文章编号:1000-5404(2003)12-1069-04

论著

小鼠表皮角质形成细胞中 TNF-α 对 PAI-2 表达的调节

连小华,杨 恬 (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 TNF-α 对 PAI-2 表达的调节及其生物学意义。方法 利用免疫细胞化学、TUNEL 反应及免疫细胞化学/TUNEL 双标等方法,观察 TNF-α 作用下,培养的表皮角质形成细胞及其脱落细胞中 PAI-2 表达的变化及凋亡发生的情况。结果 在 TNF-α 作用下,脱落细胞中 PAI-2 的表达明显增加,凋亡细胞的数量增多,PAI-2 在凋亡细胞中的表达也增强,而在一些胞体较大、形态呈多角形的凋亡细胞中 PAI-2 表达的增加更为明显。结论 在高度分化的表皮角质形成细胞中,TNF-α 可促进 PAI-2 的表达并可诱导凋亡的产生,就与 KC 凋亡的关系而言,TNF-α 所诱导的 PAI-2 可分为两种,一种与 KC 凋亡有关,另一种与 KC 凋亡无关。

关键词:PAI-2;TNF-α;表皮角质形成细胞;表达调节
中图法分类号:R322.99^{+}1;R392.2 文献标识码:A

Regulatory effect of TNF-α on the expression of PAI-2 in epidermal keratinocytes

LIAN Xiao-Hua, YANG Tian (Department of Cellular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of TNF-α on the expression of plasminogen activator inhibitor 2(PAI-2) and its biological significance. Methods Using immunocytochemistry(ICC), terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated end labeling (TUNEL) and ICC/TUNEL double-label methods, the expression of PAI-2 in and the apoptosis of the cultured epidermal keratinocytes treated by TNF-α were detected. Results After the mouse epidermal keratinocytes were incubated with TNF-α, compared with the unshed cells, the expression of PAI-2 in shed cells and the cellular apoptosis increased obviously. The increased PAI-2 expression also appeared in the apoptotic cells, especially in larger and multi-angled apoptotic cells. Conclusion In highly differentiated epidermal keratinocytes, TNF-α can enhance the expression of PAI-2 as well as apoptosis. Furthermore, according to the relation with the keratinocytes apoptosis, there are two types of PAI-2 induced by TNF-α, one of which is related to apoptosis, but the other is not.

Key words: plasminogen activator inhibitor 2; TNF-α; keratinocyte; regulation of expression

2型纤溶酶原激活剂抑制剂(Plasminogen activator inhibitor 2, PAI-2)是表皮角质形成细胞(Keratinocyte, KC)中一种重要的纤溶酶原激活剂抑制剂,因其主要表达于分化程度较高的 KC 中,且可存在于角质壳[1,2],故被认为是一种与 KC 终末分化相关的重要因子,但对于 PAI-2 在表皮 KC 分化过程中表达的调节及其作用,目前所知甚少。

TNF-α 是表皮 KC 分化中起着重要作用的一种因子,在 KC 终末分化阶段,能促进角质壳的形成、细胞凋亡的发生及某些 KC 高度分化标记物,如 SKALP 等的表达[3~5]。TNF-α 是否也是表皮 KC 分化过程中 PAI-2 表达的调节者,本研究对此作了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胚胎龄 21 d 的昆明种小鼠胚胎(第三军医大学实验动物中心),公司 DMEM/F12 培养液、胎牛血清、角质形成细胞无血清培养基(GIBCO),细胞凋亡原位检测(TUNEL 反应)试剂盒(Promega 公司)、TNF-α(邦定公司)、DNA 酶Ⅰ(*DNase* Ⅰ)(华美公司),PAI-2 单抗(American dianostica 公司),免疫细胞化学即用型试剂盒、DAB 显色试剂盒(博士得公司)。

