

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

[21] 申请号 200680008624.1

[43] 公开日 2008年3月12日

[11] 公开号 CN 101142483A

[22] 申请日 2006.3.17

[21] 申请号 200680008624.1

[30] 优先权

[32] 2005. 3. 18 [33] JP [31] 080533/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/306043 2006. 3. 17

[87] 国际公布 WO2006/098523 日 2006. 9. 21

[85] 进入国家阶段日期 2007. 9. 17

[71] 申请人 株式会社资生堂

地址 日本东京都

[72] 发明人 片桐千华 仲西城太郎 日比野利彦

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

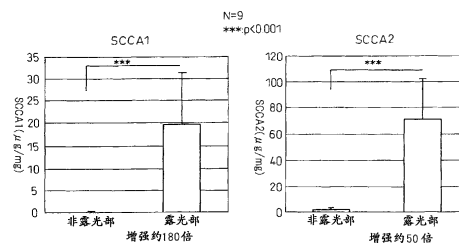
权利要求书 1 页 说明书 24 页 序列表 1 页
附图 15 页

[54] 发明名称

以鳞状上皮细胞癌抗原为指标的
皮肤性状的评价方法

[57] 摘要

本发明提供了以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原 (SCCA) 的表达为指标的
皮肤性状的评价方法。



1. 皮肤性状的评价方法，其以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原（SCCA）的表达为指标。
2. 权利要求 1 所述的方法，其中上述 SCCA 的表达是通过使用 SCCA 特异性抗体的酶联免疫吸附测定法（ELISA）而实施的。
3. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中上述皮肤角质层样本是通过胶带剥离而收集的。
4. 权利要求 1-3 中任意一项所述的方法，其中上述皮肤性状选自由于紫外线照射而引起的皮肤老化、由于伴随皮肤屏障功能降低皮肤保湿能力降低而引起的干燥皮肤、由于牛皮癣或特应性皮炎而引起的角化不全、以及由于花粉病而引起的皮肤粗糙。
5. 权利要求 1-4 中任意一项所述的方法，其中 SCCA 为 SCCA-1。

以鳞状上皮细胞癌抗原为指标的皮肤性状的评价方法

技术领域

本发明提供了以细胞的鳞状上皮细胞癌抗原（Squamous Cell Carcinoma Antigen，下文中称为“SCCA”）为指标的皮肤状态的评价方法。

背景技术

皮肤进行正常角化时，在角质细胞内发生称之为“脱核”的核消失现象。表皮角化细胞在基底层增殖、移行至上层并成熟成为角质层。但是，罹患诸如牛皮癣和特应性皮炎等皮肤病时，在无法进行正常角化的皮肤粗糙的皮肤中，核呈未消化状态残留于角质细胞中，角质细胞以有核的未成熟状态存在于角质层中，称之为“角化不全”。虽然角化不全现象很早以来就已知道，但是对角化不全的产生机制和其生物化学指标尚不知道。

鳞状上皮细胞癌抗原（SCCA）是提取自鳞状上皮癌细胞的抗原，其在子宫颈部、肺、食道、皮肤的鳞状上皮癌中显示出高的血液浓度，常用于鳞状上皮癌的诊断（H. Kato 等人，*Cancer* 40:1621-1628 (1977); N. Mino 等人，*Cancer* 62: 730-734 (1988)）。特别地，由于 SCCA 的血液中水平与鳞状上皮细胞癌的进展阶段、恶性程度、肿瘤的大小等呈良好的相关性，其除了用于癌症的早期发现之外，在癌症治疗效果的评价以及诊断所担心的复发等中也是特别有效的癌标志物。

还知道 SCCA 在牛皮癣表皮的上层中表达增强（Takeda A.等人，*J. Invest. Dermatol.*(2002) 118(1), 147-154)。牛皮癣是皮肤病中的一种，是以表皮细胞的增殖/分化异常和炎症细胞浸润为特征的慢性、再发性的炎症性角化不全症的牛皮癣。认为牛皮癣除遗传因素之外还因多种环境因子而发

病(Hopso-Havu 等人, *British Journal of Dermatology* (1983) 109, 77-85)。

SCCA是由染色体18q21.3上串联排列的两个基因SCCA-1和SCCA-2编码的。认为由这两个基因编码的蛋白质SCCA-1和SCCA-2均为分子量约45,000的蛋白质,显示高同源性,在核酸水平上它们的同源性为95%。这些SCCA属于卵清蛋白丝氨酸蛋白酶抑制物(ov-serpin)家族。ov-serpin即使在丝氨酸蛋白酶抑制物超家族中也具有独特的特征。一般地,丝氨酸蛋白酶抑制物被分泌至细胞外起作用,而ov-serpin主要在细胞内发挥蛋白酶抑制物的作用。

SCCA1是木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶抑制剂,SCCA2是糜蛋白酶样丝氨酸蛋白酶抑制剂,尽管同源性高,但因反应部位的氨基酸序列不同而具有不同的特性(Schick等人, *J. Biol. Chem.* (1997) 27213, 1849-55)。虽然已清楚了牛皮癣等疾病或UV引起SCCA-1和SCCA-2高表达,但是,尚不明确它们对皮肤性状的影响方式。

发明的公开

本发明人以阐明SCCA所参与的表皮生理学机制为目的进行研究之际,发现在牛皮癣等发生角化不全的皮肤中SCCA的表达特异性增高,SCCA是含有角化不全的皮肤出现皮肤粗糙性状的一个因素。因此,认为SCCA的表达可成为皮肤性状的指标,从而完成了本发明。

本发明提供了以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原(SCCA),确切地SCCA-1和/或SCCA-2,特别地SCCA-1的表达为指标的皮肤性状的评价方法。优选地,上述SCCA的表达是通过使用SCCA特异性抗体的酶联免疫吸附分析(ELISA)而实施的。在更为优选的方案中,上述皮肤角质层样本是通过胶带剥离而收集的。

根据本发明的方法,使得在生物化学水平上对皮肤性状,即皮肤粗糙的状态、角化不全状态等进行判定成为可能。作为根据本发明的方法判定的肌肤或皮肤性状,皮肤粗糙,可例举例如由于紫外线照射引起的皮肤老化、由于伴随皮肤屏障功能低下的皮肤保湿力低下引起的干燥皮肤、由于

牛皮癣或特应性皮炎而引起的角化不全、由于花粉病引起的皮肤粗糙等多种性状。

附图简述

图 1 显示了皮肤提取物的蛋白质印迹分析。通过使用 H-99 抗体和 h14D¹⁴⁶ 抗体，利用免疫印迹法对酶原和活性胱天蛋白酶-14(caspase-14)的存在进行分析。应用于 10 μg (泳道 1,2 和 4) 和 1 μg (泳道 3) 的全皮肤提取物、皮肤等价提取物和角化细胞提取物。

图 2 显示了纯化胱天蛋白酶-14 的分析。(A) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将自 Superdex 75 层析得到的级分第 25 号转移至 PVDF 膜，然后考马斯亮兰染色。显示 17Kda 和 11Kda 两条蛋白质条带。(B) 使用 H-99、h14D¹⁴⁶ 和 C20 抗体进行的蛋白质印迹分析。17KDa 条带对 H99 抗体和 h14D¹⁴⁶ 抗体二者显阳性，而 11KDa 条带显示可被 C20 抗体识别。M: 标记物; 1: Superdex 75 No.25; 2: Superdex 75 No.26-27, comc.

图 3 显示了若干种合成抑制物对纯化胱天蛋白酶-14 的效果。人胱天蛋白酶现在已知有 15 种，将针对各种胱天蛋白酶的肽抑制物(YVAD, VDVAD, DEVD, VEID, IETD, LEHD, DNLD)、以及针对半胱氨酸蛋白酶(IAA)和丝氨酸蛋白酶(AEBSF)的类特异性抑制物一起与胱天蛋白酶-14 进行孵育。在 1.3M 柠檬酸钠和 5mM DTT 的存在下，使用 WEHD-MCA 作为底物，测定残留的酶活性。进行试验的酶浓度分别为 5、2.5 和 1.25 μM。数值以重复测试的平均值表示。

图 4 (A) 显示了纯化胱天蛋白酶-14 对 ICAD 的切割活性。(B) 显示了使用 FL331 抗体的蛋白质印迹分析。显示 33Kda 和 27Kda 的切割产物。通过使用 10 μM SCCA-1 进行前孵育，ICAD 的切割被完全抑制。只有在 cosmotropic 盐存在的情况下，可观察到 ICAD 被分解。使用针对氨基末端的特异性抗体进行蛋白质印迹分析显示，与胱天蛋白酶 14 进行延长的孵育，完整的 ICAD 分子消失。向混合物中加入 SCCA-1，也已经检测不到 ICAD 分解，经 16 小时孵育后，仍丝毫未受影响 (B)。(C) 显示

了在 cosmotropic 盐的存在下,对合成的胱天蛋白酶底物的水解活性的调查结果。

图 5 显示了活性胱天蛋白酶-14 和 TUNEL/TUNEL 阳性细胞的定位 (co-localization)。用 H-99 抗体(A)、h14D¹⁴⁶ 抗体(B)和 TUNEL(C)对正常人皮肤的薄切片进行染色。使用 Texas-Red 用于检测荧光(B)。FITC 用于 TUNEL, Texas Red 用于免疫染色,对 TUNEL 和胱天蛋白酶实施双重染色。(D)为重叠图像,(E)显示为明视野。

图 6 显示了 ICAD 和角化不全核的共定位 (co-localization)。用抗 ICAD 抗体 FL331 对正常人皮肤的薄切片进行染色。下表皮的几乎所有核对该抗体显阳性。来自 AD 患者皮肤的角化细胞表在层上的 ICAD 用抗体进行染色时,显示出不同大小的阳性部位(B)。通过显示核簇的碘化丙啶(PI)常常观察到核染色(C)。相同部位的明视野显示出表面上的重叠范围(D)。重叠图像明确了 ICAD 仅存在于角化不全部位(E)。在明视野中也显示了核染色的重叠图像(F)。

图 7 显示了 SCCA-1 和角化不全核的共定位。正常的皮肤切片内几乎不可能检出 SCCA-1。在 AD 患者皮肤的表在层,显示了 SCCA-1 阳性部位(H)。仅在这些部位上可观察到核簇(I)。明视野如(J)所示。显示了重叠图像是 SCCA-1 阳性部位与优选地未消化核存在部位的重叠(K)。还显示了与 SCCA-1 染色和明视野相应的其他重叠图像(L)。

图 8 显示了在露光和非露光部位的表皮中,表明 SCCA 表达的免疫组织化学的检查结果。

图 9 显示了正常皮肤和罹患牛皮癣的皮肤中表明 SCCA 表达的免疫组织化学的检查结果。

图 10 显示了通过 ELISA 法,在正常皮肤角质层中的 SCCA 的表达量的结果。

图 11 显示了通过 ELISA 法,在正常皮肤和牛皮癣皮肤的角质层中的 SCCA 的表达量的对比结果。

图 12 显示了通过 ELISA 法,在正常皮肤和特应性皮炎皮肤角质层中

的 SCCA 的表达量的对比结果。

图 13 显示了正常皮肤中 SCCA 表达量和 TEWL 相关。

图 14 显示了花粉病皮肤的皮肤粗糙和 SCCA-1 表达量之间的关系。

图 15 显示花粉病皮肤的皮肤粗糙和 SCCA-1 表达增强之间的相关图。

用于实施发明的最佳方案

SCCA 为上述的在牛皮癣或 UV 照射皮肤中表达增强的分子量约 45,000 的蛋白质。SCCA-1 和 SCCA-2 的氨基酸序列以及编码它们的核酸序列如 Takeda A 等人, *J. Invest. Dermatol.* 118, 147-154 (2002) (见上文) 所述。

本发明的 SCCA 表达的测定遵从能够测定 SCCA 的任意方法, 可以定量地或定性地实施。具体地, 可例举利用 SCCA 特异性抗体的免疫测定方法、例如利用酶标记的 ELISA 法、利用放射性标记的 RIA 法、免疫比浊法、蛋白质印迹法、乳胶凝集法、红细胞凝集法等的方法。免疫测定法的方式中可例举竞争法或夹心法。另外, SCCA 的表达量还可以通过测定其编码基因在细胞内的表达量来进行。这种情况下, 优选地通过测定细胞内编码 SCCA 的 mRNA 的量来确定 SCCA 的表达。mRNA 的提取、mRNA 量的定量或定性测定已是本领域公知的, 可以通过例如 PCR 法、3SR 法、NASBA 法、TMA 法等各种各样的公知的方法实施。另外, SCCA 的表达可通过原位杂交法或测定其生物活性进行定性确定。

作为受试样本的皮肤角质层样本的收集可采用任意方法进行, 从简便性的角度出发, 优选地采用胶带剥离法。胶带剥离就是在皮肤表层粘贴胶片、剥离, 使皮肤角质层附着于剥离的胶片上而收集角质层样本的方法。如利用胶带剥离法, 仅通过一张胶带收集角质层便使测定 SCCA 的表达成为可能, 使以 SCCA 为指标的非侵入性的皮肤粗糙、角化不全的评价方法成为可能。胶带剥离的优选方法是首先用例如乙醇等清洁皮肤表层以去除皮脂、污垢等, 将切成合适大小 (例如 $2 \times 5\text{cm}$) 的胶片轻轻放置于皮肤表面上, 对整个胶片均匀施力压贴平整, 之后均匀施力剥取胶片。胶带可以

