

论著·基础研究

640 nm 红光通过 CD26 促进角质形成细胞迁移的实验研究

张 闻, 傅秀军, 姚 敏

上海交通大学医学院附属第九人民医院整复外科, 上海 200011

[摘要] **目的**·初步探究 640 nm 红光促进角质形成细胞迁移的机制。**方法**·体外培养人角质形成细胞, 根据干预方式不同分为 4 组: 对照组、sitagliptin 组 (抑制 CD26 表达)、640 nm 红光组 (8 J/cm^2)、640 nm 红光 + sitagliptin 组。Realtime-PCR 检测角质形成细胞中 CD26 mRNA 的表达水平, Western blotting 检测 CD26 蛋白表达情况, Transwell 和细胞划痕实验观察角质形成细胞的迁移能力。**结果**·Realtime-PCR 和 Western blotting 结果显示, 640 nm 红光组与对照组相比 CD26 mRNA 和蛋白表达有所升高, 而 sitagliptin 组明显低于对照组 (均 $P < 0.05$); Transwell 和细胞划痕实验均可观察到 640 nm 红光组角质形成细胞迁移能力增强, 而 sitagliptin 组迁移能力下降。**结论**·640 nm 红光照射可促使 CD26 表达增加, 加快角质形成细胞迁移, 从而缩短再上皮化进程。

[关键词] 640 nm 红光; CD26; 角质形成细胞; 创面修复; 再上皮化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.08.006 **[中图分类号]** R62 **[文献标志码]** A

Promotion of 640 nm red light on keratinocyte migration via CD26

ZHANG Wen, FU Xiu-jun, YAO Min

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the mechanism of 640 nm red light promoting keratinocyte migration preliminarily. **Methods**·Human keratinocytes were cultured *in vitro* and assigned to 4 groups according to different interventions, i.e. control group, sitagliptin group (CD26 expression inhibited), 640 nm red light group (8 J/cm^2) and 640 nm red light + sitagliptin group. The levels of CD26 mRNA and protein in keratinocytes were measured with realtime-PCR and Western blotting, respectively. Cell migration was observed with Transwell assay and scratch assay. **Results**·The level of CD26 mRNA and the expression of CD26 protein in 640 nm red light group obviously increased compared with control group, while those of sitagliptin group significantly decreased (all $P < 0.05$). Migration ability of keratinocytes increased in 640 nm red light group and decreased in sitagliptin group observed by Transwell assay and scratch assay. **Conclusion**·The expression of CD26 in keratinocytes is promoted by the 640 nm red light, which can accelerate keratinocyte migration to facilitate re-epithelialization.

[Key words] 640 nm red light; CD26; keratinocyte; wound healing; re-epithelialization

创面修复是一个复杂而有序的过程, 主要包括炎症期、增殖期、重塑期 3 个阶段, 任何环节出现异常, 均可影响最终的创伤愈合结局^[1-2]。再上皮化 (re-epithelialization) 在皮肤创面修复中发挥重要作用, 其最重要的过程是角质形成细胞向创面中心部位迁移, 随后才开始增殖并覆盖创面^[3]。由此可见, 角质形成细胞的迁移在再上皮化过程中起关键作用, 再上皮化功能缺陷往往与慢性难愈创面相关^[4]。近年来, 低能量激光/光疗法 (low level laser/light therapy, LLLT) 已广泛应用于临床治疗烧伤、创伤、糖尿病皮肤损伤等难愈性创面, 其中临床最常用应用的波段为 640 nm 红光, 普遍认为其对创面愈合有促进作用^[5], 可有效减轻疼痛及炎症反应。但是 640 nm 红光促进创面愈合的具体机制尚未明确, 对于创面再上皮化

过程中 640 nm 红光的作用认识不足, 因此研究 640 nm 红光对角质形成细胞迁移的影响具有一定价值。

在创面愈合中, 越来越多的证据强调 CD26 在皮肤修复关键过程中所起到的重要作用^[6]。CD26, 又称为二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP IV), 是一种广泛存在的 II 型跨膜糖蛋白及分泌型蛋白, 表达于上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞等多种细胞, 具有丝氨酸蛋白酶活性^[7]。有研究^[8]表明, CD26 还具有非酶功能, 可与细胞外基质相互作用, 调节多种细胞的迁移、黏附等功能。由此我们假设 CD26 可直接或间接参与 640 nm 红光促进角质形成细胞迁移的过程。本实验旨在通过验证 CD26 是否参与 640 nm 红光促进角质形成细胞迁移, 从而探讨 640 nm 红光促进角质形成细胞迁移的可能机制。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81272113) (National Natural Science Foundation of China, 81272113)。

