

紫外线 A 对人视网膜色素上皮细胞渗透压小分子物质转运的影响

伍大洋¹, 张劲松²

作者单位:¹(121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科;²(110005) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院眼科中心

作者简介:伍大洋, 博士, 住院医师, 研究方向: 白内障的发病机制。

通讯作者:伍大洋. wudayang2013@163.com

收稿日期: 2013-12-12 修回日期: 2014-03-14

Influence of ultraviolet A radiation on osmolytes transport in human retinal pigment epithelial cells

Da-Yang Wu¹, Jin-Song Zhang²

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Eye Center of the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China

Correspondence to: Da-Yang Wu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. wudayang2013@163.com

Received: 2013-12-12 Accepted: 2014-03-14

Abstract

• **AIM:** To demonstrate that ultraviolet A (UVA) induces osmolytes accumulation in retinal pigment epithelial (RPE) cells.

• **METHODS:** Under different experimental conditions such as UVA exposure, hyperosmotic stress condition and hypoosmotic stress condition, RPE cells were cultured for different time periods. The betaine / γ -amino-n-butyrac acid (GABA) transporter, the sodium-dependent myoinositol transporter and the taurine transporter (TAUT) mRNA were measured by quantitative PCR. The radioactive labeled osmolytes were measured to evaluate the level of osmolytes transportation.

• **RESULTS:** This study demonstrated that RPE expressed mRNA specific for the betaine/GABA transporter, for the sodium-dependent myoinositol transporter and for the TAUT. In comparison to norm osmotic (300mosmol/L) controls, a 3-5-fold induction of mRNA expression for the betaine/GABA transporter, the sodium-dependent myoinositol transporter and the TAUT was observed within 6-24h after hyperosmotic exposure (400mosmol/L). Expression of osmolyte transporters was associated with an increased uptake of radioactive labeled osmolytes. Conversely, hypoosmotic

(200mosmol/L) stimulation induced significant efflux of these osmolytes. UVA significantly stimulated osmolyte uptake. Increased osmolyte uptake was associated with upregulation of mRNA steady-state levels for osmolyte transporters in irradiated cells.

• **CONCLUSION:** UVA induces osmolyte uptake in RPE. It is similar reaction to hyperosmotic stress. This suggests that osmolyte uptake response by UVA may be important to maintain homeostasis.

• **KEYWORDS:** ultraviolet A; hyperosmotic stress; osmolytes; retinal pigment epithelial

Citation: Wu DY, Zhang JS. Influence of ultraviolet A radiation on osmolytes transport in human retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(4):599-602

摘要

目的: 紫外线 A 是否引发渗透压小分子物质向视网膜色素上皮细胞内积聚。

方法: 视网膜色素上皮细胞经紫外线 A 照射、高渗和低渗培养后不同时间点, 通过定量 PCR 方法测定甜菜碱/ γ -氨基丁酸转运蛋白, 钠依赖式肌醇转运蛋白和牛磺酸转运蛋白 mRNA 的表达水平, 通过放射性同位素标识的渗透压小分子物质测量渗透压小分子物质在不同实验条件下的细胞内外转运过程。

结果: 本研究证明视网膜色素上皮细胞表达甜菜碱/ γ -氨基丁酸转运蛋白, 钠依赖式肌醇转运蛋白和牛磺酸转运蛋白 mRNA。高渗 (400mosmol/L) 相对于等渗 (300mosmol/L) 引发甜菜碱/ γ -氨基丁酸转运蛋白、钠依赖式肌醇转运蛋白和牛磺酸转运蛋白的 mRNA 升高约 3~5 倍。高渗同时引发放射性同位素标记的渗透压小分子物质细胞内积聚。相反, 低渗 (200mosmol/L) 引发渗透压小分子物质外流至细胞外。紫外线 A 照射明显引发渗透压小分子物质向细胞内摄入。与此同时, 紫外线 A 照射还引发细胞膜相应转运蛋白的 mRNA 的上调。

结论: 本实验表明紫外线 A 可以引发与高渗相类似的渗透压小分子物质的细胞内积聚效应, 这种效应对保持细胞内稳态有重要作用。

关键词: 紫外线 A 高渗; 渗透压; 小分子物质; 视网膜色素上皮细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.04.06

