

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0905-04

· 论 著 ·

机械损伤对人皮肤角质形成细胞氧化应激和前列腺素 E2 分泌的影响

傅秀军, 石有振, 方 勇, 姚 敏, 王 莹

(上海交通大学 医学院附属第三人民医院烧伤整形科 创伤医学研究所, 上海 201900)

[摘要] **目的** 探讨机械损伤对人皮肤角质形成细胞前列腺素 E2(PGE₂)分泌的影响及其可能的机制。**方法** 将体外培养的人皮肤角质形成细胞(HaCaT)分为损伤组、NADPH 氧化酶(NOX)抑制剂氯化二亚苯基碘鎓(DPI)预处理组和抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理组,三组细胞经划痕法建立体外机械损伤细胞模型,以未建模的 HaCaT 细胞作为对照组。于建模后不同时间点收集损伤组、DPI 预处理组和对照组的细胞及各组细胞的培养上清液,分别采用荧光探针技术和化学发光法测定细胞内活性氧(ROS)的生成和 NOX 活性,以酶联免疫吸附试验检测各组细胞培养上清液中前列腺素 E2(PGE₂)的质量浓度。**结果** 建模后各时点,损伤组和 DPI 预处理组细胞内 ROS 生成和 NOX 活性均显著高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);DPI 预处理组建模后各时点细胞内 ROS 生成和 NOX 活性均显著低于损伤组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞培养上清液中 PGE₂ 质量浓度的检测结果显示:建模后各时点,损伤组、DPI 预处理组和 NAC 预处理组均显著高于对照组($P < 0.01$),DPI 预处理组和 NAC 预处理组均显著低于损伤组($P < 0.01$)。**结论** 机械损伤后人皮肤角质形成细胞的 PGE₂ 分泌量增加,其机制可能与细胞内 ROS 生成增加和 NOX 活性升高所介导的氧化应激有关。

[关键词] 人皮肤角质形成细胞;机械损伤;氧化应激;前列腺素 E2

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.008

[中图分类号] R641

[文献标志码] A

Effects of mechanical damage on oxidative stress and prostaglandin E2 secretion in human skin keratinocytes

FU Xiu-jun, SHI You-zhen, FANG Yong, YAO Min, WANG Ying

(Department of Burns and Plastic Surgery, the Third People's Hospital, Institute of Traumatic Medicine, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of mechanical damage on prostaglandin E2 (PGE₂) secretion in human skin keratinocytes, and explore its possible mechanism. **Methods** Human skin keratinocytes (HaCaT) cultured *in vitro* were divided into injury group, NADPH oxidase (NOX) inhibitor diphenyleneiodonium chloride (DPI) pretreatment group and antioxidant N-acetylcysteine (NAC) pretreatment group. Mechanical damage cell models were established by scratch method, and HaCaT cells without model establishment were served as control group. Cells and culture supernatant were collected from injury group, DPI pretreatment group and control group at different time points after model establishment, fluorescent probe and chemiluminescence method were employed to detect the intracellular reactive oxygen species (ROS) generation and NOX activity respectively, and the mass concentration of prostaglandin E2 (PGE₂) in culture supernatant in each group was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** At each time point after model establishment, the intracellular ROS generation and NOX activity in injury group and DPI pretreatment group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the intracellular ROS generation and NOX activity in DPI pretreatment group were significantly lower than those in injury group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The mass concentrations of PGE₂ in culture supernatant in injury group, DPI pretreatment group and NAC pretreatment group were significantly higher than that in control group ($P < 0.01$), while the mass concentrations of PGE₂ in culture supernatant in DPI pretreatment group and NAC pretreatment group were significantly lower than that in injury group at each time point after model establishment ($P < 0.01$). **Conclusion** PGE₂ secretion in human skin keratinocytes may increase after mechanical damage, which may be

[基金项目] 上海市科委基金(10ZR1418400) (Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 10ZR1418400)。

[作者简介] 傅秀军(1985—),男,硕士生;电子邮箱: fuxj84@yahoo.com.cn。

[通信作者] 王 莹,电子邮箱: wy04wy@hotmail.com。

associated with oxidative stress mediated by increased intracellular ROS generation and NOX activity.

