

血小板活化因子受体在人皮肤角质形成细胞中的表达及其调控

井 莉¹, 胡晋红^{1*}, 朱全刚¹, 冯 菲¹, 顾 军², 米庆胜²

(1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433; 2. 长海医院皮肤科)

[摘要] 目的: 观察血小板活化因子受体(PAF-R)在正常人皮肤角质形成细胞中的表达调控特征。方法: 应用免疫组织化学法检测 PAF-R 在正常皮肤组织及 HaCaT 细胞中的表达, 采用 RT-PCR 法检测 PAF-R 在 HaCaT 细胞基因水平的表达特征, 并用流式细胞术定量检测刺激因素作用下 HaCaT 细胞中 PAF-R 的表达调控情况。结果: PAF-R 在正常人角质形成细胞中有强烈的表达, 阳性部位位于细胞膜及细胞质。PAF-R 在 HaCaT 细胞转录水平有表达, 且组织型 mRNA 产物高于白细胞型 mRNA 产物。PAF-R 在 HaCaT 细胞膜内外均有阳性表达, 细胞内表达量约是膜表达量的 4.82 倍。IFN- γ 、维甲酸可以上调 PAF-R 在 HaCaT 细胞的膜表达量。结论: 皮肤角质形成细胞在细胞、蛋白及基因水平均有 PAF-R 强烈表达, 而且这种表达可被炎症因子调控, 提示 PAF 系统可能在皮肤炎症中起重要作用。

[关键词] 角质形成细胞; HaCaT 细胞; 血小板活化因子受体; 皮肤; 炎症

[中图分类号] R 751 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)06-0612-04

Expression and regulation of platelet-activating factor receptor in human keratinocytes

JING Li¹, HU Jin-Hong^{1*}, ZHU Quan-Gang¹, FENG Fei¹, GU Jun², MI Qing-Sheng²(1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Dermatology, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression and regulation of the platelet-activating factor receptor (PAF-R) in human keratinocytes. **Methods:** The expression of PAF-R in skin tissues and HaCaT cells was examined by immunohistochemistry. The expression of PAF-R in HaCaT cell mRNA level was detected by RT-PCR. The expression and regulation of PAF-R were measured by flow cytometry in HaCaT cells treated with various stimuli. **Results:** The expression level of PAF-R was very high in human keratinocytes, mainly located on cell membranes and cytoplasm. PAF-R also expressed on HaCaT cells transcription levels, and the tissue-type PAF-R mRNA was more than that of leucocyte-type PAF-R mRNA. PAF-R expressed on both membrane and intracellular part of HaCaT cell, and the intracellular expression was about 4.82 times that of membrane expression. IFN- γ and retinoic acid upregulated the membrane expression of PAF-R in HaCaT cell. **Conclusion:** Human keratinocytes can highly express PAF-R at cell, protein and transcription levels, and the expression characteristic can be regulated by some inflammatory factors, which indicates the PAF system may play an important role in the skin inflammation.

[KEY WORDS] keratinocyte; HaCaT cell; platelet-activating factor receptor; skin; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(6): 612-615]

过去人们一直认为, 皮肤是一个防护性的包膜, 在皮肤炎症反应中, 角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 仅仅是一个被动参与者和无辜牺牲者。而近年来的研究^[1]表明, 约占表皮细胞 95% 的 KC 是皮肤中一个重要的免疫细胞, 它可以合成并激活许多细胞因子及脂质介质, 表达一系列膜表面抗原, 在皮肤炎症病理过程中起到主要的调节作用。由人腹部表皮衍化而成的 HaCaT 细胞株具有与正常人 KC 相似的分化特征, 且体外容易培养, 是体外研究抗炎药物活性的良好模型^[2]。血小板活化因子 (platelet-activating factor, PAF) 是一种高活性的磷脂介质, 它不同于其他磷脂介质, 能与其特异性受体结合, 并且 PAF 在体内的生物效应依赖于其受体表达的数量

与活性。PAF 与其受体强力结合, 介导一系列生物效应, 并参与诱导表皮细胞因子网络, 发挥其信息传递作用。本实验拟观察人皮肤 KC 中 PAF-R 的表达调控情况, 探讨 PAF 及其受体在皮肤炎症过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 PAF-R 单克隆抗体 (晶美生物工程公司), 山羊抗小鼠 IgG-FITC (北京中山生物

