DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.017
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0277-03

论著

尿激酶型纤溶酶原激活物对毛囊外根鞘细胞增殖的影响

崔志鸿,杨 恬,高强国,杨 进 (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 探讨尿激酶型纤溶酶原激活物(Urokinase-type plasminogen activator, uPA)对体外培养的毛囊外根鞘(Outer root sheath, ORS)细胞增殖的作用。方法 体外培养了小鼠ORS细胞;用MTT法研究了uPA促进因子肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)和uPA抑制因子Amiloride处理后ORS细胞的增殖变化;用RT-PCR方法研究了ORS细胞的uPA mRNA的表达情况,以及HGF和Amiloride处理ORS细胞后uPA的mRNA表达的变化。结果 体外培养的ORS细胞有uPA表达;HGF可促进uPA mRNA的表达并促进ORS细胞的增殖;Amiloride抑制uPA mRNA表达并抑制ORS细胞增殖。结论 毛囊ORS细胞表达uPA,HGF促进uPA的表达并促进ORS细胞增殖,Amiloride通过抑制uPA的表达和其活性抑制ORS细胞的增殖。

关键词:尿激酶型纤溶酶原激活物;外根鞘细胞;HGF;Amiloride
中图法分类号:R322.99;R329.24;R345.63 文献标识码:A

The effects of uPA in the proliferation of outer root sheath cells

CUI Zhi-hong, YANG Tian, GAO Qiang-guo, YANG jin (Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the proliferation of cultured outer root sheath (ORS) cells. Methods The ORS cells of the mouse vibrissa follicle were cultured *in vitro*. The effects of hepatocyte growth factor (HGF) and Amiloride on the proliferation of ORS cells were observed with MTT. ORS cells treated with HGF and Amiloride were analyzed by RT-PCR of the uPA gene. Results The ORS cells expressed uPA mRNA; HGF promoted and Amiloride inhibited the uPA mRNA production and the proliferation of ORS cells. Conclusion ORS cells could express uPA mRNA, HGF might promote the expression of uPA and the proliferation of ORS cells through inhibiting the expression and the activation of uPA, Amiloride inhibit the proliferation of ORS cells.

Key words: urokinase-type plasminogen activator; outer root sheath cell; HGF; amiloride

尿激酶型纤溶酶原激活物(Urokinase-type plasminogen activator, uPA)是蛋白酶家族的成员,在体内广泛参与纤溶、排卵、组织修复、细胞迁移等过程。作者以前的工作发现,人和小鼠毛囊发育的早期在毛囊的外根鞘(Outer root sheath, ORS)及毛母质等角质形成细胞中有uPA强表达,推测其表达与角质形成细胞的快速增殖有关[1]。为了验证此假说,本实验体外培养了小鼠毛囊角质形成细胞的主要成分ORS细胞,加入uPA的促进剂肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)[2]及uPA的抑制剂Amiloride[3],观察二者对ORS细胞增殖的影响及对ORS细胞uPA mRNA表达的影响,以期获得uPA促进角质形成细胞增殖的直接证据。

1 材料与方法

1.1 小鼠毛囊ORS细胞的原代培养

取生后2 d小鼠,75%酒精消毒后,剪下触须区皮肤迅速放入D-Hank's液中,反复冲洗,置于解剖镜下小心地用小号针头分离触须毛囊,取形态完整,处于生长期的触须毛囊接种于25 ml培养瓶中,用含10%胎牛血清(FCS)(Hyclone)的DMEM/F12(Hyclone)培养基于37 ℃,5%CO_2孵箱培养。

1.2 ORS细胞的纯化

对原代培养细胞中混杂的少量成纤维细胞,按本室常规方法用0.25%胰蛋白酶消化,待成纤维细胞脱壁后倾去消化液,用含10%FCS的DMEM/F12培养基冲洗瓶壁,得到纯化的ORS细胞。

