

· 论 著 ·

皮肤老化过程中角质形成细胞的比较蛋白质组分析与鉴定*

陈爱军¹, 黄欣^{2△}, 易永芬³, 李惠¹, 高永良¹, 李文静¹, 龙亭¹

(重庆医科大学: 1. 附属第一医院皮肤科; 2. 中医药学院中药方剂教研室;

3. 分子医学及肿瘤研究中心病理教研室 400016)

摘要:目的 筛选出表皮角质形成细胞中与皮肤老化相关的蛋白。方法 从角质形成细胞(KC)中提取蛋白质,并进行 2-DE 分离,采用 MALDI-TOF 质谱分析及数据库查询;并在蛋白质水平进行 Western-blotting 验证。结果 成功鉴定了 21 个差异表达蛋白,发现 P21 既随年龄增长高表达,也在同一年龄段曝光组高表达;而 annexin A2 的表达降低;在同一年龄段热休克蛋白(HSP)27 和 HSP70、丝裂源激活的蛋白酶(MAPK)、Keratin, trpe II cyloskeletal 80(K2C80)在曝光部位高表达,而 actin cytoplasmic 1(ACTB)在非曝光部位高表达。并与蛋白质水平进行的验证结果一致。结论 所鉴定的蛋白质与皮肤自然老化和(或)光老化关系密切,但其确切功能有待进一步研究。

关键词: 皮肤老化;角质形成细胞;蛋白质组

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.023

中图分类号:R334.5;R339.38

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3207-03

Analysis and identification of comparative proteome in keratinocytes during skin aging process

CHEN Ai-jun¹, HUANG Xin^{2△}, YI Yong-feng³, et al.

(1. Department of dermatology, the First Affiliated Hospital; 2. School of Medicine

Department of Traditional Chinese Medicines; 3. Cancer Research Center of Mdecular Medicine and

Deaprtment Case, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective This study is to explore the differentially expressed protein or a specific protein expression that can be a marker of skin aging from an exposed and non-exposed skin of youth, middle-aged and elderly. **Methods** The proteins were extracted from the exposed and non-exposed elderly separated epidermis, and were submitted to two-dimensional gel electrophoresis. Then their electrophoretic patterns were analyzed by the PDQUEST software and identified by MALDI-TOF MS. The following steps were database query and probation using Western-Blotting. **Results** By comparison the two groups of two-dimensional electrophoresis patterns, in which 21 differential protein spots were successfully identified by MALDI-TOF analysis and database queries, and 4 proteins, HSP27, HSP70, MAPK, K2C80, were identified high expressed in exposed group while ACTB was high expressed in non-exposed group. **Conclusion** The changes in expression of 21 indentified proteins may have a close relationship with photoaging, that helps revealing molecular mechanism of epidermal cells in photoaging.

Key words: skin aging; keratinocyte; proteome

皮肤老化包括由遗传因素及不可抗拒因素(如机体免疫及内分泌功能随机体衰老的改变)引起的固有老化(又称时程老化或自然老化)和由环境因素(如紫外线、接触化学物质、风吹和吸烟等)引起的外源性老化。日光中的紫外线(UVB)长期反复照射是引起皮肤老化的最重要环境因素,因此外源性老化一般又指光老化^[1]。皮肤老化是自然老化和光老化中各种因素影响的最终结果^[2],是一个动态、复杂多变的过程。本文通过比较不同年龄人群中、不同部位皮肤角质形成细胞 KC 在自然、连续、动态的成长过程中差异表达蛋白,探寻其中表达差异高的蛋白有可能成为皮肤老化的标志性蛋白,探讨 KC 在皮肤老化过程中的作用及分子机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2007 年 4 月至 2009 年 12 月收集来自重庆医科大学附属第一医院皮肤科、骨外科、整形外科、泌尿外科手术后遗留的正常皮肤标本,曝光部位(面部)为曝光组及非曝光部位(臀部、会阴部)为曝光组,各 30 例,见表 1。取材前与患者和(或)家属签订《知情同意书》。

1.2 试剂和仪器 试剂:17 cm 固相 pH 梯度(immobilized pH gradients, IPG)胶条(pH 3~10、pH 5~8)、30%聚丙烯酰胺溶液购自 Bio-Rad 公司,超纯尿素(urea)购自百乐公司,蛋白酶抑制剂 Dispase II 购自 Roche 公司, RNase、DNase 购自 Sigma 公司。仪器:Bio CAD700E 快速蛋白分离纯化系统为美国 ABI 公司产品,等电聚焦仪 Ettan IPGphor III 购自通用公司,GS800 密度扫描仪为百乐公司产品,PDQuest7.4 图像分析软件为美国 Bio-RAD 公司产品。

