

# 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体及扇贝多肽在 UVA 诱导 HaCaT 细胞凋亡中的作用

王贞丽<sup>1,2</sup>, 李金莲<sup>1</sup>, 王春波<sup>1</sup>

(1. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266071; 2 济南军区青岛第一疗养院, 山东 青岛 266071)

中国图书分类号: R 967; R 931. 77; R 122. 2

文献标识码: A 文章编号: 1001 - 1978(2007) 10 - 1375 - 05

**摘要:**目的 研究 UVA 对 HaCaT 细胞肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 表达的影响; 复制 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡模型, 探究 TRAIL 在 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡中的作用及扇贝多肽 (Polypeptide from *Chlamys farreri*, PCF) 对 UVA 诱导的 TRAIL 凋亡通路的影响。方法 实验设计分为 5 组: 对照组、UVA 模型组、UVA + 5.69 mmol · L<sup>-1</sup> PCF 组、UVA + 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF 组、UVA + 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF 组。Real-Time PCR 检测 TRAIL mRNA 表达; 蛋白质印迹法检测 TRAIL 蛋白表达及 caspase-8 活性; 琼脂糖凝胶电泳分析 TRAIL 中和性抗体对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的影响。结果 8 J · cm<sup>-2</sup> UVA 照射 HaCaT 细胞后 TRAIL mRNA 及蛋白表达增加, 与对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); TRAIL 中和性抗体对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡有抑制作用; 1.42 ~ 5.69 mmol · L<sup>-1</sup> 剂量范围内的 PCF 可剂量依赖性抑制 UVA 引起的 HaCaT 细胞 TRAIL mRNA 及蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); PCF 对 UVA 引起的 HaCaT 细胞 caspase-8 的活化有抑制作用, 且呈量效关系。结论 UVA 可增强 HaCaT 细胞 TRAIL 表达; TRAIL 参与了 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡; PCF 对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞 TRAIL 表达有抑制作用, 也可减弱 UVA 诱导的 caspase-8 活化, 以其抗氧化活性抑制 TRAIL 凋亡通路而发挥抗凋亡作用。

**关键词:** UVA; 扇贝多肽; HaCaT; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; caspase-8; 凋亡

过量紫外线照射引起的皮肤损伤日益成为人们关注的健康问题之一, 可引发日光性皮炎、皮肤老化、皮肤肿瘤等多种皮肤疾病。UVA 在太阳光中占了紫外辐射能量的近 95%, 并且比 UVB 有更强的穿透力, 因而对 UVA 的防护越来越受到人们的重视。扇贝多肽 (Polypeptide from *Chlamys farreri*,

PCF) 是自海洋贝类废弃物中提取、分离、纯化出的含八个氨基酸的多肽, 相对分子量 879。我们以往的研究表明, PCF 对 UVA 引起的无毛小鼠皮肤、人 HeLa 上皮细胞及皮肤成纤维细胞的损伤具有保护作用<sup>[1-3]</sup>; PCF 可抑制 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡<sup>[4]</sup>。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 亦称凋亡素-2 配体 (Apo2-ligand, Apo2L), 1995 年由 Wilely 首先报道, 是肿瘤坏死因子家族新成员, 由于其可诱导多种细胞系的凋亡而成为近年来研究的热点<sup>[5, 6]</sup>。本研究将探究 UVA 对 HaCaT 细胞中 TRAIL 表达的影响, 并进一步阐明 TRAIL 在 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡中的作用及 PCF 对 TRAIL 凋亡通路的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和器材** PCF 由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<sup>-1</sup> 的储存液, 4 °C 保存备用。DMEM 培养基为 Gibco 产品; 中和性 TRAIL 单克隆抗体购自 Sigma 公司; caspase-8 p20 (H-134) 抗体购自 Santa Cruz 公司;  $\beta$ -actin 抗体购自北京博奥森; TaKaRa RNA iso Reagent, ExScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; Real-Time PCR 引物由北京三博远志生物工程有限公司合成; 紫外辐照仪购自北京师范大学; Rotor-gene 3 000 荧光定量 PCR 仪为 Corbett Research 公司产品。

**1.2 细胞培养、分组及紫外线照射** 人角质形成细胞株 HaCaT 由韩国延世大学丁肇晓博士惠赠, DMEM 培养基常规培养。实验前将细胞接种于六孔板中, 随机分为 5 组: 对照组、UVA 模型组、UVA + 5.69 mmol · L<sup>-1</sup> PCF 组、UVA + 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF 组、UVA + 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF 组。待细胞生长至 0.80 ~ 0.90 融合时即可进行 UVA (8 J · cm<sup>-2</sup>) 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 Real-Time PCR

