 免疫染色的影响　　参照文献[4],培养装置由双层 96 孔培养板组成,内层底部为一层孔径 74 μm 半透膜,角质形成细胞无血清培养基置于培养孔内外层之间。在半透膜中间打一 5 mm 直径的孔,直立放入银屑病皮损标本使其表皮位于膜上空气中而真皮浸于膜下液体中,即形成气、液相界面培养。转染 pIRES2-EGFP-Trappin-2 上清液及转染 pIRES2-EGFP 上清液分别作用于来源于同一患者的银屑病跨膜模型 24 h 后,常规免疫组织化学检测,S-P 法,DAB 显色,Ki67 阳性为细胞核着色。随机选择 3 个有代表性视野,计算阳性细胞占镜下细胞的百分比。

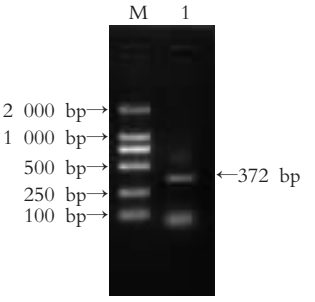
1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件,以单因素方差分析进行组间差异的比较。

2　结果

2.1　Trappin-2 全长 cDNA 的扩增

用 RT-PCR 扩增的 Trappin-2 全长 cDNA 为 372 bp(图 1)。

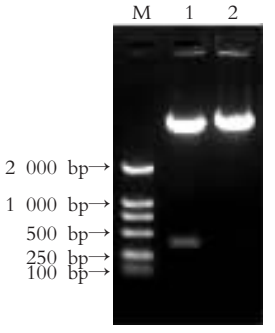


M: DNA 标准(DL 2000); 1: Trappin-2 全长 cDNA

图 1　Trappin-2 cDNA RT-PCR 产物电泳图

2.2　重组质粒 pIRES2-EGFP-Trappin-2 的酶切鉴定

重组质粒 pIRES2-EGFP-Trappin-2 经 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切鉴定(图 2),以及上海生工公司测序结果表明,所克隆序列与 GenBank 报告的 Trappin-2 基因序列完全一致。



M: DNA 标准(DL 2000); 1: pIRES2-EGFP-Trappin-2 经 *Eco*R Ⅰ + *Bam*H Ⅰ 双酶切; 2: pIRES2-EGFP-Trappin-2

