DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.042
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1094 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1094-04

EGF对小鼠角质形成细胞中组织型纤溶酶原激活剂表达的调节

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 探讨小鼠表皮角质形成细胞(KC)中,EGF对组织型纤溶酶原激活剂(tPA)表达的影响。方法 应用免疫组化及原位杂交技术,结合图像分析,定性及定量检测在EGF作用下的小鼠表皮角质形成细胞中,tPA mRNA/蛋白质的表达。结果 小鼠表皮KC经EGF处理12、24、48、72 h后,tPA mRNA/蛋白质的量均增加($P<0.01$),tPA mRNA表达的高峰出现于EGF作用24 h时,tPA蛋白质表达的高峰则出现于EGF作用48 h时。EGF联合0.5、1.0、1.5 mmol/L Ca^{2+}作用小鼠表皮KC 48 h,与EGF单独作用小鼠表皮KC 48 h时,tPA mRNA/蛋白质的表达,均显著降低($P<0.001$)。结论 小鼠表皮KC中,EGF可以时间依赖方式促进tPA mRNA/蛋白质的表达,但受Ca^{2+}浓度的影响。

关键词:tPA;EGF;表达调节
中图法分类号:R322.9;R329.21 文献标识码:A

Regulation of tissue plasminogen activator expression by EGF in epidermal keratinocytes of mouse

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

Abstract: Objective To explore the effect of EGF on the expression of tissue plasminogen activator(tPA) in cultured mouse epidermal keratinocytes(KC). Methods *In situ* hybridization, immunohistochemical methods and image analysis were employed to study the effects of EGF on the tPA expression in cultured mouse epidermal KC qualitatively and quantitatively. Results When the mouse epidermal KC were incubated with EGF for 12, 24, 48, 72 h, the expression of tPA mRNA/protein was significantly increased compared with the control($P<0.01$), and that of mRNA reached the peak in 24 h and of tPA protein in 48 h after EGF treatment. The expression of tPA mRNA/protein was significantly decreased ($P<0.001$) with the treatment of EGF combined with calcium at 0.5, 1.0, 1.5 mmol/L concentrations or alone. Conclusion In mouse epidermal keratinocytes, the expressions of tPA mRNA and protein were enhanced by EGF in a time-dependent manner, but this process can be interfered by calcium.

Key words: tissue plasminogen activator; EGF; regulation of expression

组织型纤溶酶原激活剂(Tissue plasminogen activator, tPA)是常见于牛皮癣、天疱疮患者的受损表皮中的一种蛋白水解酶,与患者非受损表皮及正常人表皮相比,其在表皮角质形成细胞(Keratinocyte, KC)中的含量异常增高,但相关的原因却属未知[1]。表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)是牛皮癣、天疱疮患者的受损表皮中作用较为活跃的一种细胞因子,可促进多种与这些疾病相关的蛋白质的表达,如:银屑病蛋白、角蛋白6/16、核糖体蛋白S6激酶等[2],并受Ca^{2+}浓度的影响[3,4]。EGF对tPA表达的调节在其它组织细胞中已得到证实[5],类似的作用是否也存在于表皮KC中,本研究将对此加以探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

小鼠表皮KC的培养:取胚胎龄为21 d的小鼠胚胎皮肤,按文献[4]的方法,进行表皮KC的培养,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。

EGF处理组:将上述传代3 d的细胞在D-Hanks液中清洗3遍,置于含有20 ng/ml EGF(购自Sigma, USA)的KC无血清培养基(购自Gibco, USA)中,分别于0、12、24、48、72 h后,用D-Hanks液清洗,4%多聚甲醛固定,以备作免疫组化及原位杂交检测。

EGF+Ca^{2+}处理组:将上述传代3 d的细胞在D-Hanks液中清洗3遍,置于含有20 ng/ml EGF(购自Sigma, USA)、Ca^{2+}浓度分别为0、0.5、1.0、1.5 mmol/L的KC无血清培养基(购自Gibco, USA)中,培养48 h后,D-Hanks液清洗,4%多聚甲醛固定,以备作免疫组化及原位杂交检测。

