

# 转录因子核因子E2相关因子2对长期中波紫外线照射诱导皮肤肿瘤的影响\*☆○

许雪珠<sup>1</sup>, 唐云<sup>1</sup>, 姜黎黎<sup>1</sup>, 李雪丽<sup>1</sup>, 杨红梅<sup>1</sup>, 川内康弘<sup>2</sup>○, 大塚藤男<sup>2</sup>○

## Effect of nuclear factor E2-related factor 2 on skin carcinoma induced by long-term midwave ultraviolet irradiation

Xu Xue-zhu<sup>1</sup>, Tang Yun<sup>1</sup>, Jiang Li-li<sup>1</sup>, Li Xue-li<sup>1</sup>, Yang Hong-mei<sup>1</sup>, Kawachi Yasuhiro<sup>2</sup>○, Otsuka Fjio<sup>2</sup>○

### 文章亮点:

核因子 E2 相关因子 2 是调节细胞内抗氧化应激反应的重要转录因子, 胞浆蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 为其特异性受体, 目前核因子 E2 相关因子 2-胞浆蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 抗氧化系统与皮肤紫外线损伤的关系受到密切关注。鉴于此, 实验运用核因子 E2 相关因子 2 基因缺陷小鼠建立皮肤肿瘤模型, 旨在研究核因子 E2 相关因子 2 对长期中波紫外线照射所致皮肤肿瘤的形成是否具有防护作用?

### Abstract

**BACKGROUND:** Ultraviolet irradiation is an important environmental factor causing skin tumor, which is associated with the induction of oxidative stress reaction. Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) is a major transcription factor to adjust cellular antioxidant responses and Kelch-like ECH-associated protein 1 is the specific receptor, and the relation of Nrf2-Kelch-like ECH-associated protein 1 antioxidant system and skin ultraviolet damage is close recently.

**OBJECTIVE:** To observe the DNA oxidative damage and photocarcinogenesis by ultraviolet irradiation on the skin of the mice, and to research the effect of Nrf2 transcription factor on skin carcinoma induced by long-term midwave ultraviolet irradiation.

**METHODS:** Female 8-week-old Nrf2 gene-deficient (Nrf2<sup>-/-</sup>) BALB/c mice and age-matched female wild-type (Nrf2<sup>+/+</sup>) BALB/c mice were selected, then the midwave ultraviolet irradiation of 100 mJ/cm<sup>2</sup> was given to the back of mice for 4 hours; ultraviolet irradiation of 300 mJ/cm<sup>2</sup> was given to the back of mice three times a week for 36 weeks

**RESULTS AND CONCLUSION:** The number of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine positive in Nrf2<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than that in Nrf2<sup>+/+</sup> mice ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between Nrf2<sup>-/-</sup> and Nrf2<sup>+/+</sup> mice in the mean number of tumors per animal and the incidence rate of tumors ( $P > 0.05$ ). The histopathology of skin tumors was similar in two groups. This result indicates that Nrf2 has antioxidant protective effect on acute ultraviolet irradiation-induced DNA oxidative damage, there may be various factors regulating the activity of Nrf2 transcription factor in chronic ultraviolet irradiation carcinogenic process, and it needs many further studies.

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of Dermatology, Department of Clinical Medicine of the University of Tsukuba, Tsukuba 305-8575, Japan

Xu Xue-zhu<sup>\*</sup>, Doctor, Associate professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Dermatology, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China xuxuezhuzhu@hotmail.com

Supported by: Technical Plan Project of Dalian, No.2008E13SF209\*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.33.016

Received: 2012-04-20  
 Accepted: 2012-06-16

Xu XZ, Tang Y, Jiang LL, Li XL, Yang HM, Kawachi Y, Otsuka F. Effect of nuclear factor E2-related factor 2 on skin carcinoma induced by long-term midwave ultraviolet irradiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(33): 6158-6163. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

### 摘要

**背景:** 紫外线照射是引起皮肤肿瘤的重要环境因素, 与其诱导氧化应激反应有关。核因子 E2 相关因子 2 是调节细胞内抗氧化应激反应的重要转录因子, 胞浆蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 为其特异性受体, 目前核因子 E2 相关因子 2-胞浆蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 抗氧化系统与皮肤紫外线损伤的关系受到密切关注。

