

扇贝多肽对 UVB 辐射诱导 HaCat 细胞凋亡的抑制作用及其机制[△]

于爽¹, 牟茜², 陈德利¹, 阎春玲¹, 王跃军³, 孙谧³, 王春波^{1*}

(1. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266021; 2. 青岛卫生学校, 山东 青岛 266071;

3. 中国水产科学院黄海水产研究院, 山东 青岛 266071)

摘要:目的 建立中波紫外线对体外培养的 HaCat 细胞辐射损伤病理模型, 探讨扇贝多肽(PCF)对 HaCat 细胞辐射损伤的保护作用及机制。方法 将培养的 HaCat 细胞分组并给以相应的药物, 经 UVB 照射后, 琼脂糖凝胶电泳观察各组的 DNA ladder; 流式细胞仪检测细胞内 Caspase-3 的含量; Western-blot 检测 ERKs, JNKs 和 p38 的水平。结果 PCF 能减少 UVB 所致的 HaCat 细胞 DNA 片段的出现, 减少 UVB 诱导的 HaCat 细胞内的 Caspase-3 的含量, 还能提高 ERKs 的水平, 但降低 JNKs 及 p38 的水平。结论 PCF 能抑制 UVB 辐射诱导的细胞凋亡, 对 UVB 辐射损伤的细胞具有保护作用。其作用机制可能是通过调节 MAPKs 的信号通路和 Caspase 级联实现。

关键词:扇贝多肽; 中波紫外线; HaCat 细胞; 凋亡; 丝裂原激活的蛋白激酶

中图分类号: Q959.21, R979.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-3461(2006)01-0016-05

Inhibitory effects of polypeptides from *Chlamys farreri* (PCF) on HaCaT cells apoptosis induced by UVB radiation

YU Shuang¹, MU Qian², CHEN De-li¹, YAN Chun-ling¹, WANG Yue-jun³, SUN Mi³, WANG Chun-bo^{1*}

(1. Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2. Qingdao Hygienical School, Qingdao 266071, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract; Objective To investigate whether PCF could inhibit apoptosis of HaCat cells induced by ultraviolet B (UVB) *in vitro* and explore its related mechanism. **Methods** HaCat cells were cultured and divided into groups (control, model, and test groups). The DNA ladder of each group was observed by gel electrophoresis; The expression of caspase-3 in HaCat cells was detected by flow cytometry and the activities of ERKs, JNKs, P38 were determined by western-blot method. **Results** PCF decreased UVB-induced DNA ladder in HaCat cells; PCF enhanced the level of ERKs, but reduced the level of JNKs and p38, and reduced the expression of Caspase-3 in HaCat cells. **Conclusion** PCF had protective effects against UVB-induced apoptotic cell death in HaCat cells and it is likely that its cytoprotective effect on HaCat cells was mediated by MAPKs pathway.

Key words: polypeptides from *Chlamys farreri* (PCF); ultraviolet B rays; HaCat cells; apoptosis; mitogen-activated protein kinases

[△]基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30471458); 山东省自然科学基金资助项目 (No. Y2003c92); 青大科学 [2003]15 号。

* 通讯作者: Tel: 86-0532-82991202; E-cbwang666@126.com

人类皮肤长期暴露在阳光或紫外线下可导致表皮过度增生、炎症,甚至发展为肿瘤。业已证明,UVB 是皮肤肿瘤发病机制中最常见的环境因素^[1]。UVB 辐射可激活丝裂原激活的蛋白激酶信号通路^[2],激活 Caspase 级联反应,水解一系列蛋白底物,引起细胞凋亡^[3],探讨 MAPK 信号通路在 UVB 诱导的凋亡机制是研究热点之一。为减轻 UVB 辐射引起损伤,人们日益广泛地应用抗氧化剂。目前,对抗氧化剂的研究多局限于大分子蛋白或糖肽,而对海洋抗氧化剂尤其是小分子多肽的作用机制报道甚少。

