

SP600125 抑制 UVA 激活皮肤成纤维细胞 JNK 通路的最佳浓度

许庆芳¹, 侯巍², 郑跃¹, 刘晨¹, 龚子鉴¹, 陆春¹, 赖维^{1*}

(1.中山大学附属第三医院皮肤性病科,广东广州 510630; 2.新疆医科大学第一附属医院皮肤性病科,新疆乌鲁木齐 830054)

摘要:【目的】研究抑制 UVA 激活的皮肤成纤维细胞 JNK 通路的最佳 SP600125 浓度,为研究 JNK 信号通路在光老化中的作用机制奠定基础。【方法】原代培养取自儿童包皮的皮肤成纤维细胞。用 CCK-8 法结合荧光倒置显微镜研究不同剂量 UVA 和不同浓度 SP600125 及两者联合对皮肤成纤维细胞活性和形态的影响,以选择非细胞毒性的 UVA 剂量和 SP600125 浓度。再用 Western-blot 检测 UVA 辐照后不同时间点皮肤成纤维细胞中磷酸化 c-Jun(P-c-Jun)表达以确定其被诱导表达的时间点。最后用 Western-blot 检测不同浓度 SP600125 对 UVA 上调的 P-c-Jun 表达的抑制。【结果】UVA 和 SP600125 分别辐照细胞和孵育细胞时,UVA ≤ 10 J/cm² 和 SP600125 ≤ 2 μ mol/L 均能保持细胞活性在 90% 以上。10 J/cm² 的 UVA 辐照不同浓度 SP600125 孵育的细胞时, ≤ 800 nmol/L 的 SP600125 孵育的细胞活性在 90% 以上;1 μ mol/L 的 SP600125 使细胞活性明显下降至 67.1%,镜下见部分细胞皱缩、碎裂、死亡;2 μ mol/L 的 SP600125 使细胞活性进一步下降至 7.6%,镜下见绝大部分细胞变形、碎裂、死亡。Western-blot 结果显示 P-c-Jun 在 UVA 辐照后 0.75 h、1.5 h 均较 0 h 升高,3 h 后恢复至 0 h 水平。200 ~ 800 nmol/L SP600125 呈剂量依赖性地抑制 UVA 上调的 P-c-Jun 表达,差异有统计学意义。【结论】低于常用浓度的 200 ~ 800 nmol/L SP600125 即可抑制 UVA 激活的皮肤成纤维细胞的 JNK 通路。JNK 通路可能在 UVA 辐照的皮肤成纤维细胞中起抗凋亡作用。

关键词: SP600125 ; c-Jun 氨基末端激酶通路;UVA;皮肤成纤维细胞;光老化

中图分类号: R75 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)02-0194-06

Investigation of Inhibition of SP600125 on JNK Signaling Pathway Activated by UVA in Human Dermal Fibroblasts

XU Qing-fang¹, HOU Wei², ZHENG Yue¹, LIU Chen¹, GONG Zi-jian¹, LU Chun¹, LAI Wei^{1*}

(1.Department of Dermatology and Venereology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Dermatology and Venereology, The First Affiliated Hospital, Xin Jiang Medical University, Wulumuqi 830054, China)

Abstract: 【Objective】To explore the optimum concentration of SP600125 to inhibit JNK signaling pathway induced by UVA in human dermal fibroblasts, and lay the foundation for studying the role of this pathway in photoaging. 【Methods】Human dermal fibroblasts were derived from the circumcised foreskin of children, and subjected to primary culture. CCK-8 assay combined with fluorescence microscope was firstly performed to evaluate the cellular viability and observe cellular morphology to determine the non-toxic doses of UVA and SP600125 for the next experiment. Then, Western-blot was applied to detect the time-course of phospho-c-Jun after UVA irradiation. Finally, Western-blot was carried out to study whether the chosen concentration of SP600125 inhibited UVA-induced phospho-c-Jun. 【Results】Treatments with ≤ 10 J/cm² UVA irradiation or ≤ 2 μ mol/L SP600125 could keep cellular viability more than 90%. However, the combined treatment with ≤ 800 nmol/L SP600125 and UVA could maintain irradiated-cell viability more than 90%. 1 μ mol/L SP600125 significantly decreased irradiated-cell viability to 67.1%, and some cells were