1.3 ORS细胞的鉴定

用ORS细胞特异性表达角蛋白19(Cytokeratin 19, CK19)抗体确认培养的细胞为ORS细胞。将原代细胞消化后,按2×10^5/ml接种于盖玻片上,次日取出用4%多聚甲醛固定30 min,PBS漂洗5 min×3次后进行免疫细胞化学染色,CK19抗体为小鼠抗人和动物CK19(博士德),用山羊抗小鼠SABC试剂盒(博士德)进行免疫细胞化学染色,另以正常山羊血清代替CK19抗体设阴性对照。

1.4 MTT(四唑盐)实验

2×10^5/ml的细胞悬液按每孔100 μl接种于96孔板中。HGF处理组中加HGF(邦定)至终浓度为0.5、1、2、4、8 μg/ml,Amiloride处理组中加入Amiloride(Sigma)至终浓度为0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L,加DMEM/F12至180 μl,加FCS至200 μl,每个浓度均作3个平行孔,另设不加细胞空白调零孔及不加处理试剂对照孔,放入37 ℃ 5% CO_2培养箱中培养。72 h后取出加MTT(Sigma)(5 mg/ml)20 μl,再培养4 h,去上清,加二甲亚砜200 μl/孔,振摇5 min,于酶标仪上490 nm下,空白调零,测OD值,绘制细胞增殖曲线。

1.5 ORS的uPA RT-PCR检测

1×10^5/ml细胞2 ml接种于25 ml培养瓶中,待细胞贴壁后在HGF处理组中加HGF至终浓度为2 μg/ml,Amiloride处理组中加Amiloride至终浓度为0.1 mmol/L,分别于处理后0、24、48、72 h用Tripure(Bohringer Mannheim)提取细胞总RNA,进行uPA RT-PCR扩增。

引物序列为:

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870390)
作者简介:崔志鸿(1974-),女,山西省神池县人,博士,讲师,主要从事上皮生物学研究。电话:(023)68752259
收稿日期:2001-06-27;修回日期:2001-08-27

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

uPA: 上游引物: 5′TGCCCAAGGAAATTCCAGGG 3′
下游引物: 5′GGCAATCTGCACATAGCACC 3′ 可扩增 255 bp 片段。

β-actin: 上游引物: 5′ATGGATGACGATATCGCTGC 3′
下游引物: 5′GCTGGAAGGTGGACAGTGAG 3′ 可扩增 1040 bp 片段。

按 RT-PCR 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech)要求的量加入细胞总 RNA 及引物, 反应总体积 50 μl, 反应条件为: 逆转录: 42 ℃ 30 min, 95 ℃灭活逆转录酶 5 min; PCR 条件: 95 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 共 32 个循环, 加强延伸 72 ℃ 10 min。

1.6 图像分析及统计学处理

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后用 Bio-rad 凝胶扫描系统采集图像, Quantity one 软件进行图像分析。所有数据采用 Student's *t* 检验。

2 结果

2.1 ORS 细胞培养

以初生小鼠触须毛囊为材料培养了小鼠触须的 ORS 细胞。将小鼠触须毛囊贴于瓶壁上后, 第 2 天即有少量细胞从毛囊 ORS 部位长出, 细胞形态上是典型的上皮型角质形成细胞, ORS 细胞特异性 CK19 免疫细胞化学染色阳性。细胞 7~10 d 后即可融合, 见图 1。并可传代, 此后每 7 d 左右可传一代, 传代 3~4 次后细胞逐渐老化, 胞质内出现空泡, 细胞增殖能力下降。

