· 实验研究 ·

中波紫外线对人永生化表皮细胞损伤作用*

刘建宝[1], 侯海峰[2], 刘亚奇[2], 李群伟[2]

摘　要: 目的　探讨中波紫外线(UVB)对人永生化表皮(HaCaT)细胞的损伤作用,为紫外线损伤防护提供技术支持。**方法**　取体外培养 HaCaT 细胞,用 0(对照组)、10、30、60 mJ/cm^2 剂量的 UVB 照射后继续培养 12 h,以流式细胞术检测细胞凋亡率,用彗星实验(单细胞凝胶电泳)检测细胞 DNA 损伤情况。**结果**　对照组、10、30、60 mJ/cm^2 紫外线照射组 HaCaT 细胞早期凋亡率分别为(1.2 ± 0.14)%、(2.23 ± 0.37)%、(4.13 ± 0.29)%、(5.97 ± 0.17)%,晚期凋亡率分别为(2 ± 0.13)%、(7.63 ± 0.52)%、(23.36 ± 0.98)%、(40.46 ± 1.39)%,与对照组比较,UVB 照射组 HaCaT 细胞早期、晚期凋亡率明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组、10、30、60 mJ/cm^2 紫外线照射组 HaCaT 细胞 DNA 尾矩分别为(0.13 ± 0.25)、(21.78 ± 2.31)、(53.48 ± 5.66)、(79.16 ± 7.47),Olive 尾矩分别为(0.32 ± 0.47)、(16.17 ± 1.96)、(36.43 ± 2.89)、(51.71 ± 1.87),与对照组比较,UVB 照射组 HaCaT 细胞 DNA 尾矩、Olive 尾矩明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论**　UVB 照射可使 HaCaT 细胞 DNA 产生损伤,诱发细胞凋亡,细胞 DNA 损伤可能是某些高原罕见病的发病原因之一。

关键词: 紫外线; HaCaT 细胞; 细胞凋亡; DNA 损伤

中图分类号: R 322.99$^+$1　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2016)10-1330-03　DOI: 10.11847/zgggws2016-32-10-09

Damage effect of ultraviolet B on HaCaT cells

LIU Jian-bao*, HOU Hai-feng, LIU Ya-qi, et al (* *Ji'nan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ji'nan, Shandong Province* 250000, China)

Abstract: Objective　To investigate the effect of ultraviolet B (UVB) on HaCaT cells for providing technical support to prevention of ultraviolet damage. **Methods**　Cultured HaCaT cells were exposed to UVB at intensity of 0, 10, 30, and 60 mJ/cm^2 and subsequently incubated for 12 hours. Flow cytometry (FCM) was used to detect proliferation rates of HaCaT cells exposed to different intensities of UVB. Commet method was used to detect DNA damage of the HaCaT cells. **Results**　The early apoptotic rates of control group, 10, 30, and 60 mJ/cm^2 UVB groups were 1.2 ± 0.14%, 2.23 ± 0.37 %, 4.13 ± 0.29%, and 5.97 ± 0.17%; the late apoptotic rates were 2 ± 0.13%, 7.63 ± 0.52%, 23.36 ± 0.98%, and 40.46 ± 1.39%, with statistically significant difference ($P < 0.05$). The tail moments (TM) of control group, 10, 30, and 60 mJ/cm^2 UVB groups were 0.13 ± 0.25, 21.78 ± 2.31, 53.48 ± 5.66, and 79.16 ± 7.47; the olive tail moments (OTM) were 0.32 ± 0.47, 16.17 ± 1.96, 36.43 ± 2.89, and 51.71 ± 1.87, with statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion**　UVB can induce cell apoptosis and DNA damage and DNA damage may be one of the causes of some rare diseases among residents living in plateau area.

Key words: ultraviolet B; HaCaT cell; cell apoptosis; DNA damage

西藏前藏地区调查发现,这一地区的人群某些骨发育不良疾病明显高于平原地区[1-4],这些骨发育不良疾病多属于罕见病。这些罕见病发病机制探讨倍受关注。研究表明,中波紫外线(ultraviolet B, UVB)对上皮细胞具有损伤作用[5]。为探讨细胞损伤机制,本研究采用不同剂量紫外线对人永生化表皮细胞(HaCaT)进行照射,通过细胞凋亡实验及彗星实验分别检测细胞凋亡率及细胞 DNA 损伤情况,旨在为探讨高原罕见病发生机制提供理论依据。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　HaCaT 细胞(中科院上海细胞库);杜尔伯科极限必需培养液(Dulbecco minimum essential medium, DMEM)(美国 Gibeco 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、彗星实验试剂盒(南京凯基生物公司),青链霉素、胰酶(北京 Soliabo 公司)。流式细胞仪(美国 BD 公司),荧光显微镜(日本 Olympus 公司),水平电泳槽(北京六一仪器厂),紫外线光源(广东佛山照明公司),紫外线强度测量仪(深圳欣宝瑞仪器有限公司)。