[Key words] human skin keratinocyte; mechanical damage; oxidative stress; prostaglandin E2

氧化应激是指机体在受到各种有害刺激时,体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成过多,氧化程度超出氧化物的清除,氧化与抗氧化系统失衡,从而导致组织损伤。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶(NADPH oxidase, NOX)是介导细胞 ROS 生成的重要酶之一。研究^[1,2]表明:氧化应激是人皮肤热、紫外线等损伤的重要机制之一;但其与机械损伤的关系尚未明确。本研究以人皮肤角质形成细胞系(HaCaT)为实验对象,采用划痕法建立体外机械损伤细胞模型,观察受损伤细胞 ROS 生成及 NOX 活性变化及其对炎症介质前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE₂)分泌的影响,初步探讨氧化应激在皮肤机械损伤和修复中的可能作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

人皮肤角质形成细胞系(HaCaT)购自武汉大学生命科学院中国典型培养物保藏中心。RPMI 1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA (Gibco);胎牛血清(Hyclone);荧光探针 2',7'-二氢二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA) (Invitrogen);NOX 抑制剂氯化二亚苯基碘鎓(diphenyleneiodonium chloride, DPI) (Sigma-Aldrich);抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-Acety-L-cysteine, NAC) (碧云天生物技术研究);光泽精(Lucigenin) (上海梯希爱化成工业发展有限公司);PGE₂ 酶联免疫试剂盒(Cayman Chemical)。SpectraMax Gemini EM 微孔板分光光度计(Molecular Devices);GloMax 20/20 化学发光检测仪(Promega);酶标仪(BIO-RAD)。

1.2 细胞培养、分组和建模

1.2.1 细胞培养 HaCaT 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下常规培养;细胞长至 90% 融合后以 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 进行消化传代培养。

1.2.2 实验分组 ①损伤组:细胞接受机械损伤;②DPI 预处理组:细胞经 50 μmol/L DPI 孵育 30 min 后接受机械损伤;③NAC 预处理组:细胞经 50 μmol/L NAC 孵育 30 min 后接受机械损伤;④对照组:细胞不接受机械损伤。

1.2.3 划痕法建立体外机械损伤细胞模型^[3] 收集损伤组、DPI 预处理组和 NAC 预处理组细胞,接种

于 6 孔板,分别待细胞长至 30%~50% (ROS 生成检测)或 70%~90% (NOX 活性测定)或 80% (PGE₂ 分泌检测)融合时吸出上清,用 20 μL 枪头在培养皿底部平行划三道直线痕(每道划痕间距为 5 mm)造成机械损伤。操作时应注意控制划伤的力度和速度,尽可能使所划之处细胞清除而皿底不受损伤,避免划痕周围细胞的成片脱落。PBS 液清洗 3 遍以去除损伤的细胞碎片,添加新鲜培养基继续培养并进行后续实验。

1.3 检测指标

1.3.1 荧光探针技术检测细胞内 ROS 生成 分别于建模后 0、10、20、30、45、60、120 min 收集损伤组、DPI 预处理组和对照组细胞,每孔加入 10 μmol/L DCFH-DA 1 mL,37 °C 避光孵育 15 min,吸出探针孵育溶液,用 PBS 洗涤 3 遍。以微孔板分光光度计对荧光强度进行定量分析。DCFH-DA 在细胞内被氧化后最大激发波长为 480 nm,最大发射波长为 530 nm。

1.3.2 化学发光法测定细胞 NOX 活性^[4] 分别于建模后 0、5、15、30、45、60 min 收集损伤组、DPI 预处理组和对照组细胞,用 Hanks 液洗 2 遍,胰蛋白酶消化细胞,1 000 ×g 离心 5 min;弃上清,沉淀用 1 mL 预冷的缓冲液(含 130 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl₂、1.5 mmol/L CaCl₂、35 mmol/L 磷酸和 20 mmol/L HEPES, pH 7.4)重悬,置冰上裂解 20 min;室温下向细胞裂解液中添加 Lucigenin(终浓度为 250 μmol/L),以化学发光检测仪进行检测。酶活性检测结果以光单位表示(raw light unites, RLU)。

