

cytes into the host haemocoel shows that the cells inhibit the host development by decreasing the host's weight. The results imply a nutrition relation exists between the host and the teratocytes from its parasitoid wasp.

Key words: Teratocytes *Microplitis mediator* Biomass Nutrition relation

尿激酶型纤溶酶原激活物的表达与毛囊细胞增殖关系的研究

崔志鸿 杨恬* 曾益军

(第三军医大学细胞生物学教研室 重庆 400038)

尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)是丝氨酸蛋白酶家族的成员,近年来发现它与表皮细胞的增殖和迁移有关,在皮肤的发育及创伤愈合中起重要作用^[1,2],但是关于uPA在毛囊中的表达及作用尚缺乏研究。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^[3],从而推测:uPA的表达与毛囊细胞的快速增殖有关,但对此推论尚缺乏直接的证据。本实验在原有工作的基础上研究ORS细胞uPA表达与其细胞周期的关系,试图为以上推论提供有力证据。

材料和方法

1. ORS细胞的原代及传代培养

参照文献的方法进行^[4],所用毛囊来源于新生昆明小鼠的触须。

2. ORS细胞细胞周期的测定

原代及三代ORS细胞用0.25%胰蛋白酶消化为单细胞悬液,离心后用PBS(pH7.2)洗2次,分别收集 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞,将细胞沉淀加入70%冷乙醇中固定过夜,清洗细胞后加入含1%RNA酶的PI染色液1ml,于4℃染色30min,于B.D公司FACS Calibur型流式细胞仪上测细胞周期,激发光源为15mW氩离子激光,波长488nm,细胞周期分析软件为ModFit LT2.0。

3. 原代及三代ORS细胞uPA的免疫细胞化学染色及图像分析

将原代及三代细胞消化后,按 2×10^5 /ml接种于盖玻片(预先用多聚赖氨酸处理)上,次日取出用4%多聚甲醛固定30min, PBS漂洗5min \times 3次后用山羊抗兔ABC试剂盒(Vectastain)进行免疫细胞化学染色,所用抗体为兔抗小鼠uPA IgG,用正常山羊血清代替uPA抗体设阴性对照。在显微镜下对每一组免疫细胞化学结果随机选取5个视野,用Tiger图像分析系统对其平均积分光密度(AOD)值进行测

量,对所测数据进行Student t检验。

4. RNA抽提

参照Tripure试剂盒(Bohringer Mannheim)说明书的方法进行,分别提取原代、第一代及第三代ORS细胞的总RNA。

5. RT-PCR检测

uPA:上游引物:5'TGCCCAAGGAAATTCCAGGG 3'

下游引物:5'GGCAATCTGCACATAGCACC 3'可扩增255bp片段

β -actin:上游引物:5'ATGGATGACGATATCGCTGC 3'

下游引物:5'GCTGGAAGGTGGACAGTGAG 3'可扩增1040bp片段

按RT-PCR试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech)要求的量加入细胞总RNA 100ng,引物10pmol,及试剂盒提供的M-MuLV反转录酶及pd(N)₆反转录引物,反应总体积50 μ l,反应条件为:逆转录:42℃ 30min,95℃灭活逆转录酶5min;PCR条件:95℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 1min,共32个循环,加强延伸72℃ 10min。

反应完毕,取反应产物10 μ l,加2 μ l点样缓冲液,于2%琼脂糖凝胶中以 $0.5 \times$ TBE为电泳缓冲液以5V/cm电压电泳1h,于Bio-Rad(Gel Doc 2000)凝胶分析仪上扫描、分析、照相。

结 果

1. 不同代龄的ORS细胞的细胞周期测定

原代及第3代ORS细胞的细胞周期(表1)显示,原代ORS细胞处于增殖期的细胞较多,细胞增殖指数(proliferation index)达25.16%,第3代细胞处于增殖期的细胞数明显下降,细胞增殖指数下降到9.22%。这一数据与我们在细胞培养与传代过程中观察到的现象一致。