引用: 伍大洋, 张劲松. 紫外线 A 对人视网膜色素上皮细胞渗透压小分子物质转运的影响. 国际眼科杂志 2014; 14(4): 599-602

0 引言

渗透压小分子物质包括甜菜碱、肌醇和牛磺酸。目前认为,这类小分子物质不带电荷,并且可以抵抗渗透压引起的一系列细胞损伤。高渗可以使细胞缩小,细胞内带电离子强度过大,氧自由基上调等。渗透压小分子物质与细胞内带电离子如钠离子、钾离子等相互交换,使细胞内渗透压保持稳定,又不会使细胞内离子强度过大,保持细胞内大分子功能蛋白的结构和生物活性,避免细胞DNA断裂^[1]。人们发现,高渗可以使渗透压小分子物质快速积聚于细胞内,相反,低渗使渗透压小分子物质由细胞内流出至细胞外。这种变化伴随着相应的细胞膜上的转运蛋白的上调。转运甜菜碱、肌醇和牛磺酸的细胞膜转运蛋白分别是甜菜碱/ γ -氨基丁酸转运蛋白(BGT-1),钠依赖式肌醇转运蛋白(SMIT)和牛磺酸转运蛋白(TAUT)。紫外线照射与高渗具有相似的细胞内信号转导通路和渗透压小分子物质细胞内外转运现象。我们通过本次研究揭示了视网膜色素上皮细胞可以利用渗透压小分子物质来维持细胞体积动态平衡,并且渗透压小分子物质可以对紫外线做出相应的主动防御性的保护反应。

1 材料和方法

1.1 材料

视网膜色素上皮细胞 ARPE-19(美国 ATCC), RNA 提取试剂盒(天根), [¹⁴C] 甜菜碱、[³H] 牛磺酸、[³H] 肌醇等放射性物质(美国 Sigma)。转运蛋白基因表达水平由 SYBR Green PCR 和 Gene Amp 5700 序列检测试剂盒检测。

1.2 方法

细胞培养:

ARPE-19 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 50U/mL 青霉素, 200mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 放置于温度为 37℃, 含 5% CO₂ 的培养箱中。通过培养液中氯化钠浓度的变化来改变渗透压。有实验表明^[2], 渗透压小分子物质的转运主要取决于渗透压的改变, 而不是由改变渗透压的物质是氯化钠还是棉子糖。这表明渗透压小分子物质转运是由渗透压本身, 而不是钠离子浓度或氯离子浓度。紫外线照射: 培养液首先经 PBS 替换, 再经 UVA 照射, 照射距离 30cm, 强度 30J/cm², 波长为 365nm。阴性对照组, 细胞不经 UVA 照射。定量 Real-time PCR: ARPE-19 总 RNA 通过总 RNA 提取试剂盒, 并反转录至 cDNA 第一链。引物设计如下: TAUT: 5'-AAAGCTGTGACAATGATGCCG-3' 和 5'-CCAGTCCAA GCAAGAGAAGCA-3', BGT-1: 5'-AACAGTGCCACCAGC TTTGTG-3' 和 5'-ACTCGGCCACTTCAGAAATGG-3', SMIT: 5'-TCAACCACATCATTCCCAACG-3' 和 5'-TGCTG TCTTCAGATTTCCCGT-3', HPRT: 5'-AAGATGGTCAAGG TCGCAAGC-3' 和 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'。

PCR 条件如下:

50℃ 2min, 95℃ 10min 为一循环。95℃ 15s 60℃ 1min 40 次循环, 样品量分别为 25 μ L。甜菜碱、肌醇和牛磺酸的摄入: ARPE-19 在无血清的培养液中在指定渗透压的条件下培养 16h。然后, 细胞被内含 [¹⁴C] 甜菜碱 (48.1Ci/mmol), [³H] 牛磺酸 (24Ci/mmol) 或 [³H] 肌醇 (22.3Ci/mmol) 的培养液培养。之后, 细胞经含 pH 7.4 的 10mmol/L Tris-HEPES, 300mmol/L 甘露醇, 300mmol/L 氯化钠的冰冷却反应终止液漂洗 3 次。最后, 细胞放置于空气中干燥, 细胞溶解等分后用于液体闪烁计数及蛋白测定。甜菜碱、肌醇和牛磺酸的外流: ARPE-19 培养于含 10 μ m [¹⁴C] 甜菜碱, [³H] 牛磺酸或 [³H] 肌醇无