1.2 细胞原代及传代培养

取 21 d 胚胎龄小鼠皮肤,按 Hennings 等[6] 的方法,对小鼠表皮 KC 进行培养,培养基选用 10% FBS/DMEM。5 d 后,细胞经 0.25% 胰酶消化,接种于多聚赖氨酸处理过的盖片上,于 10% FBS/DMEM 中继续培养。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870390,30270671)
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。电话:(023)68752264
通信作者:杨 恬,E-mail:tiany@163.net
收稿日期:2003-01-10;修回日期:2003-04-10

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

1.3 培养 KC 及其脱落细胞的处理及制备

将传代 3 d 的培养 KC 分别置于含 TNF-α(10 ng/ml)的和不含 TNF-α 无血清培养基中，继续培养 6、12、24、48、72 h，将各时相点培养细胞用 D-Hanks 液清洗，4%多聚甲醛固定，以备作免疫细胞化学检测。以在不含 TNF-α 无血清培养基培养的 KC 作为对照。

将各时相点培养 KC 的培养基离心弃上清后，4%多聚甲醛室温固定 15 min，再离心弃上清，加入 2 ml 0.01 mol/L PBS 液制细胞悬液(1×10^3/ml)，取 100 μl 悬液滴于载玻片上，空气干燥，−20 ℃保存，以备作免疫细胞化学、TUNEL 检测。

1.4 免疫细胞化学染色(Immunocytochemistry，ICC)

已固定的各时相点培养细胞及其脱落细胞，经羊血清封闭 30 min，按 ABC 法进行 ICC，PAI-2 单抗工作浓度为 25 μg/ml，二抗、三抗、封闭用羊血清均为即用型试剂，显色用 DAB 显色试剂盒(购自武汉博士得公司)。以 PBS 代替一抗作为阴性对照，阳性对照为已知 PAI-2 阳性的、培养的人包皮 KC。

1.5 TUNEL 检测

按细胞凋亡检测试剂盒的说明操作，已固定的各时相点培养细胞的脱落细胞经 0.1% Triton X-100 室温处理 2 min；25 μl TUNEL 反应混合液(含末端转移酶及荧光素标记的 dNTP 混合物)，37 ℃孵育 1 h；25 μl Converter-AP 液(含抗荧光素抗体)，37 ℃孵育 30 min；25 μl NBT/BCIP 液，室温染色 12 min。

以不含末端转移酶 TUNEL 反应混合液替代 TUNEL 反应混合液，设立阴性对照，以经 *DNase* Ⅰ 室温处理 10 min 的脱落 KC 作为 TUNEL 反应的阳性对照，胞核中有蓝色至深蓝色颗粒出现的细胞视为 TUNEL 反应阳性细胞。

1.6 PAI-2 ICC 与 TUNEL 反应双标检测

参照文献[7]的方法进行，先行 PAI-2 ICC，后作 TUNEL 反应，ICC 与 TUNEL 反应的过程、条件及对照的设置均同前。

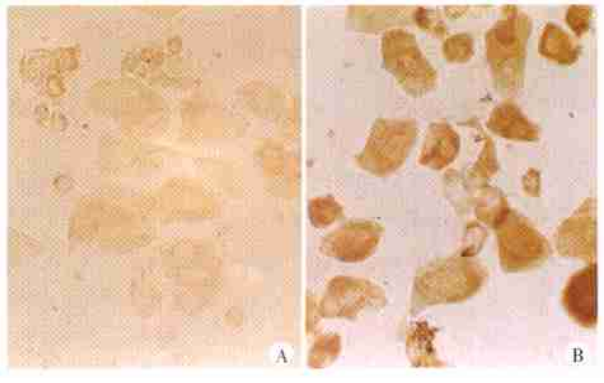
1.7 统计学分析

在高倍镜下(400 倍)记数 6 个视野内 TUNEL、ICC 阳性细胞的平均百分率，结果以%，$\bar{x}\pm s$ 表示，采用方差分析比较各组间的差异。