1.2 免疫组化

已固定的细胞,经羊血清封闭30 min,按ABC法进行免疫组化染色。tPA单抗(购自American dianostica inc)工作浓度为5 μg/ml,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)。以PBS代替一抗作为阴性对照,阳性对照为已知tPA阳性的、培养的人包皮KC。

1.3 原位杂交

探针的制备及标记:含小鼠tPA cDNA的重组Psp65质粒(American Type Culture Collection),按常规方法进行转化,用质粒提取试剂盒(Boehringer Mannheim)提纯,经Hind Ⅲ线性化(Boehringer Mannheim)及酚/氯仿纯化、乙醇沉淀后,用Dig-RNA标记试剂盒(Boehringer Mannheim)进行标记。分别以正义探针及空白杂交液替代tPA cDNA探针,作为阴性对照,阳性对照为

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39740018,39870390)
作者简介:连小华(1965—),女,重庆市人,博士研究生,副教授,主要从事表皮分化调控方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752259
收稿日期:2001-04-12;修回日期:2001-06-08

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

已知 tPA 阳性的、培养的人包皮 KC。

原位杂交: TritonX-100%/ DEPC-H_2O 处理已固定的培养细胞, 室温下 7 min, PBS/ DEPC-H_2O 漂洗 5 min× 3, 滴加已标记探针(杂交液 1∶100 稀释), 43 ℃杂交 26 h。4× SSC、2× SSC、1× SSC、0.5× SSC 漂洗 5 min× 3, 羊血清封闭 15 min, 加抗 Dig 抗体 (Boehringer Mannheim), 4 ℃过夜, 0.05 mol/ L PBS、TSM1、TSM2 各漂洗 5 min× 3, NBT/ BCIP 显色。

分别将上述免疫组化及原位杂交染色的细胞脱水、透明、封片。于光镜下观察细胞形态、大小及阳性产物的分布部位、着色的深浅程度。

1.4　图像分析及统计学处理

用 Tiger 图像分析软件, 测定各种处理条件下, 培养的小鼠 KC 免疫组化及原位杂交阳性产物的平均积分光密度(AOD)值, 作统计学处理, 各组间行 *t* 检验(微软 EXCEL2000 student *t* test)。

2　结果

2.1　EGF 对小鼠表皮 KC 中 tPA mRNA/ 蛋白质表达的调节

2.1.1　小鼠表皮 KC tPA ISH 光镜观察　　结果见图 1A, 从图 A-a 可以看到, 在未受 EGF 作用时, 小鼠表皮 KC 中部分细胞有阳性产物的表达, 阳性颗粒较细, 均匀分布于胞质中, 主要呈淡蓝色, 为弱阳性表达; 在经 EGF 作用 12 h 后, 阳性 KC 的数量及阳性颗粒的分布均无明显的变化, 见图 A-b; 经 EGF 作用 24 h 后, 阳性 KC 明显增多, 阳性颗粒主要分布于胞核中, 呈蓝紫色, 为强阳性表达, 见图 A-c; EGF 作用 48 h 后, 阳性 KC 的数量未见明显变化, 阳性颗粒则主要分布于胞质, 且在核膜周围较为集中, 阳性颗粒均呈蓝紫色, 为强阳性表达, 见图 A-d; EGF 作用 72 h 后, 阳性 KC 的数量无明显变化, 阳性颗粒主要分布于胞质中, 着色程度变浅、呈蓝色, 为阳性表达, 见图 A-e。