1.3.3 酶联免疫吸附试验检测 PGE₂ 分泌 分别于建模后 0、1、2、3、5、8 h 收集各组细胞培养上清液。按照 PGE₂ 酶联免疫试剂盒说明书进行操作,酶标仪检测在波长 412 nm 处的吸光度值。PGE₂ 的定量结果以质量浓度表示。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

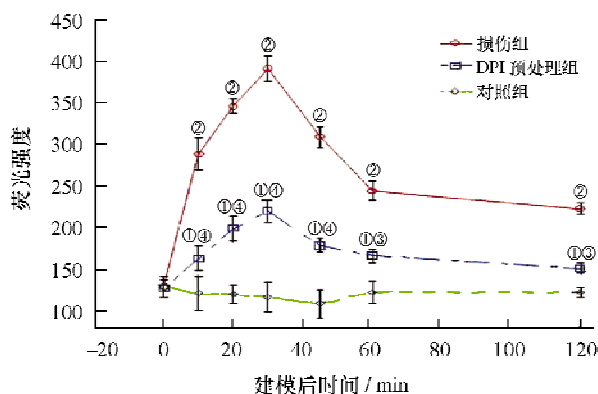
2.1 机械损伤对 HaCaT 细胞 ROS 生成的影响

在建模后不同时间,损伤组和 DPI 预处理组 HaCaT 细胞内 ROS 生成均明显高于对照组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),两组均于建模后 30 min 时点达到峰值。DPI 预处理组建模后各时点 HaCaT 细胞内

ROS 生成均显著低于损伤组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 1)。

2.2 机械损伤对 HaCaT 细胞 NOX 活性的影响

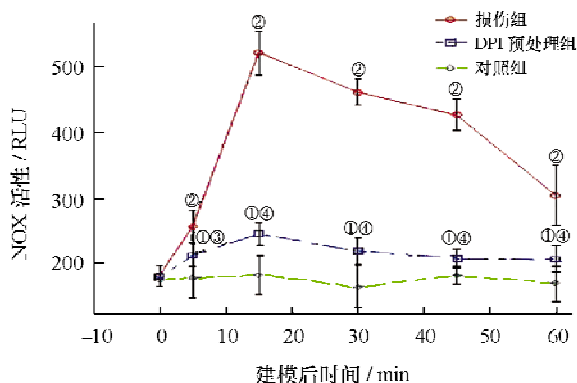
建模后 5 min 时点,损伤组和 DPI 预处理组 HaCaT 细胞 NOX 活性即已较对照组明显升高 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。在建模后不同时间,损伤组和 DPI 预处理组 HaCaT 细胞 NOX 活性均显著高于对照组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),两组均于建模后 15 min 时点达到峰值。DPI 预处理组建模后各时点 HaCaT 细胞 NOX 活性均显著低于损伤组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 2)。



① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与对照组比较; ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$ 与损伤组比较。

图 1 机械损伤对 HaCaT 细胞 ROS 生成的影响

Fig 1 Effect of mechanical damage on ROS generation in HaCaT cells



① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与对照组比较; ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$ 与损伤组比较。

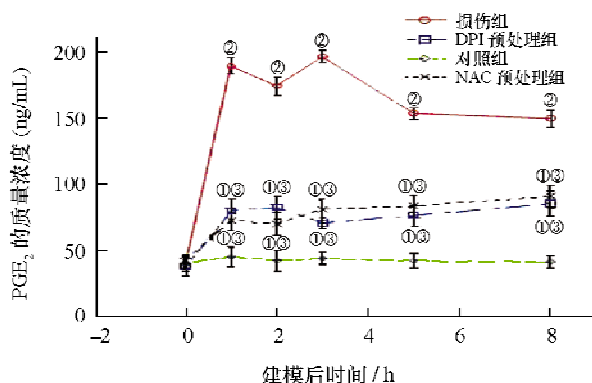
图 2 机械损伤对 HaCaT 细胞 NOX 活性的影响

Fig 2 Effect of mechanical damage on NOX activity in HaCaT cells

2.3 机械损伤对 HaCaT 细胞 PGE₂ 分泌的影响

建模后 1 h 时点,损伤组和 DPI 预处理组 HaCaT 细胞培养上清液中 PGE₂ 的质量浓度即已较对照组显著升高 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。在建模后不同时间,损伤组、DPI 预处理组和 NAC 预处理组 HaCaT 细胞培养上清液中 PGE₂ 的质量浓度均显著高于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); DPI 预处理组和 NAC 预处

