

Kobel 等^[11]认为卵巢癌中二者之间也呈正相关,而 Moilanen 等^[12]则认为 Ezrin 蛋白表达和卵巢癌侵袭转移能力之间呈负相关。本研究发现,不同质量浓度的苦参碱作用于 HO-8910PM 细胞后,引起该细胞侵袭转移能力降低的同时伴随有细胞骨架结构的稀疏化和细胞骨架连接蛋白 Ezrin 量的增多,与后一种观点相吻合。由此推测,苦参碱对 HO-8910PM 细胞侵袭运动的抑制作用可能部分是通过改变细胞骨架连接蛋白 Ezrin 的表达进而影响细胞骨架来实现的,但其具体分子联系机制仍需进一步研究。

本研究发现,苦参碱可以抑制 HO-8910PM 细胞的增殖速度,使细胞骨架结构发生改变,重要的细胞骨架连接蛋白 Ezrin 表达上调,这可能是苦参碱抗 HO-8910PM 细胞侵袭转移的作用机制之一,为临床上卵巢癌的综合治疗提供实验依据。

参考文献

- [1] 汤钊猷. 现代肿瘤学 [M]. 第二版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000.
- [2] 李先荣, 方增. 苦参生物碱的药理研究及其临床应用 [J]. 山西中医, 1985, 9(3): 49-51.
- [3] Liu X S, Jiang J, Jiao X Y, et al. Matrine-induced apoptosis in leukemia U937 cells: involvement of caspases activation and MAPK-independent pathways [J]. *Planta Med*, 2006, 72(6): 501-506.
- [4] 李贵海, 王玫, 孙付军, 等. 苦参碱逆转小鼠 S180 肿瘤细胞获得性多药耐药基因相关表达产物过度表达的研究 [J]. 中药材, 2006, 29(1): 40-42.
- [5] 许沈华, 钱丽娟, 牟瀚舟, 等. 高转移人卵巢癌细胞系 HO-8910PM 的建立及其生物学特性 [J]. 中华病理学杂志, 1998, 27(6): 451-452.
- [6] 苟新敏, 陈燕, 陈小毅, 等. EBV-LMP1 对鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞转移相关因素的影响 [J]. 癌症, 2003, 22(5): 481-485.
- [7] Gassmann P, Enns A, Haler J. Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation [J]. *Onkologie*, 2004, 27(6): 577-582.
- [8] Crepaldi T, Gautreau A, Comoglio P M, et al. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor 2 mediated migration and morphogenesis in epithelial cells [J]. *J Cell Biol*, 1997, 138: 423-434.
- [9] Park H R, Jung W W, Bacchini P, et al. Ezrin in osteosarcoma: Comparison between conventional high-grade and central low-grade osteosarcoma [J]. *Pathol-Res Prac*, 2006, 202(7): 509-515.
- [10] Valdmann A, Fang X L, Pang S T, et al. Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue [J]. *Eur Urol*, 2005, 48(5): 852-857.
- [11] Kobel M, Gradhand E, Zeng K, et al. Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2006, 25(2): 121-130.
- [12] Moilanen J, Lassus H, Leminen A, et al. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 90(2): 273-281.

表没食子儿茶素没食子酸酯影响慢性紫外线辐射诱导的人皮肤成纤维细胞凋亡和突变的研究

朱洁^{1,2}, 骆丹^{2*}, 金颂良², 沈春花², 明亚玲²

(1. 江苏省中医院 皮肤科, 江苏 南京 210029; 2. 南京医科大学第一附属医院 皮肤科, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 研究紫外线 (UV) 照射对人皮肤成纤维细胞的细胞凋亡率、细胞周期变化和次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 基因位点突变频率的影响以及表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 的干预作用。方法 采用一定剂量的中、长波紫外线 (UVA 和 UVB) 慢性照射培养的新生儿包皮成纤维细胞。通过流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期变化, HPRT 突变分析法检测突变频率。结果 慢性 UVA 组引起的细胞凋亡率低于 UVB 组 ($P < 0.05$), 而 HPRT 基因位点突变的频率是 UVB 组的 4.79 倍。EGCG 干预组与单纯 UV 辐射组相比, 成纤维细胞的凋亡率增加, HPRT 基因位点突变的频率降低。结论 慢性照射日常剂量 UVA, 其损伤性高于 UVB。EGCG 可以升高慢性 UV 照射引起的细胞凋亡率, 降低 UV 照射引起的突变频率, 提示 EGCG 可以诱导不可逆损伤细胞的凋亡, 从而减少突变细胞。

