

A HaCaT p38 MAPK caspase-3

李金莲¹, 严州萍², 陈雪红¹, 王跃军³, 孙谧³, 石宇玺⁴, 王春波^{1*} (1. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266021; 2. 青岛海慈医疗集团, 山东 青岛 266033; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 4. 滨州医学院临床医学系, 山东 滨州 256603)

从 p38 促细胞分裂剂激活蛋白激酶 (p38 MAPK) 通路和半胱天冬酶 -3 (caspase-3) 的角度, 研究扇贝多肽 (polypeptide from *Chlamys farreri*, PCF) 抑制紫外线 A 波 (UVA) 引起的 HaCaT 细胞凋亡的分子机制。实验分为 6 组: 对照组、UVA 模型组、UVA + 5.68 mmol · L⁻¹ 维生素 C 阳性对照组、UVA + 5.69 mmol · L⁻¹ PCF 组、UVA + 2.84 mmol · L⁻¹ PCF 组、UVA + 1.42 mmol · L⁻¹ PCF 组。以正交实验设计确立 UVA 诱导 HaCaT 细胞凋亡模型; 琼脂糖凝胶电泳分析 PCF、p38 MAPK 抑制剂 (SB203580) 及 caspase-3 特异性抑制剂 (Ac-DEVD-CHO) 对细胞凋亡的影响; 蛋白质印迹法检测 p38 MAPK 及磷酸化 p38 MAPK 表达; 流式细胞术检测 caspase-3 的活性。PCF 能明显抑制 UVA 引起的 HaCaT 细胞凋亡; SB203580 和 Ac-DEVD-CHO 对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡有抑制作用; 1.425.69 mmol · L⁻¹ 内的 PCF 可剂量依赖性抑制 UVA 引起的 p38 MAPK 磷酸化及 caspase-3 的活化。PCF 可抑制 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡, 其作用机制与抑制 p38 MAPK 通路和 caspase-3 活性有关。

扇贝多肽; 紫外线 A 波; 促细胞分裂剂激活蛋白激酶; 半胱天冬酶 -3; 凋亡; HaCaT 细胞

: R967; R931.74

: A

: 1001 - 2494 (2007) 02 - 0116 - 05

Inhibition of Polypeptide from *Chlamys farreri* on UVA-Induced Apoptosis of HaCaT Cells Depending on p38 MAPK Pathway and Caspase-3

LI Jin-lian¹, YAN Zhou-ping², CHEN Xue-hong¹, WANG Yue-jun³, SUN Mi³, SHI Yu-xi⁴, WANG Chun-bo^{1*} (1. Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2. Haici Medical Treatment Conglomerate, Qingdao 266033, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 4. Department of Clinical Medicine, Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibition of polypeptide from *Chlamys farreri* (PCF) on UVA-induced HaCaT cells apoptosis through p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway and caspase-3. **METHODS** Experiments were divided into six groups: control group, UVA model group, UVA + 5.68 mmol · L⁻¹ vitamin C positive control group, UVA + 5.69 mmol · L⁻¹ PCF group, UVA + 2.84 mmol · L⁻¹ PCF group, UVA + 1.42 mmol · L⁻¹ PCF group. UVA-induced apoptotic model of HaCaT cells was established by orthogonal design. Using agarose gel electrophoresis, the effects of PCF, p38 MAPK inhibitor SB203580 and caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO on UVA-induced apoptosis were investigated. Expression levels of p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK were determined by Western blot analysis. Caspase-3 activity was assayed by flow cytometry. **RESULTS** PCF significantly protected UVA-induced apoptosis. SB203580 and Ac-DEVD-CHO had inhibitory effects on UVA-induced apoptosis of HaCaT cells. PCF inhibited UVA-induced phosphorylation of p38 MAPK and activation of caspase-3 on a dose-dependent manner. **CONCLUSION** PCF can protect HaCaT cells from UVA-induced apoptosis. Its inhibitory effect on apoptosis may attribute to inhibition of activation of p38 MAPK and caspase-3.