表 1 不同年龄段、不同部位标本比较(n)

组别	青年(A)	中年(B)	老年(C)
曝光组	30(A1)	30(B1)	30(C1)
非曝光组	30(A2)	30(B2)	30(C2)

1.3 方法

1.3.1 表皮和真皮的分离,蛋白质的提取及蛋白浓度测定 将标本清洁处理后,用 PBS 洗 3 次后将皮肤剪成 5 mm×5 mm

* 基金项目:中华医学会-欧莱雅中国人健康皮肤/毛发研究项目(S 2008050627);重庆医科大学优秀博士学位论文科研资助项目;重庆医科大学校级课题资助项目(0200101008)。△ 通讯作者, E-mail:cajhx@yahoo.com.cn。

大小皮片,按 1:4 体积置入 0.125% 的 Dispase II 中 37 °C 消化 1 h,分离表皮。将分离好的表皮用去离子水洗 3 次后切成肉蓉状。4 °C、12 000×g 离心 45 min,吸取上清液,采用 Bradford 法测定蛋白浓度^[3], -80 °C 保存。

1.3.2 双向凝胶电泳

1.3.2.1 等电聚焦 取 -20 °C 保存的 IPG 预制胶条,室温放置 10 min 后线性加入 250 μL 样品。被动水化 12~16 h,聚焦:除盐、聚焦、总电压时间为每小时 60 000 V。

1.3.2.2 SDS-PAGE 电泳 将聚焦好的 IPG 胶条置平衡液中于摇床上平衡好后进行第 2 向垂直电泳。12% 胶浓度、5 mA/gel 电泳 1 h,30 mA/gel 电泳 6 h,至溴芬蓝线接近凝胶底线。

1.3.2.3 染色 凝胶于固定液中固定过夜,经水洗、敏化、水洗后,银染 30 min,显色至蛋白点清晰后立即终止。1% 的醋酸溶液 4 °C 保存。

1.3.2.4 图像分析 染色后凝胶由 GS800 扫描图像,分离所得蛋白质点由 PDQUEST 软件进行分析。

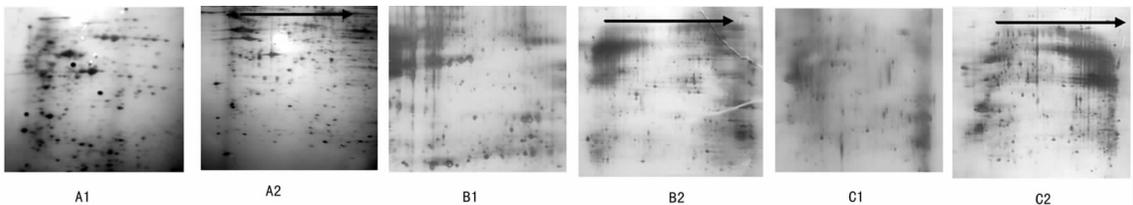


图 1 两组双向凝胶电泳图谱

表 2 各年龄段两组平均蛋白点数及匹配率比较(̄x±s)

年龄段	组别	平均蛋白点	匹配率
青年	曝光组	387±21	81.6
	非曝光组	372±18	82.2
中年	曝光组	380±31	83.7
	非曝光组	363±19	85.5
老年	曝光组	365±17	84.5
	非曝光组	359±15	83.3

表 3 各年龄段两组双向凝胶电泳图谱差异表达蛋白点比较

组别	年龄段	差异蛋白点数	2 倍以上量变	高表达蛋白数
曝光组	青年	43	14	8
	中年	43	14	9
	老年	43	14	12
非曝光组	青年	38	13	7
	中年	38	10	
	老年	38	13	8

2.2.1 MALDI-TOF/MS 分析结果及蛋白点对应的肽质指纹图 见封 2 图 2。

2.2.2 分析比较结果 P21 既随年龄增长高表达,也在同一年龄段曝光组高表达。随年龄的增长 G 蛋白高表达,而膜联蛋白 A2(annexin A2)的表达降低。两组热休克蛋白(heat shock protein, HSP) HSP27 和 HSP70、丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)、Keratin, type II cytoskeletal 80(K2C80)在曝光部位高表达,而 Actin cytoplasmic 1(ACTB)在非曝光部位高表达。