收稿日期:2013-10-12

基金项目:国家自然科学基金(81171523);广东省自然科学基金(10151008901000117);广东省科技计划项目(2012B031800057);2010年中国医师协会-宝洁基金;2011年CAD-资生堂DQ基金研究项目

作者简介:许庆芳,博士,副主任医师,研究方向:组织蛋白酶与光老化,E-mail:xqf69@163.com; *通信作者:赖维,教授,博士生导师,研究方向:皮肤美容学,E-mail:drilaiwei@163.com

observed shrinking, broken and dead. Moreover, 2 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 reduced cellular viability to 7.6%, and most cells were found deformed, broken and dead. Compared with 0 h group, the expression of phospho-c-Jun was found to be remarkably increased at both 0.75 h and 1.5 h, and resumed from 3 h after UVA irradiation. UVA-induced expression of P-c-Jun was found to be dose-dependently inhibited by 200–800 nmol/L SP600125 at 1.5 h after irradiation. 【Conclusion】 200–800 nmol/L SP600125 much lower than that commonly used could inhibit JNK signaling pathway activated by UVA in human dermal fibroblasts. JNK signaling pathway may play an antiapoptotic role in UVA-irradiated human dermal fibroblasts.

Key words: SP600125; c-Jun N-terminal kinase signaling pathway; UVA; dermal fibroblasts; photoaging

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(2): 194–199]

UVA通过激活皮肤成纤维细胞中的 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路使 c-Jun 磷酸化, c-Jun 的磷酸化激活活化蛋白-1 (active protein-1, AP-1), 活化的 AP-1 与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)启动子结合促进 MMP 的表达^[1]。上调的 MMP 通过降解真皮细胞外基质成分引起皮肤松弛、皱纹等促进皮肤光老化^[2]。SP600125 (SP)高选择性地抑制 JNK 通路的 JNK 激酶, 其常用的工作浓度为 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$, 但它抑制不同的刺激因子激活不同细胞的 JNK 通路所需的浓度不同^[3]。已有研究报道 JNK 通路在 UVA 辐照的 HaCat 细胞中起抗凋亡的作用, 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 会导致大量 UVA 辐照的 HaCat 细胞死亡, 而 125 nmol/L SP600125 即可抑制 UVA 激活的 JNK 通路^[4]。虽然目前有文献报道抑制 UVA 激活皮肤成纤维细胞 JNK 通路的 SP600125 浓度, 但结果不尽相同^[5-6], 且未有 UVA 联合 SP600125 对皮肤成纤维细胞活性影响及其机制的研究报道。为此, 我们先采用 CCK-8 法结合荧光倒置显微镜观察研究不同剂量 UVA 和不同浓度 SP600125 及两者联合对皮肤成纤维细胞增殖活性和形态的影响, 后再用 Western-blot 研究不同浓度的 SP600125 对 UVA 激活的 JNK 通路的抑制, 以寻找合适的抑制浓度, 并探讨 SP600125 联合 UVA 导致皮肤成纤维细胞活性下降的机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器

DMEM(Dulbecco's modified eagle's media)高糖培养基、胰酶、胎牛血清、磷酸盐缓冲液、青链霉素购自美国 Gibco 公司。CCK-8 试剂购自日本 Dojindo 公司。SP600125(SP)购自德国默克公司。一抗兔抗人磷酸化-c-Jun (phospho-c-Jun, P-c-

Jun)、兔抗人 c-Jun IgG 抗体, 内参兔抗人 GAPDH 多克隆 IgG 抗体及二抗 HRP 一羊抗兔 IgG 均购自美国 Cell signaling technology 公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司。ECL 显色试剂盒购自美国 Millipore 公司, 预染 Marker 购自加拿大 MBI Fermentas 公司。UVA 紫外线辐射仪(Sigma ss-03A), 灯管为 Philips UVA TL10RS, 波长 320 ~ 400 nm; UVA 辐照计 (Sigma ss-03, 2012 年 3 月 6 日标定)也购自上海希格玛高科技公司; 酶联免疫检测仪(BioTek, 美国); CO₂ 细胞培养箱(Thermo Scientific, 美国); 普通光学显微镜(Nikon, 日本); 荧光倒置显微镜(LEICA DMI 4000B, 德国)。

