

· 论 著 ·

# 紫外线对 HaCaT 细胞损伤作用的研究

黄静红<sup>1</sup>,李德如<sup>2</sup>,阎国富<sup>2</sup>

(1. 四川省都江堰市医疗中心皮肤科 646000; 2. 重庆市第一人民医院皮肤科 400010)

**摘要:**目的 探讨中波紫外线(UVB)对人永生化角质形成细胞(HaCaT 细胞)的损伤影响,建造 UVB 损伤人表皮细胞的模型,以方便进行实验室光损伤研究。方法 取培养的 HaCaT 细胞,用 10、30、50、70、90 mJ/cm 的 UVB 照射后继续培养 24 h,在光学显微镜下观察细胞的形态学改变,以 MTT 法检测细胞的增殖活性,以 ELISA 法测定细胞上清液中 TNF- $\alpha$  的水平,以流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 随 UVB 照射剂量的增加,在光镜下可见 HaCaT 细胞不同程度的损伤,其增殖活性降低, $P < 0.01$ ;细胞上清液中 TNF- $\alpha$  的水平增加, $P < 0.01$ ;凋亡率增加, $P < 0.01$ 。结论 UVB 可损伤 HaCaT 细胞,降低增殖活性,增加细胞上清液中 TNF- $\alpha$  的水平,诱导细胞凋亡,并且呈剂量依赖性。在实验中,可根据需要调节不同的 UVB 照射剂量,建造所需的细胞损伤模型。

**关键词:**紫外线;HaCaT 细胞;损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.025

中图分类号:R758.102

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3212-02

## Damage effect of UVB on HaCaT cells

HUANG Jing-hong<sup>1</sup>, LI De-ru<sup>2</sup>, YAN Guo-fu<sup>2</sup>

(1. Department of Dermatology, Dujiangyan Medical Center, Sichuan 611830, China;

2. Department of Dermatology, The First Hospital of Chongqing, Chongqing 400100, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effect of UVB in different dosage on injury of HaCaT cells and find a suitable way to construct model of injured by UVB for empirical study. Methods Cultured HaCaT cells were exposed to 10, 30, 50, 70, 90 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and subsequently incubated for 24 hours. Light microscope to observe the structure of HaCaT cell. MTT assay was used to test the viability of HaCaT cell. A specific ELISA to detect the concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$ , and a flow cytometry was used to measured apoptotic rate. Results The cellular structure underwent severe damage due to UVB irradiation. UVB irradiation reduced the viability of HaCaT cell ( $P < 0.01$ ), elevated the level of the concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), enhanced the apoptotic rate of HaCaT cells ( $P < 0.01$ ). Conclusion The injury of UVB treated HaCaT cells appeared in dose-dependent, we can construct different models as we need from it. On the other way, UVB is able to induced the viability and apoptosis of HaCaT cells, elevation the level of tumor necrosis factor- $\alpha$ .

**Key words:** UVB; HaCaT cells; damage

人角质形成细胞(keratinocytes, KC)位于皮肤的表层,约占表皮细胞的 80%以上,是紫外线(UVB)辐射作用的主要靶细胞。KC 也是皮肤免疫系统的重要组成部分,可分泌多种细胞因子, TNF- $\alpha$  是其合成的主要表皮细胞因子之一<sup>[1]</sup>,参与 UVB 引起的皮肤炎症反应过程及免疫调节,并在 UVB 介导的细胞凋亡中起重要作用<sup>[2-4]</sup>。此外 UVB 辐射诱使皮肤 KC 所分泌的 TNF- $\alpha$  和其他一些白细胞介素,例如 IL-10、IL-6 等<sup>[5-6]</sup>,它们可能分别与抑制迟发型超敏反应(DTH)和接触过敏有关<sup>[7]</sup>。因此,UVB 引起的皮肤光老化和光损伤成为近年来研究的热点之一。作者采用不同剂量的 UVB 对人永生化角质形成细胞(HaCaT)进行辐射观察其细胞学形成的变化,以 MTT 法检测细胞的增殖活性,以流式细胞术检测细胞凋亡率,以 ELISA 法测定细胞上清液中 TNF- $\alpha$  的水平,现将结果报道如下。

### 1 材料与方

**1.1 细胞株** HaCaT 细胞购自武汉大学生命科学院典型物种保藏中心。

**1.2 试剂** 1640(GIBCO 公司)、10%胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限公司)、MTT 粉(成都华美生物试剂公司);

TNF- $\alpha$  试剂盒(R&D 公司)、Annexin V 试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司)等。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** 将 HaCaT 细胞接种于培养瓶中,加入含 10%胎牛血清的 1640 培养基,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。当细胞长至 90%融合时传代,待获得足够的细胞后,用 0.25%胰酶和 0.02%EDTA 消化,离心。根据实验需要,用含 10%胎牛血清的 1640 培养基调整细胞浓度,定量接种于 96 孔板上培养,备用。