1.3.3 差异候选蛋白的 MALDI-TOF 鉴定

1.3.3.1 胶内原位酶切及质谱分析 切取凝胶上的差异蛋白点,水洗后用硫代硫酸钠脱色。经吸胀、脱水、冷冻真空干燥后,37 °C 水浴中酶解过夜。萃取 2 次,纯化后送交质谱室。

1.3.3.2 数据库查询 用蛋白质数据库 MASCOT Peptide Mass Fingerprint 进行查询。

1.3.4 蛋白质水平的验证 用蛋白质免疫印迹技术(Western-blotting)验证差异候选蛋白。每组样品取等量加入上样孔,以 β-actin 作为内参,经电泳、转膜、抗原抗体结合反应、发光等逐步验证候选蛋白的表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,两组比较采用 t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组表皮角质形成细胞蛋白质 2-DE 分离结果见表 2、图 1。两组曝光部位 KC 双向凝胶电泳图谱,筛选差异表达蛋白点。见表 3、4。

2.2 MALDI-TOF/MS 分析及数据库查询结果

2.3 差异候选蛋白的验证结果 两组图谱(图 3)条带灰度比值差异均有统计学意义(P<0.01),与双向电泳图谱分析结果一致。

表 4 各年龄段两组双向凝胶电泳图谱差异表达蛋白点比较

年龄段	组别	差异蛋白点数	2 倍以上量变	高表达蛋白数
青年	曝光组	29	12	11
	非曝光组	29	12	6
中年	曝光组	33	11	13
	非曝光组	33	11	9
老年	曝光组	36	14	15
	非曝光组	36	14	7

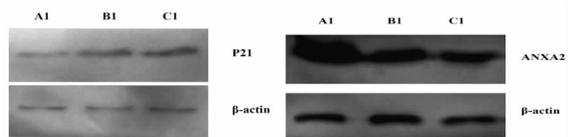


图 3 P21 和 ANXA2 表达情况

3 讨 论

本文采用蛋白质组学技术,成功鉴定了 21 个候选蛋白。根据文献报道这些蛋白质与皮肤的自然老化和(或)光老化关系密切,归纳起来主要有以下几种途径。

3.1 参与细胞的基础能量代谢 K2C80:目前关于 K2C80 的报道罕见。Sano 等^[4]发现角蛋白 K6、K16 在长期的紫外线照射中呈持续高表达,可能参与了皮肤皱纹的形成,与皮肤的光老化有关。K2C80 在曝光部位高表达可能与此相关。

3.2 影响蛋白质的合成、折叠、降解过程 G 蛋白即 GTP 结

合蛋白:研究发现 KC 衰老的基因表达改变明显,首先,G 蛋白亚单位的活性和构成有变化,然后通过 PKC、PTK 等信号传导途径,最后影响 KC 的增殖和分化。本研究结果显示,随着年龄的增长 KC 中 G 蛋白逐渐高表达。

3.3 参与细胞骨架蛋白的构建 annexin A2:其参与细胞骨架的胞内信号传导,故在维持正常上皮细胞的形态及肿瘤发生中起着重要的作用^[5]。本研究结果表明随着年龄的增长 annexin A2 的表达降低,与以往的研究结果一致。ACTB:本研究发现在同一年龄段中非曝光部位高表达,而曝光部位低表达。Provost 等^[6]证实细胞骨架与细胞的收缩有关,研究显示 UVA 照射导致了肌动蛋白的解聚,细胞骨架的变形。在长期的 UVA 暴露中最终会导致细胞功能的衰竭,提示与光老化有关。并可能最终导致表皮肿瘤的形成。

3.4 调控细胞的生长、增殖、分化 谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases,GSTs):GSTA2 在曝光部位皮肤的表达量较低,可能与老化的表皮自我保护能力的降低、氧化和抗氧化的失衡密切相关。UVB 照射可导致 KC 产生大量的活性氧及自由基,损伤细胞的多种成分,引起细胞的凋亡、皮肤肿瘤的产生^[7]。