1.2 原代皮肤成纤维细胞培养

取儿童包皮, 参照文献^[7]分离培养皮肤成纤维细胞, 第 3 代细胞冻存。细胞复苏后 10 代以内的细胞行后续实验。

1.3 CCK-8 法分别检测 UVA、SP600125、SP600125 联合 UVA 对皮肤成纤维细胞增殖活性的影响

将成纤维细胞按 5×10^3 细胞/孔密度接种于 96 孔培养板中, 每孔含 100 μL 细胞的培养液, 每组各设 3 个复孔。铺板后 24 h 予各种处理, 处理后继续培养 24 h, 然后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 在酶联免疫检测仪上测定 450 nm 的吸光度 A 值(以空白试剂孔调零)。实验重复 3 次。

1.3.1 UVA 照射方法及其对皮肤成纤维细胞增殖活性的影响 设 0 J/cm² 组、5 J/cm² 组、10 J/cm² 组、15 J/cm² 组, 共 4 组。将铺于 96 孔板已培养 24 h 的细胞从培养箱取出, 吸弃培养液, 用 PBS 洗 2 次后, 每皿加入等量的薄层 PBS。然后把培养板置于 UVA 紫外线辐射仪下, 距离紫外光源约 15 cm。用 UVA 辐照检测仪测得的平均照射功率为 13 mW/cm², 分别照射 385 s、769 s、1154 s, 使照射 1 次的 UVA 剂量分别达 5 J/cm²、10 J/cm²、15 J/

cm²。0 J/cm² 组的细胞加入 PBS 后置于超净台避光。照射后立即吸弃 PBS 溶液,加入新鲜培养液,置于 95% 的湿度、5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养继续培养 24 h 后测细胞增殖活性,并拍照。

1.3.2 SP600125 对皮肤成纤维细胞增殖活性的影响 设 0 nmol/L SP 组、200 nmol/L SP 组、400 nmol/L SP 组、800 nmol/L SP 组、1 μmol/L SP 组和 2 μmol/L SP 组,共 6 组。将铺于 96 孔板已培养 24 h 的细胞从培养箱取出,向不同组的孔中加入不同量的 SP600125,使其终浓度为各组设定的浓度,放回细胞培养箱中继续培养 24 h 后测细胞增殖活性,并拍照。

1.3.3 SP600125 联合 10 J/cm² UVA 对皮肤成纤维细胞增殖活性的影响 设无处理的对照组、10 J/cm²+200 nmol/L SP 组、10 J/cm²+400 nmol/L SP 组、10 J/cm²+800 nmol/L SP 组、10 J/cm²+1 μmol/L SP 组、10 J/cm²+2 μmol/L SP 组,共 6 组。向铺于 96 孔板已培养 24 h 的细胞中加入不同量的 SP600125。孵育 1 h 后吸弃培养液,用 PBS 洗 2 次,每皿加入等量的薄层 PBS,予 10 J/cm² UVA 照射 1 次。照射后立即吸弃 PBS 溶液,加入新鲜含 SP600125 培养液,置于培养箱中继续培养 24 h 后测细胞增殖活性,并拍照。

1.4 Western-blot 检测皮肤成纤维细胞中 P-c-Jun、c-Jun 蛋白的表达随 UVA 辐照后时间变化

将 3~10 代的成纤维细胞按 1×10^6 接种于 6 cm 的细胞培养皿,培养 24 h 后,按前述的方法予 10 J/cm² UVA 辐照一次。在辐照后 0、0.75、1.5、3、6 h 提取蛋白。BCA 法蛋白定量。总蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后,电转移到 PVDF 膜上。一抗兔抗人 P-c-Jun-IgG (浓度 1:1 000)、c-Jun-IgG (浓度 1:1 000),内参兔抗人 GAPDH-IgG (浓度 1:4 000),4 °C 孵育过夜,TBST 液洗膜,加入 HRP 一羊抗兔 IgG (浓度 1:1 000) 37 °C 孵育 1 h,TBST 液洗膜。ECL 显色。实验重复 3 次。