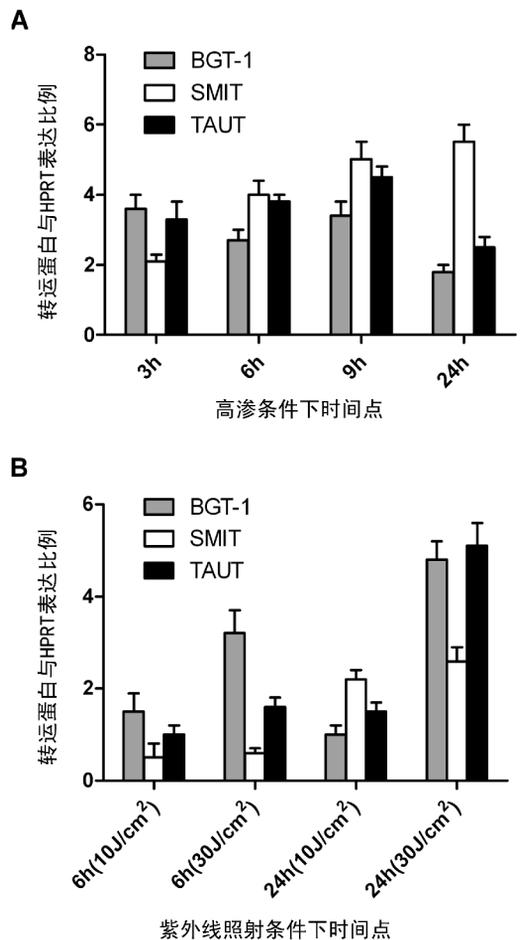


图1 视网膜色素上皮细胞中 BGT-1、SMIT 和 TAUT 的表达 A: RPE 经高渗或等渗培养液培育不同时间。渗透压的改变是通过向培养液中添加氯化钠; B: RPE 经 UVA 照射后分别培养 6 和 24h, 结果是用转运蛋白的 mRNA 表达水平是 HPRT 的 mRNA 表达水平的比值倍数表示的。

血清培养基中。细胞用 PBS 漂洗。经 UVA 照射后, 细胞培养于不含渗透压小分子物质的培养基中。收集细胞裂解液后, 通过闪烁计数法测量放射性小分子物质的放射性。放射性小分子物质外流的多少是由细胞裂解液及上清液中的放射活性占总放射活性的比例来表示的。

统计学分析: 数据统计用 SPSS 19.0 软件分析, 经 *t* 检验, *P* < 0.05 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 ARPE-19 细胞 BGT-1, SMIT 和 TAUT 的 mRNA 的表达

Real-time RT-PCR 分析得出, 在等渗条件下, BGT-1、SMIT 和 TAUT mRNA 的表达分别是 (0.1 ± 0.1, 3.7 ± 0.2 和 0.1 ± 0.1 mRNA/HPRT mRNA)。高渗 (400 mosmol/L) 条件下, ARPE 表达 BGT-1、SMIT 和 TAUT mRNA 水平上调 3 ~ 5 倍。高渗诱导 9h 后, SMIT 和 TAUT mRNA 表达达到峰值。高渗诱导 3h 后, BGT-1 mRNA 表达达到峰值 (图 1)。

2.2 ARPE-19 细胞渗透压小分子物质的转运

高渗诱导的视网膜色素上皮细胞的渗透压小分子物质转运蛋白 mRNA 的表达是通过测量细胞摄入放射性同位素的多少来测定的。在等渗 (300 mosmol/L) 条件下, ARPE-19 摄取甜菜碱、肌醇和牛磺酸的能力维持在很低的水平 (表 1)。在此条件下, 经过 2h 的细胞培养, 牛磺酸的摄取分别是

表1 ARPE-19 细胞内外渗透压小分子物质的转运 ($\bar{x} \pm s$, nmol/mg)

实验条件	甜菜碱	肌醇	牛磺酸
300 mosmol/L	1.4±0.1	1.6±0.1	3.7±0.2
400 mosmol/L	2.2±0.4	2.7±0.1	8.4±2.1
300 mosmol/L+10J/cm ² UVA	1.4±0.1	1.7±0.2	3.8±0.3
300 mosmol/L+30J/cm ² UVA	2.3±0.5	3.7±0.2	7.1±0.2

