

• 基础研究 •

血管紧张素 II 受体在人皮肤胚胎发育过程中的表达和意义

刘宏伟 程飏 付小兵 邱建勇 曹荣

【摘要】 目的 观察血管紧张素 II (Ang II) 1 型(AT₁)受体和 2 型(AT₂)受体在人胎儿皮肤中的分布和表达量的动态变化,探讨其可能的生物学意义。方法 用免疫荧光组织化学方法和实时定量 PCR 技术检测 AT₁ 和 AT₂ 受体在不同孕龄胎儿皮肤附件中的分布和表达量的变化。结果 在 11~13 周龄的胎儿皮肤,可见较强的 AT₂ 受体阳性标记信号,主要定位于胎儿表皮;几乎很难检测到 AT₁ 受体阳性标记信号。在 14~19 周龄的胎儿皮肤表皮,可检测到微弱 AT₁ 受体阳性信号。妊娠 24 周以后,AT₁ 受体的表达迅速增加,然而 AT₂ 受体的表达逐渐下降。AT₁ 和 AT₂ 受体在发育中的表皮、汗腺、真皮的微血管呈阳性标记。AT₁ 和 AT₂ 受体在成人皮肤中的表达定位与胎儿无明显差异。实时定量 PCR 法结果显示,在妊娠的 11~37 周,均可检测到 AT₁ 和 AT₂ 受体 mRNA,但主要表达的受体亚型是 AT₂ 受体 mRNA,随胚胎发育 AT₂ 受体 mRNA 维持高表达。妊娠 24 周以后随胎龄增加 AT₁ 受体 mRNA 表达增加,AT₂ 受体 mRNA 表达下降。在成人皮肤也可检测到 AT₁ 和 AT₂ 受体 mRNA,但表达水平均较胎儿时期低。结论 在皮肤胚胎发育过程中,AT₁ 和 AT₂ 的表达呈现发育调节方式,这种独特的表达方式提示 Ang II 对皮肤形态发生和损伤修复可能的影响,深层次探讨 Ang II 及其受体 AT₁ 和 AT₂ 在胚胎发育中的作用,将有助于理解成人和胎儿皮肤创伤愈合不同结局的分子机制。

【关键词】 受体,血管紧张素 II;胎儿发育;皮肤

Expression of angiotensin II type 1 and type 2 receptors during human skin development in fetus

LIU Hongwei*, CHENG Biao, FU Xiaobing, et al

* Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, 510630, China

【Abstract】 Objective To observe the distribution and expression change of angiotensin(Ang) II receptor during fetal development of human skin. Methods The spatial and temporal changes of the expression of Ang II type 1 (AT₁) and type 2 (AT₂) receptors in human developing skin at different gestational ages were investigated using immunofluorescence staining and real-time polymerase chain reaction (PCR). Results In human fetal skin, the immunofluorescence labeling of both AT₁ and AT₂ receptors was mainly distributed in epidermal cells and sweat gland. Expression of AT₂ receptors with intensely labeled immunosignal was first detected in the developing fetal epidermis from embryo gestational age (EGA) 11 weeks. However, the immunofluorescence labeling of AT₁ receptor was faint at early stage of gestation. From EGA 24 weeks, positive labeling of AT₁ receptor increased, whereas positive labeling of AT₂ receptor gradually decreased in the fetal skin. In addition, both AT₁ and AT₂ receptors were also detectable in adult skin tissues, with weak positive signals. These findings were further confirmed by real-time PCR. Conclusion AT₁ and AT₂ receptors are expressed in a developmentally regulated manner in human fetal skin, which may be related to various roles that Ang II may play during skin embryonic development. This study could assist to understand the difference in skin tissue repair between fetus and adult.

【Key words】 receptor, angiotensin II; development of fetus; skin

收稿日期:2007-03-27

作者单位:510630 广州市,暨南大学附属第一医院整形外科(刘宏伟);510010 广州市,广州军区广州总医院整形外科(程飏);100853 北京市,

解放军总医院基础所(付小兵);710038 西安市,第四军医大学全军神经科学研究所(邱建勇、曹荣)