2.1.2　小鼠表皮 KC tPA ICC 光镜观察　　结果见图 1B, 在图 B-a、b 中可以看到, 未受 EGF 作用及 EGF 作用 12 h 的小鼠表皮 KC 中, 均仅有部分细胞有阳性产物的表达, 阳性颗粒细小, 在胞质中分布较为均匀, 呈浅黄色, 为弱阳性表达; 在图 B-c 中, 经 EGF 作用 24 h 的小鼠表皮 KC, 阳性 KC 增多, 阳性颗粒较均匀分布于胞质中, 呈黄色, 为阳性表达; 在图 B-d 中, 经 EGF 作用 48 h 后, 阳性 KC 的数量明显增多, 阳性颗粒分布于胞质中, 且在核膜周围较为集中, 阳性颗粒颜色加深, 呈深黄色, 为强阳性表达; 图 B-e 为经 EGF 作用 72 h 后的小鼠表皮 KC, 此时阳性 KC 的数量明显减少, 阳性颗粒分布于胞质的局部, 可集中于核膜附近或胞质的一侧而延伸至胞膜, 呈浅黄色, 为弱阳性表达。

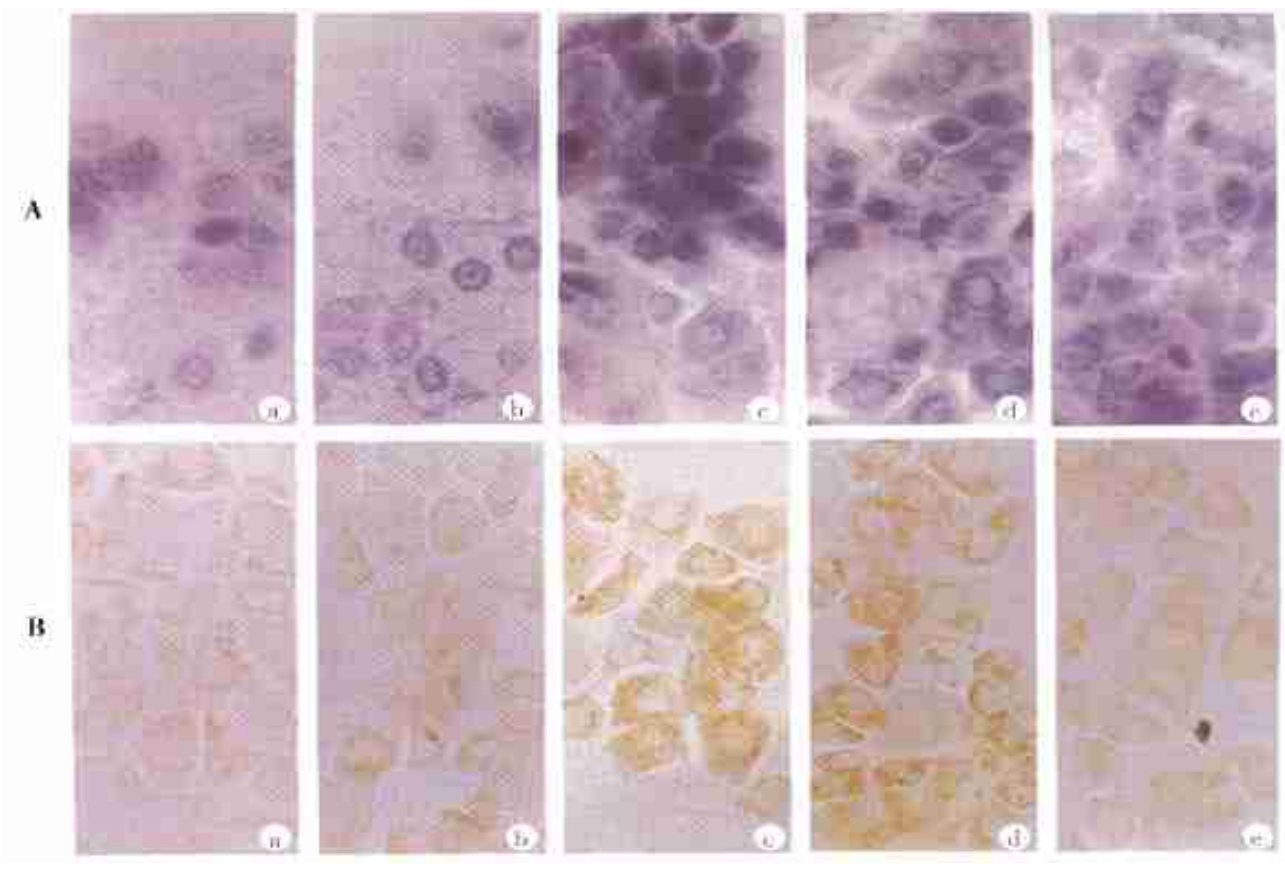


图 1　**EGF(20 ng/ ml)对小鼠表皮角质形成细胞中 tPA 表达的影响**

A: tPA mRNA 的表达　(原位杂交× 400); B: tPA 抗原的表达　(ABC× 400)

a: EGF 作用 0 h; b: EGF 作用 12 h; c: EGF 作用 24 h; d: EGF 作用 48 h; e: EGF 作用 72 h

Fig 1　Effect of EGF on expression of tPA in mouse epidermal keratinocyte

A: Expression of tPA mRNA　(*in situ* hybradization× 400); B: Expression of tPA antigen　(ABC× 400)

a: 0 h after EGF treatment; b: 12 h after EGF treatment; c: 24 h after EGF treatment; d: 48 h after EGF treatment; e: 72 h after EGF treatment

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

