

- [J]. Acta Otolaryngol, 2002, 122(3): 586 - 599
- 8 Ozturk K, Yaman H, Cihat Avunduk M, *et al.* Effectiveness of Mero-Gel hyaluronic acid on tympanic membrane perforations[J]. Acta Oto - Laryngologica, 2006, 126(6): 1158 - 1163
- 9 Scaramella LF, Farrell BP, Kooiker PD. Effectiveness of nonsurgical office closure of tympanic membrane pars tensa perforations[J]. ENT - Ear, Nose & Throat Journal, 2002, (2): 556 - 560
- 10 Yadav SPS, Aggarwal N, Julaha M, *et al.* Endoscope - assisted myringoplasty[J]. Singapore Med J, 2009, 50(2): 510 - 512
- 11 Gladstone HB, Robert K, Varavk. Tympanic membrane wound healing [J]. An Overview Clinotorhinolaryngology, 1995, 28(3): 913 - 932
- 12 Hellstrom S, Spratley J, Eriksson P, *et al.* Tympanic membrane vessel revisited: a study in an animal model[J]. Otology Neurotology, 2003, 24(2): 494 - 499
- 13 Alexis DR, Christine, Giulio G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast[J]. Wound rep reg, 2005, 13(1): 7 - 12
- 14 Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2007, 127(2): 526 - 537

(收稿: 2011 - 01 - 13)

(修回: 2012 - 05 - 29)

## Notch 信号通道对角质形成细胞中 RPTP - $\kappa$ 的影响

薛斯亮 王晓珊 张 珏

**摘 要** **目的** 探讨 Notch 信号通路对角质形成细胞中 RPTP -  $\kappa$  的影响。**方法** 采用体外细胞培养, 分别激活和抑制 Notch 信号通道后, 抽提 RNA, 实时荧光定量 RNA 检测 RPTP -  $\kappa$  mRNA 含量。**结果** 角质形成细胞在覆盖率为 40% 和 80% 的情况下, RPTP -  $\kappa$  mRNA 表达量后者为前者的 3.4 倍 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), Hes - 1 则为 2.9 倍 ( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ ); 激活 Notch 信号通道后, RPTP -  $\kappa$  mRNA 在 1、2、4、8、24h 分别是对照组的 1.2、1.5、5.1 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、2.3 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )、1.1 倍。而 Notch 信号的目的基因 Hes - 1 的表达在上述时间点分别为对照组的 1.2、1.6 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、2.2 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、1.8 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、1.3 倍; 覆盖率为 80% 角质形成细胞 RPTP -  $\kappa$  mRNA 为 40% 者的 2.3 倍 ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$ )。而抑制 Notch 信号后, 则变为 0.6 倍 ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )。**结论** ①在角质形成细胞不同覆盖率的时候, Hes - 1 和 RPTP -  $\kappa$  表达量有所不同, 细胞覆盖率越大, 细胞越多, 越需要抑制细胞生长的时候, Notch 信号的下游因子 Hes - 1 表达就越多, 与之相同的是 RPTP -  $\kappa$  这一 TGF -  $\beta$  信号的下游因子表达同样增多; ②Notch 信号通道激活的时候, 同时会增大其自身下游因子 Hes - 1 的表达, 同时也可增加 RPTP -  $\kappa$  的表达; ③在高覆盖率的角质形成细胞中抑制 Notch, 本该出现升高的 RPTP -  $\kappa$  表达反而降低了。

**关键词** RPTP -  $\kappa$  Notch NICD

**Regulation of RPTP -  $\kappa$  Transcription by Notch in Primary Human Keratinocytes.** Xue Siliang, Wang Xiaoshan, Zhang Jue. Department of Dermatology, West China Hospital, Sichuan University, Sichuan 610041, China

