

· 论著 · < 基础研究 >

他扎罗汀诱导前后角质形成细胞 TIG 3 mRNA 表达

郑焱¹, 罗素菊¹, 彭振辉¹, 樊靖华², 李晓莉¹, 周少娜¹

[摘要] 目的 研究他扎罗汀对培养的正常人角质形成细胞增殖和他扎罗汀诱导基因 3 (TIG3) mRNA 表达的影响。方法 用 0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 他扎罗汀处理正常人角质形成细胞 24 h 后, 用 MTT 法、RT-PCR 和实时定量 RT-PCR (TaqMan 探针) 法分别检测细胞增殖和 TIG3 mRNA 表达的改变。结果 他扎罗汀可抑制角质形成的增殖和诱导 TIG3 mRNA 的表达。0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 他扎罗汀处理角质形成细胞后, 分别使角质形成细胞增殖抑制 5.0% 和 11.1%, 使 TIG3 mRNA 增加到正常对照组的 2.1 倍和 2.8 倍。结论 他扎罗汀可抑制角质形成细胞的增殖和上调 TIG3 mRNA 的表达。

[关键词] 角质形成细胞; 他扎罗汀; 他扎罗汀诱导基因

[中图分类号] R 986 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-7089(2007)08-0449-03

Effects of Tazarotene on the Expression of Tazarotene-induced Gene 3 mRNA in Normal Human Keratinocytes

ZHENG Yan, LUO Su-ju, PENG Zhen-hui, et al

(Department of Dermatology, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the alteration of cell proliferation and tazarotene-induced gene 3 (TIG3) mRNA expression in cultured normal human keratinocytes after tazarotene treatment. **Methods** After 24-hour incubation with 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ tazarotene of normal human keratinocytes, the proliferation potency of the cells was detected by MTT colorimetric assay and the expression of TIG3 mRNA was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time quantitative RT-PCR (TaqMan). **Results** After treatment with 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ tazarotene, keratinocytes proliferation was inhibited by 5.0% and 11.1%, and TIG3 mRNA expression was induced by 2.1- and 2.8-fold, respectively. **Conclusion** Tazarotene can inhibit keratinocytes proliferation and elevate TIG3 mRNA expression.

Key words: Keratinocyte; Tazarotene; Tazarotene-induced gene

他扎罗汀是第三代维 A 酸类药物的一种, 在临床上能有效治疗银屑病、寻常痤疮、光老化性皮肤病和基底细胞癌, 但其具体作用机制尚不完全清楚。他扎罗汀可能通过诱导他扎罗汀诱导基因 (tazarotene-induced Gene, TIG)-1, 2, 3 的表达而发挥其作用^[1]。因此, 笔者在体外用他扎罗汀处理培养的正常人角质形成细胞, 检测其对细胞增殖和 TIG3 mRNA 表达的影响, 以进一步探讨他扎罗汀的治疗作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 角质形成细胞无血清培养基 (KC-SFM)、低糖 DMEM、Dispase 酶 (加拿大 Gibco 公司), 他扎罗汀 (重庆华邦制药股份有限公司), TRIzol 试剂 (加拿大 Invitrogen 公司), RT-PCR 试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司), TaqMan 2 × PCR 混合液 (美国 ABI

公司), PCR 配套试剂 (日本 TaKaRa 公司), Centrifuge 5417R 高速低温离心机 (美国 Brinkmann Instruments Inc. 公司), GeneAmp 9700 PCR 仪 (美国 ABI 公司), PRISM 7700 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 原代角质形成细胞培养 取健康青少年环切术后包皮, 洗必泰浸泡, 用 Dispase 酶消化, 分离表皮与真皮, 然后用胰酶与 EDTA 混合液消化, 分离角质形成细胞, 加入 KC-SFM, 置于 37℃ 5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 取 3~5 代细胞进行实验^[2]。当细胞 80% 融合时, 加入含 0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 他扎罗汀的培养液, 继续培养 24 h。

1.2.2 MTT 检测角质形成细胞的增殖 将细胞接种于 96 孔培养板, 待细胞 80% 融合时, 加入含 0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 他扎罗汀的培养液, 培养 24 h 后加入 MTT。每组设 3 个孔, 并设置未处理的正常对照组及空白对照组 (只加细胞培养液无细胞)。以空白对照组为基准, 在 490 nm 波长处检测吸光度值。生长抑制率 (%) = 1 - A_{490 nm} (实验组细胞) / A_{490 nm} (对照组细胞) × 100%。

