

论 著

UVB 诱导人皮肤成纤维细胞的 *SMP30* 基因表达变化

张 杰, 高 波

【摘要】 目的 研究经过不同剂量紫外线中波(UVB)照射不同时间后正常人皮肤成纤维细胞(HSF)中衰老标记蛋白 30(*SMP30*)基因的表达改变,探讨 UVB 诱导 HSF 衰老可能的机制。**方法** 以未采用 UVB 照射的 HSF 为对照组,经过不同剂量 UVB(100,200,300 mJ/cm²)处理不同时间(1,2,3 d 后)的 HSF 为实验组,四唑盐比色法(MTT)观察 HSF 的生长活性,流式细胞仪检测 HSF 的凋亡率,实时荧光定量 PCR 技术(FQ-PCR)检测实验组和对照组中 *SMP30* 基因的表达。**结果** 不同照射时间组和不同剂量组之间,随着 UVB 照射时间延长和剂量的增加,HSF 细胞增殖抑制率逐渐增高,细胞的凋亡率也逐渐增加,差异有统计学意义($P<0.05$);UVB 处理后实验组中 *SMP30* 基因的相对表达水平(0.66 ± 0.19)明显低于对照组(1.15 ± 0.11),差异有统计学意义($P<0.01$);*SMP30* 基因的表达水平随着 UVB 作用的时间和剂量的不同而变化,呈明显的时间依赖性和浓度剂量依赖性,不同照射时间组和不同剂量组之间基因表达的差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 经过不同剂量 UVB 处理不同时间后可以抑制 HSF 细胞生长,促进细胞凋亡,大剂量长时间 UVB 照射可诱导 HSF 发生衰老改变。

【关键词】 人皮肤成纤维细胞;紫外线中波;衰老标记蛋白 30;四唑盐比色法;实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 R334.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2018)02-0126-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.02.004

Study on the change of *SMP30* in HSF with induced by UVB

ZHANG Jie¹, GAO Bo²

(1.Department of Dermatology, Xiangzhou District People's Hospital, Xiangyang 441000, Hubei, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Taihe Hospital, Shiyan 442000, Hubei, China)

【Abstract】 Objective To explore the expression of *SMP30* in human skin fibroblast (HSF) after different dose and time treatments with ultraviolet B (UVB), and to study the mechanism of UVB to induce HSF senescence. **Methods** HSF was set as the control group and different dose (100, 200, 300 mJ/cm²) of UVB treatment of different time (1, 2, 3 d) after the HSF was set as the experimental group. FQ-PCR was used to test the expression of *SMP30* gene in two groups. **Results** HSF treated with UVB displayed a slow growth in comparison with the control group. In the different irradiation time group and different dose groups, it showed that with the increasing of UVB irradiation time and dose, the cellular proliferation inhibition rate and the cell apoptosis rate increased gradually. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression level of *SMP30* gene in the experimental group (0.66 ± 0.19) was significantly lower than that in the control group (1.15 ± 0.11), the difference was statistically significant ($P<0.01$). The expression level of the genes varied with the time and dose of UVB, and it had obvious time-dependent and concentration-dependent. Differences in gene expression between different exposure time groups and different dose groups were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Different concentrations of UVB can inhibit HSF cell growth, promote apoptosis, and large doses of UVB irradiation can induce HSF to be senescence.

【Key words】 human skin fibroblast; ultraviolet B; senescence marker protein30; MTT; FQ-PCR

0 引 言

基金项目:襄阳市科技计划项目(2013-8-1709)

作者单位:441000 襄阳,襄阳市襄州区人民医院皮肤科(张 杰);
442000 十堰,十堰市太和医院检验科(高 波)