1.2　细胞培养　将 HaCaT 细胞接种于培养瓶,用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,培养于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中。每 2 ~ 3 d 换液,待细胞长至 80% 融合时进

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81060228; 81273155); 山东省自然科学基金(ZR2012HL47)
作者单位: 1. 济南市疾病预防控制中心,山东 250000; 2. 泰山医学院公共卫生学院
作者简介: 刘建宝(1988 -),女,山东济宁人,硕士,主要从事疾病预防控制工作。
通讯作者: 李群伟,E-mail: qwli@ tsmc. edu. cn
数字出版日期: 2016 - 1 - 7 8:08
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160107.0808.010.html

行实验。

1.3　细胞分组与处理　将细胞消化，调整密度为 2×10^5 个/mL，接种在 6 孔培养板，每孔 1 mL，每组 5 个复孔，共设 4 组，分别为对照组、10、30、60 mJ/cm^{2}紫外线照射组；照射前小心吸去培养基，用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗 2～3 遍，加入少许 PBS 液刚好覆盖孔底，将板置于中波紫外线灯下 15 cm 处，按预先设定好的剂量照射，对照组除不进行照射外其余条件与照射组一致。照射后加入原培养基继续培养 12 h。

1.4　指标与方法

1.4.1　细胞凋亡检测　采用流式细胞术，消化细胞制成悬液收集于离心管内，使细胞数目不少于 1×10^5 个，1 000 r/min 离心 5 min。加入预冷 PBS，洗涤细胞 2 次（1 000 r/min，5 min）。各管中加入 500 μL的 binding buffer 悬浮细胞，轻柔吹打成细胞悬液。避光条件下，除调零组外各管中加入 5 μL annexin V fluorescein isothiocyanate（FITC），充分混匀，室温反应 5～15 min。用 300 目尼龙过滤网过滤各管细胞悬液置于样品管中。除调零组外每管中各加入 5 μL propidium iodide（PI），1 h 内上机检测。

1.4.2　彗星实验（单细胞凝胶电泳）　细胞用冰冷 PBS 洗 1 次，离心收集，用 PBS 重悬使其密度为 1×10^4 个/mL；在载玻片上自制大小为 15 mm×12 mm×2 mm 小槽，按照试剂盒说明铺胶；将盖玻片移去，放置载玻片于平皿中，将预冷 lysis buffer 倒入（使用前每 9 mL 加入 1 mL 二甲基亚砜），4 ℃环境下裂解 1～2 h，倒掉 lysis buffer，用 PBS 轻轻漂洗载玻片；将载玻片平放于水平电泳槽，倒入刚配制的电泳碱性缓冲液，加至载玻片胶面以上 0.25 cm 左右，室温环境下解旋 20～60 min；将直流稳压电源电压调至 25V，时间设为 20～30 min；在器皿中加入 0.4 mol Tris-HCl（pH7.5）缓冲液，电泳完毕将载玻片取出置于器皿中，4 ℃环境下中和 3 次，每次 10 min，取出载玻片用吸水纸轻轻擦拭剩余缓冲液。滴加 20 μL PI 染液覆盖小槽，盖上盖玻片，避光染色10 min；荧光显微镜下观察，515～560 nm 波长激发光、PI 染色的 DNA 图像呈红色，观察核 DNA 和迁移 DNA（即彗星尾）；图像用 CASP 软件分析，测定彗星尾矩（tail moment，TM）、Olive 尾矩（olive tail moment，OTM），表示 DNA 损伤情况。

1.5　统计分析　计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，组间比较采用 Dunnet-*t* 法，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

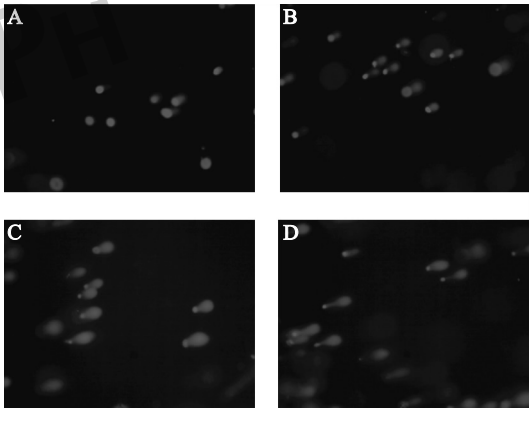
2.1　UVB 对 HaCaT 细胞凋亡影响（表 1）　与对照组比较，10、30、60 mJ/cm^2 剂量照射组 HaCaT 细胞早期、晚期凋亡率均明显增加，差异均有统计学意义（$F=326.39$、1867.16，$P<0.05$），呈剂量依赖性。