使用市售的玻璃纸胶带等，例如 Scotch Superstrength Mailing Tape (3M 社生产)、玻璃纸胶带(セロテープ(注册商标); ニチバン株式会社)等。附着于胶片的皮肤角质层样本中的 SCCA 可以通过将胶片浸渍于合适的提取液例如 Tris 缓冲液(pH 8.0) (0.1M Tris-HCl, 0.14M NaCl, 0.1%吐温 20)，提取角质层，使 SCCA 自胶片中分离和提取。

在本发明的优选方案中，通过免疫测定方法例如 ELISA 测定 SCCA。ELISA 中使用的 SCCA 特异性抗体可以是单克隆抗体也可以是多克隆抗体。单克隆抗体和多克隆抗体的制备方法是本领域技术人员公知的，例如 Lunstrum 等人, J Biol. Chem. 1986, 261: 9042-9048; Hurle 等人, J Cell Science 1994, 107: 2623-2634 所描述。

本发明的方法中，特别优选的是夹心免疫测定法。夹心免疫测定方法可通过如下描述实施。

将两种 SCCA 的特异性抗体的其中之一作为一次抗体固定于载体上。作为载体优选固体载体，例如作为固体载体可以使用免疫测定法中常用的任意载体，例如任意大小、形状的苯乙烯或聚苯乙烯等高分子载体，除此之外还可使用由这些适宜的材料制成的反应容器例如 ELISA 板的孔内壁等。

上述一次抗体固定于载体可以通过常规方法进行，例如将上述一次抗体溶解于缓冲液中，例如磷酸缓冲盐水 (PBS)、硼酸缓冲液等，使其吸附于载体上进行固定。另外，例如也可以将结合上述一次抗体的抗体和其它蛋白质例如蛋白质 C 事先固定于载体上，使它们与上述一次抗体接触等。进一步地，为了抑制非特异性结合，优选地向如此固定了一次抗体的载体加入适宜的封闭剂，例如 PBS - BSA 或市售的封闭剂例如ブロックエース (大日本制药)，通过约 4 ~ 40℃，优选的 20 ~ 37℃，孵育 5 分钟至数日，优选的 10 分钟至 24 小时、更为优选的 10 分钟 ~ 3 小时进行封闭。

将上述两种 SCCA 的特异性抗体中的另一种抗体作为二次抗体使用、进行标记。作为标记可例举酶标记、放射线标记、荧光标记等。进行酶标记时，使酶直接结合于二次抗体进行标记，或者通过如亲和素 - 生物素这

样的相互反应性蛋白质间接地进行酶标记。酶与抗体等的结合可以利用例如市售的巯基导入基试剂向酶和应该标记的抗体等分别导入巯基，使二者通过 S-S 键合。作为酶可例举辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶等。酶的检测可使用该酶的特异性底物进行。例如使用辣根过氧化物酶时，可利用 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 和 ABTS (2,2'-连氨基-双-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸]) 等。

所进行的免疫测定通过将固定了上述一次抗体的载体、上述标记的二次抗体和被检样品进行混合、孵育，使被检样品中的 SCCA 和固定于载体的一次抗体结合，使标记二次抗体和该 SCCA 分子结合。

这样，在反映样本中的 SCCA 量的方面，标记化抗体通过固定于载体上的一次抗体和来自于样本的 SCCA 被固定在载体上。所进行的孵育如下，在适宜的缓冲液中，例如 PBS 中，约 4~40℃、优选地 20~37℃，孵育 5 分钟至数日、优选地 10 分钟至 24 小时，更为优选地 10 分钟~3 小时。

然后，从上述载体分离未结合的标记化抗体。载体为固体载体时，该分离操作可以通过固液分离简单地进行。使用一定已知量的标记二次抗体时，可以测定在载体上结合的标记或未结合的标记或者两者均测定。另一方面，使用任意的标记抗体时，检测、测定结合于载体上的标记。为了检测结合于载体上的标记，优选地使用清洗液，例如加入了适宜的表面活性剂的缓冲液，例如 PBS-吐温 20，清洗载体，除去未结合的标记化抗体后进行检测。根据标记的种类，可以遵从常规方法进行检测。

下面，通过列举具体实施例，更具体地说明本发明。并且，本发明并不受这些实施例的限制。

实施例

1. SCCA 和角化不全的关系的阐明

材料和方法

材料

Ac-WEHD-MCA 、 Ac-YVAD-MCA 、 Ac-VDVAD-MCA 、

Ac-DEVD-MCA、Ac-VEID-MCA、Ac-IETD-MCA、Ac-LEHD-MCA 购自 Peptide Institute, Inc.(日本、大阪府)。

苜氧羰基 (Z)-YVAD-FMK、Z-VDVSD-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VEID-FMK、Z-IETD-FMK、Z-LEHD-FMK 和 Z-VAD-FMK 购自 BioVision(Mountain View, CA)。重组胱天蛋白酶-1~10 获自 BIOMOL Research Labs, Inc.(Plymouth Meeting, PA)。

H-99 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc)用于胱天蛋白酶 14 的酶原形和大亚单位的检测。H-99 抗体是人胱天蛋白酶 14 中 24-122 位氨基酸所对应肽产生的抗体,因此,可与胱天蛋白酶 14 酶原和其经加工的形态即其大亚单位反应。

C-20 抗体(Santa Cruz) 用于胱天蛋白酶 14 小亚单位的检测。开裂部位特异性抗体(h14D¹⁴⁶)为使用对应于人胱天蛋白酶 14 的推测加工部位的合成五肽 TVGGD,通过对兔实施免疫而获得的。

WEHD-MCA 水解活性的测定

将 Mikolajczyk J.等人, *Biochemistry* 43, 10560-9 (2004)所述的方法进行或多或少的变更,以 Ac-WEHD-MCA 作为底物,测定胱天蛋白酶 14 的活性。简而言之,以 45 μ L 的 0.1M HEPES 缓冲液(pH 7.5)、0.06M NaCl、0.01% CHAPS、5mM DTT、1.3M 柠檬酸钠和 10 μ M WEHD-MCA 制作测试混合物(全部以最终浓度表示)。向该混合物中加入酶样品(5 μ l),孵育 10 至 30 分钟。加入 150 μ l 的 0.1M 一氯代乙酸使反应中止,然后,使用 Fluoroskan Ascent FL(Thermo Electron Co., Wolsam, MA)于 355nm 激发波长和 460nm 发射波长处进行测定。对抑制物进行测试时,将胱天蛋白酶 14 和肽抑制物室温下于测试缓冲液中孵育 15 分钟,然后加入 5 μ l 的 100 μ M WEHD-MCA 开始测试。

胱天蛋白酶-14 的纯化

从正常人的脚后跟部擦取的人角化细胞(约 14g)于玻璃匀浆器中用

含有 0.14M NaCl 的 0.1M Tris-HCl(pH 8.0)进行提取。15,000g 离心 60 分钟后,得上清液。用 Amicon Ultra(Millipore, MA)进行浓缩,经快速脱盐柱 HR10/10(Amersham Biosciences)脱盐后,将粗产物涂于 HiPrep 16/10 Q XL 柱。用 20mM Tris-HCl(pH 8.0)清洗柱子,经 0 至 1M 线性 NaCl 梯度洗脱。通过使用抗胱天蛋白酶 14 抗体(H-99)(Santa Cruz Biotechnology, CA)和 h14D¹⁴⁶ 抗体的蛋白质印迹分析对级分进行追踪。另外,测定各级分对 Ac-Tyr-Glu-His-Asp-甲基-香豆酰胺(WEHD-MCA)(Peptide Institute, Inc. 日本国大阪)的水解活性。将显阳性的级分上样于经同样缓冲液平衡过的 Mono Q 柱,用最大 1M 的 NaCl 梯度进行洗脱。胱天蛋白酶 14 级分进一步地通过 Mono S 阳离子交换层析分离。用 20mM 醋酸缓冲液(pH4.5)对柱进行平衡,然后用 0 至 1M 的 NaCl 梯度进行洗脱。将显阳性的级分进行浓缩,然后将其上样于经 25mM 乙醇氨(pH 8.3)平衡的层析聚焦 Mono P 柱。使用 46ml Polybuffer(pH 5.0),一边形成 pH8 至 5 的 pH 梯度,一边进行洗脱。胱天蛋白酶 14 使用 Superdex 75 凝胶层析进行最终的纯化。蛋白质浓度由 BioRad Protein Assay Kit (BioRad Lab, Hercules, CA)确定。

重组胱天蛋白酶 14 和 SCCA-1 的制备

使用正向引物: AAGGATCCAATCCGCGGTCTTTGGAAGAGGAG (序列号 1) 和反向引物: TTTCTGCAGGTTGCAGATACAGCCGTTTCCGGAGGGTGC (序列号 2) 通过 PCR 将编码胱天蛋白酶 14 的 cDNA 从角质形成细胞 cDNA 中分离并扩增。将 PCR 产物克隆入 pQE-100 DoubleTag 载体(Qiagen, Valencia, CA)中,随后在大肠杆菌 JM109 中表达。

从牛皮癣 cDNA 文库 (Takeda A 等人, J. Invest. Dermatol., 118, 147-54(2002)) 中分离 SSCA1 cDNA, 然后克隆入 pQE30 载体(Qiagen)。通过 Ni-NTA Agarose(Qiagen)和 Mono Q 层析纯化重组蛋白质。

免疫组织化学

经患者同意后，通过外科整形手术取得人头皮试验片。将组织用磷酸缓冲液(pH7.4)中的4%低聚甲醛(PFA)固定，石蜡包埋。制备薄切片，于4℃放置一晚后与适宜的抗体一起孵育。使用连接有过氧化物酶的山羊抗兔IgG(Nichirei公司生产)作为二次抗体，与作为显色试剂的DAB反应。

进行TUNEL阳性细胞和活性胱天蛋白酶的双重免疫检测时，使用连接有Texas Red(注册商标)色素的抗兔IgG(驴)作为二次抗体。使用荧光素原位细胞死亡检测试剂盒(Roche Diagnostics)，按照制造商提供的说明书实施TUNEL反应。

进行ICAD的蛋白质印迹和免疫组织化学分析时，使用抗ICAD IgG(FL331, Santa Cruz Biotechnology)和DFF45/ICAD Ab-2(NeoMarkers, Fremont, CA)。

有报道称在活性特应性皮炎(AD)患者的皮肤内常常观察到簇化的角化不全(Sakurai K.等人, J. Dermatol. Sci. 30, 37-42(2002); Piloto Valdes, L.等人, Allergol. Immunopathol. (Madr) 18, 321-4(1990))。本实验中使用非侵入方法研究角化不全皮肤中ICAD和SCCA-1的定位。从AD或正常志愿者的皮肤收集表皮在性角化层，然后使用医用粘着剂Aron Alpha A(Sankyo Co., Tokyo)使其附着于载玻片上。用3%低聚甲醛固定后，将样品用0.1% Triton X-100浸透，之后该样品用抗ICAD或抗SCCA-1抗体于4℃免疫染色过夜。分别将Alexa Fluor 400接合型抗兔(ICAD)或抗小鼠IgG(SCCA-1)作为二次抗体，室温孵育1小时。为了便于对核进行视觉化观察，将样品在0.1%碘化苯基偶氮二氨基吡啶溶液中浸润5分钟，之后用PBS清洗3次。使用Leica DMLA显微镜进行荧光观察。

蛋白质印迹分析

利用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法，通过5至20%梯度的凝胶分离蛋白质。电泳后，将蛋白质转移至聚乙烯赖氨酸二氟化物膜(Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA)上，之后与含有H-99, h14D¹⁴⁶或C20的抗胱天蛋白酶14抗体一起孵育。使用过氧化物酶标记的抗兔IgG(Sigma)或抗山羊

IgG 作为二次抗体，之后使用 ECL-plus(Amersham)通过化学发光法使免疫反应性蛋白可见。

结果

角化细胞中的胱天蛋白酶 14 为在 Asp¹⁴⁶ 处被加工

通过蛋白质印迹分析，H-99 抗体只能检测出角化细胞提取物中的 17KDa 条带（图 2）。该结果与含有未经加工的 30Kda 结构的来自全皮肤或皮肤等价模型的提取物的结果不一致。用 h14D¹⁴⁶ 抗体也可识别该 17KDa 条带（图 2B），推测是活性胱天蛋白酶 14(p17)的大亚单位。这提示在终末分化的最终阶段中通过 Asp¹⁴⁶ 的开裂完成胱天蛋白酶 14 的成熟。进一步地，在皮肤等价模型中，也可通过 H-99 和 h14D¹⁴⁶ 抗体识别 30KDa 条带，这提示在 Asp¹⁴⁶ 进行了切割。

自角化细胞提取物制备胱天蛋白酶 14

角化细胞中的胱天蛋白酶 14 的大部分是经加工过的结构，因此，推测以活性型存在（Eckhart L.等人, *J. Invest. Dermatol.* 115, 1148-51 (2000); Lippens S.等人, *Cell Death Differ.* 7, 1218-24(2000); Mikolajczyk, J.等人, *Biochemistry* 43, 10560-9(2004)），从而认为人角化细胞是极好的胱天蛋白酶 14 纯化源。但是，还知道人角化细胞含有胱天蛋白酶 1 样酶（Takahashi T., *J. Invest. Dermatol.* 111, 367-72(1998)）。胱天蛋白酶 1 的底物，例如 WEHD-底物能够被胱天蛋白酶 1 和胱天蛋白酶 14 二者水解。本发明人首先在有无 1.3M 柠檬酸钠和 5mM 二硫苏糖醇存在下，试验由胱天蛋白酶 1 引起的水解 WEHD-MCA。明确了在标准胱天蛋白酶测试缓冲液中，尽管 WEHD-MCA 是胱天蛋白酶 1 的极好底物，但存在 cosmotropic 离子时，胱天蛋白酶 1 不能水解该底物(数据未显示)。因此，通过如下 3 种方法对各个级分进行评价，即对 WEHD-MCA 的水解活性、对 H-99 的反应性和 h14D¹⁴⁶ 抗体。表 1 表示连续层析的结果。使用 HiPrep Q 柱进行最初的阴离子交换层析后，收率增加 170%，比活性增加约 10 倍。认为以上增加大

