

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.17.001

核激素受体在皮肤主要构成细胞中的表达*

何仁颖^{1,2}, 何 威², 张 斌^{2,3△}

1. 重庆市人民医院皮肤科, 重庆 400014; 2. 陆军军医大学新桥医院皮肤科, 重庆 400037;
3. 重庆市中医院/重庆市第一人民医院皮肤科, 重庆 400011

摘要:目的 探讨核激素受体在皮肤主要构成细胞中的表达情况。方法 应用 PCR array 法检测人皮肤主要构成细胞——角质形成细胞(KC)和真皮成纤维细胞(FB)中核激素受体的 mRNA 表达水平。结果 核激素受体在 KC 和 FB 中有大量的表达。在人 KC 中, 大多数核激素受体的表达水平比 FB 中高, 其中, 表达较高的受体主要集中在 RXR 二聚体家族, 如 VDR、RXRs、PPARs、LXR_β 和 TRs 等。结论 皮肤 KC 和 FB 中有大量核激素受体的表达, 在调节细胞的代谢、增殖、分化和凋亡方面, 以及皮肤发育过程中均发挥着重要的作用。

关键词:核激素受体; 角质形成细胞; 成纤维细胞

中图分类号: R739.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)17-2433-04

The expression of nuclear hormone receptors in the skin*

HE Renying^{1,2}, HE Wei², ZHANG Bin^{2,3△}

1. Department of Dermatology, Chongqing General Hospital, Chongqing 400014, China;
2. Department of Dermatology, Xinqiao Hospital of Army Medical University,
Chongqing 400037, China; 3. Department of Dermatology, Chongqing Traditional
Chinese Medicine Hospital/Chongqing First People's Hospital, Chongqing 400011, China

Abstract: Objective To investigate the expression of members of the nuclear hormone receptor family in the skin. **Methods** PCR array was used to detect mRNA expression levels in human skin keratinocytes and fibroblasts. **Results** Nuclear hormone receptors were abundantly expressed in keratinocytes and fibroblasts. Most nuclear hormone receptors had higher levels of expression in human keratinocytes than in fibroblasts. The higher expression receptors were mainly concentrated in the RXR dimer family, such as VDR, RXRs, PPARs, LXR_β and TRs. **Conclusion** There are a large number of nuclear hormone receptors in skin keratinocytes and fibroblasts, which may be involved in the regulation of cell metabolism, proliferation, differentiation and apoptosis, and play an important role in skin development.

Key words: nuclear hormone receptor; keratinocyte; fibroblast

皮肤是人体最大的器官, 是人体最外层的屏障, 皮肤屏障功能完好对维持机体的健康具有十分重要的作用。既往研究发现, 核激素受体可调节细胞的增殖、分化和凋亡, 在皮肤的发育过程中发挥着重要的作用^[1]。目前在皮肤科临床治疗中运用最多、研究最深入的核激素受体是糖皮质激素受体、维甲酸受体和维生素 D 受体及其相关配体。随着新的核激素受体不断涌现, 核激素受体家族成员与皮肤之间的相互作用值得进一步探讨。因此, 本研究采用 PCR array 方法检测皮肤中主要构成细胞——表皮角质形成细胞(KC)和真皮成纤维细胞(FB)内核激素受体家族成员的 mRNA 表达水平, 旨在了解皮肤主要构成细胞中

核激素受体的表达情况, 更好地选择特异性作用靶点, 对皮肤疾病的治疗有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 人皮肤 KC 和人真皮 FB 均购自美国组织培养库(ATCC)。

1.2 仪器与试剂 高级光学显微镜(日本 Olympus 公司), PCR 反应扩增仪(美国 Bio-Rad 公司), 荧光定量 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司), 微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)。细胞培养: KC 培养基, FB 培养基, 胰蛋白酶终止缓冲液(ATCC), DPBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司), 青霉素-链霉素溶液(美国 Cellgro 公司), 胰蛋白酶(美国 Roche 公司)。

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81502369)。

作者简介: 何仁颖, 女, 主治医师, 主要从事皮肤肿瘤研究工作。

△ 通信作者, E-mail: 562868146@qq.com。

PCR array; RNeasy Mini 试剂盒、RT² First Strand 试剂盒、RT² SYBR Green PCR Mastermix、RT² Profiler PCR array plate(美国 Qiagen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 在 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中,用各自专用培养基对细胞进行培养。

