

# 不同浓度松弛素-2 对人永生角质细胞增殖、迁移的影响

胡金鹏,李心怡,张伟,许熙,李小静

(安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022)

**摘要** 目的 观察不同浓度松弛素-2(RLN-2)对人永生角质(HaCaT)细胞增殖、迁移能力的影响。方法 将 HaCaT 细胞在不同浓度 RLN-2 的培养基中培养,以不含 RLN-2 的培养基培养的细胞作为对照组,应用 CCK-8 试剂检测其对细胞增殖影响,细胞划痕实验检测其对细胞迁移能力的影响,流式细胞术检测其对细胞生长周期的影响,Western blot 检测细胞周期蛋白 Cyclin B1 和 Cyclin A2 表达情况。结果 以 RLN-2 浓度为 10~100 ng/ml 培养 HaCaT 细胞 24 h 后,相比如对照组,增殖逐渐加快、迁移能力逐渐增强,相关细胞周期蛋白 Cyclin B1 和 Cyclin A2 表达水平增高,处于 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例增加,并在 100 ng/ml 处达到峰值;RLN-2 浓度 200 ng/ml 培养的 HaCaT 细胞相比 100 ng/ml 组增殖减慢、迁移能力下降,相关细胞周期蛋白 Cyclin B1 和 Cyclin A2 表达水平下降,处于 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例下降。结论 RLN-2 在适当浓度范围内能增强 HaCaT 细胞的迁移能力,同时也可通过促进相关细胞周期蛋白表达,提高处于 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例促进细胞增殖。

**关键词** 松弛素-2;人永生角质细胞;增殖;迁移;细胞周期蛋白

**中图分类号** R 619.6

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1926-05

**doi**:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.006

人永生角质(HaCaT)细胞是人表皮主要细胞之一,经增殖、迁移和分化后形成皮肤表皮及其他成分,并能增强底层真皮结构的修复能力,与创面愈合密切相关<sup>[1]</sup>。松弛素在人类多器官系统中具有不同分布和功能,其成员松弛素-2(relaxin-2, RLN-2)能够促进多种上皮组织修复,如通过刺激细胞增殖和抑制凋亡来促进子宫及阴道的上皮积累,也能刺激支气管上皮细胞增殖迁移参与损伤修复<sup>[2]</sup>。近年来研究<sup>[3]</sup>发现,RLN-2 在动物实验中有预防瘢痕增生和促进伤口愈合作用,机制为抑制成纤维细胞增殖及抗纤维化,同时具有抗感染、抗氧化、诱导血管生成和刺激血管扩张作用<sup>[4]</sup>。但 RLN-2 对人皮肤表皮细胞生长状态的影响及机制鲜有文献报道。该研究将以 RLN-2 作用于体外培养的 HaCaT 细胞,在增殖、迁移、细胞周期、细胞周期相关蛋白表达方面对其探究,以探讨可能影响临床创面愈合的机制,为明确 RLN-2 的更多作用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2023-12-28 接收

基金项目:安徽省高等学校科学研究项目(编号:2022AH051191)

作者简介:胡金鹏,男,硕士研究生;

李小静,女,教授,主任医师,博士生导师,通信作者, E-mail: lixiaojing5@163.com

**1.1.1 主要试剂** RLN-2 购自以色列 ProSpec 公司;DMEM/F12 培养基及胎牛血清(FBS)均购自维森特生物技术(南京)有限公司;0.25%胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂、细胞周期试剂盒均购自上海碧云天生物有限公司;细胞周期蛋白抗体 Cyclin B1 和 Cyclin A2、GAPDH 抗体、HRP 标记山羊抗兔抗体均购自杭州华安生物技术有限公司。

