DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.011
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)15-1357-03

论著

表皮角质形成细胞分化中 tPA 分泌的研究

连小华[1],杨 恬[2],蔡绍皙[1] ([1]重庆大学生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400044;[2]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 探讨表皮角质形成细胞中,tPA 分泌的变化及其对细胞分化的影响。方法 利用免疫细胞化学、酶联免疫吸附测定等方法,检测高浓度 Ca^{2+} 作用下,培养的小鼠分化表皮角质形成细胞表面及培养上清中 tPA 表达的变化。结果 高 Ca^{2+} 浓度下,KC 分化标记物 K10 在培养 24 h 即有较强的表达,与此同时,在培养上清中检测到大量分泌 tPA;培养 24 h 以后,随着培养时间的延长,KC 培养上清中分泌 tPA 的含量呈现出降低趋势,KC 表面 tPA 量则呈现出增加趋势,当有 L-精氨酸存在时,上述两种趋势均明显减弱。结论 小鼠表皮 KC 分化过程中存在 tPA 的分泌,分泌 tPA 能通过其赖氨酸位点进一步吸附于 KC 表面,进而促进 KC 的分化。

关键词:表皮角质形成细胞;分化;tPA;分泌
中图法分类号:Q556.9;R322.991;R329.26 文献标识码:A

Secretion of tPA in differentiation of epidermal keratinocyte

LIAN Xiao-hua[1], YANG Tian[2], CAI Shao-xi[1]([1]Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044; [2]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the changes of plasminogen activator (tPA) secretion and its effects on epidermal keratinocyte (KC) differentiation. Methods The immunocytochemical method (ICC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to determine the tPA amounts in culture supernatant as well as on cell surface of the differentiated mouse KCs cultured in high-calcium medium. Results The KC differentiation marker keratin 10 was strongly expressed 24 h after KCs being cultured in high-calcium medium, and a large amount of secreted tPA was detected in culture supernatant. A decrease in the amount of secreted tPA in culture supernatant and an increase in the amount of cell surface-associated tPA were found after the KCs being cultured for 24 h, but the decrease and the increase could be inhibited by L-arginine. Conclusion The tPA, secreted in the processes of KCs differentiation, can bind to the KCs surface through its lysine sites, and promote the tPA secreation.

Key words: epidermal keratinocyte; differentiation; tissue plasminogen activator (tPA); secretion

组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)是一种与表皮角质形成细胞(keratinocyte, KC)分化密切相关的蛋白水解酶,在原位表皮及体外培养的皮肤等同物模型中,tPA 的表达部位主要限于分化程度较高的棘层与颗粒层细胞,且数量与分化进程呈正相关[1,2]。在培养的表皮 KC 中,因高度分化而自行脱落的细胞中 tPA 含量明显高于分化程度低的未脱落细胞的含量[3]。此外,在有血清培养条件下,tPA 仅在分层克隆最表面的细胞中表达[4]。tPA 已被认为是一种调节表皮细胞分化的新因子,但对于 tPA 在 KC 分化中如何发挥作用、其作用过程有何特点和可调节位点,目前少见文献涉及。对此,本研究加以了探讨。

1 材料和方法

1.1 KC 的培养及处理

参照 Lian 等[5]的方法,将来自于新生小鼠(1 d)的 KC 培养于 DMEM/F12 培养基中,添加 10% FBS,传代后以 1×10^4/ml 的密度将细胞分别接种于 96 孔培养板及放置有盖玻片的 24 孔培养板中。用含有高浓度 Ca^{2+}(1.5 mmol/L)的 KC 无血清培养基(K-FEM)加以培养,根据在培养基中是否添加 0.1 mol/L 的 L-精氨酸(华美生物工程有限公司),将培养细胞分为两个实验组,即:L-精氨酸组、无 L-精氨酸组,96 孔培养板中每一实验组接种双孔。以不含 Ca^{2+} 的 K-FEM 作为对照。

1.2 用于 ELISA 检测的条件培养基及细胞的制备

于培养 0、24、48、72、96 h 时相点,收集 96 孔板各实验组细胞的培养上清,离心(1 000 r/min 离心 10 min)后,取上清,于

基金项目:中国高等院校重点实验室访问学者基金资助项目(2003-2-7)
Supported by Visiting Scholar Foundation of Key Lab. the Higher Educational Institutions in China (2003-2-7)
作者简介:连小华(1965-),女,重庆市人,博士,副教授,主要从事表皮分化调控方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)68752264
收稿日期:2004-03-29;修回日期:2004-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

