

# 8-1-3

以蛋白質體學方法研究皮膚細胞經UVB傷害後之分子機制

A Study of Proteomic Analysis of HaCat Cell after UVB Radiation

楊子妍\* 美和科技大學美容系

Zu-Yen Yang

陳國蕙\* 美和科技大學美容系

Kuo-Hui Chen

林政頤 美和科技大學健康與生技產業研究所

Chen-Gi Lin

陳正吉 美和科技大學美容系

Chen-Gi Chen

吳裕仁 美和科技大學美容系

Yu-Jen Wu

【收稿：2010.09 核刊：2011.02】



## 以蛋白質體學方法研究皮膚細胞經 UVB 傷害後之分子機制

### 摘要

皮膚過度的照射紫外光會造成急性或是慢性的傷害，短暫的照射紫外光會造成曬傷及產生紅斑，長期性的照射則會增加癌症及加速老化的產生，在細胞研究中也指出過度的照射紫外光會增加活性氧物質(reactive oxygen species; ROS)的產生，引發皮膚細胞產生複雜的訊息傳遞的代謝途徑，減低穀胱甘肽(glutathione)的含量，並且造成一些保護性酵素如超氧化歧化酶(superoxide dismutase)、觸酶(catalase)等活性降低，進而使皮膚膠原蛋白(collagen)的產生減少，造成皮膚光老化現象發生。

紫外光過量的照射在生物體或是細胞實驗中都發現其所造成的傷害，但是以往的實驗都是檢測某些抗氧化酵素的活性變化，或是分子層次的改變，但是無法觀察出其蛋白質的變化，同時也無法觀察經由紫外光過度的照射，其生物體內整體的蛋白質變化。此研究目的是利用蛋白質體(proteome)的方法，觀察角質細胞(keratinocyte)經由紫外光照射後其總體蛋白質的變化，經由二維電泳(two-dimentional electrophoresis, 2DE)圖譜分析，總共有 16 個蛋白質經由 LC/MS/MS 分析，有 16 個蛋白質身分被鑑定出來，其中有 13 個蛋白質表現量漸增，分別為 keratin1, keratin 9, MTHSP75, Lamin B2、stomatin (EPB72)-like 2、thioredoxin peroxidase，1 個 BIP 蛋白質表現量下降，將部分蛋白質分別進行 RT-PCR 及 western blot 分析，以驗證在 mRNA 及蛋白質層次之差異表現。並且建立此一系統，對於研發皮膚抗氧化物質的篩選，可以多一種整體性的研究方法，並可了解抗氧化物質在皮膚細胞中的功效，對於化妝品中抗氧化成分的研究，有更多的細胞實驗的證據。

### 關鍵詞

- 紫外光
- 蛋白質體學



楊子妍 陳國蕙  
林政頤 陳正吉  
吳裕仁

以蛋白質體學方法研究皮膚細胞經 UVB 傷害後之  
分子機制  
A Study of Proteomic Analysis of HaCat Cell after UVB  
Radiation

## ABSTRACT

Overdose of UV radiation could cause acute or chronic damages to the skin. Short-term UV radiation could cause sun burn and erythema; long-term UV radiation could cause cancers and accelerated aging. High-dose radiation causes the generation of reactive oxygen species which could trigger the activation of complex signaling pathways in skin cells, reduce the amount of glutathione, and reduce the activities of some protective enzymes such as superoxidase and catalase. The consequences could retard the synthesis of collagen in skin to cause skin photoaging.

Conventionally the studies on damages caused by overdose UV radiation are carried out by examining the activities of oxidases or their changes at the molecular level. The changes at the total protein levels has not been examined. The purpose of this research is to establish a system which employ proteomics to observe the overall protein changes in skin cells caused by UV radiation. By using two-dimensional electrophoresis analysis, sixteen protein spots have been identified by LC/MS/MS. The levels of thirteen protein spots including keratin1, keratin 9, MTHSP75, Lamin B2, stomatin (EPB72)-like 2, and thioredoxin peroxidase increased. The level of one BIP protein decreased. RT-PCR and western blot analysis have been carried out on some proteins to confirm the expression difference in mRNA and protein level. The developed system could be used to evaluate potential antioxidants through the cell level reflecting their effectiveness closer to real conditions. The function of the antioxidants in the cells can be observed and the screening of the potential antioxidants used for cosmetics formulations could be done efficiently.