2 结果

2.1 TNF-α 对小鼠表皮 KC PAI-2 表达的作用

TNF-α 作用不同时相点，小鼠表皮培养 KC 及其脱落细胞中 PAI-2 ICC 阳性表达结果见表 1。从表中可看到，培养 KC 经 TNF-α 作用后，PAI-2 表达阳性率与对照相比无明显的变化，而培养 KC 的脱落细胞经 TNF-α 作用 18 h 后，PAI-2 表达阳性率与对照组相比发生增加($P<0.05$)，尤以 TNF-α 作用 24 h 时，PAI-2 阳性率为最高($P<0.01$)，阳性颗粒呈棕黄色至棕色，为中度及强阳性表达，见图 1。



A: Treated without TNF-α; B: Treated with TNF-α for 24 h

图 1 培养 3 d 的 KC 脱落细胞 PAI-2 ICC (ABC× 400)

Fig 1 Immunocytochemical results of PAI-2 in the cells shedded from 3-day-cultured KC (ABC× 400)

表 1 TNF-α 作用不同时相点，小鼠表皮培养 KC 及其脱落细胞中 PAI-2 ICC/细胞凋亡结果($n=6$，cell/mm²，%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Results of PAI-2 ICC and apoptosis in murine epidermal KC as well as their shed cells after treatment with TNF-α at different time points($n=6$，cell/mm²，%，$\bar{x}\pm s$)

	Culture of time(h)					
	6	12	18	24	48	72
Cultured KC						
Control	2.2±0.13	3.4±0.11	4.3±0.21	3.9±0.35	4.0 ±0.63	4.2±0.57
Treating with TNF-α	3.0±0.51	4.1±0.29	3.8±0.13	4.8±0.75	2.86±0.69	3.1±0.15
In the cells shedded from cultured KC						
Control	5.6±0.13	4.9±0.18	6.0±1.9	5.7±0.32	5.1 ±0.46	6.3±1.8
Treating with TNF-α	6.0±0.48	5.8±0.21	10.3±0.46*	30.4±0.21**	20.7±0.33**	15.4±0.16**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.2 TNF-α 对小鼠表皮培养 KC 脱落细胞凋亡的作用

TNF-α 作用不同时相点，小鼠表皮培养 KC 脱落细胞 TUNEL 反应阳性结果见表 2。从表 2 中可看到，在 TNF-α 作用 18 h 后，与对照组相比，脱落细胞中发生凋亡的细胞数量增多($P<0.05$)，在形态上除一些小圆细胞外，一些多角形、胞体较大的细胞也发生了凋亡，TNF-α 作用 24 h 时，脱落细胞的凋亡率达最高，见图 2。

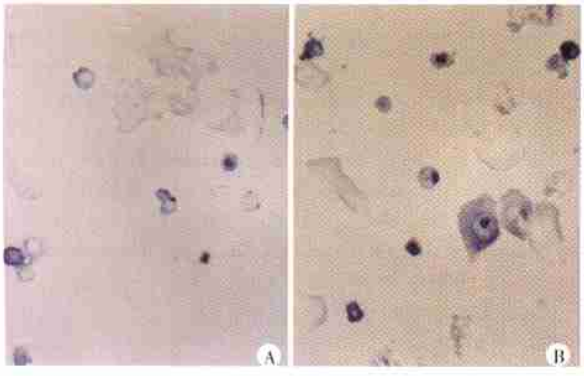
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　TNF-α 作用不同时相点, 小鼠表皮培养 KC 及其脱落细胞中细胞凋亡结果($n=6$, cell/mm², %, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Results of apoptosis in murine epidermal KC as well as their shed cells after treatment with TNF-α at different time points($n=6$, cell/mm², %, $\bar{x}\pm s$)

