

· 难愈创面的研究 ·

晚期糖基化终末产物对表皮角质形成细胞细胞周期的调控及信号通路的影响



谢挺 牛轶雯 葛奎 陆树良

【摘要】 目的 了解晚期糖基化终末产物(AGE)对表皮角质形成细胞细胞周期的影响及其可能的信号通路。 **方法** 体外制备 AGE 修饰的蛋白质(AGE-HSA, 150 mg/L)作为干预手段。将原代培养的表皮角质形成细胞分为:正常组,采用无血清 DK-SFM 培养液培养; AGE 干预组,采用含 150 mg/L AGE-HSA 的 DK-SFM 培养液培养;对照组以 10 μmol/L U0126 处理后同正常组条件培养;干预对照组以上述 U0126 处理后同 AGE 干预组条件培养。采用流式细胞仪检测细胞周期,蛋白质印迹法检测细胞周期蛋白 D1、B1 以及细胞周期素依赖性激酶 4(CDK4)和 p44/42 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的表达。 **结果** 与正常组比较,AGE 干预组 S 期和 G2/M 期细胞百分比均显著降低($P < 0.05$);对照组、干预对照组 G2/M 期细胞百分比亦显著降低,分别为 $(9.7 \pm 1.1)\%$ 、 $(9.8 \pm 0.7)\%$ ($P < 0.05$)。与正常组比较,其余 3 组细胞周期蛋白 D1 表达下降,其中干预对照组该蛋白仅有微弱表达;正常组、AGE 干预组 CDK4、细胞周期蛋白 B1、p44/42 MAPK 蛋白表达相似,对照组、干预对照组的 3 种蛋白表达显著低于前 2 组。 **结论** AGE 通过下调细胞周期蛋白 D1 的表达阻碍表皮角质形成细胞的细胞周期进程。

【关键词】 糖基化终产物,高级; 细胞外信号调节 MAP 激酶类; 细胞周期; 角质形成细胞

Effect of advanced glycosylation end products on cell cycle of epidermal keratinocyte and the role of signal pathway XIE Ting, NIU Yi-wen, GE Kui, LU Shu-liang. Department of Burns, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, P. R. China

Corresponding author: LU Shu-liang, 200025, Email: sllu@sh163.net, Tel: 021-64675394

【Abstract】 Objective To investigate the effect of advanced glycosylation end products(AGE) on cell cycle of epidermal keratinocyte and its possible signal pathway. **Methods** 150 mg/L AGE-human serum albumin (AGE-HSA) was prepared in vitro. Primary cultured keratinocytes in logarithmic growth phase were harvested and divided randomly into: A group [with treatment of defined keratinocyte-SFM (DK-SFM) serum-free medium], B group (with treatment of DK-SFM medium including 150 mg/L AGE-HSA), C group (with DK-SFM medium after treatment of U0126) and group D (with DK-SFM medium including 150 mg/L AGE-HSA after treatment of U0126). Cell cycle distributions were analyzed by flow cytometer. The protein levels of cyclin D1, cyclin B1, CDK4 and p44/42 MAPK were measured by Western blot. **Results**

Compared with those of A group, the percentage of S-phase and G2/M-phase keratinocytes were decreased obviously in B group, the percentages of G2/M-phase keratinocytes showed the same tendency in C and D groups [$(9.7 \pm 1.1)\%$, $(9.8 \pm 0.7)\%$, respectively, $P < 0.05$]. Compared with that of A group, the expression of cyclin D1 were decreased significantly in other groups, among which a weak expression was showed in D group. There was no obvious difference between A and B groups in CDK4, or cyclin B1 and p44/42 MAPK protein levels, which were significantly higher than those in C and D groups. **Conclusion** AGEs inhibit the progress of cell cycle of keratinocytes by downregulation of cyclin D1 expression.

【Key words】 Glycosylation end products, advanced; Extracellular signal-regulated MAP kinases; Cell cycle; Epidermal keratinocyte

糖尿病是以慢性高血糖为主要特征的代谢性疾病

基金项目:国家自然科学基金(30471784、30570705、30600645)

作者单位:430060 武汉市第三医院烧伤科(谢挺);上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤科(牛轶雯、葛奎、陆树良)

通讯作者:陆树良,200025, Email: sllu@sh163.net, 电话:021-

64675394

病,持久性的病理性高血糖引起晚期糖基化终末产物(AGE)大量生成。AGE 具有广泛的生物学活性,参与多种糖尿病并发症的发生和发展^[1-4]。笔者前期研究证实,糖尿病皮肤组织烫伤前后表皮角质形成细胞呈现不同程度的增殖抑制状态,并伴有细胞周期调控因子的低表达和丝裂期促进因子(MPF)