课题组制备的扇贝多肽是从栉孔扇贝中提取的水溶性小分子多肽,相对分子质量为 879 Da。我们前期的研究显示,PCF 能有效清除化学体系产生的氧自由基,抑制紫外线对人皮肤细胞的氧化损伤^[4~7]。为了进一步研究扇贝多肽对 HaCat 细胞的作用,我们以 UVB 辐射损伤的 HaCat 细胞为模型,从 MAPKs 通路和 Caspase-3 的角度探究了 PCF 对 UVB 辐射 HaCat 细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株、培养基及其它试剂 人类角质形成细胞株 HaCaT 由韩国延世大学丁肇晓博士惠赠。完全培养基由 DMEM (Gibco 公司)、10% 小牛血清 (Gibco 公司)、100 U · mL⁻¹ 青霉素、100 μg · mL⁻¹ 链霉素组成。流式细胞仪 (美国 B. D 公司) 型号: Sacs-Vantage。PCF, 纯度 > 96%, 由中国水产科学院黄海水产研究所提供, 用无血清的完全培养基配制成 20% 的母液, 4℃ 保存备用; Caspase-3 抗体、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p38MAPK (p38) 和细胞外信号调节激酶 (ERK) 抗体购于 Cell Signaling Tech.; β 肌动蛋白抗体购于博士德公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计与 UVB 氧化损伤 HaCaT 细胞病理模型的建立 HaCaT 用完全培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 的饱和水汽 CO₂ 培养箱培养, 待细胞生长至 70%~90% 融合时, 用 PBS 洗 2 遍, 后进行 UVB 照射, 剂量

分别为 5, 10, 15 和 20 mJ/cm², 同时设对照组, 确定实验的辐射参数。

将细胞随机分为 6 组: 模型组, 对照组, PCF 组 5.69, 2.84, 1.42 mmol · L⁻¹ 和 VitC 组 5.69 mmol · L⁻¹, 各给药组在加药后培养 2 h, 除对照组外, 其它各组细胞均经 20 mJ/cm² (经实验确定) UVB 辐射, 时间 20 min, 在照射前用 PBS 洗 2 遍。辐射后细胞继续培养 18 h (流式检测 Caspase-3 为辐射后 3 h) 进行以下实验。

1.2.2 细胞凋亡的检测 参照文献^[8]并改良, DNA 的裂解用琼脂糖凝胶电泳分析。细胞制成 5 × 10⁷ 个 · L⁻¹ 细胞悬液, 接种于 6 孔培养板, 每孔加 3 mL 细胞悬液。于培养箱中培养至指数生长期时, 随机将细胞分为 6 组, 分组同上。经处理后各组 HaCaT 细胞悬液 1 mL, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解液 (5 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0); 20 mmol · L⁻¹ EDTA; 0.5% Triton X-100), 50℃ 孵育 1 h, 然后加入 RNase A (100 μg · mL⁻¹) 50℃ 孵育 1 h, 再加入蛋白酶 K (200 μg · mL⁻¹) 50℃ 孵育 1 h, 裂解的上清用苯酚/氯仿/乙醇 (25:24:1, v/v) 抽提。收集沉淀, 70% 的冷乙醇漂洗 1 次, 沉淀溶于 1 × TE 缓冲液 (10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol · L⁻¹ EDTA), 提取的 DNA 样本加入含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶, 60v 电泳 1 h 后在紫外线下观察并照相。

1.2.3 流式细胞仪检测 Caspase-3 的表达

细胞接种于 6 孔培养板, 每孔加 3 mL 细胞悬液, 于培养箱中培养至指数生长期时, 随机将细胞分为 6 组, 分组同上。与 PCF 共孵育 2 h 并经 UVB 辐射后孵育 3 h 后收集细胞, PBS 洗 2 次, 加入质量浓度为 10 g · L⁻¹ 的多聚甲醛 2.0 mL, 30 min 后, 离心去上清, 加 Triton x-100 1 mL, 10 min, 再加入含有 10 mg · L⁻¹ 抗 Caspase-3 抗体, 置冰上孵育 1 h 后洗涤 3 次, 上机测定 Caspase-3 含量。