**Key Words :** UV radiation 、proteome

## 壹、前言

### 一、皮膚氧化傷害

皮膚是人類最大的器官，具有調節體溫、呼吸、分泌、免疫反應、防止紫外線傷害等作用，是最重要的保護器官之一。依據目前流行病學及研究指出，過度曝曬陽光中之紫外線會導致皮膚癌的發生，也有研究指出過度曝曬陽光會使皮膚曬傷並產生紅斑等現象，並使角質角化增生 (erythema) (Biedalski et al., 2001)，長期曝曬陽光更會造成皮膚提早老化，並增加皮膚黑色素瘤及非黑素色皮膚癌的發生機率。(Biedalski et al., 2001; Longstreth et al., 1998)。



紫外光可以分成 UVA(320-400nm)、UVB(280-320nm)及 UVC(200-280nm)三種，UVC 會被大氣臭氧層吸收無法到達地表，只有 UVA 及 UVB 可以到達地表，一般照射到地表的紫外線 5~10% 屬於 UVB，90~95% 屬於 UVA，波長越短代表其能量越大，對於皮膚的傷害力也越大。紫外線中的 UVB 能量較強，可穿透至表皮層，造成表皮肥厚、角質增厚以及皮膚紅腫發炎等症狀發生，長期曝曬 UVB 會直接破壞細胞內之 DNA，使 DNA 產生突變，同時會使皮膚產生活性氧物質(reactive oxygen species; ROS)，如超氧化合物(superoxide anion radical)、氫氧自由基(hydroxyl radical)、過氧化氫(hydrogen peroxide) 及單線氧自由基(singlet oxygen)，這些 ROS 會造成蛋白質、脂質及細胞膜的破壞，並間接造成細胞 DNA 的突變。另外一種紫外光 UVA 能量較低，但是其波長較長可以穿透至真皮層，造成膠原蛋白及彈力纖維蛋白產生減少，是造成皮膚老化的最主要原因，雖然 UVA 不會直接破壞 DNA，但會促進大量的 ROS 產生，是皮膚細胞產生 ROS 最主要的來源，目前的研究發現 ROS 的產生會引發皮膚細胞產生複雜的訊息傳遞的代謝途徑，尤其會使皮膚細胞大量表現 Matrix metalloproteinases(MMPs)，包括 MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-8 (neutrophil collagenase) 及 MMP-13 (collagenase 3)，進而影響膠原蛋白的產生，造成皮膚出現光老化(photoaging)(Oh et al., 2004; Fisher et al., 1998)，並且引發生長因子(growth factor)及 cytokine receptors 等內在訊息傳遞系統的表現(Heck et al., 2004)。

依據目前流行病學及實驗研究顯示，太陽光中的紫外線會導致皮膚癌的發生；也有研究指出過度曝曬陽光會使皮膚曬傷並產生紅斑(erythema)(Biedalski et al., 2001)，長期曝曬陽光會造成皮膚提早老化，並增加皮膚黑色素癌及非黑素色皮膚癌的發生機率。(Biesalski et al., 2001; Longstreth et al., 1998)

人體中有一套抵抗 ROS 的機制，使 ROS 的傷害降至最低程度，這套機制中包含利用抗氧化酵素以及非酵素的抗氧化劑，抗氧化酵素包括觸酶(catalase)、超氧化歧化酶(superoxide dismutase)、穀胱甘肽過氧化酶(glutathione reductase)以及穀胱甘?還原酶(glutathione reductase)；非酵素的抗氧化劑如 L-ascorbic acid, α-tocopherol, selenium, β-carotene, tea polyphenols, taurine, glutathione, arginine, creatine 及 citrulline 等，以進行 ROS 的清除。所以當皮膚過度的照射 UVA 及 UVB 時，會產生許多的 ROS，進而造成皮膚急性或是慢性的傷害；短暫的照射 UVA 及 UVB 會造成曬傷，長期性的照射則會增加癌症及加速老化的產生，在目前的細胞研究中也指出過度的照射紫外光會增加 ROS 的產生，並且減低穀胱甘肽(glutathione)的含量，並且造成超氧化歧化酶、觸酶等活性的降低(Frederick et al., 1993)。



楊子妍 陳國蕙  
林政頤 陳正吉  
吳裕仁

以蛋白質體學方法研究皮膚細胞經 UVB 傷害後之  
分子機制  
A Study of Proteomic Analysis of HaCat Cell after UVB  
Radiation

紫外光過量的照射對於生物體或是在細胞實驗中都發現其所造成的傷害，但是以往的實驗都是檢測自由基產生量的多寡、抗氧化酵素的活性變化，或是 DNA 分子層次的破壞改變，並無法觀察經由紫外光過度的照射後細胞整體性蛋白質的變化，尤其皮膚是保護身體免於受到紫外光的傷害主要防護機制，對於紫外光的反應具有獨特性，並且與其他外在的逆境反應具有很大的差異 (Li et al.,2001)。利用整體性的蛋白質體方法來觀察皮膚細胞經由紫外光照射後總體蛋白質的變化，若是可以建立此一系統，建立照射不同強度紫外光前後皮膚細胞的二維電泳圖譜，並且鑑定其相對應具有消長的蛋白質，可以進一步的闡明紫外光對於皮膚細胞產生傷害的生化機制及訊息傳導途徑，並且可以將此系統建立為抵禦紫外光傷害皮膚之有效物質篩選平台。