收稿日期: 2007 - 04 - 20, 修回日期: 2007 - 07 - 15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No 30471458)

作者简介: 王贞丽 (1971 - ), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 抗衰老药理学, Tel: 0532-83985655, E-mail: qdwzhenli@163.com;  
王春波 (1955 - ), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗衰老药理学, 通讯作者, Tel: 0532-83780029, Fax: 0532-83780029, E-mail: cbwang66@126.com

**1.3.1 总 RNA 的提取与反转录** 按 TaKaRa RNA iso Reagent 试剂说明抽提 HaCaT 细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定  $A_{260}$  和  $A_{280}$ , 计算 RNA 浓度并评估纯度。按试剂盒 (ExScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit) 说明进行反转录, 20  $\mu$ l 反应体系中含总 RNA 1  $\mu$ g, 5  $\times$ ExScript<sup>TM</sup> Buffer 4  $\mu$ l, 1  $\mu$ l dNTP Mixture (各 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), Random 6 mers (100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ l, ExScript<sup>TM</sup> RTase (200 U  $\cdot$   $\mu$ l<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ l, RNase Inhibitor (40 U  $\cdot$   $\mu$ l<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ l, 42 15 min, 95 2 min。合成好的 cDNA 置 -20 保存备用。

**1.3.2 PCR 反应** 将反转录得到的 cDNA 溶液用 easy dilution (TaKaRa), 按 10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> 进行梯度稀释, 以不同稀释度的 cDNA 为模板扩增目的基因和看家基因, 以相对起始浓度和 Ct 值为 X、Y 轴, 制作标准曲线。按试剂盒 (SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>) 说明进行 Real-Time PCR 反应, 在 25  $\mu$ l 反应体系中含有 2  $\times$ SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 12.5  $\mu$ l, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l。TRA L-forward 5'-GTGTA CTTTACCAAC-3'; TRA L-reverse 5'-TTGCTCA GGAATGAA TGC-3'; GAPDH-forward 5'-CGTGGAAGGACTCATGACCA-3'; GAPDH-reverse 5'-TCCAGGGGICTTACTCCTTG-3。循环参数为 95 10 s, 然后 94 40 s, 60 40 s, 72 40 s, 共 60 个循环。每个样品做 3 个平行管。

**1.4 免疫印迹 (Western blot)** 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  $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞加 100  $\mu$ l 裂解液 [20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EGTA, 体积分数 0.01 的 Triton X-100, 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 焦磷酸钠 (sodium pyrophosphate), 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸甘油 (glycerophosphate), 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 亮抑酶肽 (leupeptin), 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 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  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 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  $\mu$ g 蛋白质, SDS-PAGE 电泳; 蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 封闭液室温封闭 1 h; 加一抗, 4 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 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。

**1.5 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡** 按以往报道的方法建立 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡模型<sup>[7]</sup>。

UVA 照射前 1 h 加入中和性 TRA L 抗体 (2 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 培育, 照射后 18 h 收集细胞, PBS 洗 2 次, 加入 500  $\mu$ l 细胞裂解液 [150 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA, 质量浓度为 5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 SDS, 500 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 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  $\times$ g 离心 5 min, 取上清; 加入 1/10 体积的 3 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, -20 过夜沉淀 DNA; 12 000  $\times$ g 离心 10 min, 收集沉淀, 体积分数为 0.70 的冷乙醇漂洗一次; 沉淀溶于 50  $\mu$ l TE 缓冲液 [10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA] 中, 加入 RNA 酶, 使其终浓度为 20 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 37 水浴 30 min; 含溴化乙啶的 15 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳, 观察 DNA ladder。

**1.6 统计学分析** 计量资料用表示, SPSS 软件进行单因素方差分析及 Q 检验。

**2 结果**

**2.1 PCF 对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞 TRA L mRNA 表达的影响** UVA 照射前 2 h 加 PCF, 照射后 2 h 收集细胞, 提取 RNA, 反转录后进行 Real-Time PCR 反应。标准曲线见 Fig 1, TRA L 相关系