1.2.4 Western blot 检测磷酸化 p38、磷酸化 ERKs、磷酸化 JNKs 按文献^[9]报道的 Western blot 方法检测蛋白质。细胞无血清培养 24 h 后, 直接于裂解缓冲液 (20 mmol · L⁻¹

Tris-HCl (pH 7.7), 250 mmol · L⁻¹ NaCl, 2 mmol · L⁻¹ EGTA, 0.5% NP40, 10% glycerol, 20 mmol · L⁻¹ 3-glycerophosphate, 1 mmol · L⁻¹ Na₃VO₄) 裂解 30 min, 12000 g 离心 10 min, 取上清分装。测蛋白浓度(考马斯亮蓝蛋白测定法测定)。取 100 μg 蛋白于 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转至硝酸纤维素膜。在含 0.1% 的一抗 (ERKs, JNKs 和 p38 的单克隆抗体) 的封闭液中, 4℃ 摇晃过夜; TBST (1×TBS, 0.1% Tween 20) 漂洗 3 次, 每次 5 min; 在含 1:2000 稀释 HRP 标记的第二抗体的封闭液中, 室温摇晃 1 h; TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显色。每组实验至少重复 3 次。

1.3 统计学处理 计量资料的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 软件对结果进行单因素方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 PCF 对 UVB 辐射 HaCaT 细胞 DNA ladder 的影响

DNA 凝胶电泳显示结果如图 1。在 20 mJ/cm² 的 UVB 照射剂量和照射后培养时间 18 h 的条件下, 呈现特征的阶梯状 DNA 凋亡带, 5, 10, 15 mJ/cm² UVB 辐射各组均未见凋亡条带, 对照组呈现为单一条带。表明在 20 mJ/cm² UVB 辐射可诱导 HaCaT 细胞发生凋亡。

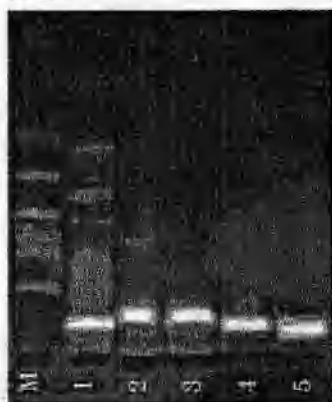


图 1 不同剂量 UVB 辐射 HaCaT 细胞后 DNA 片段形成的影响

M: Marker 1: UVB 20 mJ/cm² 2: UVB 15 mJ/cm² 3: UVB 10 mJ/cm² 4: UVB 5 mJ/cm² 5: 对照组



图 2 PCF 对 HaCaT 细胞受 UVB 辐射后 DNA 片段形成的影响

M: Marker 1: 模型组 2: 对照组 3: 5.69 mmol · L⁻¹ PCF 组 4: 2.84 mmol · L⁻¹ PCF 组 5: 1.42 mmol · L⁻¹ PCF 组 6: 5.69 mmol · L⁻¹ VitC 组

图 2 所示, 与对照组比较, UVB 模型组细胞 DNA 断裂明显, 呈现特征的阶梯状 DNA 凋亡带, 且梯状带辉度较高; 与 UVB 模型组比较, PCF 各组梯状带不明显, 辉度减弱, 5.69 mmol · L⁻¹ PCF 组图象与对照组接近。鉴于 DNA 梯状带的亮度与发生凋亡的细胞数目成正比, 证明 1.42 mmol · L⁻¹ ~ 5.69 mmol · L⁻¹ PCF 可抑制 UVB 辐射诱导的 HaCaT 细胞凋亡, 并有浓度依赖关系。