正常人皮肤成纤维细胞(human skin fibroblast, HSF)长期暴露在氧化应激条件下,可以被氧化应激

诱导出现衰老、形态改变、G1 期停滞以及许多调控衰老靶基因的表达水平改变等标记^[1-2]。紫外线长期照射皮肤可以发生氧化应激类的光损伤,这种光损伤在细胞衰老、皮肤老化的过程中发挥着重要的作用,紫外线中波(ultraviolet B,UVB)作为自然环境中的一种紫外辐射主要作用于皮肤的真皮浅层和表皮层,UVB 照射后可以诱导皮肤光老化,导致皮肤变得粗糙、皱纹加深^[3]。衰老标记蛋白 30(senescence marker protein 30,SMP30)是新发现的一种存在于大脑微粒体中的衰老标记蛋白,最早识别于老鼠肝脏,又被称为钙调素,其表达随着宿主年龄的增加而降低,可能介导延缓衰老的进程^[4]。本研究采用不同剂量的 UVB 照射 HSF 不同时间,模拟损伤状态,观察 HSF 细胞生长活性、凋亡率以及 SMP30 基因表达的变化,探讨该基因在 UVB 导致的皮肤损伤的作用,为阐明氧化应激类光损伤机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HSF(武汉大学细胞库),Reverse Transcription System A3500、Trizol Reagent(Promega);PE7500(ABI 公司);100 bp DNA marker(Fermentas 公司);SYBR Green I 染料(Gene 公司);RG-BOX 紫外凝胶成像系统(Gene 公司);CF-16RX 台式高速冷冻离心机(日立公司);721 紫外分光光度计(北京六一公司);PCR 试剂盒(上海生物工程有限公司),DMEM 培养基(Gibco)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与 UVB 处理 将细胞冻融复苏后置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,融合生长至 80%后用 1:1 的胰蛋白酶和 EDTA 进行消化传代培养。取 2~4 代生长良好的细胞进行试验,其余液氮保存。设置实验组和对照组,其中经过不同剂量 UVB(100、200、300 mJ/cm²)处理不同时间(1、2、3 d 后)^[5]的 HSF 为实验组,以未采用 UVB 照射的 HSF 为阴性对照组。取生长良好的传代细胞培养 24 h 后,收集实验组和对照组细胞进行 HSF 细胞生长活性、凋亡率以及 SMP30 基因表达的检测。

1.2.2 细胞增殖活性的检测 应用 MTT 法检测。具体方法为:取对数生长期的细胞约 2×10^3 个(约 200 μ L)的培养液接种到培养板中,24 h 后细胞贴壁单层生长约 50%~60%孔面积时弃上清,UVB 间距

30 cm 处照射,剂量分别为 100、200、300 mJ/cm²,照射时间分别为 1、2、3 d。照射结束后终止培养,弃去上清,每孔加二甲亚砜振荡混匀,测定各孔 570 nm 处吸光度(A),计算实验组和对照组的细胞增殖抑制率(cellular proliferation inhibition rate, CIPR)。每组实验重复 5 次,计算公式如下:

$$\text{CIPR} = (\text{对照组 A} - \text{实验组 A} / \text{对照组 A}) \times 100\%$$

1.2.3 流式细胞仪检测 HSF 细胞凋亡率 UVB 照射时间、剂量方法同上。照射完毕后胰蛋白酶消化离心收集细胞约 1×10^6 个,磷酸盐缓冲液洗涤细胞 3 次,加入 FITC 标记的膜联蛋白 V 10 μ L 和结合缓冲液 100 μ L,室温避光 10 min,加入碘化丙啶 5 μ L,混匀后避光染色 30 min 后用流式细胞仪测定 HSF 细胞凋亡率。

1.3 SMP30 基因表达检测

1.3.1 引物合成 内参 β -actin 的上游引物:CTC GCG TAC TCT CTC TTT CTG G,下游引物:GCT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA A,扩增片段 334 bp;SMP30 的上游引物:CCG TGG ATG CCT TTG ACT AT,下游引物:TCC AAA GCA GCA TGA AGT TG,扩增片段 233 bp(上海生物工程有限公司)。