活性的下降^[5]。因此,有必要了解糖基化效应对表皮角质形成细胞增殖调控的影响,从而明确糖尿病皮肤微环境改变对难愈创面再上皮化障碍的作用。

1 材料与方 法

1.1 体外制备 AGE 修饰的蛋白质

将 1.75 g 纯化的人血白蛋白(HSA)加入到每升含 200 mmol D-葡萄糖、100 mg 青霉素、50 mg 庆大霉素和 1.5 mmol 苯甲磺酰氟的磷酸盐缓冲液(PBS, 100 mmol/L)中孵育 60 d,操作参见文献[4]。所制备的 AGE-HSA 经荧光分光光度法鉴定。

1.2 标本来源

选用 8 周龄清洁级雄性 SD 大鼠(中国医学科学院上海实验动物中心)4 只,体质量 200 ~ 220 g。经脱毛、消毒后,取全层背部皮肤以 PBS 清洗,去除皮下组织,浸没在 5 g/L dispase 溶液中 4 ℃ 过夜。次日弃 dispase,加入 2.5 g/L 胰蛋白酶及 0.5 g/L 乙二胺四乙酸(EDTA)室温消化 3 ~ 5 min。游离表皮反复吹打,300 目尼龙网过滤,4 ℃ 下于离心半径 9 cm,1500 r/min 离心 10 min。弃上清液,PBS 洗涤,混匀,再次离心,获得表皮角质形成细胞沉淀。加入适量无血清 DK-SFM 培养液(美国 Gibco 公司),混匀后接种至培养瓶中,常规培养 1 周以便纯化细胞。

1.3 筛选 AGE 的干预浓度

待原代表表皮角质形成细胞进入对数生长期后,以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板常规培养 24 h,换成无血清 DK-SFM 培养液继续培养 24 h,分别给予 50、100、150、200、250 mg/L 的 AGE-HSA 干预 24、48 h,同时设相同渗透压的甘露醇和不含 D-葡萄糖的 HSA 作对照,另设平行空白对照用于比色调零。孵育 48 h 后,每孔加入 10 μ L 噻唑蓝(5 mg/mL),常规培养 4 h。弃培养液,加入 100 μ L 二甲亚砷(美国 Sigma 公司),孵育 30 min 至颗粒溶解,采用酶标仪(美国 Beckman 公司)测定波长 570 nm 下的吸光度值,计算增殖抑制率(%) = (1 - 实验组吸光度值 \div 对照组吸光度值) \times 100%。以 150 mg/L 的 AGE-HSA 作为干预条件,进行如下实验。

1.4 实验分组及取材

将表皮角质形成细胞分为:正常组,采用无血清 DK-SFM 培养液培养;AGE 干预组,采用含 150 mg/L AGE-HSA 的 DK-SFM 培养液培养;对照组,采用 10 μ mol/L U0126 处理后同正常组条件培养;干预对照组,采用上述 U0126 处理后同 AGE 干预组条

件培养。48 h 后弃去培养液,以 PBS 洗涤培养瓶内的细胞,2.5 g/L 胰蛋白酶及 0.5 g/L EDTA 于 37 ℃ 下共同作用 10 min,PBS 终止消化,4 ℃ 下离心,弃上清液,PBS 洗涤,混匀,再次离心,获得表皮角质形成细胞沉淀。

1.5 检测指标

1.5.1 细胞周期检测 将 200 μ L PBS 与部分细胞沉淀混匀,加入 RNA 酶 100 μ L,体积分数 0.1% TritonX-100 50 μ L,37 ℃ 水浴 20 min。加碘化丙啶 40 μ L,采用 EPICS-XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)测定细胞周期,每份样本计数 1×10^4 个细胞,并以配套 Lysis 软件进行数据分析。

1.5.2 细胞周期蛋白 D1、细胞周期素依赖性激酶 4(CDK4)、细胞周期蛋白 B1 和 p44/42 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的蛋白表达检测 在细胞沉淀中加入适量的蛋白提取液(德国 Merck 公司),冰浴裂解 30 min,12 000 \times g 离心 15 min。留取上清液,用二辛丁酸蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司)测定前 3 种蛋白的浓度。将抽提蛋白于 -20 ℃ 下分装保存,用蛋白质印迹法检测各种蛋白的表达,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参照。

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 6.12 统计软件行配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞周期