概是由于将胰天蛋白酶 14 自内源性抑制物隔离而造成的。蛋白质印迹分析显示级分 No.16 至 20 是含有分子量为 17 Kda 的 H-99 且 ^{146}D 均阳性的条带。认为这些级分也具有 WEHD-MCA 水解活性。后续的 Mono Q 阴离子交换层析中，根据存在 17 Kda 大小且 H-99 和 ^{146}D 均阳性的条带进行判断，级分 No.25 至 No.29 含有经加工形式的胰天蛋白酶 14。只有这些级分显示有 WEHD-MCA 水解活性。Mono S 阳离子层析和 Mono P 层析聚焦对于去除主要的杂质蛋白质是有效的，从而使比活性分别增加 3.5 倍和 7 倍。另外，只有 H-99 且 ^{146}D 均阳性的级分显示 WEHD-MCA 水解活性。Superdex 75 层析最后阶段分离出分子量 30 Kda 的峰，该峰与 WEHD-MCA 水解活性峰一致。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法显示该制备物含有 17Kda 和 11KDa 片段。前者对 H-99 抗体和 ^{146}D 抗体均显阳性，后者被 C20 抗体识别。以上提示人胰天蛋白酶 14 作为由大亚单位(17KDa)和小亚单位(11KDa)组成的异二聚体被纯化。另外，Superdex 75 凝胶层析显示人角化细胞中的胰天蛋白酶 14 与其他胰天蛋白酶不同，是像粒酶 B 活化型那样作为单体存在的。表 1 汇总了胰天蛋白酶 14 的纯化率。以约 100mg 可溶性蛋白质提取物为起始物，可得到 11.8 μg 纯化蛋白质。比活性增加 764 倍，收率为 9.1%。

胰天蛋白酶-14 的纯化的总结

	蛋白质浓度	量	总蛋白质量	酶活性	比活性	总活性	收率
	ug/ml	ml	ug	AFU(m U)	(mU/mg 蛋白质)	U	(%)
CC TBS Ext	312.0	320.00	99840.0	3.67	11.8	587.34	100.0
Hi Prep Q	1185.0	15.00	17775.0	133.59	112.7	1001.92	170.6
Mono Q	582.0	8.00	4656.0	150.30	258.2	601.19	102.4
Mono S	61.3	8.00	490.4	56.94	928.8	227.75	38.8
Mono P	50.5	1.00	50.5	338.31	6699.2	169.15	28.8
Superdex 75	11.8	1.00	11.8	106.52	9015.1	53.26	9.1

纯化胱天蛋白酶 14 的酶特性

对于纯化胱天蛋白酶 14 的酶特性进行了研究 (图 3 至 4)。胱天蛋白酶 14 对多种胱天蛋白酶抑制物例如 YVAD-FMK(胱天蛋白酶 1 抑制物)、VDVAD-FMK(胱天蛋白酶 2 抑制物)、DEVAD-FMK(胱天蛋白酶 3 抑制物)、IETD - FMK (胱天蛋白酶 8 抑制物)、LEHD - FMK (胱天蛋白酶 9 抑制物) 和 VAD - FMK (pan - 胱天蛋白酶抑制物) 具有敏感性 (图 3)。然而, VEID - FMK 几乎没有效果。但是, YVAD-FMK 对胱天蛋白酶 14 活性显示极强的抑制效果。认为这大概是由于胱天蛋白酶 1 和胱天蛋白酶 14 二者之间结构相似造成的。pan-胱天蛋白酶抑制物 VAD-FMK 与 VAD-FMK 具有相同程度的抑制胱天蛋白酶 14 活性的作用。半胱氨酸蛋白酶的类特异性抑制物碘乙酸 (IAA), 或者丝氨酸蛋白酶的类特异性抑制物 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟 (AEBSF) 在本研究的试验浓度下, 无显著性抑制效果。

纯化胱天蛋白酶 14 对 ICAD 的分解效果

在摸索胱天蛋白酶 14 的天然底物中, 本发明人就胱天蛋白酶 14 对 ICAD 的效果进行了试验。核的消失对于终末分化是极为重要的事件之一。在常规胱天蛋白酶测试缓冲液中, 将重组 ICAD 蛋白质和纯化胱天蛋白酶 14 一起孵育, 如果用抗 ICAD IgG 进行蛋白质印迹分析判定, 纯化胱天蛋白酶 14 对 ICAD 无任何水解活性 (图 4A)。但是, 有 cosmotropic 盐存在时, 完整的 ICAD 蛋白质减少, 两种主要分解产物增加, 显示纯化胱天蛋白酶 14 对 ICAD 具有有限的分解作用。

SCCA-1 对胱天蛋白酶 14 的抑制

尽管 SCCA-1 属于丝氨酸蛋白酶抑制物超家族, 但它抑制半胱氨酸蛋白酶例如木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 L (Takeda A. 等人, Biol. Chem. 383, 1231-6(2002))。这显示 SCCA-1 是像 Crm-A³² 那样的固有的交叉抑制物 (cross-class inhibitor)。因此, 本发明人对 SCCA-1 是否能够抑制胱天蛋白

酶成员进行了研究。对于胱天蛋白酶 14，利用 cosmotropic 条件。将重组活性胱天蛋白酶与 SCCA-1 一起孵育，任一胱天蛋白酶成员(1~10)的酶活性未受任何影响。与此相反，SCCA-1 剂量依赖性地抑制胱天蛋白酶 14 对 WEHD-MCA 的活性(图 4C)。SCCA-1 也抑制胱天蛋白酶 14 对 ICAD 的分解。即使延长孵育，酶活性也不恢复。这提示胱天蛋白酶 14 和 SCCA-1 有强的结合(图 4B)。

活性胱天蛋白酶 14 和 TUNEL 阳性细胞的定位

为了研究胱天蛋白酶 14 是否参与脱核过程，本发明人对活性胱天蛋白酶 14 和 TUNEL 进行双重染色。如图 5A 所示，包含酶原形和活性型的胱天蛋白酶 14 定位于正常人表皮内的有棘细胞至角化细胞。这和过去的研究发现一致(Lippens 等人,(2000), 见上文)。用 h14D¹⁴⁶ 抗体检测的活性胱天蛋白酶 14 仅限于角化细胞和部分颗粒细胞(图 5B)。角化细胞几乎均被染色。观察到 TUNEL 阳性细胞在角化层的紧下方，这些阳性细胞多被显著限制(图 5C)。令人感兴趣的是，TUNEL 阳性细胞专门与 h14D¹⁴⁶ 阳性细胞共定位。这提示在上述细胞中发生了 DNA 片段化，活性胱天蛋白酶 14 参与了该过程。

角化不全性核中的 ICAD 和 SCCA-1 的共定位

在正常人上皮的纵断面，通过使用 FL331 抗体发现 ICAD 主要定位于基底细胞和基底上细胞的核内。基底细胞至颗粒细胞的细胞质显示弱阳性。在角化层中，对 ICAD 的免疫反应性大幅降低。即便使用 N 末端肽抗体 DFF45/ICAD Ab-2 事实上也得到相同的结果(数据未显示)。用抗 ICAD 抗体(FL-331)染色 AD 患者的表在性角化层，不同大小的簇区域对该抗体显示阳性(图 6B)。用 PI 进行核染色时，显示在这些斑状岛内常常可见角化不全的核(图 6C)。表在性角化层的明视野显示很多凹凸的粗糙表面(图 6D)。重叠图像显示角化不全部位与 ICAD 阳性部位一致(图 6E 和 5F)。这些结果提示 ICAD 分解对于终末分化中核的消除是必要的。

对于正常的皮肤, 颗粒层内可检测出极低水平的 SCCA-1。即便在具有活性 AD 的表在性角化层内, 阳性部位的斑状分布仍显示显著的强免疫染色(图 7H)。同样地, SCCA-1 阳性区域与 PI 阳性的核层即角化不全部位相一致(图 7J~L)。综上结果所述, 教导了 ICAD/CAD 体系在脱核过程中发挥主要作用, 然后 SCCA-1 作为抑制物参与了该反应。

讨论

大部分胱天蛋白酶 14 于表皮内表达, 在其它组织内几乎不表达 (Van de Craen, M 等人, *Cell Death Differ.* 5, 836-46 (1998))。过去的报告称角质形成细胞的终末分化与胱天蛋白酶 14 的加工有关, 角质形成细胞的终末分化提示了胱天蛋白酶所具有的蛋白酶活性增强 (Lippens, S 等人, *Cell Death Differ* 7, 1218-24 (2000); Eckhart I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 655-9(2000); Hu S. J. *Biol. Chem* 273, 29648-53(1988))。最近, Mikolajczyk 等人, (2004), 见上文) 已证实在 cosmotropic 盐存在下, 粒酶 B 具有切割胱天蛋白酶 14 的酶活性。在该研究中, 本发明人为了揭示人胱天蛋白酶 14 在角质形成细胞分化的最终阶段是否具有活性, 尝试从完全分化的角质形成细胞中纯化胱天蛋白酶 14。本发明人使用了分别识别大亚单位、酶原形(H-99) (具有推定的胱天蛋白酶切割部位 Asp¹⁴⁶(h14D¹⁴⁶)) 和小亚单位(C20) 的 3 种抗体。最终制备物由 2 个蛋白质条带组成, 即通过 h14D¹⁴⁶ 抗体识别的 17KDa 蛋白质条带和通过 C20 抗体识别的 11KDa 蛋白质条带。这些蛋白质条带是活性胱天蛋白酶 14 的大、小亚单位。纯化步骤中 H-99 阳性的 17KDa 条带与 h14D¹⁴⁶ 抗体一同被识别。这就提示大亚单位的羧基末端是以 Asp¹⁴⁶ 终止的。小亚单位的氨基末端区经鉴定为 Lys¹⁵³-Asp-Ser-Pro-Gln, 这提示在 Ile¹⁵² 和 Lys¹⁵³ 之间发生了加工。该部位是胱天蛋白酶成员的特异性的切割部位。这与 Chien 等人发现的自包皮提取物免疫沉淀的胱天蛋白酶 14 显示在相同部位切割 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002 Aug 30;296(4);911-7) 是一致的。因此, 得出如下结论, 即人胱天蛋白酶 14 以高活性异二聚体被均质地纯化。

提示在胱天蛋白酶 14 的成熟过程中,有如下变化参与其中,即在 Asp¹⁴⁶ 和 Ile¹⁵² 这两个部位进行了加工,并且,去除了接头区 Xxx¹⁴⁷ 至 Ile¹⁵² 之间的 6 个残基。两个不同切割部位(一个为酸性,另外一个为疏水性)的存在还提示胱天蛋白酶 14 的活化是不同酶多阶段的作用结果。

纯化胱天蛋白酶 14 的酶学特性是十分独特的。纯化胱天蛋白酶 14 对于已知的胱天蛋白酶抑制物显示出较宽的抑制物敏感性。尤其是胱天蛋白酶 1 抑制物 YVAD-FMK 显示最强的抑制作用。YVAD-FMK 相对于 WEHD-MCA 及其他胱天蛋白酶 1 底物 YCAD-MCA 而言显示出最高活性。这提示胱天蛋白酶-1 与胱天蛋白酶 14 的密切关系。但是,本发明人明确了胱天蛋白酶 14 具有显著不同的特性。本发明人首次阐明 SCCA-1 是胱天蛋白酶 14 的内源性抑制物。SCCA-1 最为特异的特性就是对胱天蛋白酶 14 的显著的特异性。胱天蛋白酶 1 至 10 的其他成员不受 SCCA-1 的影响。以 CrmA 作为对照,使用合成底物 DEVD-MCA 或天然底物 ICAD,SCCA-1 不抑制胱天蛋白酶 3 的活性。CrmA 也属丝氨酸蛋白酶抑制物超家族,已知其能够抑制包含胱天蛋白酶 1 和胱天蛋白酶 8 在内的多种胱天蛋白酶 (Gagliardini V.等人, Science 263, 826-8(1994))。已知 XIAP 抑制胱天蛋白酶 3, -7 和 -9 (Srinivasula S. M.等人, Nature 410, 112-6(2001))。抗程序性细胞死亡性蛋白质 p35 抑制胱天蛋白酶 1, -3, -6, -7, -8 和 -10, 因此,认为其具有更广泛的抑酶谱。这些抑制蛋白质 CrmA、IAP 和 p35 全部对开始和实行胱天蛋白酶的一部分起到抑制作用,提示这些分子参与典型的程序性细胞死亡通路的实行。另外,本发明人得到的结果强烈提示 SCCA-1 并非扮演通常程序性细胞死亡事件中的关键角色,而是在胱天蛋白酶 14 介导的脱核过程中充当重要的调节物。

该过程的分子机制尚不明确。本发明人明确了在 cosmotropic 盐存在下,人胱天蛋白酶 14 能够分解 ICAD。ICAD (也称作 DNA 片段化因子“DFF45”)是被称作胱天蛋白酶活化型 DNA 酶(CAD) (或 DFF40) 的镁依赖型核酸内切酶的抑制物。ICAD/CAD 系统在程序性细胞死亡性细胞死中的染色体 DNA 的分解中发挥主要作用。与 CAD 结合的 ICAD 以无活