## 貳、材料與方法

### 一、人類角質細胞培養

選用 HaCat 細胞進行細胞培養。

#### 1. DMEM 培養基 (Seromed FG 1285) :

內含 5.5 g/L NgCl, 25 mM HEPES, 2.0 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 5 mg/L Phenol Red 及 0.532 g/L N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine。貯存於 4°C 備用，可保存半年以上。

#### 2. Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone SH 30070.03) :

L-Glutamine (Flow 15-801-05)

取 584 mg 溶於 20 mL 純水，使用時稀釋 100 倍。於 4°C 儲存。

#### 3. Pen-Strep (penicillin-stretomycin, Flow 16-700-49) :

5000 IU/mL-5000 g /mL，使用時稀釋 100 倍。於 4°C 儲存。

#### 4. Sodium pyruvate (Flow 16-820-49, 100 mM, 100x) :

使用時稀釋 100 倍。置於 4°C 保存。

◆ 以上藥品均先以無菌濾膜過濾後使用。



### 5. DMEMX 培養基：

DMEM	(Seromed FG1285)	170 mL
FBS	(Hyclone SH30070.03)	30 mL
L-Glutamine	(Flow 15-801-05)	2 mL
Sodium pyruvate	(Flow 16-820-49)	2 mL
Pen-Strep	(Flow 16-700-49)	2 mL

上述溶液混合後使用。置於 4°C 保存。

## 二、細胞照射 UVB

儀器設備：315nm UVB 燈管、暗箱

實驗方法：

1. 將 UV 燈箱置於無菌操作台中（於無菌操作台中進行 UV 照射）。
2. HaCat cell 繼代至 100mm dish 中培養 12h 後，倒去培養液，dish 不加蓋使細胞直接照射 UVB，分成 control 及照射 100、200、300J/cm<sup>2</sup> 等四組；每組需要 6 個 100mm 的 dish。
3. 射 UV 後，在加入新鮮的 DMEMX(10% FBS)，培養 24h 後將細胞分別收集，待萃取 cytosol protein。

## 三、二維電泳分析

主要是利用 IEF 電泳將蛋白質以其等電點在膠體上分離，並利用 SDS PAGE 將蛋白質再利用其分子量來分離，是目前可以觀察整體性蛋白質的主要方法。

第一維 IEF

電壓	時間	Vh
30 V	12h	360
500V	1h	500
1000V	1h	1000
8000V	2h	16000

## 四、SDS 膠體電泳分析

### (一)鑄膠

方法同上節不連續膠體電泳，只是在膠體溶液中多加了 1% 的 SDS；膠體的濃度配方如下表 2.2，10 mL 約足夠鑄造兩片膠片。



表(一) 常用 SDS-PAGE 膠體溶液 (單位 : mL)

膠體溶液	分離膠體溶液						焦集膠體 4%
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	
A	1.65	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						—
C	—						1.24
10% SDS	0.1						0.05
H <sub>2</sub> O	5.7	4.85	4.05	3.2	2.35	0.65	2.95
APS	0.05						0.1
總體積	10						5.0

## (二)電泳

- 取出膠片回溫，將稀釋成一倍的 SDS 電泳緩衝液，倒入電泳槽底部。接著把膠片以 45 度角放入，可避免氣泡的產生，當電泳夾夾妥後，在電泳玻片的上方，加入電泳緩衝液。同樣也要清洗每個樣本槽。
- 取適量的樣本（約 5~10μL），加入同體積之樣本緩衝液 (sample buffer) 再加入 2μL 追蹤染料，混合均勻後於 100°C 中煮 5 min，待冷卻後離心 30 秒，以微量針管小心注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡產生。
- 低分子量標準蛋白質約需 4~8μL，作為蛋白質分子量參考的依據。
- 將電泳槽上部的蓋子蓋上，確認正負極裝置正確，連接上電源供應器，定電壓以 100~150V 進行電泳。
- 追蹤染料跑出膠片外，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。

## 五、SDS 膠體內蛋白酶水解

### (一)還原

- SDS-PAGE 經 CBR 染色後，以二次水清洗二次，每次 2 h。
- 將目標蛋白從膠片割下，放入離心管中，濃度需約 100 pmol。
- 置於 100μL 10 mM DDT/25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 緩衝溶液中，在 37°C 下反應 1 h，使雙硫鍵還原。
- 10,000 rpm 離心 1 min 以去除 DTT。



5. 加入 100 μL 100 mM iodoacetamide (IAA)/25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 緩衝溶液，於室溫避光反應 1 h。
6. 10,000 rpm 離心 1 min 以去除 DTT。

### (二) 脫色

1. 加入脫色液(25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 50% CH<sub>3</sub>CN)，於 30°C 反應 15 min，重複兩次。
2. 以二次水清洗兩次，以去除 CBR，最後以 SpeedVac 抽乾。

In gel digestion :