1.5 不同浓度的 SP600125 对 10 J/cm² UVA 上调的皮肤成纤维细胞中 P-c-Jun 的抑制

因 JNK 通路的活化直接磷酸化下游的 c-Jun^[8],因此我们通过检测 P-c-Jun 以验证不同浓度 SP600125 是否抑制 UVA 激活的 JNK 通路。设无处理的对照组、UVA 辐照组、UVA+200 nmol/L SP 组、UVA+400 nmol/L SP 组和 UVA+800 nmol/L SP 组。将 1×10^6 细胞接种于 6 cm 的培养皿,24 h 后

向培养皿中加入不同量的 SP600125 孵育 1 h,吸弃培养液,用 PBS 洗 2 次,每皿加入等量的薄层 PBS,予 10 J/cm² UVA 辐照一次,再在含不同浓度 SP600125 的培养基中孵育 1.5 h 后提取蛋白,再按前述的 Western-blot 方法检测各组 P-c-Jun。

1.6 统计学处理

各组数据均以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 13.0 统计软件。所有实验重复 3 次,结果用方差齐性检验。两样本均数的比较用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 UVA、SP600125、SP600125 联合 UVA 对皮肤成纤维细胞增殖活性的影响

与 0 J/cm² UVA 组相比,5 J/cm² UVA 组、10 J/cm² UVA 组、15 J/cm² UVA 组皮肤成纤维细胞增殖活性分别为 98.6%、97.5%、82.1%,15 J/cm² UVA 使细胞增殖活性明显下降 ($F = 43.56, P < 0.001$)。因此,本实验选择 10 J/cm² UVA 作为后续实验的剂量。与 0 nmol/L SP 组相比,200 nmol/L SP 组、400 nmol/L SP 组、800 nmol/L SP 组、1 μmol/L SP 组和 2 μmol/L SP 组皮肤成纤维细胞增殖活性分别为 98.6%、97.9%、96.6%、95.3%、92.1%, $\leq 2 \mu\text{mol/L}$ SP 均能保持细胞活性在 90% 以上。SP600125 联合 10 J/cm² UVA 处理细胞,与无处理的对照组相比,10 J/cm²+200 nmol/L SP 组、10 J/cm²+400 nmol/L SP 组、10 J/cm²+800 nmol/L SP 组、10 J/cm²+1 μmol/L SP 组、10 J/cm²+2 μmol/L SP 组细胞增殖活性分别为 97.4%、94.9%、91.1%、67.1%、7.6%。10 J/cm² UVA + 1 μmol/L SP 组细胞的活性明显下降,10 J/cm²+2 μmol/L SP 组细胞活性进一步下降到 7.6%,差异有统计学意义 ($F = 996.001, P < 0.001$)。因此,本研究设定 SP600125 抑制 UVA 上调的 P-c-Jun 的最大浓度为 800 nmol/L。

2.2 10 J/cm² UVA、不同浓度 SP600125 及二者联合对皮肤成纤维细胞形态学的影响

UVA、SP600125 及二者联合处理皮肤成纤维细胞 24 h 后拍照。 $\geq 800 \text{ nmol/L}$ SP、10 J/cm² UVA、800 nmol/L SP+10 J/cm² UVA 对细胞的形态无影响;1 μmol/L SP+10 J/cm² UVA 使部分细胞