1.2.3 总 RNA 的提取和 cDNA 合成 按 10 cm² (培

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30371295, 30400387); 陕西省自然科学基金资助项目 (No. 2004C211)

[作者单位] 1 西安交通大学第二医院皮肤科, 陕西 西安 710004;

2 西安市中心医院皮肤科, 陕西 西安 710004

[作者简介] 郑焱 (1972-), 女, 陕西省西安市人, 主治医师, 医学博士, 主要从事维甲酸作用机制的研究。

养瓶面积)加入 1 mL TRIzol 提取总 RNA,操作严格按试剂盒说明进行。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性,用紫外分光光度计测 RNA 含量和纯度。cDNA 的合成操作严格按试剂盒说明进行。

1.2.4 RT-PCR 检测 TIG3 mRNA PCR 反应体系为 12.5 μ L,包括 10 $\times$ PCR buffer 1.25 μ L, dNTP 0.8 μ L,上游和下游引物(TIG3 或 β -actin)各 0.8 μ L, r-Taq 0.08 μ L, cDNA 2 μ L,加无菌蒸馏水至 12.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 40 次,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。TIG3 上游引物序列:5'-CAGTATTGTGAGCAGGAAGTGTGA-3',下游引物序列:5'-TTGGCCTTTTCCACCTGTTTAC-3',产物 84 bp; β -actin 上游引物序列:5'-CCTGGCACCCAGCA-CAAT-3',下游引物序列:5'-CTGATCCACATCTGCTG-GAA-3'产物 125 bp。

1.2.5 实时定量 RT-PCR 检测 TIG3 mRNA 实时定量 PCR 反应体系为 25 μ L,包括模板 cDNA 2 μ L, Taq-Man 2 $\times$ PCR 混合液 12.5 μ L,无菌蒸馏水 8.5 μ L,上游和下游引物(TIG3 或 β -actin)各 1 μ L。扩增条件为:50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min,然后 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min,循环 40 次。TIG3 和 β -actin 的引物序列见 RT-PCR 所述,探针分别为 5'-CCAGCTGAGATATG-GCAAGTCCCGC-3' (TIG3) 和 5'-ATCAAGATCATT-GCTCCTCCTGAGCGC T-3' (β -actin)。在 PCR 过程中设立无模板阴性对照,每组实验重复 3 次。

1.2.6 统计学处理 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理实时荧光定量 RT-PCR 数据,所得结果即表示目的基因相对于正常对照组所改变的倍数^[3]。这种方法可把目的基因归一化,以减少由于细胞数和抽提 RNA 获得率的差异所引起的误差,这里 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{TIG3} - Ct_{\beta-actin})_{\text{实验组}} - (Ct_{TIG3} - Ct_{\beta-actin})_{\text{对照组}}$ 。Ct 即临界循环数值,为 PCR 扩增过程中,荧光信号开始由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环次数,其与模板 cDNA 的起始拷贝数成反比。统计学分析采用 SPSS 11.5 软件进行 One-Way ANOVA 中的 Dunnett-*t* 检验, $P < 0.05$ 则认为有统计学意义。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 他扎罗汀对角质形成细胞增殖的影响 他扎罗汀可抑制角质形成细胞的增殖,0.1 和 1 μ mol/L 他扎罗汀处理角质形成细胞后,分别使角质形成细胞增殖抑制 5.0% 和 11.1% (表 1)。

2.2 总 RNA 纯度及质量鉴定 经测定 A260/280 比值在 1.7~1.9 之间,表明 RNA 无污染,电泳显示 18 s 和 28 s 两条带,说明 RNA 完整性较好(图 1)。

表 1 他扎罗汀对角质形成细胞增殖的影响

处理方法	A490nm	抑制率(%)	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组	0.41 $\pm$ 0.01	0 $\pm$ 0.5		
0.1 μ mol/L 他扎罗汀	0.38 $\pm$ 0.02	5.0 $\pm$ 1.5	11.1*	<0.01
1 μ mol/L 他扎罗汀	0.35 $\pm$ 0.03	11.1 $\pm$ 3	23.3*	<0.01