1.3.2 RNA 提取与逆转录 收集细胞,按照说明书步骤提取 HSF 细胞中总 RNA,提取的 RNA 经分光光度计测定其纯度和浓度后溶于无 RNA 酶的双蒸水中,采用 A3500 逆转试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录体系为:总 RNA 2 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L,10 mmol/L dNTP 混合液 2 μ L,10 \times Buffer 2 μ L,Oligo(dT)引物 1 μ L,AMV 逆转录酶 0.6 μ L,Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ L,用无核酸酶的双蒸水齐体积至 20 μ L。短暂离心后置于 PCR 扩增仪,42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 进行逆转录。用无 RNA 酶的双蒸水稀释逆转的 cDNA 至 100 μ L 后 mRNA 扩增或者 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3.3 PCR 扩增 PCR 扩增体系 2 mmol/L dNTP 1.5 μ L、10 \times Buffer 3 μ L、25 mmol/L Mg²⁺ 2.4 μ L、5 U/uL Taq 0.3 μ L、上下游引物各 2 μ L、10 \times SYBR-Green I 1 μ L、cDNA 5 μ L,用无菌水补齐体积共 30 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s 共 40 个循环;最后一步收集熔点曲线的过程 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

1.3.4 结果判断 通过熔点曲线判断扩增的特异性,然后取 5 μ L 扩增产物与指示 buffer 混匀后,2%

琼脂糖凝胶进行电泳,120 V 电压电泳 1 h,紫外凝胶成像系统分析结果。在 233、334 bp 处出现特异性目的条带。并利用检测 Ct 值和扩增效率 E,以 β -actin mRNA 为参照,计算 SMP30 相对表达量,公式如下:

$$\text{SMP30 mRNA}/\beta\text{-actin mRNA} = (1 + E_{\beta\text{-actin}})^{Ct(\beta\text{-actin})} / (1 + E_{\text{SMP30}})^{Ct(\text{SMP30})}$$

1.4 统计学分析 应用 SPSS16.0 统计软件进行结果分析,所有计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用两独立样本 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同剂量 UVB 处理不同时间后对 HSF 细胞增殖的影响 随着照射时间的延长,CPIR 增高,差异有统计学意义($P<0.05$);随着 UVB 剂量的增加,CPIR 增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 UVB 照射不同时间对 HSF 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, %)

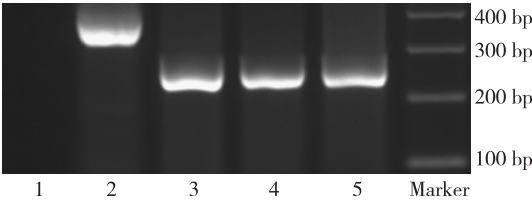
组别	不同照射时间的 CPIR		
	1 d	2 d	3 d
对照组	0	0	0
实验组			
100 mJ/cm ²	4.12 \pm 0.76 ^{*#}	6.02 \pm 1.08 [#]	8.38 \pm 1.27 ^{*#}
200 mJ/cm ²	7.14 \pm 0.84 [*]	9.14 \pm 1.44	11.42 \pm 1.51 [*]
300 mJ/cm ²	9.52 \pm 0.53 ^{*#}	12.37 \pm 0.96 [#]	14.64 \pm 1.05 ^{*#}
与 UVB 照射 2 d 比较, * $P<0.05$; 与实验组 UVB 200 mJ/cm ² 比较, # $P<0.05$			

2.2 不同剂量 UVB 处理不同时间后对 HSF 细胞凋亡的影响 随着照射时间的延长,细胞凋亡率逐渐增高,差异有统计学意义($P<0.05$);随着 UVB 剂量的增加,细胞凋亡率逐渐增高($P<0.05$)。见表 2。

表 2 UVB 照射不同时间对 HSF 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$, %)

组别	不同照射时间的细胞凋亡率		
	1 d	2 d	3 d
对照组	1.96 \pm 0.41	2.81 \pm 0.57	4.01 \pm 0.38
实验组			
100 mJ/cm ²	6.52 \pm 1.51 ^{*#}	10.06 \pm 1.50 [#]	12.06 \pm 1.17 ^{*#}
200 mJ/cm ²	9.61 \pm 1.14 [*]	12.24 \pm 1.19	14.32 \pm 0.86 [*]
300 mJ/cm ²	12.06 \pm 1.17 ^{*#}	14.18 \pm 1.16 [#]	16.02 \pm 1.32 ^{*#}
与 UVB 照射 2 d 比较, * $P<0.05$; 与实验组 UVB 200 mJ/cm ² 比较, # $P<0.05$			