本文2002年4月1日收到,7月15日接受。

国家自然科学基金资助项目:No. 39870390

*通讯作者。E-mail: tiany @163.net

表1 不同代龄的ORS细胞的细胞周期

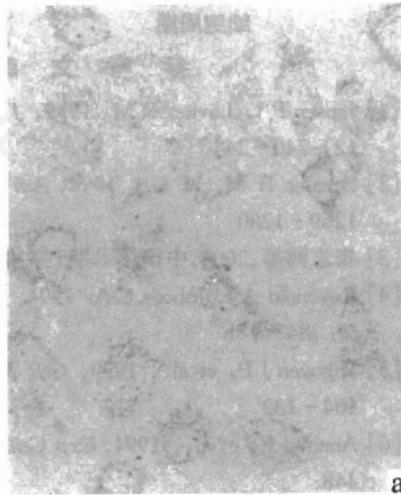
| 细胞 | G ₀ -G ₁ (%) | S(%) | G ₂ -M(%) | 增殖指数*(%) |
|------------|------------------------------------|------------|----------------------|-------------|
| 原代培养的ORS细胞 | 74.83±1.75 | 18.19±1.46 | 6.97±0.41 | 25.16±0.32 |
| 第3代ORS细胞 | 90.78±2.54 | 5.00±3.18 | 4.22±0.69 | 9.22±0.36** |

*:增殖指数(%)=(S+G₂-M)/(G₀-G₁+S+G₂-M)×100%。

** :P<0.01 vs 原代培养ORS。

2. 不同代龄ORS细胞uPA免疫细胞化学染色

原代ORS细胞的uPA的免疫细胞化学染色呈强阳性,阳性表达均在胞浆中(图1,a),呈棕色颗粒



状分布,图像分析显示其阳性较对照有极显著差异(P<0.01)3代ORS细胞的免疫细胞化学染色呈弱阳性至阴性(图1,b),与对照无显著差异(P>0.05)。图像分析结果见表2。

表2 不同代龄的ORS细胞uPA的免疫细胞化学定量分析结果(AOD,x±s)

| | 阴性对照 | 原代培养ORS细胞 | 第3代ORS细胞 |
|---------|-----------|------------|-----------|
| AOD,x±s | 0.28±0.06 | 0.73±0.14* | 0.31±0.12 |

*:P<0.01 vs 阴性对照(正常山羊血清代替uPA抗体)。

3. 不同代龄的ORS细胞uPA的RT-PCR检测

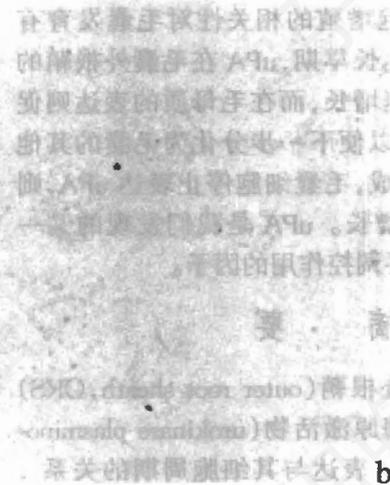


图1 不同代龄ORS细胞uPA蛋白质的表达(DAB×200)
a. 原代细胞 b. 第3代细胞。

原代、第1代、第3代ORS细胞的RT-PCR结果显示,用β-actin引物对3种细胞的总RNA都扩增出相同浓度的PCR产物,说明三种细胞RNA稳定,扩增条件适当。用uPA引物对原代及1代细胞的总RNA都扩增出相应片段大小的产物,两者PCR产物浓度相近,说明细胞有uPA mRNA表达,而对第3代细胞的总RNA却没有扩增出PCR产物(图2)。

讨论

本文发现,ORS细胞的增殖与其uPA mRNA及蛋白的表达密切相关。细胞周期的检测显示,原代ORS细胞增殖旺盛,而3代ORS细胞增殖水平下降,表现为处于增殖期的细胞数目的极显著降低。免疫细胞化学和RT-PCR的结果则显示,增殖旺盛的ORS细胞uPA mRNA及蛋白表达较强,而增殖缓慢的ORS细胞uPA mRNA及蛋白的表达明显下降或不表达,本文的结果可以证明我们提出的uPA的表达与毛囊细胞的快速增殖有关的推测。

uPA是丝氨酸蛋白酶家族的成员,由于其N末端包含有一个与表皮生长因子同源的结构域,所以在多种上皮型细胞中都证明其可促进细胞增殖。如表皮创伤后,其基底层表达uPA,可促进表皮细胞的增殖,促进创伤愈合^[1];在多种癌细胞中,uPA不仅可以促进肿瘤浸润,而且促进肿瘤细胞的增殖^[5]。uPA促进增殖机理的解释是uPA通过其生长因子