作者简介:刘宏伟,男,1965 年 5 月生,甘肃兰州人,医学博士,副主任医师

通讯作者:付小兵, Tel:010-68480755, E-mail: fuxb@cgw. net. cn

皮肤具有内分泌作用,同时又是激素敏感器官,激素与皮肤的发育,损伤修复和衰老有密切关系^[1]。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)是全身几个重要的激素系统之一,已证明皮肤是其靶器官之一。RAS 最重要的活性产物血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)可明显加速创面愈合,同时它还作为一个致纤维化因子参与皮肤的瘢痕形成^[2]。像其他细胞因子一样,Ang Ⅱ也是通过其细胞膜上的特异性受体来发挥生物学作用的,有两个主要的 Ang Ⅱ受体已被克隆,即 Ang Ⅱ 1 型(Ang Ⅱ type 1, AT₁)受体和 2 型(Ang Ⅱ type 2, AT₂)受体。但目前关于胎儿发育过程中 Ang Ⅱ受体在皮肤中定位和表达量的变化还未见报道。本研究利用免疫荧光组织化学和实时定量 PCR 法对 Ang Ⅱ受体 AT₁ 和 AT₂ 在不同发育阶段皮肤中的表达进行观察,为揭示 Ang Ⅱ调控创面愈合的机制和胎儿伤口无瘢痕愈合的内在本质提供线索。

1 材料与方法

1.1 标本来源及制备 11~37 周龄胎儿背部皮肤组织标本由解放军总医院第一附属医院全军创伤修复重点实验室提供(表 1)。另外利用整形手术时机获取正常成年人背部皮肤组织标本 5 例,其中男 3 例,女 2 例,年龄 18~57 岁。标本经无菌取材后分成两份,每份切成 1 cm × 1 cm 组织块,其中 1 份用 4%多聚甲醛固定后用于免疫组织化学检测,另 1 份经 10%中性甲醛固定后用于光学显微镜形态学观察。

表 1 11~37 周龄胎儿背部皮肤组织标本

胎龄(周)	标本数	胎龄(周)	标本数	胎龄(周)	标本数
11	3	19	1	27	1
12	2	20	1	28	2
13	2	21	2	29	2
14	3	22	2	30	1
15	2	23	3	31	1
16	2	24	3	32	1
17	1	25	1	33	1
18	2	26	1	37	1

1.2 主要试剂 兔抗人 AT₁ 受体多克隆抗体,羊抗人 AT₂ 受体多克隆抗体,羊抗人血管紧张素转换酶多克隆抗体,SABC 试剂盒均购自 Santa Cruz 公司。德克萨斯红(Dexas Red)标记的猴抗兔 IgG,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的猴抗

山羊 IgG 由第四军医大学全军神经科学研究所提供。TRIzol 和 PCR 试剂盒购自 Invitogen 公司。AT₁ 和 AT₂ 受体引物由 Takara 公司合成。

1.3 免疫荧光组织化学染色主要步骤 按常规方法制做石蜡切片,厚 6μm,将其贴于涂有 APES 的干净玻片上,常规脱蜡脱水,完成免疫荧光染色^[3]。FITC 标记的 AT₂ 呈现绿色荧光,德克萨斯红标记的 AT₁ 呈现红色荧光。用于 FITC 的激发波长 488nm,用于德克萨斯红的激发波长 514nm。FV-100 型共聚焦显微镜(日本)采集图像。

1.4 AT₁ 和 AT₂ 受体 mRNA 表达的分析(实时定量 PCR)^[4] 胎儿皮肤组织标本处理后,总 RNA 抽取(TRIzol 试剂盒),按试剂盒说明完成实时定量 PCR。反应条件:50℃, 2 min,95℃ 10 min;循环 40 次:94℃ 变性 20s, 53℃ 1 min。引物设计:AT₁ 受体 mRNA 引物序列:5'-CCC AAA GCT GGA AGG CAT AAT T-3'和 5'-GAC GCT GGC TGA AGC AAT CTT-3';AT₂ 受体 mRNA 引物序列:5'-CTG CTG TTG TTC TGG CCT TCA T-3'和 5'-ACT CTC TCT TTT CCC TTG GAG CC-3';内参照 GAPDH 引物序列:5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'和 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。

2 结果

2.1 不同发育期皮肤的组织学观察 光学显微镜下可见不同发育阶段的人胎儿皮肤具有典型的组织学结构。在早期妊娠胎儿(胎龄 11~13 周)皮肤中,表皮仅由 2~3 层表皮组成;真皮内毛细血管已经形成,但官腔较细,结构原始,尚未成熟;毛囊开始发育,而完整的毛囊结构尚未形成。胎龄 17 周左右,皮肤出现角化层,皮脂腺开始发育;毛细血管的数量丰富,管腔较小且不十分成熟。胎龄 21 周左右,皮肤表皮由 4 层细胞为主;汗腺、毛囊和皮脂腺等皮肤附属结构已经形成,但结构不成熟;血管腔进一步增大。胎龄 25 周以后,胎儿皮肤表皮细胞层数逐渐增多;汗腺和毛囊结构日益成熟且数量递增;血管数量减少,但血管管径不均一,血管结构日益成熟。