2.1.3 小鼠表皮 KC tPA ISH/ICC 阳性产物的 AOD 值 变化曲线见图 2. 从图上可以看到: 小鼠表皮 KC 经 EGF 处理 12 h, tPA ISH 阳性产物的 AOD 值为 0.10±0.07, 与未经 EGF 处理时之值(0.08±0.08)相比, 无明显差异($P>0.05$); EGF 处理 24、48、72 h 后, tPA ISH 阳性产物的 AOD 值分别为 0.29±0.04、0.28±0.04、0.25±0.05, 与未经 EGF 处理、EGF 处理 12 h 时相比, 均显著增加, 差异非常显著($P<0.001$), EGF 作用 24 h, AOD 值最高, EGF 作用 48 h, AOD 值约有下降, 但与前一时相点的 AOD 值间, 差异显著($P>0.05$); EGF 作用 72 h, AOD 值与前两个时相点相比, AOD 值则明显降低($P<0.01$)。

小鼠表皮 KC 经 EGF 处理 12 h, tPA ISH 阳性产物的 AOD 值为(0.21±0.03), 与未经 EGF 处理时之值(0.20±0.04)相比, 差异显著($P>0.05$); 小鼠表皮 KC 经 EGF 处理 24、48、72 h 后, tPA ICC 阳性产物的 AOD 值分别为 0.3±0.03、0.34±0.05、0.22±0.08, 与未经 EGF 处理、EGF 处理 12 h 时相比, 均发生了显著的增加($P<0.01$), tPA ICC 阳性产物的 AOD 最大值出现于 EGF 作用 48 h, 与 EGF 作用 24 h 相比, AOD 值有显著的增加($P<0.05$), EGF 作用 72 h, AOD 值明显下降, 与前两个时相点的 AOD 值间差异非常显著($P<0.001$)。

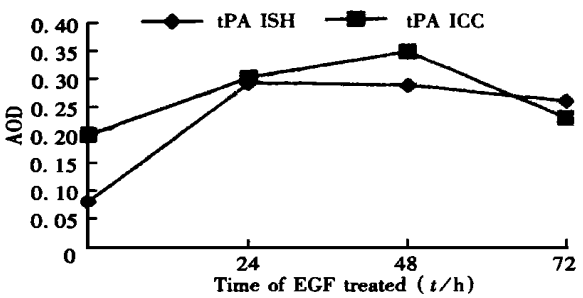


图 2 EGF(20 ng/ml)对小鼠表皮角质形成细胞中 tPA 表达影响的定量分析

Fig 2 Quantitative analysis of effects of EGF on tPA expression in mouse epidermal keratinocyte