	Culture of time(h)					
	6	12	18	24	48	72
Cultured KC						
Control	0.89±0.32	1.3±0.27	1.4±0.53	1.6±0.63	1.1±0.39	1.4±0.62
Apoptosis	1.0 ±0.23	1.8±0.69	2.1±0.55	1.7±0.14	1.4±0.85	1.5±0.51
In the cells shedded from cultured KC						
Control	1.8 ±0.14	2.3±0.53	2.1±0.21	2.4±0.32	1.7±0.52	1.9±0.46
Apoptosis	2.1 ±0.11	3.2±0.32	5.2±0.67 *	10.1±0.19 *	6.3±0.14 *	5.5±0.41 *

*: $P<0.05$ *vs* control



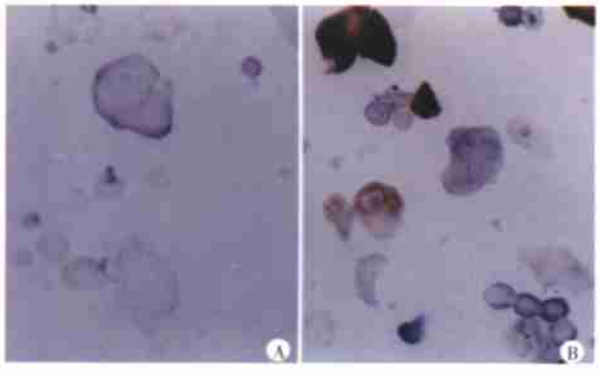
A: Treated without TNF-α; B: Treated with TNF-α for 24 h

图 2　培养 3 d KC 脱落细胞 TUNEL 反应　(×400)

Fig 2　Double-label results by immunocytochemistry and TUNEL reaction in the cells shedded from 3-day cultured KC　(×400)

2.3　TNF-α 诱导的培养 KC 脱落细胞中, PAI-2 的表达与细胞凋亡的关系

小鼠表皮培养 KC 脱落细胞 PAI-2 ICC/TUNEL 反应双标结果显示, 在经 TNF-α 处理后, 伴随着细胞凋亡的增加, PAI-2 在凋亡细胞中的表达也增强, 而在一些胞体较大、形态呈多角形的凋亡细胞中 PAI-2 表达的增加更为明显; 此外, 在一部分未发生凋亡的细胞中, PAI-2 的表达也发生了增加。见图 3。



A: Treated without TNF-α; B: Treated with TNF-α for 24 h

图 3　培养 3 d KC 脱落细胞 ICC/TUNEL 双标　(×400)

Fig 3　Double-label results of ICC/TUNEL reaction in the cells shedded from 3-day-cultured KC　(×400)

3　讨论

TNF-α 是对表皮 KC 有着重要作用的因子, 在 KC 分化过程中, TNF-α 除能促进与 KC 终末分化相关的角质壳的形成及细胞凋亡的发生外, 还能调节某些 KC 分化标记物的表达[3~5]。但对于在小鼠表皮 KC 分化中, TNF-α 是否能调节 PAI-2 的表达, 目前尚属未知。

已经知道, 在体外培养条件下, 表皮 KC 只有在分化达到较高程度时, 才可自发脱落, 自发脱落的 KC 常被认为是高分化的细胞[8]。本实验中, 在 TNF-α 作用下, 与未脱落的培养 KC 相比, 脱落的培养 KC 中 PAI-2 表达明显增强, 在 TNF-α 作用 24 h 时达到高峰, 表明在小鼠表皮 KC 中, TNF-α 可以时间依赖方式促进 PAI-2 的表达, 但这一作用与 KC 的分化程度相关, 在高度分化的 KC 中, TNF-α 是 PAI-2 表达的调节因素之一。TNF-α 能促进 PAI-2 的表达, 在人血管内皮细胞、黑素细胞、巨噬细胞的相关研究中也有报道[9, 10], 与这些研究结果相比, 本研究更进一步地说明了 TNF-α 调节 PAI-2 的方式为时间依赖性, 调节的过程与细胞分化相关。进一步分析本实验结果可表明, TNF-α 促进 PAI-2 表达的过程, 也促进了着 KC 凋亡的发生, 因为经 TNF-α 作用后, 培养 KC 脱落细胞中, 发生凋亡的细胞明显增加, 表明 TNF-α 诱导了分化程度较高的 KC 发生凋亡。在小鼠表皮 KC 中, 有关 TNF-α 对细胞凋亡的直接作用, 未见报道。