**1.3.2 UVB 照射 HaCaT 细胞** 将 HaCaT 细胞接种于培养板中,待细胞长至 90%融合时,将其随机分为 UVB 照射组(10、30、50、70、90 mJ/cm<sup>2</sup>)和非 UVB 照射组(对照组,0 mJ/cm<sup>2</sup>)。小心吸去孔板中培养基,加入少许 PBS 液,以刚好覆盖孔底为宜,置于中波 UVB 灯下 15 cm 处,调定好 UVB 剂量,UVB 按 0、10、30、50、70、90 mJ/cm<sup>2</sup> 照射 HaCaT 细胞,照射完成后换为培养基继续培养。

**1.3.3 光学显微镜观察** 观察细胞经 UVB 光照后的形态学变化。

**1.3.4 MTT 法测定 UVB 照射后细胞的增殖活性** 将培养瓶

中生长至 90% 融合的 HaCaT 细胞接种至 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu$ L, 细胞浓度为  $1 \times 10^5$  /mL, 次日行 UVB 照射。照射时随机分为照射组 5 块板和非照射对照组 1 块板, 每 1 块板为 1 个剂量组, 均设 5 复孔。照射后继续在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 10  $\mu$ L, 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入二甲亚砜 150  $\mu$ L, 轻微振荡 10 min, 待蓝色颗粒完全溶解后, 立即用全自动酶标仪检测每孔 OD490 值, 计算细胞增殖活性。

**1.3.5 ELISA 法测定 UAB 照射后细胞上清液中 TNF- $\alpha$  的分泌量** 将细胞接种至 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu$ L, 细胞浓度为  $1 \times 10^5$  /mL, 照射 24 h 后收集细胞培养液, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$  的分泌量。在以吸光度值为纵轴, TNF- $\alpha$  浓度值为横轴的坐标系里绘制出标准曲线, 在酶标仪上读取待测标本的吸光度值, 在标准曲线上查出其浓度。

**1.3.6 流式细胞仪分析照射后细胞凋亡率** 将传至 6 孔板的细胞 (90% 左右融合) 在照射前弃去培养液, 每孔加入 1 mL

PBS 后照射。照射后继续培养 24 h 后, 用 0.25% 胰酶 (不含 EDTA) 消化收集细胞, 稀释成单细胞悬液 (细胞数应达到  $10^6$  个/mL), 吸取细胞悬液于离心管, 4  $^{\circ}$ C、2 000 r/min 离心 5 min; 吸去上清液, 加预冷的 PBS 漂洗 2 次, 加 0.5 mL 冰浴的 PBS, 迅速放于冰上保存 (防止细胞继续凋亡); 用 300 孔/cm<sup>2</sup> 滤网过滤, 去除未完全消化的细胞团块; 吸取约 0.5 mL 细胞悬液, 加入 5  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 与 2.5  $\mu$ L PI 混匀; 30 min 内用流式细胞仪检测。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS15.0 统计软件分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。各组间 LSD 法做两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 UVB 照射 HaCaT 细胞后 24 h, 光学显微镜下可观察到细胞损伤的形态变化, 10、30、50、70、90 mJ/cm<sup>2</sup> UVB 的损伤依次逐渐加重, 分别如图 1 所示, 表现为细胞肿胀, 脱落, 细胞碎屑增多, 漂浮于培养基中, 与对照组相比, 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB 对细胞损伤较轻, 以 90 mJ/cm<sup>2</sup> UVB 的损伤最重。**

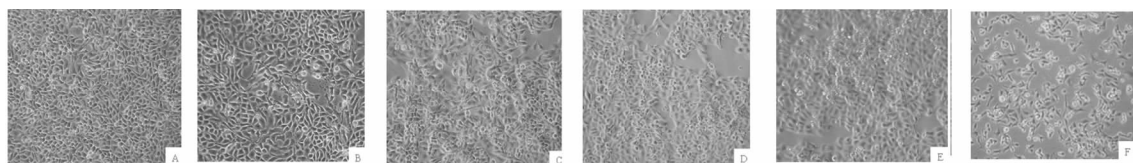


图 1 A~F 依次为 0、10、30、50、70、90 mJ/cm<sup>2</sup> UVB 照射后 24 h HaCaT 细胞形态。

**2.2 UVB 对 HaCaT 细胞照射达 90% 融合时, 24 h 后分别检测细胞的生存率、细胞 TNF- $\alpha$  的分泌水平以及细胞凋亡情况。随照射剂量的增加, 细胞生存率降低, TNF- $\alpha$  的分泌含量逐渐增加, 凋亡细胞的百分率逐渐增加, 见表 1。**