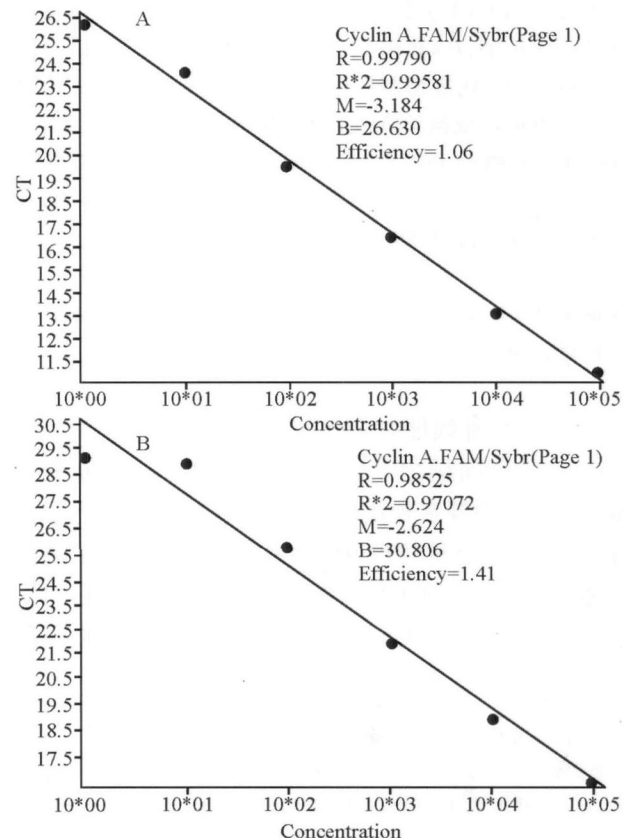


Fig 1 Standard curve in Real-Time PCR

A: TRA L; B: GAPDH

数为 0.998,斜率为 - 3.184; GAPDH 相关系数为 0.985,斜率为 - 2.624,说明了标准品的质量好,定量体系准确。

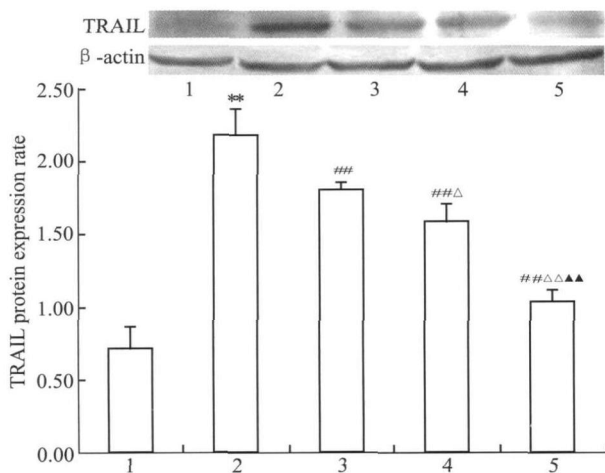
目的基因表达量以 TRAIL 基因浓度 /GAPDH 基因浓度表示,结果见 Tab 1。可见 UVA 模型组 TRAIL 基因表达量明显增加,与对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); PCF 各剂量组 TRAIL 基因表达量均低于模型组,且呈量效关系 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。

**Tab 1 Effect of PCF on UVA-induced TRAIL mRNA expression in HaCaT cells**( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Group	TRAIL/GAPDH
Control	0.17 $\pm$ 0.02
UVA model	0.46 $\pm$ 0.06 **
UVA + 5.69 mmol · L <sup>-1</sup> PCF	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>
UVA + 2.84 mmol · L <sup>-1</sup> PCF	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>
UVA + 1.42 mmol · L <sup>-1</sup> PCF	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>

Note: \*\*  $P < 0.01$  vs control; <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs UVA model;  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$  vs 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF;  $P < 0.05$  vs 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF

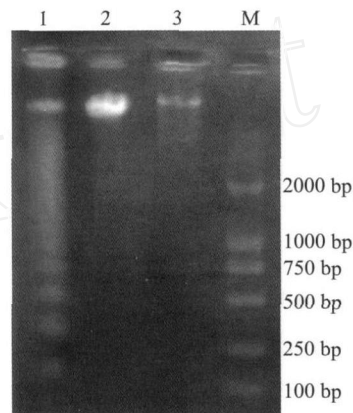
**2.2 PCF对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞 TRAIL 蛋白表达的影响** UVA 照射前 2 h 加 PCF,照射后 3 h 收集细胞,Western blot 检测 TRAIL 蛋白表达,蛋白表达水平以 TRAIL 与  $\beta$ -actin 光密度比值表示。可见 (Fig 2) UVA 照射后,模型组 TRAIL 蛋白表达明显增强 ( $P < 0.01$ ),各剂量 PCF 组 TRAIL 蛋白表达均低于模型组,且随 PCF 剂量增加抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖性 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。