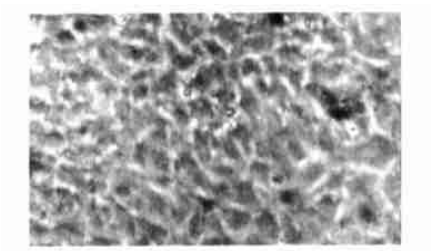


图 1 原代培养的小鼠 ORS 细胞
Fig 1 Primary-cultured mouse ORS cells

2.2 HGF 及 Amiloride 对 ORS 细胞增殖的影响

低剂量的 HGF(0.5 μg/ml)作用于 ORS 细胞后即可促进细胞增殖, 细胞增殖随 HGF 剂量的增加而增加, 增殖曲线呈上升趋势, 但 HGF 达到一定量后(4 μg/ml), 随 HGF 量的增加细胞增殖不再明显, 见图 2。Amiloride 抑制 ORS 细胞增殖的作用也很明显, 低剂量的 Amiloride(0.025 mmol/L)即可抑制 ORS 细胞增殖, 细胞增殖随 Amiloride 剂量的增加而减少, 增殖曲线呈下降趋势, 见图 3, Amiloride 达到一定量后(0.2 mmol/L), 对细胞有毒性作用, 细胞形态发生改变, 胞质内出现空泡化, 少数细胞脱壁。

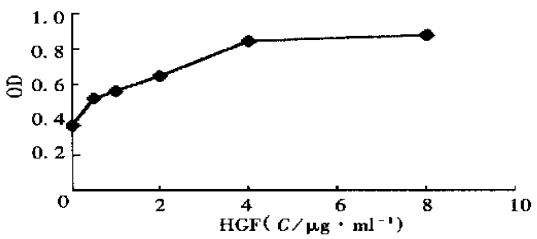


图 2 HGF 处理后对 ORS 细胞的增殖变化 (×100)
Fig 2 Proliferation changes of ORS cells after treated with HGF (×100)

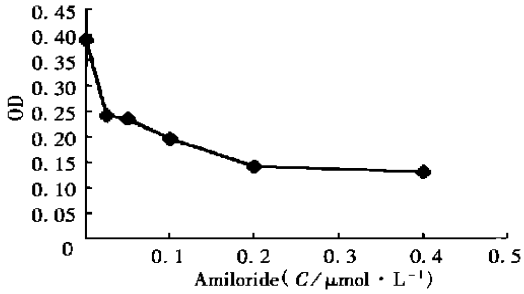
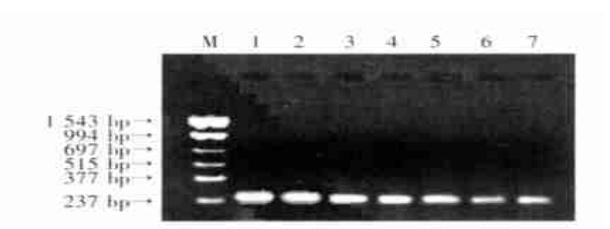


图 3 Amoloride 处理后 ORS 细胞的增殖变化
Fig 3 Proliferation changes of ORS cells after treated with Amiloride

2.3 HGF 及 Amiloride 对 uPA mRNA 表达的影响

根据 HGF 及 Amiloride 对 ORS 细胞作用后的增殖曲线, 选取对 ORS 细胞增殖有明显促进作用的 HGF 浓度(2 μg/ml)及对 ORS 细胞增殖有明显抑制作用的 Amiloride 浓度(0.1 mmol/L), 分别处理 ORS 细胞 24、48、72 h。处理后对 ORS 细胞的 RNA 进行 RT-PCR 扩增后发现: 用相同量的总 RNA 扩增, 得到的β-actin 的扩增产物条带片段大小一致, 亮度无显著差异, 说明 RNA 可靠, 扩增条件恰当; 而 uPA 的扩增产物片段大小一致, 但亮度有所差异, 见图 4, 其灰度分析结果见表 1。



M: marker; 1、2、3: treated with HGF 72、48、24 h; 4: Control; 5、6、7: treated with Amiloride 24、48、72 h

