

其他肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001690

TLR9 在 HaCaT 细胞 UVB 光老化模型中
对下游信号分子的调控作用

沈方舟, 黄欣, 潘芸, 曹迪, 刘川, 刘依依, 陈爱军

(重庆医科大学附属第一医院皮肤科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 在中波紫外线 (ultraviolet B, UVB) 诱导的人永生角质形成细胞 (human immortal keratinocyte, HaCaT) 光老化模型中对下游信号分子的调控作用。**方法:**实验分为 3 组: 正常对照组、模型组、A151 组。正常对照组予以假照射处理, 模型组予以辐照剂量 30 mJ/cm² UVB 照射处理, A151 组予以辐照剂量 30 mJ/cm² UVB 照射并加用 TLR9 抑制剂进行干预处理。使用衰老相关 β 半乳糖苷酶法观察细胞衰老。CCK-8 法检测细胞增殖。Western blot 检测 TLR9、磷酸化核转录因子 (phospho nuclear factor- κ B, pNF- κ B) 蛋白表达。RT-PCR 法检测细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) mRNA 转录水平。**结果:**Western blot 结果显示模型组较正常对照组 TLR9、pNF- κ B 蛋白表达量升高 ($P=0.000$, $P=0.000$), A151 组较模型组 TLR9、pNF- κ B 蛋白表达量降低 ($P=0.010$, $P=0.000$)。RT-PCR 结果显示模型组较正常对照组 TNF- α 、IL-6 mRNA 转录水平上调 ($P=0.000$, $P=0.000$), A151 组较模型组 TNF- α mRNA、IL-6 mRNA 转录水平下调 ($P=0.000$, $P=0.030$)。衰老相关 β 半乳糖苷酶染色结果显示模型组较正常对照组染色阳性细胞数增多 ($P=0.000$), A151 组较模型组染色阳性细胞数减少 ($P=0.000$)。CCK-8 结果显示模型组较正常对照组细胞增殖率降低 ($P=0.010$), A151 组较模型组细胞增殖率升高 ($P=0.045$)。**结论:**UVB 通过上调 HaCaT 中的 TLR9 表达, 引起核转录因子磷酸化, 促进细胞因子 TNF- α 、IL-6 转录水平升高, 介导细胞炎症反应, 从而降低细胞增殖率, 诱导细胞衰老。

【关键词】中波紫外线; Toll 样受体 9; 核转录因子; 肿瘤坏死因子; 白介素-6

【中图分类号】R758.19

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-02-05

Role of Toll-like receptor 9 in ultraviolet B induced
HaCaT cell photoaging model

Shen Fangzhou, Huang Xin, Pan Yun, Cao Di, Liu Chuan, Liu Yiyi, Chen Aijun

(Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the molecular mechanism of Toll-like receptor (TLR) 9 in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging model of HaCaT cell. **Methods:** This experiment contains three groups: control group, model group, A151 group. The control group was given sham irradiation. The model group was established by the dose of 30 mJ/cm² UVB irradiation. The A151 group was given the dose of 30 mJ/cm² UVB irradiation and treated with TLR9 inhibitor. The cell senescence was evaluated by aging related beta-galactosidase cytochemistry staining. The cell proliferation rate was measured by CCK-8 assay. The contents of TLR9 and phosphorylation nuclear factor- κ B (pNF- κ B) were detected by Western blot. The mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by RT-PCR. **Results:** The protein expressions of TLR9 and pNF- κ B were higher in model group than control group ($P=0.000$, $P=0.000$), which were attenuated by the A151 treatment ($P=0.010$, $P=0.000$). The mRNA levels of TNF- α , IL-6 increased in model group compared to control group ($P=0.000$, $P=0.000$), which were ameliorated by the A151 treatment ($P=0.000$, $P=0.030$). The number of positive cells in aging related beta galactosidase staining was increased in model group than in control group ($P=0.000$), while the number of positive cells was decreased in A151 group than in model group ($P=0.000$). The cell proliferation rate of model group decreased markedly compared with that of control group ($P=0.010$), while the cell proliferation rate increased in A151 group than in model group ($P=0.045$).

Conclusion: The decrease of UVB-induced HaCaT cell proliferation rate and senescence are mediated by phosphorylated nuclear factor- κ B and elevated mRNA of TNF- α and IL-6 via activation of the TLR9.