KEY WORDS: polypeptide from *Chlamys farreri*; ultraviolet A; mitogen activated protein kinase; caspase-3; apoptosis; HaCaT

日光中的紫外线主要由 A 波 (320-400 nm) 和 B 波 (280-320 nm) 组成, 长期的紫外线照射不仅引起皮肤光老化而且与皮肤癌的发生有关^[1]。由于在

到达地球表面的紫外线 A 波 (UVA) 占 90% - 99%, 并且其穿透力强, 可穿透表皮和真皮, 因此 UVA 受到越来越多的关注。扇贝多肽 (polypeptide from *Chla-*

: 国家自然科学基金 (30471458); 山东自然科学基金 (Y2003c02)

: 李金莲, 女, 硕士研究生

: 王春波, 女, 教授, 硕士生导师

Tel: (0532) 82991202

Fax: (0532) 82991009

E-

mail: cbwang666@126.com

· 116 ·

Chin Pharm J, 2007 January, Vol. 42 No. 2

中国药学杂志 2007 年 1 月第 42 卷第 2 期



mys farreri, PCF)是从栉孔扇贝中提取的一种小分子、水溶性多肽,相对分子质量为 879。我们以往的研究表明,PCF对 UVA引起的裸鼠皮肤、人 HeLa上皮细胞及皮肤成纤维细胞的损伤具有保护作用^[2-4]。对角质形成细胞 HaCaT, PCF通过降低胞浆活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平,提高超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性而发挥抗氧化损伤作用^[5]。本研究从 p38 促细胞分裂剂激活性蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路及 caspase-3的角度进一步探究 PCF对 UVA 损伤 HaCaT细胞保护作用的分子机制。

1

1.1 主要试剂和器材

PCF(中国水产科学研究院黄海水产研究所分离纯化,纯度 > 96%,用蒸馏水配制成 227.5 mmol · L⁻¹的储存液,4℃保存备用);DMEM 培养基(Gibco公司);p38 抗体、caspase-3 抑制剂(Ac-DEVD-CHO)(Santa Cruz Biotechnology);磷酸化 p38 抗体(Cell Signaling Technology);荧光标记活化 caspase-3 抗体(BD Biosciences);肌动蛋白抗体(武汉博士德生物工程有限公司);p38 抑制剂 SB203580(Calbiochem 公司);碘化丙啶(Propidium iodide, PI)、NP-40(Sigma公司);紫外辐照仪(北京师范大学);FACS-vantage型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson公司)。

1.2 细胞培养、分组及紫外线照射

人角质形成细胞株 HaCaT(韩国延世大学丁肇晓博士惠赠)。由 DMEM 培养基(加 10%小牛血清,1 × 10⁵ u · L⁻¹青霉素和 100 mg · L⁻¹硫酸链霉素),37℃,5% CO₂常规培养。实验前将细胞接种于六孔板中,随机分为 6 组:对照组、UVA 模型组、UVA + 5.68 mmol · L⁻¹维生素 C 阳性对照组(Vit C 组)、UVA + 5.69 mmol · L⁻¹ PCF 组(PCF1 组)、UVA + 2.84 mmol · L⁻¹ PCF 组(PCF2 组)、UVA + 1.42 mmol · L⁻¹ PCF 组(PCF3 组)。待细胞生长至 80%~90%融合时即可进行照射,照射时弃去培养基,用 PBS 漂洗 2 次,再加入 PBS 2 mL。对照组用铝箔盖住,其余同处理组。照射结束后继续进行常规培养。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡

收集细胞,冷 PBS 洗 2 次,调节细胞为每 1 L 含 1 × 10⁹个,加入 50 mg · L⁻¹ PI 低渗液(含 NP-40、RNA 酶)200 μL,混匀,4℃避光染色 30 min。400 目筛网过滤。FACS 管上样检测 DNA 含量,激发光

