

表皮生长因子受体反义寡核苷酸对紫外线诱导的 表皮角质形成细胞 c-jun 活性的影响

夏济平, 宋秀祖, 孙蔚凌, 李燕华, 康健, 陈文琦, 毕志刚

南京医科大学 第一附属医院皮肤科, 南京 210029

通信作者: 毕志刚 电话: 025-83718836, 电子邮件: eltonbi@21.cn.com

摘要: **目的** 探讨表皮生长因子受体 (EGF-R) 反义寡核苷酸转染体外培养的表皮角质形成细胞株 HaCaT 后, 对紫外线诱导的表皮角质形成细胞转录因子 c-jun 活性的影响。 **方法** 用一种高灵敏度、高特异性的比色法测定不同剂量中波紫外线 (UVB) 辐射后以及 EGF-R 反义寡核苷酸转染后紫外线辐射的角质形成细胞 c-jun 活性的变化; RT-PCR 方法测定 EGF-R 反义寡核苷酸转染后 EGF-R mRNA 的表达。 **结果** 10、20、30 mJ/cm² UVB 辐射角质形成细胞后均可显著增强 c-jun 活性 ($P < 0.05$), 不同浓度的 EGF-R 反义寡核苷酸转染后对 30 mJ/cm² UVB 诱导的 EGF-R mRNA 表达和 c-jun 活性均有显著抑制作用 ($P < 0.01$)。 **结论** 脂质体介导的 EGF-R 反义寡核苷酸转染表皮角质形成细胞可以抑制 UVB 辐射诱导的表皮角质形成细胞 c-jun 活性, 表明紫外线诱导角质形成细胞 c-jun 激活是通过 EGF-R 介导的。

关键词: 紫外线; 角质形成细胞; c-jun; 反义寡核苷酸

中图分类号: R758.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2007)02-0213-04

Effects of Antisense Epidermal Growth Factor Receptor Oligodeoxynucleotides on Ultraviolet-induced c-jun Activity of Keratinocytes

XIA Ji-ping, SONG Xiu-zu, SUN Wei-ling, LI Yan-hua, KANG Jian, CHEN Wen-qi, BI Zhi-gang

Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: BI Zhi-gang Tel: 025-83718836, E-mail: eltonbi@21.cn.com

ABSTRACT: **Objective** To explore the effects of antisense epidermal growth factor receptor (EGF-R) oligodeoxynucleotides on ultraviolet-induced c-jun activity of keratinocytes after EGF-R oligodeoxynucleotides transfect to HaCaT *in vitro*. **Methods** c-jun DNA binding activity after ultraviolet-B (UVB) irradiation and EGF-R oligodeoxynucleotides transfection were determined with a highly sensitive and specific colorimetric method. After EGF-R oligodeoxynucleotides transfection, the mRNA level of EGF-R was detected by reverse transcription polymerase chain reaction method. **Results** Compared with control groups, c-jun activity increased significantly in UVB (10, 20, 30 mJ/cm²) irradiation groups ($P < 0.05$). EGF-R mRNA and c-jun activities induced by UVB were inhibited after the keratinocytes were transfected with EGF-R antisense oligodeoxynucleotides at 2, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$ concentrations ($P < 0.01$). **Conclusion** The ultraviolet-induced c-jun activity of keratinocytes can be mediated by EGF-R and inhibited by EGF-R antisense oligodeoxynucleotides, which is transfected to keratinocytes and mediated by lipofectamine.

Key words: ultraviolet; keratinocyte; c-jun; antisense oligodeoxynucleotide

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(2): 213-216

人体皮肤受低剂量的紫外线辐射后,表皮角质形成细胞生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGF-R)和细胞因子受体激活,激活有丝分裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传导途径,原癌基因 c-jun 和 c-fos 表达。c-jun、c-fos 与蛋白因子一起构成转录因子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1),促使基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)高表达。MMP 是引起基质胶原降解的主要蛋白酶, MMP 的高表达将导致胶原降解加速,最终导致皮肤光老化^[1,2]。有研究显示,表没食子儿茶酚没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)可以降低紫外线(ultraviolet, UV)辐射诱导的成纤维细胞表达 c-jun 和 MMP-1^[3]。为进一步探讨紫外线引起皮肤光老化信号传导途径及皮肤光老化的防治机制,本研究应用反义寡核苷酸技术阻断紫外线引起皮肤光老化信号传导途径中角质形成细胞 EGF-R,观察紫外线诱导表皮角质形成细胞的 c-jun 活性变化,以进一步明确 EGF-R 在光老化中的作用。