3. 加入含有 0.1μg trypsin 之酵素緩衝液 10μL (25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>)，水解反應 10 min。
4. 加入 100μL 酵素緩衝液，於 37°C 下反應過夜。

### (三) 萃取 peptides

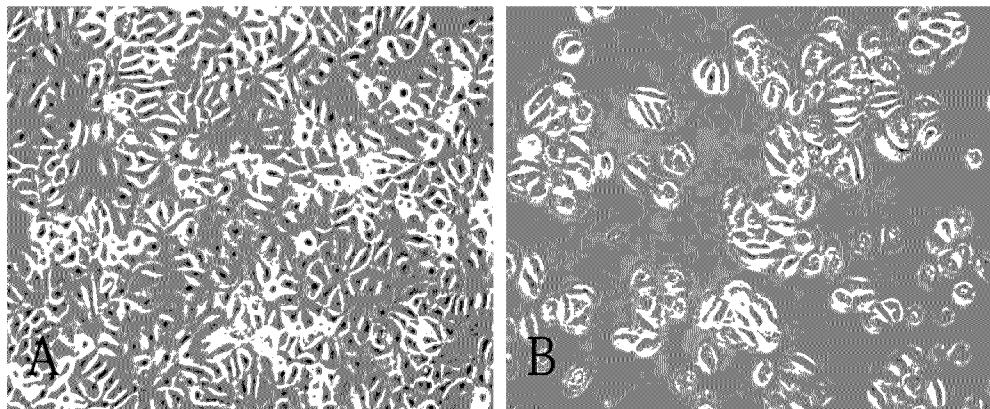
1. 收集萃取液於離心管，加入 200μL 萃取溶液(0.1% TFA, 60% CH<sub>3</sub>CN)。
2. 在 35~40°C 下超音波 30 min，收集萃取液於離心管中。
3. 用 SpeedVac 抽乾，最後以 20μL 甲酸回溶。

## 貳、結果與討論

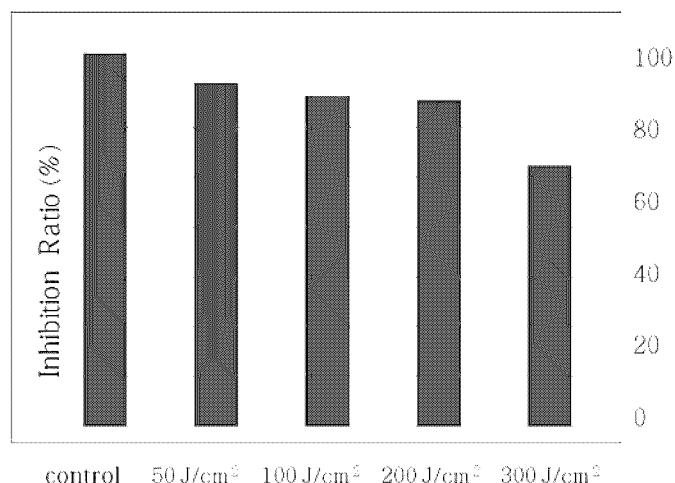
### 一、人類角質細胞 HaCat cell 照射 UVB 不同時間後之型態與存活率

我們利用紫外光照射器(UVITEC, LF-106-M, 6W, 315nm)，其功率為(0.11mW/cm<sup>2</sup>)，進行 HaCat cell 照射，首先將細胞以  $1 \times 10^5$  cells/ml 進行 10 公分培養盤細胞培養，待細胞生長至 7 成滿後進行 UVB 的照射，分別將細胞照射 0, 100, 200, 300 J/cm<sup>2</sup>，再繼續進行細胞培養 24 小時，最後利用顯微鏡觀察 HaCat cell 經過 UV B 照射不同的時間後，其型態是否因照射 UV B 的時間逐漸增長而改變，並且利用 trypan blue 及 MTT Assay 觀察 HaCat cell 經不同時間照射紫外光後，其細胞死亡情況。由結果顯示，隨著細胞照射時間增長至 30 J/cm<sup>2</sup> 時，利用 trypan blue 染色，發現 HaCat cell 出現部分死亡的現象（圖(一)），另外，也透過 MTT Assay 觀察其照射 UVB 後的存活率的變化（圖(二)）。結果發現 HaCat cell 照射至 300 J/cm<sup>2</sup> 時，細胞的存活率明顯下降，但是 HaCat cell 在照射 0~200 J/cm<sup>2</sup> 的過程中雖然細胞並未因為照射 UVB 的時間逐漸增長而出現死亡的現象，但是卻呈現了細胞增生能力下降的現象，因此在接續的實驗條件設定照射 UVB 為 0~200 J/cm<sup>2</sup>。





圖(一) Morphological changes of HaCat cells treated with different doses of UVB. (A) control sample (B) treated with 200 J/cm<sup>2</sup> UVB



圖(二) Effect of different UVB doses on the viability of HaCat cells after 24 hr incubation by MTT assay. Cells were exposure with different doses UVB (0~300 J/cm<sup>2</sup>) and were evaluated by MTT assay.