理组建模后各时点 HaCaT 细胞培养上清液中 PGE₂ 的质量浓度均显著低于损伤组 ($P < 0.01$) (图 3)。



① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与对照组比较; ③ $P < 0.01$ 与损伤组比较。

图 3 机械损伤对 HaCaT 细胞 PGE₂ 分泌的影响

Fig 3 Effect of mechanical damage on PGE₂ secretion in HaCaT cells

3 讨论

机体损伤后的创面修复一般包括以下三个紧密联系的过程,即炎症反应、组织增生和组织重塑,炎症反应是关键环节之一。

Roy 等^[5]的动物实验结果显示:在局部皮肤切除伤后的炎症期, H₂O₂ 在创面局部体液内由低浓度 (100 ~ 250 μmol/L) 迅速上升到高浓度,超氧阴离子的浓度也明显升高;创面外用低浓度 H₂O₂ (50 mmol/L) 可加快创面愈合,而创面外用高浓度 H₂O₂ (1 mol/L) 则阻碍创面愈合。目前,对于 ROS 参与创伤后组织炎症反应以及调节创面修复的机制尚未阐明。本研究通过对经划痕法建立的人皮肤角质形成细胞体外机械损伤模型的研究结果显示:损伤后细胞内 ROS 生成和炎症介质 PGE₂ 的释放增加。

NOX 广泛分布于各种细胞的质膜上,是介导细胞 ROS 生成的关键酶之一,可被多种刺激因素活化。体外实验^[1,2]结果显示:热损伤和紫外线 A (ultra-violet A, UVA) 可激活人皮肤角质形成细胞的 NOX;而 Niethammer 等^[6]的体内研究发现:创伤可激活斑马鱼上皮细胞中的 DUOX (NOX 的一种亚型)。本研究首次通过体外实验发现:机械损伤可诱导人皮肤角质形成细胞 NOX 活性快速升高且维持时间较长。推测 NOX 可能是细胞损伤后 ROS 产生的快速反应机制,相对于线粒体电子传递链较缓慢产生 ROS, NOX 在机体创伤后的急性期可能具有更重要的病理生理作用。

活化的 NOX 作用于质膜结合的微小的电子传递链,通过单电子还原促使分子氧产生活性氧 ROS^[7,8]。研究^[9-13]表明,ROS 可通过氧化细胞内核因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF-κB) 等多种信号

分子,上调细胞环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, Cox-2) 的活性和表达,从而调节细胞内炎症因子 PGE₂ 的合成,介导细胞的炎症反应。本实验结果显示:机械损伤引起人皮肤角质形成细胞内 ROS 生成增多,又进一步引起 PGE₂ 分泌增加,但其具体机制还有待深入研究。鉴于机械损伤后人皮肤角质形成细胞 PGE₂ 分泌增加的速度较快且持续时间较长,细胞内 PGE₂ 产生的关键酶 COX-2 的活性及浓度均有可能升高,从而引起 PGE₂ 分泌增加。然而,对于机械损伤后 ROS 介导角质形成细胞 PGE₂ 分泌增加的具体途径,则是本课题组进一步研究的内容。