【Key words】ultraviolet B; Toll-like receptor 9; nuclear factor- κ B; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

作者介绍: 沈方舟, Email: 271207236@qq.com,

研究方向: 皮肤光损伤。

通信作者: 陈爱军, Email: cajhx@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81573027); 重庆市自然科学基金计划资助项目 (编号: cstc2016jcyjA04300)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180504.1103.018.html>
(2018-05-04)

皮肤作为人体最大的一个器官,是抵御外界刺激的第一道防线。紫外线作为外界环境的最常见刺激因素,可直接作用于皮肤,导致皮肤炎症性疾病、肿瘤等^[1]。其中,尤以中波紫外线(ultraviolet B,UVB)照射与皮肤损伤关系最为密切^[2-3]。角质形成细胞(keratinocyte,KC)作为皮肤免疫的前哨站,在UVB刺激下可释放多种细胞因子,参与皮肤的病理生理过程。Toll样受体9(Toll-like receptor 9,TLR9)作为固有免疫中重要的模式识别受体之一^[4-5],与多种皮肤疾病关系密切^[6-7],TLR9在人永生角质形成细胞(human immortal keratinocyte,HaCaT)中有表达^[8],然而是否参与UVB诱导的HaCaT细胞的光老化过程还未见报道。本研究以HaCaT为受试细胞^[4],观察中波紫外线UVB照射后,TLR9对下游信号分子、炎症因子的调控作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

所有试剂均为分析纯级。胎牛血清购自BI公司,DMEM培养基购自Coring公司,TLR9抑制剂A151(ODNTTAGGG)购自InvivoGen生物公司,二幸可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒、衰老相关 β 半乳糖苷酶试剂盒、CCK-8试剂盒购自碧云天生物公司。鼠抗TLR9单克隆抗体(Novus)、兔抗pNF- κ B(ser536)多克隆抗体(CST)、兔抗 β -actin抗体购自武汉三鹰生物公司,HRP标记的山羊抗兔二抗、鼠二抗均购自杰克逊公司。牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)购自Biosharp生物科技公司。Trizol购自Invitrogen生物公司。逆转录试剂盒购自All-in-one生物公司,目的基因及内参购自上海生工生物工程有限公司。UVB297型紫外辐照计购自北京师范大学光电仪器厂。UVB紫外线灯管购自Philips(PL-S 9W/01,波长范围300~320 nm,波峰311 nm)。HaCaT来自重庆医科大学附属第一医院皮肤科赵恒光教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HaCaT细胞先培养在10%胎牛血清的DMEM培养基中,将培养瓶置于37℃、50 mL/LCO₂条件下培养。每隔隔24 h更换培养基,待细胞汇合至80%左右时,消化传代。

1.2.2 模型建立及干预 将已换为0.1%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液培养12 h的HaCaT细胞随机分为3组:正常对照组、模型组、A151组。TLR9抑制剂A151用培养基稀释为5 mmol/L工作浓度^[9],A151组用配有A151的培养基避光孵育2 h。根据参考文献^[10]模型建立方法将模型组、A151组培养皿揭去盖子置于紫外灯下,培养皿距离灯源约20 cm,总辐照剂量30 mJ/cm²;正常对照组给予假照射处理。辐照完成

后正常对照组、模型组更换为新鲜培养基,A151组更换为含有A151的新鲜培养基,所有实验组放置于37℃、50 mL/L CO₂条件下避光培养,24 h收获。

1.2.3 衰老相关 β 半乳糖苷酶法检测细胞衰老 将24孔细胞爬片置于24孔板中,取对数生长期的HaCaT细胞,以每孔 1×10^4 个细胞接种于24孔板,建立实验模型和进行抑制剂干预处理,处理完成后按照衰老相关 β 半乳糖苷酶试剂盒使用说明书进行操作,染色完成后将爬片取出置于显微镜下进行观察,随机选择3个视野,计数每100个细胞中染色阳性细胞数目。每组试验重复5次。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖率 取对数生长期的HaCaT细胞,以每孔 3×10^3 细胞接种于96孔板,每组各设置6个复孔,建立实验模型和进行抑制剂干预处理,处理完成后根据CCK-8试剂盒使用说明书进行操作,置于37℃孵育2 h,使用酶标仪测量反应溶液在450 nm处的吸光度值。根据说明书中给出的公式计算细胞增殖率(用%表示)。