与正常组比较,AGE 干预组 S 期、G2/M 期细胞比例明显减少($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组表皮角质形成细胞的细胞周期比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	S 期	G2/M 期
正常组	6	14.6 \pm 0.9	12.2 \pm 0.5
AGE 干预组	6	11.1 \pm 0.3*	9.0 \pm 2.7*
对照组	6	13.7 \pm 4.8	9.7 \pm 1.1*
干预对照组	6	11.6 \pm 2.8	9.8 \pm 0.7*

注:AGE 为晚期糖基化终末产物;与正常组比较,* $P < 0.05$

2.2 几种蛋白的表达

与正常组细胞周期蛋白 D1 的表达水平 1098 \pm 84 比较,AGE 干预组蛋白表达水平为 460 \pm 46,显著下降($P < 0.05$),对照组表达水平为 634 \pm 129,亦下降但无明显变化($P > 0.05$),干预对照组仅有微弱表达为 120 \pm 51。正常组 CDK4 表达水平为 197 \pm 64,与 AGE 干预组的 194 \pm 67 相似;对照组和干预对照组几乎未见表达。正常组细胞周期蛋白 B1 表达水平为 355 \pm 115,与 AGE 干预组表达无明

显差异(408 ± 208 , $P > 0.05$),但明显高于对照组、干预对照组(221 ± 65 , 62 ± 42 , $P < 0.05$)。蛋白质印迹法结果显示,在相对分子质量为 44×10^3 和 42×10^3 处可见清晰蛋白条带,即磷酸化的细胞外信号调节激酶(ERK)1/2。正常组和 AGE 干预组中磷酸化 ERK1/2(即 p44/42 MAPK)呈高水平表达,其余 2 组该蛋白表达水平明显较低。见图 1。

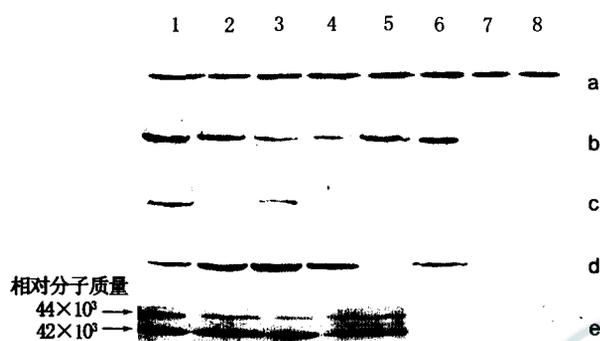


图 1 蛋白质印迹法检测几种蛋白的表达水平。正常组为 1、2 泳道,AGE 干预组为 3、4 泳道,对照组为 5、6 泳道,干预对照组为 7、8 泳道;a 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,b、d 分别为细胞周期蛋白 D1、B1,c 为细胞周期素依赖性激酶 4,e 为 p44/42 丝裂原活化蛋白激酶

3 讨论

本研究结果表明,AGE 干预后 S 期和 G2/M 期细胞数量均显著降低,提示它能够抑制角质形成细胞的 DNA 合成及有丝分裂。CDK 的时相性激活是细胞周期调控机制的核心,主要依赖于细胞周期素的细胞周期特异性或时相性表达、累计和分解。细胞周期受到激酶复合物驱动,该复合物由一系列细胞周期蛋白调节亚基和 CDK 催化亚基组成。在该调控机制中,G1/S 期和 G2/M 期检查点至关重要。细胞周期蛋白 D 与 CDK 的结合是启动细胞周期,使细胞从 G1 末期进入 S 期的关键;细胞周期蛋白 B 在 S 期末表达并逐渐积累,于 G2 期达到高峰,其与 cdc2 激酶形成的复合物 MPF 受到复杂、有序的调控而被激活,诱导细胞进入 M 期。

细胞周期蛋白 D1 和 CDK4 组成的激酶复合物使 Rb 蛋白磷酸化,释放转录因子,是细胞从 G1 期进入 S 期的必要条件^[6]。细胞周期蛋白 D1 是 G1 期最重要的周期素之一,它通过与 CDK4 结合形成复合物上调 CDK4 的活性。一般而言,细胞周期蛋白 D1 的表达与细胞增生同步,而细胞内 CDK4 的含量通常保持稳定^[7]。显然,AGE 干预主要是通过下调细胞周期蛋白 D1 表达,导致细胞进入 S 期障碍。