1.3.2 细胞 RNA 的提取 分别提取培养好的 KC、FB 的 RNA。分别检测两种 RNA 标本的纯度和浓度,每种细胞 3 个复孔。RNA 提取过程中所使用的容器和移液吸头均为 RNase-free 配置并严格按照 RNeasy Mini Kit 说明书要求进行操作。

1.3.3 PCR array 检测 按 RT² Profiler PCR array plate 试剂盒的操作说明,配置对应的反应体系。扩增条件为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,共 45 个循环。

1.4 统计学处理 采用 2^{-ΔΔC_t} 法对实验所得的计量资料进行分析。采用 Microsoft Excel 软件对不同组别的数据进行归类整理后进行统计学分析。

2 结果

在 KC 和 FB 中,核激素受体有大量的表达,见表 1。大部分核激素受体在人 KC 中的表达水平比在 FB 中高。除经典的糖皮质激素受体(GR)以外,表达较高的核激素受体主要集中在 RXR 二聚体家族,如 VDR、RXRs、PPARs、LXR_β 和 TRs 等(图 1、2),且部分受体如 VDR、RXRs、PPARs 的表达明显高于 GR 的表达。此外,还有一些孤儿受体如 NR₂F₂、NR₁D₂、NR₂C₁、NR₂C₂ 等的表达也很高。

表 1 核激素受体在 KC 和 FB 中的表达(±s)

核激素受体	KC	FB
VDR	0.919 9±0.040 2	0.253 1±0.005 6
NR ₂ F ₂	0.891 6±0.025 5	2.099 8±0.104 8
PPAR _β	0.566 1±0.078 1	0.161 3±0.010 1
RXR _α	0.531 4±0.023 5	0.689 5±0.011 2
RXR _β	0.519 6±0.023 3	0.241 1±0.024 1
NR ₃ C ₁ (GR _α)	0.484 5±0.014 9	0.187 9±0.005 3
NR ₁ H ₂ (LXR _β)	0.284 1±0.008 1	0.138 7±0.011 7
NR ₁ D ₂	0.156 5±0.008 5	0.140 2±0.008 1
AHR	0.155 8±0.007 5	0.298 7±0.017 6
NR ₂ C ₁	0.146 2±0.006 3	0.087 3±0.007 8
RAR _γ	0.145 6±0.006 8	0.067 9±0.010 5
NR ₂ C ₂	0.145 1±0.000 3	0.108 1±0.008 0
NR ₂ F ₆	0.140 2±0.005 1	0.052 2±0.004 3
PPAR _α	0.053 5±0.001 2	0.074 3±0.007 6
RAR _α	0.040 6±0.001 1	0.038 8±0.004 3

续表 1 核激素受体在 KC 和 FB 中的表达(±s)

核激素受体	KC	FB
THR _α	0.032 6±0.000 1	0.049 8±0.004 1
ROR _α	0.022 7±0.001 1	0.025 1±0.001 6
THR _β	0.017 6±0.001 1	0.048 5±0.003 3