**Abstract Objective** To illuminate the effect of Notch signal in regulation of RPTP -  $\kappa$  transcription. **Methods** After inhibiting and activating Notch signal of keratinocytes culture *in vitro* separately, we abstracted RNA and used real - time PCR to find out the change of RPTP -  $\kappa$  mRNA expression. **Results** RPTP -  $\kappa$  mRNA expression of keratinocytes in 80% confluent is 3.4 times that in 40% confluent. Hes - 1 (downstream cytokine of Notch signal) mRNA expression of keratinocytes in 80% confluent is 2.9 times that in 40% confluent. After activating Notch signal, RPTP -  $\kappa$  mRNA expression were 1.2, 1.5, 5.1 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), 2.3 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), and 1.1 times that of controls in 1, 2, 4, 8, and 24h; Hes - 1 mRNA expression is 1.2, 1.6 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), 2.2 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), 1.8 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), and 1.3 times that of controls in 1, 2, 4, 8, and 24h. The RPTP -  $\kappa$  mRNA expression of keratinocyte in 80% confluent is 2.3 ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$ ) times that in 40% confluent, but after inhibiting Notch signal, the fold turned to 0.6 ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). **Conclusion** In different confluent of keratinocytes, Hes - 1 and RPTP -  $\kappa$  mRNA expression is different. The higher the confluent of cells is and the more inhibition of cells growth is needed, the more Hes - 1 express; the trend is the same to RPTP -  $\kappa$ . After activating Notch signal pathway, Hes - 1 and RPTP -  $\kappa$  mRNA expression increase at the same time. In high confluent keratinocytes, we inhibit

作者单位: 610041 成都, 四川大学华西医院皮肤科 (薛斯亮); 610041 成都, 四川省医学科学院四川省人民医院肿瘤科 (王晓珊); 563000 遵义医药高等专科学校 (张珏); 610041 成都, 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞与组织工程研究室 (张珏)

通讯作者: 张珏, 讲师, 电子信箱: zhangjue25@163.com

Notch signal, the RPTP- $\kappa$  mRNA expression should have increased but decrease.

**Key words** RPTP- $\kappa$ ; Notch; NICD

Notch 基因首次发现于 1917 年,其突变可造成果蝇的残翅,1983 年 Artavanis Tsakonas 研究组首次克隆了该基因<sup>[1]</sup>。Notch 蛋白通过 3 次水解,最后分割为  $\gamma$ -分泌酶切割为胞内片段(NICD),为 Notch 在细胞内的真正活性形式<sup>[2-4]</sup>。Notch 受体可以通过对相邻细胞配体相互作用,调节细胞的分化、生长,接触性抑制和肿瘤细胞的相对无限增殖即可能与之相关。受体酪氨酸蛋白磷酸酶- $\kappa$ (receptor type protein tyrosin phosphatase- $\kappa$ , RPTP- $\kappa$ )可以特异地使表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)去磷酸化,从而阻断 EGFR 依赖的信号,抑制下游信号和下游蛋白的增殖。RPTP- $\kappa$  对表皮生长的抑制作用正是皮肤肿瘤的形成、皮肤老化、皮肤慢性炎症等现象的重要调控机制<sup>[5]</sup>。Notch 信号和 EGFR 的相互作用在多种细胞甚至干细胞中都有研究阐述<sup>[6]</sup>。本研究旨在揭示 Notch 信号对 EGFR 通道活性的调控蛋白——RPTP- $\kappa$  的调控作用,为阐明 Notch、EGFR 信号通道的关系和作用原理提供线索。

## 材料与方法

1. 实验试剂与材料:成人角质形成细胞株购自 Cascade Biologics 公司(Portland, OR)。角质形成细胞培养基(keratinocyte growth medium, KGM)、(keratinocyte basal medium, KBM)(Epilife, 美国),人重组 TGF- $\beta_1$ (R&D System, 美国),Jagged1 肽段(AnaSpec, 美国),SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒、RT-PCR(Taqman)试剂盒(Applied Biosystems, 美国),Trizol、胰蛋白酶中和液(TN)、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸溶液(TE)、双抗、PBS 缓冲液(invitrogen, 美国),GSI、引物合成及探针修饰由美国密歇根大学皮肤科实验室提供。

2. 角质形成细胞的培养和传代:细胞到 80% 的覆盖率可以用于传代。移走培养皿中所有培养液,加入 3ml TE 液,消化细胞,5min 后镜下观察细胞,80% 细胞漂浮时加入 7ml TN 液,吹打剩余贴壁细胞,并吹打混匀为单细胞悬液。将细胞悬液移入离心管中,1200r/min,5min 离心。吸出上清,并用 5ml KGM 培养基重悬为细胞悬液,1:5 传代。细胞悬液轻摇后放入培养箱,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养。