1.2.5 Western blot法检测TLR9、pNF- κ B的蛋白水平 提取各实验组细胞的蛋白质,用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度,指导蛋白上样量。根据Western blot法检测TLR9和pNF- κ B的表达,以 β -actin作为内参,通过ECL发光显影,通过Fusion软件测定条带的灰度值,使用目的蛋白灰度值/ β -actin灰度值的比值来计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 PCR检测TNF- α 、IL-6的mRNA转录水平 Trizol试剂提取各实验组细胞RNA,按逆转录试剂盒操作步骤将RNA逆转录为cDNA,以cDNA为模版,扩增TNF- α 、IL-6、 β -actin。引物:IL-6:5'-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3'/5'-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTG-3';TNF- α :5'-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3'/5'-CGGGCCGATT-GATCTCAGC-3'; β -actin:5'-CCACGGCTGCTCCAGCTCC-3'/5'-GG-CTCCATGCCAGGAAGGAA-3';反应程序:94℃ 30 s,94℃ 5 s,58℃ 30 s,35循环。

1.3 统计学分析

实验结果用SPSS 16.0软件进行统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析及SNK- q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组衰老相关 β 半乳糖苷酶检测结果

衰老相关 β 半乳糖苷酶染色显示,与正常对照组相比,模型组中染色阳性细胞增多,呈蓝绿色,A151组染色阳性细胞较模型组有明显减少。如图1A所示:正常对照组、模型组、A151组阳性数分别为 5.8 ± 2.8 、 63.2 ± 5.3 、 22.6 ± 6.8 。方差分析3组 β 半乳糖苷酶染色差异有统计学意义($F=158.922$, $P=0.000$)。两两比较结果显示:与正常对照组相比,模型组 β 半乳糖苷酶染色细胞明显增多,差异有统计学意义($P=0.000$)。给予A151抑制剂干预后,A151组 β 半乳糖苷酶染色细胞较模型组明显减少,差异有统计学意义($P=0.000$)。如图1B所示。

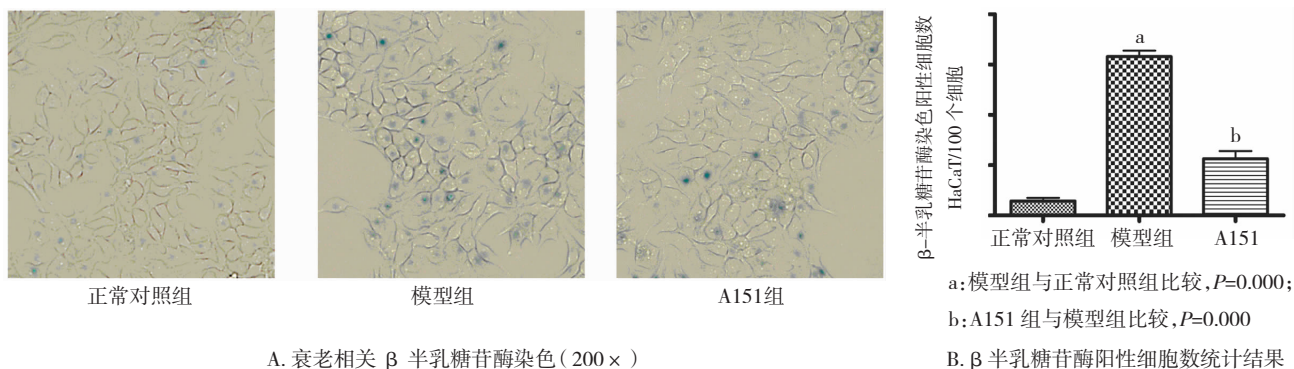
图 1 各组细胞衰老相关 β 半乳糖苷酶染色及统计

Fig.1 The number and statistic of positive cells in aging related beta galactosidase staining

2.2 CCK-8 检测细胞增殖率

通过 CCK-8 法测定 HaCaT 的增殖率。以正常对照组细胞增殖水平为对照 (即 100%), UVB 组、A151 组增殖率分别为 $(55.0 \pm 13.4)\%$ 、 $(76.5 \pm 7.7)\%$ 。方差分析 3 组细胞增殖率差异有统计学意义 ($F=10.787, P=0.002$)。两两比较结果显示: 模型组细胞的增殖率较正常对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($P=0.010$); A151 组较模型组其增殖率明显升高, 差异有统计学意义 ($P=0.045$)。如图 2 所示。