**1.1.2 实验细胞** 所用 HaCaT 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 以含有 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基、0.25% 胰蛋白酶按常规细胞培养流程每 2 d 传代 1 次,传代比例为 1:3,取生长状态良好第 3 次传代的 HaCaT 细胞进行正式实验。根据预实验结果,RLN-2 以 PBS 溶液预制成浓度为 5 μg/ml,在 -20 °C 保存备用,细胞实验时加入培养基稀释为 10、20、50、100、200 ng/ml 的 5 个浓度实验组,对照组不加 RLN-2。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖** 调整细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个/ml 接种到 96 孔板,每孔 100 μl,设 6 组,每组设置 6 个复孔。37 °C 孵育 24 h 贴壁后,设置 5 个浓度梯度实验组及空白组,此时记为 0 h,并在 24 h 时每孔避光加入 10 μl CCK-8 溶液,避光孵育 1 h,随后在酶标仪上(调整波长 450 nm)检测各孔吸光度(optical density, OD)值,根据公式:细胞活力(%)

$= [\text{OD}(\text{加药}) - \text{OD}(\text{空白})] / [\text{OD}(0 \text{ 加药}) - \text{OD}(\text{空白})] \times 100\%$ , 计算 RLN-2 对细胞增殖活力的影响。

**1.2.3 细胞划痕实验检测细胞迁移** 接种细胞到 6 孔板中,以含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基培养 24 h,获得细胞贴壁铺满状态,以 200  $\mu\text{l}$  枪头垂直板面匀速划线,加入无血清 DMEM/F12 培养基,设置 5 个浓度梯度实验组及空白组,此时记为 0 h,并于 0、12、24 h 在光镜下同一视野拍照保存,以 Image J 处理分析,根据公式:细胞迁移率(%) = (划痕初始面积 - 24 h 划痕面积) / 划痕初始面积  $\times$  100%,得出各组 24 h 细胞迁移率。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞周期** 接种细胞到 6 孔板中,以含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基培养 24 h,获得细胞贴壁 60% 左右状态,设置 5 个浓度梯度实验组和空白组,细胞培养箱孵育 24 h。取消化下的细胞,以 PBS 清洗 2 次,70% 冰乙醇过夜固定,按细胞周期试剂盒操作说明加入试剂,样品制备完成后于流式细胞仪上机检测,检测数据结果用 Flowjo 10.0 分析,根据公式:增殖指数 PI = (S 期 + G<sub>2</sub>/M 期) / (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 + S 期 + G<sub>2</sub>/M 期)  $\times$  100%,根据指数大小判断细胞增殖情况。

**1.2.5 Western blot 法检测细胞周期蛋白** 按细胞周期检测实验相同处理获得 6 组贴壁细胞,提取细胞总蛋白,以 12.5% 蛋白分离胶电泳,转膜封闭,以 1 : 1 000 稀释抗体 Cyclin B1、Cyclin A2、GAPDH 作为一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 漂洗,完成后以 1 : 50 000 稀释二抗继续孵育 2 h,TBST 再次漂洗,滴加化学发光液后曝光成像,图像以 Image J 处理分析。

**1.3 统计学处理** 每个实验重复 3 次收集结果,采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,行  $t$  检验或方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RLN-2 对 HaCaT 细胞增殖的影响** CCK-8 结果显示:在 24 h 时 10 ~ 200 ng/ml 各组细胞活力相对对照组细胞活力增高,差异有统计学意义( $F = 175.797, P < 0.05$ ),且 100 ng/ml 组与 10、20、50、200 ng/ml 组相比,细胞活力最高,差异有统计学意义( $t = 9.664, 5.161, 3.447, 3.600, P < 0.05$ )。见图 1。