3. 角质形成细胞在不同细胞覆盖率情况下 RPTP- $\kappa$ , Hes-1 的 mRNA 表达:将细胞以  $2 \times 10^4$ /ml,  $1 \times 10^4$ /ml 接种在 6 孔板中,当细胞覆盖率分别达到 80% 和 40% 时,提取总 RNA。按试剂盒说明反转录聚合酶链反应(RT-PCR)。引物设计:人类 HES-1 上游引物:5'-TTGGAGGCTTCCAGGTGTA-3',下游引物:5'-TTGGAGGCTTCCAGGTGTA-3'。人类 RPTP- $\kappa$  上游引物:5'-ACAGACTGCTGAAAATAGCAGGAA

-3',下游引物:5'-TGACAACTAGGAGAAGGAGGATGA-3'。实时荧光定量 PCR 反应参数:94℃ × 10min, 94℃ × 20s, 60℃ × 30s, 72℃ × 30s, 45 个循环。

4. Notch 配体 Jagged-1 对人角质形成细胞 RPTP- $\kappa$  mRNA 及 Hes-1 mRNA 的作用:取覆盖率为 40% 的角质形成细胞 6 孔板,移除培养基后在每孔中加入 1ml KBM 培养基,放入培养箱 30min。每孔加入 Jagged-1 1  $\mu$ l,轻柔振摇培养板后,分别放入培养箱 0、1、2、4、8、24h。每个时间点分别 mRNA 抽提、反转录和实时 PCR 检测。以不加 Jagged-1 角质形成细胞为对照组。

5.  $\gamma$  分泌酶抑制剂(gamma-secretase inhibitor, GSI)对受细胞覆盖率影响的 RPTP- $\kappa$  mRNA 表达的影响:取覆盖率为 40%, 80% 角质形成细胞 6 孔板,移除培养基后在每孔中加入 1ml KBM 培养基,放入培养箱 30min。每孔加入 GSI 2  $\mu$ l,轻柔振摇培养板后,分别放入培养箱 24h。24h 后拿出做 mRNA 抽提、反转录和实时 PCR 检测。以不加 Jagged-1 角质形成细胞为对照组。

## 结 果

1. 角质形成细胞培养:角质形成细胞贴壁成典型铺路石样外观,每 4~5 天可传一代。

2. 角质形成细胞在不同细胞覆盖率情况下 RPTP- $\kappa$ , Hes-1 mRNA 表达:角质形成细胞在覆盖率为 40% 和 80% 的情况下, RPTP- $\kappa$  mRNA 表达量后者为前者的  $3.4 \pm 0.26$  倍( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), Hes-1 则为  $2.9 \pm 0.15$  倍( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ )(图 1)。

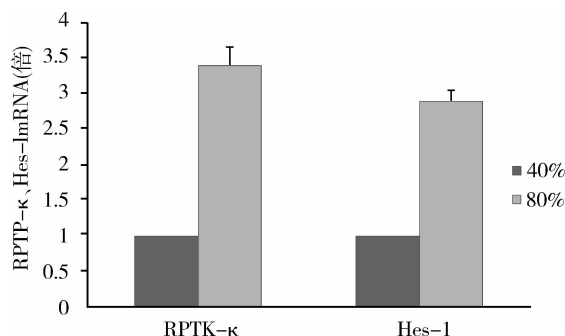


图 1 不同覆盖率角质形成细胞 RPTP- $\kappa$  mRNA、Hes-1 mRNA 的表达

3. Notch 配体 Jagged-1 对人角质形成细胞 RPTP- $\kappa$  mRNA 及 Hes-1 mRNA 的作用:加入 Jagged-1 的人角质形成细胞中 RPTP- $\kappa$  mRNA 在 1、2、4、8、24h 分别是对照组的 1.2、1.5、5.1 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、2.3 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )、1.1 倍。而 Hes-1 的表达

在上述一个时间点这分别为对照组的 1.2、1.6 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、2.2 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、1.8 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、1.3 倍(图 2)。