波长 488 nm, CV 值 < 2%, FSC/SSC 设门。收集门内 10 000 个细胞,用 Modfit LT 软件分析凋亡率。

1.4 正交实验设计筛选 UVA 诱导 HaCaT 细胞凋亡模型

用正交设计实验选择两个因素 3 个水平以确定最佳凋亡模型,两个因素是:A-UVA 照射剂量(J · cm⁻²);B 照射后培养时间(h)。根据 L₉(3⁴)正交表进行实验,流式细胞术检测细胞凋亡,见表 1。

1 正交设计实验因素和水平

Tab 1 Factors and levels of orthogonal test

Levels	Factors	
	A	B
1	4	12
2	8	18
3	16	24

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡

待细胞融合至 80%~90%,加入 PCF 培育 2 h,或分别加入 p38 MAPK 抑制剂 SB203580(10 μmol · L⁻¹)、caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO(100 μmol · L⁻¹)培育 1 h,然后进行 UVA 照射。照射后 18 h 收集细胞, PBS 洗 2 次,加入 500 μL 细胞裂解液[150 mmol · L⁻¹ NaCl, 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.5)、10 mmol · L⁻¹ EDTA, 0.5% SDS, 500 mg · L⁻¹蛋白酶 K],混匀,50℃水浴过夜;以等体积苯酚:氯仿(1:1)抽提两遍,等体积氯仿抽提 1 次,12 000 ×g 离心 5 min,取上清;加入 1/10 体积的 3 mol · L⁻¹ 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇,-20℃过夜沉淀 DNA;12 000 ×g 离心 10 min,收集沉淀,体积分数 70%冷乙醇漂洗 1 次;沉淀溶于 50 μL TE 缓冲液[10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0), 10 mmol · L⁻¹ EDTA]中,加入 RNA 酶,使其终质量浓度为 0.02 μg · L⁻¹,37℃水浴 30 min;含溴化乙啶的 15 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳,观察 DNA ladder。

1.6 蛋白质印迹检测非磷酸化及磷酸化 p38

待细胞融合至 80%~90%换为无血清培养基培育过夜,照射前 2 h 加 PCF,照射后 30 min 收集细胞:预冷 PBS 冲洗 3 次,弃去 PBS 后将培养板置于冰上,每 1 × 10⁶个细胞加 100 μL 裂解液[20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.5), 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, 1 mmol · L⁻¹ EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mmol · L⁻¹ 焦磷酸钠(sodium pyrophosphate), 1 mmol · L⁻¹ 磷酸甘油(-glycerophosphate), 1 mmol · L⁻¹ Na₃VO₄, 1 mg · L⁻¹ 亮抑酶肽(leupeptin), 1 mmol · L⁻¹ 苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride)],冰上裂解 30 min;将细胞刮下置

于 1.5 mL 离心管中, 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清; 测蛋白质浓度 (BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天), 每孔上样约 40 μg 蛋白质, 10% SDS-PAGE 电泳; 蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 封闭液 (1 \times IBS, 0.1% Tween-20, 5% BSA) 室温封闭 1 h; 加入非磷酸化 (1 200 稀释) 及磷酸化 (1 1 000 稀释) p38 MAPK 兔多克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 培育过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 1 2 000 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG, 室温培育 1 h; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 以二氨基联苯胺 (DAB) 显色。凝胶分析软件 Quantity one 测灰度值。

1.7 流式细胞术检测 caspase-3 活性

UVA 照射前 2 h 加入不同剂量的 PCF, 照射后 12 h 收集各组贴壁及悬浮细胞约 2×10^6 个, 预冷 PBS 洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛 2 mL 固定 30 min; 离心去上清, 加 TritonX-100, 室温反应 10 min; PBS 洗 2 次, 加入荧光标记活化 caspase-3 抗体, 室温下避光放置 30 min 后洗涤 2 次, 上机检测 caspase-3 活性。