胞浆内颗粒增多、皱缩,部分细胞发生崩解、碎裂、死亡;2 $\mu\text{mol/L}$ SP+10 J/cm^2 UVA 使几乎所有的

细胞都发生变形、皱缩,很多细胞崩解、碎裂、死亡(图1)。

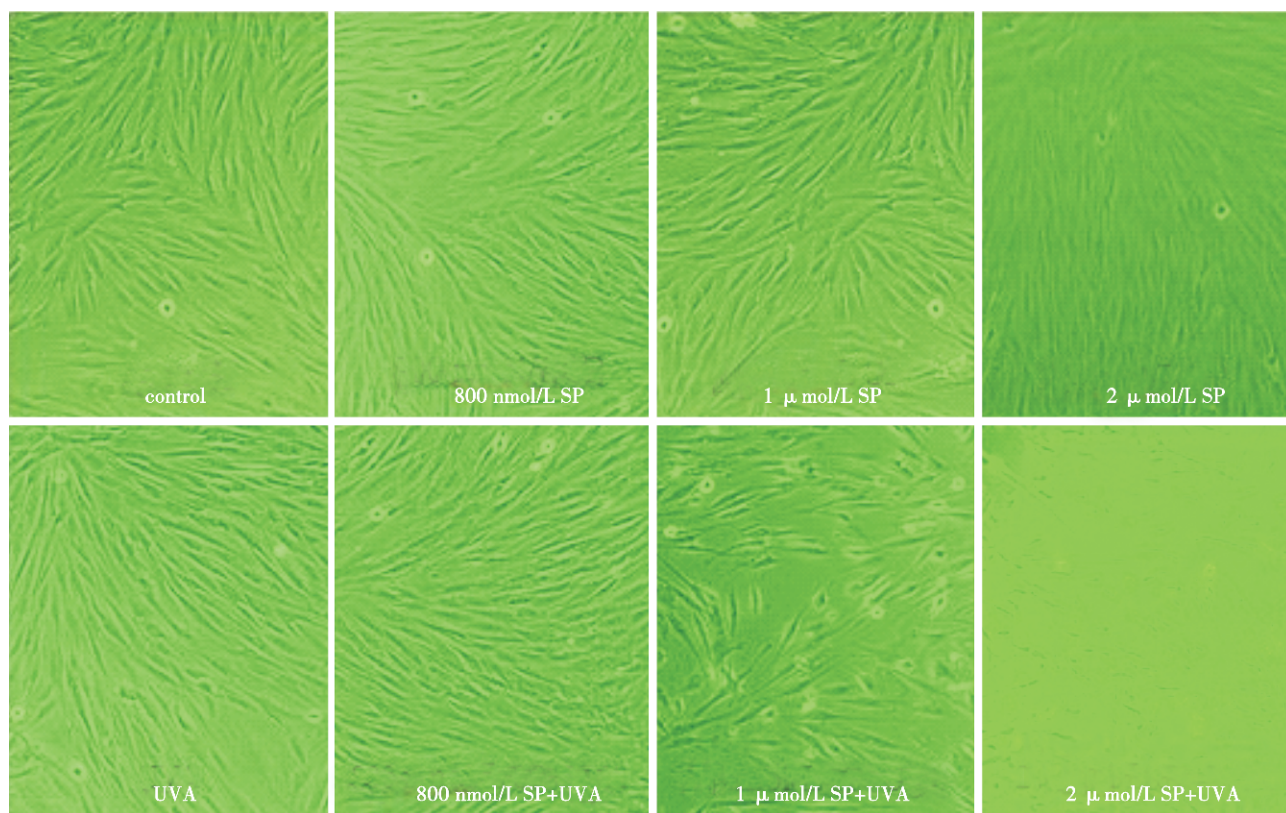


图1 10 J/cm^2 UVA 下不同浓度 SP600125 及二者联合对皮肤成纤维细胞形态学的影响

Fig.1 Effects of treatment of 10 J/cm^2 UVA or different concentration of SP600125, and combined treatment of them on fibroblast morphology

inverted microscope, $\times 200$

2.3 皮肤成纤维细胞中 P-c-Jun、c-Jun 蛋白的表达随 10 J/cm^2 UVA 辐照后时间的变化

UVA 辐照后 0、0.75、1.5、3、6 h 皮肤成纤维细胞中 P-c-Jun 蛋白表达的灰度值分别为 1.56 ± 0.16 、 3.46 ± 0.42 、 2.09 ± 0.26 、 1.32 ± 0.29 、 1.34 ± 0.26 。P-c-Jun 在 0.75 h 和 1.5 h 的表达均较 0 h 明显升高,并以 0.75 h 表达最高,差异有统计学意义 ($F=28.64$, $P<0.001$),3 h 后恢复至 0 h 水平。c-Jun 在辐照后 0.75 h 也明显升高。由此可知本实验所用 10 J/cm^2 UVA 可使 c-Jun 磷酸化,上调 P-c-Jun 的表达(图 2)。