[作者简介] 张 闻 (1992—), 女, 硕士生; 电子信箱: zw_hayida@163.com。

[通信作者] 姚 敏, 电子信箱: my058@vip.sina.com。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, 人永生角质形成细胞 HaCaT 由上海市创伤研究所保存; DPP IV 抑制剂 sitagliptin 购自美国 Selleck 公司, 蛋白酶抑制剂购自德国 Roche 公司; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, RNA 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (realtime-PCR) 反应试剂盒购自美国 Qiagen 公司; BCA 试剂盒购自上海碧云天公司, CD26、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体购自英国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗购自中国 Arigo 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 划痕实验插件购自德国 Ibidi 公司。

1.2 光源

640 nm 光源来自 Carnation 系列红光治疗仪, 由深圳普门科技有限公司提供。低能量激光 (low level laser, LLL) 处理照射细胞功率为 10 mW、8 J/cm²。

1.3 实验分组

将人角质形成细胞分为 4 组进行实验: ① 对照组 (NC 组), 在正常条件下培养角质形成细胞。② sitagliptin 组 (Sa 组), 用 2 mmol/L 的 sitagliptin 预处理角质形成细胞 20 min 后正常培养。③ 640 nm 红光组 (640 nm 组), 给予角质形成细胞 640 nm 红光照射处理, 照射能量为 10 mW、8 J/cm²。④ 640 nm 红光 + sitagliptin 组 (640 nm + Sa 组), 先用 2 mmol/L 的 sitagliptin 预处理角质形成细胞 20 min, 再行 640 nm 红光照射处理。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 HaCaT 细胞株使用含 10% 新鲜胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内培养, 待细胞生长至约 80% 融合时, 用 PBS 冲洗细胞 1 ~ 2 次, 用胰酶消化贴壁细胞, 按 1:3 传代培养。倒置显微镜下观察细胞生长情况, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.4.2 Realtime-PCR 按说明书用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。引物序列: 人 CD26 F 链为 5'-AGTGGCACGGCAACACATT-3', R 链为 5'-AGAGCTTCTATCCCGATGACTT-3'; 人 GAPDH F 链为 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3', R 链为 5'-TGTAACCATGTAGTTGAGGTCA-3'。NanoDrop 微量分光光度计检测浓度后按试剂盒说明操作反转录合成 cDNA。建立 20 μL PCR 反应体系, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s,

60 °C 退火 60 s, 共 35 个循环实施扩增和实时分析, 最后 4 °C 冷却。以 GAPDH 为内参, 计算目的基因的相对表达量。所有样本均做 3 个复孔。

1.4.3 Western blotting 分别给予 HaCaT 细胞不同处理后, 使用 RIPA (25 mmol/L pH7.4 Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1% NP-40、1% 脱氧胆酸钠、0.1% 十二烷基硫酸钠) 缓冲液裂解细胞, 提取细胞总蛋白后, 用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。每孔 30 μg 蛋白样品进行 SDS 凝胶电泳。使用 PVDF 膜, 100 V 转膜 90 min, 然后 5% 牛奶室温封闭 1 h, 一抗孵育 4 °C 过夜 (CD26, 1:2 000; GAPDH, 1:2 000), HRP 标记山羊抗小鼠二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h。采用化学发光检测并拍照, 以 GAPDH 为内参蛋白, 应用 Image J 软件分析条带光密度。

1.4.4 Transwell 迁移实验 分别收集 4 组 HaCaT 细胞消化离心, 无血清 DMEM 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 上室接种细胞悬液 200 μL, 下室为含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μL, 恒温培养箱静置 24 ~ 48 h。小室使用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min 后擦去上室细胞, 倒置显微镜随机选取 3 个视野拍照, 细胞计数。