－80 ℃保存备用。

用0.01 mol/L PBS 清洗培养板中的细胞，用4% 的多聚甲醛室温固定 15 min，0.01 mol/L PBS 清洗、晾干，4 ℃保存备用。

1.3 培养 KC 分泌 tPA ELISA 检测

从－80 ℃取出上述已制备好的 KC 培养上清，分别加入 48 孔酶标板中，于 4 ℃过夜。用含 0.1% 的 gelatine 与 0.01 mol/L 的 NaN_3 的 PBS 液封闭非特异性的位点，参照文献[6]的方法进行 KC 培养上清中 tPA ELISA 的检测。tPA 单抗（购自 American diagnostica，USA）工作浓度为 2.5 μg/ml。

1.4 细胞表面 tPA 的 ELISA 检测

从 4 ℃取出上述已固定的 96 孔板细胞，用含 0.1% 的 gelatine 与 0.01 mol/L 的 NaN_3 的 PBS 液封闭非特异性的位点，参照文献[6]的方法进行细胞表面 tPA 的 ELISA 检测。tPA 单抗（购自 American diagnostica，USA）工作浓度为 2.5 μg/ml。

1.5 培养细胞的分化程度的检测

于培养 0、24、48、72、96 h 时相点取出 24 孔板中的培养细胞，用 0.01 mol/L PBS 清洗，4% 的多聚甲醛室温固定 15 min，0.01 mol/L PBS 再清洗、晾干，经羊血清封闭 30 min，按 SABC 法进行 KC 分化标记物 keratin 10（K10）的免疫细胞化学染色（immunocytochemical stain，ICC）。加入 K10 单抗（Neomarkers，USA，按1∶100 稀释）于 37 ℃孵育 1 h，抗体结合情况用卵白素-生物素标记的过氧化物酶及 DAB 加以显色。K10 单抗及二抗、三抗、封闭用羊血清均为即用型试剂（购自武汉博士得公司），DAB 显色用 DAB 显色试剂盒（购自武汉博士得公司）。

1.6 统计学方法

K10 ICC 阳性产物的平均光密度（A）值，用 Tiger 图像分析软件加以测定，实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件进行重复测量的方差分析。

2 结果

2.1 培养 KC 分泌 tPA 的检测结果

KC 培养上清 ELISA 结果表明，高 Ca^{2+} 浓度下，培养上清中 tPA 的量明显高于对照（$P<0.01$），在培养 24 h 时达到高峰。24 h 之后，培养上清中 tPA 量逐渐降低，72 h 时达最低。L-精氨酸的加入，可明显抑制培养 24 h 后培养上清 tPA 量降低的趋势，见表 1。

2.2 培养 KC 表面 tPA 检测结果

培养 KC 表面 tPA ELISA 结果表明，与对照相比，高 Ca^{2+} 浓度条件下，培养 KC 表面的 tPA 在培养 48、72 h 后发生明显的增加（$P<0.01$），在 72 h 时达高峰，但在 L-精氨酸加入后，KC 表面 tPA 量显著降低，见表 2。

2.3 培养 KC 分化程度检测结果

KC 分化标记物 K10 表达定量分析结果（表 3）显示，在没有 L-精氨酸存在的情况下，与对照相比，经高 Ca^{2+} 浓度培养 24 h 的 KC 中 K10 表达量已发生显著的增加（$P<0.01$），而此时细胞形态也发生变化：胞体明显增大、趋于扁平，胞质中有较多的 K10 抗原阳性颗粒存在，阳性颗粒分布于整个胞质，呈黄色或棕黄色，见图 1 A、B。

L-精氨酸加入后，高 Ca^{2+} 浓度下培养的各时相点 KC 中 K10 表达量均发生减少，72 h 时相点时 K10 量降至最低（表 3），此时可见细胞中 K10 抗原阳性颗粒数量明显减少，阳性颗粒颜色由强阳性的棕黄色或深棕色转变为弱阳性的淡黄色，见图 2A、B。

表1 高 Ca^{2+} 浓度下培养 KC 上清中 tPA 含量的变化（ng）

Tab 1 Changes of tPA in supernatant of keratinocytes cultured in high-calcium medium（ng）