表2 紫外线 A 和低渗透压 ARPE-19 细胞渗透压小分子物质外流占总放射活性百分数 ($\bar{x} \pm s$, %)

实验条件	甜菜碱		肌醇		牛磺酸	
	5min	60min	5min	60min	5min	60min
300 mosmol/L	18±1	33±2	11±2	14±3	15±1	23±3
200 mosmol/L	43±4	67±6	14±1	28±3	53±7	75±6
300 mosmol/L+30J/cm ² UVA	27±3	39±3	16±3	18±4	17±4	27±5

甜菜碱和肌醇的 2.5 倍和 2.1 倍。培养于低渗、等渗以及高渗的溶液中 16h 的 ARPE-19, 随后再浸浴在包含 100mmol/L 的甜菜碱、肌醇和牛磺酸的溶液中。结果显示, 培养于高渗透压溶液的 ARPE-19 细胞在渗透调节物质的摄取显著增加, 分别增加摄取了 51% 甜菜碱, 52% 肌醇和 150% 的牛磺酸。值得说明的是, 2h 的时间设定是为了减少渗透压小分子物质对细胞膜转运蛋白的潜在影响^[3]。而且, 经过 2h 的培育, 小分子物质被缓慢摄入细胞内, 不是反映细胞内平稳状态下的细胞内渗透压小分子物质的水平, 而是反映起始摄入水平, 是反映转运蛋白的活跃程度。

2.3 低渗引发的小分子物质外流 首先, ARPE-19 细胞培养于含有约 10 μ m 的渗透压小分子物质溶液约 16h。然后, 细胞清洗两次。再后, 培养于等渗或低渗的缓冲液中约 5min ~ 1h。低渗引发小分子物质大量外流至细胞外。甜菜碱在等渗环境中 1h 约渗出 33%, 然而在低渗环境中, 5min 渗出约 43%, 1h 约渗出 67%。肌醇和牛磺酸在等渗环境中 1h 分别约渗出 14% 和 23%, 但是在低渗环境中分别约渗出 28% 和 75% (表 2)。

2.4 紫外线 A 照射 ARPE-19 引发渗透压小分子物质加速进入细胞内 因为紫外线是视网膜细胞内的氧化应激的主要来源, 可以导致细胞 DNA 断裂, 而且紫外线和渗透压均可导致相似的细胞内信号转导变化, 因此, 我们研究紫外线对渗透压小分子物质的转运的影响。小于 300nm 波长的紫外线引起 DNA 直接破坏, 形成环丁烷嘧啶二聚体等生物学效应。大于 300nm 波长的紫外线, 产生细胞内氧化应激的效应在远远大于对 DNA 直接破坏的效应。因此, 在本研究中, 紫外线 A 激发装置激发出的波长大于 300nm, 最大激发波长约在 365nm。

紫外线 A (30J/cm²) 辐射 ARPE-19 明显引起肌醇和牛磺酸流入细胞内 (表 1)。相对于低渗条件, UVA 辐射并没有引发渗透压小分子物质外流至细胞外 (表 2)。与非照射组比较, UVA 照射引发 BGT-1 mRNA 于 6h 后表达上调约 3 倍, 24h 后表达上调约 4 倍 (图 1), 但是, SMIT mRNA 仅在 UVA 照射 24h 后才表达略有上调, UVA 照射 6h 后, TAUT mRNA 表达上调约 1 倍, UVA 照射 24h 后上调约 2 倍 (10J/cm²) 及 5 倍 (30J/cm²)。