2.4 不同浓度的 SP600125 抑制 UVA 激活的 JNK 通路

Western-blot 检测无处理对照组、UVA 组、200 nmol/L SP+UVA 组、400 nmol/L SP+UVA 组、800 nmol/L SP+UVA 组 P-c-Jun 蛋白表达,灰度值分

别为 1.61 ± 0.08 、 3.19 ± 0.12 、 2.2 ± 0.13 、 0.75 ± 0.11 、 0.35 ± 0.05 。采用单因素方差分析得到 F 值为 81.55 ($P<0.001$),再用 LSD- t 检验发现 5 组两两比较差异均有统计学意义,200 nmol/L SP+UVA 组、400 nmol/L SP+UVA 组和 800 nmol/L SP+UVA 组 P-c-Jun 表达均显著低于 UVA 组,且 200 nmol/L SP+UVA 组显著高于 400 nmol/L SP+UVA 组、400 nmol/L SP+UVA 组显著高于 800 nmol/L SP+UVA 组,表明 200 nmol/L、400 nmol/L、800 nmol/L SP600125 呈剂量依赖性地抑制 UVA 上调的 P-c-Jun 的表达(图 3)。

3 讨论

UVA 通过激活皮肤成纤维细胞表面的生长因子和细胞因子受体,以及促进细胞产生活性氧簇

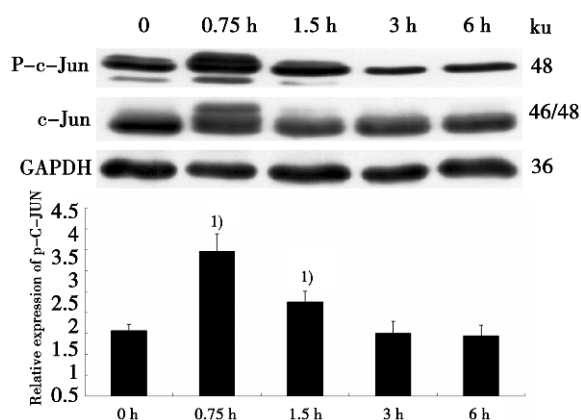


图 2 皮肤成纤维细胞中 P-c-Jun、c-Jun 蛋白的表达随 10 J/cm² UVA 辐照后时间的变化

Fig.2 Time courses for 10 J/cm² UVA-induced P-c-Jun and c-Jun

Western blot data are representative of three independent experiments. $F = 28.64$ ($P < 0.001$), 1) $P < 0.05$ vs. 0 h group.

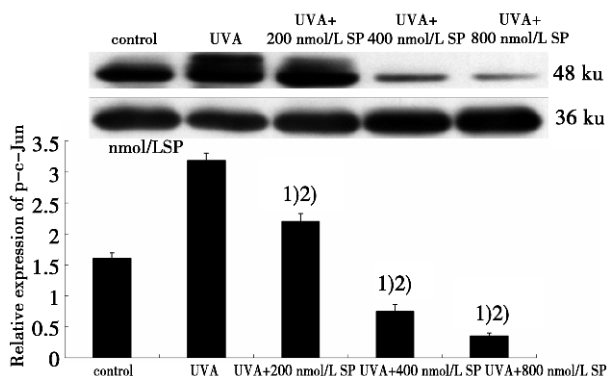


图 3 不同浓度的 SP600125 对 UVA 诱导的皮肤成纤维细胞 P-c-Jun 的抑制

Fig.3 Inhibition of treatment of different concentration of SP600125 on UVA-induced P-c-Jun expression

Western blot data are representative of three independent experiments. $F = 81.55$ ($P < 0.001$), 1) $P < 0.05$ vs. UVA group, 2) $P < 0.05$ vs. UVA+SP group.