关键词: 紫外线; 成纤维细胞; 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG); 细胞凋亡; 突变频率

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)03-0390-04

* 收稿日期: 2007-06-26

作者简介: 朱洁 (1980—), 女, 江苏省南京人, 硕士研究生, 医师, 研究方向为皮肤光生物学。

* 通讯作者 骆丹

Effect of EGCG on apoptosis and mutation of human skin fibroblasts damaged from long-term ultraviolet radiation

ZHU Jie^{1,2}, LUO Dan², JIN Song-liang², SHEN Chun-hua², MENG Ya-ling²

(1. Department of Dermatology, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

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

Abstract Objective To observe the effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on apoptosis rate, cell cycle, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) gene mutation frequency induced by long-term UVA and UVB irradiation in human skin fibroblasts. **Methods** Fibroblasts were separated from infant foreskin, and divided into six groups, they were control, EGCG, UVA, UVB, UVA + EGCG, and UVB + EGCG groups. The cells were irradiated by 30 mJ/cm² UVB and 10 J/cm² UVA every day for 2 weeks. After irradiation, fibroblasts were incubated with DMEM containing 10% bovine serum or the same medium containing 25 µg/mL of EGCG for 24 h. The apoptosis rate and cell cycle were detected by Flow Cytometer. The HPRT gene mutation frequency was detected by the HPRT mutagenesis assay. **Results** Under long-term UV irradiation, apoptosis rate and mutation frequency of fibroblasts were increased. The apoptosis rate in long-term UVA group was lower than that in UVB group ($P < 0.05$), while HPRT mutation frequency in UVA group was 4.79 times as much as that in UVB group. Compared EGCG inference groups with UV groups, the apoptosis rates were increased, while HPRT gene mutation frequency was decreased. **Conclusion** The damage by long-term daily irradiation in UVA group is heavier than that in UVB group. The EGCG could increase the apoptosis rate of fibroblasts induced by long-term UV irradiation and prevent the increase of the mutation frequency, which indicate that the EGCG could induce the irreversible damage of apoptosis so that to reduce the mutation cells.

Key words: ultraviolet irradiation; fibroblasts; EGCG; apoptosis; mutation frequency

长波紫外线 (UVA) 引起氧化应激, 主要导致光老化; 中波紫外线 (UVB) 可被 DNA 吸收而直接损伤 DNA, 导致基因突变, 更易引起染色体的不稳定, 从而促进癌症的形成。然而近年来, 有研究认为 UVA 与皮肤癌的发生日趋相关。DNA 虽然不吸收 UVA, 但是与 UVA 密切相关的活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 对 DNA 的氧化性损伤, 也可使 UVA 具有致突变性和致癌性^[1]。已有的研究表明, 次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HPRT) 基因位点对辐射敏感, 易形成突变, 并可以在生物体内蓄积, 且剂量效应关系理想, 可作为辐射生物剂量计^[2]。本研究报道 UV 对人皮肤成纤维细胞的细胞凋亡率、细胞周期变化、HPRT 基因位点突变频率的影响以及加入表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 后的干预作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养: 分离获得新生儿包皮环切术后皮肤成纤维细胞, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司) 的 DMEM 培养基 (Gibco/BRL, Rockland, MA) 中, 根据实验目的不同分别定量接种在 6 孔板以及 100 mm 培养皿中备用。

1.2 药物配制: EGCG, Calbiochem 公司, 以 DMEM 培养液配制, 贮存液质量浓度 500 µg/mL, 分装, 贮存于 -20 °C 冰箱, 实验终质量浓度为 25 µg/mL。

1.3 实验分组: 成纤维细胞培养 48 h 后, 分为 6 组进行实验, 包括对照组、EGCG 组、慢性 UVB (290~320 nm) 辐射组、慢性 UVB + EGCG 组、慢性 UVA (320~400 nm) 辐射组、慢性 UVA + EGCG 组。每组 3 个复孔, 共做 3 次。对照组不做任何处理; EGCG 组为正常培养细胞中加入 EGCG (终质量浓度为 25 µg/mL); 慢性 UVB 辐射组 UVB 剂量为 30 mJ/cm², 连续照射 2 周; 慢性 UVA 辐射组 UVA 剂量为 10 J/cm², 连续照射 2 周; 慢性 UVB + EGCG 组和慢性 UVA + EGCG 组照射前均先以含 EGCG (25 µg/mL) 培养液孵育 24 h 后, 开始照射, 其 UVB 剂量为 30 mJ/cm², UVA 剂量为 10 J/cm², 照射后重新孵育于含 EGCG (25 µg/mL) 培养液中, 两组照射均持续 2 周, 照射完毕后继续培养 24 h, 收集细胞进行相关实验。