1.4.5 划痕实验 分别收集 4 组 HaCaT 细胞消化离心, 用无血清 DMEM 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 6×10^5 个/mL。将无菌插件放置于皿底, 向插件两侧孔内分别注入 70 μL 细胞悬液, 待细胞贴壁后, 用镊子取走插件, 6 孔板中每孔加入 2 mL 无血清培养基, 分别于 0 h、24 h 镜下拍照记录。

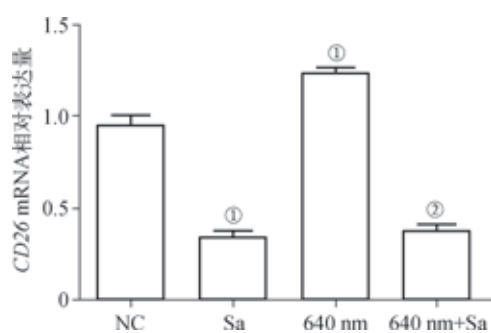
1.5 统计学方法

所有统计分析均采用 SPSS 13.0 软件 (IBM, 美国), 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每组结果由至少 3 个独立的实验结果统计。使用 ImageJ 和 GraphPad Prism 软件进行绘图计算。

2 结果

2.1 640 nm 红光对角质形成细胞 CD26 mRNA 表达的影响

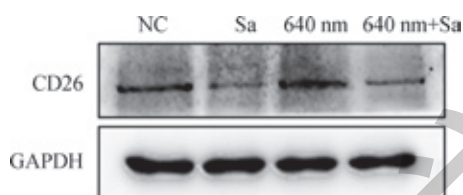
采用 640 nm 红光照射角质形成细胞, 24 h 后 realtime-PCR 检测各组细胞 CD26 mRNA 表达情况。结果显示: 640 nm 组细胞 CD26 mRNA 表达水平高于 NC 组 (1.24 ± 0.01 vs 0.95 ± 0.03 , $P = 0.000$); Sa 组明显低于 NC 组 (0.34 ± 0.03 vs 0.95 ± 0.03 , $P = 0.000$); 640 nm + Sa 组较 640 nm 组 CD26 mRNA 表达水平降低 (0.37 ± 0.02 vs 1.24 ± 0.01 , $P = 0.000$), 但与 Sa 组相比差异无统计学意义 ($P = 0.463$) (图 1)。



注: ^① $P=0.000$, 与 NC 组比较; ^② $P=0.000$, 与 640 nm 组比较

图 1 640 nm 红光对角质形成细胞 CD26 mRNA 表达的影响

Fig 1 Effect of 640 nm red light on CD26 mRNA expression in keratinocytes



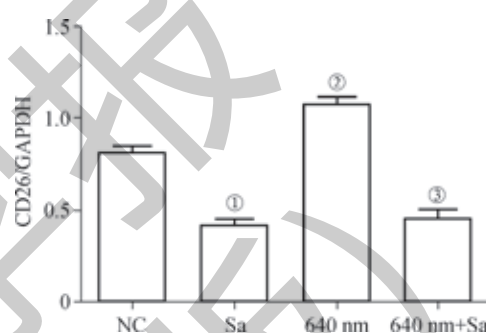
注: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.002$, 与 NC 组比较; ^③ $P=0.000$, 与 640 nm 组比较

