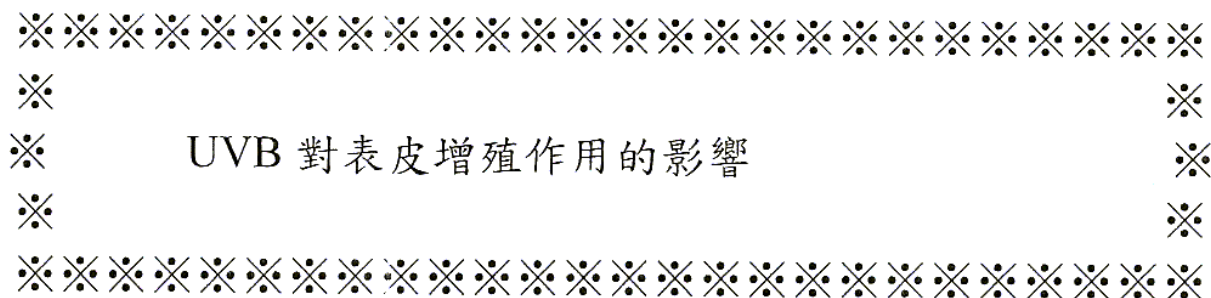


# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告



計畫編號： 90-CS-06

執行期間： 90年1月1日至 90年12月31日

計畫主持人：張慧柔



執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 91 年 3 月 20 日

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：90-CS-06

執行期限：90年1月1日至90年12月31日

執行機構及單位名稱：化粧品應用與管理系

主持人：張慧柔

## 一、中文摘要

探討 UVB 照射對表皮增殖作用影響的機轉，是本研究的目的。

研究對 UVB 對正常角質細胞與高增殖作用細胞的增殖能力破壞機轉的探討，是從對角質細胞增殖作用扮演重要角色的  $\beta_2$  腎上腺接受體 ( $\beta_2$ -adrenergic receptor) 著手。本研究著手在 UVB 對角質細胞  $\beta_2$  腎上腺接受體的作用，結果顯示  $\beta_2$  腎上腺接受體受 UVB 照射後有明顯的改變，因此角質細胞的增殖作用與分化作用能力可能受到 UVB 照射所影響。

**關鍵詞：**UVB，角質細胞， $\beta_2$  腎上腺接受體

## 二、Introduction

陽光是一種含有多種波長電磁波的輻射線，包含有紫外線、可見光和紅外線，其中以紫外線對人體具有明顯的傷害。目前針對紫外線對人體作用的波段範圍分為 UVA (320~400 nm)，UVB (280~320 nm) 及 UVC (190~280 nm)，其中波長最短的 UVC，到達太空的大氣層就吸收掉，因此大部分都不能到達地面，中波長波段的 UVB 是最容易對生物造成傷害的紫外線，而波長最長的 UVA，雖到達地面的量最多，且會透過到達人體組織深部，但其毒性卻比 UVB 來得少。

過多的紫外線照射對皮膚有害，UVA 會造成真皮層的纖維變性，因而無法保持皮膚的張力和彈性，並且與深層皺紋和光過敏的產生有密切的關係。UVB 會造成表皮細胞新陳代謝的紛亂和變性，使其不能

保持水分，皮膚會變的乾燥和粗糙，並且與淺層皺紋和皮膚癌的產生有非常密切的關係。此外 UVA，UVB 皆會使黑色素母細胞產生大量黑色素，使皮膚變黑。因此進入皮膚之紫外線波段不同，對皮膚組織所產生之影響也有不同。

皮膚為人類最外部之屏障，因此與陽光中的紫外線接觸的機會最多，尤其是高度工業及某些物質（如海龍等）過分利用的結果，造成大氣層中的臭氧層逐漸稀薄，無形中增加了人體的紫外線曝露量，因而易造成皮膚之傷害，UVB 的過度曝露對皮膚會造成嚴重的傷害，UVB 對皮膚的重要傷害為皮膚癌，皮膚癌為一高增殖現象的疾病。

表皮層的角質細胞已被證實含有  $\beta$ -adrenergic adenylate cyclase system，此系統的  $\beta$ -adrenergic receptor 可經由與特异性訊息傳導物質 (catecholamine) 結合，刺激 guanosine 5-triphosphate (GTP) 結合蛋白，導致細胞內 cyclic AMP (c-AMP) 的產生 (Koizumi et al., 1991)，因而對表皮細胞的增殖 (proliferation) 與分化作用 (Differentiation) 產生影響 (Orenberg et al., 1983)。有研究顯示，在未分化或正在增殖的 (undifferentiated/proliferating) 角質細胞，具有相當高密度的  $\beta_2$ -adrenergic receptor，並且在角質細胞分化的過程中  $\beta_2$ -adrenergic receptor 的密度有明顯的下降 (Schallreuter, 1997)。有研究報告指出，在牛皮癬病人身上可發現到角質細胞的  $\beta$ -adrenergic adenylate cyclase system 的反應性有明顯的下降 (Yoshikawa et al., 1975; Voorhees et al., 1971)。另外，以實驗分式誘導的角質細胞高增殖作用現象的研究中，也發現角質細胞  $\beta$ -adrenergic adenylate cyclase system 有明顯的缺失 (Garte and Belman, 1980; Iizuka et al.,

