

· 论著 ·

表皮生长因子对肿瘤坏死因子 α 致 HaCaT 细胞凋亡的抑制作用



梁鹏飞 黄晓元 陈北方 蒋碧梅 龙剑虹 张丕红 杨兴华

【摘要】 目的 了解肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 导致 HaCaT 细胞凋亡过程中过氧化物酶体增殖物激活受体 β (PPARβ) 的表达情况, 探讨表皮生长因子 (EGF) 对 HaCaT 细胞的保护机制。 **方法** 将培养的 HaCaT 细胞分为正常对照组 (不作任何处理)、TNF-α 小剂量组 (10 ng/ml TNF-α 处理)、TNF-α 大剂量组 (20 ng/ml TNF-α 处理)、EGF + TNF-α 小剂量组、EGF + TNF-α 大剂量组, 后 2 组先用 20 ng/ml EGF 培养 4 h 后, 再分别予以 10、20 ng/ml TNF-α 处理。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 荧光检测试剂盒测定 caspase-3 的活性, 噻唑蓝比色法检测细胞存活率。以 5、10、20、40 ng/ml 的 EGF 处理 HaCaT 细胞, 采用反转录-PCR 和蛋白质印迹法检测 PPARβ mRNA 及其蛋白的表达。 **结果** 与 TNF-α 小剂量组 [(32 ± 6)%]、TNF-α 大剂量组 [(57 ± 6)%] 比较, EGF + TNF-α 小剂量组、EGF + TNF-α 大剂量组细胞凋亡率 [(20 ± 3)%、(28 ± 4)%] 明显下降 ($P < 0.01$), caspase-3 活性降低、存活率上升 ($P < 0.01$)。20 ng/ml EGF 处理细胞时, PPARβ mRNA 及其蛋白表达最强。 **结论** EGF 在抑制 TNF-α 导致的 HaCaT 细胞凋亡的同时, 亦增强细胞中 PPARβ 的表达。

【关键词】 细胞凋亡; PPARβ; 表皮生长因子; 肿瘤坏死因子 α; HaCaT 细胞

Inhibitory effect of epidermal growth factor on apoptosis in HaCaT keratinocytes induced by TNF-α LIANG Peng-fei, HUANG Xiao-yuan, CHEN Bei-fang, JIANG Bi-mei, LONG Jian-hong, ZHANG Pi-hong, YANG Xing-hua. Department of Burns and Plastic Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, P. R. China

Corresponding author: HUANG Xiao-yuan, Email: huxzhong@yahoo.com.cn, Tel: 0731-4327006

【Abstract】 Objective To explore the effect of epidermal growth factor (EGF) on apoptosis induced by TNF-α and the expression of PPARβ in HaCaT keratinocytes. **Methods** HaCaT keratinocytes were cultured and randomly divided into A (normal control), B (with treatment of 10 ng/ml TNF-α for 24 hours), C (with treatment of 20 ng/ml TNF-α for 24 hours), D (with treatment of 10 ng/ml TNF-α after 20 ng/ml EGF treatment for 4 hours), E (with treatment of 20 ng/ml TNF-α after 20 ng/ml EGF treatment for 4 hours) groups. The apoptosis of HaCaT keratinocytes was observed by flow cytometry. The proliferative activity of HaCaT keratinocytes was evaluated by MTT method. The activity of caspase-3 was analyzed with caspase colorimetric assay Kit. The changes in the mRNA and protein expression of PPARβ in HaCaT keratinocytes were observed by RT-PCR and western-blotting after treatment with different concentrations (5, 10, 20, 40 ng/ml) of EGF for 4 or 24 hrs. **Results** Compared with A and B groups [(32 ± 6)%、(57 ± 6)%], the apoptosis of HaCaT keratinocytes in D and E groups were significantly increased [(20 ± 3)%、(28 ± 4)%], respectively, $P < 0.01$, while the survival rate of HaCaT keratinocytes in D and E groups increased, and the caspase-3 activity were decreased ($P < 0.01$). The expression of PPARβ mRNA and protein in HaCaT keratinocytes reached the peak with the treatment of 20 ng/ml EGF. **Conclusion** EGF can inhibit the apoptosis of HaCaT keratinocytes induced by TNF-α, and it can also increase the expression of PPARβ.