1.8 统计学分析

双因素分析采用正交试验及其方差分析; SPSS 软件进行单因素方差分析及 Q 检验。

2

2.1 UVA 诱导 HaCaT 细胞凋亡模型的筛选

按 $L_9(3^4)$ 正交表进行了 9 个实验, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 结果见表 2, 方差分析见表 3。可知照射剂量和照射后培养时间对凋亡率均有影响 ($P < 0.01$), 最佳凋亡模型为 A_2B_2 , 即 $8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVA 照射 HaCaT 细胞后 18 h。

2 正交实验设计表

Tab 2 Orthogonal design and apoptotic rate

No	A	B	Error	Error	Apoptotic rate / %		
1	1	1	1	1	3.23	2.77	3.01
2	1	2	2	2	4.4	3.86	5.65
3	1	3	3	3	4.83	3.99	5.67
4	2	1	2	3	10.36	13.28	11.83
5	2	2	3	1	23.74	26.65	29.55
6	2	3	1	2	25.06	25.9	30.39
7	3	1	3	2	18.42	20.73	20.05
8	3	2	1	3	20.17	23.89	25.71
9	3	3	2	1	17.93	19.32	20.43
	37.41	103.68	160.13	146.63			
	196.76	163.62	107.06	154.46			
	186.65	153.52	153.63	119.73			

2.2 PCF 抑制 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡

结果见图 1, UVA 模型组有明显的 DNA 梯形条带, 维生素 C 及各 PCF 组均未见梯形条带。说明维

3 正交设计方差分析结果

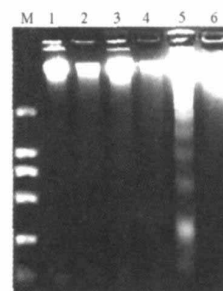
Tab 3 Variance analysis of orthogonal design

Source of variation	<i>l</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>	
A	1 769.156	2	884.578	60.321	<0.01
B	228.846	2	114.423	7.803	<0.01
Error	322.619	22	14.665		

注: $F_{0.01}(2,22) = 5.72$

Note: $F_{0.01}(2,22) = 5.72$

生素 C、 $1.425.69 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PCF 均可显著抑制 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡。



1 PCF 对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞 DNA 片段形成的影响

M - marker; 1 - UVA + 扇贝多肽 $5.69 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2 - UVA + 扇贝多肽 $2.84 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3 - UVA + 扇贝多肽 $1.42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4 - UVA + 维生素 C ($5.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 5 - UVA 模型组; 6 - 对照组

Fig 1 Effect of PCF on UVA-induced DNA fragmentation in HaCaT cells

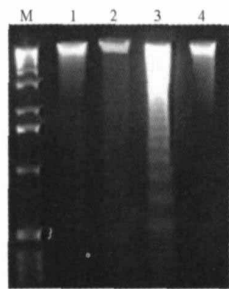
M - marker; 1 - UVA + PCF $5.69 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2 - UVA + PCF $2.84 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3 - UVA + PCF $1.42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4 - UVA + Vit C ($5.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 5 - UVA model; 6 - control

2.3 SB203580、Ac-DEVD-CHO 对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的抑制作用

为了研究 p38 MAPK 通路及 caspase-3 在 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡中的作用, 分别加入 p38 MAPK 抑制剂 SB203580、caspase-3 特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO, 观察对细胞凋亡的影响。加入 SB203580 后未见 DNA ladder 的形成, 表明 p38 MAPK 的激活参与 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡; 加入 Ac-DEVD-CHO 后也未见有 DNA ladder, 提示 UVA 诱导 HaCaT 细胞产生的凋亡为 caspase-3 依赖性。结果见图 2。