**Fig 2 Effect of PCF on UVA-induced TRAIL protein expression in HaCaT cells**( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

1: Control; 2: UVA model; 3: 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF; 4: 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF; 5: 5.69 mmol · L<sup>-1</sup> PCF; \*\*  $P < 0.01$  vs control; <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs UVA model;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  vs 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF;  $P < 0.01$  vs 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF

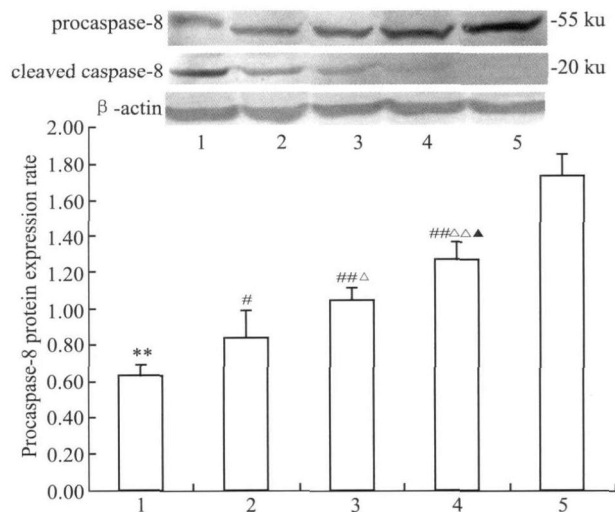
**2.3 TRAIL 抑制剂对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的影响** 用中性 TRAIL 单克隆抗体与 TRAIL 结合,以抑制 TRAIL 的生物学活性,然后用 DNA ladder 观察 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡。结果如 Fig 3 所示,UVA 模型组有明显的 DNA 梯形带,加入 TRAIL 抗体后未见 DNA ladder 的形成,表明 TRAIL 参与了 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡。



**Fig 3 Effect of TRAIL neutralization antibody on UVA-induced apoptosis in HaCaT cells**

1: UVA model; 2: Control; 3: TRAIL neutralization antibody; M: Marker

**2.4 PCF 对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞 caspase-8 活性的影响** UVA 照射后 6 h 收集细胞,Western Blot 检测 HaCaT 细胞 caspase-8 的活化,结果如 Fig 4 所示,UVA 照射后 caspase-8 酶原蛋白减少,出现



**Fig 4 Effect of PCF on UVA-induced caspase-8 activation in HaCaT cells**( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

1: UVA model; 2: 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF; 3: 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF; 4: 5.69 mmol · L<sup>-1</sup> PCF; 5: control; \*\*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs UVA model;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  vs 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF;  $P < 0.05$  vs 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF

活性裂解片段 p20。加入 PCF 后,活性裂解片断明显减少,且 caspase-8 酶原 /  $\alpha$ -actin 光密度比值有随 PCF 剂量增加而增大的趋势 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 说明 PCF 可有效抑制 UVA 诱导的 HaCaT 细胞 caspase-8 的活化。

### 3 讨论

TRAIL 存在于人体的大多数器官和细胞,在许多组织和细胞中都能检测到 TRAIL mRNA 的表达<sup>[5,6]</sup>。TRAIL 在皮肤中的生理学作用还未完全阐明。研究表明,TRAIL 能够削弱衰老的角质形成细胞对凋亡的抵抗力<sup>[8]</sup>,说明 TRAIL 在维持表皮内环境的稳定中发挥重要作用。本研究从 mRNA 及蛋白水平检测了 UVA 对 HaCaT 细胞 TRAIL 表达的影响,结果显示:UVA 可引起 HaCaT 细胞中 TRAIL 表达增加,说明 TRAIL 参与了 UVA 诱导的 HaCaT 细胞信号传导。在以往的研究中,我们已成功建立了 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡模型<sup>[7]</sup>,本实验复制此凋亡模型以研究 TRAIL 在 UVA 诱导凋亡中的作用。应用 TRAIL 中和性抗体抵消 TRAIL 的生物学作用后,UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡被抑制,提示 TRAIL 在 UVA 引起的 HaCaT 细胞凋亡中发挥重要作用。PCF 可剂量依赖性降低 UVA 引起的 TRAIL 表达,说明 PCF 对凋亡的抑制作用与 TRAIL 有关。

caspase-8 在 TRAIL 诱导的凋亡过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。本实验用 Western blot 检测 caspase-8 的活性,在  $8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  UVA 照射后 6 h, caspase-8 产生明显的活化片段,预先给予 PCF 可剂量依赖性抑制 caspase-8 酶原的活化,进一步证明 PCF 可抑制 TRAIL 凋亡通路。