## 二、HaCat 細胞經紫外光照射後二維電泳圖譜分析

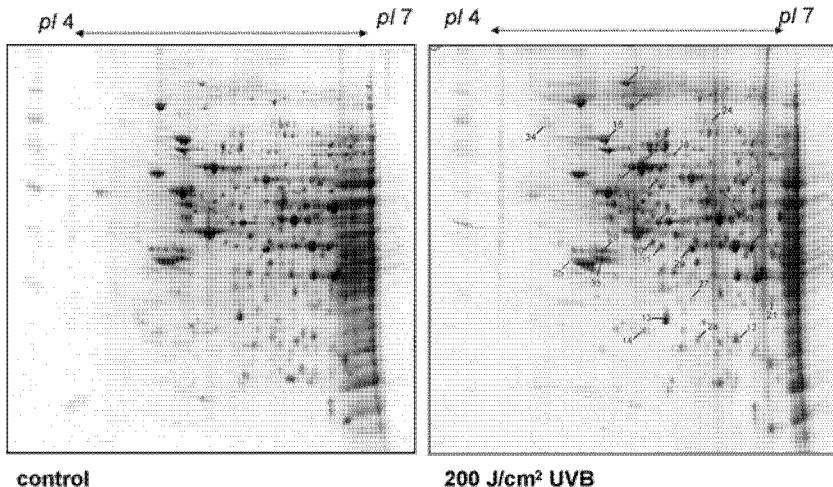
萃取細胞全部蛋白質後進行 SDS-PAGE 觀察細胞照射 UV B 後進行二維電泳圖譜分析，以觀察其蛋白質量的差異，將蛋白質依其等電點及分子量大小的不同展開圖譜並且進行比對 HaCat cell 照射 UVB 前後蛋白質表現量的差異，所以進行了 pH 4-7 二維電泳分析（圖(三)）。而在對照組（未照射 UVB）與照射 200 J/cm<sup>2</sup> 的 2-DE 圖譜中，分別比對出照射後表現量具有差異或消長的蛋白質，透過 LC/MS/MS 身份鑑定。本研究中經比對過後初步鑑定了 16 個蛋白質的身分（如表(二)），其中經 UVB 照射後蛋白質表現量上升的蛋白質為：pyruvate carboxylase precursor、histone cluster

2、MTHSP75、chaperonin、lamin B2、keratin 9、keratin 1、stomatin (EPB72)-like 2、thioredoxin peroxidase 等，照射 UVB 後表現量維持與照射 UVB 前表現量幾乎一致的為：glucosidase II、lamin A/C isoform 2，而本次蛋白質身分鑑定中表現量下降的只有 BIP protein。透過 NCBI 資料庫逐一搜尋蛋白質的功能後，針對 keratin 9、keratin 1、MTHSP75、Lamin B2、stomatin (EPB72)-like 2、thioredoxin peroxidase、BIP protein 等，7 個蛋白質的功能及其可能在參與的機制中所扮演的角色進行探討。

表(二) Protein identification by LC-MS/MS

Spot number	Protein name	NCBI acc.no	Calculate Mr/pl	Peptide matched	Sequence covered %	MASCOT score
1	Pyruvate carboxylase	AAA82937	129.5/6.37	11	10	241
2	glucosidase II	CAA04006	106.8/5.71	48	38	1183
3	lamin A/C isoform 2	NP_005563	65.0/6.4	33	36	934
4	Histone cluster 2	NP_003507	140/10.90	2	22	63
5	MTHSP75	AAA67526	73.7/5.97	26	32	685
6	chaperonin	NP_002147	61.0/5.7	49	47	1358
7	lamin B2	NP_116126	67.6/5.29	32	40	1044
8	keratin 9	CAA52924	61.9/5.14	2	4	166
9	keratin 9	CAA52924	61.9/5.14	7	15	311
10	stomatin (EPB72)-like 2	BAD96822	38.5/6.88	21	43	743
11	keratin 9	NP_000217	62.0/5.14	5	14	208
12	histone cluster 2	NP_003507	140/10.9	1	22	73
13	thioredoxin peroxidase	NP_006397	30.5/5.86	6	21	229
14	keratin 1	AAG41947	660.27/8.1	9	13	383
15	Bip protein	AAF13605	70.8/5.23	9	13	365
16	histone cluster 2	NP_003507	140.87/10.9	1	22	86





图(三) The 2-DE maps of HaCat cells treated with UVB and the control sample. (A) control sample (B) treated with UVB for 20 min. Proteins spots marked on the maps were considered differentially expressed and identified by LC-MS/MS. The results are representatives of three independent runs.