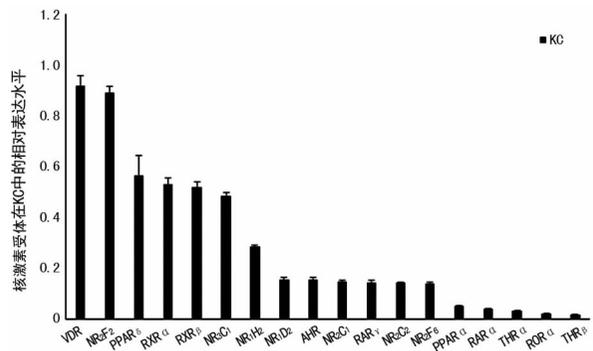


图 1 核激素受体在 KC 内的表达

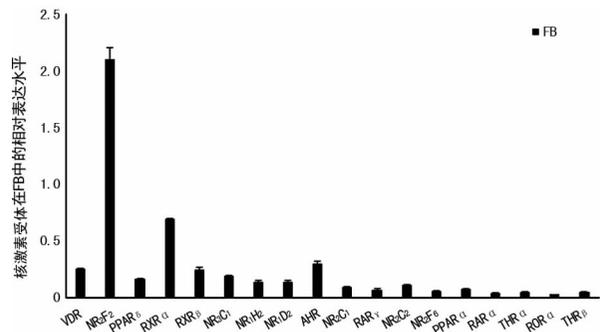


图 2 核激素受体在 FB 内的表达

3 讨论

在调节皮肤细胞功能和动态平衡的过程中,核激素受体发挥着十分重要的作用,其中糖皮质激素与细胞中的 GR 结合以后,在炎症性皮肤病中发挥着抗炎、免疫抑制、抗细胞增殖等生物学作用。但由于 GR 靶向治疗的配体特异性较弱,长期系统使用会导致高血压、骨质疏松等不良反应;长期局部使用可导致皮肤萎缩、类固醇性痤疮、毛细血管扩张等不良反应。因此,在一定程度上限制了糖皮质激素的应用。目前,寻找不良反应更小的靶向治疗配体或其他核激素受体的靶向药物已经成为研究的热点。

本研究结果发现,在皮肤的主要构成细胞中有大量核激素受体成员的表达。其中,RARs、VDR、TRs、LXR_β 和 PPAR_β 等核激素受体表达较高,部分核激素受体的表达明显高于 GR。由此推测,这些受体及相关的配体在皮肤中可能发挥着更强大的作用。有研究发现,皮肤中的 RAR 可通过对角蛋白表达的调节影响表皮分化。因此,维甲酸类药物在银屑病、痤疮、角化性皮肤病和肿瘤的治疗中均有明确的疗效。本

研究也发现,在皮肤主要构成细胞中,存在 RXR $_{\alpha}$ 、RXR $_{\beta}$ 、RAR $_{\alpha}$ 和 RAR $_{\gamma}$ 表达,但以 RXR $_{\alpha}$ 和 RAR $_{\gamma}$ 表达为主,是皮肤中的优势表达亚型。RAR 和 RXR 各亚型之间具有各自特异性的配体,且和各配体的亲和力不同。其作用的大小取决于受体的分布量,辅助因子的性质和数量及维甲酸受体选择性激动剂和拮抗剂的相互作用^[1]。部分患者使用维甲酸类药物时,皮肤会出现红斑、脱屑、干燥、烧灼等典型的不良反应,这些皮肤刺激反应与维甲酸受体 RAR $_{\alpha}$ 、RAR $_{\beta}$ 、RAR $_{\gamma}$ 的高表达和被激活密切相关^[2]。为了给患者提供接受度高,不良反应更小,安全性更高的维甲酸类药物,深入地了解维甲酸受体的表达和分布将成为关键。目前研究发现,与传统的全反式维甲酸相比,一种新的维甲酸衍生物——ECPIRM 具有更强的调节细胞分化、抑制肿瘤增殖和诱导细胞凋亡的功能,但其对皮肤的刺激性却更小,患者的安全性和可接受度更高。这对于维甲酸研究领域而言,是一个全新的突破^[3]。

有研究发现,表皮是人体最大的维生素 D 的合成器官,还参与了维生素 D 的代谢过程^[4]。VDR 可以通过介导维生素 D 的活性形式 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 调节基因转录,广泛发挥其生物学效应。高表达 VDR 的细胞对 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 的抑制增殖效应有明显应答,而低表达的细胞对其抑制反应则较弱。因此,VDR 表达的高低与维生素 D 的效应密切相关。本研究表明,在正常皮肤 KC 中,VDR 的表达水平明显高于其他多数受体,也高于在 FB 中的表达。这正好可以解释在银屑病、白癜风等疾病中,广泛使用的 VDR 的配体 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 的类似物如钙泊三醇具有良好的疗效^[5]。钙泊三醇除可直接调节细胞的增殖和分化外,还可以诱导 KC 中的自噬^[6],调节局部皮肤组织中 IL-10、IL-17A、IL-17F、IL-8 和抗菌肽等炎症细胞因子的分泌,还可以调节 Th1/Th2 细胞因子间的平衡^[5]。但患者在使用钙泊三醇的过程中,容易发生皮肤红斑、烧灼感和瘙痒等局部刺激症状,影响了其临床应用。因此,进一步深入研究 VDR 和特异度更高、不良反应更小的配体对皮肤疾病的临床治疗和新药开发显得尤为重要。