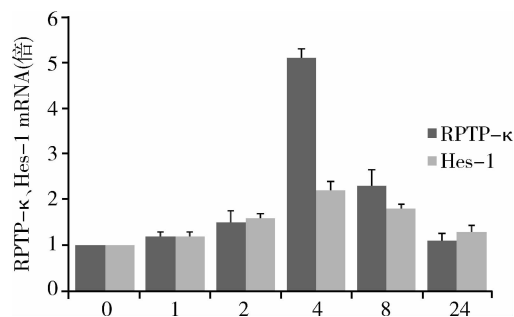


图 2 加入 Jagged-1 的 1、2、4、8、24h, RPTP-κ、Hes-1 mRNA 表达量

4. GSI 对高细胞覆盖率细胞 RPTP-κ mRNA 表达的影响: 覆盖率为 80% 角质形成细胞 RPTP-κ mRNA 为 40% 者的 2.3 倍 ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$ )。在加入了 GSI 后 80% 覆盖率组 RPTP-κ mRNA 则变为 40% 覆盖率未加 GSI 组的 0.6 倍 ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (图 3)。

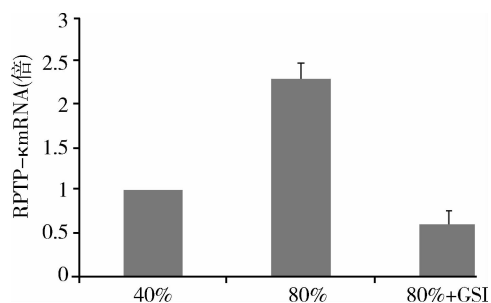


图 3 不同条件下 RPTP-κ mRNA 表达量

## 讨 论

RPTP-κ 胞外结构由 3 个黏附分子样片段构成, 可以和临近细胞的同类抗原分子结合, 和其他 RPTP 一样, 它可以使 EGFR 处于非激活状态, 但 RPTP-κ 的作用是所有 RPTP 中最强的。RPTP-κ 将使 EGFR 被氧化物激活的酪氨酸磷酸化作用降低 5 倍, 从而减少表皮肿瘤形成的可能性<sup>[5,6]</sup>。本实验中发现 Notch 通道对 RPTP-κ 的重要作用, 让我们对 Notch 在皮肤抗衰老和皮肤肿瘤的研究和应用前景充满了期待。

敲除 Notch 的小鼠表皮可出现毛囊间表皮增生, 表皮基底细胞层与马尔匹基层细胞中角蛋白异常增多, 基底层以上整合素增多。可表现为表皮角化过度, 脱毛和表皮囊肿<sup>[7]</sup>。其原理可能是在 Notch 受体

与配体结合后, 提高了 RPTP-κ 的表达, 阻止 EGFR 酪氨酸磷酸化, 控制表皮细胞的生长。

在本研究中, 为方便实验, 我们将细胞以  $2 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $1 \times 10^4/\text{ml}$  同时接种在 6 孔板中, 这样两种浓度的细胞在较近的时间里, 细胞覆盖率分别达到 80% 和 40%, 利于我们对两种覆盖率情况下的细胞同时提取 RNA, 所以也可以同种浓度接种, 分别等到两种覆盖率时再分别提取 RNA, 所以接种起始浓度并不影响实验结果。我们发现在细胞覆盖率较大的时候, RPTP-κ mRNA 增高了。而作为 Notch 信号的下游因子的 Hes-1 mRNA 也增高。那么在细胞覆盖率增高也就是需要抑制细胞生长的时候, Notch 和 RPTP-κ 都被激活而表达增加。细胞覆盖率升高的同时, 由于 RPTP-κ 胞外段含有黏附分子样片段, 这些片段使 RPTP-κ 起到或至少参与了细胞接触抑制<sup>[8]</sup>。所以在高覆盖率角质形成细胞中, RPTP-κ mRNA 表达明显高于低覆盖率者, 而 Hes-1 的同步升高, 提示我们 Notch 信号的抑制细胞生长作用很可能是由 RPTP-κ 来实现的。

为了证明 Notch 信号 RPTP-κ 有直接联系, 我们在人角质形成细胞中加入 Notch 配体 Jagged-1, 发现细胞中 Hes-1 和 RPTP-κ 都有明显增加。Jagged-1 在激活 Notch 信号的同时, 增加了 RPTP-κ 的表达量。所以说 Notch 与 RPTP-κ 确有直接联系。在加入 Jagged-1 以后, Hes-1 和 RPTP-κ 的表达在 4h 达到了一个峰值, 4h 后 Hes-1 和 RPTP-κ 同步逐渐下降, 使我们猜想在 Notch 信号和 RPTP-κ 之间是否还有中间物质或通道, 使 4h 后的 Hes-1 和 RPTP-κ 逐渐减少, 这会是我们下一步研究非常有趣的着力点。而我们将 Notch 信号抑制剂加入高覆盖率的人角质形成细胞后, 本该升高的 RPTP-κ 反而不高, 甚至略低于低覆盖率的细胞, 所以 RPTP-κ 的表达似乎确需依赖于 Notch 信号通道。