【Key words】 Apoptosis; PPAR-beta; Epidermal growth factor; Tumor necrosis factor-alpha; HaCaT cells

基金项目:湖南省自然科学基金(06jj4033)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院烧伤整形科(梁鹏飞、黄晓元、龙剑虹、张丕红、杨兴华),高压氧科(陈北方);中南大学基础医学院病理生理学教研室(蒋碧梅)

通讯作者:黄晓元, Email: huxzhong@yahoo.com.cn, 电话: 0731-

4327006

研究表明,应用外源性表皮生长因子(EGF)可调节创面的修复^[1-4]。烧伤创面以及正常表皮与皮肤附属器的角质形成细胞均表达 EGF 的结合受体(EGFR)^[5,6]。当 EGF 与 EGFR 胞外配体结合区结合后,激活一系列信号级联反应最终引起靶基因的转录和表达,从而影响细胞的增殖、迁移及分化^[7]。

过氧化物酶体增殖物激活受体 β (PPAR β) 可诱导角质形成细胞增殖、分化、迁移和抗凋亡,从而利于皮肤伤口愈合及创面修复^[8]。但它是否在 EGF 的信号转导过程中起作用,目前尚不清楚。本研究中笔者采用肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 介导体外培养的 HaCaT 细胞发生凋亡,分析 EGF 对其的影响,观察 HaCaT 细胞中 PPAR β 的表达情况。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

HaCaT 细胞株(美国 ATCC 公司), MEM 培养基(美国 Gibco 公司), 噻唑蓝 (MTT)、TNF- α (美国 Promega 公司), PPAR β 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 荧光检测试剂盒(美国 R&D 公司), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 及兔抗鼠 IgG、EGF (美国 Sigma 公司), 二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。倒置相差显微镜、紫外透射仪(日本 Olympus 公司), 1601 型紫外分光光度计(日本岛津公司), 酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司), PCR 仪(德国 Biometra 公司)。

1.2 细胞培养与分组

常规复苏 HaCaT 细胞,接种于含 MEM 培养液的培养瓶,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml。分为正常对照组(不作任何处理)、TNF- α 小剂量组(10 ng/ml TNF- α 处理)、TNF- α 大剂量组(20 ng/ml TNF- α 处理)、EGF + TNF- α 小剂量组、EGF + TNF- α 大剂量组,后 2 组采用 20 ng/ml EGF 培养 4 h 后,分别以 10、20 ng/ml TNF- α 处理。

1.3 细胞凋亡率的测定

将细胞按分组要求处理后刮下,收集于 10 ml 离心管中,1000 $\times g$ 离心 8 min,弃上清液。以 5 ml 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重新悬浮细胞,缓慢加入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的体积分数 95% 乙醇 15 ml,使其体积分数为 70%。重新悬浮细胞,冰浴 30 min 固定,并尽量吹打成单细胞,采用 PBS 将细胞浓度调至 1×10^6 个/ml。将等体积的单细胞悬液和碘化丙啶染液混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 20 ~ 30 min。测定前将样品用 300 目尼龙膜过滤,采用流式细胞仪检测 HaCaT 细胞的凋亡情况并计算凋亡率。重复检测 3 次。

1.4 caspase-3 活性的测定

参照 caspase-3 荧光检测试剂盒说明书操作。采用裂解液 (1×10^4 个细胞/ μl) 将各组细胞置于冰

上裂解 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\times g$ 离心 1 min。取上清液 5 μl 采用 Bradford 法行蛋白定量,应用紫外分光光度计测定波长 595 nm 下吸光度 ($A_{595 \text{ nm}}$) 值;另取 45 μl 上清液,加入 50 μl 2 倍反应缓冲液及 5 μl 底物 (caspase-3),37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h,测定波长 405 nm 下的 $A_{405 \text{ nm}}$ 值,计算 caspase-3 活性 ($A_{405 \text{ nm}}$ 值/ $A_{595 \text{ nm}}$ 值)。均重复检测 3 次。

1.5 细胞存活率的测定

取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板 (1×10^4 个/孔),以含体积分数 10% 新生小牛血清的 MEM 培养液培养 12 h,按分组要求处理细胞后,向每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl 继续培养 4 h。终止培养,弃上清液,加入二甲亚砜 150 μl ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡至蓝紫色的甲胺结晶完全溶解。采用酶标仪测量波长 490 nm 下 $A_{490 \text{ nm}}$ 值,并计算存活率。重复检测 3 次。