1.4 紫外线照射: UVB 和 UVA 辐射光源为台式紫外辐射仪 (美国 Sigma 公司), UVA 辐射强度为 4.4 mW/cm², UVB 的辐射强度为 1.16 mW/cm², 以辐射仪的计时装置控制辐射剂量, 辐射光源与细

胞相距 15 cm。照射时吸去各组培养细胞培养液, PBS 冲洗两次, 再加入少量 PBS 覆盖底面避免干燥, 培养板于室温水浴下照光以避免照射后过热。照射后再弃去 PBS, 重新加入 DM EM 培养液或 EGCG 溶液。UVA 10 J/cm² 和 UVB 30 mJ/cm² 的照射剂量均采用日常生理剂量, 即在海平面盛夏中午日照 1 h 所获得的剂量^[3]。

1.5 流式细胞仪检测成纤维细胞凋亡率及细胞周期变化: 将各实验组细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, 以 80% 乙醇固定, PBS 洗细胞 3 次, 取出 4℃ 保存的 50 μg/mL 含 Triton 的碘化丙啶 (PI, Molecular Probe 公司), 各管中分别加入 200 μL, 振荡成单细胞悬液, 避光室温静置 30 min, 300 目滤网滤过, 流式细胞仪检测。

1.6 HPRT 突变分析法检测突变频率^[4]: HPRT 突变分析技术用于描述 UV 诱导的 HPRT 突变^[5,6]。UV 照射使 HPRT 位点突变后可抵抗 6-硫代鸟嘌呤 (6-TG) 的杀伤作用而存活增殖形成克隆。将 UV 照射后的成纤维细胞培养至 HPRT 突变基因充分表达后 (表达期), 在含 7 μg/mL 6-TG 的培养基中重新接种成纤维细胞, 接种密度为 6 700 个/cm², 即每个 10 mm 培养盘接种 3.3×10⁴ 个细胞。在 5% CO₂ 37℃ 温箱中孵育约 4 周以选择突变细胞克隆 (选择期), 在选择期只有 HPRT 突变的细胞可以存活并形成克隆, 因为它们不能将 6-TG 代谢转化为毒性物质。再以亚甲蓝染色固定突变的克隆, 并加以计数。克隆细胞团两个融合的按照 1 个计算。照射后突变频率的计算需以非照射组自身克隆形成效率作校正处理。此实验共重复 3 次。

1.7 统计学处理: 以 SPSS11.0 统计软件对细胞凋亡率、细胞周期变化数据进行单因素方差分析, 对 HPRT 基因位点突变频率进行扩展 *T* 检验。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡率: 结果发现对照组及 EGCG 组均未见明显的凋亡峰。慢性 UVB 辐射组和慢性 UVA 辐射组在 G₁ 期前出现明显的亚二倍体峰 (凋亡峰), 两组与对照组比较, 差异显著 (*P* < 0.05); 而经 EGCG 处理的 UVB + EGCG 组和 UVA + EGCG 组细胞凋亡率则明显上升, 两组分别与单纯 UVB 组和单纯 UVA 组比较差异非常显著 (*P* < 0.01)。UVA 组和 UVB 组较对照组和 EGCG 组 S 期细胞增多, UVA + EGCG 组和 UVB + EGCG 组分别与 UVA 组和 UVB 组相比 G₀/G₁ 及 G₂/M 期细胞增多 (*P* < 0.05)。每组 9 个复

孔的凋亡均值及细胞周期变化情况见表 1。

表1 UVA、UVB 及 EGCG 对人皮肤成纤维细胞凋亡率及细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 9)

Table 1 Effects of UVA, UVB, and EGCG on cell apoptosis rate, and cell cycle of human skin fibroblasts ($\bar{x} \pm s$, *n* = 9)