以往的研究表明, 在 TNF-α 诱导的细胞凋亡中, PAI-2 则可通过降低 TNF-α 受体的表达或直接作用于蛋白水解酶, 抑制 TNF-α 所激活的细胞内蛋白水解反应[11, 12], 对细胞起保护作用。在本实验中, 经 TNF-α 作用后, 培养 KC 脱落细胞中 PAI-2 表达与凋亡均在 24 h 发生明显增加, 而在凋亡的细胞中也检测到 PAI-2 蛋白质的存在, 表明在表皮 KC 中, PAI-2 表达与凋亡有相关性。

本实验中 PAI-2 也表达于一些非凋亡 KC 中, 由此推测: 在表皮 KC 中, TNF-α 所诱导的、与 KC 分化相关的 PAI-2, 可能包括两种, 一种与 KC 凋亡有关, 另一种与 KC 凋亡无关。已证实在表皮 KC 中, PAI-2 可在蛋

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

白水解酶的作用下，于其活性中心环上发生裂解，形成稳定、松弛的结构[13]，PAI-2 可以裂解型与非裂解型两种形式存在于细胞中。因在白血病细胞中发现，裂解型 PAI-2 可持续表达于凋亡细胞中，而非裂解型 PAI-2 则存在于非凋亡细胞中[14]，在本实验中，在凋亡 KC 中表达的 PAI-2 是否就属裂解型、在非凋亡 KC 中表达的 PAI-2 是否就属非裂解型，对此，还应作进一步的探讨。

参考文献：

[1] Jensen P J. Plasminogen activator inhibitor type 2: an intracellular keratinocyte differentiation product that is incorporated into the cornified envelope [J]. Exp Cell Res, 1995, 217(1): 65—71.

[2] Robinso N A, Lapis S, Welter J F, *et al*. S100A11, S100A10, annexin Ⅰ, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes[J]. J Biol Chem, 1997, 272(18): 12035—12046.

[3] Pillai S, Bikle D D, Eessalu T E, *et al*. Binding and biological effects of tumor necrosis factor alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocyte [J]. J Clin Invest, 1989, 83(3): 816—821.

[4] Basile J R, Zacny U, Munger K. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratiocytes expressing the human papillomavirus-116 ET oncoprotein[J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22522—22528.

[5] Pfundt R, Wingens M, Bergers M, *et al*. TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway[J]. Arch Dermatol Res, 2000, 292(4): 180—187.

[6] Hennings H, Michael D, Cheng C, *et al*. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermis cells in culture[J]. Cell, 1980, 19(1): 245—254.

[7] 林科雄，王长征，钱桂生. 地塞米松及霍公藤甲素对哮喘 CD4、CD8 细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2000，22(2)：132—134.

[8] Pearton D J, Nirunsuksiri W, Rehemtulla A, *et al*. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates[J]. EXP Dermatol, 2001, 10(3): 193—200.

[9] Mahony D, Stringer B W, Dicknson J L, *et al*. DNase Ⅰ hypersensitive sites in the 5′ flanking region of the human plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) gene are associated with basal and tumor necrosis factor-alpha-induced transcription in monocytes[J]. Eur J Biochem, 1998, 256(3): 550—559.

[10] Zoellner H, Wojta J, Gallicchio M, *et al*. Cytokine regulation of the synthesis of plasminogen activator inhibitor-2 by human vascular endothelial cells. Comparison with plasminogen activator inhibitor-1 synthesis[J]. Thromb Haemost, 1993, 69(2): 135—140.