2.4 PCF 对 p38 及磷酸化 p38 蛋白表达的影响

结果见图 3。蛋白质印迹检测 UVA 照射后 HaCaT 细胞中 p38 及磷酸化 p38 (p-p38) 蛋白表达。p38 蛋白表达水平以 p38 与 β -肌动蛋白吸光度比值表示, 磷酸化 p38 蛋白表达水平以 p-p38 与 p38 吸光度比值表示。对照组、模型组、维生素 C 组及各剂量 PCF 组 p38 蛋白表达水平无差异 ($P > 0.05$) (图 3B); UVA 照射后 30 min, 模型组 p-p38 表达显著增强, 维生素 C 及各剂量 PCF 组 p-p38 的表达均



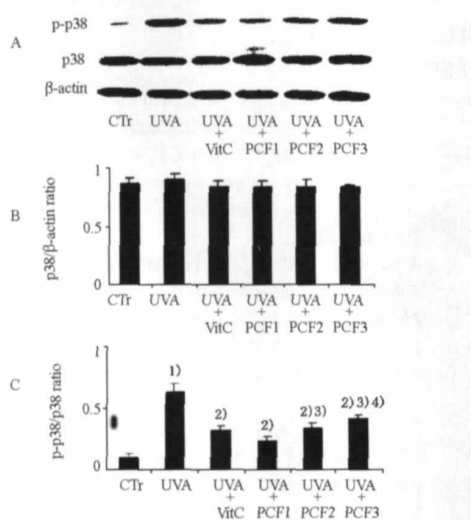
2 SB203580及 Ac-DEVD-CHO对 UVA 诱导的 HaCaT细胞 DNA片段形成的影响

M - marker; 1 - UVA + SB203580; 2 - UVA + Ac-DEVD-CHO; 3 - UVA 模型组; 4 - 对照组

Fig 2 Effect of SB203580 and Ac-DEVD-CHO on UVA-induced DNA fragmentation in HaCaT cells

M - marker; 1 - UVA + SB203580; 2 - UVA + Ac-DEVD-CHO; 3 - UVA model; 4 - control

低于模型组 ($P < 0.01$),且随 PCF剂量增加对 p38磷酸化的抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖性(图 3C)。



3 PCF对 UVA 诱导的 p38 MAPK蛋白表达的影响

A - p38及磷酸化 p38蛋白表达; B - p38蛋白表达水平; C - 磷酸化 p38蛋白表达水平; Ctr - 对照组; UVA - UVA 模型组; Vit C - 维生素 C ($5.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); PCF13 - 扇贝多肽 ($5.69, 2.84, 1.42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); ¹⁾ $P < 0.01$ 与对照组比较; ²⁾ $P < 0.01$ 与 UVA 模型组比较; ³⁾ $P < 0.01$ 与 UVA + PCF1组比较; ⁴⁾ $P < 0.05$ 与 UVA + PCF2组比较

Fig 3 Effect of PCF on UVA-induced p38 MAPK protein expression

A - protein expressions of p38 and phosphorylated p38; B - expression level of p38; C - expression level of phosphorylated p38; Ctr - control; UVA - UVA model; Vit C - vitamin C ($5.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); PCF13 - PCF ($5.69, 2.84, 1.42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); ¹⁾ $P < 0.01$, vs control; ²⁾ $P < 0.01$, vs UVA model; ³⁾ $P < 0.01$, vs UVA + PCF1; ⁴⁾ $P < 0.05$, vs UVA + PCF2

2.5 PCF对 UVA 诱导的 caspase-3活性的影响

流式细胞仪检测 HaCaT细胞 caspase-3活性,结果见表 4。UVA照射后 12 h, caspase-3活性明显增强,与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$);预先加入各

剂量 PCF可明显抑制 UVA引起的 caspase-3活性增强,与模型组相比差异显著 ($P < 0.01$); PCF各剂量组间随剂量增加对 caspase-3的抑制作用逐渐增强。caspase-3活性抑制率按下列公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \left[\frac{\text{UVA 组 caspase-3 活性} - \text{加药组 caspase-3 活性}}{\text{UVA 组 caspase-3 活性}} \right] \times 100$$