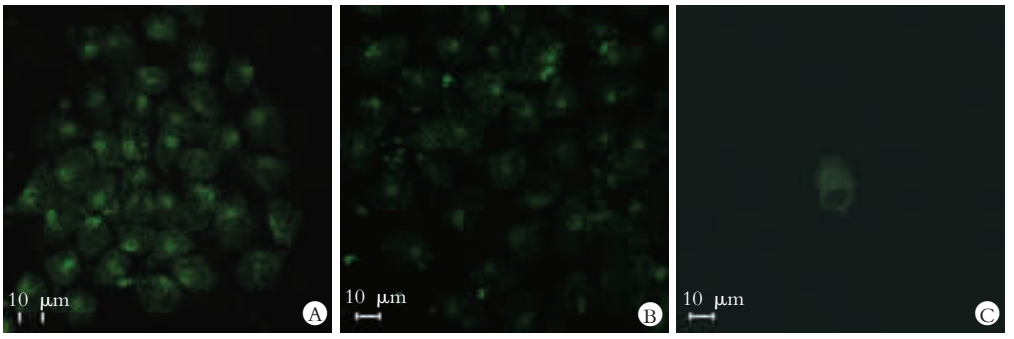
图 2　pIRES2-EGFP-Trappin-2 的酶切鉴定

2.3　Trappin-2 基因表达的鉴定

2.3.1　EGFP 的表达检测　　转染 36 h 后,用激光共聚焦显微镜可观察到 EGFP 的有效表达(图 3)。

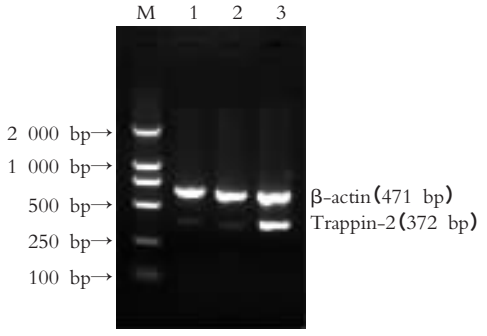
2.3.2　pIRES2-EGFP-Trappin-2 转染 HeLa 细胞的 RT-PCR 鉴定　　从转染后 HeLa 细胞中扩增出大小为 372 bp 的特异条带,高丰度表达,属内源性表达(图 4)。

2.3.3　Trappin-2 在 HeLa 细胞上清液中的含量　　转染 pIRES2-EGFP-Trappin-2、转染 pIRES2-EGFP 和未转染质粒的 HeLa 细胞上清液中 Trappin-2 浓度分别为(97.02 ± 8.13) ng/ml、(9.35 ± 3.42) ng/ml 和(7.15 ± 2.73) ng/ml。统计学分析表明,转染 pIRES2-EGFP-Trappin-2 的 HeLa 细胞上清液 Trappin-2 水平明显高于后两组($P < 0.01$),而后两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:pIRES2-EGFP-Trappin-2 转染 HeLa 细胞; B:pIRES2-EGFP 转染 HeLa 细胞;C:阴性对照

图3 转染不同质粒 HeLa 细胞的激光共聚焦显微镜检测结果



M:DNA 标准(DL 2000); 1:阴性对照; 2:pIRES2-EGFP 转染 HeLa 细胞; 3:pIRES2-EGFP-Trappin-2 转染 HeLa 细胞

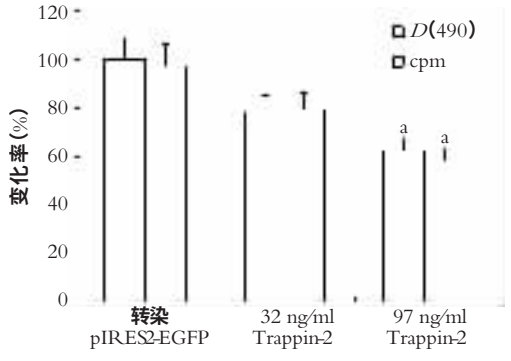
图4 pIRES2-EGFP-Trappin-2 转染 HeLa 细胞的 RT-PCR 鉴定

2.4 Trappin-2 对 HaCaT 细胞增殖的影响

不同浓度 Trappin-2 作用于 HaCaT 细胞后,MTT 法的变化率分别为 78.4% 和 62.3%,^{3}H-TdR 掺入法的变化率分别为 79.3% 和 58.2%,97 ng/ml 浓度的抑制作用更强于 32 ng/ml 浓度($P<0.01$)(图5)。

2.5 Trappin-2 对 HaCaT 细胞周期的影响

HaCaT 细胞在 97 ng/ml Trappin-2 条件下培养 24 h 后分析细胞周期的变化(表1),结果表明 G_1 期的细胞比例(65.2%)明显高于对照组(49.38%),细胞增殖指数(34.81%)显著低于对照组(50.7%)($P<0.01$)。表明 97 ng/ml Trappin-2 可通过某种机制抑制 HaCaT 细胞 DNA 合成,使细胞增殖停滞于 G_1 期。