材料和方法

主要仪器和试剂 CO₂ 孵箱(Heraeus 公司),紫外线辐射仪(上海 Sigma 公司),24 孔、6 孔培养板(Costar 公司),DMEM 培养基(Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青公司),脂质体(Lipofectamine)(Gibco BRL 公司),核蛋白抽提试剂盒(美国 Active Motif 公司),TransAM™ AP-1 c-jun 转录因子分析试剂盒(美国 Active Motif 公司)。

细胞培养 角质形成细胞株 HaCaT 由美国 Providence 大学万寅生教授惠赠,培养基用含 10% 小牛血清的 DMEM。细胞生长至 90% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化后接种于 24 孔和 6 孔培养板中,待细胞 70% 融合时辐射紫外线。

紫外线辐射细胞 紫外线辐射光源与细胞之间的距离 15 cm,中波紫外线(ultraviolet-B, UVB)强度为 700 μw/cm²。HaCaT 细胞分为:正常对照组,UVB 辐射 10、20、30 mJ/cm² 组,以及 UVB 辐射 30 mJ/cm² 后 2 h 脂质体介导的 EGF-R 反义、错配寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)转染组。

核蛋白抽提 紫外线辐射后 6 h 按照核蛋白抽提试剂盒说明书抽提核蛋白,经考马斯亮蓝蛋白定量为 1 μg/μl。

EGF-R 反义及错配 ODN 的合成 反义 ODN 靶序列是针对 EGF-R 基因 5' 端起始编码区第 1~21 个碱基的脱氧核苷酸片断,其序列为:5'-GGCCGTC-CCGGAGGCTCGCAT-3'。错配 ODN 序列的碱基组成与反义 ODN 相同,但排列顺序随机。错配 ODN 序列为 5'-GGACGCGGCGTAGCTGCGCTC-3'。ODN 经全程硫代化修饰,由上海生工生物工程公司合成。

EGF-R ODN 转染细胞 脂质体介导 ODN 的细胞转染按试剂盒说明书操作,配制终浓度分别为 2、4、8 μg/ml 的脂质体与浓度为 1 μg/ml 的 EGF-R ODN 混匀,室温放置 30 min。然后加入已用无血清无抗生素培养基洗涤过的用于转染 ODN 的细胞表面,37℃、5% 的 CO₂ 孵箱中放置 24 h,收集细胞和上清。

半定量 RT-PCR 测定 ODN 转染后 EGF-R 的 mRNA 表达 用于转染的 HaCaT 细胞在转染前 2 h 辐射 30 mJ/cm² UVB。RNA 的抽提根据 Tripure 说明书进行操作。EGF-R (304 bp) 及内参照 β-actin (120 bp) 引物序列参照文献 [4], EGF-R 正义引物:5'-AGCTCACGCAGTTGGGCACT-3', 反义引物:5'-TCTCATGGGCAGCTCCTTCA-3'; β-actin 正义引物:5'-CCACTGAAAAAGATGAGTAT-3', 反义引物:5'-CT-TCAACCTCCAGATGCTG-3'。RT-PCR 反应体系总反应量 50 μl 包括:反应缓冲液 10 μl、dNTP 1 μl、MgSO₄ 2 μl、Tfl DNA 1 μl、AMV 逆转录酶 1 μl、无核酸酶水 21 μl、EGF-R 正义引物 3 μl (50 pmol)、反义引物 3 μl (50 pmol)、β-actin 正义引物 3 μl (50 pmol)、反义引物 3 μl (50 pmol)、RNA 模板 2 μl。反应参数为:48℃ 45 min 逆转录,94℃ 2 min,AMV-RT 失活和 RNA/cDNA 变性,94℃ 30 s 变性,57℃ 1 min 复性,68℃ 2 min 延伸,40 个循环,68℃ 7 min 延伸。取反应产物 5 μl 在含 0.5 mmol/L 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶经激光密度扫描仪(BIO-RAD 公司,T2A 型)扫描,所有扩增产物的光密度峰值均以 β-actin 为基准校正。

c-jun DNA 结合活性的测定 根据 TransAM™ AP-1 c-jun 转录因子分析试剂盒说明书进行操作。在待测样本孔中依次加入 20 μl 核蛋白样本,每个样本设有 8 个复孔,并设阳性对照、阴性对照和空白孔。严格按试剂盒说明书操作。

统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

结 果

UVB 辐射激活 c-jun 转录因子活性 UVB 10、20、30 mJ/cm² 辐射组 HaCaT 细胞的 c-jun DNA 结合活性较未辐射的正常对照组相比, 均显著增加 ($P < 0.05$) (图 1)。