[基金项目] 全军医药卫生科研“十五”规划课题 (01Z066)。

[作者简介] 井 莉 (1978-), 女 (汉族), 硕士生。

*Corresponding author. E-mail: Hjhong@yaoxue.net

公司), EnVision 试剂(抗鼠, DAKO 公司), DMEM 细胞培养液(Gibco 公司), 新生牛血清(杭州四季青生物制品公司), PAF(Sigma 公司), IFN- γ (本校生化教研室惠赠), Saponin(Sigma 公司), 小量柱离心式组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司), RT-PCR 试剂盒(上海申能博彩生物公司), 引物合成(上海生工生物工程技术有限公司), 流式细胞仪(FACS, 美国 Becton-Dickson 公司), Tgradient96 梯度聚合酶联反应仪(德国 Biometra 公司), FR-980 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

1.2 HaCaT 细胞的培养^[3] HaCaT 细胞株由我院皮肤科顾军教授和米庆胜教授联合提供, 用含 20% 新生牛血清的 DMEM 细胞培养液, 置 5% CO₂ 的 37℃ 孵箱中培养, 选择生长旺盛、形态良好的细胞用于实验。

1.3 免疫组织化学方法检测人皮肤组织及 HaCaT 细胞中 PAF-R 的表达 组织切片用正常皮肤由本院整形外科提供。将 OCT 包被的皮肤组织于恒冷切片机制备 5 μ m 的切片, 冰丙酮(-20℃)固定后置于-80℃冰箱保存待用。细胞爬片是将 HaCaT 细胞用 DMEM 细胞培养液(含 20% 小牛血清)制成细胞悬液, 计数后滴至 6 孔板中预先放置的消毒玻片上, 置 5%CO₂ 的 37℃ 孵箱中培养 4 h, 然后每孔补充细胞培养液 2 ml 继续培养 24 h, 取出玻片贴于载玻片上风干, 冰丙酮(-20℃)固定后待用。取以上切片及细胞爬片, 首先用 0.1% 过氧化氢去除内源性过氧化物酶, 加 10% 小牛血清封闭非特异性抗原, 然后加 PAF-R 单克隆抗体 50 μ l(阴性对照用 PBS 代替), 4℃ 孵育过夜, PBS 充分洗涤后, 按照 EnVision 试剂盒说明加辣根过氧化物酶标记的通用二抗 50 μ l, 孵育 2 h 后 DAB 显色 10 min, 流水冲洗, 苏木精衬染 1 min, 漂洗封片, 倒置显微镜观察。

1.4 总 RNA 抽提与 RT-PCR 分析 HaCaT 细胞中 PAF-R 的表达 人体中 PAF-R 分为转录子 1 型(白细胞型)和转录子 2 型(组织型)2 种表达形式, 据文献^[4]设计合成以下 2 对引物, 分别对应产物 P1(L1/C1, 191 bp)和 P2(H1/C1, 252 bp): 5'-CCC GAA CAC AAA GAT GAT GC-3'(C1, 反义), 5'-GGC TGG GGC CAG GAC CCA GA-3'(L1, 正义), 5'-CCTGAG CTC CCC GAG AAG TCA -3'

(H1, 正义)。HaCaT 细胞总 RNA 用 Trizol 试剂盒抽提。参照逆转录酶使用说明, 在 20 μ l 总反应体积中分别加入 1 μ g 总 RNA, 4 \times dNTP(1 pmol/ μ l)、Oligo dT(0.125 pmol/ μ l)、AMV 逆转录酶(0.25 U/ μ l)、RNase 抑制剂(1 U/ μ l), 于 42℃ 2 h、99℃ 5 min、5℃ 5 min 条件下合成 cDNA。参照 Tag 酶使用说明, 在 25 μ l 总反应体积中分别加入 1.0 μ l 的 cDNA、TaKaRa Ex Tag(0.04 U/ μ l)、MgCl₂(2 nmol/ μ l)、dNTP(0.2 nmol/ μ l)、引物 0.5 μ l(22 μ mol/L), 于 Tgradient 96 梯度聚合酶联反应仪进行 PCR 反应。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 结果置生物成像分析系统中拍照分析。