1988)。

UVB 的過度曝露對皮膚會造成嚴重的傷害，UVB 對皮膚的重要傷害為皮膚癌，皮膚癌為一高增殖現象的疾病。因此本研究計畫將著手在 UVB 對正常角質細胞與高增殖作用細胞的增殖作用能力機轉的探討。

### 三、研究方法

#### 人類角質細胞之培養

正常皮膚得自臨床病人切割下來的包皮，並確定無皮膚感染性疾病或其他皮膚增生性疾病始得收集。把切下的包皮組織立即放入培養溶液並送至實驗室處理，首先在無菌操作下以磷酸緩衝液(PBS)清洗三次後，以消毒過的剪刀除去脂肪組織，將組織切成小塊(約  $5 \text{ mm}^3$ )，再以 PBS 沖洗三次，之後浸泡在含有 0.25% trypsin 酵素的 PBS 中，然後靜置在  $4^\circ\text{C}$  冰箱內靜置隔夜。次日取出經酵素作用完成之小塊皮膚，以 PBS 溶液沖洗洗去酵素，再以消毒完全的鑷子將表皮層與真皮層分開，並且仔細地將細胞儘量刮下，置入裝有 PBS 的試管。以振盪器振盪五分鐘，小心地將角質細胞由角質層振下並將之打散，除去懸浮的大塊組織，經過離心( $500\text{g}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $10\text{min}$ )後，集中細胞，倒去上清液，再加入 PBS，以 2ml 的吸管沖散後再離心，最後所得的細胞則加入 5 ml 的角質細胞培養液(KC-SFM medium)，其中添加有  $25 \mu\text{l/ml}$  的牛腦下垂體萃取物(bovine pituitary extract, BPE)及  $1-5\text{ng/ml}$  的基因重組上皮細胞生長因子(recombinant epidermal growth factor, rEGF)，將混合培養液之細胞以吸管置入經過膠原蛋白(Collagen S)處理後的培養皿，置於  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  的培養箱中作第一代的培養。培養瓶中之培養液約 2-3 天更換一次，在倒立顯微鏡下觀察細胞之生長狀態及細胞密度，長滿培養瓶細胞即須進行繼代培養。

#### 繼代培養方法

將長滿培養皿的第一代角質細胞以 PBS 清洗三次後，加入 1ml 0.25% 的 trypsin，在  $37^\circ\text{C}$  下作用約 10 分鐘，當細胞自培養皿脫離時即加入 10 ml 的 PBS 稀

釋酵素以便中止其對細胞的作用，而後將溶液放在 15 ml 離心管中以  $400\text{g}$ ， $20^\circ\text{C}$  離心 10 分鐘，除去上層液後，加入適量培養細胞液，把  $1.0 \times 10^5$  個細胞接種在已塗覆 Collagen S 的培養皿完成繼代培養，置入  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培養箱內，每隔三天更換培養液，待細胞長滿培養皿時依同樣方法分盤培養。

#### 紫外線照射方法

將第三代培養的角質細胞以 PBS 清洗三次後再加入約 1 ml PBS 將細胞覆蓋，讓細胞在紫外線處理時不會乾燥。以中長波紫外線(UVB)照射培養角質細胞，所使用中長波紫外線照射燈之儀器為  $1 \times 15\text{W}-312 \text{ tube}$  (SVL, power 30W, France)。每次照射前，先以手動式的偵測儀 (UVX digital radiometer, UVR-305/365-D detector, Tokyo Optical CO., LTD) 檢測紫外線之強度。 $(1 \text{ mW/cm}^2 \text{ 於 } 15 \text{ cm 高度})$ 。再以不同紫外線劑量照射，照射完後馬上吸去上清液並加入角質細胞培養液。