组别	凋亡率/%	S 期/%	G ₀ /G ₁ 期/%	G ₂ /M 期/%
对照	0.15±0.06	29.73±1.52	46.50±2.32	23.77±1.21
EGCG	0.50±0.11	30.36±1.83	48.79±2.42	20.85±1.05
UVB	26.09±1.27*	61.47±3.47*	19.63±1.24	18.90±1.02
UVB+EGCG	48.81±2.96 ^{△△}	21.71±1.91	58.67±3.11 [△]	30.74±1.89 [△]
UVA	20.06±1.14*	64.15±3.98*	17.95±1.47	17.90±1.21
UVA+EGCG	31.48±2.01 ^{▲▲}	25.78±1.10	48.59±2.68 [▲]	25.63±1.92 [▲]

与对照组比较: **P* < 0.05; 与 UVB 组比较: [△]*P* < 0.05
^{△△}*P* < 0.01; 与 UVA 组比较: [▲]*P* < 0.05 ^{▲▲}*P* < 0.01

**P* < 0.05 vs control group; [△]*P* < 0.05 ^{△△}*P* < 0.01 vs UVB group; [▲]*P* < 0.05 ^{▲▲}*P* < 0.01 vs UVA group

2.2 HPRT 突变分析法检测突变细胞克隆频率: 在未经照射的正常细胞中, 自发突变率很低, 突变频率为 (1.74±2.88)×10⁻⁶。EGCG 处理组与正常细胞对照组突变频率无显著差异 (*P* > 0.05)。实验组细胞在表达期及 6-TG 的选择培养后, 经过染色、计数及校正得出单纯 UVB 和单纯 UVA 组照射诱导的突变分别是未经照射的自发突变的 72 倍及 241 倍, 而经 EGCG 处理的 UVB + EGCG 组和 UVA + EGCG 组突变频率显著低于单纯 UVB 组和单纯 UVA 照射组, 经扩展 *T* 检验 (*P* < 0.05), 分别较单纯 UVB 组和单纯 UVA 组降低了 52.78% 和 32.37% (图 1)。

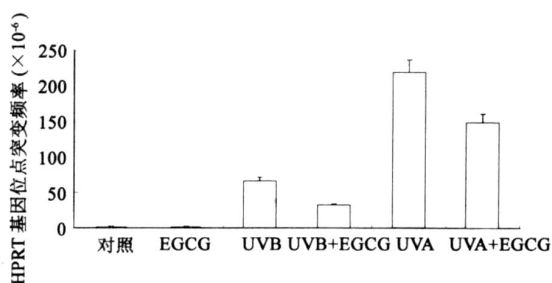


图1 各组 HPRT 基因位点突变频率 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 9)

Fig 1 HPRT Gene mutation frequency in every group ($\bar{x} \pm s$, *n* = 9)

3 讨论

在自然界由太阳辐射产生, 按其波长分为长波紫外线 (UVA, 320~400 nm)、中波紫外线 (UVB, 280~320 nm) 和短波紫外线 (UVC, 200~280 nm), 其中 UVC 经过大气层时被臭氧层吸收, 对机体产生作用的主要是 UVA 和 UVB。重复长期暴露于 UV 下能引起各种不同的皮肤病, 包括黑素瘤和

非黑色素瘤的皮肤癌。研究显示UV 辐射后引起的凋亡被认为是一种防御性机制^[7], UV 辐射后, 细胞采用各种方式进行修复, 但当伤害外因持续存在, 则发生不可逆的变化, 此时启动细胞的程序性死亡, 它可以确保不可逆损伤的细胞和潜在癌细胞的移除。

本实验中UVA 和UVB 照射剂量均采用日常生理剂量, 连续照射 14 d。其中UVA 剂量为UVB 的 667 倍, 而由UVA 刺激所引起的细胞凋亡率显著低于UVB ($P < 0.05$), 其导致的 HPRT 基因位点突变率则是UVB 的 4.79 倍, 可见成纤维细胞对于UVA 引起损伤的防御性反应较UVB 弱, 虽然相同剂量UVA 的致损伤能力较UVB 弱, 但日常生活中UVA 的量远高于UVB, 故其损伤性不容忽视。

EGCG 是一种抗氧化剂, 可以明显减少自由基对DNA 的损伤, 诱导肿瘤细胞的凋亡。EGCG 诱导肿瘤细胞凋亡的机制还未能阐明。这其中可能包括核转录因子 (NF- κ B) 的阻断, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 介导的通路, 细胞周期在 G_0/G_1 ^[8]或 G_2/M ^[9]期的阻断, 及EGCG 通过与Fas 在细胞表面结合而触发的Fas 介导的凋亡^[10]。由于慢性UVB 辐射导致的皮肤肿瘤大部分有p53 基因的突变, EGCG 选择性的促凋亡作用还可能是通过p53 途径发挥作用的^[11]。