**2.2 RLN-2 对 HaCaT 细胞迁移的影响** 细胞划痕结果显示:各实验组对比对照组迁移率增加,差异

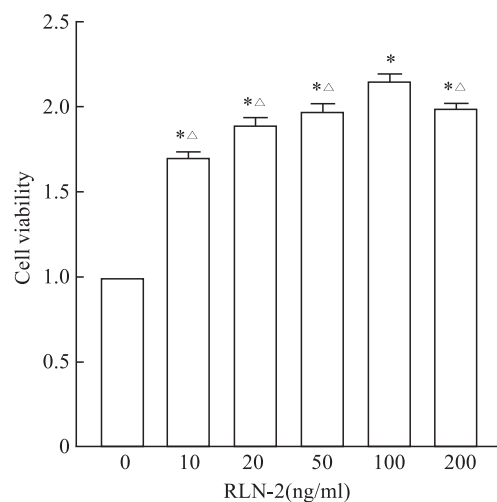


图 1 RLN-2 对 HaCaT 细胞增殖的影响

Fig. 1 The influence of RLN-2 on cell proliferation of HaCaT cells

\*  $P < 0.05$  vs the 0 ng/ml group;  $\Delta P < 0.05$  vs the 100 ng/ml group.

有统计学意义( $F = 53.152, P < 0.05$ )。100 ng/ml 组与 10、20、50、200 ng/ml 组相比,迁移率最大,差异有统计学意义( $t = 12.184, 8.923, 4.806, 6.713, P < 0.05$ )。见图 2。

**2.3 RLN-2 对 HaCaT 细胞细胞周期的影响** 流式细胞周期实验结果显示,相比对照组,各实验组细胞处于 S 期、G<sub>2</sub>/M 期的细胞比例增高,差异有统计学意义( $F = 9.05, P < 0.05$ )。100 ng/ml 组与 10、20、50、200 ng/ml 组相比,处于 S 期、G<sub>2</sub>/M 期的细胞比例占比最高,差异有统计学意义( $t = 4.045, 3.467, 2.910, 3.001, P < 0.05$ )。见图 3。

**2.4 RLN-2 对 HaCaT 细胞细胞周期相关蛋白表达的影响** Western blot 蛋白条带结果显示,相比对照组,各实验组细胞周期蛋白 Cyclin B1 和 Cyclin A2 表达水平增高,差异有统计学意义( $F = 1.818, 1.704, P < 0.05$ )。100 ng/ml 组与 10、20、50、200 ng/ml 组相比,Cyclin B1、Cyclin A2 蛋白表达水平最高,差异有统计学意义( $t = 51.692, 41.124, 29.478, 15.700, P < 0.05; t = 45.220, 17.213, 8.924, 55.899, P < 0.05$ )。见图 4。

## 3 讨论

皮肤是人体抵御外界损伤刺激天然屏障,其完整性能够防止有害物质入侵和体液流出<sup>[5]</sup>。在皮肤受到创伤后,创面中的 HaCaT 细胞通过增殖和迁移参与创面的愈合,此过程受多种因素的影响。首先 HaCaT 细胞自身能够分泌许多生物活性物质,

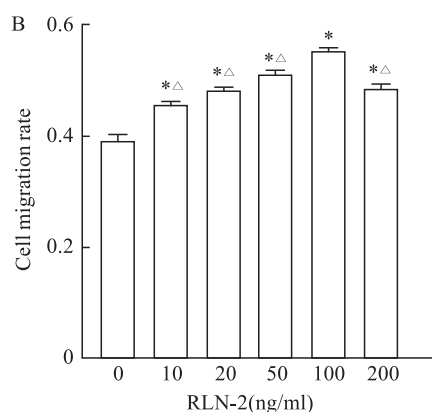
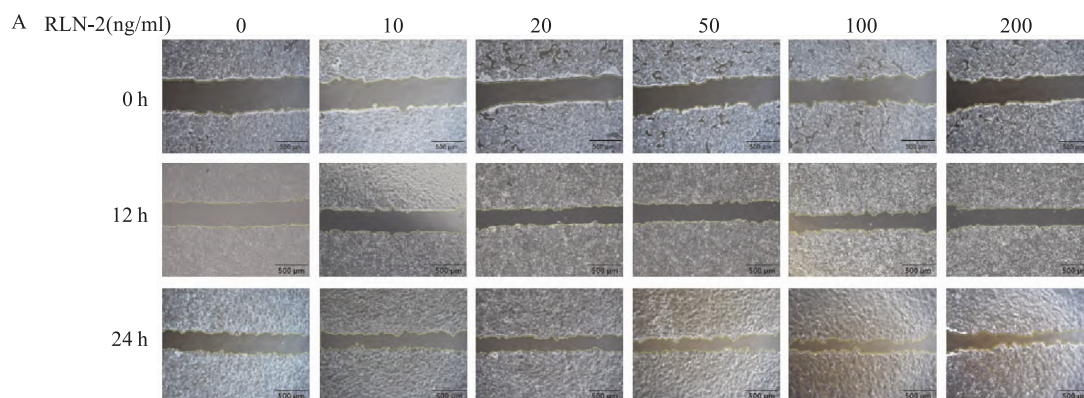