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	F	P
Without L-arginine	Control	0.03±0.01	41.31±1.56	20.61±1.16	14.04±1.23	15.60±1.47		
	H-Ca^{2+}	0.03±0.02	129.44±0.02 **▲▲	73.1±2.29 **▲▲	35.16±1.86 **▲▲	35.35±1.59	4944.4	0.000
With L-arginine	Control	0.03±0.01	29.26±1.02	27.0±1.63	26.25±1.56	27.37±1.48		
	H-Ca^{2+}	0.10±0.12	117.16±4.87 **▲▲	94.02±3.26 **▲▲	88.50±3.14 **	89.02±2.97	2489.79	0.000

**：$P<0.01$，*vs* the previous time-phase；▲▲：$P<0.01$，*vs* control

表2 高 Ca^{2+} 浓度下培养 KC 表面 tPA 含量的变化（ng）

Tab 2 Changes of cell surface-associated tPA on the surface of the keratinocytes cultured in high-calcium medium（ng）

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	F	P
Without L-arginine	Control	1.82±0.13	2.15±0.20	3.32±0.21	3.37±0.19	3.41±0.26		
	H-Ca^{2+}	2.11±0.17	1.32±0.12	37.22±0.00 **▲▲	91.18±3.85 **▲▲	90.65±3.43	855.39	0.000
With L-arginine	Control	1.18±0.09	1.55±0.13	1.72±0.16	1.9±0.18	1.88±0.14		
	H-Ca^{2+}	1.60±0.18	1.27±0.07	5.29±0.39 **	6.38±0.47	5.94±0.46	174.94	0.000

**：$P<0.01$，*vs* the previous time-phase；▲▲：$P<0.001$，*vs* control

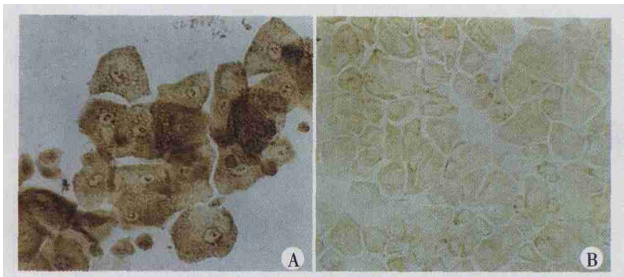
表3 高 Ca^{2+} 浓度下培养 KC 中 K10 表达定量分析结果

Tab 3 Quantitative analysis results of K10 expression in keratinocytes cultured in high-calcium medium

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	F	P
Without L-arginine	Control	1.98±0.16	2.05±0.17	1.89±0.12	1.93±0.17	1.90±0.21		
	H-Ca^{2+}	2.14±0.21	4.31±0.38 **	5.27±0.49 **	6.87±0.53 **	5.76±0.50 **	111.96	0.000
With L-arginine	Control	1.87±0.13	1.96±0.16	1.88±0.13	1.89±0.14	1.92±0.17		
	H-Ca^{2+}	2.06±0.19	3.57±0.23▲▲	3.65±0.22▲▲	3.78±0.24▲▲	3.71±0.26▲▲	132.76	0.000

**：$P<0.01$，*vs* control；▲▲：$P<0.01$，*vs* without L-arginine

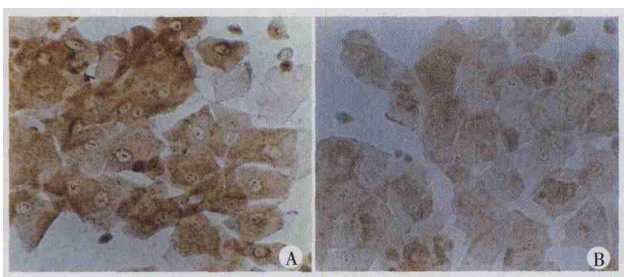
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Medium with high-calcium (1.5 mmol/L); B: Medium without calcim (control)

图 1　培养 24 h 表皮角质细胞中 K10 的免疫细胞化学染色　(SABC× 400)

Fig 1　Immunocytochemical analysis of keratin 10 in mouse keratinocyte cultured for 24 h　(SABC× 400)



A: Medium without L-arginine; B: Medium with L-arginine

图 2　高钙培养 72 h 表皮角质细胞中 K10 的免疫细胞化学染色　(SABC× 400)

Fig 2　Immunocytochemical analysis of keratin 10 in mouse keratinocyte cultured for 72 h　(SABC× 400)

3　讨论

在培养表皮 KC 中, tPA 能分泌到胞外发挥作用已得到许多研究的证实[4-6], 但对于分化的 KC 否能分泌 tPA, 目前尚少有研究涉及。本实验中, 在高浓度 Ca^{2+} 作用下, KC 分化标记物 K10 在培养 24 h 即有较强的表达, 与此同时, 在培养上清中检测到大量的 tPA, 从而证实表皮 KC 分化的过程中存在 tPA 的分泌。tPA 是一种与 KC 分化密切相关的蛋白酶[7], 但至今仍不清楚 tPA 影响 KC 分化的机制, 本研究的上述结果提示 tPA 表达后分泌到胞外可能是其影响 KC 分化的一条途径。