a: $P<0.01$,与 32 ng/ml Trappin-2 比较

图5 Trappin-2 蛋白对 HaCaT 细胞增殖及 DNA 合成的影响

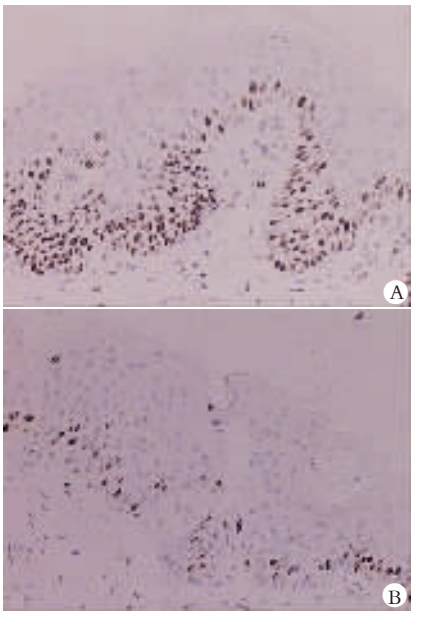
表1 Trappin-2 作用下 HaCaT 细胞细胞周期

组别	G_0/G_1	S	G_2/M	PI(%)
97 ng/ml Trappin-2	65.20±5.30[a]	30.37±2.60	4.97±0.90[a]	34.81±3.80[a]
转染 pIRES2-EGFP	49.38±4.20	35.65±3.10	15.18±1.40	50.70±4.60

a: $P<0.01$,与转染 pIRES2-EGFP 比较

2.6 Trappin-2 对银屑病跨膜器官培养模型 Ki67 免疫染色的影响

Ki67 在对照组银屑病皮损内呈阳性表达,阳性细胞百分比为(32.5±8.19)%,Trappin-2 作用组银屑病皮损 Ki67 表达明显减弱,阳性细胞百分比为(13.9±3.47)%,两组间差异显著($P<0.01$),表明 Trappin-2 可以下调银屑病皮损 Ki67 的表达(图6)。



A:对照组; B:Trappin-2 作用 24 h 后

图6 免疫组化法检测银屑病皮损中 Ki67 的表达 (S-P×200)

3 讨论

Trappin-2 蛋白 C 端由富含丝氨酸的 4 个二硫键结构核心组成,是结合及降解弹性蛋白酶的活性部位;

N 端由可变数目的 6 肽重复结构组成作为谷氨酰转移酶底物的锚状结构,可以将蛋白锚定于特定部位,该结构使 Trappin-2 蛋白与细胞外基质及角质形成细胞表面形成共价铰连[1]。外周血中 SLPI 等弹性蛋白酶抑制剂很难通过皮肤间隙,故 Trappin-2 蛋白是皮肤局部关键的弹性蛋白酶抑制剂。EGF、TNF-α、IL-1β 等细胞因子及低浓度 NE 可以诱导 Trappin-2 的表达,维甲酸可使其表达减少[5]。Trappin-2 蛋白在正常皮肤不表达,而表达于炎症性皮肤病及某些皮肤肿瘤,如银屑病和鳞状细胞癌,在表皮基底层上方表达阳性[6]。已证实 Trappin-2 蛋白与转谷胺酶(transglutaminase,TG)共同参与角质层的形成,促进角质形成细胞及癌细胞的分化,是角质形成细胞及某些癌症分化的标志蛋白。

已证实 Trappin-2 在治疗以 NE 为关键致病因素的急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、心肌炎、关节炎等疾病中发挥着重要作用[2]。Trappin-2 蛋白通过抑制 IκB 的降解而抑制 NF-κB 活性,从而有效减少 ICAM-1、IL-6、IL-8 等重要细胞因子的表达释放[7]。我们在前期研究中发现寻常型银屑病皮损组织液中 Trappin-2 蛋白表达水平显著增高,并高于外周血水平,且与病情活动相关,可以作为监测寻常型银屑病活动性的指标。Trappin-2 蛋白在银屑病中的高表达吸引我们对其可能的调控作用进行深入探究。