图2 RLN-2对HaCaT细胞迁移的影响

Fig.2 The influence of RLN-2 on the migration of HaCaT cells

A: Photographs were taken to record the scratch widths of cells in each group at 0 h, 12 h, and 24 h ×40; B: Analysis of cell scratch healing in each group at 24 h; \*  $P < 0.05$  vs the 0 ng/ml group; Δ  $P < 0.05$  vs the 100 ng/ml group.

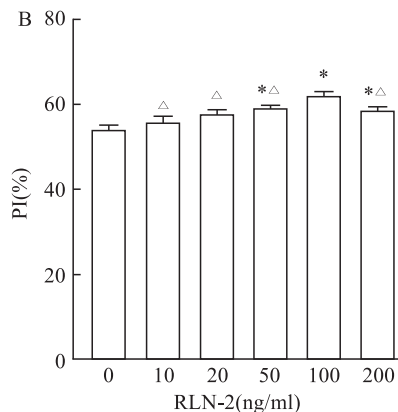
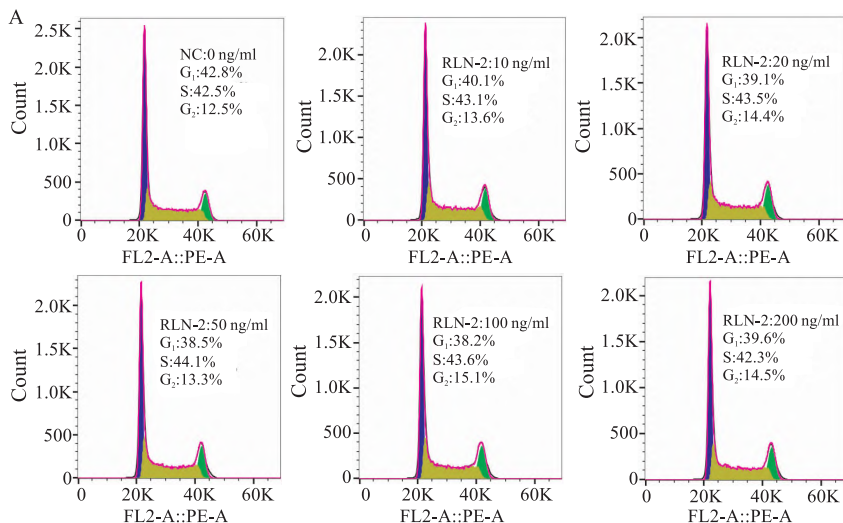


图3 RLN-2对HaCaT细胞细胞周期的影响

Fig.3 The influence of RLN-2 on the cell cycle of HaCaT cells

A: The changes in the cell cycle of each group; B: Statistically analyze the proportion of cells in each group in the S phase and G<sub>2</sub>/M phase; \*  $P < 0.05$  vs the 0 ng/ml group; Δ  $P < 0.05$  vs the 100 ng/ml group.