图 4 HGF、Amiloride 处理后 ORS 细胞 uPA 的 RT-PCR
Fig 4 uPA RT-PCR of ORS cells after treated with HGF and Amiloride

表 1 HGF 及 Amiloride 处理 ORS 细胞后 ORS 细胞的 uPA RT-PCR 产物灰度分析

Fig 1 The volume analysis of the uPA RT-PCR production of the ORS cells treated by HGF and Amiloride

Group	OD	Group	OD
Control	17.525	Control	17.525
HGF 24 h	18.248	Amiloride 24 h	8.966
HGF 48 h	18.725	Amiloride 48 h	4.967
HGF 72 h	22.175	Amiloride 72 h	5.819

HGF 对 uPA 的 mRNA 表达有促进作用, Amiloride 对 uPA mRNA 的表达有抑制作用。

3 讨论

Yang[5] 对人头发毛囊的 ORS 细胞作了培养, Reynolds[6] 用大鼠的触须也成功培养出了 ORS 细胞, 但小鼠 ORS 细胞的培养迄今尚未见报道。我们以小

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

鼠触须为材料培养出了小鼠的 ORS 细胞。这种细胞形态上是典型的角质形成细胞, 有 uPA mRNA 表达, CK19 的免疫细胞化学染色呈阳性, CK19 是在体毛囊 ORS 细胞表达的特异性角蛋白。以上实验证据表明, 这种细胞具有在体 ORS 细胞的生物学特征, 可以作为体外研究 ORS 细胞的良好模型。

HGF 是由间充质细胞分泌的一种细胞因子, 但其作用是旁分泌性的, 即不对分泌它的间充质成分起作用, 而促进邻近的上皮细胞增殖, 是上皮—间充质相互作用的重要细胞因子[7]。毛囊的间充质成分—毛乳头细胞分泌 HGF[8], 本实验证明, HGF 可以促进毛囊的上皮成分—ORS 细胞的增殖, 说明 HGF 也是在毛囊上皮—间充质相互作用中的重要因子之一。

HGF 促进上皮细胞的作用是可能通过以下两条途径: ①HGF 促进 uPA mRNA 及蛋白的表达[2], uPA 通过与其受体结合, 通过信号传导作用调节细胞增殖[9], 本实验发现, HGF 可以促进 ORS 细胞 uPA mRNA 的表达, 并促进 ORS 细胞的增殖, 二者呈伴随现象, 支持此途径的存在; ②HGF 与 uPA 的直接底物纤溶酶原有 70%的结构域相同, 也是 uPA 的底物之一, 上皮细胞分泌的 uPA 水解前体 HGF, 使 HGF 活化, 活化的 HGF 是上皮细胞的有丝分裂因子, 促进上皮细胞增殖[7]。无论是通过哪条途径, 总之 uPA 与 HGF 是上皮-间充质相互作用的一对因子, 二者相互作用, 促进上皮细胞增殖。在毛囊中, 二者的作用亦如此, 毛囊的间充质成分—毛乳头细胞分泌 HGF, 上皮成分-ORS 细胞分泌 uPA, 二者相互作用, 促进 ORS 细胞的增殖。

Amiloride 是一种 Na^+ 通道阻遏剂, 它特异性地抑制 uPA 的活性[3]。Amiloride 处理后, uPA 的酶活性丧失, 另外 Amiloride 还有抑制肿瘤细胞 uPA mRNA 合成的作用[10], 但 Amiloride 不抑制 PA 的另一种形式-tPA (Tissue type PA), 即组织型纤融酶原激活物。uPA 在很多肿瘤中有促进肿瘤细胞侵润的作用, 现已证明 Amiloride 可以通过抑制 uPA 活性有阻止肿瘤细胞侵润的作用[10]。本实验用 Amiloride 处理 ORS 细胞后, Amiloride 导致 uPA mRNA 的合成的减少, 而且由于 Amiloride 抑制 uPA 的活性, 导致 uPA 促 ORS 细胞增殖的能力消失, 从而导致 ORS 细胞增殖水平的下降, 这也从另一方面证明了 uPA 在毛囊发育中具有重要的促 ORS 细胞增殖的能力。

参考文献:

[1] 崔志鸿, 杨　恬, 高强国. 人和小鼠表皮及毛囊 uPA/uPAR 的表达[J]. 中国学术期刊文摘, 2000, 6(8): 1047.