PGE₂ 是花生四烯酸的代谢产物,具有激素样介质的作用,参与调节机体内多种生物学活动(如调节血压、神经、生殖及炎症)。正常情况下,磷脂酶 A2 作用于细胞磷脂后,将其转化成前列腺素 H₂ (prostaglandin H₂, PGH₂), PGH₂ 可合成 PGE₂ 及其他的前列腺素物质^[14]。在创伤过程中, PGE₂ 作为一种炎症介质起到十分关键的调节作用。PGE₂ 可调节血管舒缩、增加通透性,改变局部组织血供;通过调节炎症细胞的趋化、分化以及炎症因子的合成,从而调节炎症反应^[13]。有研究^[15-17] 报道,大量分泌的 PGH₂ 可诱导体外培养的关节软骨细胞、滑膜成纤维细胞死亡;Sheu 等^[10] 研究发现:PGE₂ 分泌增多可激活人脐静脉内皮细胞 caspase-3 活性,从而诱导细胞凋亡。因此, PGE₂ 在创伤愈合中具有“双刃剑”的作用,适量的 PGE₂ 可调节炎症细胞及修复细胞的功能,促进创伤愈合;而过量的 PGE₂ 则可能引起组织细胞的进一步损伤,不利于创伤愈合。本研究结果显示:角质形成细胞受到机械损伤后,升高的 ROS 可促进细胞 PGE₂ 的分泌,使细胞外 PGE₂ 维持较高浓度;然而,升高的 PGE₂ 对于角质形成细胞及周围的成纤维细胞和血管内皮细胞的调节作用及其参与创伤愈合的具体机制目前尚不清楚。

综上所述,机械损伤可引起人皮肤角质形成细胞的 PGE₂ 分泌量增加,可能与细胞内 ROS 生成和 NOX 活性升高所介导的氧化应激有关。本实验为全面认识 ROS 在创伤愈合中的作用,进一步探索促进创伤愈合药物作用靶点的研究,开辟了新思路。

[参考文献]

- [1] Shin MH, Moon YJ, Seo JE, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44 (4): 635 - 645.
- [2] Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128 (1): 214 - 222.
- [3] 张杰敏, 廖伟宏. 大鼠脊髓星形胶质细胞体外划痕损伤模型的建立 [J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21 (2): 133 - 134.
- [4] Gui XL, Brockman D, Campos B, et al. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia [J]. *Placenta*, 2006, 27 (4-5): 422 - 431.
- [5] Roy S, Khanna S, Nallu K, et al. Dermal wound healing is subject to redox control [J]. *Mol Ther*, 2006, 13 (1): 211 - 220.
- [6] Niethammer P, Grabher C, Look AT, et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish [J]. *Nature*, 2009, 459 (7249): 996 - 999.
- [7] Armitage ME, Wingler K, Schmidt HH, et al. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS [J]. *J Mol Med*, 2009, 87 (11): 1071 - 1076.
- [8] Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63 (1): 218 - 242.
- [9] Eligini S, Barbieri SS, Cavalea V, et al. Diversity and similarity in signaling events leading to rapid Cox-2 induction by tumor necrosis factor-alpha and phorbol ester in human endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65 (3): 683 - 693.
- [10] Sheu ML, Ho FM, Yang RS, et al. High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (3): 539 - 545.
- [11] Chang MC, Lin LD, Chan CP, et al. The effect of BisGMA on cyclooxygenase-2 expression, PGE₂ production and cytotoxicity via reactive oxygen species- and MEK/ERK-dependent and-independent pathways [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (25): 4070 - 4077.
- [12] Chin WT, Shen SC, Chow JM, et al. Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE₂ activation [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37 (1): 118 - 129.
- [13] Barbieri SS, Eligini S, Brambilla M, et al. Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 60 (1): 187 - 197.
- [14] Kuehl FA Jr, Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation [J]. *Science*, 1980, 210 (4473): 978 - 984.
- [15] Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, et al. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E₂ via the induction of cyclooxygenase-2 [J]. *J Immunol*, 2000, 165 (6): 3402 - 3410.
- [16] Kim SJ, Chun JS. Protein kinase C alpha and zeta regulate nitric oxide-induced NF-kappa B activation that mediates cyclooxygenase-2 expression and apoptosis but not dedifferentiation in articular chondrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303 (1): 206 - 211.
- [17] Jovanovic DV, Mineau F, Notoya K, et al. Nitric oxide induced cell death in human osteoarthritic synoviocytes is mediated by tyrosine kinase activation and hydrogen peroxide and/or superoxide formation [J]. *J Rheumatol*, 2002, 29 (10): 2165 - 2175.

[收稿日期] 2011-03-17

[本文编辑] 王淑平