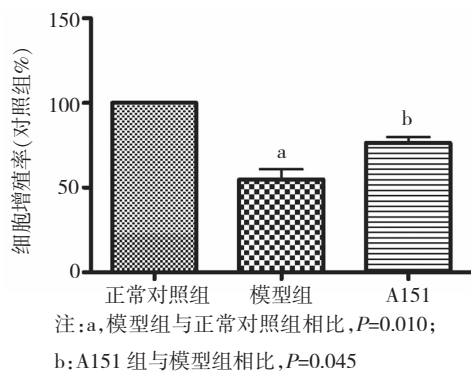


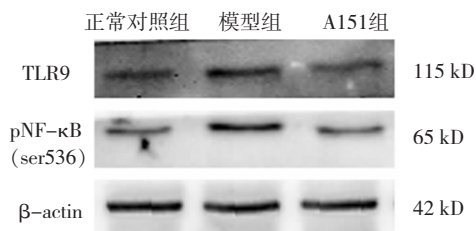
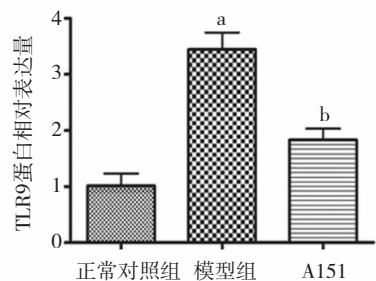
图 2 CCK-8 法测定 HaCaT 的增殖率

Fig.2 The cell proliferation rate in different groups

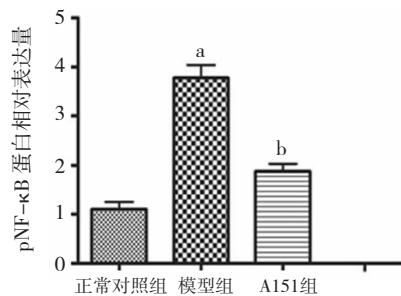
2.3 各组细胞 TLR9 及 pNF- κ B 蛋白表达水平检测结果

Western blot 法检测 TLR9 和 pNF- κ B 蛋白表达。图 3A 结果显示, 3 组细胞均有 TLR9 及 pNF- κ B 蛋白表达。正常对照组、模型组、A151 组 TLR9 蛋白表达水平分别为 1.015 ± 0.493 、 3.445 ± 0.681 、 1.836 ± 0.445 。方差分析 3 组细胞 TLR9 蛋白表达差异有统计学意义 ($F=25.427, P=0.000$)。两两比较结果显示: 与正常对照组相比, 模型组 TLR9 蛋白表达明显上调 ($P=0.000$)。用 TLR9 抑制剂 A151 干预后, A151 组 TLR9 蛋白表达较模型组明显下调 ($P=0.010$)。如图 3B 所示。正常对照组、模型组、A151 组 pNF- κ B 蛋白表达水平分别为 1.103 ± 0.338 、 3.773 ± 0.583 、 1.876 ± 0.337 。方差分析 3 组细胞 pNF- κ B 蛋白表达差异有统计学意义 ($F=49.418, P=0.000$)。两两比较结果显示: 与正常对照组相比, 模型组 pNF- κ B 蛋

白表达明显上调 ($P=0.000$)。用 TLR9 抑制剂 A151 干预后, A151 组 pNF- κ B 蛋白表达较模型组明显下调 ($P=0.000$)。如图 3C 所示。

A. Western blot 法检测 TLR9 及 pNF- κ B 蛋白表达

B. TLR9 蛋白灰度值统计

C. pNF- κ B 蛋白灰度值统计图 3 各组 TLR9 及 pNF- κ B 蛋白表达及灰度值统计
Fig.3 The expression and statistics of TLR9 and pNF- κ B in different groups

2.4 各组细胞 TNF- α 、IL-6 的 mRNA 转录水平检测

RT-PCR 结果显示,正常对照组、模型组、A151 组 TNF- α mRNA 分别为 0.960 ± 0.362 、 5.360 ± 1.191 、 2.576 ± 0.771 。方差分析 3 组细胞 TNF- α mRNA 转录水平差异有统计学意义($F=36.643$, $P=0.000$)。两两比较结果显示:与正常对照组相比,模型组 TNF- α mRNA 转录水平明显上调($P=0.000$)。用 TLR9 抑制剂 A151 干预后,A151 组 TNF- α mRNA 转录水平较模型组明显下调($P=0.000$)。如图 4A 所示。正常对照组、模型组、A151 组 IL-6 mRNA 分别为 1.093 ± 0.378 、 4.704 ± 0.606 、 3.478 ± 0.577 。方差分析 3 组细胞 IL-6 mRNA 转录水平差异有统计学意义($F=60.048$, $P=0.000$)。两两比较结果显示:与正常对照组相比,模型组 IL-6 mRNA 转录水平明显上调($P=0.000$)。用 TLR9 抑制剂 A151 干预后,A151 组 IL-6 mRNA 转录水平较模型组明显下调($P=0.030$)。如图 4B 所示。