性复合体形式存在。胱天蛋白酶 3 对 ICAD 显示有限的蛋白质分解，在 Asp¹¹⁷ 和 Asp²²⁴ 两个部位切割。该切割使 CAD 活化，使 DNA 开始分解 (Nagata S. *Exp. Cell Res.* 256, 12-8 (2000))。胱天蛋白酶 3 在程序性细胞死亡之际，对于大量的细胞蛋白质的切割并非必要，但是对于 ICAD 的切割而言则是必须的 (Tang D.等人, *J. Biol. Chem.* 273, 28549-52(1998))。这显示胱天蛋白酶 3 对于 DNA 片段化是极其重要的，但是，对于其他实行胱天蛋白酶，即胱天蛋白酶 6 和 7 则不重要。令人感兴趣的是，胱天蛋白酶 14 可以将 ICAD 切割成类似于 12Kda 和 35Kda 的切割片段。序列分析显示切割部位相同。这提示胱天蛋白酶 14 可以成为胱天蛋白酶 3 的完美的替代物。尽管胱天蛋白酶 14 能够分解 ICAD，以下原因表明其与促程序性细胞死亡胱天蛋白酶 3 明显不同。第一，胱天蛋白酶 14 的过量表达不诱导程序性细胞死亡性细胞死亡 (Van de Craen. *Cell Death Differ.* 5, 838-46(1998))。这是以胱天蛋白酶 3 作为对照。第二，胱天蛋白酶 14 在多种程序性细胞死亡性刺激下不活化 (Lippens 等人(2000), 见上文)。开始胱天蛋白酶或其他胱天蛋白酶成员无法对胱天蛋白酶 14 酶原进行加工。这与早前的发现一致 (Lippens 等人(2000), 见上文)。其活化仅发生于终末分化阶段 (Eckhart L.等人, (2000), 见上文)。第三，胱天蛋白酶 14 的合成仅限于成年人组织中的分化中角质形成细胞 (Eckhart L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 655-9(2000))。另外，胱天蛋白酶 14 对 ICAD 切割的能力是以与胱天蛋白酶 3 显著不同的方式受到调节的。胱天蛋白酶 14 分解 ICAD 时，需要 cosmotropic 离子的浓度非常高。在这样的离子浓度下，其他胱天蛋白酶几乎没有活性。综合来看，角质形成细胞分化程序调节胱天蛋白酶 14 的活化，因此，认为胱天蛋白酶 14 在胱天蛋白酶成员中占有特殊的位置。

ICAD/CAD 系统参与角质形成细胞的终末分化已通过体内实验得以进一步证实。免疫组织化学的研究显示，ICAD 在基底角质形成细胞至有棘角质形成细胞的核内存在，在颗粒细胞内消失，核的消失发生于终末分化之际。AD 患者的表在性表皮内，ICAD 的强免疫染色显示在斑状部位。

这些区域具有若干粗糙表面，半透明性低。PI 阳性的未消化核的集合正是共定位于这些区域中。其他区域使用抗 ICAD 抗体不被染色。另外，取自 AD 患者皮肤的胶带剥离样本显示存在完整的 ICAD 蛋白质，但是，在正常人的提取物中则没有检测出。这些结果提示 ICAD 参与了终末分化之际的脱核过程。

据报导 SCCA-1 在正常表皮几乎不表达。另一方面，在牛皮癣表皮、口腔粘膜和食道中有强表达 (Takeda A.等人, *J. Invest. Dermatol.* 118, 147-54(2002))。令人感兴趣的是，这些组织均伴有角化不全。本发明人发现，在角化不全部位可见 SCCA-1 的强染色。进一步地，SCCA-1 和 ICAD 也常常共定位于与存在核集合区域相同的部位。SCCA-1 或 ICAD 不存在于呈阴性的其他表皮表面部分，这些分子在角化不全部位的共定位提示这些分子参与抑制脱核过程。据报导在 pan-胱天蛋白酶抑制物 VAD-FMK 作用下，皮肤等价模型中的核消失殆尽(Weil 等人, 1999)。本发明人发现 VAD-FMK 是最强效的胱天蛋白酶 14 抑制物之一，这提高了胱天蛋白酶 14 恐怕是该反应的候选物质的可能性。在牛皮癣皮肤的角化不全部位内，胱天蛋白酶 14 被下调，另外不存在于口腔表皮内。在口腔表皮，核消失是以某些形式被损坏或不发生 (Lippens 等人, (2000), 见上文)。令人感兴趣的是，在这些组织内 SCCA-1 被上调。认为这些分子的异常表达也许引起包括核的持久存在在内的不完全分化。

对皮肤内的胱天蛋白酶 14 的活化机制尚不完全了解。仅对皮肤或皮肤等价模型的活化进行了观察，未进行细胞培养体系观察 (Eckhart L.等人 (2000), 见上文)。实际上，本发明人就多种条件进行了试验。这些条件包括添加血清，呈集密状态后在有钙或无钙存在下将培养时间延长至第 14 天，用钙离子载体 A23187 处理，或在空气中充分暴露 30 分钟以上调大量分化标志物。这些分化刺激诱导胱天蛋白酶 14 mRNA 显著表达，但是，对引起胱天蛋白酶 14 的活性而言不是有效的刺激 (数据未显示)。活化过程被严密地控制，在单层培养中被强烈抑制。认为层化和空气暴露对其活化是必要的。明确胱天蛋白酶 14 的活化并非通过程序性细胞死亡程序而是

通过分化程序实施调控来进行的。在终末分化过程中，包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶在内的多种蛋白酶被活化。提示胰蛋白酶样和糜蛋白酶样血清蛋白酶起到使最外侧的角化细胞脱落的作用。部分半胱氨酸蛋白酶，例如组织蛋白酶 B 和 L 在分化的角质形成细胞中被上调。提示组织蛋白酶 D、天冬氨酸蛋白酶也起到使角化细胞脱落的作用。有时这些酶参与其它分化机制例如胱天蛋白酶 14 的活化。

综上所述，本发明人自人角化细胞提取物纯化了胱天蛋白酶 14。胱天蛋白酶 14 诱导核消失，这种消失是程序性细胞死亡样的，但是，强烈提示在角质形成细胞分化的最终阶段，通过 ICAD 分解而产生可区别的变化。虽然多种程序性细胞死亡性因子共同存在于该过程，但该过程不是导致去除损伤细胞的细胞死亡过程，而是以完成主要作用为屏障功能的完整结构为目的的构成过程。胱天蛋白酶 14 或 SCCA-1 的异常表达直接影响分化程序，其结果是产生角化不全和屏障功能损坏。

2. 以皮肤角质层细胞 SCCA 的表达为指标评价皮肤性状

材料和方法

(1) 抗体

识别 SCCA-1 和 2 二者的多克隆抗体是使用自牛皮癣表皮鳞屑纯化的 SCCA (SCCA-1 和 SCCA-2) 制备的多克隆抗体。牛皮癣表皮的鳞屑提取物(提取液: 0.1M Tris-HCl (pH8.0), 0.14M NaCl)离心后, 上清用 Sephacryl S-200, DEAE Sepharose, Mono Q, Mono S, Mono P, Superose 6 进行纯化, 以此作为抗原, 以兔子作为免疫动物。

抗 SCCA-1 单克隆抗体和抗 SCCA-2 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.

(2) 免疫组织化学检查

表皮活组织检查按照 AmeX 步骤进行(Sato Y 等人, Am.J.Pathol., 125, 431-435 (1986)), 用冷丙酮固定后包埋于石蜡中。用二甲苯对切片进行脱石蜡处理, 用丙酮, 然后用 PBS 洗涤。然后, 用 10%正常山羊血清

(Histofine, Tokyo, Japan)封闭该切片的非特异性结合部位。

将表皮切片分别与抗 SCCA-1 单克隆抗体(稀释为 1:500)、如上述纯化的抗 SCCA-2 单克隆抗体(稀释为 1:500)或抗 SCCA 多克隆抗体(稀释为 1:500) 孵育。用 PBS 洗涤后, 将切片用 DAKO Envision System (DAKO Corp., CA, USA)显色后, 苏木精复染观察。

(3) ELISA

通过向皮肤表面粘贴透明胶片(セロテープ(注册商标)(NICHIBAN))后剥离的胶带剥离法, 收集皮肤角质层样本。裁断附着有皮肤角质层的胶带, 浸渍于提取缓冲液(0.1M Tris-HCl (pH8.0)、0.14M NaCl、0.1%吐温 20, 1ml)中, 超声波(20秒×4)处理后制备样本提取液。

向 96 孔 ELISA 板的每个孔分别注入 100 μ l 经 PBS 稀释的多克隆抗 SCCA 抗体(稀释为 1:1000), 室温放置过夜, 使其结合于板的固相。之后, 在封闭溶液(用 PBS-Tween 20 稀释的ブロックエース溶液、300 μ l/孔)中孵育 1 小时用以抑制与板的非特异性结合。

向 ELISA 板的各孔内加入 50 μ l 上述样本提取液, 37 $^{\circ}$ C 下反应 2 小时。加入单克隆抗 SCCA-1 抗体(稀释为 1:1000)或单克隆抗 SCCA-2 抗体(稀释为 1:1000), 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。然后, 加入二次抗体-辣根过氧化物酶标记抗小鼠, 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时, 0.1%吐温 20 PBS 清洗后, 加入底物 3', 3', 5', 5'-四甲基联苯胺(TMB), 使用 TMB 过氧化物酶 EIA 底物试剂盒(BIO-RAD 社)使其显色, 在 630 nm 处进行测定。

(4) 皮肤的经皮蒸发水分量 (TEWL) 的测定

使用 TEWAmeter(TM120)测定样本(正常人面部和内臂)的 TEWL。

结果

(1) 免疫组织化学检查

图 8 是收集自非露光部位(相对地被日光晒的机会少的部位)的上臂部位(人 24 岁), 臀部(人 46 岁), 大腿部位(人 75 岁)获得的表皮, 以及自露光部位(相对地被日光晒的机会多的部位)的颊部(人 20 岁, 76 岁), 眼睑

(人 82 岁)获得的表皮作为表皮样本,使用与 SCCA-1 和 SCCA-2 二者结合的抗 SCCA 多克隆抗体作为抗体,进行显微镜观察的结果。根据图 8,表明了与非露光部位相比,暴露于紫外线等较严酷环境下经常被晒的露光部位的表皮上层中 SCCA 显著增强。

图 9 显示了正常表皮上层(50 岁男性)和罹患牛皮癣的表皮上层的 SCCA-1 和 2 的表达。如图所示,正常皮肤中的 SCCA-1 和 2 均仅显示弱表达,相反,作为炎症性角化不全症的牛皮癣的患病皮肤中,SCCA-1 和 2 均显著表达。

以上显示,与正常皮肤角质层相比,露光部位或发生角化不全的皮肤部位中 SCCA 的表达显著增强。

(2) ELISA

1) 正常皮肤角质层中的 SCCA 表达量

通过实施胶带剥离分别收集显示正常皮肤性状的露光部位的皮肤(面部和颊部)和非露光部位的皮肤(内臂)的角质层,通过 ELISA 测定 SCCA-1 和 SCCA-2 的表达量。其结果如图 10 所示。

与非露光部位相比,露光部位的 SCCA-1 和 2 的表达显著增强。因此,通过 ELISA 法,将虽然显示出正常的性状,但是经常暴露于严酷环境的露光部位的表皮上层与非露光部位相比,可以定量地确定出前者的 SCCA,特别地 SCCA-1 显著增强。

2) 牛皮癣皮肤角质层中的 SCCA 表达量

通过实施胶带剥离分别收集显示正常皮肤性状的个体的皮肤(非露光部位:内臂)和牛皮癣患者的皮肤的角质层,通过 ELISA 测定 SCCA-1 和 SCCA-2 的表达量。作为牛皮癣患者的皮肤部位,对伴有痒的被疹部位、不伴有痒的被疹部位、以及无疹部位进行了试验,其结果如图 11 所示。

正常个体的皮肤角质层中几乎没有观察到 SCCA-1 和-2 表达,与之相反,在牛皮癣患者的被疹患部的角质层中,不论是否伴有痒,均观察到 SCCA-1 和-2 的表达显著增强。另外,即使是牛皮癣患者,在无牛皮癣症状的皮肤部位(无疹部)中,几乎不能观察到 SCCA-1 和-2 的表达。

3) 特应性皮炎皮肤角质层的 SCCA 表达量

通过实施胶带剥离分别收集显示正常皮肤性状的个体的皮肤（非露光部位：内臂）和特应性皮炎患者的皮肤的角质层，通过 ELISA 测定 SCCA-1 和 SCCA-2 的表达量。作为特应性皮炎患者的皮肤部位，对被疹部位和无疹部位进行了试验，其结果如图 12 所示。

正常个体的皮肤角质层中几乎没有观察到 SCCA-1 和-2 表达，特应性皮炎患者患部的角质层中，不论是被疹部位还是无疹部位，观察到 SCCA-1 和-2 的表达显著增强。因此，在特应性皮炎的情况时，即使在特应性皮炎发病前，也可以以 SCCA-1 和/或-2 为指标对该疾病进行诊断。因此，如果以 SCCA 作指标，可以判定是否易患特应性皮炎，使预防或早期（例如发病前）处理成为可能。