1.5 流式细胞术检测 HaCaT 细胞中 PAF-R 的表达 待 HaCaT 细胞增殖近融合后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 计数后移至离心管(每管细胞数 1 \times 10⁶ 个), PBS 洗涤 2 遍, 加含 4% 多聚甲醛的 PBS 混合液 4℃ 孵育 10 min, PBS 洗涤后加 PAF-R 单克隆抗体 50 μ l(0.5 mg/ml), 阴性对照用 PBS 代替, 4℃ 冰上孵育 2 h; 再用 PBS 洗涤, 加山羊抗小鼠 IgG-FITC 50 μ l(0.5 mg/ml), 4℃ 冰上孵育 1 h, 洗涤后以 400 μ l PBS 重悬细胞, 上机检测。实验分为正常对照组、实验刺激组及膜渗透组, 每组平行设立 3 个复孔。HaCaT 细胞分别用培养液种植于 6 孔板中, 于 5%CO₂ 的 37℃ 孵箱中培养。其中实验刺激组分别使用 PAF(100 nmol/L)、IFN- γ (40 ng/ml)、维甲酸(1 \times 10⁻⁴ mg/ml)刺激作用 24 h。膜渗透组则在加入一抗反应前用含 0.1% Saponin 的 PBS 100 μ l 重悬细胞, 4℃ 孵育 20 min, 进行胞膜穿透处理^[5]。根据实验结果计算: 平均荧光强度百分率=[(实验组荧光强度-对照组荧光强度)/对照组荧光强度] \times 100%。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组均数比较采用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果 与阴性对照相比, PAF-R 在正常人表皮基底层以上细胞, 尤其是 KC 有强烈的棕黄色颗粒表达, 阳性部位位于细胞膜及细胞质内, 而真皮和皮下组织中均未见阳性表达(图 1)。HaCaT 细胞爬片免疫组化结果表明, 阳性颗粒主要位于细胞膜, 细胞质内也有少量表达(图 2)。

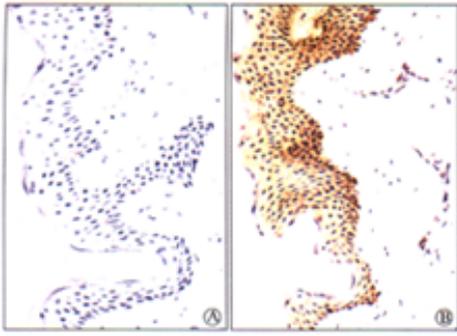


图 1 正常人皮肤组织冷冻切片中 PAF-R 的表达
Fig 1 PAF-R expression in human skin cryostat sections (EnVision, ×200)

A: PAF-R negative staining; B: PAF-R positive staining

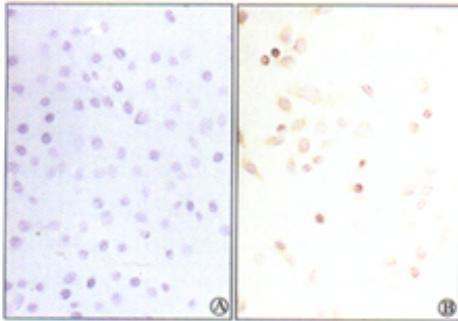


图 2 HaCaT 细胞爬片中 PAF-R 的表达

Fig 2 PAF-R expression in HaCaT cells (EnVision, ×200)

A: PAF-R negative staining; B: PAF-R positive staining

2.2 RT-PCR 结果 PCR 产物的电泳图显示, PAF-R 在 HaCaT 细胞上有明显表达, 产物相对分子质量与设计一致, 条带较清晰, 未见杂带, 且转录子 2 型(组织型)PAF-R 的 mRNA 产物高于转录子 1 型(白细胞型)产物(图 3)。

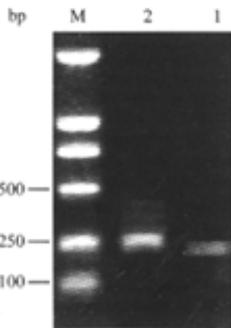


图 3 PAF-R 在 HaCaT 细胞转录水平的表达特征

Fig 3 Expression characteristics of PAF-R at HaCaT cells transcription level

M: DNA marker; 1: Leucocyte-type PAF-R mRNA;