在黑色素瘤细胞及内皮细胞中, 已发现分泌到细胞外的 tPA 随着培养时间的延长, 可通过其分子结构上的赖氨酸位点附着于细胞的表面[8,9]。L-精氨酸可与 tPA 分子中的赖氨酸位点竞争 KC 表面的吸附位点, 进而抑制 tPA 对 KC 表面的附着[9]。本实验中, 在高 Ca^{2+} 浓度下, KC 经 24 h 培养后, 随着培养时间的延长, 培养上清中分泌 tPA 的含量呈现出降低趋势, 而 KC 表面 tPA 量则呈现出增加趋势, 当有 L-精氨酸存在时, 上述两种趋势均明显减弱, 由此表明, 在分化的表皮 KC 中, tPA 分泌到胞外后, 也能通过其赖氨酸位点进一步吸附于 KC 表面, 本研究这一结果在以往研究中少见有相关的报道。

进一步分析本实验的结果可表明, L-精氨酸的加入不仅减少了分泌 tPA 对 KC 表面的附着, 同时也对 KC 分化产生影响, 因为在有 L-精氨酸存在时, 高 Ca^{2+} 浓度下培养 72h 的 KC 中 K10 阳性表达程度发生明显减弱, 表明在培养的表皮 KC 中, 分泌到胞外的 tPA 能通过其分子结构中的赖氨酸位点与 KC 表面结合, 进而促进 KC 的分化。以往在内皮细胞、成纤维细胞及神经小胶质细胞中均发现, 外源性 tPA 在与细胞表面特定分子结合后, 能激活细胞内 PKA、PKC 等胞内信使系统, 促进细胞的增殖[10,11], 由此推测, 我们实验中分泌 tPA 附着于 KC 表面后, 或许也是通过激活某一细胞信号转导途径, 对分化相关的基因, 如 K10 等的表达加以调节, 从而对分化产生影响, 但这需要得到更多实验的证实。

参考文献:

[1] Kuwae K, Matsumoto-miyai K, Yoshida S, *et al*. Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathological skin samples [J]. Mol Pathol, 2002, 55(4): 235-241.

[2] Chen C S, Lyons-Giordano B, Lazarus G S, *et al*. Differential expression of plasminogen activators and their inhibitors in an organotypic skin coculture system[J]. J Cell Sci, 1993, 106(pt1): 45-53.

[3] Jensen P J, John M, Baird J. Urokinase and tissue type plasminogen activators in human keratinocyte culture[J]. Exp Cell Res, 1990, 187(1): 162-169.

[4] Chen C S, Jensen P J. Serum is a potent stimulator of keratinocyte tissue plasminogen activator expression[J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(2): 238-242.

[5] Lian X H, Yang T, Xiang M M. Roles of tissue plasminogen activator in epidermal stratification[J]. Colloids and SurfacesB: Biointerfaces, 2003, 27(2-3): 231-240.

[6] Buessecker F, Reinartz J, Kramer M D. tPA of human keratinocytes: contribution to cell surface-associated plasminogen activation and upregulation by retinoic acid[J]. Exp Dermatol, 1995, 4(6): 357-364.

[7] Weckroth M, Vaheri A, Myohanen H, *et al*. Differential effects of acute and chronic wound fluids on urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and tissue-type plasminogen activator in cultured human keratinocytes and fibroblasts[J]. Wound Repair Regen, 2001, 9(4): 314-322.

[8] Bizik J, Trancikova D, Felnerova D, *et al*. Spatial orientation of tissue-type plasminogen activator bound at the melanoma cell surface[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239(1): 322-328.

[9] Welling T H, Huber T S, Messina L M, *et al*. Tissue plasminogen activator increases canine endothelial cell proliferation rate through a plasmin-independent, receptor-mediated mechanism[J]. J Surg Res, 1996, 66(1): 36-42.

[10] Copeta A, Tavian D, Marchina E, *et al*. Gene response of human skin fibroblasts to urokinase- and tissue-type plasminogen activators[J]. Growth Factors, 2000, 17(4): 249-268.

[11] Siao C J, Tsirka S E. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation *via* its finger domain through annexin II[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3352-3358.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net