注:与对照组比较。

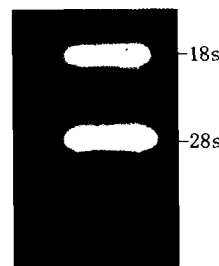
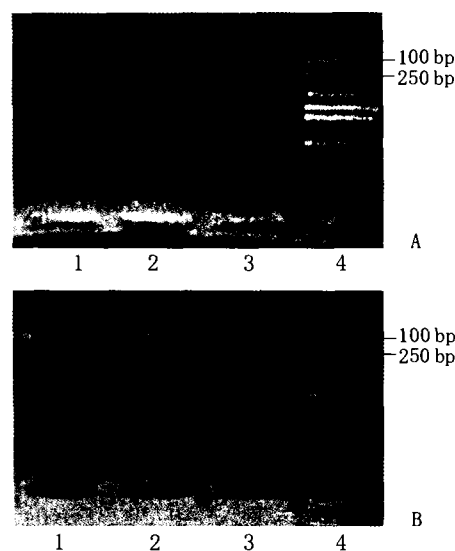
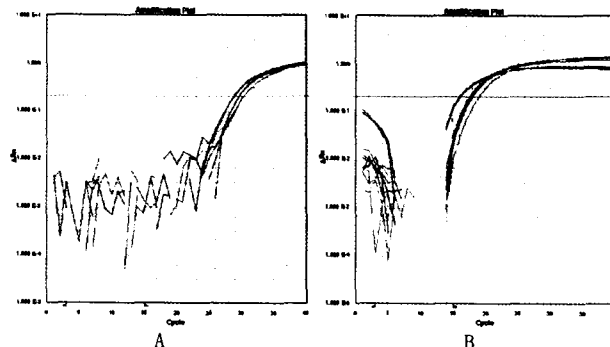


图 1 总 RNA 电泳图



TIG3(A):1 为 0.1 μ mol/L 他扎罗汀,2 为 1 μ mol/L 他扎罗汀,3 为对照组,4 为 markers (DNA Marker DL2 000); β -actin(B):1 为 0.1 μ mol/L 他扎罗汀,2 为 1 μ mol/L 他扎罗汀,3 为对照组,4 为 markers

图 2 RT-PCR 检测 TIG3 mRNA 的表达



A 为 TIG3 mRNA 的扩增曲线:从左向右依次为 0.1 μ mol/L 他扎罗汀、对照组、1 μ mol/L 他扎罗汀;B 为 β -actin 的扩增曲线:从左向右依次为对照组、0.1 μ mol/L 他扎罗汀、1 μ mol/L 他扎罗汀。

图 3 实时荧光定量 RT-PCR 的扩增曲线,横线与扩增曲线的相交点为 Ct 值

2.3 RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 检测 他扎罗汀对

角质形成细胞 TIG3 mRNA 表达的影响 PCR 扩增见图 2, 实时定量 PCR 扩增曲线见图 3。正常人角质形成细胞可表达少量的 TIG3 mRNA, 0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 他扎罗汀处理后, TIG3 mRNA 的表达增加, 分别增加到正常对照组的 2.1 倍和 2.8 倍(表 2)。

表 2 他扎罗汀对 TIG3 mRNA 表达的影响

处理方法	TIG3 Ct 值	β -actin Ct 值	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值 [#]	t	P
对照组	29.7 $\pm$ 0.1	17.5 $\pm$ 0.1	1 $\pm$ 0.1		
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 他扎罗汀	28.8 $\pm$ 0.1	17.7 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3	2.3*	<0.05
1 $\mu\text{mol/L}$ 他扎罗汀	30.3 $\pm$ 0.1	19.6 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.2	3.4*	<0.01

注: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值即表示目的基因相对于正常对照组所改变的倍数。这里 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{TIG3}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}})_{\text{实验组}} - (\text{Ct}_{\text{TIG3}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}})_{\text{对照组}}$ 。
* 与对照组比较。

3 讨论

在实验中, 笔者观察到正常人角质形成细胞可表达少量的 TIG3 mRNA, 表明 TIG3 在维持角质形成细胞的增殖和分化中发挥一定作用。他扎罗汀处理后, 可抑制角质形成细胞的增殖和上调 TIG3 mRNA 的表达。