2.2 Ca^{2+} 浓度对 EGF 调节作用的影响

不同的 Ca^{2+} 浓度下, 经 EGF 作用 48 h 的小鼠表皮 KC 中, tPA ISH/ICC 阳性产物 AOD 值变化曲线见图 3。

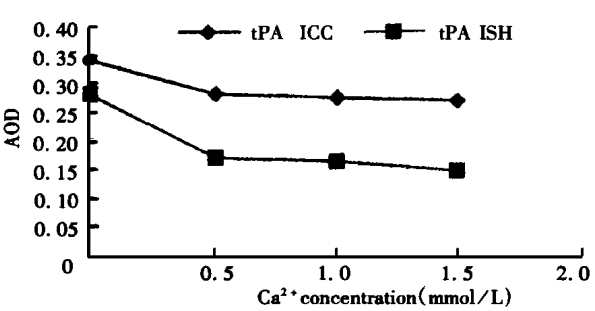


图 3 小鼠表皮角质形成细胞中 Ca^{2+} 浓度对 EGF 作用的影响

Fig 3 Calcium concentration interfering the effect of EGF in mouse epidermal keratinocyte

EGF 联合 0.5、1.0、1.5 mmol/L Ca^{2+} 作用小鼠表皮 KC 48 h, tPA ISH 阳性产物 AOD 值分别为 0.17±0.04、0.16±0.03、0.14±0.04, 与 EGF 单独作用小鼠表皮 KC 48 h 时之值 0.28±0.04 相比, 均显著降低($P<0.001$), 0.5~1.0 mmol/L Ca^{2+}、1.0~1.5 mmol/L Ca^{2+} 浓度之间, 其 tPA ISH 阳性产物 AOD 值差异不显著($P>0.05$); EGF 联合 0.5、1.0、1.5 mmol/L Ca^{2+} 作用小鼠表皮 KC 48 h, tPA ICC 阳性产物 AOD 值分别为 0.28±0.03、0.27±0.03、0.26±0.04, 与 EGF 单独作用小鼠表皮 KC 48 h 时之值(0.34±0.05)相比, 也发生了显著降低($P<0.001$), 而上述 3 种不同的 Ca^{2+} 浓度之间, 其 tPA ICC 阳性产物 AOD 值差异均不显著($P>0.05$)。

3 讨论

EGF 可促进 tPA 表达, 这在 HeLa 细胞、粒细胞及微血管内皮细胞中, 已得到证实[5], 但类似的情况是否也存在于表皮 KC 中, 目前还未见报道。在本实验中, 培养的表皮 KC 经 EGF 作用后, 其 tPA 蛋白质及 mRNA 的量均发生了明显增加, 从而表明, 在小鼠表皮 KC 中, tPA 的表达也受到 EGF 的调节, 且调节发生于转录水平, 并呈时间依赖方式, 过程较为缓慢。

因本实验中, 在 EGF 作用期间, tPA mRNA 表达的部位最初大量聚集于胞核, 然后逐渐转移至胞质, 从而提示, 小鼠表皮 KC 中, 在 EGF 作用的初期, tPA mRNA 伴随着其量的增加, 在胞核中发生了一定程度的滞留。已证实, mRNA 3′端的加工及剪接过程的某些变化, 均可导致核内 mRNA 向胞质中转移的速率减慢, 造成 mRNA 在核中的滞留[6], 本实验中 EGF 所致的 tPA mRNA在胞核中的滞留, 是否也与此相关, 有待于进一步的证实。

从本实验中还可发现, 当 EGF 作用时间延长至 72 h, tPA 蛋白质量呈现出比 mRNA 更为显著的降低, 推测此时 tPA 发生了向胞外的分泌。EGF 可促进 tPA 分泌, 这在人子宫内膜细胞、鼠塞尔托利氏细胞、莱迪希氏细胞相关研究中均有报道[7,8], 本实验中, 在 tPA 蛋白质量显著降低的同时, 其在胞质中的分布趋向于不均一, 并集中于胞膜附近, 从而表明, EGF 对 tPA 的分泌的促进作用, 也可能存在于小鼠表皮 KC 中。