1.6 细胞 PPAR β mRNA 的表达水平

采用 D-Hank 平衡盐溶液将 EGF 配制成工作液 (浓度为 50 g/L),再将 EGF 加入培养液中,使其终浓度分别为 5、10、20、40 ng/ml。将 HaCaT 细胞采用不同浓度的 EGF 处理 4 h 后,Trizol 试剂抽提细胞的总 RNA,以 Primer3 软件(上海博亚生物技术有限公司)设计引物,PPAR β 上游引物:5'-GAGCAGC-CACAGGAGGAAGCC-3',下游引物:5'-CCGTCA-CAGCCCATCTGCAGT-3'。以细胞总 RNA 为模板行反转录-PCR,甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参照。扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶染色,照相。

1.7 细胞 PPAR β 蛋白的表达水平

将 HaCaT 细胞采用上述 4 种浓度的 EGF 处理 24 h 后,以十二烷基硫酸钠加样缓冲液裂解细胞,收集蛋白,采用 Bradford 法进行蛋白定量。将制备好的蛋白样品置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。每泳道 20 μg 蛋白上样,经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转膜至硝酸纤维膜,封闭后加入 PPAR β 多克隆抗体,室温孵育 2 h,再加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 或兔抗鼠 IgG 孵育 40 min,DAB 显色,拍摄照片。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS for Windows 软件包进行检验,两组间比较用 t 检验,多组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 EGF 对 TNF- α 介导 HaCaT 细胞凋亡的影响

正常对照组细胞凋亡率为 (8 ± 4)%,无凋亡峰。TNF- α 小剂量组、TNF- α 大剂量组细胞凋亡率分别为

(32 ± 6)%、(57 ± 6)%，于处理 24 h 后出现凋亡峰且高于正常对照组 ($P < 0.01$)。EGF + TNF- α 小剂量组、EGF + TNF- α 大剂量组细胞凋亡率分别为 (20 ± 3)%、(28 ± 4)%，明显低于 TNF- α 小剂量组、TNF- α 大剂量组 ($P < 0.01$)。

2.2 EGF 对 TNF- α 介导 HaCaT 细胞 caspase-3 的活性影响

正常对照组细胞 caspase-3 活性为 0.95 ± 0.34 ，明显低于 TNF- α 小剂量组、TNF- α 大剂量组 (2.25 ± 0.32 、 2.78 ± 0.42 ， $P < 0.01$)。与 2 个 TNF- α 组比较，EGF + TNF- α 小剂量组、EGF + TNF- α 大剂量组 caspase-3 活性 (1.69 ± 0.40 、 1.88 ± 0.26) 均被抑制 ($P < 0.01$)。

2.3 EGF 对 TNF- α 介导 HaCaT 细胞存活率的影响

EGF + TNF- α 小剂量组、EGF + TNF- α 大剂量组的细胞存活率分别高于 TNF- α 小剂量组、TNF- α 大剂量组 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.4 EGF 介导 HaCaT 细胞中 PPAR β mRNA 水平的表达

细胞未用 EGF 处理时，PPAR β mRNA 表达处于相对较低的水平。不同浓度的 EGF 处理细胞 4 h 后，PPAR β mRNA 的表达水平均上升，其中 20 ng/ml EGF 处理时达峰值。见图 1。

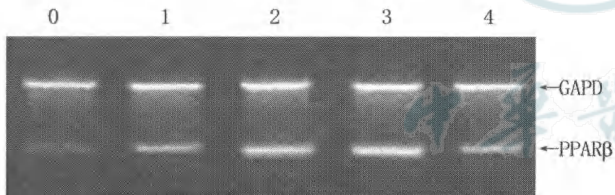


图 1 反转录-PCR 检测表皮生长因子 (EGF) 对 HaCaT 细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 β (PPAR β) mRNA 表达的影响。GAPD 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶；0. 未用 EGF 处理；1~4. EGF 的处理浓度依次为 5、10、20、40 ng/ml