表 1　紫外线对 HaCaT 细胞凋亡影响（%，$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别（mJ/cm^2）	早期凋亡率	晚期凋亡率
对照组	1.20±0.14	2.00±0.13
UVB 10	2.23±0.37^a	7.63±0.52^a
30	4.13±0.29^{ab}	23.36±0.98^{ab}
60	5.97±0.17^{abc}	40.46±1.39^{abc}

注：与对照组比较，a $P<0.05$；与 10 mJ/cm^2 组比较，b $P<0.05$；与30 mJ/cm^{2}组比较，c $P<0.05$。

2.2　UVB 对 HaCaT 细胞 DNA 损伤影响（图 1、表 2）　结果显示，对照组细胞无明显拖尾现象（图 1A），10 mJ/cm^2 剂量紫外线照射组细胞可见拖尾现象（图 1B），30 mJ/cm^2 剂量紫外线照射组细胞拖尾现象明显，60 mJ/cm^2 剂量紫外线照射组细胞拖尾最长。与对照组比较，各剂量 UVB 组 HaCaT 细胞尾矩和 Olive 尾矩明显延长，差异有统计学意义（$F=259.35$、637.64，$P<0.05$）；随着照射剂量增加，尾矩和 Olive 尾矩逐渐增大，存在剂量依赖性。



注：A：对照组；B、C、D：10、30、60 mJ/cm^{2}UVB 组。

图 1　UVB 对 HaCaT 细胞 DNA 损伤影响

表 2　紫外线对 HaCaT 细胞 DNA 损伤影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别（mJ/cm^2）	TM	OTM
对照组	0.13±0.25	0.32±0.47
UVB 10	21.78±2.31^a	16.17±1.96^a
30	53.48±5.66^{ab}	36.43±2.89^{ab}
60	79.16±7.47^{abc}	51.71±1.87^{abc}

注：与对照组比较，a $P<0.05$；与 10 mJ/cm^2 组比较，b $P<0.05$；与 30 mJ/cm^2 组比较，c $P<0.05$。

3　讨　论

紫外线是波长为 100～400 nm 的光辐射。其中中、长波紫外线对人体生理功能影响较大，中波紫外线（UVB）因可直接被细胞 DNA 吸收，危害更大。紫外线属非电离化辐射，作用于细胞后，其光子能量

被原子或分子吸收,引起分子原子电子能级状态改变,进而导致细胞内相关事件出现。核酸和蛋白质分别在波长为 260 nm 和 278 nm 处有吸收峰,正处于紫外线波长范围,因此紫外辐射对细胞损伤作用常体现在与生物大分子有关的细胞增殖和凋亡方面[6-8]。紫外线诱导的细胞损伤研究已成为细胞生物学、分子生物学领域的研究热点之一。紫外线空间分布主要与地理纬度、地势高度、云层散射等因素有关[9]。在中国,冬季青藏高原、云南地区紫外辐射强度最高,华南地区次之,处于高纬度的东北和新疆北部最低。夏季青藏高原地区紫外线辐射量最大,西北明显高于东南,中纬度地区高于低纬度和高纬度地区。其余月份总体呈现西部高于东部,西北大于东南[9-10]。

环境污染所致臭氧层破坏可引起紫外线辐射增多。人类现代工业生产生活排放的大量化学物质如有机溴化物及氯氟烃类化合物加速了臭氧层破坏,使得大气平流层臭氧破坏加重。虽然人类已经意识到臭氧层破坏的严重性,开始重视环境保护,但臭氧浓度在北半球依旧在降低[11],2011 年北极臭氧浓度显著下降[12-13],预计 2015—2019 年地球平流层臭氧浓度将降至最低[14]。透过北极的紫外线可对整个北半球人类的生活产生重要影响[15]。中纬度地区由于臭氧浓度减少,紫外线辐射带来的压力增加[16-17],尤其是中波紫外线方面[18]。在过去几十年中,北半球中纬度地区的地表中波紫外线辐射强度增加了大约 5%[19]。有研究者预测,在中国,臭氧总量将会以线性趋势减少,到 2030 年会达到最低值,预计在 20 年内不会好转[20]。