图 2 640 nm 红光对角质形成细胞 CD26 蛋白表达的影响

Fig 2 Effect of 640 nm red light on CD26 protein expression in keratinocytes

2.2 640 nm 红光对角质形成细胞 CD26 蛋白表达的影响

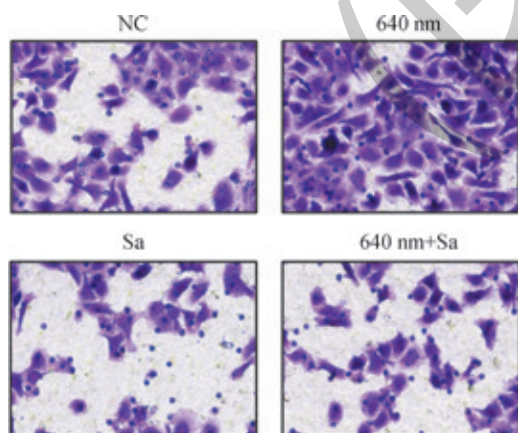
应用 640 nm 红光照射角质形成细胞, 24 h 后 Western blotting 检测细胞内 CD26 蛋白表达情况。结果显示: 640 nm 组细胞内 CD26 蛋白表达水平高于 NC 组 (1.15 ± 0.03 vs 0.80 ± 0.02 , $P=0.002$); Sa 组明显低于 NC 组 (0.41 ± 0.02 vs 0.80 ± 0.02 , $P=0.000$), 提示 CD26 抑制剂可有效抑制 CD26 蛋白表达; 640 nm+Sa 组较 640 nm 组 CD26 蛋白表达水平降低 (0.44 ± 0.04 vs 1.15 ± 0.03 , $P=0.000$), 但与 Sa 组相比差异无统计学意义 ($P=0.478$) (图 2)。



2.3 640 nm 红光对角质形成细胞迁移能力的影响

Transwell 细胞迁移实验被用来观察角质形成细胞的迁移能力。结果显示: 640 nm 组细胞迁移数目较 NC 组明显增多 (120.70 ± 5.21 vs 73.33 ± 2.40 , $P=0.001$), 提示 640 nm 红光处理后, 角质形成细胞的迁移能力增强; Sa

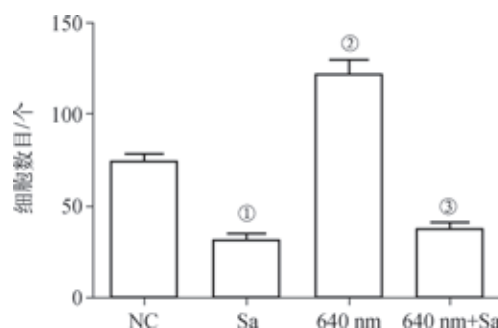
组细胞迁移数目与 NC 组比较有所下降 (31.00 ± 2.08 vs 73.33 ± 2.40 , $P=0.000$), 提示抑制 CD26 蛋白表达影响角质形成细胞的迁移能力; 640 nm+Sa 组较 640 nm 组细胞迁移数目减少 (38.33 ± 0.88 vs 120.70 ± 5.21 , $P=0.000$), 但与 Sa 组相比差异无统计学意义 (图 3)。



注: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.001$, 与 NC 组比较; ^③ $P=0.000$, 与 640 nm 组比较

图 3 Transwell 实验检测 640 nm 红光对角质形成细胞迁移能力的影响 ($\times 40$)

Fig 3 Effect of 640 nm red light on keratinocyte migration by Transwell assay ($\times 40$)



细胞划痕实验同样用来评价细胞迁移能力。结果如图4所示,4组细胞分别被干预24 h后,640 nm组细胞覆盖面积最大,表示640 nm红光可有效促进角质形成细胞

移行,加速再上皮化进程,从而促进创面愈合;Sa组与640 nm+Sa组细胞覆盖面积最小,由此可知CD26缺失或表达降低可抑制角质形成细胞的迁移能力。

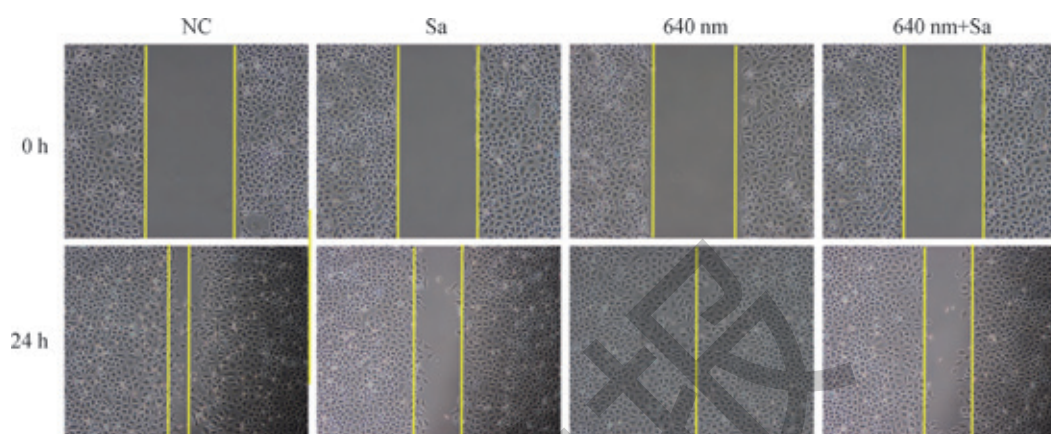


图4 划痕实验检测640nm红光对角质形成细胞迁移能力的影响($\times 20$)