2.2 PCF 对 UVB 辐射后 HaCaT 细胞 Caspase-3 的影响

HaCaT 细胞在完全培养基中培养至 70%~90% 融合时, 预先给予 PCF, UVB 照射 20 min 后, 继续培养 3 h, 收集细胞, 流式细胞仪分析 HaCaT 细胞中 Caspase-3 的含量 (如图 3 所示)。与对照组相比, UVB 模型组 Caspase-3 的含量明显升高; 与 UVB 模型组比较, 1.42 mmol · L⁻¹ PCF 组 ($P < 0.05$) 和 2.84 mmol · L⁻¹ PCF 组 ($P < 0.01$) 中 Caspase-3 的含量降低, 并且在 5.69 mmol · L⁻¹ PCF 组和 5.69 mmol · L⁻¹ VitC 组 ($P < 0.01$) 中, Caspase-3 的含量明显降低。表明 UVB 辐射可以诱导 Caspase-3 激活, 而 PCF 可抑制 UVB 对 Caspase-3 的作用。

表 1 PCF 对 UVB 辐射后 HaCaT 细胞 Caspase-3 平均荧光强度影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3 平均荧光强度
对照组	19.5 ± 2.4
UVB 模型组	38.0 ± 3.5**
5.69 mmol · L ⁻¹ PCF 组	13.6 ± 0.8**
2.84 mmol · L ⁻¹ PCF 组	25.5 ± 2.8**
1.42 mmol · L ⁻¹ PCF 组	28.9 ± 2.1*
5.69 mmol · L ⁻¹ VitC 组	23.6 ± 1.9**

注: ** $P < 0.01$ vs 对照组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组

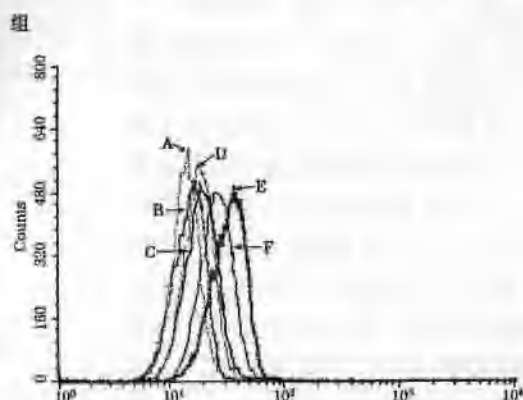


图3 PCF对UVB辐射后HaCaT细胞
Caspase-3活性的影响

A: 5.69 mmol · L⁻¹ PCF组 B: 对照组

C: 5.69 mmol · L⁻¹ VitC组 D: 2.84 mmol · L⁻¹ PCF组

E: 模型组 F: 1.42 mmol · L⁻¹ PCF

2.3 PCF对HaCaT细胞受UVB辐射后ERKs、JNKs和p38水平的影响

HaCaT细胞在完全培养基中培养至70%~90%融合时,预先给予PCF,UVB照射20min后,继续培养18h,收集细胞,Western印迹观察ERKs、JNKs和p38的激活情况:与对照组相比,UVB模型组JNKs、p38水平明显升高,而ERKs水平降低($P < 0.01$)。与UVB模型组比较,1.42 mmol · L⁻¹ PCF组和2.84 mmol · L⁻¹ PCF组中ERKs增高,并且在5.69 mmol · L⁻¹ PCF组中ERKs升高明显,但是各PCF组中JNKs和p38的水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明PCF可明显增强ERKs的水平,同时降低JNKs和p38的水平。

3 讨论

众多研究表明在一定剂量范围内,UVB能以剂量依赖的方式引起角质形成细胞发生凋亡,但是其剂量和时间范围不尽一致。本实验的结果表明:在20mJ/cm²的UVB照射剂量和照射后培养时间18h的条件下,UVB能以时间和剂量依赖的方式引起角质形成细胞发生凋亡。细胞发生凋亡时,基因组DNA断裂成寡核小体片段,在琼脂糖电泳上呈典