Zaidi 等[8]发现 Trappin-2 蛋白过表达可有效抑制动脉损伤后平滑肌细胞的增殖。最新 AACR 会议提出 Trappin-2 蛋白可作为乳腺癌新的治疗靶位,它可以促进上皮源性肿瘤细胞凋亡,并抑制上皮源性肿瘤细胞内 cyclinE 降解为小分子片段,从而减慢肿瘤细胞的增殖速率[9,10],我们推测 Trappin-2 蛋白可能同样参与了角质形成细胞的增殖调控。我们选择人永生化角质形成细胞株 HaCaT 细胞作为转染细胞,发现其表达 Trappin-2 蛋白的水平较低。遂将 pIRES2-EGFP-Trappin-2 瞬时转染 HeLa 细胞并获得高表达 Trappin-2 蛋白的培养上清,该上清明显抑制 HaCaT 细胞及银屑病跨膜模型的增殖,证实了 Trappin-2 蛋白具有抑制 HaCaT 细胞及银屑病角质形成细胞增殖的作用。由于银屑病突出表现为皮肤角质形成细胞的过度增殖,从而推测 Trappin-2 蛋白可能在参与调控银屑病增殖中发挥着某种作用,这正是一个探讨银屑病发病机制新的切入点。目前国内外关于 Trappin-2 蛋白参与增殖调控的研究较少,我们将在后续实验研究中用 Trappin-2 蛋白纯品作用于 HaCaT 细胞,再次验证其抑制 HaCaT 细胞增殖的作用,并探讨可能的作用机制和途径。

参考文献:

[1] Guyot N, Zani M L, Berger P, *et al*. Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for tryptase-mediated generation of elafin[J]. Biol Chem, 2005, 386(4): 391 – 399.

[2] McMichael J W, Maxwell A I, Hayashi K, *et al*. Antimicrobial activity of murine lung cells against Staphylococcus aureus is increased *in vitro* and *in vivo* after elafin gene transfer[J]. Infect Immun, 2005, 73(6): 3609 – 3617.

[3] 杨　波, 王志新. MMP-7 反义寡核苷酸抑制肺腺癌 A549 细胞体外增殖活性的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3): 250 – 252.

[4] 刘　玮, 赵庆利, 张新华, 等. 银屑病皮损免疫病理表型特征及其体外维持[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2000, 14(2): 79 – 81.

[5] Tanaka N, Fujioka A, Tajima S, *et al*. Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha stimulate its secretion *in vitro*[J]. Br J Dermatol, 2000, 143(4): 728 – 732.

[6] Liu H J, Moroi S, Yasumoto S, *et al*. Expression of elafin in extramammary Paget's disease[J]. Br J Dermatol, 2005, 152(3): 578 – 579.

[7] Henriksen P A, Hitt M, Xing Z, *et al*. Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa Bdependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli[J]. J Immunol, 2004, 172(7): 4535 – 4544.

[8] Zaidi S H, You X M, Ciura S, *et al*. Suppressed smooth muscle proliferation and inflammatory cell invasion after arterial injury in elafin-overexpressing mice[J]. J Clin Invest, 2000, 105(12): 1687 – 1695.

[9] Yokota T, Hunt K K, Keyomarsi K. Downregulation of elafin gene in breast cancer: A novel target [C/OL]// AACR Annual Meeting, Washington Convention Center. Washington, D. C., April 1 – 5, 2006; impact on cellular and molecular biology [2007 – 05 – 22]. http://www. aacrmeetingabstracts. org/cgi/content/abstract/2006/1/1154. html.

[10] Liu Y, Keyomarsi K, Lu X, *et al*. Induction of apoptosis in human breast cancer cells following adenovirus-mediated elafin gene expression *in vitro*[C/OL]//AACR Annual Meeting, Abstracts Convention Center, Anaheim, California, April16 – 20, 2005; impact on cellular and molecular biology [2007 – 05 – 22]. http:// www. aacrmeeting abstracts. org cgi/content/abstract/2005/1/1258. html.

(编辑　王　红)