2.3 UVB 诱导后 SMP30 基因表达的变化 对照组中 SMP30 基因的相对表达量为(1.15 \pm 0.11),实验组中 SMP30 基因表达量为(0.66 \pm 0.19),差异有统计学意义($t=9.5, P<0.01$)。基因表达的电泳见图 1。随着 UVB 剂量的增加,实验组中 SMP30 基因表达逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$),并且随着 UVB 处理时间的延长 SMP30 基因表达也逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$),基因的表达对 UVB 诱导有着较为明显的时间依赖性和浓度剂量依赖性。见表 3。



1: 对照组; 2: β -actin; 3~5 分别为实验组 UVB 100、200、300 mJ/cm²

图 1 SMP30 基因在实验组和对照组中的表达电泳图

表 3 UVB 照射不同时间对 SMP30 基因表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	不同照射时间的基因相对表达量		
	1 d	2 d	3 d
对照组	1.08 \pm 0.10	1.18 \pm 0.10	1.20 \pm 0.10
实验组			
100 mJ/cm ²	0.94 \pm 0.08 ^{*#}	0.82 \pm 0.08 [#]	0.69 \pm 0.10 ^{*#}
200 mJ/cm ²	0.80 \pm 0.11 [*]	0.66 \pm 0.08	0.53 \pm 0.09 [*]
300 mJ/cm ²	0.63 \pm 0.12 ^{*#}	0.48 \pm 0.08 [#]	0.36 \pm 0.07 ^{*#}
与 UVB 照射 2 d 比较, * $P<0.05$; 与实验组 UVB 200 mJ/cm ² 比较, # $P<0.05$			

3 讨 论

衰老是指在正常生理情况下发育成熟的个体随着年龄的增长器官逐渐退行性改变以及生理机能逐渐衰退等生物现象,是内源性因素和外源性因素共同作用的结果^[6]。细胞内 mRNA 含量降低是衰老后细胞分子水平的主要改变,作为人体最大器官的皮肤随着年龄增长也会出现衰老情况,并且研究表明长期的 UVB 照射可以导致不可逆的慢性光老化晒伤,发病隐蔽、病程较长,不仅可以造成皮肤的早衰、难治性皮损,还可以诱发皮肤肿瘤的发生^[7-10]。为研究 UVB 照射和 SMP30 基因改变之间的关系,本文以不同剂量 UVB 处理不同时间后的 HSF 为研究对象,研究 SMP30 基因在模拟损伤状态

前后基因表达的变化,探讨 UVB 照射在皮肤衰老中的机制。

本研究发现,随着 UVB 剂量的增加以及照射时间的延长,HSF 细胞增殖抑制率及细胞凋亡率逐渐增高,表明 HSF 在一定剂量 UVB 照射一定时间后会出现一定的损伤状态,比如细胞凋亡、细胞生存率下降等。王懿娜等^[2]研究也发现 300 mJ/cm² 剂量的 UVB 照射可以使得 HSF 细胞进入光损伤状态,细胞会出现一系列的氧化应激损伤表现,如:细胞周期停滞在 G1 期、细胞凋亡、SOD 活性下降以及氧化应激损伤产物升高等。并且本研究发现随着 UVB 剂量的增加实验组中 SMP30 基因表达逐渐降低,基因的表达对 UVB 诱导有着较为明显的时间依赖性和浓度剂量依赖性,模拟损伤后的基因表达要明显低于对照组,这与国内的研究结果一致^[11]。SMP30 在实验老鼠中,随着氧化应激水平的逐渐增强,其表达逐渐减弱^[12],并且高表达的 SMP30 可以抑制与衰老相关的细胞活性氧 ROS 和 β -半乳糖苷酶的表达^[11],而在小鼠敲除 SMP30 基因后,促氧化剂水平随着鼠龄增加而增加^[13],这些研究表明 SMP30 具有抗细胞衰老的作用,可能正是由于皮肤在遭受 UVB 这类氧化应激时,氧自由基增多聚集,并且引起 HSF 细胞中调控皮肤衰老的基因 SMP30 表达降低,产生一系列不可逆的细胞内的氧化损伤,导致皮肤的衰老^[14]。