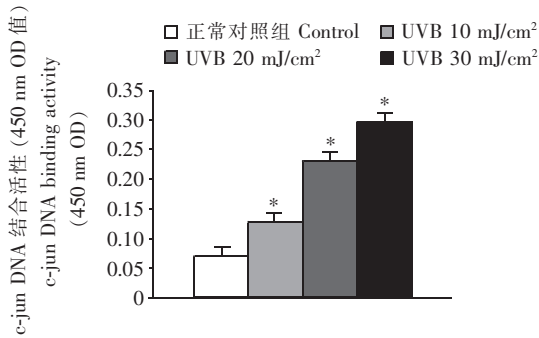


图 1 UVB 辐射对 c-jun DNA 结合活性的影响
Fig 1 Effects of UVB irradiation on c-jun DNA binding activity
 UVB: 中波紫外线; OD: 光密度值
 与对照组比较, * $P < 0.05$
 UVB: ultraviolet-B; OD: optical density
 * $P < 0.05$ compared with control group

EGF-R 反义 ODN 抑制 EGF-R mRNA 的表达 30 mJ/cm² UVB 辐射后, EGF-R mRNA 表达较未辐射的正常对照组显著增加 ($P < 0.05$)。30 mJ/cm² UVB 辐射后, 再转染不同浓度的 EGF-R 反义 ODN, EGF-R mRNA 表达均受到显著抑制 ($P < 0.01$)。错配组 ODN 对 HaCaT 细胞 EGF-R mRNA 表达无影响 ($P > 0.05$) (图 2、3)。

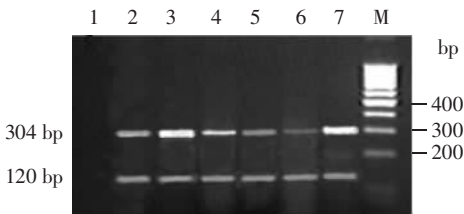


图 2 EGF-R mRNA 的电泳结果
Fig 2 Electrophoresis results of EGF-R mRNA
 1. 阴性对照组; 2. 正常对照组; 3. UVB 组; 4. UVB + 2 μg/ml 反义 ODN 组; 5. UVB + 4 μg/ml 反义 ODN 组; 6. UVB + 8 μg/ml 反义 ODN 组; 7. 错配反义 ODN 组; M. 100 bp DNA Ladder
 EGF-R: 表皮生长因子受体; ODN: 寡脱氧核苷酸
 1. negative control; 2. normal control; 3. UVB; 4. UVB + 2 μg/ml antisense ODN; 5. UVB + 4 μg/ml antisense ODN; 6. UVB + 8 μg/ml antisense ODN; 7. mismatch ODN; M. 100 bp DNA Ladder
 EGF-R: epidermal growth factor receptor; ODN: oligodeoxynucleotides

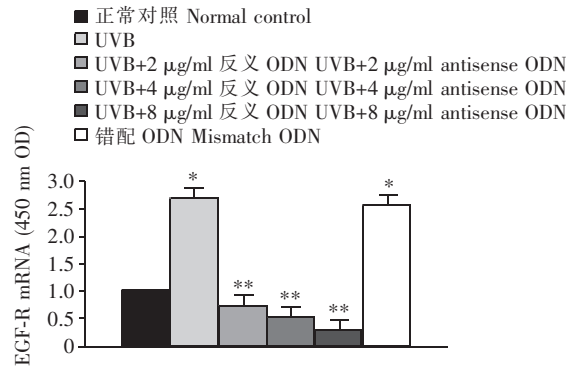


图 3 EGF-R 反义寡核苷酸对 EGF-R mRNA 表达的影响
Fig 3 Effects of antisense EGF-R oligodeoxynucleotides on expression of EGF-R mRNA
 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 UVB 组比较, ** $P < 0.01$
 * $P < 0.05$ compared with normal control group; ** $P < 0.01$ compared with UVB group

EGF-R 反义 ODN 抑制 UVB 辐射激活 c-jun 活性 30 mJ/cm² UVB 辐射后, c-jun 活性 (0.304 ± 0.006) 与正常对照组 (0.070 ± 0.003) 相比显著增加 ($P < 0.01$), 浓度分别为 2、4、8 μg/ml 的 EGF-R 反义 ODN 转染细胞后, 与未转染组相比, c-jun 活性显著下降 ($P < 0.01$), 分别为 0.213 ± 0.011 、 0.187 ± 0.007 、 0.135 ± 0.008 。