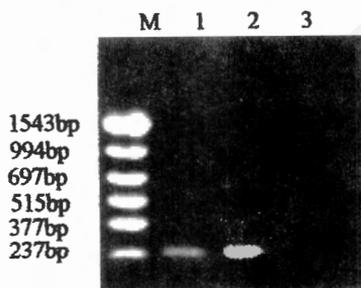


图2 不同代龄ORS细胞uPA RT-PCR检测
M. marker; 1. 原代培养ORS细胞; 2. 第1代ORS细胞; 3. 第3代ORS细胞。

结构域结合在其受体上,这种结合引起一系列信号传导的效应,最终导致细胞增殖^[6],研究表明,毛囊细胞不仅可表达 uPA,还表达其受体 uPAR(urokinase plasminogen activator receptor)^[7],这些证据都显示:uPA 对毛囊细胞的增殖有促进作用。但不表达 uPA 的 ORS 细胞也有一定程度的增殖,本文结果表明,3 代 ORS 细胞虽然停止表达 uPA,但仍可增殖,只是增殖指数有所下降,在体研究也表明,发育完全的皮肤和毛囊中没有 uPA 的表达,对其正常的自我更新并未有影响,所以我们推测,细胞表达 uPA 通常是其应对快速增殖的一种策略。

uPA 与毛囊细胞增殖的相关性对毛囊发育有重要的意义。毛囊生长早期,uPA 在毛囊外根鞘的表达可以使毛囊迅速增长,而在毛母质的表达则促进毛母质细胞增殖,以便下一步分化为毛囊的其他成分;到毛囊发育完成,毛囊细胞停止表达 uPA,则可避免毛囊的过度增长。uPA 是我们发现的又一种对毛囊周期有重要调控作用的因子。

摘 要

为了研究毛囊外根鞘(outer root sheath, ORS)细胞尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)的表达与其细胞周期的关系,并探讨 uPA 对毛囊生长的调控作用,本文应用流式细胞仪对不同代龄的 ORS 细胞的细胞周期进行了

检测,并用免疫细胞化学和 RT-PCR 手段对相应代龄 ORS 细胞的 uPA mRNA 及蛋白质的表达进行了检测。结果显示,原代 ORS 细胞增殖旺盛,而 3 代 ORS 细胞增殖水平显著下降,增殖旺盛的 ORS 细胞 uPA mRNA 及蛋白表达较强,而增殖缓慢的 ORS 细胞 uPA mRNA 及蛋白的表达明显下降或不表达。说明 ORS 细胞的增殖水平与其 uPA mRNA 及蛋白的表达密切相关,uPA 在毛囊生长早期的表达可以促进毛囊细胞增殖,利于毛囊发育。

关键词:尿激酶型纤溶酶原激活物 毛囊外根鞘细胞周期

参 考 文 献

- [1] Jensen P J, Lavker P M. 1999, *J Invest Dermatol.*, **112** (2):240-244.
- [2] Schafer B M, et al., 1994, *Am J Pathol.*, **144** (6): 1269-1280.
- [3] 崔志鸿等,2000,中国学术期刊文摘,6(8):1047.
- [4] Reyonold A J, Johoda C A. 1994, *J Dermatol Sci., Suppl*: s84-97.
- [5] Irigoyen J P, et al., 1999, *Cell Mol Life Sci.*, **56**(1): 104-132.
- [6] Anchini E, et al., 1994, *Exp Cell Res.*, **213**(3):438-448.
- [7] 高强国等,2001,第三军医大学学报,23(11):1279-1281.

RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR AND THE PROLIFERATION OF HAIR FOLLICLE CELLS

CUI Zhi Hong YANG Tian ZENG Yi Jun

(Department of cell biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China)

ABSTRACT

To study the relationship between the expression of uPA and the cell cycle of the ORS cells, and to investigate the regulation effects of uPA in the hair follicle growth, the cell cycles of ORS cells in different passage were tested by flow cytometry, and the expression of uPA mRNA and protein was detected by RT-PCR and immunocytochemistry. The original cultured ORS cells were active in proliferation, whereas the 3rd passage ORS cells were inactive, and the expression of uPA in the anterior was more significant than in the posterior. These results demonstrated that the proliferation of ORS cells was correlated with the expression of uPA mRNA and protein in the cells. The expression of uPA can increase the proliferation of hair follicle cells, and help the growth of hair follicle.

Key words: Urokinase plasminogen activator Outer root cells of the hair follicle Cell cycle