3 讨论

本研究描述了在 ARPE-19 中, 甜菜碱、肌醇和牛磺酸

三种渗透压小分子物质的存在。首先, 本研究发现 ARPE-19 中存在有 BGT-1, SMIT, TAUT 的 mRNA 的表达, 并且表达随着高渗和紫外线 A 照射上调。其次, 本研究发现伴随转运蛋白 mRNA 的表达, 渗透压小分子物质加速转运至细胞内。高渗和紫外线 A 照射可以加速小分子物质细胞内转移。再次, 低渗可加速小分子物质由细胞内转移至细胞外。需要说明的是, 本实验没有直接测量渗透压小分子物质的转运。测量渗透压小分子物质在细胞内外转运是间接通过培养液及细胞裂解液中放射性同位素标识的小分子物质的含量测定的。本实验表明, 人视网膜色素上皮细胞渗透压转运蛋白的表达上调伴随着相应的渗透压小分子物质的细胞内积聚。这说明, 在高渗和紫外线 A 照射条件下, 渗透压小分子物质的细胞内积聚是通过上调相应的转运蛋白这种机制加速细胞摄取渗透压小分子物质的速度实现的。而且, 细胞摄取渗透压小分子物质的速度要远大于渗透压小分子物质外流至细胞外的速度。而在低渗条件下, 细胞摄入渗透压小分子物质的速度要小于渗透压小分子物质外流至细胞外的速度, 从而实现了低渗条件下渗透压小分子物质的细胞外流。通过这种机制实现了渗透压小分子物质的细胞内外分布的精确调节。

在脑、肾、肝等细胞均发现甜菜碱、肌醇和牛磺酸三种渗透压小分子物质的存在, 而且行使着调节细胞容积, 保持细胞活性及功能的作用。渗透压小分子物质不仅维持细胞内稳态, 而且对保护细胞有重要作用, 比如抵抗细胞内过强的氧化压力。渗透压小分子物质称作分子伴侣, 可以稳定内源性蛋白的生物学结构及功能。有研究表明, 甜菜碱和牛磺酸可以抵抗外界对离体细胞造成的各种各样的损伤。特别在肾脏^[4], 肾髓质处于极高的渗透压差的环境中, 这种环境可以促进原尿的重吸收, 在这种极高的渗透压差的环境中, 小分子物质对肾细胞的存活起着至关重要的作用。在肝脏^[5], 渗透压小分子物质参与基因的表达。在脑组织^[6], 渗透压小分子物质参与维持细胞容积的调控。有学者发现在单核细胞和巨噬细胞^[7]中有甜菜碱和肌醇的表达。这些广泛存在的渗透压小分子物质不仅保持细胞体积内稳态, 而且还对稳定细胞内大分子蛋白起重要作用。视网膜, 特别是视网膜色素上皮细胞构成视网膜屏障, 保持视网膜色素上皮细胞的内稳态。最近有学者发现高渗使 RPE 细胞周期停滞^[8]。有实验表明^[9, 10], 高渗可以调节视网膜牛磺酸转运蛋白水平。在肝性脑病、

糖尿病、多囊肾、戈谢病等多种疾病的发病机制中均有渗透压小分子物质发生变化的学说。与肾、肝、脑细胞一样,视网膜色素上皮通过调配渗透压小分子物质来抵抗各种各样的外界损伤^[11],特别是紫外线对视网膜的损伤。

紫外线照射是老年性黄斑变性的致病因素之一,视网膜色素上皮细胞在日光照射下,经常接受大量来自太阳光的紫外线,而且随着大气臭氧层的逐年变薄,紫外线抵达视网膜的含量越来越多,老年性黄斑变性的发病率也逐年增多。紫外线与高渗相似,使视网膜色素上皮细胞内氧压力上调,加速细胞凋亡。有研究证实^[12],紫外线照射Hela细胞后,可以出现细胞内ROS上调,进而细胞内信号转导通路发生变化,这些变化与高渗压力产生的细胞内信号变化相似。两者最终均导致渗透压小分子物质细胞内积聚。本实验也同样证实,紫外线与高渗相似,引起视网膜色素上皮细胞内渗透压小分子物质积聚细胞内,以抵抗紫外线对细胞的进一步损伤。避免紫外线对其诱导的氧压力及凋亡非常重要。有研究表明^[13],金属硫蛋白(Metallothionein)可以抵抗视网膜色素上皮细胞氧化应激,避免其大量凋亡。渗透压小分子物质也有抗氧化的功效。早期实验发现,牛磺酸转运蛋白受视网膜色素上皮细胞内的氧化应激调节^[14]。另外,牛磺酸这种渗透压小分子物质对视网膜有抗氧化和抗凋亡的关键作用^[15]。本实验发现牛磺酸在高渗条件及紫外线照射条件下反应性上调,对保护视网膜色素上皮起重要作用,可以延迟老年性黄斑病变起积极的治疗作用。视网膜色素上皮之间的紧密连接构成视网膜外屏障。因此RPE对整个视网膜的功能有着至关重要的屏障作用。RPE细胞内的渗透压小分子物质可以保护RPE抵抗紫外线损伤,维持视网膜外屏障功能正常,维持RPE细胞内稳态。