TRAIL 诱导的凋亡信号传导与 ROS 有关。在 Lee 等<sup>[10,11]</sup>的研究中,TRAIL 可引起 HeLa 细胞 ROS 的产生增加,预先给予抗氧化剂还原性谷胱甘肽 (GSH) 或雌激素可有效抑制 TRAIL 引起的凋亡性细胞死亡。最近 Perez-Cruz 等的研究也表明<sup>[12]</sup>,抗氧化剂维生素 C 能够有效抑制 TRAIL 诱导的 ROS 产生及 caspase-8 的活化,证明了氧化抑制在 TRAIL 诱导的凋亡通路中发挥重要作用。以往研究已证明,PCF 是一海洋抗氧化多肽,可抑制 UVA 诱导的 ROS 的产生<sup>[3,4]</sup>,因而可能通过其抗氧化活性抑制 TRAIL 凋亡通路而抑制 UVA 诱导的凋亡。

总之,UVA 可诱导 HaCaT 细胞 TRAIL 表达增加,TRAIL 在 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡中具有重要作用;PCF 抑制 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡机制与 TRAIL 通路有关,PCF 可直接抑制 TRAIL 的

表达,或以其抗氧化活性抑制 TRAIL 凋亡通路。此研究为 PCF 在紫外防护方面的应用提供了重要的理论基础。

### 参考文献:

- [1] Wang CB, Yao R Y, Liu Z T, et al Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice damaged by ultraviolet A [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(9): 813 - 8
- [2] Yao R Y, Wang CB. Protective effects of polypeptide from *Chlamys farreri* on HeLa cells damaged by ultraviolet A [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(11): 1018 - 22
- [3] Han Y T, Han Z W, 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 - 74.
- [4] 龚梅, 初晓, 张杰, 等. 扇贝多肽保护单次 UVA 氧化损伤 HaCaT 细胞 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 416 - 20.
- [4] Dou M, Chu X, Zhang J, et al Polypeptide from *chlamys farreri* protect HaCaT cells from single UVA induced oxidative damages [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, 22(4): 416 - 20.
- [5] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 673 - 82.
- [6] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 12687 - 90.
- [7] 李金莲, 严州萍, 陈雪红, 等. 扇贝多肽抑制紫外线 A 波诱导的 HaCaT 细胞凋亡依赖 p38MAPK 通路和 caspase-3 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(2): 40 - 4.
- [7] Li J L, Yan Z P, Chen X H, et al Polypeptide from *Chlamys farreri* inhibits UVA-induced apoptosis of HaCaT Cells depending on p38 MAPK Pathway and caspase-3 [J]. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*, 2007, 42(2): 40 - 4.
- [8] Qin J Z, Bacon P E, Chaturvedi V, et al Pathways involved in proliferating, senescent and immortalized keratinocyte cell death mediated by two different TRAIL preparations [J]. *Exp Dermatol*, 2002, 11(6): 573 - 83.
- [9] Kim I K, Chung C W, Woo H N, et al Reconstitution of caspase-8 sensitizes JB6 cells to TRAIL [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277(2): 311 - 6.
- [10] Lee M W, Park S C, Kim J H, et al The involvement of oxidative stress in tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in HeLa cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 182(1): 75 - 82.
- [11] Lee M W, Park S C, Yang Y G, et al The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2002, 512(1-3): 313 - 8.
- [12] Perez-Cruz I, Carcamo J M, Golde D W. caspase-8 dependent trail-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(1): 225 - 34.