4) SCCA 表达量和经皮蒸发水分量（TEWL）之间的相关性

通过 ELISA 对皮肤角质层的 SCCA 表达量进行测定之外，还调查了作为皮肤生理参数的 TEWL、SCCA 表达量与 TEWL 之间的相关性。该结果如图 12 所示。SCCA-1 与 TEWL 之间的 Pearson 相关系数为 0.876、SCCA-2 与 TEWL 之间的 Pearson 相关系数为 0.600，认为均显著相关，因此，明确了 TEWL 升高、皮肤性状较为不好时，SCCA-1 和-2、特别地 SCCA-1 的表达量升高。

5) 花粉病皮肤角质层中的 SCCA 表达量

通过实施胶带剥离分别收集显示正常皮肤性状的个体的皮肤（对照）和花粉病引起的皮肤粗糙患者的皮肤的角质层，调查了花粉病皮肤的皮肤粗糙和 TEWL 之间的关系之外，还通过 ELISA 对花粉病皮肤中的皮肤粗糙和 SCCA-1 的表达量进行了测定。选择内臂（非露光部）和额（露光部）作为皮肤部位。

图 14 显示了花粉病皮肤中的皮肤粗糙和 TEWL 之间的关系（A），以及与 SCCA1 表达量之间的关系（B）。自该图可明确花粉病引起 TEWL 显著上升，皮肤屏障功能降低、变为皮肤粗糙状态的皮肤与正常个体的皮肤相比较，SCCA-1 的表达显著增强。因此，明确了 SCCA-1 成为花粉病

引起的皮肤粗糙的指标。另外，花粉病皮肤中，在无日光照射的内臂仍存在 TEWL 恶化，即认为屏障功能降低，提示全身的炎症反应和 SCCA 增强使身体的屏障功能恶化。图 15 显示了花粉病皮肤中，皮肤粗糙的皮肤和 SCCA-1 表达增强之间的相关关系。SCCA-1 与 TEWL 之间的 Pearson 相关系数为 0.8086，认为显著相关。因此，明确了花粉病引起的皮肤屏障功能降低，即随着皮肤粗糙状态恶化，SCCA-1 的表达量增高。

因此，即使在皮肤粗糙发病前，如果以 SCCA 作指标，也可以判定是否易患花粉病引起的皮肤粗糙，使其预防和早期（例如发病前）处理成为可能。另外，花粉病皮肤存在角化不全的发生是全新的发现，SCCA 是花粉病皮肤的屏障功能恶化或角化不全的起因值得注意。

<110> 株式会社资生堂	
<120> 以鳞状上皮细胞癌抗原为指标的皮肤性状的评价方法	
<130> SSD-S628	
<150> JP 2005-080533	
<151> 2005-03-18	
<160> 2	
<210> 1	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 正向引物	
<400> 1	
aaggatccaa tccgcggtct ttggaagagg ag	32
<210> 2	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 反向引物	
<400> 2	
tttctgcagg ttgcagatac agccgtttcc ggagggtgc	39