3.5 参与细胞的凋亡、免疫调控 P21(CDKN1A):有研究结果表明,UVB 照射正常人 KC 后,P21 蛋白表达增强。本研究结果显示 P21 既随年龄增长高表达,也在同一年龄段曝光组高表达。因此,p21 与自然老化及紫外线照射后引起的光老化可能都密切相关。HSP:本研究检测到两种 HSP27 和 HSP70,都在曝光部位高表达。Jean 等^[8]用 cDNA 芯片检测发现在给予单一剂量 UVA 后黑素细胞的 3 个编码应激反应蛋白(HSP70、HSP40、HSP86)的基因表达增加,表明单一剂量 UVA 即可诱导黑素细胞多种 HSP 基因表达增加,其中 HSP70 表现最为明显且水平持续增高。与本研究结果一致。

本研究建立了人表皮组织的双向电泳技术,获得了清晰、重复性高的双向电泳图谱,检测自然成长人不同年龄段、不同部位 KC 存在差异表达的蛋白;经分析和鉴定的 21 种蛋白质与皮肤的自然老化和(或)光老化关系密切,为进一步研究表皮细胞在光老化过程中的作用及分子机制奠定基础。但所鉴定

出的差异蛋白在皮肤自然老化和(或)光老化中的确切功能有待进一步验证。

参考文献:

- [1] Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing[J]. Mech Aging Dev,2002,123:801.
- [2] 李良平,魏莲枝,周建荣. 高低分化喉癌组织的二维电泳图谱的建立及质谱分析[J]. 重庆医学,2008,37(2):149.
- [3] Gartel A,Radhakrishnan S. Lost in transcription: p21 repression,mechanisms,and consequences[J]. Cancer Res,2005,65(10):3980.
- [4] Sano T,Kume T,Fujimura T,et al. Long-term alteration in the expression of keratins 6 and 16 in the epidermis of mice after chronic UVB exposure[J]. Arch Dermatol Res,2009,301(3):227.
- [5] Paweletz C,Ornstein D,Roth M,et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma[J]. Cancer Res,2000,60(22):6293.
- [6] Provost N,Moreau M,Leturque A,et al. Ultraviolet A radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2003,284:C51.
- [7] Black A,Gray J,Shakarjian M,et al. Distinct effects of ultraviolet B light on antioxidant expression in undifferentiated and differentiated mouse keratinocytes[J]. Carcinogenesis,2008,29(1):219.
- [8] Jean S,Bideau C,Bellon L,et al. The expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365 nm UVA: study by cDNA arrays and real, time quantitative RT-PCR[J]. Biochim Biophys Acta,2001,1522:89.

(收稿日期:2010-06-13 修回日期:2010-07-13)

(上接第 3206 页)

- [2] 曾惠琼,叶志中,汪迅,等. SLE 患者外周血 IFN- γ 水平与疾病活动性的相关研究[J]. 现代免疫学杂志,2007,27(1):69.
- [3] Bombardier C,Gladman DD,Urowitz MB,et al. Derivation of the SLE;a disease activity index for lupus patients. The committee on Prognosis Studies in SLE [J]. Arthritis Rheum,1992,35(6):630.
- [4] Baechler EC,Batliwalla FM,Karypis G,et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(5):2610.
- [5] 陶金辉,李向培,厉小梅,等. IFN- γ 在 SLE 发病中的作用和临床意义[J]. 疾病控制杂志,2005,9(3):278.
- [6] Tackey E,Lipsky PE,Illei GG. Rationale for IL-6 blockade in SLE[J]. Lupus,2004,13(5):339.
- [7] 伍丽,马圣清,王光超. SLE 患者糖皮质激素治疗前后 IL-

2、sIL-2R 及 IL-6 水平的比较[J]. 临床皮肤科杂志,1995,1:8.

- [8] Yin Z,Bahtiyar G,Zhang N,et al. IL-10 regulates murine lupus[J]. J Immunol,2002,169(4):2148.
- [9] 王静,王俭勤,张筠,等. 1 α ,25-二羟维生素 D₃ 对患者 PB-MC 分泌的 IFN- α 和 IL-10 水平的影响[J]. 中国药物与临床,2004,4(9):677.
- [10] Ishida H,Muchamuel T,Sakaguchi S,et al. Continuous administration of anti-IL 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/WF1 mice[J]. J Exp Med,1994,179:305.
- [11] 韩晓枫,邹容良. 血清 sFas 和 sFasL 在系统性红斑狼疮诊治中的应用[J]. 临床检验杂志,2000,18(6):349.
- [12] 毛艳,王帆,胡文胜. 系统性红斑狼疮血 sFas 水平的变化及意义[J]. 中华中医药杂志,2002,26(3):154.

(收稿日期:2010-02-13 修回日期:2010-06-13)