2: Tissue-type PAF-R mRNA

2.3 流式细胞术检测结果 流式细胞仪获取 1×10^4 个细胞进行平均荧光强度检测, 与阴性对照相比, 正常组 PAF-R 在 HaCaT 细胞表面有显著阳性表达 ($P < 0.01$); 用 0.1% Saponin 进行膜渗透处理后, PAF-R 表达量显著增加, 平均荧光强度由原来的 $(100.9 \pm 5.2)\%$ 增加到 $(486.6 \pm 11.1)\%$, 即细胞内表达量约为膜表达量的 4.82 倍 ($P < 0.01$)。与正常对照组相比, 不同刺激因素对 HaCaT 细胞膜表面 PAF-R 的表达均有影响, 其中 IFN- γ (40 ng/ml)、维甲酸 (1×10^{-4} mg/ml) 可以使 PAF-R 的表达量平均上调 96.3% 和 137.9% ($P < 0.01$); 而 PAF (100 nmol/L) 对 HaCaT 细胞膜表面 PAF-R 的表达没有显著影响; 0.1% Saponin 进行膜渗透处理后与正常对照组相比较, 不同刺激因素对 HaCaT 细胞膜内 PAF-R 的表达均有上调作用, PAF、IFN- γ 、维甲酸使膜内 PAF-R 表达分别上调 8.3%、18.8%、20.1%, 但没有显著差异。

3 讨论

PAF 作为一种重要的炎性介质具有广泛的生理学作用, 可激活炎细胞释放 5-羟色胺、组胺和前列腺素等刺激因子, 共同参与哮喘、过敏反应、慢性炎症反应等疾病的发生、发展过程。KC 是人皮肤中的一种重要免疫细胞, 不仅可以合成 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 及 PAF 等致炎因子^[2], 而且可表达功能性的 PAF-R 等^[6]。KC 中 PAF-R 促进表皮功能和参与炎症反应的机制之一是通过 PAF、前列腺素 (PGs)、IL-6、IL-8 等调节剂来完成的^[7]。在 PAF 介导的许多皮肤炎症中, PAF-R 与其他炎性介质之间存在正反馈调节机制, 共同参与诱导皮肤细胞因子网络系统, 构成协同放大效应。因此, PAF-R 的表达与炎症反应关系的研究具有重要意义。

不同细胞上 PAF-R 的数目、表达特征及受刺激后活化的程度各不相同。为了考察 KC 中 PAF-R 的表达特征以及其表达活化与皮肤炎症的密切关系, 本实验从组织、蛋白、基因水平 3 方面考察皮肤角质形成细胞上 PAF-R 的表达特征。免疫组织化学结果显示 PAF-R 在正常人 KC 中有强烈的阳性表达, 阳性信号位于细胞膜及细胞质。RT-PCR 检测结果显示, PAF-R 在 HaCaT 细胞转录水平有表达, 进一步分析发现 PAF-R 的转录基因可以作用产生 2 种不同的 mRNA 转录子, 即转录子 1 型(白细胞型)和 2 型(组织型)^[8~10], HaCaT 细胞中组织型 mRNA 产物高于白细胞型 mRNA 产物, 这与文献报道^[4]的结果一致。利用 Western 印迹研究表

明^[11], PAF-R 在干癣皮肤组织中所表达的蛋白除了相对分子质量为 67 000 者(在正常皮肤组织中表达), 还有相对分子质量为 45 000 者, 经研究证明这是切去了顶端, 缩短了的 PAF-R 的表达形式, 提示 PAF-R 结构的改变与皮肤炎症密切相关; 同时在皮肤肿瘤细胞株 HT29 和 HaCaT 中, 也存在相对分子质量为 68 000 的 PAF-R 蛋白表达, 提示 PAF-R 可能在传递肿瘤细胞增殖信息、抗凋亡中起着重要作用。