4 PCF对 UVA照射后 HaCaT细胞 caspase-3活性的抑制作用. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab 4 Inhibitory effect of PCF on activities of caspase-3 in UVA-radiated HaCaT cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Groups	Caspase-3 activity (fluorescence intensity)	Inhibition ratio/%
Control/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	39.10 \pm 1.24	-
UVA	50.14 \pm 2.1 ¹⁾	-
UVA + Vit C/ $5.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	39.95 \pm 1.27 ²⁾	20.3
UVA + PCF1/ 5.69	36.81 \pm 1.58 ²⁾	26.6
UVA + PCF2/ 2.84	40.04 \pm 1.06 ²⁾⁴⁾	20.1
UVA + PCF3/ 1.42	42.21 \pm 1.83 ²⁾³⁾⁵⁾	15.8

注: ¹⁾ $P < 0.01$ 与对照组相比; ²⁾ $P < 0.01$ 与 UVA组相比; ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ 与 UVA + PCF1组相比; ⁵⁾ $P < 0.05$ 与 UVA + PCF2组相比

Note: ¹⁾ $P < 0.01$, vs control; ²⁾ $P < 0.01$, vs UVA; ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$, vs UVA + PCF1; ⁵⁾ $P < 0.05$, vs UVA + PCF2

3

紫外线可诱导皮肤细胞的凋亡。角质形成细胞是表皮的主要构成细胞, Miyachi等^[6]在 1983年发现的表皮内日晒伤细胞 (sunburn cell)实际上就是由紫外线所致进入凋亡的角质形成细胞,因而本实验采用角质形成细胞 HaCaT作为受试细胞进行研究。研究已证明,多种抗氧化剂如绿茶多酚、维生素 C、维生素 E可抑制紫外线引起角质形成细胞凋亡。PCF是一相对分子质量小、水溶性强、低致敏、具有我国自主知识产权的海洋抗氧化多肽。以往的研究表明, PCF可抑制 UVA诱导的角质形成细胞的凋亡^[5],本实验结果进一步阐明: PCF通过抑制 p38 MAPK及 caspase-3的激活而发挥抗凋亡作用。

细胞凋亡有多种检测方法, PI染色法是为常用的流式细胞凋亡定量检测技术。在本实验中采用正交实验设计及 PI染色法,确定了以 $8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVA照射 HaCaT细胞后 18 h作为凋亡检测模型。根据细胞凋亡时 DNA断裂形成不同倍数的 180200碱基对核酸片段,在琼脂糖凝胶电泳上可呈现阶梯状条带 (DNA ladder)的特征,我们又进一步观察了 PCF对 UVA诱导 HaCaT细胞凋亡的影响,结果显示, $1.425.69 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内的 PCF均可有效抑制 UVA引起的 DNA ladder的形成。

促细胞分裂剂激活性蛋白激酶 (MAPK) 家族

在紫外线引起的信号转导中起重要的调节作用。p38是MAPK家族成员之一,紫外线照射可引起p38 MAPK磷酸化而活化,通过磷酸化活化转录因子调控特定基因的表达,从而将信号从细胞外传导到细胞核。p38 MAPK在紫外线引起的细胞凋亡中的作用仍有争议:Assefa等^[7]的研究表明,p38 MAPK通过介导线粒体细胞色素C的释放而引起UVB辐射的HaCaT细胞凋亡;然而,Chouinard等^[8]的实验发现,UVB引起的p38 MAPK的激活可通过稳定胞浆p53而增强角质形成细胞对凋亡的抵抗力。正是这种争议说明,p38 MAPK在紫外线诱发细胞凋亡中有相当重要的作用。事实上,细胞种类、紫外线性质(波长及剂量)、p38 MAPK的激活水平及持续时间、不同p38亚基被选择性激活等诸多因素都会对p38 MAPK的作用产生影响。在本实验中我们采用琼脂糖凝胶电泳的方法,证明加入p38抑制剂SB203580可明显抑制DNA ladder的形成,说明p38 MAPK的激活可促进UVA诱导的HaCaT细胞凋亡。UVA照射HaCaT细胞后30 min,用蛋白质印迹可检测到磷酸化p38的明显表达,预先给予PCF可剂量依赖性抑制磷酸化p38表达,说明PCF可通过抑制p38 MAPK的激活而抑制HaCaT细胞凋亡。