本研究结果显示,以 10、30、60 mJ/cm^2 UVB 作用于体外培养的 HaCaT 细胞,与对照组比较,HaCaT 细胞早期、晚期凋亡率及总凋亡率均随着照射剂量增加逐渐增加。与已有研究结果[21]一致。单细胞凝胶电泳实验显示,经紫外线照射后 HaCaT 细胞出现拖尾现象,剂量越大,拖尾越严重,表明 DNA 损伤越严重;与对照组比较,紫外线照射组 HaCaT 细胞尾矩和 olive 尾矩均明显延长,呈剂量效应关系。提示,紫外线照射导致 DNA 损伤可能是细胞凋亡、细胞生长抑制作用机制之一;UVB 可使细胞 DNA 产生损伤,诱导细胞发生凋亡;而细胞 DNA 损伤可能是某些高原罕见病的发病原因之一。

参考文献

[1] 李群伟,次央,侯海峰,等. 肱骨短小症流行病学调查报告[J]. 中国预防医学杂志,2012,13(10):721-723.

[2] 李群伟. 一种新的骨骼疾病-肱骨短小症的报告[J]. 罕少疾病杂志,2010,17(2):62-63.

[3] 李群伟,次央,侯海峰,等. 多发性骨疣一例[J]. 中国实用儿科杂志,2013,28(2):158.

[4] 李群伟,索朗次登,边巴次仁,等. 跖骨短小一家系二例[J]. 中国优生与遗传杂志,2014,22(8):113-114.

[5] 刘建宝,焦鹏,侯海峰,等. 紫外线对人胃癌细胞 SGC-7901 损伤作用的研究[J]. 中国地方病防治杂志,2014,29(6):403-406.

[6] 冯莉,苏奉发,李丽,等. 紫外线致 Hep-G2 细胞调亡的分子机制初探[J]. 川北医学院学报,2004,19(1):16-19.

[7] Einspahr JG, Bowden GT, Alberts DS. Skin cancer chemoprevention: strategies to save our skin[J]. Recent Results Cancer Res, 2003, 163: 151-164.

[8] Rafferty TS, Beckett GT, Walker C, et al. Selenium protects primary human keratinocytes from apoprosis induced by exposure to ultraviolet radiation[J]. Clin Exp Dermatol, 2003, 28(3): 294-300.

[9] 廖永丰,王五一,张莉,等. 到达中国陆面的生物有效紫外线辐射强度分布[J]. 地理研究,2007,26(4):821-827.

[10] 祝青林,于贵瑞,蔡福,等. 中国紫外辐射的空间分布特征[J]. 资源科学,2005,27(1):108-113.

[11] Agusti S, Llabres M, Carreja B, et al. Contrasting sensitivity of marine biota to UV-B radiation between southern and northern hemispheres[J]. Estuaries and Coasts, DOI: 10.1007/s12237-014-9790-9.

[12] Manney GL, Santee ML, Rex M, et al. Unprecedented Arctic ozone loss in 2011[J]. Nature, 2011, 478: 469-475.

[13] Dugo MA, Han F, Tchounwou PB. Persistent polar depletion of stratospheric ozone and emergent mechanisms of ultraviolet radiation-mediated health dysregulation[J]. Reviews on Environmental Health, 2012, 27: 103-116.

[14] Valkama E, Kivimäenpää M, Hartikainen H, et al. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth. chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (Friaries × anamosa) and barley (*Horde vulgare*) treated in the field[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2003, 120: 267-278.

[15] European Commission. European research in the stratosphere 1996-2000: advances in our understanding of the ozone layer during THESEO[R]. Brussels: Office for Official Publications of the European Communities.

[16] Zerefos CS, Meleti C, Balis DS, et al. On changes of spectral UV-B in the 90's in Europe[J]. Advances in Space Research, 2000, 26: 1971-1978.

[17] Gao ZQ, Gao W, Chang NB. Spatial statistical analyses of global trends of ultraviolet B fluxes in the continental United States[J]. GIScience and Remote Sensing, 2012, 49: 735-754.

[18] Randeniya LK, Vohralik PF, Plumb IC. Stratospheric ozone depletion at northern mid latitudes in the 21st century: the importance of future concentrations of greenhouse gases nitrous oxide and methane[J]. Geophysical Research Letters, 2002, 29: 101-104.

[19] Song XZ, Jiang H, Zhang ZT, et al. Interactive effects of elevated UV-B radiation and N deposition on decomposition of Moso bamboo litter[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 69: 11-16.

[20] 韦惠红,郑有飞. 我国臭氧总量的时空分布特征[J]. 南京气象学院学报,2006,29(3):390-395.

[21] 黄静红,李德如,阎国富. 紫外线对 HaCaT 细胞损伤作用的研究[J]. 重庆医学,2010,39(23):3212-3213,3216.

收稿日期: 2015-08-24　　(解学魁编辑　郑新校对)