在 G2/M 转变期,细胞周期蛋白 B1 是 MPF 的

调节亚基,它在 G1 期开始表达,随细胞周期进程合成逐渐增加,在 G2/M 转变期水平最高,并与 P^{34cdc2} 结合成 MPF 催化有丝分裂过程^[8-9],其合成与 MPF 的活性密切相关。但亦有学者认为,该蛋白的表达与细胞分裂并无直接联系^[8,10]。本研究结果表明,AGE 干预所导致的细胞有丝分裂水平低下,并不由下调细胞周期蛋白 B1 的表达来实现。糖尿病大鼠角质形成细胞也呈现类似的规律^[5]。

U0126 是目前常用的丝裂原激活蛋白激酶激酶 1/2(MEK1/2)抑制剂,主要是通过 MEK1/2 结合抑制 ERK1/2 的磷酸化。本实验应用 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 U0126 处理后,细胞中 p44/42 MAPK 即磷酸化(大鼠 ERK2 的苏氨酸 183 和酪氨酸 185 位点磷酸化)的 ERK1/2 表达显著降低,处于有丝分裂期的细胞比例也显著下降。该结果提示,本实验体系中无论是常规的表皮细胞培养条件,或是一定浓度的 AGE 干预条件,原代培养的角质形成细胞的细胞周期进程都受 ERK 信号转导通路的调控。资料表明,ERK 参与细胞周期尤其是 G1/S 期调节,同时对 G2/M 期过渡也发挥着重要的调控作用^[11-12]。

研究认为,ERK 通路与细胞周期蛋白 D 的表达调控关系密切。但也有文献报道称,ERK 通路被阻断后该蛋白的表达并未被抑制^[13-14],提示 ERK 还可能通过调控其他相关的周期调控因子来影响细胞周期的进程。本研究结果表明,正常培养条件下的角质形成细胞经过 U0126 预处理后,细胞周期蛋白 D1 的表达无明显改变,但 CDK4 表达下降明显。说明在正常培养条件下,ERK 信号转导通路主要介导角质形成细胞 CDK4 的表达,但对细胞周期蛋白 D1 的表达无影响。U0126 预处理后细胞周期蛋白 B1 表达显著减少,提示 ERK 磷酸化水平与细胞周期蛋白 B1 表达量变化趋势一致。ERK 磷酸化过程被阻断后,细胞周期蛋白 B1 表达下调,将导致 MPF 活性降低,从而阻碍细胞的有丝分裂进程。

参考文献

- [1] Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications. Expert Opin Investig Drugs, 2002, 11(9): 1205-1223.
- [2] 陆树良,青春,谢挺,等. 糖尿病皮肤“隐性损害”的机制研究. 中华创伤杂志, 2004, 20(8): 468-473.
- [3] 林炜栋,陆树良,青春,等. 晚期糖基化终产物修饰人血清白蛋白对人血管内皮细胞的生长抑制作用. 中华医学杂志, 2003, 83(7): 572-576.
- [4] Hou FF, Jiang JP, Guo JQ, et al. Receptor for advanced glycation end products on human synovial fibroblasts: role in the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. J Am Soc Nephrol,

2002, 13(5): 1296-1306.

[5] 谢挺, 陆树良. 糖尿病大鼠皮肤组织表皮细胞增殖相关事件的研究. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(6): 541-544.

[6] Westerman ME, Holt GJ, DiMichele L. Quantitative assay of cyclin-dependent kinase activity as a sensitive marker of cell proliferation in marine teleost larvae. Mar Biotechnol (NY), 1999, 1(3): 297-310.

[7] 兰蕾, 赫荣乔. 细胞周期分子机制的成功探索——2001 年诺贝尔生理及医学奖部分工作介绍. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(6): 773-777.

[8] Murielle G, Annie T, Rudkin BB, et al. Developmental changes in cyclin B1 and cyclin-dependent kinase (CDK1) levels in the different populations spermatogenic cells of post natal rat testes. EJC, 2000, 79(11): 816-823.

[9] Kong WH, Zheng G, Lu JN, et al. Temperature dependent expression of cdc2 and cyclin B1 in spermatogenic cells during spermatogenesis. Cell Res, 2000, 10(4): 289-302.

[10] Josefsberg LB, Kaufman O, Galiani D, et al. Inactivation of M-phase promoting factor at exit from first embryonic mitosis in the rat is independent of cyclin B1 degradation. Biol Reprod,

2001, 64(3): 871-878.

[11] Kortylewski M, Heinrich PC. Mitogen-activated protein kinase control p27 expression and growth of human melanone cells. J Biochem, 2001, 357(1): 297-303.

[12] Ravenhall C, Cuida E, Harris T, et al. The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle. Br J Pharmacol, 2000, 131(1): 17-28.