表皮是脂质代谢活跃的部位,本研究发现在皮肤主要构成细胞中,核激素受体 PPAR $_{\alpha}$ 、PPAR $_{\delta}$ 两种亚型均有表达,其中 PPAR $_{\delta}$ 的表达水平最高,是优势表达亚型。既往研究发现,激活 PPARs 可诱导 KC 分化。受体激活可诱导表皮脂质合成,促进板层小体的形成和分泌,增加角质层内脂质处理必需酶的活性,诱导板层膜的形成,从而改善皮肤屏障功能^[7]。在调节皮肤脂质代谢和屏障功能方面,LXR 同样也发挥着

重要的作用。本研究结果发现,在皮肤主要构成细胞中 LXR 的两个亚型 α 和 β 均有表达,其中 LXR $_{\beta}$ 的表达水平较高,是优势表达亚型,在调节皮肤细胞功能方面作用更强。相关研究也证实,LXR $_{\beta}$ 在表皮基底层、毛囊外根鞘细胞中和皮脂腺细胞内均有较高表达^[8]。使用 LXR 激动剂 GW683965 和 TO901317 可抑制毛囊细胞、KC、皮脂腺细胞的增殖。不仅如此,活化的 LXR 可以通过调节细胞因子活性来调控 KC 的分化,通过调节 KC 中脂质合成相关酶的表达来改善皮肤屏障功能和改善皮肤不适症状^[9]。在皮肤老化模型中,LXR 配体可以通过调节体内脂质平衡来逆转老化的形成^[10]。除此之外,有学者在特应性皮炎、银屑病患者中使用 LXR 的激动剂后,角质层水化作用明显增强,表皮增生情况明显好转,皮肤屏障功能明显改善,还可以通过减少细胞因子、促炎物质的产生来减少炎症的发生,有助于患者皮损的控制^[11-12]。不仅如此,LXR 在白癜风的发生和复色过程中也起着关键性的作用,LXR 可以通过下调黑色素细胞的黏附作用参与白癜风的复色过程。因此,被认为是治疗的潜在靶点^[13]。在 B16F10 鼠黑色素瘤细胞系中,LXR $_{\beta}$ 可抑制黑色素瘤细胞的增殖,使用激动剂 TO901317 处理该细胞会诱导凋亡通路相关蛋白 caspase-3 的活化,进而诱导黑色素瘤细胞凋亡^[14]。用 LXR 激动剂(TO901317)处理人 B16 和 A-357 黑色素瘤细胞系时发现,LXR $_{\beta}$ 可调控 APOE 的表达,从而影响肿瘤生长、血管生成和转移过程等多个环节。在敲除 APOE 的情况下,LXR $_{\beta}$ 激动剂 GW3965 介导的肿瘤侵袭作用将被阻断^[15]。因此,在黑色素瘤病情进展过程中,LXR 配体可以在转录水平上抑制恶性黑色素瘤的进程,发挥着重要的调控作用,LXR 激动剂有望成为治疗黑色素瘤新的靶向治疗的药物。

众所周知,甲状腺激素 T3 可以通过调节靶基因的表达来调控机体的生长、发育、细胞分化、凋亡的进程。而这些作用是由甲状腺激素受体(TR)介导的^[16]。本研究结果发现,在皮肤主要构成细胞中,TR 的两个亚型均存在,且表达水平相对较高。相对于其他受体而言,TR $_{\alpha}$ 和 TR $_{\beta}$ 在 FB 中的表达水平高于在 KC 中的表达。这提示真皮可能是甲状腺素的主要作用部位。有研究发现,临床上有许多患者因长期使用糖皮质激素后,局部皮肤明显萎缩,其中以前胶原含量减低为主,但局部外用甲状腺激素类似物 3,3,5-三碘甲状腺乙酸(TRIAC)可使组织中的前胶原含量明显升高,从而减少了皮肤萎缩的发生^[17]。另有研究显示,随着年龄的增长,真皮中的胶原含量减少,这与 FB 数量的减少和真皮 FB 中 TR $_{\alpha}$ 和 TR $_{\beta}$ 的表达降低密切相关^[18]。随着研究的进展,人们发现甲状腺功能