细胞凋亡是一个复杂的、由caspase家族成员介导的蛋白酶级联反应过程。Caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的效应性蛋白裂解酶,活化的caspase-3能裂解大量的底物,包括抗凋亡成分及结构或看家蛋白,引起细胞凋亡。本研究中预先给予caspase-3特异性抑制剂Ac-DEVD-CHO,可显著抑制UVA引起的HaCaT细胞DNA ladder的形成,说明UVA诱导的HaCaT细胞凋亡为caspase-3依赖性。本实验中应用荧光标记活化caspase-3抗体与凋亡细胞中活化的caspase-3相结合,用流式细胞仪即可检测到活化caspase-3的含量。应用PCF后,明显抑制UVA引起的caspase-3活性增加,且呈剂量依赖性,提示PCF可通过抑制caspase-3的激活而抑制UVA诱导的HaCaT细胞凋亡。

Assefa等^[7]的实验表明,预先给予p38 MAPK抑制剂可抑制UVB引起的caspase-3的激活,而

caspase-3抑制剂对p38 MAPK的活化没有影响,说明在紫外线引起的细胞凋亡信号传导中,p38 MAPK处于caspase-3的上游,p38 MAPK的激活参与了caspase-3的活化。本研究中,UVA照射后30 min即有磷酸化p38的明显表达,12 h有caspase-3的活化,18 h可检测到明显的凋亡,说明p38 MAPK-caspase-3途径可能参与了UVA诱导的HaCaT细胞凋亡。PCF对UVA引起的HaCaT细胞凋亡的抑制作用部分通过抑制该通路实现。

总之,本研究从p38 MAPK信号转导途径及caspase-3的角度解释了PCF抗UVA引起的HaCaT细胞凋亡的可能机制,为PCF在紫外防护方面的应用提供了重要的理论基础。研究表明,在紫外线引起的信号转导中,p38 MAPK的激活与某些凋亡相关转录因子如p53,AP-1,NF- κ B的活化有关,因此我们今后的研究将着眼于PCF通过p38 MAPK通路对这些转录因子的影响,进一步阐明PCF抗紫外线凋亡的分子机制。

REFERENCES

- [1] DE GRUILL FR. Skin cancer and solar UV radiation [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(14): 2003-2009.
- [2] WANG CB, YAO R Y, LU Z T, *et al*. Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice damaged by ultraviolet A [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, 23(9): 813-818.
- [3] YAO R Y, WANG C B. Protective effects of polypeptide from *Chlamys farreri* on HeLa cells damaged by ultraviolet A [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, 23(11): 1018-1022.
- [4] HAN Y T, HAN ZW, YU G Y, *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(3): 265-274.
- [5] DOU M, HAN Y T, HAN ZW, *et al*. Inhibitory effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on UVA induced apoptosis in human keratinocytes [J]. *Invest New Drugs*, 2004, 22(4): 391-398.
- [6] MIYACHI Y, HORD T, MAMURA S. Sunburn cell formation is prevented by scavenging oxygen intermediates [J]. *Clin Exp Dermatol*, 1983, 8(3): 305-310.
- [7] ASSEFA Z, VANTIEGHEM A, GARMYN M, *et al*. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome C release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21416-21421.
- [8] CHOUINARD N, VALERIE K, ROUABHIA M, *et al*. UVB mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53 [J]. *Biochem J*, 2002, 365(Pt1): 133-145.

(收稿日期:2006-03-23)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告