2.2 胎儿皮肤组织中 AT₁ 和 AT₂ 受体的表达 在 11~13 周龄的胎儿皮肤,可见较强的 AT₂ 受体免疫荧光阳性标记信号,主要定位于胎儿表皮;几乎很难检测到 AT₁ 受体阳性标记信号。如图 1A 和 1B 所示,在 14~19 周龄的胎儿皮肤表皮,可检测到微弱 AT₁ 受体阳性信号,此时 AT₂ 受体仍维持较

强的阳性标记信号。妊娠 24 周以后, AT_1 受体的表达迅速增加(图 1C), 维持较高的水平直至妊娠 37 周(图 1E); 然而 AT_2 受体的表达逐渐下降(图 1D), 但在妊娠 37 周前还维持在一个相对较高的水平(图 1F)。 AT_1 和 AT_2 受体在发育中的表皮、汗腺、真皮的微血管呈阳性标记(图 2A 和 2B), AT_2 受体似乎主要定位于表皮的浅层。 AT_1 和 AT_2 受体在汗腺的分泌细胞和导管细胞的表达也呈现和表皮类似的变化趋势。为比较胎儿和成人 AT_1 和 AT_2 受体表达的差异, 笔者检查了它们在成年人皮肤组织中的表达。如图 3A 和 3B 所示, AT_1 和 AT_2 受体在成人皮肤中的表达定位与胎儿无明显差异, 主要分布在表皮的细胞膜、真皮微血管, 但表达强度较胎儿明显降低。

2.3 胎儿皮肤组织中 AT_1 和 AT_2 受体 mRNA 的

表达 为进一步定量分析 AT_1 和 AT_2 受体表达量的变化, 用实时定量 PCR 法检测了在胚胎各个周龄 AT_1 和 AT_2 受体 mRNA 的表达。如图 4 所示, 和免疫荧光染色的结果类似, 在妊娠的 11~37 周, 均可检测到 AT_1 和 AT_2 受体 mRNA, 但主要表达的受体亚型是 AT_2 受体 mRNA, 随胚胎发育 AT_2 受体 mRNA 维持高表达。妊娠 24 周以后随胎龄增加 AT_1 受体 mRNA 表达增加, AT_2 受体 mRNA 表达下降。在成人皮肤也可检测到 AT_1 和 AT_2 受体 mRNA, 但表达水平均较胎儿时期低。