失调不仅影响真皮 FB 合成胶原,还影响着表皮 KC 的增殖^[19]。这与 TR 在细胞内的作用与 T3 的浓度、作用方式和 TR 的类型、结合状态相关。此外,在创伤修复方面,外用甲状腺激素可促进损伤修复,促进伤口愈合^[20]。

综上所述,除上述已确定配体的受体外,在表皮 KC 和真皮 FB 中还有大量孤儿受体,比如 NR₂F₂、NR₂C₁、NR₂C₂、NR₁D₂ 等的表达,尤其是 NR₂F₂,该受体在两种主要构成细胞中的表达均较高,提示该受体可能在皮肤的发生、发育过程中发挥重要作用。但由于目前技术及对这些受体认识的限制, NR₂F₂ 与皮肤的相关研究报道较少。随着越来越多针对核受体超家族成员的研究和对其功能的深入认识,以核激素受体为靶目标的药物研究将成为皮肤科治疗学的又一研究热点。

参考文献

- [1] GERICKE J, ITTEN SOHN J, MIHÁLY J, et al. Regulation of retinoid-mediated signaling involved in skin homeostasis by RAR and RXR agonists/antagonists in mouse skin[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 626-643.
- [2] BUNACIU R P, YEN A. Retinoid chemoprevention: who can benefit[J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2015, 1(6): 391-400.
- [3] ZHANG M, TAO Y, MA P, et al. Synthesis and characterization of a new retinoic acid ECPIRM as potential chemotherapeutic agent for human cutaneous squamous carcinoma[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 15(9): 1204-1212.
- [4] BIKLE D D. Protective actions of vitamin D in UVB induced skin cancer[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2012, 11(12): 1808-1816.
- [5] RAYCHAUDHURI S, MITRA A, DATTA-MITRA A. Immunomodulatory mechanisms of action of calcitriol in psoriasis[J]. *Indian J Dermatol*, 2014, 59(2): 116-122.
- [6] WANG R C, LEVINE B. Calcipotriol induces autophagy in HeLa cells and keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(4): 990-993.
- [7] FEINGOLD K R. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(12): 2531-2546.
- [8] 何仁颖, 张斌, 吴峰, 等. 肝 X 受体 β 在皮肤鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(9): 919-923.
- [9] VARANI J, DAME M K, RITTIE L, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation[J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 1861-1868.
- [10] POLTE T, TYRRELL R M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(12): 1566-1574.
- [11] YANG J, MIN S, HONG S. Therapeutic effects of fermented flax seed oil on NC/Nga mice with atopic dermatitis-like skin lesions[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 5469125.
- [12] SOODGUPTA D, KAUL D, KANWAR A J, et al. Modulation of LXR-alpha and the effector genes by Ascorbic acid and Statins in psoriatic keratinocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 397(1/2): 1-6.
- [13] KUMAR R, PARSAD D, KANWAR A J, et al. Altered levels of LXR-alpha: crucial implications in the pathogenesis of vitiligo[J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(11): 853-858.
- [14] ZHANG W, JIANG H, ZHANG J, et al. Liver X receptor activation induces apoptosis of melanoma cell through caspase pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14(1): 16-22.
- [15] PENCHEVA N, BUSS C G, POSADA J, et al. Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 986-1001.
- [16] RUIZ-LLORENTE L, CONTRERAS-JURADO C, MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ M, et al. The thyroid hormone receptors regulate the expression of microRNAs with key roles in skin homeostasis[J]. *Thyroid*, 2018, 28(7): 921-932.
- [17] ZHANG B, ZHANG A, ZHOU X, et al. Thyroid hormone analogue stimulates keratinocyte proliferation but inhibits cell differentiation in epidermis[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 25(4): 859-869.
- [18] GUNIN A G, GOLUBTSOVA N N. Thyroid hormone receptors in human skin during aging[J]. *Adv Gerontol*, 2018, 31(1): 82-87.
- [19] LAUSE M, KAMBOJ A, FAITH E F. Dermatologic manifestations of endocrine disorders[J]. *Transl Pediatr*, 2017, 6(4): 300-312.
- [20] CONSTANZA C J, GARCÍA-SERRANO L, MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ M, et al. Impaired hair growth and wound healing in mice lacking thyroid hormone receptors[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108137.

(收稿日期: 2019-01-06 修回日期: 2019-03-24)