[11] Kumar S, BagLioni C. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by overexpression of plasminogen activator inhibitor type-2[J]. J Biol Chem, 1991, 266(31): 20960—20964.

[12] Dickinson J L, Bates E J, Ferrante A, *et al*. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor α-induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 1995, 270(46): 27894—27904.

[13] Risse B C, Chung N M, Beker M S, *et al*. Evidence for intracellular cleavage of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) in normal epidermal keratinocytes[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(2): 281—289.

[14] Jensen P H, Cressey L I, Gjertsen B T, *et al*. Cleaved intracellular plasminogen activator inhibitor 2 in human myeloleukaemia cells is a marker of apoptosis[J]. Br J Cancer, 1994, 70(5): 834—840.

（编辑 薛国文）

（上接 1068 页）

2 讨论

误诊原因分析：① 斯氏肺吸虫病临床表现复杂多变，无特异性症状[1]。肺吸虫病常表现出咳嗽、低热、乏力，其胸部 X 线也缺乏特异性。本组病例中 18 例做胸部 X 线检查，16 例出现胸腔积液，10 例提示肺纹理增多，8 例示肺部边缘模糊低密度阴影。和肺炎、肺结核、结核性胸膜炎、支气管扩张相似，极易误诊。但普通肺炎病程短，病情变化快；肺结核表现有午后潮热、慢性消耗性体质，且肺吸虫病血痰多为铁锈色或棕褐色，肺结核血痰多为鲜红色。这些均有助于鉴别。②肺吸虫病不易查到病原体。人为斯氏肺吸虫的非适宜终宿主，痰和粪便中很难查见虫卵，且皮下包块活组织检查也不易找到虫体。本组病例无一找到虫卵，包块活检仅有 2 例检测到斯氏肺吸虫童虫。③基层医疗单位缺乏特异性的检测手段。医务人员对本病认识不足，缺乏经验，病史收集不全面，思考问题简单、片面。肺吸虫抗原皮试是本病检测的一个简单、方便、有效的手段，但目前抗原皮试液为粗抗原，试剂需冷冻保存，有一定的使用时间；与多种疾病特别是吸虫病可出现交叉反应，影响结果的判断。在许多基层单位使用有一定困难。因此，肺吸虫抗原的血清学诊断显得尤其重要[2]。

加强卫生健康教育，做好防治工作：以往的肺吸虫病流行病学调查表明三峡库区的巫山、巫溪、奉节、云阳等地均为肺吸虫病的中、高度流行区[3]。随着三峡水利工程的兴建，库区的自然环境、社会与经济结构都将发生巨大变化，将会形成更多适合于螺、溪蟹孳生繁殖的溪沟、山涧；而居民的环境容量进一步缩小和人口的更加集中；加上当地居民防病意识差，普遍有食用生蟹或吃油煎、火烤溪蟹及饮用生水的习惯等因素，使得肺吸虫病的流行有进一步加重或扩散的可能，因此肺吸虫病的防治工作显得尤为重要。采用多种形式加强居民的卫生健康教育，改变其不良饮食习惯，减轻和消除肺吸虫病对当地居民尤其是对青少年的危害，为三峡水利工程建设服务，将是一个长期而艰巨的任务。

关键词：三峡库区；肺吸虫病；临床表现；误诊
中图法分类号：R532.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] 许隆祺，薛纯良. 重要寄生虫病诊治指南[M]. 北京：北京科学技术出版社，2002. 69—71.

[2] 张锡林，段建华，王 英，等. 斯氏狸殖吸虫虫体抗原分析和血清学诊断方法的研究[J]. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志，2000，18(5)：277—281.

[3] 刘纪伯，罗兴仁，刘宗华，等. 四川省肺吸虫病感染及临床表现[J]. 实用寄生虫病杂志，1995，3(4)：167—169.

（编辑 陈聪连）

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