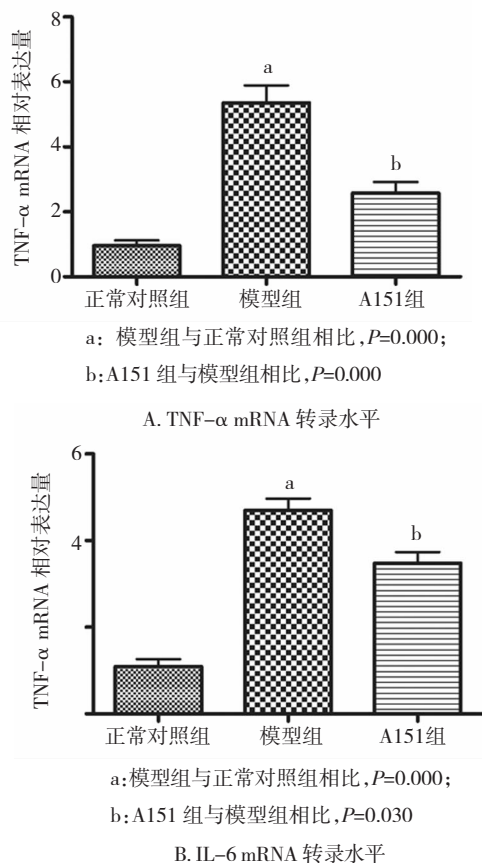


图 4 各组 TNF- α mRNA 及 IL-6 mRNA 转录水平统计

Fig.4 The transcription and statistics of TNF- α mRNA and IL-6 mRNA in different groups

3 讨论

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类模式识别受体,在感知外界环境刺激时,启动快速

的非特异性免疫应答产生细胞因子,激活补体级联反应,识别和清除有害物质。近年来研究认为,在系统性红斑狼疮、黑色素细胞瘤等多种光线相关皮肤疾病中,UVB 与固有免疫中的 TLRs 表达关系密切^[5,11]。TLR9 作为 TLRs 的一员^[12],是重要的天然免疫受体之一,主要通过识别细菌、病毒的非甲基化 CpG DNA 以及真核细胞线粒体 DNA,传递信号参与细胞免疫应答^[8,13]。Bliksøen 等^[14]研究发现在急性心肌梗死模型中,线粒体 DNA 可以作为配体与 TLR9 结合,TLR9 与配体结合后,通过髓样分化蛋白-88 (myeloid differentiation protein 88, MyD88) 依赖途径,进一步介导 NF- κ B 磷酸化入核,调控各种细胞因子释放,诱导细胞凋亡。

本研究观察到,在 UVB 诱导的 HaCaT 细胞光老化模型中细胞增殖率明显下降,衰老细胞数明显增多。与正常对照组相比,模型组的 HaCaT 细胞内 TLR9 及 pNF- κ B 蛋白表达水平升高,同时 TNF- α 、IL-6 转录水平明显上调,提示 UVB 可能通过激活 HaCaT 细胞中的 TLR9 以及下游相关信号分子,降低细胞的增殖活性,诱导细胞衰老,这与 Bliksøen 等^[14]的研究结果类似。为了进一步明确 TLR9 表达上调在 UVB 诱导的光老化模型中的作用,本课题组选用 TLR9 特异性抑制剂 A151^[15]干预细胞。与模型组相比,发现 A151 组 TLR9 的蛋白表达水平明显下降,这与 Shao 等^[16]研究结果类似,TLR9 抑制剂干预可以明显缓解肝脏缺血所致的 TLR9 转录及翻译水平的上调。本课题组推测,A151 通过抑制配体与 TLR9 结合,减少细胞损伤,间接降低了 TLR9 的表达。本研究还发现,A151 干预后可以明显缓解 UVB 引起的细胞增殖活性下降、细胞衰老增多等现象。同时,A151 组的 NF- κ B 磷酸化水平以及 TNF- α 、IL-6 转录水平较模型组明显下降。这与 Acioglu 等^[17]的报道相似,外源性 TLR9 抑制剂干预的星形胶质细胞中,趋化因子 (chemokine CXC ligand 1, CX-CL1)、IL-6 等因子释放减少,细胞增殖水平明显改善。因此,本课题组认为 TLR9 介导的 NF- κ B 炎症信号通路参与了 UVB 诱导的 HaCaT 细胞衰老过程。而 UVB 如何引起 HaCaT 细胞 TLR9 信号通路激活还需要进一步实验。Bamboat 等^[18]曾报道,肝脏缺血再灌注过程中,细胞中大量活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 累积,诱导 TLR9 信号通路激