### 三、Keratin 9 及 Keratin 1

Keratin 其功能主要是在細胞中擔任 intermediate filament(IFs)，在上皮細胞分化(epithelial differentiation)過程中，細胞會逐漸角質化，keratin 蛋白質會參與形成長串角質 IFs。角質細胞存在於基底層時是屬於活細胞，會漸漸的往上進入棘狀層及顆粒層中，keratin 幫助角質細胞在基底層通往棘狀層的過程中可以維持細胞的結構，並且參與細胞與細胞之間的交互作用以維持恆定。 Keratin 依照其帶電性性質的不同可以分成二種型態分別為 Type I 及 Type II，而目前共有 20 種 keratin 存在於上皮細胞中。本研究中所鑑定出的 keratin 9 是屬於 Type I keratin，在目前的研究中其主要發現位於手掌與腳掌的皮膚中，當其基因發生變異時會產生 epidermolytic palmo-plantar keratoderma 的病徵。而 keratin 1 是屬於 Type II keratin，並且隸屬於 keratin 10 family member 中之一員，主要是表現於棘狀層及顆粒層中，目前研究發現若是其基因發生變異時會在腳底或是腿部產生先天性魚鱗症的病徵(bullous congenital ichthyosioform erythrderma)。 keratin 9 及 keratin 1 在 HaCat Cell 經 UVB 照射過後其蛋白質的表現量都是上升的現象，但是目前沒有研究提及有關 keratin 9 及 keratin 1 經 UVB 照射過後其蛋白質的表現量上升之研究，其可能參與的機制為何則有待更多之研究探討。

#### 四、Lamin A/C isoform 2 及 Lamin B<sub>2</sub>

Lamin（層黏連蛋白）是一種硫酸化的醣蛋白，為基底膜的主要成分，由大部分的上皮與內皮細胞所製造。Lamin 可與多種化學基(ligand)結合，使其成為細胞與胞外基質之間主要的胞外連接分子，且 Lamin 因存在位置不同而有不同的形式；主要分別為 A-type lamin、B-type lamin。Lamin A 存在於正常皮膚真皮層的纖維母細胞及基底層的上皮細胞中，一般 Lamin A 的缺乏與腫瘤的快速增生有關，另一個與 Lamin A 同屬於 A-type lamin subfamliy 的 Lamin C 表現於真皮層的纖維母細胞及基底層的上皮細胞但是不會表現於靜止的基底上皮細胞，缺乏則是減緩腫瘤的增殖。

B-type lamin 包含了有 lamin B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>及 IV(Benavente et al , 1985a ; Quinlan et al , 1995)。Lamin B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>在哺乳類動物體內的細胞中表現特別顯著，儘管不是所有體內的組織表現了這兩種 B-type lamin。Lamin B<sub>1</sub>表現於上皮細胞但不表現於真皮層的纖維母細胞，Lamin B<sub>2</sub>表現於所有正常皮膚的上皮細胞中，但卻不表現在真皮層的纖維母細胞中。綜合 lamin 的表現量也可顯現出基底細胞瘤的變異位置。

本研究中鑑定出的 Lamin A/C isoform 2 幾乎是維持恆定的狀態，推測 Lamin A/C isoform 2 可能並沒有參與本次實驗的反應機制中。而 Lamin B<sub>2</sub>則是在照射 UVB 200 J/cm<sup>2</sup>後表現量是呈現上升的狀態，對照 RT-PCR 及 western blot，在 mRNA 以及蛋白質的表現量與蛋白質體中的表現都是呈現上升的現象，但是目前仍無文獻關於探討 Lamin B<sub>2</sub>於 UVB 照射的過程中其參與的機制，所以目前推測當皮膚角質細胞受到 UVB 照射後可能增加角質增生作用。

#### 五、thioredoxin peroxidase

Thioredoxin peroxidase 是一種受到氧化壓力之下所被誘導出來的一種酵素，可幫助細胞在分裂的過程中保護其他的細胞免於受到氧化傷害後參與細胞中的訊息傳遞。而在本研究中 thioredoxin peroxidase 在經過 UVB 照射後的表現量為上升，因此推測當角質細胞於 UVB 照射的過程中也是屬於受到一種氧化傷害，而因此被表現出來保護其他的細胞免於傷害，是屬於保護性的蛋白質。thioredoxin peroxidase 在經過 UVB 照射後 mRNA 的表現量也是上升的趨勢。

#### 六、Heat Shock Protein-75, BIP protein, chaperone

熱休克蛋白(Heat Shock Protein;HSP)屬於一種 molecular chaperone 是研究果蠅唾腺細胞受熱導致染色體膨脹現象時發現的，本身是一個龐大的族群，在細菌、酵母菌、植物、及動物中都有發現。當細胞處於壓力、氧化、缺氧、發炎等熱逆境狀態下，細胞受到環境改變的壓力時，容易造成蛋白質失去應有的構形或是變性，此