[13] Cheng J, Imanishi H, Liu W, et al. Involvement of cell cycle regulatory proteins and MAP kinase signaling pathway in growth inhibition and cell cycle arrest by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, etodolac, in human hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Sci, 2004, 95(8): 666-673.

[14] Yang B, Cao DJ, Sainz I, et al. Different roles of ERK and p38 MAP kinases during tube formation from endothelial cells cultured in 3-dimensional collagen matrices. J Cell Physiol, 2004, 200(3): 360-369.

(收稿日期:2007-08-28)
(本文编辑:莫愚)

· 经验交流 ·

真皮下血管网皮瓣修复小儿会阴部瘢痕挛缩 30 例

王肖蓉

1 临床资料

1992—2006 年,笔者单位应用真皮下血管网皮瓣修复小儿会阴部瘢痕挛缩 30 例,其中男 18 例、女 12 例,年龄 2~11 岁。瘢痕挛缩部位为:会阴部前区、股内侧、外阴部。因瘢痕挛缩,患儿入院时均为身体前屈不能直立,大腿外展受阻,阴部外口被瘢痕覆盖。

2 手术方法

于贴近股内侧区域作切口,松解剥离使下肢外展,阴囊外侧、大阴唇、阴阜复位,在左或右侧下腹部,以腹壁浅动脉为轴心设计皮瓣。将皮瓣的尖端修成真皮下血管网皮瓣,皮下仅保留厚约 1 mm 的脂肪组织,至隐约可见皮下毛细血管网为止。根据创面大小和形状确定皮瓣长宽比例。将皮瓣从一侧转移至另一侧大腿内侧,覆盖下腹部、耻骨上。继发创面可直接缝合。皮瓣保留适当的张力,包扎时保持一定压力,使皮瓣与创面紧密接触。

3 结果

30 例患儿皮瓣全部成活。阴茎、阴囊、大阴唇恢复正常位,双侧大腿外展,两侧髋关节活动正常,皮肤质地柔软,无臃肿。随访 1~5 年,患者功能和外观较好。

4 讨论

带真皮下血管网皮瓣在国内外早已应用,文献报道其效果较好^[1-3]。在运用轴型皮瓣的过程中,对超血运范围血供不佳部分可采取剪除大部分脂肪而保留真皮下血管网的办

法。该法具有蒂窄瓣宽,长宽可超比例、瓣薄不臃肿,与受区建立血运快等优点。真皮下血管网薄皮瓣中段有一血管增快快速密集区,使皮瓣易与受区创面重建血运联系,且具有 2 套血供系统,较传统皮瓣有所突破。在手术时应避免紧贴阴囊或阴唇边作切口。皮瓣修薄的厚度以保留真皮下血管网下层 2~3 mm 为宜,但操作时此厚度难以掌握,如透过脂肪层隐约见真皮下血管网的血管树,有少许鲜红色出血点,即视为达到要求。修除后,减少了对脂肪组织的供血负担,但皮下血管网皮瓣处于低灌注、低氧、低代谢状态,相对增加了皮瓣的供血量,使静脉回流量减少,进出血量达到相对平衡。

经典皮瓣长宽比例要求 2:1,但会阴部瘢痕切除后,缺损部位窄长。以前我们直接移植皮片,虽然近期外观满意,但随着小儿身体长大,皮片逐渐收缩再次出现畸形。我们也曾用腹部两侧经典局部皮瓣同时转向正中联结,但由于切口在耻骨上,外观不满意;仅用轴型皮瓣、腹壁浅动脉进行修复,又因为皮瓣尖端太长容易坏死且外观臃肿。同时运用轴型皮瓣、真皮下血管网皮瓣修复小儿会阴部瘢痕,可以使皮瓣直接从一侧耻骨覆盖到对侧大腿内侧,较为安全、有效,远期效果满意。

参考文献

[1] 肖能坎,肖添有. 轴型真皮下血管网皮瓣的应用解剖及在深度烧伤创面修复中的应用. 中华烧伤杂志, 2002, 18(6): 336-338.

[2] 黄晓元,梁鹏飞,杨兴华,等. 上臂真皮下血管网皮瓣与面颌部瘢痕瓣置换移植术. 中华烧伤杂志, 2005, 21(2): 117-118.

[3] 叶胜捷,陈如俊,叶鹤柳,等. 真皮下血管网皮瓣修复手掌合并多指掌面深度烧伤 23 例. 中华烧伤杂志, 2004, 20(5): 314.

(收稿日期:2007-02-25)
(本文编辑:张红)