3 讨论

早期胎儿损伤后的修复反应是无瘢痕的组织再生, 而成人的反应则有瘢痕形成, 这说明胎儿与成年人皮肤之间存在某种差异, 这种差异可能导致了修

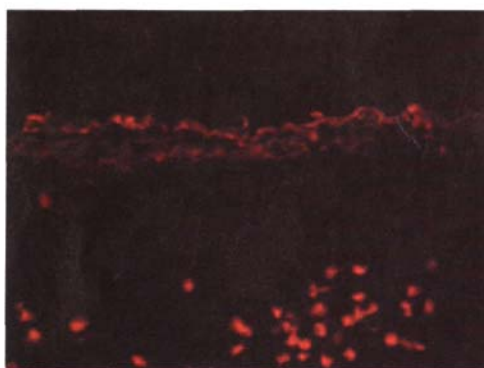


图 1A

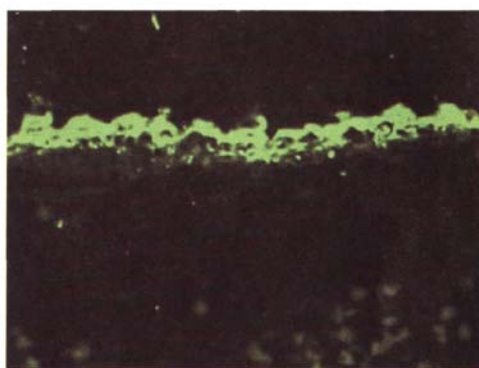


图 1B

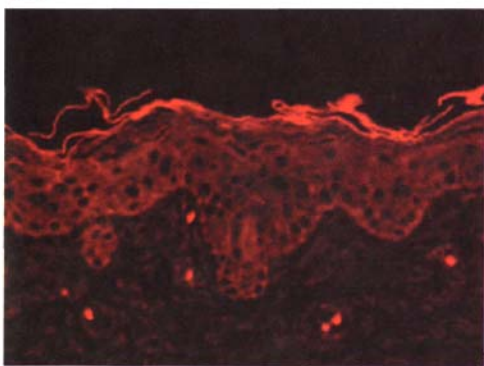


图 1C

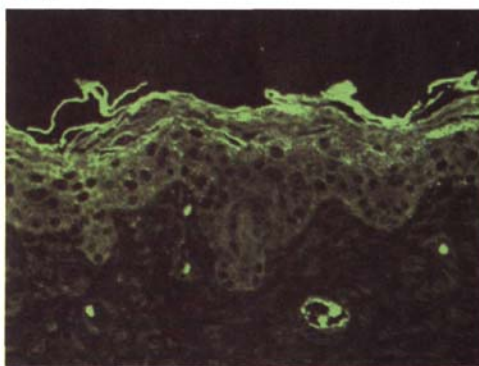


图 1D

图 1A AT_1 受体在 14 周龄胎儿皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法, $\times 400$)

图 1B AT_2 受体在 14 周龄胎儿皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法, $\times 400$)

图 1C AT_1 受体在 24 周龄胎儿皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法, $\times 400$)

图 1D AT_2 受体在 24 周龄胎儿皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法, $\times 400$)

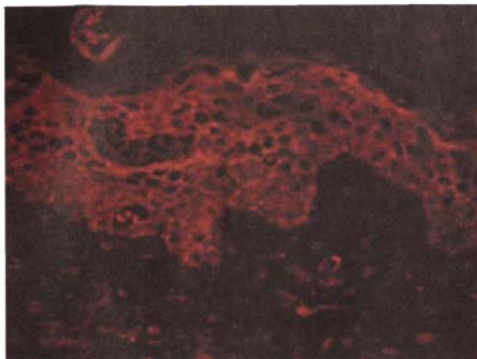


图 1E

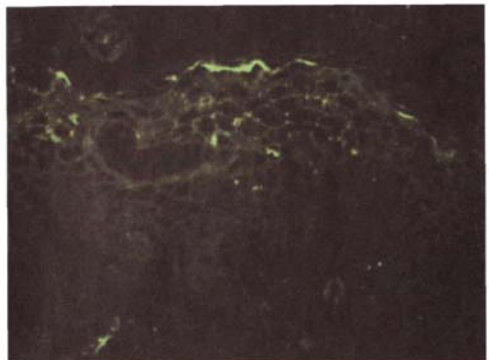


图 1F

图 1E AT₁ 受体在 37 周龄胎儿皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法,×400)

图 1F AT₂ 受体在 37 周龄胎儿皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法,×400)

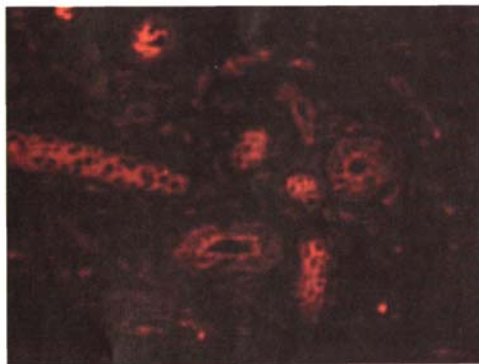


图 2A



图 2B

图 2A AT₁ 受体在 24 周龄胎儿皮肤汗腺中的表达(免疫荧光组织化学法,×400)

图 2B AT₂ 受体在 24 周龄胎儿皮肤汗腺中的表达(免疫荧光组织化学法,×400)

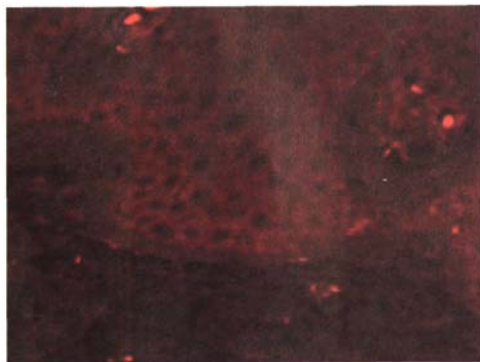


图 3A

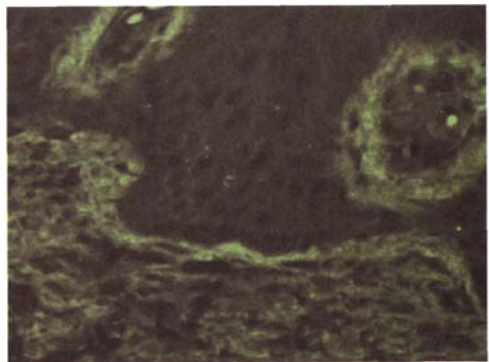


图 3B

图 3A AT₁ 受体在成人皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法,×400)