在表皮 KC 中, Ca^{2+} 浓度的升高, 可使 EGF 受体的数量减少、与 EGF 的亲和性降低, EGF 的作用将由此减弱[3]。已经知道, Ca^{2+} 能抑制 EGF 对 ras 基因产物 p21ras 活性的诱导[4], 与此类似, 本实验中, 随着 Ca^{2+} 浓度的加入及升高, 经 EGF 促进的 tPA mRNA/蛋白质量均显著降低, 从而表明, 在小鼠表皮 KC 中, EGF 对 tPA 表达的调节, 也受 Ca^{2+} 浓度的影响。

在牛皮癣患者受损表皮处, tPA 在基底层上层细胞表达异常增高, 可能与上述 EGF 对 tPA 的调节作用有关, 因为 EGF 受体在这些受损表皮中也存在异常, 其分布由局限于基底层而扩展到整个基底层上层[9,10], 结果可使 EGF 对基底层上层细胞的作用增强[11], tPA 在这些细胞中的表达也将因此得到促进, 但这对于牛皮癣的发病机制有何意义, 值得深入的探讨。

参考文献:

[1] Chen C S, Jensen P J. Serum is a potent stimulator of keratinocyte tissue

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

plasminogen activator expression[J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(2): 238—242.
[2] Choi J H, O'Connor T P, Kang S, *et al*. Activation of ribosomal protein S6 kinase in psoriatic lesions and cultured human keratinocytes by epidermal growth factor receptor ligands[J]. J Invest Dermatol, 1997, 108(1): 98—102.
[3] Te Pas M F, Van Bergen en Henegouwen P M, Boonstra J, *et al*. Regulation of epidermal growth factor receptor expression in normal and transformed keratinocytes[J]. Arch Dermatol Res, 1991, 283(2): 125—130.
[4] Medema J P, Sark M W, Backendof C, *et al*. Calcium inhibits epidermal growth factor-induced activation of p21ras in human primary keratinocytes [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14(11): 7 078—7 085.
[5] Ito K, Ryuto M, Ushiro S, *et al*. Expression of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor couples with development of capillary network by human microvascular endothelial cells on Matrigel[J]. J Cell Physiol, 1995, 162(2): 213—224.
[6] Custodio N, Carmo-Fonseca M, Geraghty F, *et al*. Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription[J]. EMBO J, 1999, 18 (10): 2 855—2 866.
[7] Miyauchi A, Momoeda M, Nakabayashi M, *et al*. Regulation of the plasminogen activator/plasmin system by epidermal growth factor in cultured human endometrial cells[J]. Hum Reprod, 1995, 10(12): 3 284—3 288.
[8] Liu Y, Du Q, Zhou H, *et al*. Regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured rat Sertoli and Leydig cells[J]. Sci China C Life Sci, 1996, 39(1): 37—44.
[9] Nanny L B, Yates R A, King LE Jr. Modulation of epidermal growth factors in psoriatic lesions during treatment with topical EGF[J]. J Invest Dermatol, 1992, 98(3): 296—301.
[10] Krane J F, Gottlieb A B, Carter D M, *et al*. The insulin-like growth factor I receptor is overexpressed in psoriatic epidermis, but is differentially regulated from the epidermal growth factor receptor[J]. J Exp Med, 1992, 175(4): 1 081—1 090.
[11] Rikimaru K, Moles J P, Watt F M. Correlation between hyperproliferation and suprabasal integrin expression in human epidermis reconstituted in culture[J]. Exp Dermatol, 1997, 6(5): 214—221.