活,导致肝细胞损害。本课题组前期研究发现,UVB 照射后的大鼠皮肤组织中 ROS 浓度升高,与皮肤细胞老化坏死有关^[19]。因此,本课题组推测 UVB 可能通过引起 HaCaT 细胞中的 ROS 堆积损伤细胞,进一步激活 TLR9,促进下游炎症信号通路激活,引起细胞衰老。

综上所述,本研究初步证实,UVB 可以上调 TLR9 的表达并激活 NF- κ B、促进炎症因子的转录增加; A151 可以抑制 TLR9 所介导的下游信号通路激活,缓解 HaCaT 细胞的衰老过程。探讨 TLR9 在 HaCaT 细胞 UVB 光老化模型中的作用有助于丰富 UVB 所致细胞衰老机制,为临床治疗 UVB 所致疾病提供实验依据和新的思路。

参 考 文 献

- [1] Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging[J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2015, 31(2): 65–74.
- [2] Fisher GJ, Kang SJ, Varani J, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging[J]. Archives of Dermatology, 2002, 138(11): 1462–1470.
- [3] Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, et al. Photoaging: mechanisms and repair[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2006, 55(1): 1–19.
- [4] Olaru F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors[J]. Experimental Dermatology, 2010, 19(8): 314–316.
- [5] Hari A, Flach TL, Shi Y, et al. Toll-like receptors; role in dermatological disease[J]. Mediators of Inflammation, 2010, 2010: 437246.
- [6] Kang SS, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors; applications to dermatologic disease[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2006, 54(6): 951–983.
- [7] Pacini L, Savini C, Ghittoni R, et al. Downregulation of toll-like receptor 9 expression by beta human papillomavirus 38 and implications for cell cycle control[J]. Journal of Virology, 2015, 89(22): 11396–11405.
- [8] McCarthy CG, Wenceslau CF, Gouloupoulou S, et al. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats[J]. Cardiovascular Research, 2015, 107(1): 119–130.
- [9] Abdi J, Engels F, Garssen J, et al. Toll-like receptor-9 triggering modulates expression of α -4 integrin on human B lymphocytes and their adhesion to extracellular matrix proteins[J]. Experimental Hematology, 2011, 39(9): 927–933.
- [10] Zaid MA, Afaq F, Syed DN, et al. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx[J]. Photochemistry & Photobiology, 2007, 83(4): 882–888.
- [11] Valins W, Amini S, Berman B. The expression of Toll-like receptors in dermatological diseases and the therapeutic effect of current and newer topical Toll-like receptor modulators[J]. Journal of Clinical & Aesthetic Dermatology, 2010, 3(9): 20–29.
- [12] Jin M, Lee J. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes[J]. Immunity, 2008, 29(2): 182–191.
- [13] Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure[J]. Nature, 2012, 485(7397): 251–255.
- [14] Bliksøen M, Mariero LH, Torp MK, et al. Extracellular mtDNA activates NF- κ B via Toll-like receptor 9 and induces cell death in cardiomyocytes[J]. Basic Research in Cardiology, 2016, 111(4): 42.
- [15] Gursel I, Gursel M, Yamada H, et al. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation[J]. Journal of Immunology, 2003, 171(3): 1393–400.
- [16] Shao Z, Jiao B, Yi D, et al. Prevention of TLR9 pathway in warm ischemia in porcine donor liver after cardiac death[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(4): 1547–1554.
- [17] Acioglu C, Mirabelli E, Baykal AT, et al. Toll-like receptor 9 antagonism modulates spinal cord neuronal function and survival; direct versus astrocyte-mediated mechanisms[J]. Brain Behavior & Immunity, 2016, 56: 310–324.
- [18] Bamboat ZM, Balachandran VP, Ocui LM, et al. Toll-like receptor 9 inhibition confers protection from liver ischemia-reperfusion injury[J]. Hepatology, 2010, 51(2): 621–632.
- [19] 曹迪, 陈瑾, 黄琨, 等. 皮肤光老化 SD 大鼠模型的构建及评价标准的探讨[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(4): 379–383.

(责任编辑: 冉明会)