Fig 4 Effect of 640 nm red light on keratinocyte migration by scratch assay ($\times 20$)

3 讨论

再上皮化在表皮屏障的完整性中起到了至关重要的作用,也是创面愈合过程中不可或缺的条件^[9]。再上皮化过程包括创缘角质形成细胞的迁移及增殖、分化,继而覆盖整个创面^[10]。在创面愈合中,多种细胞因子、趋化因子和各种信号通路等都参与再上皮化过程^[11-12]。研究^[13-14]表明CD26可以通过参与细胞外基质的降解,调节细胞因子、趋化因子,从而促进皮肤创面愈合。人类CD26基因定位于染色体2q24,编码一条包含766个氨基酸、相对分子质量约为110 000的多肽链,是一种广泛分布的II型跨膜糖蛋白^[15-16],大部分以跨膜结合蛋白的形式存在于多种组织中。CD26具有非酶功能,可与细胞外基质相互作用,参与细胞的迁移、侵袭等过程^[17]。与此同时,CD26还是一种细胞膜受体和共刺激分子,参与机体的免疫调节、肿瘤侵袭、炎症反应等多种病理生理过程^[18]。有研究^[19]表明CD26的活化可以增加基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)的表达,肿瘤细胞中MMP的增加与肿瘤细胞的侵袭能力呈正相关。

近年来,LLLTT由于非侵入性、成本低、无不良反应等优点,在临床治疗慢性创面方面得到广泛认可^[20-21]。LLLTT使用低功率的激光器或发光二极管产生的激光或窄谱光作用于机体,不对组织细胞产生损伤或热作用,而是通过光生物学调节(photobiomodulation, PBM)作用影响细胞功能,可有效改善创面微循环,调控炎症反应,促进肉

芽组织新生等^[22]。Kaviani等^[23]对23例糖尿病足患者进行了随机对照临床试验,光照组患者接受了685 nm、10 J/cm²激光照射,每周照射6次,而对照组采用临床应用的磺胺嘧啶银进行治疗,20周后发现光照治疗组治愈率显著高于对照组。由此表明,红光照射可加快糖尿病足这种临床难愈创面的修复。本课题组前期已发现应用640 nm红光照射长期使用糖皮质激素患者的创面,可显著加快创面表皮细胞爬行、减轻炎症反应、促进创面愈合^[24]。虽然红光用于治疗难愈性创面具有广阔的临床应用前景,但是其具体机制仍不明确,有待进一步研究。

目前认为640 nm红光主要通过细胞色素C氧化酶—ATP途径、细胞色素C氧化酶—NO途径发挥作用,细胞膜、线粒体膜上的感光受体将所吸收的光能转化为代谢能,使细胞有氧呼吸功能增强、细胞糖原含量增加、促进ATP分解,对局部创伤环境产生积极的调节作用^[25]。与此同时,也有个别报道640 nm红光通过激活不依赖于细胞增殖机制的口腔角质形成细胞迁移和触发mTOR信号通路加速口腔黏膜的愈合^[26]。本实验研究发现,640 nm红光照射人角质形成细胞后细胞CD26 mRNA以及蛋白表达量明显增加,细胞迁移能力显著加强;而当应用CD26的抑制剂sitagliptin后,角质形成细胞CD26 mRNA及蛋白的表达下降,从而导致角质形成细胞迁移能力有所下降。由此我们可以推断,640 nm红光可能通过激活CD26加快创面愈合过程,CD26表达升高可增强角质形成细胞迁移能力,加快再上皮化进程。然而,本研究目前只局限于体外细胞

实验, 640 nm 红光对再上皮化的作用尚未明确。接下来, 我们将结合临床难愈性创面, 开展相关临床试验研究, 进一步证实红光治疗的临床应用价值, 继续探索 640 nm 红