#### $\beta_2$ 腎上腺接受體之偵測

$100 \mu\text{l}$  之角質細胞膜溶液(內含  $20 \mu\text{g}$  蛋白質)，加入  $10-200 \text{ pM}$  之  $^{125}\text{ICYP}$  ( $^{125}\text{I}$ iodocyanopindolol)，最後之容積為  $250 \mu\text{l}$  [內含  $0.09\text{M NaCl}$ ,  $12\text{mM Tris-HCl}$  ( $\text{pH}7.4$ ),  $1 \mu\text{g BSA}$ ,  $1\text{mM ascorbic acid}$ ,  $300 \mu\text{M GTP}$ ]，此溶液加/不加  $10 \mu\text{M}$  未標示之 propranolol，之後將這些溶液置於  $37^\circ\text{C}$ ，一小時之後加入 5ml 之 PBS，同時以  $20 \text{ mM Tris-HCl}$  作為緩衝液( $\text{pH}7.4$ , ISB-Tris,  $4^\circ\text{C}$ )。之後把這些混合物快速以 Whatman GF/B 濾紙過濾，每一濾紙以 5 ml ISB-Tris buffer 沖洗二次( $4^\circ\text{C}$ )，之後放置於自動 gamma scintillation spectrometer 下檢測，專一性之結合的決定是依據結合之總數減去含 propranolol 時的結合；專一性之結合平均超過 65% 之總結合數，非專一性之結合被定義為不與 propranolol 作競爭性結合之結合。最後  $\beta_2$  腎上腺接受體之密度 ( $B_{\text{max}}$ ) 與游離常數 ( $K_d$ ) 自 Scatchard plot 之飽和曲線求得。

#### 四、結果

經過實驗結果顯示正常對照組之 $\beta 2$ 腎上腺接受體的密度(Bmax)為  $95.22 \pm 10.56 \text{ fmol/mg}$ ，然而經由 20, 50, 75  $\text{mJ/cm}^2$  UVB 照射之角質細胞所含之 $\beta 2$ 腎上腺接受體的密度分別為  $78.55 \pm 9.36$ ,  $42.11 \pm 6.52$ ,  $34.22 \pm 7.34 \text{ fmol/mg}$ 。研究結果顯示培養的角質細胞經過 20, 50, 75  $\text{mJ/cm}^2$  UVB 照射之後，其 $\beta 2$ 腎上腺接受體的密度與對照組之間的差別具統計學上的意義 (unpaired t-test,  $p < 0.05$ )，然而 Kd 值並無統計上之差別。另一方面 $\beta 2$ 腎上腺接受體的密度與 UVB 照射的劑量成正比 ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.05$ )。

#### 五、討論

目前已知細胞外的 catecholamine 能夠經由未分化角質細胞的 $\beta 2$ -adrenergic receptor 訊息，來調整鈣離子的恒定，並且角質細胞的 $\beta 2$ -adrenergic receptor 在控制細胞內的鈣離子的恒定上扮演重要的角色 (Koizumi et al., 1992)。細胞外的 Catecholamine 會經由與表皮層未分化的角質細胞的細胞膜上的 $\beta 2$ -adrenergic receptor 結合，影響到 cAMP 與鈣離子的調節。Catecholamine 經由與 $\beta 2$ -adrenergic receptor 結合，活化了 adenylyl cyclase，因而產生了 cAMP，並且伴隨著細胞內鈣離子濃度的增加 (Kobilka et al., 1987)，此結果引起了角質細胞的分化，在角質細胞受到分化之後，導致細胞外的 catecholamine 的合成和角質細胞的 $\beta 2$ -adrenergic receptor 密度明顯的降低 (Schallreuter et al., 1995)。

在皮膚上之角質細胞已被證實明顯具有 $\beta$ 腎上腺接受體，在本研究中也確實發現它受到 UVB 照射下所產生的變化，此角質細胞上 $\beta$ 腎上腺接受體受 UVB 照射所造成的改變，可能與角質細胞增殖與分化作用有密切的關係。

#### 六、參考文獻

Garte SJ, and Belman S: Tumour promoter uncouples beta-adrenergic receptor from adenylyl cyclase in mouse epidermis. *Nature* 284:171-173, 1980.

Iizuka H, Matsuo S, Tamura T and Ohkuma N: Increased cholera toxin-, and Forskolin -induced cyclic AMP accumulations in psoriatic involved versus uninvolved or normal human epidermis. *J invest Dermatol* 91:154-157, 1988.

Kobilka BK, Dixon RAF, Francke T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Sigal IS, Yangberg TL, Francke U, Caron MG, Letkovicz RJ: cDNA for the beta-adrenergic receptor. A protein with multiple membrane spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with the receptor for platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:46-50, 1987.

Koizumi H, Yasui C, Fukaya T, Ohkawara A, Ueda T: Beta-adrenergic stimulation induces intracellular  $\text{Ca}^{++}$  increase in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 96:234-237, 1991.

Orenberg EK, Pfendt Ea, Wilkinson DI: Characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agonist stimulation of adenylyl cyclase activity in human epidermal keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 80:503-507, 1983.

Schallreuter KU: Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis. *J Invest Dermatol Sympos Proceed* 2:37-40, 1997.

Schallreuter KU, Lemke KR, Pittelkow MR, Wood JM, Korner C, Swanson NN, Hitzemann K, Malik R. Catecholamines and keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 104:953-957, 1995.

Voorhees JJ, and Duell EA: Psoriasis as a possible defect of the adenylyl cyclase-cyclic AMP cascade. *Arch Derm* 104:352-365, 1971.

Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, and Levine V: On the lack of response to catecholamine stimulation by the adenylyl cyclase system in psoriatic lesions. *Brit J Dermatol* 92:619.