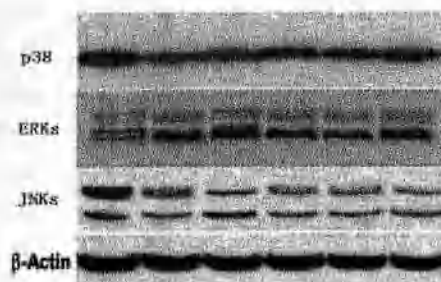
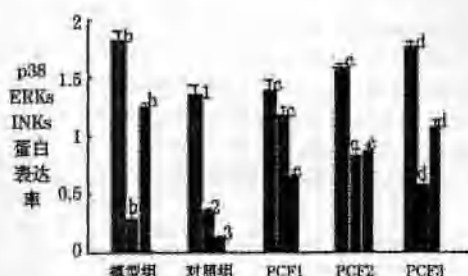


图4 PCF对HaCaT细胞受UVB辐射
后p38、ERKs和JNKs活性的影响

1. p38蛋白表达率 2. ERKs蛋白表达率

3. JNKs蛋白表达率 PCF1为5.69 mmol · L⁻¹

PCF组 PCF2为2.84 mmol · L⁻¹ PCF组

PCF3为1.42 mmol · L⁻¹ PCF组 $bP < 0.01$ vs

对照组 $cP < 0.01$ vs 模型组 $dP < 0.05$ vs 模型组

型的梯状(ladder)条带,而正常细胞DNA呈单一条带^[10]。本实验研究发现,PCF具有抗HaCat细胞凋亡的作用。UVB辐射损伤的HaCat细胞呈典型的凋亡生化改变,这种改变在模型组最为明显。用不同浓度的PCF预处理细胞可减轻细胞受损,以5.69 mmol · L⁻¹ PCF效果为优(DNA表现为单一条带),说明PCF在实验剂量下能拮抗UVB损伤HaCat细胞的凋亡。

Shimizu^[11]等使用25mJ/cm² UVB对人KC细胞进行辐射所诱导的凋亡过程中,可出现Caspase-3的显著激活;预先将细胞用抑制剂处理后,UVB诱导的凋亡数被抑制了60%,从而揭示Caspas-3在UVB诱导KC凋亡中的作用。此次研究中,用流式细胞仪检测活化的Caspase-3的含量表明,UVB辐射能诱导Caspase-3的激活,而PCF能剂量依赖的降低Caspase-3的活化,提示Caspase-3可能参与了PCF对抗UVB辐射

诱导的 HaCat 细胞的凋亡效应。

MAPKs 家族包括 ERKs 途径、JNK 通路和 p38 通路。一般而言, ERKs 的激活是细胞增生和存活信号, 该通路的活化具有抗细胞凋亡的作用^[12]。Shyria J^[13] 等研究表明, 抗氧化剂保护中性粒细胞不产生凋亡, 是通过激活 ERKs 途径。本文研究采用 Western blot 检测 ERKs 的水平, 结果显示 UVB 辐射显著降低 HaCat 细胞的 ERKs 水平, 而 PCF 能剂量依赖性增强 ERKs 的水平。因此, PCF 的抗凋亡作用可能通过其加强 ERKs 激酶的活性而介导的。在 MAPKs 通路中, JNKs 和 p38 是引起细胞凋亡的信号^[14]。紫外线可催化激活 JNKs^[15]、p38^[16], 从而导致细胞凋亡。有文献报道, Gadd45 抑制紫外线诱导的造血细胞凋亡是通过抑制 JNKs 和 P38 通路^[17]。本文结果表明, UVB 辐射 HaCat 细胞增强了 JNKs 和 p38 激酶水平。预先给予 PCF 可明显地阻滞 UVB 辐射诱导的 JNKs 和 p38 激酶的水平, 随 PCF 的剂量增加, JNKs 和 p38 激酶的水平降低。由此提示 JNKs 激酶和 p38 激酶介导了 UVB 诱导 HaCat 凋亡, PCF 的抗凋亡作用是通过 JNKs 激酶和 p38 激酶通路来实现的。