在基底细胞癌和表现为表皮角化过度的肿瘤中 Notch 信号都明显减少, 而 Notch 的肿瘤抑制作用可以受 TGF-β 调节, RPTP-κ 则有可能是其原理的重要因素<sup>[9]</sup>。所以 TGF-β 信号通道与 Notch 信号通道, RPTP-κ 三者的关系将是本小组的下一个研究课题。EGFR 在其他多种肿瘤的形成中起着至关重要的作用, 目前多种抗肿瘤药物以 EGFR 作为治疗靶点。比如西妥昔单抗, 作用于 EGFR 胞外区的 IgG 单克隆抗体, 通过使肿瘤细胞进入  $G_0/G_1$  期而达到抑制肿瘤生长的目的; 吉非替尼和厄洛替尼通过竞争性

抑制 EGFR 的 ATP 结合位点而阻断下游 EGFR 信号通道的激活。所以对 EGFR 起着抑制作用的 RPTP- $\kappa$  和 Notch 信号通路完全有可能成为新的治疗靶点和研究方向。

总之,Notch 提高 RPTP- $\kappa$  mRNA 的过程中是重要且不可替代的。RPTP- $\kappa$  与 Notch 信号由于可以抑制 EGFR 对细胞增殖,肿瘤细胞生长作用,其重要性不言而喻。由此可见在 RPTP- $\kappa$  调节过程中起着重要作用的 Notch 信号通道对 EGFR 通道的细胞增殖,皮肤衰老和肿瘤形成可能就扮演着重要角色,甚至未来在对细胞分化,增殖的控制研究,肿瘤的靶向治疗及皮肤抗衰老的研究中 Notch 信号通道是前景非常光明的方向。

#### 参考文献

- Wharton KA, Johansen KM, Xu T, *et al.* Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats [J]. Cell, 1985, 43 (3pt2):567-581
- Fryer CJ, White JB, Jones KA. Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover [J]. Mol cell, 2004, 16(4):509-520

- Kopan R, Ilagan MX. Gamma-secretase: proteasome of the membrane [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(6):499-504
- Oswald F, Winkler M, Cao Y, *et al.* RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(23):10379-10390
- Xu Y, Tan L, Grachtchouk V, *et al.* Receptor type protein tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function [J]. J Biol Chem, 2005, 280(52):42694-42700
- Adan A, Maria R, Vittorio G. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal [J]. Nature, 467:323-327
- Yiru X, Yuan S, John V, *et al.* Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes [J]. J Biol Chem, 2006, 281(37):27389-27397
- Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, *et al.* Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation [J]. EMBO J, 2001, 20(13):3427-3436
- Blokzijl A, Dahlqvist C, Reissmann E, *et al.* Cross-talk between the Notch and TGF- $\beta$  signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3 [J]. J Cell Biol 2003, 163(4):723-728

(收稿:2011-11-30)

(修回:2011-12-16)

## 《医学研究杂志》2012 年征订征稿启事

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》)于 1972 年创刊,是由卫生部主管、中国医学科学院主办的国家级医学学术刊物。中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。世界卫生组织西太区医学索引(WPRIM)收录期刊。月刊。CN11-5453/R,ISSN1673-548X。

《医学研究杂志》紧跟医学发展趋势,对医学热点予以及时追踪,内容新颖,学术水平较高,以从事医疗、科研工作者为读者对象,以报道医学领域的科研成果和诊疗经验为主要内容,突出科学性、创新性和实用性,及时反映我国医学领域基础、临床、科研工作的重大进展,以促进医学科学领域的学术交流。《医学研究杂志》为大 16 开,150 页,80g 铜版纸。杂志信息量大,装帧精美。每册定价:10 元,全年 120 元(含邮费)。国内外公开发售,邮发代号:2-590。编辑部电话:010-52328677,52328678,52328679;传真:010-65230946。E-mail:xyz85637883@126.com。投稿网址:http://www. xyjzz. cn。编辑部地址:北京市朝阳区雅宝路 3 号(邮编:100020)医科院信息所 306、307 房间。