2.5 EGF 介导 HaCaT 细胞中 PPAR β 蛋白水平的表达

当 EGF 的浓度为 20 ng/ml 时，PPAR β 蛋白的表达达峰值 (0.79 ± 0.21)；当 EGF 的浓度为 5、10、

40 ng/ml 时，PPAR β 蛋白表达分别为 0.21 ± 0.12 、 0.40 ± 0.10 、 0.51 ± 0.31 ，均明显高于未加 EGF 时 PPAR β 蛋白的表达水平 (0.00 ± 0.09)。见图 2。

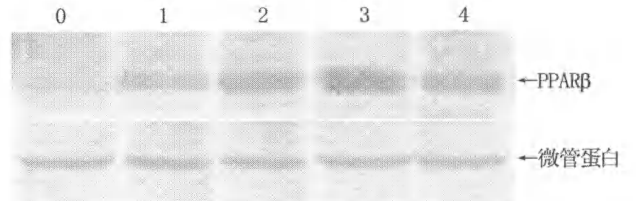


图 2 蛋白质印迹法检测表皮生长因子 (EGF) 对 HaCaT 细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 β (PPAR β) 蛋白表达的影响。0. 未用 EGF 处理；1~4. EGF 的处理浓度依次为 5、10、20、40 ng/ml

3 讨论

皮肤易遭受各种环境的损伤，如烧(创)伤、紫外线损伤等，在损伤部位需优先重建有效的皮肤屏障来防止各种细菌感染，维护机体的完整。研究表明，伤后血清和痂下水肿液中 TNF- α 水平明显升高，且与烧伤的严重程度显著相关^[9,10]；烧伤创面愈合的关键在很大程度上取决于角质形成细胞的功能。本研究结果表明，HaCaT 细胞经 20 ng/ml EGF 预作用 4 h 后再予以 TNF- α 处理，细胞凋亡明显受到抑制，细胞增殖能力增强，caspase-3 的活性亦明显受到抑制。提示创面应用 EGF 后，角质形成细胞的存活增加，有利于局部再上皮化。这一结果为 EGF 促进创面修复提供了证据。

EGF 家族包括 EGF、转化生长因子 α 、肝素结合 EGF 生长因子、双调蛋白 (amphiregulin)、神经调节蛋白 (neuregulin)、Epiregulin、Betacellulin、Epigen 等，均是牛痘病毒和痘病毒基因编码的产物^[11,12]。这些生长因子均通过结合 EGFR 家族中的不同成员而发挥生物学功能。EGFR 家族包括 EGFR/HER1/erbB1、HER2/erbB2、HER3/erbB3、HER4/erbB4，这些受体一旦结合配体即形成同源或异源二聚体。受体二聚化后，其胞内区酪氨酸激酶交互磷酸化或自我磷酸化被激活^[13]，并进一步激活下游信

表 1 各组 HaCaT 细胞的存活率 (%， $\bar{x} \pm s$)

组别	处理前	处理时间 (h)		
		6	12	24
TNF- α 小剂量组	0.364 ± 0.046	0.312 ± 0.032^a	0.272 ± 0.039^a	0.221 ± 0.011^a
TNF- α 大剂量组	0.356 ± 0.056	0.288 ± 0.022^a	0.239 ± 0.019^a	0.194 ± 0.031^a
EGF + TNF- α 小剂量组	0.368 ± 0.041	0.352 ± 0.032^b	0.329 ± 0.028^b	0.298 ± 0.027^b
EGF + TNF- α 大剂量组	0.361 ± 0.051	0.347 ± 0.042^b	0.312 ± 0.028^b	0.278 ± 0.037^b

注：TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ，EGF 为表皮生长因子；数据以吸光度值表示，均重复测定 3 次；正常对照组 HaCaT 细胞存活率为 (0.362 ± 0.036)%；与正常对照组比较，a: $P < 0.01$ ；与 TNF- α 大剂量组及 TNF- α 小剂量组比较，b: $P < 0.01$

号级联反应。EGFR 的信号级联反应包括: Ras-丝裂原活化蛋白激酶途径、磷脂酶 C- γ 途径、磷脂酰肌醇 3-激酶途径、信号转导子和转录激活子途径等^[7], 这种信号转导的级联反应最终引起靶基因的转录和表达, 调节细胞的增殖、迁移、分化和抗凋亡作用, 从而影响创面修复。