PAF-R 的全长有 342 个氨基酸, 分为胞外结构区、跨膜结构区和胞质结构区, 其中跨膜结构区由 7 个疏水段构成, 复杂的结构造成了功能上的差异^[12]。据文献^[5]报道, PAF-R 在人的小肠上皮细胞中有阳性表达。在 HT-29 细胞株中, PAF-R 胞内表达量约是膜表达量的 2 倍。本实验也做了类似研究, 结果发现 PAF-R 在 HaCaT 细胞膜内外具有表达差异, 且细胞内表达量约是膜表面表达量的 4.82 倍。此外, 本实验考察了不同刺激因素对 PAF-R 表达的影响, 发现 IFN- γ 、维甲酸和 PAF 3 种因素对 HaCaT 细胞膜内 PAF-R 的表达无显著影响, 但对细胞表面 PAF-R 的表达影响明显不同, PAF (100 nmol/L) 对 HaCaT 细胞表面 PAF-R 的表达无显著影响, 而 IFN- γ (40 ng/ml)、维甲酸 (1×10^{-4} mg/ml) 可以使 PAF-R 的表达量明显上调, 这可能是由于影响因素刺激胞内受体异位至膜表面所致。这些实验结果从一个侧面反映了受体结构的复杂性, 以及与不同配体结合的差异, 可能与受体被遮蔽、内化或异位有关, 也可能是 PAF-R 的异质性造成。在表皮细胞中功能性的 PAF-R 可以调控其他的细胞毒性刺激^[13], 同时 PAF-R 可以感应细胞内损伤, 激活细胞因子转录并导致系统免疫抑制^[14], 提示这种功能性的转化导致受体数目及活性变化, 可能是皮肤炎症反应重要影响因素。

PAF-R 在皮肤 KC 中有特征性的表达且可被部分炎症因子调控, 提示 PAF 系统可能在皮肤炎症中起重要作用。但是功能性的 PAF-R 受体在表皮 KC 的生理学影响还不明确, 还有待进一步研究, 这对 KC 中 PAF-R 受体活化与皮肤炎症方面的研究将具有更加重要的意义。

[参考文献]

[1] Travers JB, Huff JC, Rola-Pleszczynski M, et al. Identification of functional platelet-activating factor receptors on human keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 1995, 105(6): 816-823.
 [2] Travers JB, Harrison KA, Johnson CA, et al. Platelet-activat-

ing factor biosynthesis induced by various stimuli in human HaCaT keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 107(1): 88-94.

[3] Stein M, Bernd A, Ramirez-Bosca A, et al. Measurement of anti-inflammatory effects of glucocorticoids on human keratinocytes *in vitro* [J]. *Arzneimittelforschung*, 1997, 47(11): 1266-1270.
 [4] Shimada A, Ota Y, Sugiyama Y, et al. *In situ* expression of platelet-activating factor (PAF)-receptor gene in rat skin and effects of PAF on proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 110(6): 889-893.
 [5] Merendino N, Dwinell MB, Varki N, et al. Human intestinal epithelial cells express receptors for platelet-activating factor [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(4 Pt 1): G810-G818.
 [6] Travers JB, Murphy RC, Johnson CA. Identification and pharmacological characterization of platelet-activating factor and related 1-palmitoyl species in human inflammatory blistering diseases [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 1998, 56(5-6): 305-324.
 [7] Pei Y, Barber LA, Murphy RC, et al. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis [J]. *J Immunol*, 1998, 161(4): 1954-1961.
 [8] Kotelevets L, Noe V, Bruyneel E, et al. Inhibition by platelet-activating factor of Src-and hepatocyte growth factor-dependent invasiveness of intestinal and kidney epithelial cells. Phosphatidylinositol 3'-kinase is a critical mediator of tumor invasion [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(23): 14138-14145.
 [9] Mutoh H, Fukuda T, Kitamaoto T, et al. Tissue-specific response of the human platelet-activating factor receptor gene to retinoic acid and thyroid hormone by alternative promoter usage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(2): 774-779.
 [10] Shimizu T, Mutoh H. Structure and regulation of platelet-activating factor receptor gene [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 407: 197-204.
 [11] Bayerl C, Brandt H, Niemczyk M, et al. PAF-receptor in inflammatory versus non-inflammatory human epidermis, cell cultures and embryonal cells [J]. *Inflamm Res*, 2003, 52(7): 283-286.
 [12] Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, et al. Platelet-activation factor and related lipid mediators [J]. *Ann Rev Biochem*, 2000, 69: 419-445.
 [13] Barber LA, Spandau DF, Rathman SC, et al. Expression of the platelet-activating factor receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(30): 18891-18897.
 [14] Walterscheid JP, Ullrich SE, Nghiem DX. Platelet-activating factor, a molecular sensor for cellular damage, activates systemic immune suppression [J]. *J Exp Med*, 2002, 195(2): 171-179.

[收稿日期] 2003-11-07

[修回日期] 2004-03-22

[本文编辑] 曹 静