研究表明,大剂量的紫外照射可以引起 DNA 不可逆的损伤,或者细胞坏死甚至癌变,小剂量的照射可以诱导氧化应激的光损伤,进而启动细胞老化过程^[15-16]。氧化应激损伤在皮肤细胞早衰过程中发挥着重要作用,并且紫外照射导致的光老化被认为是一种癌前病变^[17],如何有效降低和控制这类损伤,延缓和预防由于氧化应激导致的皮肤衰老是我们后期研究的主要方向,也是课题目前不足之处,但这也为美容医学提供了一个很好的契机。并且进一步研究 UVB 照射,预防皮肤肿瘤的发生也将是我们后期研究的重点。

综上所述,经过不同剂量 UVB 处理不同时间后,HSF 细胞中 SMP30 表达存在较为明显的时间依赖性和剂量依赖性,这对了解 UVB 如何调控皮肤衰老机制提供一定理论依据。

[参考文献]

[1] Hong EH, Lee SJ, Kim JS, *et al.* Ionizing radiation induce cellu-

lar senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase [J]. *J Bio Chem*, 2010, 285 (2): 1283-1295.

- [2] 王懿娜, 吴 炜, 彭国平, 等. UVB 诱导人皮肤成纤维化细胞的氧化应激损伤研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2008, 41 (7): 465-468.
- [3] Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2003, 48 (1): 1-19.
- [4] Tian LM, Xie HF, Xiao X, *et al.* Study on the roles of β -catenin in hydrogen peroxide-induced senescence in human skin fibroblasts[J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20 (10): 836-838.
- [5] 张青松, 顾 恒. UVB 对人皮肤成纤维细胞自噬影响的初步研究[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2008, 24 (7): 511-513.
- [6] Woo DK, Shadel GS. Mitochondrial stress signals revise an old aging theory[J]. *Cell*, 2011, 144 (1): 1-12.
- [7] Larue L, Delmas V. The WNT/ β -catenin pathway in melanoma[J]. *Front Biosci*, 2006, 11 (1): 733-742.
- [8] 张 意, 郭志丽, 张 勇. VitC 和锌对游泳训练大鼠皮肤光老化的协同防护作用[J]. *东南国防医药*, 2016, 18 (4): 337-341.
- [9] Nam JH, Nam DY, Lee DU. Valencene from the Rhizomes of *Cyperus rotundus* Inhibits Skin Photoaging-Related Ion Channels and UV-Induced Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells[J]. *J Nat Prod*, 2016, 79 (4): 1091-1096.
- [10] Park G, Baek S, Kim JE, *et al.* Flt3 is a target of coumestrol in protecting against UVB-induced skin photoaging [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 98 (3): 473-483.
- [11] 田黎明, 彭 圆, 胡荣毅, 等. 衰老标记蛋白 30 对过氧化氢所致人皮肤成纤维细胞衰老表型的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2016, 33 (6): 452-456.
- [12] Kagami Y, Kondo Y, Handa S, *et al.* Senescence marker protein-30/gluconolactonase expression in the mouse ovary during gestation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36 (12): 2005-2008.
- [13] Mizukami H, Saitoh S, Machii H, *et al.* Senescence marker protein-30 (SMP30) deficiency impairs myocardium-induced dilation of coronary arterioles associated with reactive oxygen species[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (5): 9408-9423.
- [14] Rass K, Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 624: 162-178.
- [15] Toussaint O, Royer V, Salmon M, *et al.* Stress-induced premature senescence and tissue ageing[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64 (5-6): 1007-1009.
- [16] 陈文琦, 许惠娟, 毕志刚. UVB 照射诱导皮肤成纤维细胞早期衰老的研究[J]. *中华皮肤杂志*, 2010, 43 (2): 98-100.
- [17] Williams M, Ouhtit A. Towards a Better Understanding of the Molecular Mechanisms Involved in Sunlight-Induced Melanoma [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2005, 2005 (1): 57-61.

(收稿日期: 2017-06-13; 修回日期: 2017-08-10)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 王建东)