表 1 不同剂量的 UVB 照射 HaCaT 细胞 24 h 后各指标值变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

UVB 剂量 (mJ/m <sup>2</sup> )	MTT (OD 值)	TNF- $\alpha$ 分泌水平 (pg/mL)	细胞凋亡 (%)
0	1.33 $\pm$ 0.06	4.85 $\pm$ 0.23	3.31 $\pm$ 0.42
10	1.23 $\pm$ 0.05	6.97 $\pm$ 0.88	11.89 $\pm$ 1.28
30	1.13 $\pm$ 0.09	12.98 $\pm$ 1.37	17.30 $\pm$ 1.59
50	1.07 $\pm$ 0.09	22.60 $\pm$ 1.52	28.09 $\pm$ 1.27
70	0.77 $\pm$ 0.04	34.28 $\pm$ 0.91	34.09 $\pm$ 1.33
90	0.46 $\pm$ 0.03	44.51 $\pm$ 1.64	37.93 $\pm$ 1.13
F	102.34	532.94	364.17
P	<0.01	<0.01	<0.01

**3 讨 论**

过量日光 UVB 照射可以引发日光性皮炎、皮肤光老化和皮肤癌等疾病。自然界中 UVB 分 3 类, UVA、UVB 和 UVC, 其中 UVC 被臭氧层吸收几乎不能到达地面, 因此引起人皮肤损伤的 UVB 成分主要是 UVB 和 UVA, 而对正常人的皮肤能产生红斑等致病作用的光谱主要是 UVB。UVB 可使体内外角质形成细胞发生凋亡<sup>[8-9]</sup>, 其具体机制较为复杂, 其中对 DNA 的直接损伤、诱导活性氧族 (ROS) 的形成及细胞膜表面死亡受体的活化被认为是主要机制<sup>[10]</sup>。在本实验中当给

HaCaT 细胞予不同剂量的 UVB 照射后, 与对照组比较, 照射组的细胞受到不同程度的损伤, 并且 UVB 对 HaCaT 细胞的损伤作用呈剂量依赖性, 随着 UVB 剂量呈 10、30、50、70 和 90 mJ/cm<sup>2</sup> 增大, 细胞受到的损伤越大。这表现在随着 UVB 剂量逐次增大时, 细胞发生形态学损伤越严重, 细胞增殖活性逐渐减小。而流式细胞仪检测结果也提示细胞凋亡率随着 UVB 照射剂量的增大而增加, 这与陈向齐等<sup>[11]</sup>在进行中波 UVB 对人 HaCaT 细胞株凋亡和死亡的影响研究一致。有研究表明, UVB 照射 HaCaT 细胞后, 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  等细胞因子的分泌量增加<sup>[12]</sup>, 在本实验结果也显示 HaCaT 细胞经 UVB 照射后 TNF- $\alpha$  的水平增加, 并且随着 UVB 照射剂量的增加而增加。

本实验结果显示 UVB 照射对 HaCaT 细胞的损伤是肯定的, 随着 UVB 照射剂量的增加, HaCaT 细胞的外形损伤越严重, 增殖活性降低, 其凋亡率增加, 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  等细胞因子的分泌量也增加, UVB 对 HaCaT 细胞的损伤呈剂量依赖性。据此, 在实验中根据具体情况的需求可制造出不同程度的 UVB 损伤 HaCaT 的细胞模型。

**参考文献:**

[1] Susan L, Walker, Antony R. An action spectrum (290 ~ 320 nm) for TNF<sub>α</sub> protein in human skin in vivo suggests that basal-layer epidermal DNA is the chromophore[J]. Pnas, 2007, 104(48): 19052.  
 [2] Suzuki T, Yoshida M, Yamada M, et al. Misincorporation of 2'-deoxyoxanosine 5'-triphosphate by DNA polymerases and its implication for mutagenesis[J]. Biochemistry, 1998, 37: 11592. (下转第 3216 页)

IL-10 水平一直不降,将会转为促进疾病的发展与加剧;如果中西医结合治疗,一方面可以使 IL-10 水平在适当的时候减低,另一方面在提高疗效的同时,能有效地减少激素的不良反应。关于 IL-10 的研究目前仍存在争议,尚需进一步进行深入研究,目前国内有关于中药与 IL-10 水平的高低与 SLE 中医辨证分型关系的研究,发现对其含量的测定与 SLE 的诊断与辨证有一定参考价值<sup>[15]</sup>,但尚无动态水平的观察,考虑如在临床疗效观察中进行连续的不同时相的 IL-10 水平测定,观察其与用中药治疗、中西医结合治疗与病情变化的关系等,可能才能更好地评价中药的疗效。