讨 论

紫外线辐射能激活细胞表面生长因子受体和细胞因子受体, UVB 是 c-jun 氨基端激酶 (c-jun N-terminal kinase, JNK) 的较强激活剂, 紫外线引起的 JNK 途径激活是通过细胞的生长因子受体和细胞因子受体介导的, 受体激活又导致了下游独特的信号传导途径中组成成分 c-jun、c-fos 的激活。有研究表明, 紫外线辐射以与 EGF 类似的配体受体作用方式激活体外角质形成细胞的 EGF-R^[5]。EGF-R 抑制剂能抑制紫外线、EGF 诱导的 EGF-R 酪氨酸磷酸化, 同时抑制紫外线和白介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 诱导 c-Jun 激酶激活。在接受紫外线辐射后, EGF-R 和 IL-1R 交互作用 (cross-talk) 导致信号途径下游成分 c-jun 激酶激活^[6,7]。表明在细胞表面受体中 EGF-R 是通过紫外线辐射作用而激活的主要受体, 是多种受体介导的信号传导途径中的关键介质; 阻断紫外线诱导的 EGF-R 的作用有可能抑制紫外线引起的下游信号传导。

反义寡核苷酸技术因具有高度特异性阻断的特

点,已被广泛用于治疗与基因异常活动有关的疾病及其机制研究。脂质体作为一种基因转染的载体,具有无免疫原性、可自然降解、能显著改进转染效率以及瞬时转染和用量少的特点^[8]。本研究应用脂质体介导的反义寡核苷酸技术阻断 EGF-R 的表达,选用近年文献报道的一种高敏感性技术^[9]分析 HaCaT 细胞提取液中核转录因子 c-jun 的活性。结果显示 UVB 10、20、30 mJ/cm² 辐射可以显著增加表皮角质形成细胞 c-jun 的 DNA 结合活性,30 mJ/cm² UVB 可以诱导 HaCaT 细胞 EGF-R mRNA 表达显著增加。应用脂质体介导的反义寡核苷酸技术抑制 UVB 诱导的 EGF-R mRNA 表达,EGF-R 反义 ODN 也显著抑制了 UVB 诱导角质形成细胞核转录因子 c-jun 的 DNA 结合活性。本研究提示,在一定的浓度范围内,随着 EGF-R 反义寡核苷酸转染量的增加,对 c-jun 活性的抑制作用增强。表明 UVB 辐射激活核转录因子 c-jun 的 DNA 结合活性是由细胞的 EGF-R 介导的,从而进一步说明 EGF-R 是光老化过程中的关键靶位之一。

本研究表明,应用反义寡核苷酸抑制紫外线诱导角质形成细胞 EGF-R 表达,可以抑制 c-jun 活性,减少 MMP 表达,从而达到减轻紫外线引起皮肤光老化的目的。

参 考 文 献

- [1] Bachelor MA , Cooper SJ , Sikorski ET , *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model [J]. *Mol Cancer Res* , 2005 , 3(2) 90-99.
- [2] Wang XY , Bi ZG . UVB-irradiated human keratinocytes and interleukin-1alpha indirectly increase MAP kinase/AP-1 activation and MMP-1 production in UVA-irradiated dermal fibroblasts [J]. *Chin Med J (Engl)* , 2006 , 119(10) :827-831.
- [3] Lee JH , Chung JH , Cho KH . The effects of epigallocatechin-3-gallate on extracellular matrix metabolism [J]. *J Dermatol Sci* , 2005 , 40(3) :195-204.
- [4] 高 颖 , 罗丽兰 , 何福仙 . 异位子宫内膜细胞的凋亡与增殖的研究 [J]. *中华妇产科杂志* , 1999 , 34(9) :536-539.
- [5] Xu Y , Shao Y , Voorhees JJ , *et al.* Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells [J]. *Am J Pathol* , 2006 , 169(3) :823-830.
- [6] Wan YS , Wang ZQ , Voorhees J , *et al.* EGF receptor crosstalks with cytokine receptors leading to the activation of c-Jun kinase in response to UV irradiation in human keratinocytes [J]. *Cell Signal* , 2001 , 13(2) :139-144.
- [7] Wan YS , Belt A , Wang ZQ , *et al.* Transmodulation of epidermal growth factor receptor mediates IL-1 beta-induced MMP-1 expression in cultured human keratinocytes [J]. *Int J Mol Med* , 2001 , 7(3) 329-334.
- [8] Stuart DD , Allen TM . A new liposomal formulation for antisense oligodeoxynucleotides with small size , high incorporation efficiency and good stability [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2000 , 1463(2) 219-229.
- [9] Renard P , Ernest I , Houbion A , *et al.* Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NF kappa B [J]. *Nucleic Acids Res* , 2001 , 29(4) :E21.

(2006-11-30 收稿)