本研究中, 慢性UVB 和UVA 辐射成纤维细胞均在 G_1 期前出现明显的亚二倍体峰 (凋亡峰), 表明慢性UV 照射可以诱导成纤维细胞发生凋亡。正常细胞加入EGCG 后凋亡无显著变化, 而经UV 慢性长期辐射以后再加入EGCG 处理则可见细胞凋亡率明显上升, 表明EGCG 可以诱导慢性日常剂量UVA 和UVB 辐射后的成纤维细胞凋亡, 但对正常细胞没有诱导凋亡的作用。细胞周期检测的结果显示, 慢性UVB 和UVA 辐射成纤维细胞的 G_0/G_1 及 G_2/M 期较正常细胞减少, 显著出现S 期阻滞, 而加入EGCG 处理的UVB+EGCG 组和UVA+EGCG 组则出现 G_0/G_1 及 G_2/M 期的细胞显著增多和S 期细胞减少, 这与既往研究显示的EGCG 诱导肿瘤凋亡的可能相关机制结果一致^[12]。

在HPRT 基因位点突变率检测实验中, 正常细胞的自发突变率和EGCG 组的突变率无显著差异 ($P > 0.05$), 说明EGCG 不会影响正常细胞的基因突变。UVB 组和UVA 组的突变率分别为自发突变率的 72 倍和 241 倍, 而经EGCG 处理的UVB+EGCG 组和UVA+EGCG 组突变频率分别较单纯UVB 组和单纯UVA 组降低了 52.78% 和

32.37%, 可见EGCG 可显著减少UVB 和UVA 辐射所诱导的成纤维细胞的基因突变, 当然这种保护作用也是有限的。

EGCG 是一种抗氧化剂, 可以明显减少自由基对DNA 的损伤, 但本实验同时证明这种减少损伤的作用也是有限的, 慢性UV 辐射后的一些细胞可能已经进入了不可修复的突变状态, 本实验中单次照射剂量虽为文献记载的日常生理剂量, 但对于培养状态的位于真皮层的成纤维细胞来说, 剂量已经较大, 故推测长期UV 照射2 周后可能已引起部分细胞突变。两部分实验结果可初步说明, EGCG 可以通过诱导不可逆损伤细胞的凋亡, 从而减少UV 诱导的成纤维细胞突变。

由于本实验对象为体外培养状态下的成纤维细胞, 故虽然UV 照射剂量为文献提示的日常生理剂量, 但是对于培养状态下的细胞也许剂量偏大, 更切实的情况有待于进一步的动物体内实验。

参考文献

- [1] Kappes U P, Luo D, Potter M, et al. Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(3): 667-675.
- [2] Hirai Y, Kusunoki Y, Kyozumi S, et al. Mutant frequency at the HPRT locus in peripheral blood T lymphocytes of atomic bomb survivors [J]. *Mutat Res*, 1995, 329: 183.
- [3] Jeanmougin M, Civate J. Dosimétrie du rayonnement ultraviolet solaire. Variations journalières et mensuelles à Paris [J]. *Ann Dermatol Vénérol*, 1987, 114: 671-676.
- [4] Douki T D, Perdiz P, Grof Z, et al. Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role [J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 70: 184-190.
- [5] McCormick J J, Maher V M. In DNA Repair, A Laboratory Manual of Research Procedures [M]. New York: Marcel Dekker, 1981.
- [6] Zdzienicka M Z. Mammalian X-ray-sensitive mutants which are defective in non-homologous (illegitimate) DNA double-strand break repair [J]. *Biochimie*, 1999, 81: 107-116.
- [7] Gavrieli Y, Sheman Y, Ben sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. *J Cell Biol*, 1992, 119(3): 493-501.
- [8] Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275: 328-334.
- [9] Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, et al. Cancer inhibition by green tea [J]. *Mutat Res*, 1998, 402: 307-310.
- [10] Hayakawa S, Saeki K, Sazuka M, et al. Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285: 1102-1106.
- [11] Morley N, Clifford T, Salter L, et al. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005, 21: 15-22.
- [12] Ahmad N, Feyes D K, Nieminen A L, et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells [J]. *Natl Cancer Inst*, 1997, 89: 1881.