刺激皮肤细胞增殖<sup>[6]</sup>;其次在体外细胞培养条件下,在剂量-反应关系上多种体内外因素可表现出对HaCaT细胞的增殖具有正面刺激和负面毒性作用,进而可能影响创面愈合,如纳米材料<sup>[7]</sup>、表皮生长因子<sup>[8]</sup>等。此外,人体产生的多种激素,也可能

在伤口愈合的过程中发挥着整体或局部作用,例如糖皮质激素能够抑制HaCaT细胞增殖<sup>[9]</sup>,而雌激素则表现为积极作用<sup>[10]</sup>。除了目前已发现的体内外影响因素,探明更多人体内激素,如RLN-2对HaCaT细胞的生长影响,显得尤为必要。

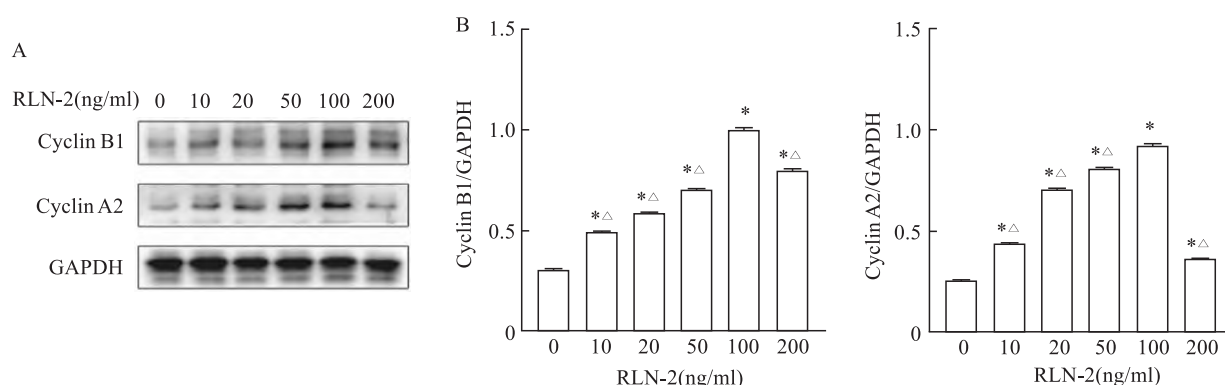


图4 RLN-2对HaCaT细胞细胞周期相关蛋白表达的影响

Fig. 4 The influence of RLN-2 on the expression of cell cycle - related proteins in HaCaT cells

A: The expression levels of the cell cycle proteins cyclin B1 and cyclin A2 in each group; B: Analyze the expression of proteins Cyclin B1 and Cyclin A2; \*  $P < 0.05$  vs the 0 ng/ml group;  $\Delta P < 0.05$  vs the 100 ng/ml group.

细胞周期相关蛋白 Cyclin A2 和 Cyclin B1 表达是细胞增殖的必要条件之一。HaCaT 细胞分裂经历  $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期、M 期,  $G_1$  期为 DNA 复制的主要阶段,  $G_1$  后期 Cyclin A2 促使细胞从 S 期过渡到  $G_2$  期进行有丝分裂<sup>[11]</sup>, 而 Cyclin B1 驱动细胞从  $G_2$  期向 M 期转变, 在相应周期过后两蛋白即降解<sup>[12]</sup>, 其表达水平可反映细胞所处分裂的不同时期活跃程度。本研究中, 实验组相比对照组这两种细胞周期蛋白表达水平均增高, 说明 RLN-2 在细胞有丝分裂的 S 期到 M 期过程中都发挥了促进细胞分裂作用, 进而促进细胞增殖。伤口愈合不仅与细胞增殖有关, 细胞迁移能力也是重要因素。RLN-2 促进 HaCaT 细胞迁移的实验结果显示, 其具有加速皮肤愈合的潜力。但该研究也显示, RLN-2 达到一定浓度后, 相关细胞周期蛋白的表达水平下降, HaCaT 细胞增殖能力以及迁移能力下降, 提示 RLN-2 干预浓度须控制在合理区间才能在伤口愈合研究方面挖掘更多价值。研究<sup>[13]</sup>表明细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号途径和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 信号途径参与了 HaCaT 细胞增殖与分化的调节, 为深入研究 RLN-2 的作用机制提供了方向。