(编辑 郭建秀)

文章编号: 1000-5404(2001)09-1097-01

个案与短篇

药物性肝病 92 例临床分析

Clinical analysis of 92 cases of drug-induced hepatic diseases

赵 丽, 房殿春 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心, 重庆 400038)

近年随着临床用药种类的增加, 药物性肝病(Drug-induced hepatic disease, DIHD)的发生率也有增加的趋势。迄今为止, 国内外报道的大约有 1 000 余种药物可能导致肝损害[1]。为提高对本病诊治水平, 本研究对 1990—2000 年我院临床诊断的药物性肝病 92 例患者进行了回顾性总结和分析。

1 资料与方法

观察对象: 病例来自我院 1990-02—2000-12 临床诊断药物性肝病的住院患者, 共 92 例, 男 42 例, 女 50 例。年龄 15~68 岁, 平均 40.5 岁。

观察内容: 从以下几方面进行观察和分析: ①临床特点; ②相关辅助检查; ③病理活检; ④治疗和预后。

临床诊断和分型标准: 参考《肝脏病学》等有关资料确定药物性肝病的诊断和分型标准。

2 结果

DIHD 的年龄分布: 92 例 DIHD 各年龄组分布: 以 31~40 岁年龄组病例最多 37 例(40.22%), 41~50 岁 20 例(21.74%), 21~30 岁 15 例(16.30%), 51~60 岁 13 例(14.13%), 61~68 岁 4 例, 15~20 岁 3 例。

DIHD 的病因: 92 例 DIHD 中, 由抗结核药引起者 42 例(45.7%), 消核片(治疗乳腺增生)18 例(19.7%), 中草药 8 例(8.7%), 抗肿瘤药物(阿霉素、环磷酰胺和卡铂等)4 例, 抗生素、抗精神病药和药名不详各 3 例, 抗甲状腺药物、对乙酰氨基酚和减肥药各 2 例, 其他柳氮黄胺嘧啶、三苯氧胺、丙酸睾丸酮、苯巴比妥和抗风湿药各 1 例。

致病药物使用时间: DIHD 的发病高峰位于 2~8 周, 共 54 例(58.70%); 12~24 周 31 例(33.76%); 1 周以内和大于 1 年发病较少分别为 4 例(4.35%)和 3 例(3.26%)。

临床症状及体征: 多数 DIHD 患者表现为乏力失眠 80 例(86.96%)、消化道症状 75 例(纳差、厌油、恶心、呕吐和返酸等)75 例(81.52%)、黄疸 62 例(67.39%), 相对少见的表现, 包括肝区疼痛、肝或脾肿大、腹水、过敏症状(皮疹、瘙痒和发热)、意识障碍或昏迷和其他器官损害, 个别患者无任何症状和体征。

辅助检查结果: 92 例 DIHD 患者均有 ALT 或 AST 异常, 73 例(79.35%)血清胆红素增高, 合并病毒性肝炎 16 例(17.39%), 部分患者 TP、AIB、A/G、GGT、ALP、TBA 和 PT 等均有异常。

DIHD 的临床类型和病理类型: DIHD 的主要临床类型为急性 DIHD, 80 例(86.96%); 慢性 DIHD5 例(5.43%); 亚临床 DIHD7 例(7.61%)。有 22 例行肝穿刺活检, 根据病理特点分为以下几种类型: ①肝细胞损害型 13 例, 多为急性或亚临床 DIHD。②慢性肝炎型 5 例, 多为慢性或亚临床 DIHD。③肝硬化型 2 例, 临床上为慢性 DIHD。④淤胆型 1 例, 为急性 DIHD。⑤脂肪肝型 1 例, 为慢性 DIHD。

治疗和预后: 92 例患者临床诊断一经确立, 除 10 例患者因原发病严重而采取药物减量外, 其余均立即停用了相关药物。83 例(90.22%)预后良好, 临床症状在短期内消失, 各种肝功能化验指标也恢复正常。6 例患者自动出院未随访。3 例(3.26%)病情较重, 死于肝功能衰竭。

3 讨论

近年来, 随着临床用药种类和非处方用药量的增加, DIHD

(下转 1100 页)

作者简介: 赵 丽(1971—), 女, 四川省巴中市人, 医师。电话: (023)68754000-73055

收稿日期: 2001-03-21; 修回日期: 2001-06-05

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