光促进角质形成细胞迁移的具体机制, 明确 CD26 在角质形成细胞迁移中的作用及其信号通路。这将为 640 nm 红光用于临床治疗难愈性创面的研究提供新的思路。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Farahani RM, DiPietro LA. Microgravity and the implications for wound healing[J]. *Int Wound J*, 2008, 5(4): 552-561.
- [2] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(265): 265sr6.
- [3] Sivamani RK, Garcia MS, Isseroff RR. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 2849-2868.
- [4] Li W, Henry G, Fan J, et al. Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(4): 622-633.
- [5] Agrawal T, Gupta GK, Rai V, et al. Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: light before the storm[J]. *Dose Response*, 2014, 12(4): 619-649.
- [6] Aliyari Serej Z, Ebrahimi Kalan A, Mehdipour A, et al. Regulation and roles of CD26/DPPIV in hematopoiesis and diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 88-94.
- [7] Bauvois B. Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 317-329.
- [8] Baticic Pucar L, Pernjak Pugel E, Detel D, et al. Involvement of DPP IV /CD26 in cutaneous wound healing process in mice[J]. *Wound Repair Regen*, 2017, 25(1): 25-40.
- [9] Kim DJ, Mustoe T, Clark RA. Cutaneous wound healing in aging small mammals: a systematic review[J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(3): 318-339.
- [10] Castilho RM, Squarize CH, Gutkind JS. Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing[J]. *Oral Dis*, 2013, 19(6): 551-558.
- [11] Li W, Nadelman C, Henry G, et al. The p38-MAPK/SAPK pathway is required for human keratinocyte migration on dermal collagen[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(6): 1601-1611.
- [12] Nikolopoulos SN, Blaikie P, Yoshioka T, et al. Targeted deletion of the integrin $\beta 4$ signaling domain suppresses laminin-5-dependent nuclear entry of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B, causing defects in epidermal growth and migration[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(14): 6090-6102.
- [13] Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, et al. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells[J]. *J Exp Med*, 1999, 190(3): 311-322.
- [14] Beckenkamp A, Willig JB, Santana DB, et al. Differential expression and enzymatic activity of DPP IV /CD26 affects migration ability of cervical carcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134305.
- [15] Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, et al. The dipeptidyl peptidase family, prolyl oligopeptidase, and prolyl carboxypeptidase in the immune system and inflammatory disease, including atherosclerosis[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 387.
- [16] Yazbeck R, Jaenisch SE, Abbott CA. Potential disease biomarkers: dipeptidyl peptidase 4 and fibroblast activation protein[J]. *Protoplasma*, 2018, 255(1): 375-386.
- [17] Boonacker EP, Wierenga EA, Smits HH, et al. CD26/DPP IV signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry[J]. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50(9): 1169-1177.
- [18] Schürmann C, Linke A, Engelmann-Pilger K, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates inflammation and accelerates epithelialization in wounds of diabetic ob/ob mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 342(1): 71-80.
- [19] Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, Weber MR, et al. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells[J]. *Biochem J*, 2001, 355(Pt 2): 397-407.
- [20] Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review[J]. *Regen Med*, 2016, 11(1): 107-122.
- [21] Kaviani A, Djavid GE, Ataie-Fashtami L, et al. A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report[J]. *Photomed Laser Surg*, 2011, 29(2): 109-114.
- [22] Farivar S, Malekshahi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy[J]. *J Lasers Med Sci*, 2014, 5(2): 58-62.
- [23] Zimmet SE. Venous leg ulcers: modern evaluation and management[J]. *Dermatol Surg*, 1999, 25(3): 236-241.
- [24] Xiao N, Li H, Yu W, et al. SUMO-specific protease 2 (SEN2) suppresses keratinocyte migration by targeting NDR1 for de-SUMOylation[J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 163-174.
- [25] de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy[J]. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*, 2016, 22(3). DOI: 10.1109/ISTQE.2016.2561201.
- [26] Pelliccioli AC, Martins MD, Dillenburg CS, et al. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway[J]. *J Biomed Opt*, 2014, 19(2): 028002.

[收稿日期] 2019-02-12

[本文编辑] 邵碧云