通过以上分析,本研究从细胞分子水平进一步深入分析相关细胞因子在中药治疗 SLE 中的变化及意义,不仅可为今后系统研究中中药治疗 SLE 的免疫学机制提供参考,也可为临床进行针对性治疗提供依据。

#### 参考文献:

- [1] Santiago-Raber ML, Laporte C, Reininger L, et al. Genetic basis of murine lupus[J]. *Autoimmun Rev*, 2004, 3: 33.
- [2] Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation[J]. *Immunity*, 2008, 28(1): 18.
- [3] Stohl W. BlyS fulness does not equal bliss fulness in systemic lupus erythematosus: a therapeutic role for BlyS antagonists[J]. *Curr Dir Autoimmun*, 2005, 8: 289.
- [4] Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(6): 1313.
- [5] Gavin AL, Ait-Azzouzene D, Ware CF, et al. DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and bio presentation of the B cell survival cytokine, BAFF [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38220.
- [6] 郭建晖, 鞠少卿, 臧红兵. 系统性红斑狼疮患者血清 B 淋巴细胞刺激因子的水平研究[J]. *检验医学与临床*, 2007,

4(7): 609.

- [7] Schmidt MR, Appel MC, Giassi LJ, et al. Human BlyS facilitates engraftment of human PBL derived B cells in immunodeficient mice[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): 1234.
- [8] Stohl W, Metyas S, Tan SM, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(12): 3475.
- [9] 周丽春, 郝飞. 系统性红斑狼疮的生物制剂治疗进展[J]. *重庆医学*, 2009, 38(3): 345.
- [10] Sigal LH. Basic science for the clinician 42; handling the corpses: apoptosis, necrosis, nucleosomes and (quite possibly) the immunopathogenesis of SLE[J]. *J Clin Rheumatol*, 2007, 13(1): 44.
- [11] 吴凯, 韩日成, 张家明, 等. 系统性红斑狼疮患者血清中 IL-18, IL-10 和 IFN- $\gamma$  的变化 [J]. *海南医学*, 2007, 13(2): 120.
- [12] Zhang GF, Zhang X, Dong GF. Combined mesenchymal stem cells and allogenic bone marrow transplantation in treatment of MRL/lpr mice [J]. *Zhonghua Neike Zazhi*, 2008, 47(9): 754.
- [13] Csiszar A, Nagy G, Gergely P, et al. Increased interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122(3): 464.
- [14] Yin Z, Bahtiyar G, Zhang N, et al. IL-10 regulates murine lupus [J]. *J Immunol*, 2002, 169(4): 2148.
- [15] 袁娜, 荣大奇. 系统性红斑狼疮患者中医辨证分型与外周血 IL-10 的相关性研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2008, 24(1): 58.

(收稿日期: 2010-05-13 修回日期: 2010-06-13)

(上接第 3213 页)

- [3] Levitt NC, Hickson ID. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity [J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8: 179.
- [4] Brash D E, Ziegler A, Jonason A, et al. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1996, 1: 136.
- [5] Karlne G, Isabelle P, Nathalie P, et al. Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1, and TNF-recapitulates some features of Psoriasis [J]. *J Immunol*, 2010, 184: 5263.
- [6] Birgit Poppelmann, Kerstin Klimmek, Elwira Strozyk, et al. NF- $\kappa$ B dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 15635.
- [7] Rivas J. M, Ullrich SE. The role of IL-4, IL-10, and TNF- $\alpha$  in the immune suppression induced by ultraviolet radiation [J]. *J Leukoc Biol*, 1994, 56: 769.
- [8] Abu-Yousif AO, Smith KA, Getsios S, et al. Enhancement

of UVB-Induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 3057.

- [9] Shannon RS, Jorien B, Nihal AM. Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes [J]. *J Cancer Ther*, 2006, 5: 418.
- [10] Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005, 21(4): 195.
- [11] 陈向齐, 刘向农, 牛高祥. 中波紫外线对人永生角质形成细胞株凋亡和死亡的影响 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2008, 24(2): 118.
- [12] Skiba B, Neill B, Piva TJ. Gene expression profile of TNF- $\alpha$ , TACE, furin, IL-1 $\beta$  and matrilysin in UVA and UVB-irradiated HaCat cells [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005, 21(4): 173.

(收稿日期: 2010-05-13 修回日期: 2010-06-15)