[2] Webb C P, Hose C D, Koochekpour S, *et al*. The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 342—349.

[3] Vassalli J D, Belin D. Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator[J]. FEBS, 1987, 214(1): 187—191.

[4] Schirren C G, Burgdorf W H, Sander C A, *et al*. Fetal and adult hair follicle[J]. Ameri J Dermatopathology, 1997, 19(2): 334—340.

[5] Yang J S, Lavker R M, Sun T T. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential[J]. J Invest dermatol, 1993, 101(5): 652—659.

[6] Reyonold A J, Johoda C A. Hair follicle reconstruction in vitro[J]. J Dermatol Sci, 1994, (Suppl): s84—97.

[7] Jindo T, Tsuboi R, Takamori K, *et al*. Local injection of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) alters cyclic growth of murine hair follicles[J]. J Invest Dermatol, 1998, 110(4): 338—342.

[8] Jindo T, Tsuboi R, Imai R, *et al*. The effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on human hair follicle growth[J]. J Dermatol Sci, 199510(3): 229—232.

[9] Anchini E, Fibbi G, Pucci M, *et al*. Production of second messangers following chemotactic and mitogenic urokinase-receptor interaction in human fibroblasts and mouse fibroblasts transfected with human urokinase receptor[J]. Exp Cell Res, 1994, 213(3): 438—448.

[10] Wang Y, Dang J, Liang X, *et al*. Amiloride modulates urokinase gene expression at both transcription and post-transcription levels in human colon cancer cells[J]. Clin Exp Metastasis, 1995, 13(3): 196—202.

(编辑　陈聪连)

(上接 276 页)

为 60 岁以上的老年人, 女性为多, 男性之比为 1∶3[1]。胆囊扭转的病因尚不明确, 但体质瘦弱, 驼背, 体位改变, 剧烈运动等考虑是扭转的诱发因素[2]。老人由于脂肪减少, 组织萎缩, 弹性降低, 内脏下垂, 易形成胆囊系膜, 同时脊柱后凸畸形亦可使胆囊更为悬垂, 加之患者本身的胆囊畸形, 胆囊在腹腔内活动度增大, 一旦胆囊胆汁淤积充盈, 致下垂加重, 在体位突然改变, 腹内压升高, 临近脏器的强裂蠕动, 即可促进扭转的发生。本病在临床上无特殊表现, 常与急性胆囊炎、急性阑尾炎及上消化道穿孔等急腹症有相似之处, 故在诊断上应注意与鉴别。如不及时处理可因胆囊急性梗阻, 胆汁排空障碍, 导致胆囊坏疽旦孔甚至中毒性休克。故早期诊断较为重要, B 超对本病的诊断具有一定意义[3]。治疗上早期手术切除胆囊是最有效的方法。

目前随着我国人口老龄化程度的增高, 本病的发生率也可能会逐步升高, 故在诊疗过程中应对本病有足够的认识。

关键词: 胆囊扭转; 胆囊切除; 手术
中图法分类号: R575.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 单思清, 陆友国, 饶应阳, 等. 急性胆囊扭转 6 例报告[J]. 上海医学, 1986, 9(3): 165—166.

[2] 周绍霞. 胆囊急性扭转 1 例报告[J]. 铁道医学, 1996, 24(6): 390.

[3] 秦胜亚. 胆囊扭转 B 超诊断一附 4 例报告[J]. 中国普通外科杂志, 1994, 3(1): 42.

(编辑　张大春)

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