他扎罗汀是一种维 A 酸受体 (retinoic acid receptor, RAR) 选择性维 A 酸类药物, 其通过激活 RAR β 和 γ , 并诱导下游基因的表达而调节细胞的增殖和分化。他扎罗汀可通过上调 TIG1, TIG2 和 TIG3 的表达而发挥其抗增殖和减少炎症的作用^[4]。TIG3 又称维 A 酸受体反应子 3 (retinoic acid receptor responder 3, RARRES3) 或维 A 酸诱导基因 1 (retinoid-induced gene 1, RIG1), 是从他扎罗汀处理后的人角质形成细胞中分离出来的一种 II 类肿瘤抑制子, 与 H-rev107 有 52% 的同源性。在正常皮肤组织中, TIG3 表达最多的部位为表皮基底上层, 毛囊和皮脂腺。与正常组织相比, TIG3 在银屑病、基底细胞癌和鳞状细胞癌的皮损中表达下降, 在浸润性鳞状细胞癌中表达缺失^[5], 提示

TIG3 的作用可能与表皮基底上层的 KC 终末分化和生长停滞有关。在体外, TIG3 可抑制培养的鳞状细胞癌细胞系和 EcR-293 肾细胞系的生长。在银屑病和基底细胞癌皮损中, 外用他扎罗汀后可使 TIG3 的表达升高, 提示 TIG3 在介导他扎罗汀的作用中发挥重要作用^[4-7]。笔者在体外培养的角质形成细胞证实了他扎罗汀处理后可抑制正常角质形成细胞的增殖和上调 TIG3 mRNA 的表达。

总之, 他扎罗汀在体外可抑制角质形成细胞的增殖和诱导 TIG3 mRNA 的表达, 这对他扎罗汀调节角质形成细胞功能的作用机制有一定的提示作用, 但关于他扎罗汀对角质形成细胞功能调节的具体分子作用机制还需进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Duvic M, Nagpal S, Asano AT, et al. Molecular mechanisms of tazarotene action in psoriasis[J]. J Am Acad Dermatol, 1997, 37(2): 18-24.
- [2] 张锡宝, 彭振辉, 曹振平. MTX 对正常人表皮角质形成细胞体外培养增殖的作用及影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2003, 17(6): 371-373.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] 张江安, 谭升顺, 张秉正. 他扎罗汀 (乙炔维甲酸) 的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2001, 15(3): 200-202.
- [5] Duvic M, Helekar B, Schulz C, et al. Expression of a retinoid-inducible tumor suppressor, Tazarotene-inducible gene-3, is decreased in psoriasis and skin cancer[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(8): 3249-3259.
- [6] Duvic M, Ni X, Talpur R, et al. Tazarotene-induced gene 3 is suppressed in basal cell carcinomas and reversed in vivo by tazarotene application [J]. J Invest Dermatol, 2003, 121(4): 902-909.
- [7] DiSepio D, Ghosn C, Eckert RL, et al. Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(25): 14811-14815.

【收稿日期】 2007-01-30 【修回日期】 2007-03-22

· 消息 ·

全国皮肤美容化妆品制剂研修班招生及邮书消息

2007 年 8 月由大连医科大学举办第 10 期全国皮肤美容化妆品制剂研修班, 全国著名药学、化妆品、皮肤美容专家系统讲授涂膜剂、凝胶剂、乳膏剂、香波等美容化妆品和皮肤美容产品的配制技术, 以实习为主, 传授商业处方, 推广最新科研成果及药剂辅料。致力于皮肤美容外用制剂基质化妆品化, 皮肤美容外用制剂及化妆品与相关学科结合。邮购马振友主编《皮肤美容化妆品制剂手册》, 50 元。向全国提供技术咨询, 协助用户开发外用制剂及化妆品, 还有皮肤美容化妆品原料及成品邮购资料备案。

联系地址: 吉林省梅河口市马振友皮肤病研究所; 邮编: 135000; 电话: 0435-4222180, 029-85001029; 联系人: 马振友、苏荣彪; http://www.cd222.com; E-mail: mzy8899@263.net