外源性给予松弛素具有改善心功能、扩血管、抗纤维化和抑制凋亡等多种作用<sup>[14]</sup>。RLN-2 作为多肽类物质, 在血清蛋白存在情况下能有效维持其结构完整性和生物学功能, 也可经封包或修饰后更加保证其稳定性及生物活性<sup>[15]</sup>。目前已有报道<sup>[16]</sup>负载 RLN-2 新材料制成缓释型制剂应用于大鼠关节

抗纤维化, 并取得积极成果, 为进一步在动物实验中研究 RLN-2 在创面愈合过程中对 HaCaT 细胞的效应提供了给药方法。由于 RLN-2 兼有抗纤维化的作用, 结合本细胞实验结果, RLN-2 在特定条件下可能既促进创面愈合, 又能减少瘢痕组织的形成。综上所述, 研究 RLN-2 对 HaCaT 细胞的影响机制, 可为创面愈合的治疗提供新思路。

#### 参考文献

- [1] Calabrese E J, Dhawan G, Kapoor R, et al. Hormesis: wound healing and keratinocytes [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 183: 106393. doi:10.1016/j.phrs.2022.106393.
- [2] Wyatt T A, Sisson J H, Forget M A, et al. Relaxin stimulates bronchial epithelial cell PKA activation, migration, and ciliary beating [J]. *Exp Biol Med*, 2002, 227(11): 1047-53. doi:10.1177/153537020222701114.
- [3] Samuel C S, Bennett R G. Relaxin as an anti-fibrotic treatment: Perspectives, challenges and future directions [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 197: 114884. doi:10.1016/j.bcp.2021.114884.
- [4] Almeida-Pinto N, Dschietzig T B, Brás-Silva C, et al. Cardiovascular effects of relaxin-2: Therapeutic potential and future perspectives [J]. *Clin Res Cardiol*, 2024, 113(8): 1137-50. doi:10.1007/s00392-023-02305-1.
- [5] Uche L E, Gooris G S, Bouwstra J A, et al. Barrier capability of skin lipid models: Effect of ceramides and free fatty acid composition [J]. *Langmuir*, 2019, 35(47): 15376-88. doi:10.1021/acs.langmuir.9b03029.
- [6] Kunhorm P, Chaicharoenuomrung N, Noisa P. Cordycepin-induced keratinocyte secretome promotes skin cell regeneration [J]. *In Vivo*, 2023, 37(2): 574-90. doi:10.21873/in vivo.13116.
- [7] Majhi R K, Mohanty S, Khan M I, et al. Ag@ZnO nanoparticles induce antimicrobial peptides and promote migration and antibacterial activity of keratinocytes [J]. *ACS Infect Dis*, 2021, 7(8):