# 秋茄提取物抗大鼠实验性胃溃疡作用研究

符健<sup>1,2</sup>, 韩丽<sup>2</sup>, 邢桂兰<sup>2</sup>, 姚茂忠<sup>2</sup>, 鲍时翔<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所; 2. 海南医学院药理学教研室, 海南 海口 571101)

中国图书分类号: R-332; R 284.1; R 329.24; R 363-332; R 573.102.2; R 573.105.31; R 975.6

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2007)10-1379-05

**摘要:**目的 探讨海洋红树林植物秋茄枝水提取物活性部分 B 部位 (fraction B of stem aqueous extracts of *kandelia candel*, SAEKC) 对实验性大鼠胃溃疡的作用及其作用机制。方法 将大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、给药组 (480、240、60 mg · kg<sup>-1</sup> 3 个剂量组) 和西咪替丁组。各组每天灌胃给药 (赋形剂, SAEKC B 和西咪替丁), 连续 3 d。除正常对照组外, 其余各组大鼠在最后一次给药后通过水应激 18 h 建立水浸束缚应激型胃溃疡大鼠模型, 测定溃疡指数 (U I), 计算溃疡抑制率; 同时建立幽门结扎型胃溃疡大鼠模型, 造模

后 17 h 测定溃疡指数, 计算溃疡抑制率, 检测胃液量、胃蛋白酶活性, 血清和胃组织一氧化氮 (NO) 含量。结果 SAEKC B 的高、中、低 3 个剂量组能明显减轻应激型胃溃疡大鼠胃黏膜损伤的程度 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $0 < 0.05$ ), 溃疡抑制率分别为模型对照组的 0.411、0.404、0.254; SAEKC B 能明显减轻幽门结扎型胃溃疡大鼠胃黏膜损伤的程度 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 溃疡抑制率分别为模型对照组的 0.556、0.361、0.306。480、240 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量组能明显降低胃蛋白酶活性和胃液量 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。给药 3 个剂量组均能提高胃组织 NO 含量, 其中 240、60 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量组能明显升高血清 NO 含量 ( $P$  均  $< 0.01$ )。结论 SAEKC B 有明显抗应激型和幽门结扎型大鼠胃溃疡的作用, 其效应呈剂量依赖性。对于幽门结扎型大鼠其机制可能在于减少胃液分泌、降低胃蛋白酶活性、提高血清和胃组织中 NO 水平。

**关键词:** 秋茄; 胃溃疡模型; 抗溃疡作用

收稿日期: 2007-05-29, 修回日期: 2007-06-30

作者简介: 符健 (1959-), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 药理学, Tel/Fax: 0898-66893152, E-mail: fujian\_hmc@163.com;

鲍时翔 (1966-), 男, 博士, 教授, 通讯作者, Tel: 0898-66890695, E-mail: bxqhqh@yahoo.com.cn

红树为自然分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物, 通常生长在港湾河口地区的淤泥质滩涂

## The role of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand and Polypeptide from *Chlamys farreri* in UVA-induced apoptosis in HaCaT cells

WANG Zhen-li<sup>1,2</sup>, LI Jin-lian<sup>1</sup>, WANG Chun-bo<sup>1</sup>

(1. Qingdao University Medical College, Qingdao Shandong 266071, China; 2. The First Sanatorium of Ji nan Military Command in Qingdao, Qingdao Shandong 266071, China)

**Abstract:** **Aim** To investigate the impact of UVA on expression of tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and study the role of TRAIL in UVA-induced apoptosis of HaCaT cells as well as the influence of Polypeptide from *Chlamys farreri* (PCF) on TRAIL apoptotic pathway induced by UVA.

**Methods** Cells were divided into five groups: control group, UVA model group, UVA + 5.69 mmol · L<sup>-1</sup> PCF group, UVA + 2.84 mmol · L<sup>-1</sup> PCF group, UVA + 1.42 mmol · L<sup>-1</sup> PCF group. Expression level of TRAIL mRNA was assayed by Real-Time PCR. Western blot analysis was used to determine the protein level of TRAIL and caspase-8 activation. The effect of TRAIL neutralization antibody on UVA-induced apoptosis was also investigated. **Results** TRAIL mRNA and protein levels increased after 8 J · cm<sup>-2</sup> UVA radi-

ation and the discrepancy was significant compared with control group ( $P < 0.01$ ). TRAIL neutralization antibody had inhibitory effect on UVA-induced apoptosis of HaCaT cells. 1.42 ~ 5.69 mmol · L<sup>-1</sup> PCF inhibited UVA-induced expression of TRAIL in HaCaT cells dose-dependently ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). PCF attenuated UVA-induced caspase-8 activation in a dose-dependent manner. **Conclusions** The enhancement of TRAIL expression induced by UVA in HaCaT cells indicated the involvement of TRAIL in UVA-induced apoptosis. PCF could attenuate UVA-induced TRAIL expression and block TRAIL apoptotic pathway, which may be attributed to its anti-apoptotic effect.

**Key words:** UVA; Polypeptide from *Chlamys farreri* (PCF); HaCaT; tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL); caspase-8; apoptosis