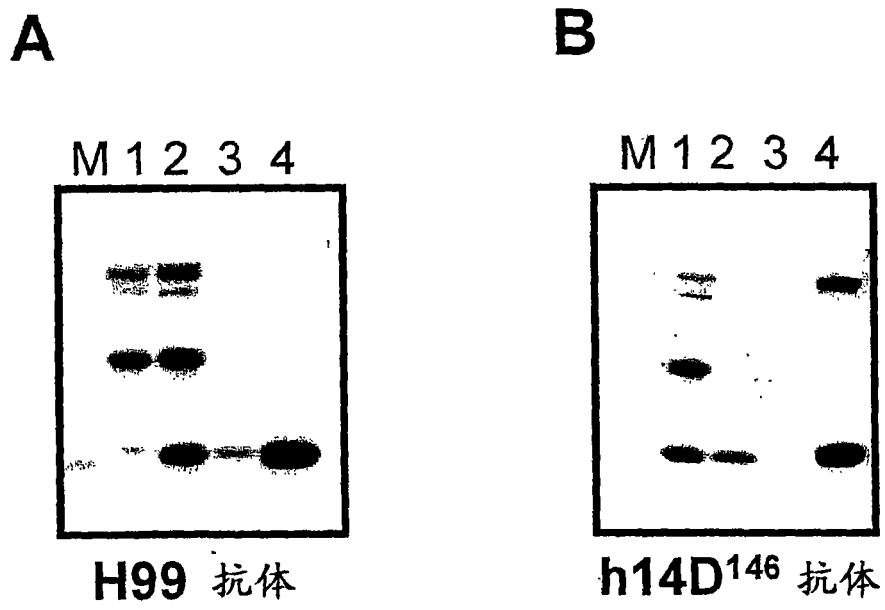


图 1

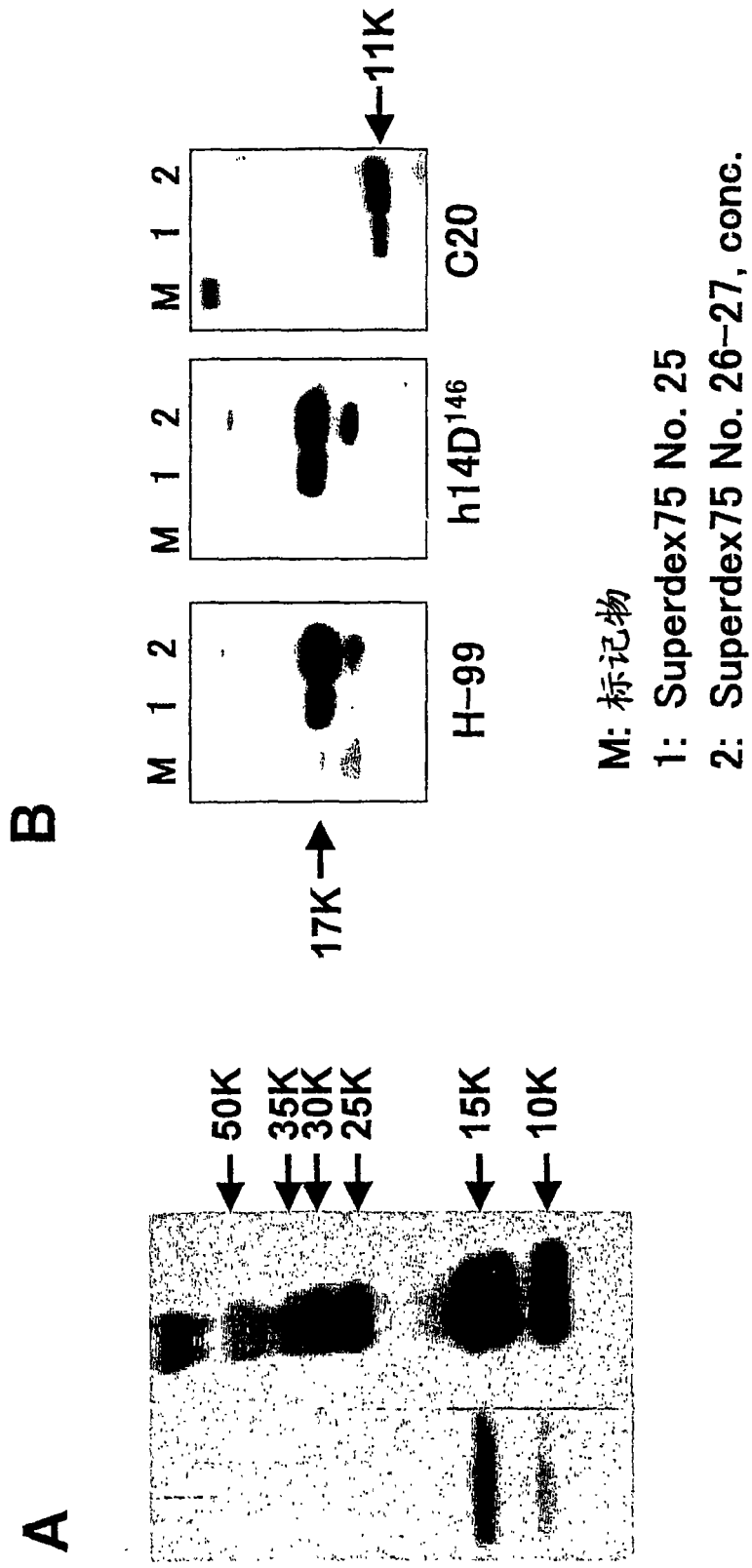


图 2

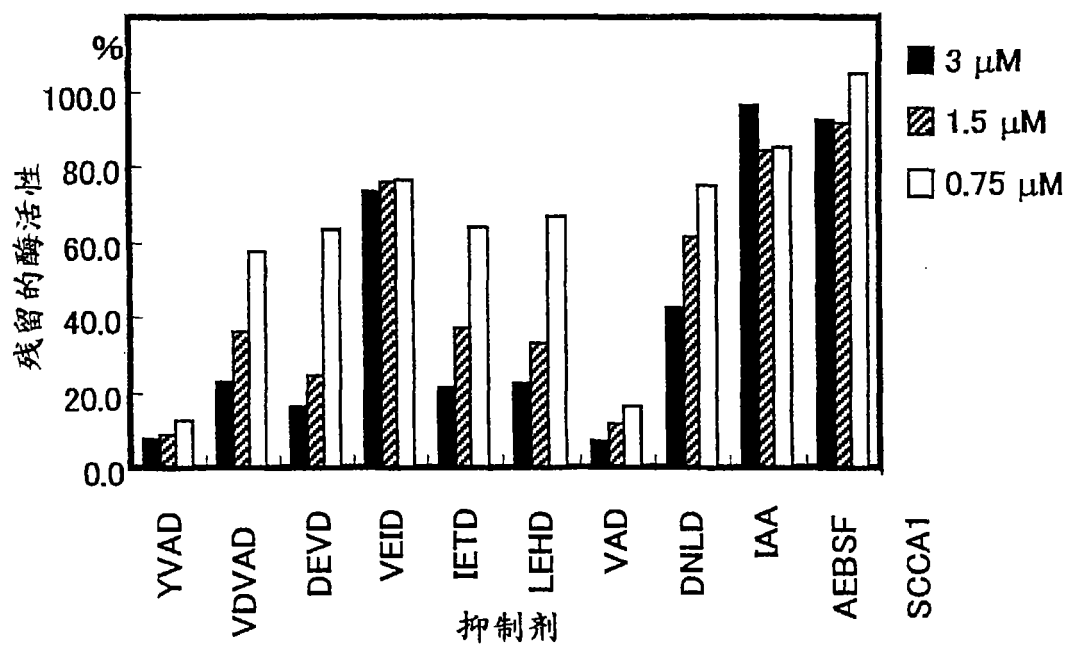


图 3

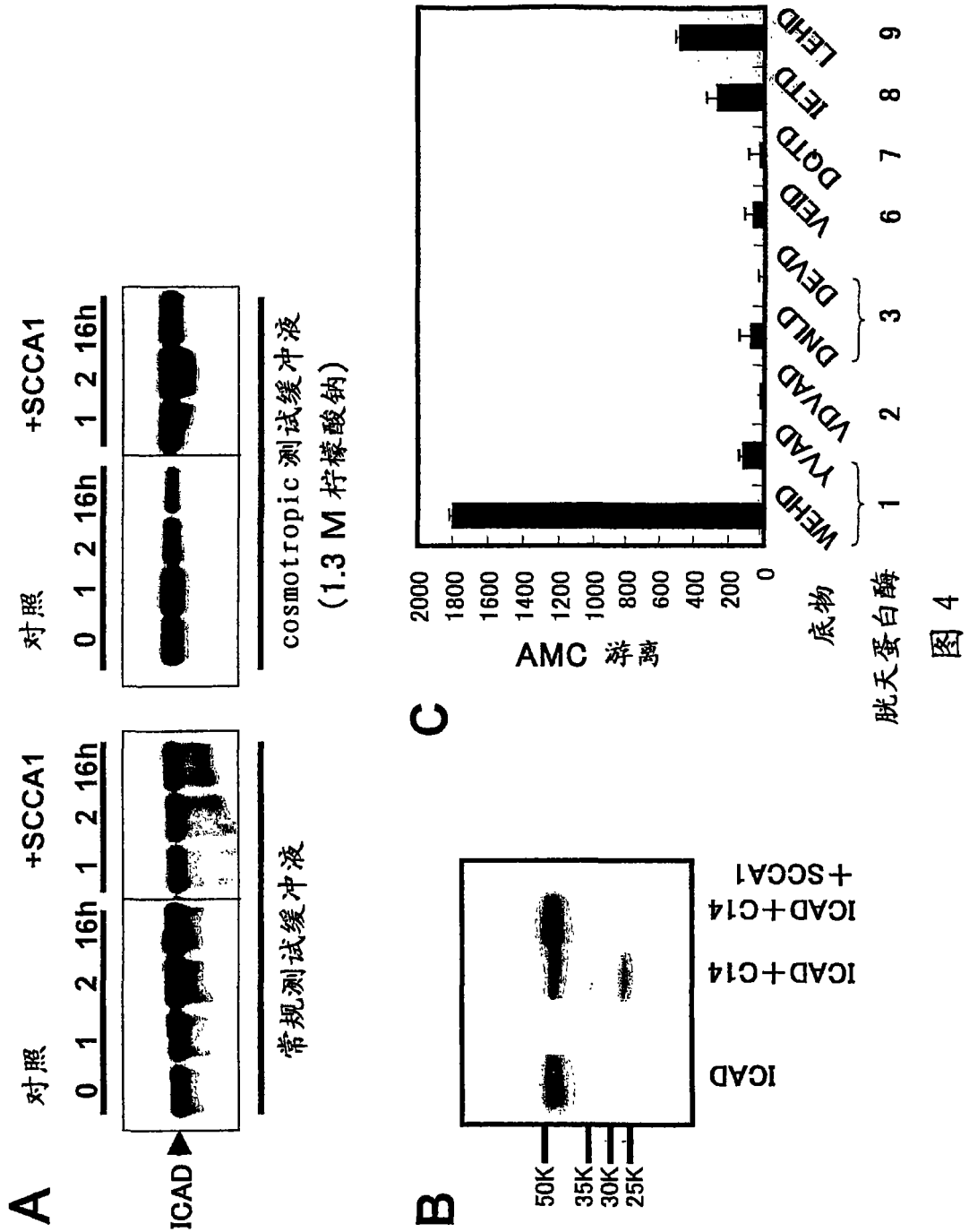


图 4

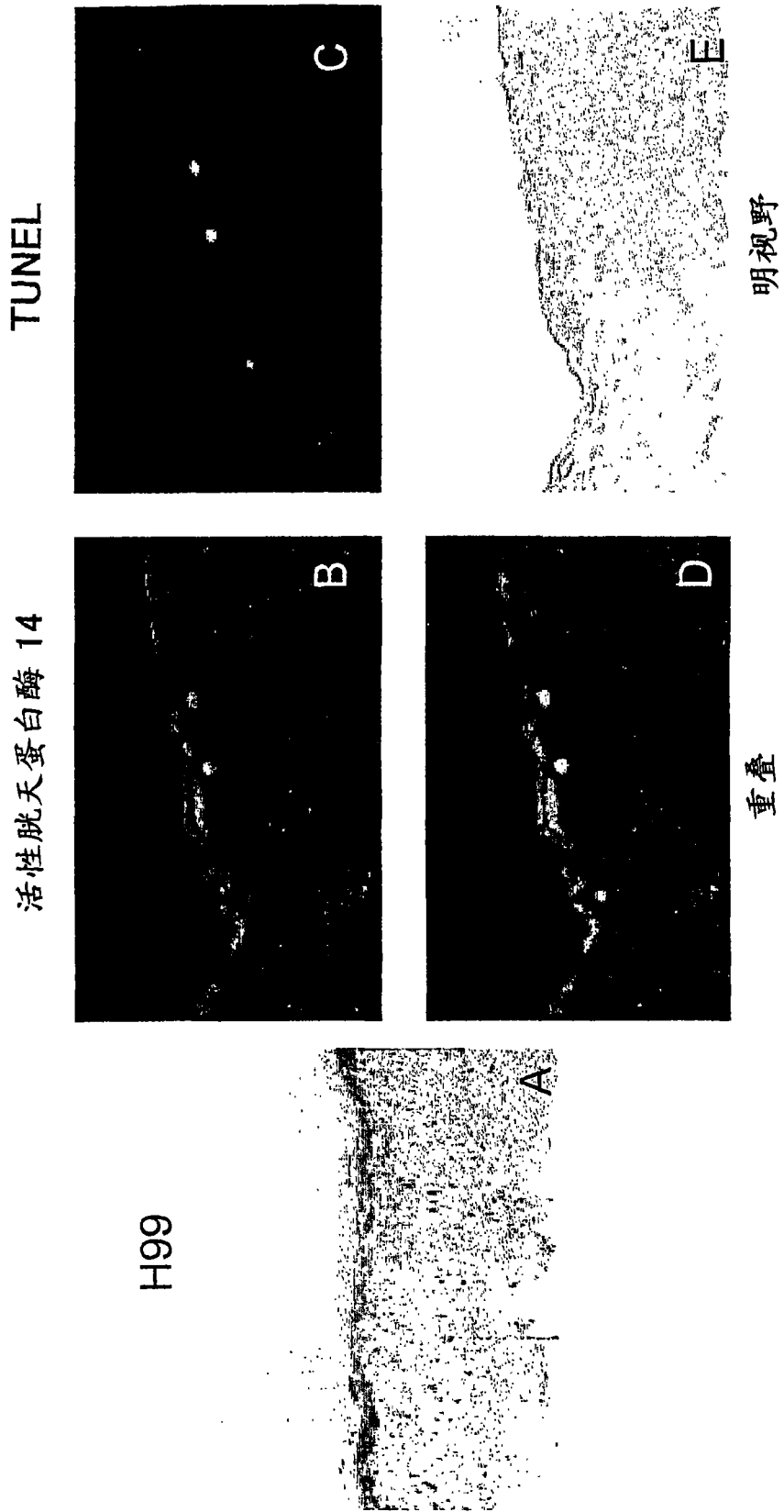


图 5

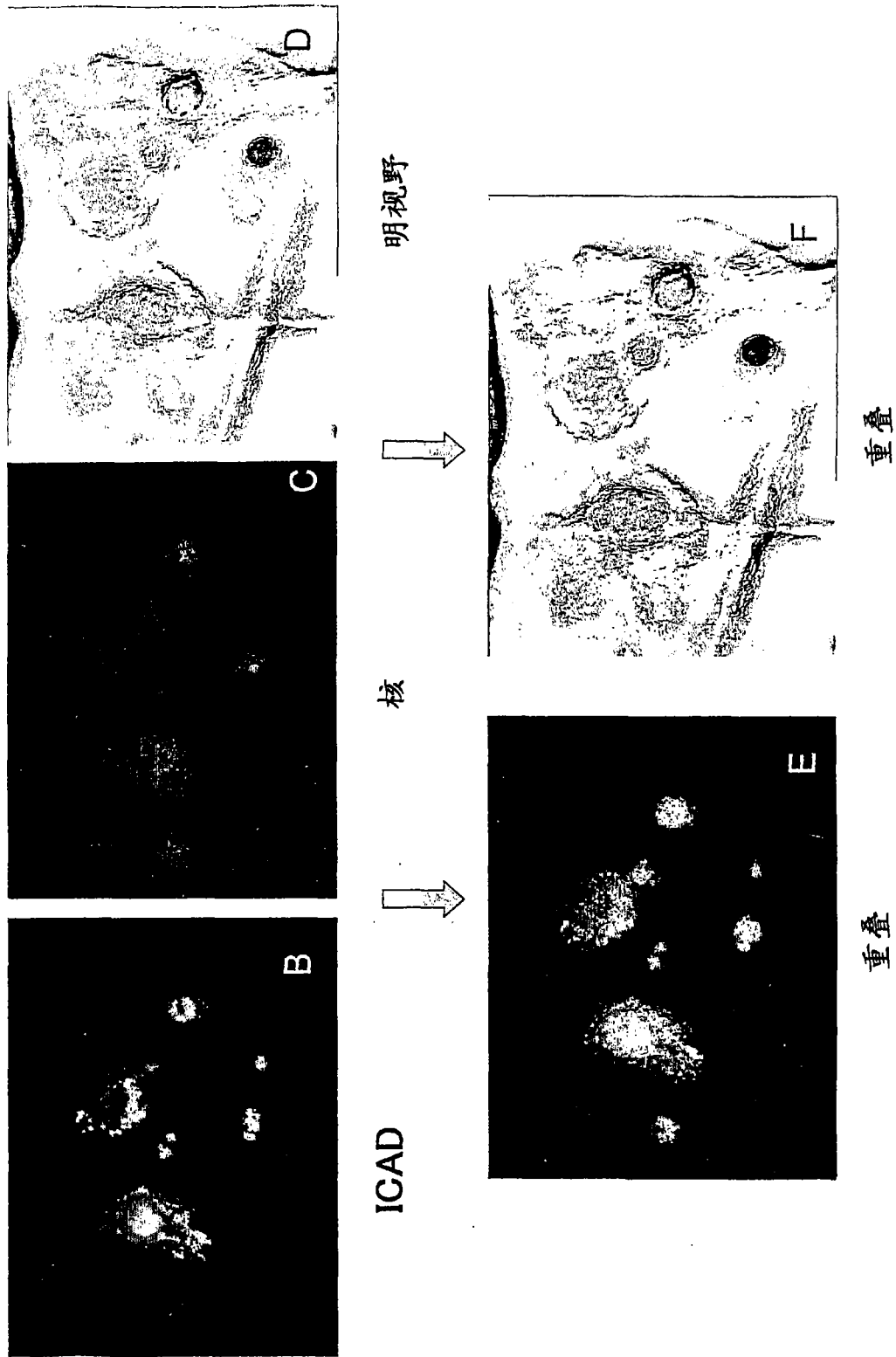


图 6

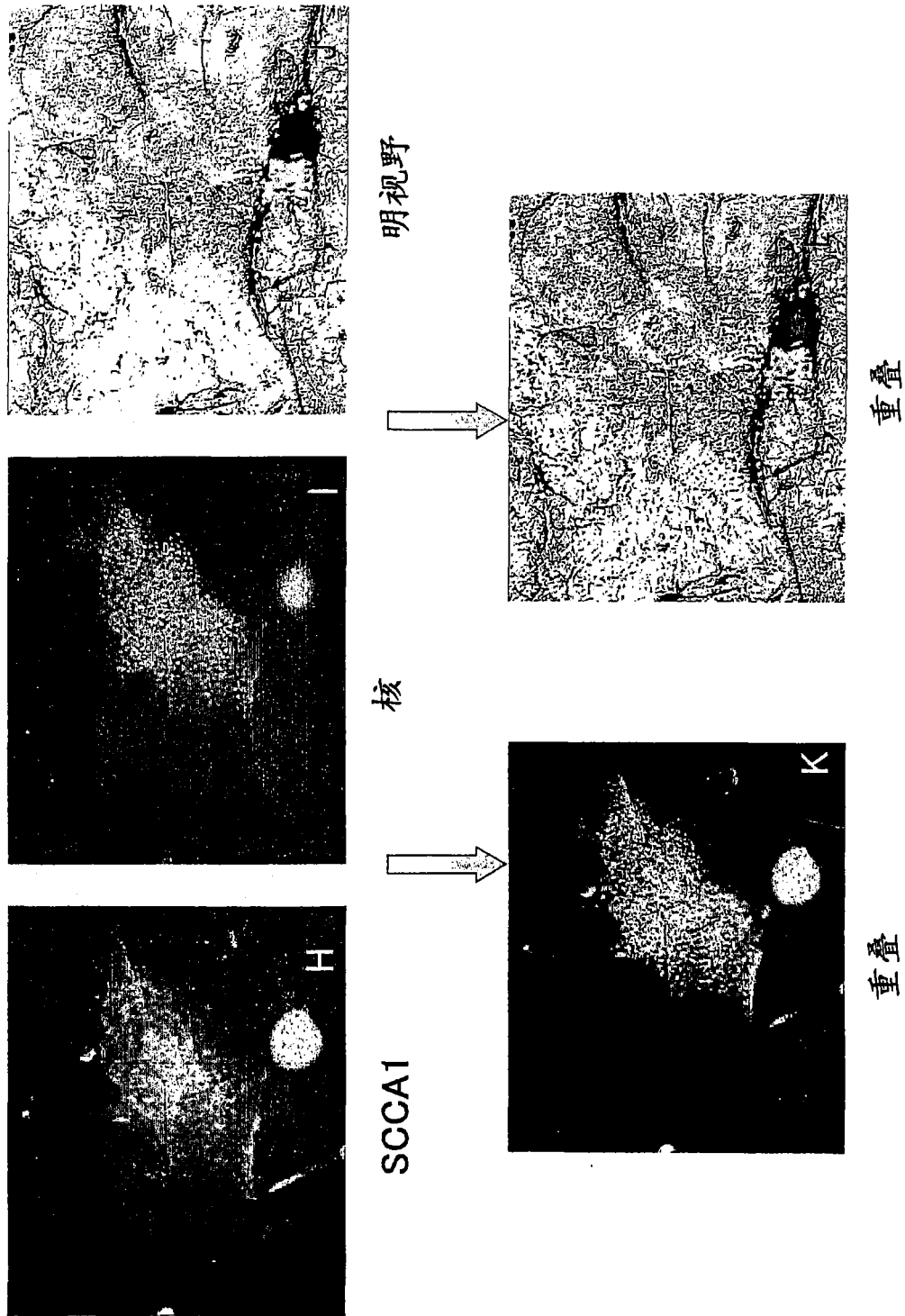


图7

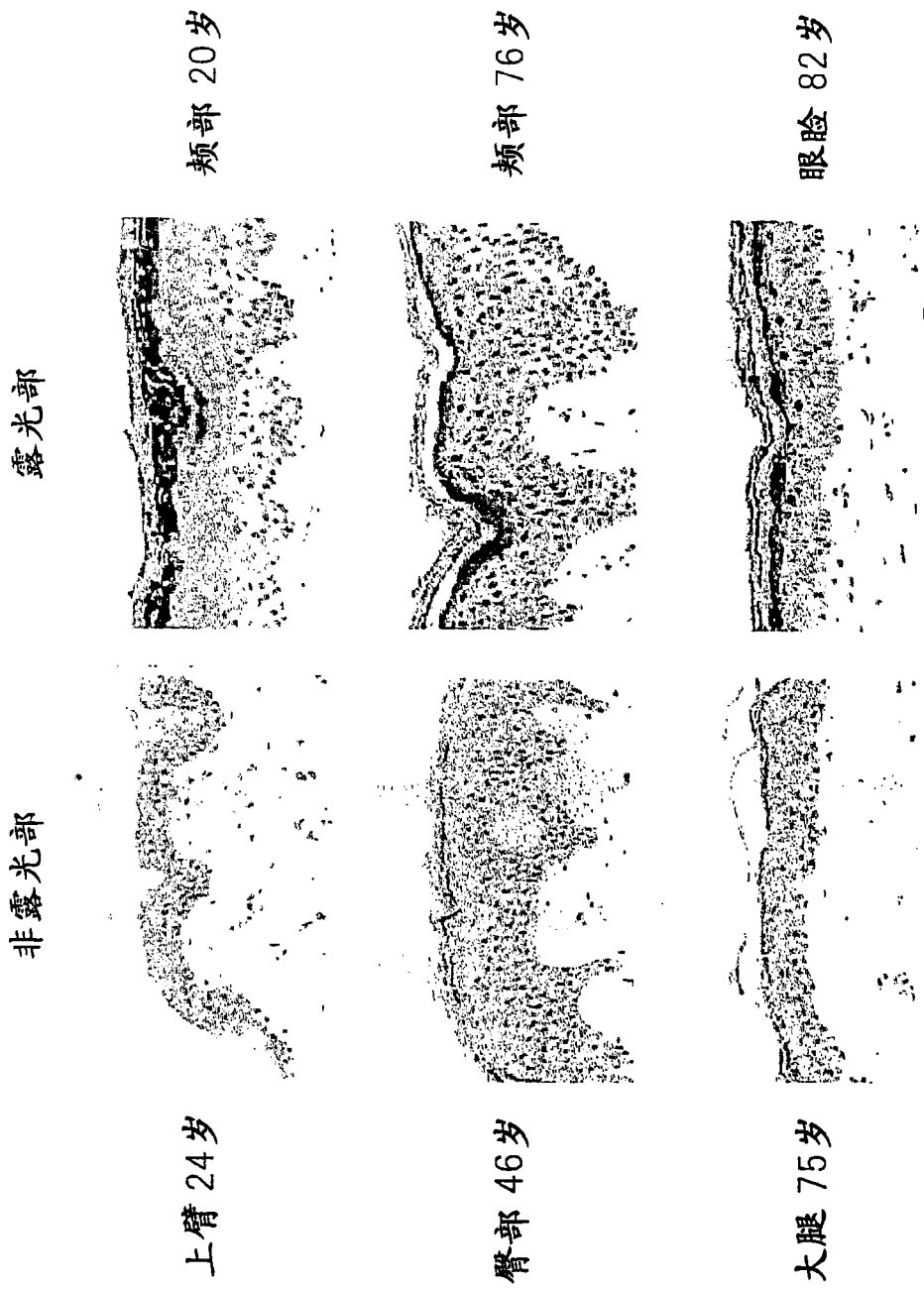


图 8

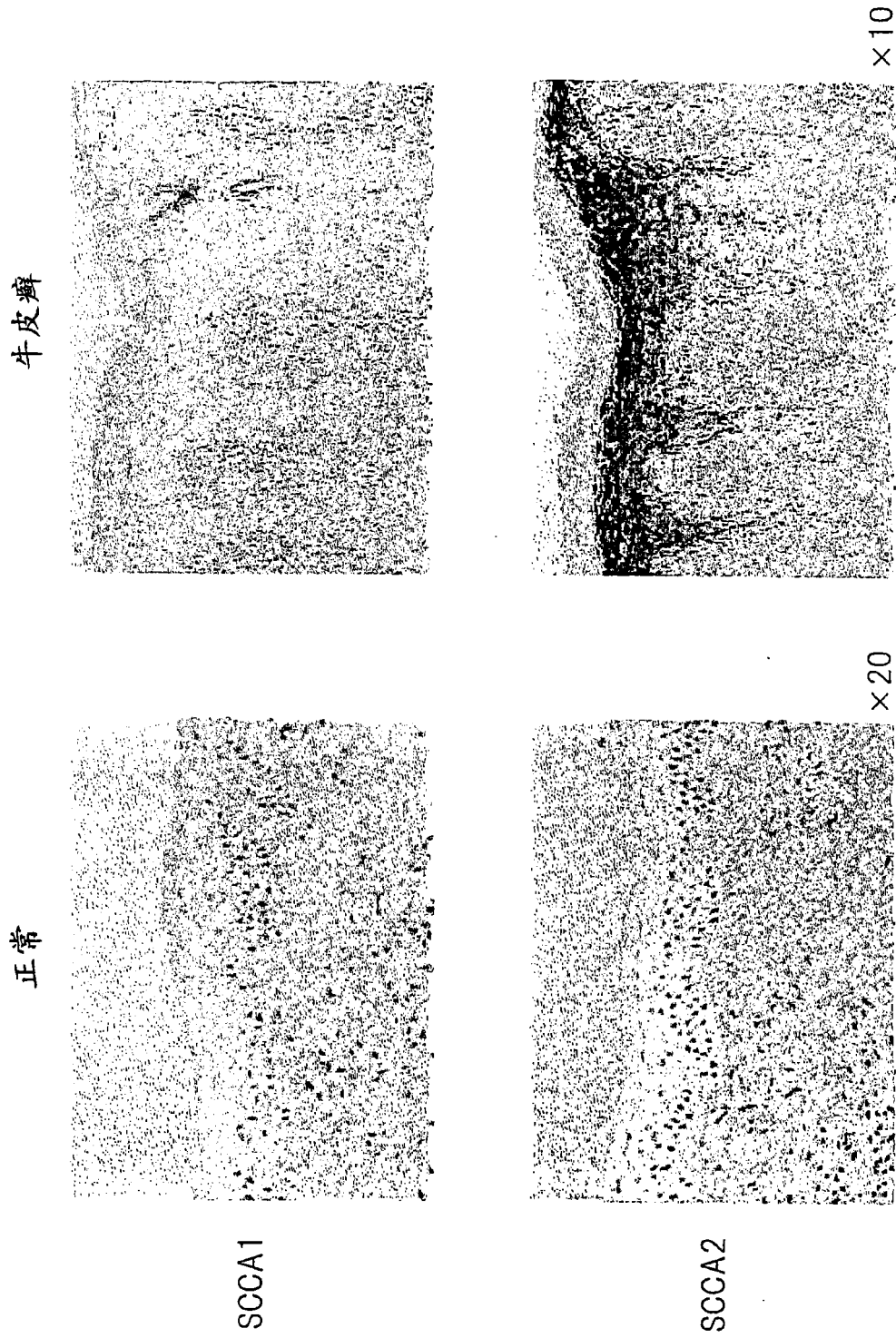


图 9