活化丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 通路。JNK 信号通路是 MAPK 家族中重要的成员之一, 是细胞对各种应激反应的信号转导的关键分子, 参与细胞对紫外线、 γ 射线、渗透压、温度变化等应激反应^[9]。它的活化能使 c-Jun 磷酸化, 继而增强 AP-1 的活性。活化的 AP-1 与 MMP 启动子结合促进 MMP 基因的转录, 进而上调 MMP 蛋白的表达。MMP 在光老

化中起着重要作用。SP600125 是 JNK 信号通路的高选择性抑制剂, 它在不同的细胞中、不同的刺激因素下抑制 JNK 通路的活化所需的浓度不同。因此, 探索最佳的抑制 UVA 激活的皮肤成纤维细胞 JNK 通路的 SP600125 浓度对于光老化的研究非常重要。

我们先通过 CCK-8 法结合倒置显微镜研究 UVA、SP600125 及两者联合对皮肤成纤维活性和形态的影响, 以筛选出能保持细胞活性在 90% 以上的 UVA 剂量和 SP600125 的浓度。实验发现, ≤ 10 J/cm² UVA 或 ≤ 2 μ mol/L SP600125 均能维持细胞的活性在 90% 以上。但当 10 J/cm² UVA 辐照 SP600125 孵育的皮肤成纤维细胞时, 仅 ≤ 800 nmol/L SP600125 能使细胞的活性在 90% 以上; 1 μ mol/L SP600125 使活性明显下降为 67.1%, 镜下见漂浮的死细胞, 部分细胞变形、崩解、碎裂、结构破坏; 2 μ mol/L SP600125 使细胞活性进一步下降至 7.6%, 几乎所有的细胞都发生变形、皱缩, 很多细胞崩解、碎裂、死亡。而通常抑制细胞中 JNK 通路的活化需 5 ~ 10 μ mol/L SP600125^[10]。由此可见 SP600125 联合 UVA 对皮肤成纤维细胞的毒性明显高于单一的 SP600125, JNK 通路的活化可能对于 UVA 辐照的皮肤成纤维的存活非常重要。现已知 JNK 通路和细胞凋亡有关^[11], 但其究竟是促凋亡抑或抗凋亡仍有很多争议。一些因素, 如死亡信号的性质、细胞类型、JNK 信号通路持续激活的时间及细胞内其他信号通路的活性等, 都会影响该通路的功能, 使之或有促凋亡作用, 或有抗凋亡作用, 甚或在细胞凋亡中不起作用^[2]。有研究发现 JNK 信号通路的激活通过以下机制促进细胞凋亡: 一是上调促凋亡蛋白的表达, JNK 通过增强 AP-1 活性促进 p53、Bax、FasI 等促凋亡蛋白的表达^[12]; 二是作用于线粒体, 如 Bax、Bak 等促使细胞色素 C 释放入胞浆, 细胞色素 C 和半胱天冬蛋白酶 (caspase)-9 结合, 最终作用于 caspase-3, 激活的 caspase-3 与凋亡底物结合引起细胞凋亡^[13]。但也有一些研究显示在某些类型的应激刺激下, 激活的 JNK 通路具抗凋亡功能。活化的 JNK 通路通过上调转录因子 AP-1 的活性促进细胞增殖、分化、转化等^[14]。Silvers 等^[4]发现 25 J/cm² UVA 联合 125 nmol/L SP600125 可上调 HaCat 细胞和人角质形成细胞 caspase-3、8、9 的表达, 增加细胞次 G₀ 期 DNA 含量, 使部分细胞皱缩、碎裂、死亡, 进而

提出 UVA 激活的 JNK 通路在 HaCat 细胞和人角质形成细胞中具抗凋亡作用。我们推测, 激活的 JNK 通路在 UVA 辐照的皮肤成纤维细胞中也可能起抗凋亡的功能。当加入高浓度 SP600125 抑制该通路活化后, 皮肤成纤维细胞的增殖被抑制, 引起细胞的凋亡。然而, 同样是紫外线, UVB 联合 10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 却不会造成大量的皮肤成纤维细胞死亡^[15]。UVA 联合 SP600125 是否也通过激活半胱天冬酶诱导皮肤成纤维细胞凋亡, 有待进一步研究。但也不排除 SP600125 在 UVA 辐照后发生光化学变化对细胞产生毒性。