- 2068–72. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00903.
- [8] Lee H J, Jeong M, Na Y G, et al. An EGF- and curcumin-co-encapsulated nanostructured lipid carrier accelerates chronic-wound healing in diabetic rats[J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4610. doi:10.3390/molecules25204610.
- [9] Pukale S S, Sharma S, Dalela M, et al. Multi-component clobetasol-loaded monolithic lipid-polymer hybrid nanoparticles ameliorate imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in Swiss albino mice[J]. *Acta Biomater*, 2020, 115: 393–409. doi:10.1016/j.actbio.2020.08.020.
- [10] Gratton R, del Vecchio C, Zupin L, et al. Unraveling the role of sex hormones on keratinocyte functions in human inflammatory skin diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3132. doi:10.3390/ijms23063132.
- [11] Kong Y, Wu R, Zhang S, et al. Wilms' tumor 1-associating protein contributes to psoriasis by promoting keratinocytes proliferation via regulating cyclinA2 and CDK2 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106918. doi:10.1016/j.intimp.2020.106918.
- [12] Wu Z, Yang Q, Xu K, et al. Study on the key genes and molecular mechanisms of IL-27 promoting keratinocytes proliferation based on transcriptome sequencing[J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2023, 16: 1457–72. doi:10.2147/CCID.S414633.
- [13] 尹雪莉, 贾波, 刘莉, 等. IL-10 调控 HaCaT 细胞增殖及分化的分子机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(6): 890–5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.06.002.
- [13] Yin X L, Jia B, Liu L, et al. The study of molecular mechanism of regulation of IL-10 on proliferation and differentiation of HaCaT cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(6): 890–5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.06.002.
- [14] 尹凌宇, 王帆, 王敬之, 等. Relaxin 家族肽及受体的内源性分布及功能[J]. *生理科学进展*, 2023, 54(1): 63–8. doi:10.20059/j.cnki.pps.2022.11.0101.
- [14] Yin L Y, Wang F, Wang J Z, et al. Endogenous distribution and function of relaxin family peptides and their receptors[J]. *Prog Physiol Sci*, 2023, 54(1): 63–8. doi:10.20059/j.cnki.pps.2022.11.0101.
- [15] Kogkos G, Gkartziou F, Mourtas S, et al. Liposomal entrapment or chemical modification of Relaxin2 for prolongation of its stability and biological activity[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10): 1362. doi:10.3390/biom12101362.
- [16] Kirsch J R, Williamson A K, Yeritsyan D, et al. Minimally invasive, sustained-release relaxin-2 microparticles reverse arthrofibrosis[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(666): eabo3357. doi:10.1126/scitranslmed.abo3357.

## Effects of different concentrations of Relaxin-2 on the proliferation and migration of human immortalized keratinocytes

Hu Jinpeng, Li Xinyi, Zhang Wei, Xu Xi, Li Xiaojing

(Dept of Plastic and Cosmetic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the effect of different concentrations of relaxin-2 (RLN-2) on the proliferation and migration abilities of human immortalized keratinocytes (HaCaT cells). **Methods** HaCaT cells were cultured in media with different concentrations of RLN-2, and the cells were cultured in media without RLN-2 as the control group. The effect on cell proliferation was assessed by using the CCK-8 reagent, the cell migration ability was evaluated through *in vitro* cell scratch assay, the cell cycle was examined by flow cytometry, and the expression levels of cell cycle proteins Cyclin B1 and Cyclin A2 were detected by Western blot. **Results** After being cultured for 24 hours under RLN-2 concentration ranging from 10 ~ 100 ng/ml, HaCaT cells showed progressively increased proliferation and migration capabilities compared to the control group, with elevated expression levels of cell cycle proteins Cyclin B1 and Cyclin A2 and an increased proportion of cells in S and G<sub>2</sub>/M phases, peaking at 100 ng/ml. However, HaCaT cells cultured with 200 ng/ml of RLN-2 exhibited reduced proliferation and migration capabilities, decreased expression levels of Cyclin B1 and Cyclin A2, and a lower proportion of cells in S and G<sub>2</sub>/M phases compared to the 100 ng/ml group. **Conclusion** RLN-2 can enhance the migration ability of HaCaT cells within an appropriate concentration range and may also promote cell proliferation by increasing the expression of related cell cycle proteins and the proportion of cells in S and G<sub>2</sub>/M phases.

**Key words** relaxin-2; HaCaT cell; proliferation; migration; cell cycle protein

**Fund program** Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee(No. 2022AH051191)

**Corresponding author** Li Xiaojing, E-mail: lixiaojing5@163.com