转录因子 PPAR β 主要参与某些启动子区含有其结合元件基因的转录。研究表明, 正常情况下采用 RNA 酶保护法在皮肤中检测不到 PPAR β 的表达。当皮肤损伤时, PPAR β 的表达被炎性因子再次激活, 其机制是促炎性细胞因子通过应激活蛋白激酶通路, 使激活蛋白 1 转录复合物的表达增强, 同时这些炎性细胞因子也刺激其内源性配体的产生而增加活性受体的数量, 被再次激活的 PPAR β 影响着修复过程中角质形成细胞的存活、增殖和分化^[14]。修复的早期, PPAR β 通过 Akt1 调节角质形成细胞的抗凋亡情况, 以增加它存活的数量; 晚期 PPAR β 则促进角质形成细胞的增殖和分化^[15, 16]。由配体激活的 PPAR β 可以增加伤口及创面中角质形成细胞总的存活数, 迅速启动再上皮化。那么同样可以影响角质形成细胞存活、增殖、分化和迁移的 EGF 与 PPAR β , 是否存在某种内在的联系呢? 本研究结果表明, EGF 可上调细胞中 PPAR β mRNA 及蛋白表达, 且其浓度为 20 ng/ml 时达到峰值。提示 EGF 在促进创面修复时, 除了启动上述的信号级联反应外, 还可能通过增强 PPAR β 的作用发挥其生物学功能。EGF 是否增强了 PPAR β 的转录活性, 以及由此活化的 PPAR β 是否可增加角质形成细胞的存活率, 均有待进一步研究。

参考文献

- [1] Brown GL, Nanney LB, Griffen J, et al. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med*, 1989, 321(2): 76-79.
- [2] 郑军, 黄晓元, 韦星. 表皮生长因子对大鼠深 II 度烧伤创面愈

合的影响. 中华烧伤杂志, 2003, 19(5): 289-292.

- [3] Gibbs S, Pinto AN, Murli S, et al. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Reg*, 2000, 8(3): 192-203.
- [4] Lee AR. Enhancing dermal matrix regeneration and biomechanical properties of 2nd degree-burn wounds by EGF-impregnated collagen sponge dressing. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(11): 1311-1316.
- [5] 杨奕敏, 陆树良, 董叫云, 等. 大鼠浅 II 度烫伤创面表皮生长因子受体的表达. 中华烧伤杂志, 2003, 19(4): 243.
- [6] Wenczak BA, Lynch JB, Nanney LB. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. *J Clin Invest*, 1992, 90(6): 2392-2401.
- [7] Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(6): 637-643.
- [8] 梁鹏飞, 黄晓元, 杨兴华. 皮肤创伤修复的新靶点——过氧化物酶体增殖物激活受体 β . 中华烧伤杂志, 2005, 21(6): 476-480.
- [9] 李志清, 周一平, 荣新洲, 等. 豚鼠烧伤后痂下水肿液和血浆中 TNF α 、IL-6 和 IL-8 的变化. 中华整形烧伤外科杂志, 1999, 15(2): 158-159.
- [10] 张彤, 李雨林, 裴玉梅. 烧伤患者血清 TNF- α 含量的变化. 放射免疫学杂志, 2003, 16(5): 282-283.
- [11] Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, et al. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 18265-18271.
- [12] Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 2001, 37 Suppl 4: S3-8.
- [13] Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 6845-6857.
- [14] Tan NS, Michalik L, Noy N, et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev*, 2001, 15(24): 3263-3277.
- [15] Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, et al. Anti-apoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell*, 2002, 10(4): 721-733.
- [16] Di-Poi N, Michalik L, Tan NS, et al. The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 85(2 Pt 5): 257-265.

(收稿日期: 2006-08-31)

(本文编辑: 莫愚)

· 消息 ·

《中华烧伤杂志》关于增聘国际编委的公告

经中华医学会批准, 国际烧伤学术界知名学者 Basil A. Pruitt 教授与 David N. Herndon 教授 2007 年被聘为中华烧伤杂志第二届编辑委员会成员, 并授予聘书。Basil A. Pruitt 教授现任《Journal of Trauma》杂志主编, 目前已主编专著 13 部、参编专著 168 部、发表论文 444 篇。David N. Herndon 教授现任《Shock》等国际知名杂志编委, 目前已主编专著 6 部、参编专著 93 部、发表论文 542 篇。

相信两位国际编委的加入, 将有助于进一步提高我刊的学术水平, 扩大国际影响力, 促进国际间学术交流。

中华烧伤杂志编辑部