图 3B AT₂ 受体在成人皮肤中的表达(免疫荧光组织化学法,×400)

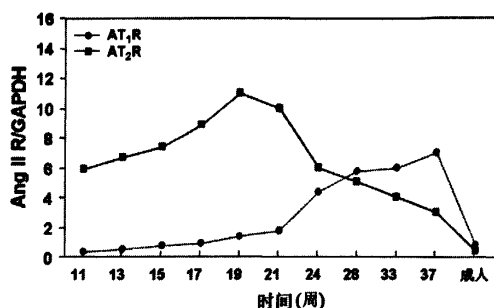


图 4 AT₁ 和 AT₂ 受体 mRNA 在不同周龄胎儿和成人皮肤中的表达(实时定量 PCR)

复结局的不同。随着对创伤愈合分子微环境的认识,人们注意到某些基因的开放与关闭,细胞因子及受体的特异性差异可能是造成伤口愈合结局不同的重要因素之一。

近十年来,在 Ang II 的研究领域已经取得了一些突破性进展,已有研究发现^[5], Ang II 不仅调节血压和体液平衡,而且还作为一个多效应生长因子影响细胞的增殖、凋亡和分化、调节细胞因子的基因表达和分泌、增加细胞对生长因子的敏感性、参与炎症反应等。AT₁ 和 AT₂ 受体同属 G 蛋白偶联受体超家族。在靶器官中, Ang II 的绝大部分作用由 AT₁ 受体调节,如细胞增殖和细胞外基质沉积等。AT₂ 受体的功能有争议,研究提示 AT₂ 受体似乎对抗 AT₁ 受体介导的作用,如 AT₂ 受体产生抗生长、促凋亡和分化的作用。在靶器官, Ang II 的作用是由 AT₁ 和 AT₂ 受体介导的信号相互作用来调节的。

皮肤是人体最大的器官,它的生长和发育受多种生长因子和细胞因子的调控。已报道 AT₁ 和 AT₂ 受体在皮肤中都有表达^[1, 4, 6]。然而在人皮肤胚胎发育过程中 Ang II 受体表达的变化和意义仍然值得研究。为此,本研究用免疫荧光组织化学和实时定量 PCR 观察 AT₁ 和 AT₂ 受体在发育过程中皮肤中的分布和表达量的变化,发现 AT₁ 和 AT₂ 受体在发育过程中的皮肤分布基本相同,主要定位于表皮和皮肤附属器,表达量和孕龄密切相关。胚

胎早期和中期主要表达 AT₂ 受体,胚胎中晚期主要表达 AT₁ 受体。上述结果提示 Ang II 受体的表达呈现发育调节的方式。

鉴于 AT₁ 受体介导 Ang II 的促细胞增殖和促炎症反应的作用, AT₂ 受体对抗 AT₁ 受体介导的促进细胞增殖和炎症反应的作用,皮肤胚胎发育过程中同时存在这两个介导不同作用的受体,提示 Ang II 可能与皮肤的形态发生密切相关。

参考文献

- [1] 付小兵,程飏. 重视神经、内分泌与免疫机制在皮肤修复与再生中作用的研究. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20: 331-335.
- [2] 刘宏伟,程飏. 血管紧张素 II 与皮肤损伤后的修复. 中国临床康复, 2005, 9: 127-129.
- [3] 程飏,刘宏伟,付小兵. 成纤维细胞生长因子 2 对凋亡成纤维细胞中 S100 蛋白表达的影响. 中华烧伤外科杂志, 2006, 22: 109-112.
- [4] Liu HW, Cheng B, Yu WL, et al. Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT₁ and AT₂ receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars. Life Sci, 2006, 79: 475-483.
- [5] De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, et al. International Union of Pharmacology. XXXIII. The angiotensin II receptor. Pharmacol Rev, 2000, 52: 415-472.
- [6] Steckelings UM, Wollschlaeger T, Peters J, et al. Human skin: source of and target organ for angiotensin II. Exp Dermatol, 2004, 13: 148-154.
- [7] Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, et al. A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. J Biol Chem, 2006, 281: 13209-13216.
- [8] 程飏,付小兵,盛志勇. 胎儿、成人正常皮肤 EGFR 与 FGFR-2 表达的研究. 中华整形外科杂志, 2003, 19: 91-94.