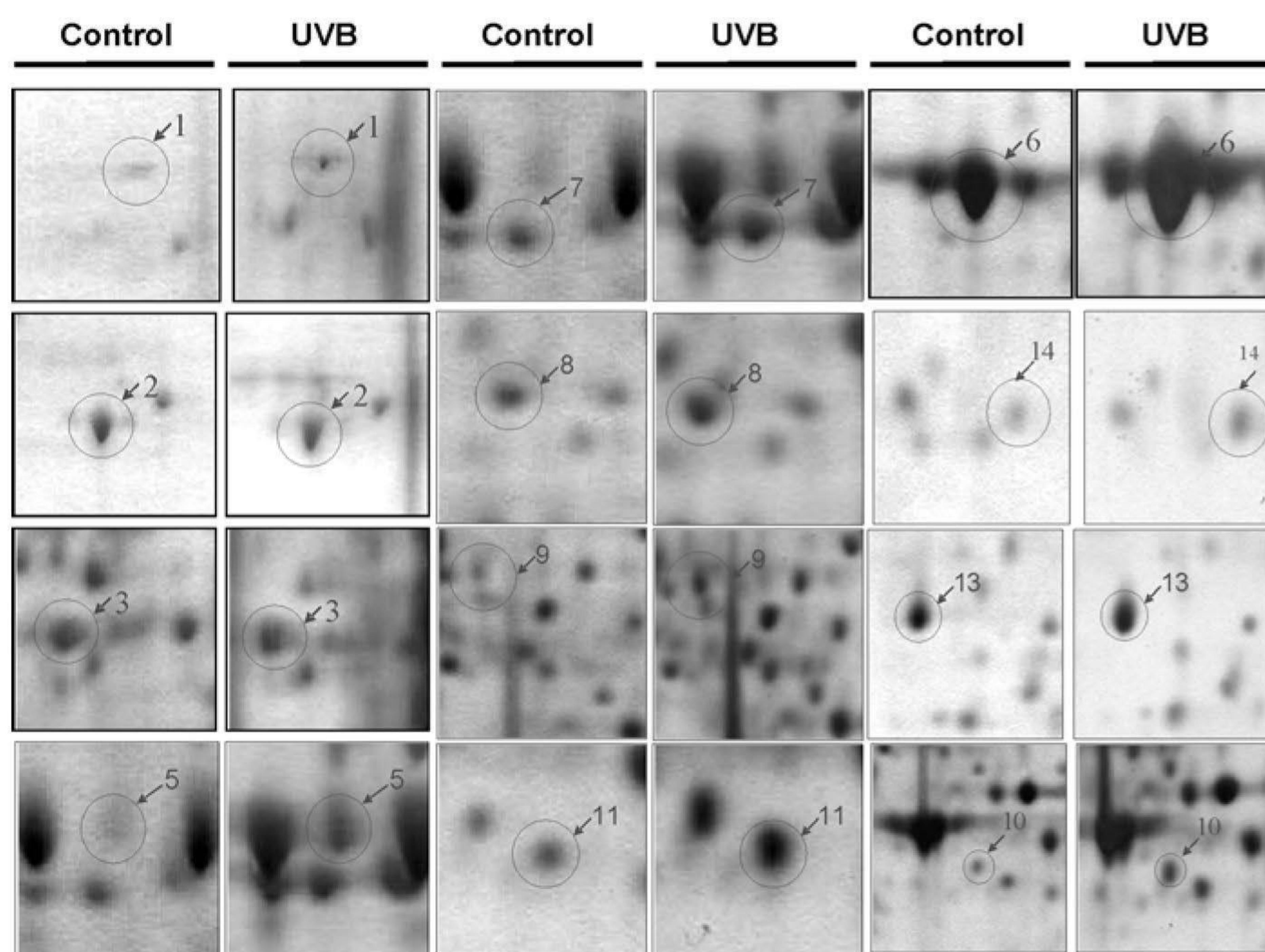
楊子妍 陳國蕙  
林政頤 陳正吉  
吳裕仁

以蛋白質體學方法研究皮膚細胞經 UVB 傷害後之  
分子機制  
A Study of Proteomic Analysis of HaCat Cell after UVB  
Radiation

現象則稱做熱休克反應(heat shock response)。尤其有關正常代謝或是和基因複製有關的重要酵素受到損害，對生物體或是細胞來說都是危害。生物或細胞為了抵抗這種逆境就會誘導出 Heat Shock Protein，以移除這些危害因子。有些 Heat Shock Protein 與基因的調控有關，有些則具有 molecular chaperone 功能。(Georgopoulos et al., 1993;Hendrick et al.,1993)。