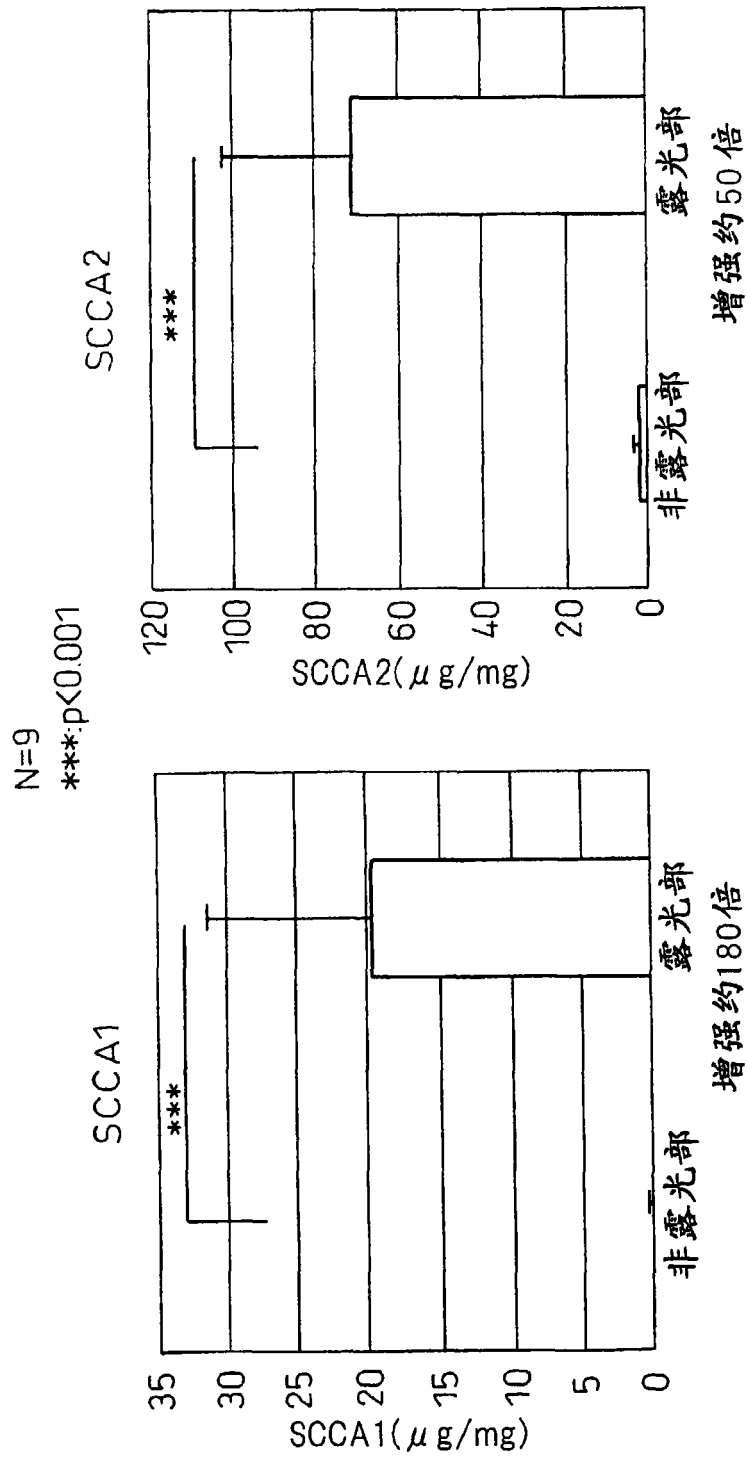


图 10

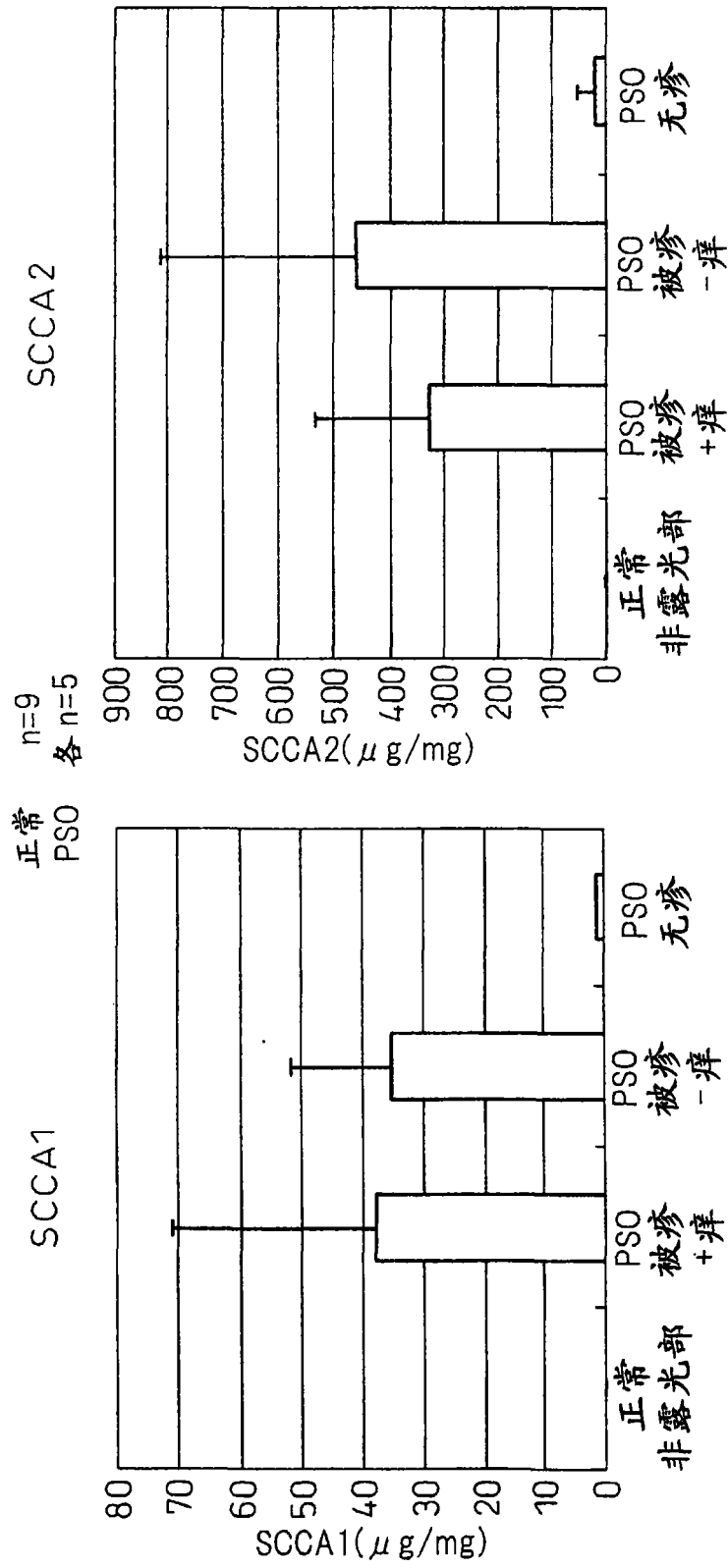


图 11

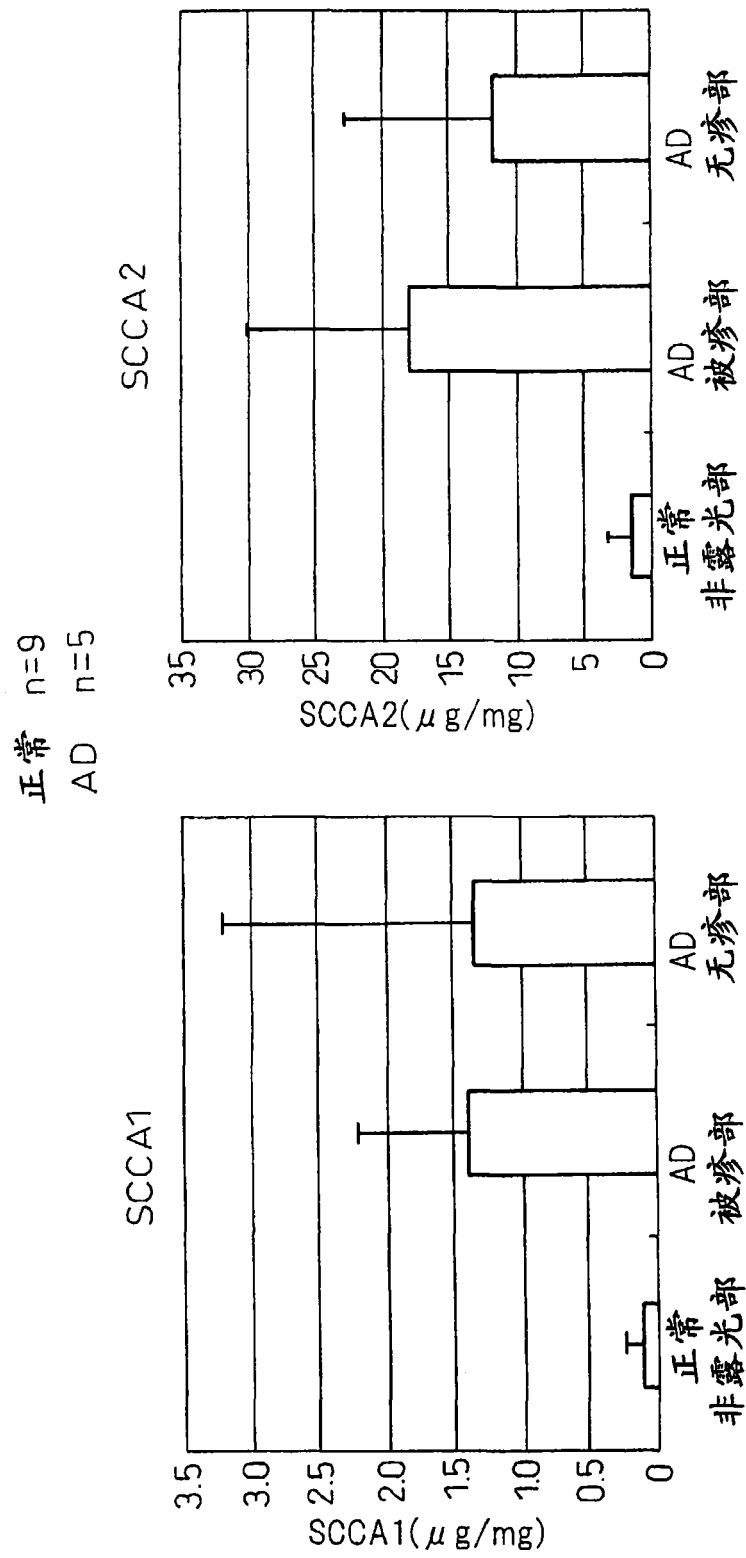


图 12

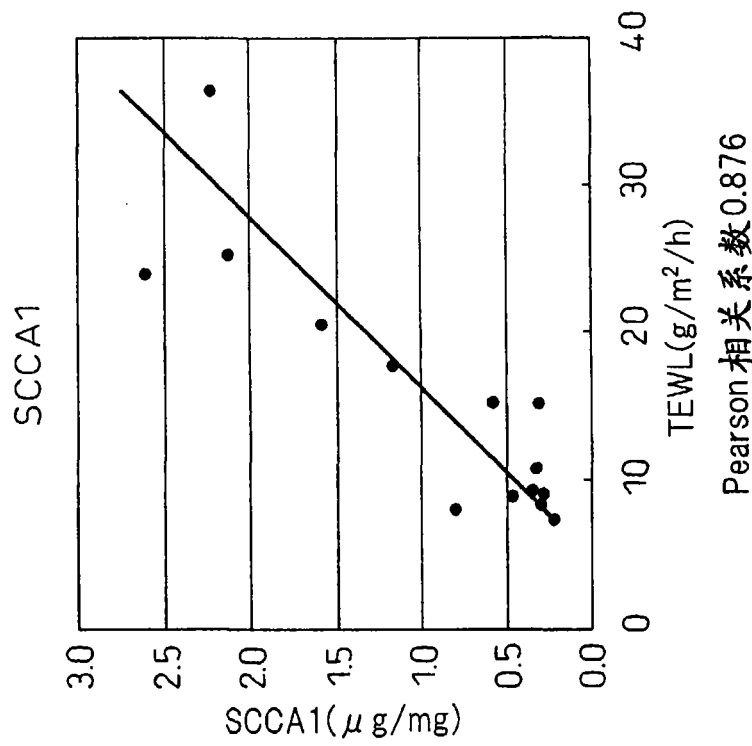
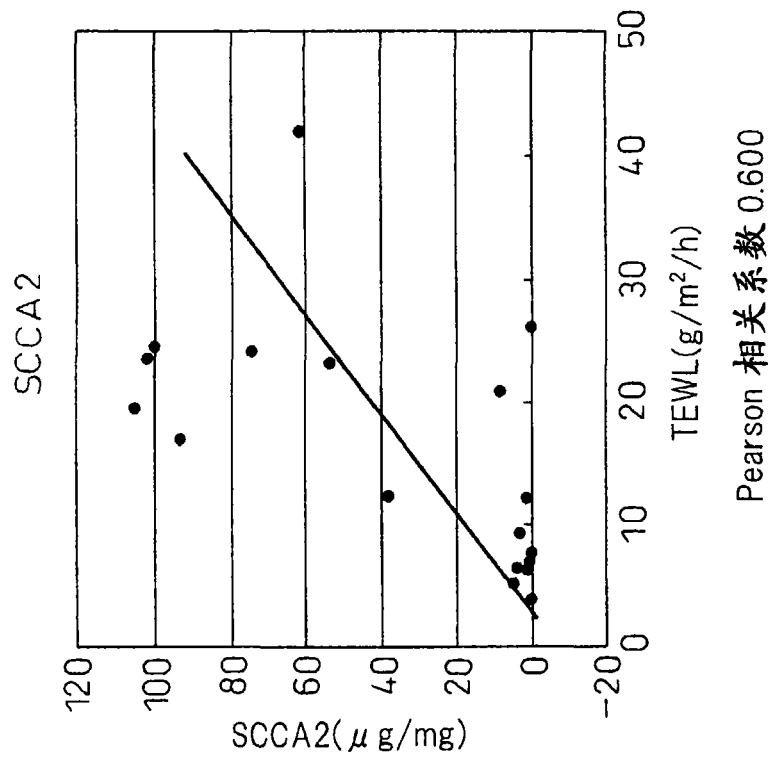


图 13

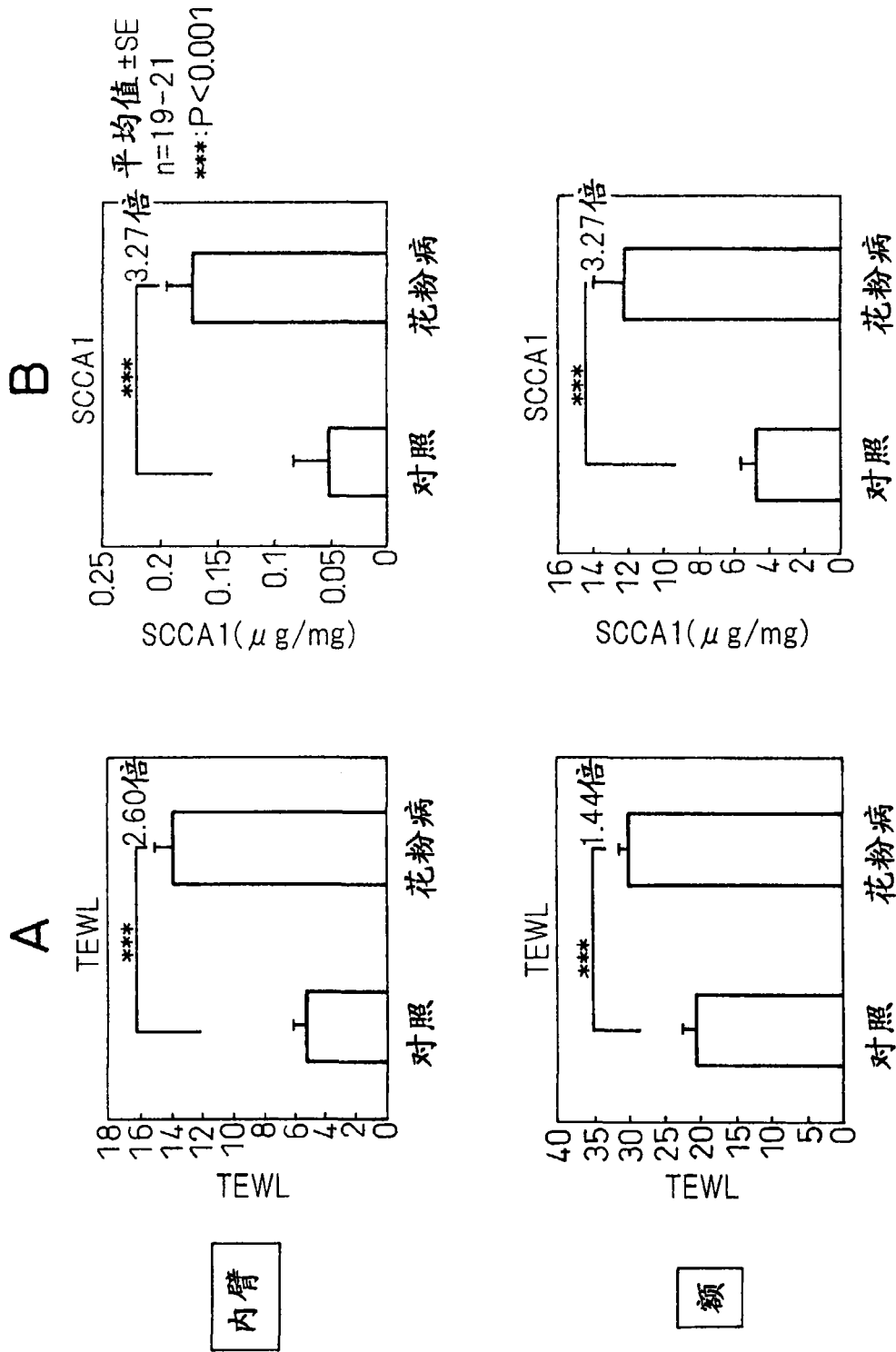


图 14

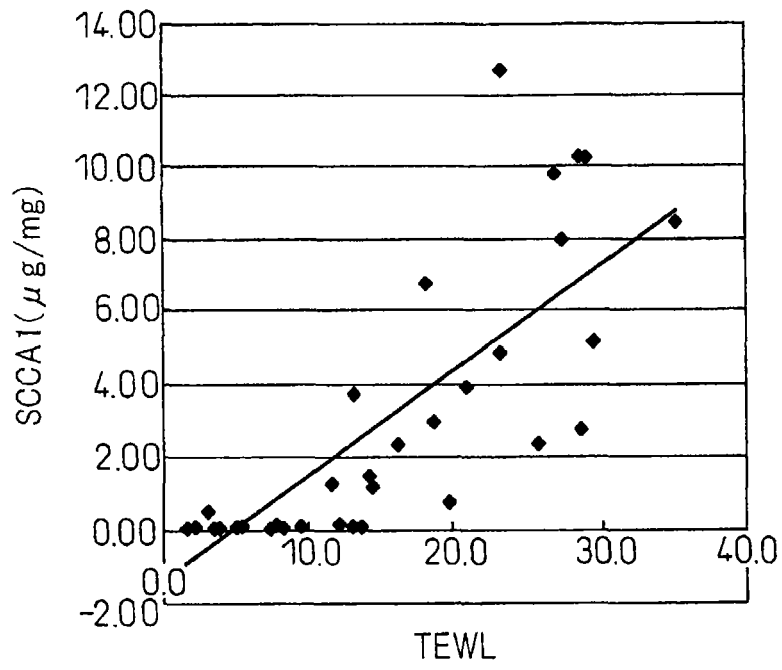


图 15

专利名称(译)	以鳞状上皮细胞癌抗原为指标的皮肤性状的评价方法		
公开(公告)号	CN101142483A	公开(公告)日	2008-03-12
申请号	CN200680008624.1	申请日	2006-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
[标]发明人	片桐千华 仲西城太郎 日比野利彦		
发明人	片桐千华 仲西城太郎 日比野利彦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/577 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6881 G01N2800/202 G01N2800/40 G01N33/5091 G01N33/5005 G01N33/53 G01N2800/20 G01N2800/205 G01N2800/24		
优先权	2005080533 2005-03-18 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了以皮肤角质层细胞的鳞状上皮细胞癌抗原(SCCA)的表达为指标的皮肤性状的评价方法。