本实验紫外线照射视网膜的能量和时间没有导致细胞的活性的改变。另外,紫外线照射后,渗透压小分子物质的加速摄入细胞内伴随着对应的转运蛋白mRNA的上调。这表明紫外线和高渗导致的小分子物质的加速摄入反映的是细胞最新合成的转运蛋白,而不是细胞内早先存在的转运蛋白。同样,有研究表明,在高渗条件下长期高渗可诱导肝细胞、单核细胞、巨噬细胞小分子物质转运蛋白表达,并可诱导小分子物质积聚细胞内。渗透压小分子物质,又被称为细胞内的分子伴侣,在紫外线照射的条件下聚积于细胞内,是细胞抵抗外界损伤的策略之一。Janeke等^[16]学者研究表明,表皮角质细胞表达大量活跃的TAUT转运蛋白。也有学者发现在视网膜色素上皮细胞中有大量的TAUT表达。因为甜菜碱和牛磺酸有抵抗氧化应激的作用,因此,在三种渗透压小分子物质的组成中,这两种物质很有可能是起抵抗损伤的重要成份,特别是抵抗紫外线对视网膜色素上皮细胞产生的氧化损伤。在以后的实验中,我们将继续探讨,这些渗透压小分子物质是否通过其他更多的途径来抵抗紫外线及高渗对视网

膜色素上皮细胞的损伤。而且,我们认为我们TAUT基因敲除小鼠将是验证上述假设的更有效的实验模型。

参考文献

- 1 Wang Y, Ko BC, Yang JY, et al. Transgenic mice expressing dominant-negative osmotic-response element-binding protein (OREBP) in lens exhibit fiber cell elongation defect associated with increased DNA breaks. *J Biol Chem* 2005;280(20): 19986-19991
- 2 Burg MB, Kwon ED, Kultz D. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 1997;59: 437-455
- 3 Warskulat U, Zhang F, Haussinger D. Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J Hepatol* 1997;26(6): 1340-1347
- 4 Lee SD, Choi SY, Lim SW, et al. TonEBP stimulates multiple cellular pathways for adaptation to hypertonic stress: organic osmolyte-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300(3): F707-F715
- 5 Zhang F, Warskulat U, Wettstein M, et al. Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology* 1996;110(5): 1543-1552
- 6 Haussinger D, Laubenberger J, Vom DS, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994;107(5): 1475-1480
- 7 Denkert C, Warskulat U, Hensel F, et al. Osmolyte strategy in human monocytes and macrophages: involvement of p38MAPK in hyperosmotic induction of betaine and myoinositol transporters. *Arch Biochem Biophys* 1998; 354(1): 172-180
- 8 Arsenijevic T, Vujovic A, Libert F, et al. Hyperosmotic stress induces cell cycle arrest in retinal pigmented epithelial cells. *Cell Death Dis* 2013; 4: e662
- 9 Ando D, Kubo Y, Akanuma S, et al. Function and regulation of taurine transport in Muller cells under osmotic stress. *Neurochem Int* 2012; 60(6): 597-604
- 10 El-Sherbeny A, Naggar H, Miyauchi S, et al. Osmoregulation of taurine transporter function and expression in retinal pigment epithelial, ganglion, and muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(2): 694-701
- 11 Lin LR, Carper D, Yokoyama T, et al. The effect of hypertonicity on aldose reductase, alpha B-crystallin, and organic osmolytes in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(7): 2352-2359
- 12 Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996; 274(5290): 1194-1197
- 13 Lu H, Hunt DM, Ganti R, et al. Metallothionein protects retinal pigment epithelial cells against apoptosis and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2002; 74(1): 83-92
- 14 Nakashima E, Pop-Busui R, Towns R, et al. Regulation of the human taurine transporter by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells stably transformed to overexpress aldose reductase. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(11-12): 1530-1542
- 15 Ripps H, Shen W. Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Mol Vis* 2012; 18: 2673-2686
- 16 Janeke G, Siefken W, Carstensen S, et al. Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration. *J Invest Dermatol* 2003; 121(2): 354-361