Heat Shock Protein 以分子量大小分類，具有 molecular chaperone 功能的有 HSP-60(GroEL)、HSP-70(DnaK)、HSP-90、HSP-40(DnaJ)、HSP-10(GroES)，而本研究中鑑定出的 MTHSP- 75 則是屬於 HSP- 70S 中的其中一種蛋白質。但是並非所有的蛋白質都具有 molecular chaperone 的功能，這些 Heat Shock Protein 分布於細胞核、細胞質及各式的胞器中，功能與蛋白質的運輸、進出胞器、幫助蛋白質折疊、保護蛋白質免於被蛋白質水解，或者是屬於 co-chaperone 的角色。但是並非所有具有 molecular chaperone 功能的 Heat Shock Protein 都需要受到熱逆境才能夠表現，molecular chaperones 的功能對於蛋白質的摺疊與運送是必須的，所以有些在細胞正常生理條件下，就已經在細胞內恆定的表現。MTHSP- 75 在本研究中經 UVB 照射後表現量呈現上升的現象，在 Mrna 中的表現量也是上升的趨勢。BIP protein 屬於 heat shock protein-70s 中一種蛋白，主要存在於內質網中，其主要的功能為幫助其他的蛋白質能夠正確的摺疊，才能使蛋白質擁有特定的功能，因此 BIP protein 在內質網中擔任著非常重要的角色，蛋白質經過修飾及正確得折疊後，也會參與機制的反應。在本研究中發現 BIP protein 經過 UVB 照射後的表現量為下降，推測角質細胞可能因為於 UVB 的照射過後而受到傷害，因此位於內質網中的 BIP protein 表現量下降，也造成了其他的蛋白質摺疊不正確，可能會使角質細胞雖然沒有凋亡，但是也不會呈現健康的狀態。





圖四 Enlarged 2-DE map of the 28 differential proteins in CAL-27 cells treated with 11-dehydrosinulariolide. (differentially expressed between the CAL-27 cells and the control sample) Solid arrows point the up-regulated proteins and dashed arrows point the down-regulated proteins



## 參考文獻

1. 吳裕仁 (2006) 綠竹筍生長過程蛋白質體變化及其抗體庫之建立
2. 陳宜嫻、黃宜純、黃淑桂、傅如嶽、溫慧萍、楊佳璋、鄭智交 (2002)。皮膚生理學。臺中：華格那企業
3. 石宗憲等 (2003)。蛋白質體學。藥物基因生物技術教學資源中心教育部顧問室生物技術科技教育改進計畫
4. Stevens A. and Lowe J., 尹相姝編譯 (2006)。臺北：藝軒圖書出版社
5. Zhang B.O., Yan Wang, Yongping (2009) Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Letters*
6. Bayerl C., Lauk J., Moll I., Jung E. G. (1997) Immunohistochemical characterization of HSP,  $\alpha$ -MSH, Merkel cells and neuronal markers in acute UV dermatitis and acute contact dermatitis in vivo. *Inflamm. res.* 46: 409- 411
7. Dudek J., Benedix J., Cappel S., Greiner M., Jalal C., Muller L., Zimmermann R. (2009) Functions and pathologies of Bip and its interaction partners. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1556- 1569
8. Jos L. V. Broers, Barbie M. Machiels, Helma J. H. Kuijpers, Frank Smedts, Ronald van den Kieboom, Yves Raymond, Frans C. S. Ramaekers (1997) A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol.* 107: 505- 517
9. Jasper B Green, J Peter W Young (2008) Slipin: ancient origin, duplication and diversification of the stomatin protein family. *BMC Evolutionary Biology*. 8: 44
10. Laura Planko, Karsten Bohse, Jorg Hohfeld, Regina C. Betz, Sandra Hanneken, Sibylle Eigelshoven, Roland Kruse, Markus M. Nothen, Thomas M. Magin (2007) Identification of a keratin- associated protein with a putative role in vesicle transport. *European Journal of Cell Biology*. 86: 827- 839
11. Matthias Schafer, Sabine Werner (2008) Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*. 58: 165- 171
12. RS Venables, S MCLean, D Luny, E Moteleb, S Morley, RA Quinlan, EB Lane, CJ Hutchison (2001) Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *British Journal of Cancer*. 84: 512- 519



13. Sarah J. Hatsell and David P. Kelsell (2000) The diffuse palmoplantar keratodermas. *Dermatovenerologica*. 2000, Vol 9, No 2
14. S. V. Novoselov, I. V. Peschenko, V. I. Popov, V. I. Novoselov, M. F. Bystrova, V. J. Evdokimov, S. S. Kamzalov, M. I. Merkulova, T. M. Shubaeva, V. M. Lipkin, E. E. Fesenko (1999) Localization of 28- kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties. *Cell Tissue Res.* 298: 471- 480
15. Teresa S. Rafferty, Roderick C. Mckenzie, John A. A. Hunter, A. Forbes Howie, John R. Arthur, Fergus Nicol, and Geoff J. Beckett (1998) Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation- induced cell death. *Biochem. J.* 332: 231- 236
16. Vijaya Chaturvedi, Jian- Zhong Qin, Mitchell F. Denning, Divaker Choubey, Manuel O. Diaz, Brian J. Nickoloff (1999) Apoptosis in Proliferating, Senescent, and Immortalized Keratinocytes. *Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 33, Issue of August 13, pp. 23358- 23367