我们进一步以 Western-blot 检测 ≤ 800 nmol/L SP600125 是否能抑制 UVA 激活的 JNK 通路。结果显示 200 nmol/L SP600125 即可抑制 10 J/cm² UVA 上调的皮肤成纤维细胞中 P-c-Jun 的表达, 且 SP600125 呈剂量依赖性地抑制 P-c-Jun 的表达。这表明抑制 UVA 激活的皮肤成纤维细胞的 JNK 通路无需太高浓度的 SP600125, 否则会导致细胞死亡, 影响后续实验。与我们研究结果相类似的, 有报道抑制 25 J/cm² UVA 激活的 HaCat 细胞 JNK 通路只需 125 nmol/L SP600125^[8]。

我们的研究提示低于常用浓度的 200 ~ 800 nmol/L SP600125 即可抑制 UVA 激活的皮肤成纤维细胞的 JNK 通路, JNK 通路可能在 UVA 辐照的皮肤成纤维细胞中起抗凋亡作用。至于 SP600125 如何启动 UVA 辐照的皮肤成纤维细胞的凋亡级联反应, SP600125 是否与 UVA 发生光化学反应, 有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Zheng JF, Lai W, Zhu GX, et al. 10-Hydroxy-2-decenoic acid prevents ultraviolet A-induced damage and matrix metalloproteinases expression in human dermal fibroblasts [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2012, 10(3): 1468-1476.
- [2] Kim MS, Oh GH, Kim MJ, et al. Fucosterol inhibits matrix metalloproteinase expression and promotes type-1 procollagen production in UVB-induced HaCaT cells [J]. *Photochem Photobiol*, 2013, 89(4): 911-918.
- [3] Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of jun N-terminal kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13681-13686.
- [4] Silver AL, Finch JS, Bowden GT. Inhibition of UVA-induced c-Jun N-terminal kinase activity results in caspase-dependent apoptosis in human keratinocytes [J]. *Photochem Photobiol*, 2006, 82(2): 423-431.
- [5] Zhang J, Bowden GT. Activation of p38 MAP kinase and JNK pathways by UVA irradiation [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2012, 11(1): 54-61.
- [6] An L, Dong GQ, Gao Q, et al. Effects of UVA on TNF- α , IL-1 β , and IL-10 expression levels in human keratinocytes and intervention studies with an antioxidant and a JNK inhibitor [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2010, 26(1): 28-35.
- [7] 许庆芳, 侯巍, 刘晨, 等. UVA 辐照对皮肤成纤维细胞组织蛋白酶 K 表达的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2013, 46(9): 35-38.
Xu QF, Hou W, Liu C, et al. Effects of ultraviolet A irradiation on the expression of cathepsin K in human dermal fibroblasts [J]. *Chin J Dermatol*, 2013, 46(9): 35-38.
- [8] Silver AL, Bachelor MA, Bowden GT. The role of JNK and p38MAPK activities in UVA-induced signaling pathways leading to AP-1 activation and c-fos expression [J]. *Neoplasia*, 2003, 5(4): 319-329.
- [9] Cao G, Chen M, Song Q, et al. EGCG protects against UVB-induced apoptosis via oxidative stress and the JNK1/c-Jun pathway in ARPE19 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(1): 54-59.
- [10] Bashari D, Hacoheh D, Ginsberg D. JNK activation is regulated by E2F and promotes E2F1-induced apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(1): 65-70.
- [11] Du H, Sun X, Guma M, et al. JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, 110(6): 2377-2382.
- [12] Yang F, Chen H, Liu Y, et al. Doxorubicin Caused Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells via p38, JNK and p53 Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(4): 1072-1082.
- [13] Huntwork-Rodriguez S, Wang B, Watkins T, et al. JNK-mediated phosphorylation of DLK suppresses its ubiquitination to promote neuronal apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 2013, 202(5): 747-63.
- [14] Das S, Dey KK, Bharti R, et al. PKI 166 induced redox signaling and apoptosis through activation of p53, MAP kinase and caspase pathway in epidermoid carcinoma [J]. *J Exp Ther Oncol*, 2012, 10(2): 139-53.
- [15] Yang B, Ji C, Kang J, et al. Trans-Zeatin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAP kinase signaling in human skin fibroblasts [J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(4): 555-560.