本文在建立紫外线 UVB(20mJ/cm²) 对 HaCat 细胞氧化损伤和凋亡的模型基础上, 首次在 MAPKs 信号传导通路和 Caspase-3 级联通路上探讨了扇贝多肽对 UVB 损伤 HaCat 细胞的保护作用机理。PCF 抗 UVB 辐射诱导的 HaCat 细胞的凋亡效应, 是通过增强 ERKs, 抑制 JNKs 和 P38 激酶的水平, 降低 Caspase-3 的活化而实现的。

参考文献:

- [1] Bode AM, Dong Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction[J]. *Science's STKE*, 2003(167), 2.
- [2] Verheij M, Bartelink H. Radiation-induced apoptosis[J]. *Cell Tissue Res*, 2000, 31(1), 133.
- [3] Dent P, Yacoub A, Fisher PB, et al. MAPK pathways in radiation responses[J]. *Oncogene*, 2003, 2(37), 5885.
- [4] CB Wang, RY Yao, ZT Liu, et al. Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice dam-

aged by ultraviolet A[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(9), 813.

[5] Yan-Tao Han, Zhi-Wu Han, Guo-Ying, et al. Inhibitory effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on ultraviolet A-induced oxidative damage on human skin fibroblasts in vitro[J]. *Pharmacol Res*, 2004, 49, 265.

[6] 黄绵庆, 阎春玲, 袁梅, 等. 扇贝多肽对 UVB 损伤 HaCat 细胞的抗氧化作用[J]. *中国海洋药物*, 2005, 24(3), 26.

[7] CB Wang, BX Ding, SB Guo, et al. Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on mitochondria in human dermal fibroblasts irradiated by ultraviolet B[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(7), 692.

[8] Queille S, Drougard C, Sarasin A, et al. Effects of XPD mutations on ultraviolet-induced apoptosis in relation to skin cancer-proneness in repair-deficient syndromes[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(5), 1162.

[9] Bhling F, Koch G, Wex T, et al. Simultaneous detection and differentiation of anti-Helicobacter pylori antibodies by flow microparticle immunofluorescence assay[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(1), 131.

[10] Mitsui H, Takuwa N, Maruyama T, et al. The MEK1-ERK map kinase pathway and the PI 3-Kinase-Akt pathway independently mediate anti-apoptosis signals in HepG2 liver cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2001, 92, 55.

[11] Shimizu H, Banno Y, Sumi N, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells[J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 112(5), 769.

[12] Song-Ja Kim, Jung-Won Ju, Chun-Do Oh, et al. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(2), 1332.

[13] Shyria JG, Ben BW, YQ Xiao, et al. Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279, 44695.

[14] Fan M, Goodwin ME, Birrer MJ, et al. The c-Jun NH2-terminal protein kinase/AP-1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine[J]. *Cancer Res*, 2001, 61, 4450.

[15] 王春波, 贺孟泉, 秦守哲, 等. 海洋肽的体外抗氧化作用[J]. *中国海洋药物*, 1998, 17(3), 15.

[16] Tatiana E. Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEK1, MEK3, p38/RK, AP-1 signal transduction pathway[J]. *Biol Chem*, 1998, 273(38), 24387.

[17] Mamta G, Shiv K, Gupta, et al. Gadd45a and Gadd45b protect haematopoietic cells from ultraviolet radiation induced apoptosis via distinct signaling pathways[J]. *Blood*, 2004, 104(8), 1258.

(收稿日期: 2005-07-25)