**目的:** 观察中波紫外线照射所致皮肤 DNA 氧化损伤及光致癌作用, 研究转录因子核因子 E2 相关因子 2 对长期中波紫外线照射诱导小鼠皮肤肿瘤形成的影响。

**方法:** 取 8 周龄雌性核因子 E2 相关因子 2 基因敲除(Nrf2<sup>-/-</sup>) BALB/c 小鼠和野生型(Nrf2<sup>+/+</sup>)BALB/c 小鼠, 以 100 mJ/cm<sup>2</sup> 剂量的中波紫外线照射小鼠背部 4 h。另取 Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠和 Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠以 300 mJ/cm<sup>2</sup>剂量的中波紫外线对小鼠背部进行长期照射, 每周 3 次, 连续 36 周。

**结果与结论:** Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠表皮内 8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷阳性细胞数量显著高于 Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠( $P < 0.05$ ), Nrf2<sup>-/-</sup>和 Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠中波紫外线长期照射诱导皮肤肿瘤数目和发生率接近( $P > 0.05$ ), 且皮肤肿瘤组织病理学改变相似, 提示核因子 E2 相关因子 2 对急性中波紫外线照射所致的 DNA 损伤具有抗氧化防护作用, 在长期中波紫外线照射致癌过程中, 转录因子核因子 E2 相关因子 2 的活性可能受到多种因素的调节, 其具体机制有待于进一步研究。

**关键词:** 核因子 E2 相关因子 2; 紫外线; 氧化损伤; 皮肤肿瘤

**缩略语:** 核因子 E2 相关因子 2: nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2; 胞浆蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白: Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1; 8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG

许雪珠, 唐云, 姜黎黎, 李雪丽, 杨红梅, 川内康弘, 大塚藤男. 转录因子核因子 E2 相关因子 2 对长期中波紫外线照射诱导皮肤肿瘤的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(33): 6158-6163.  
[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

<sup>1</sup> 大连大学附属中山医院皮肤科, 辽宁省大连市 116001; <sup>2</sup> 筑波大学临床医学系皮肤科, 日本筑波市 305-8575

许雪珠☆, 博士, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事皮肤色素性疾病、皮肤肿瘤及皮肤外科治疗方面的研究。  
xuxuezh@hotmail.com

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344 (2012)33-06158-06

收稿日期: 2012-04-20  
修回日期: 2012-06-16  
(20120420002/NJ·C)

## 0 引言

紫外线是一种光致癌因子, 长期紫外线照射可导致皮肤细胞异常增生, 与人类皮肤癌的发生有着密切联系<sup>[1]</sup>。研究发现, 紫外线辐射所致的氧化应激是皮肤光老化、光致癌的重要机制。日光中的中波紫外线具有很强的细胞毒性和DNA突变效应<sup>[2]</sup>, 诱导皮肤细胞生成高浓度的活性氧簇, 可导致一系列急慢性皮肤损伤目前认为核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)能与胞浆蛋白Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)及抗氧化反应元件相互作用, 启动抗氧化酶和 II 相解毒酶的基因表达, 提高细胞抗氧化应激的能力, 维持体内氧化还原平衡<sup>[3]</sup>。作者在前期研究中发现, 转录因子Nrf2可提高皮肤细胞抗氧化能力, 参与抑制皮肤急性炎症, 防御中波紫外线所致的急性日晒伤反应。本实验旨在运用Nrf2基因敲除小鼠模型, 通过观察中波紫外线照射导致的DNA氧化损伤变化及光致癌作用, 研究Nrf2对长期中波紫外线照射诱导小鼠皮肤肿瘤的影响, 探讨Nrf2对中波紫外线照射所致的光致癌病变有无防护作用, 希望能为皮肤肿瘤的防治寻找新的理论依据和途径。

## 1 材料和方法

**设计:** 基因对比动物实验。

**时间及地点:** 于2010-10/2011-12在大连大学附属中山医院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 正常野生型(Nrf2<sup>+/+</sup>)及Nrf2基因敲除型(Nrf2<sup>-/-</sup>) BALB/c小鼠各16只, 雌性, 鼠龄8周, 20~25 g, 日本国立筑波大学人间综合科学研究所皮肤病研究室提供, 实验前观察1

周。

### 主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
兔抗小鼠 8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)单克隆抗体	德国 Millipore 公司
SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒	福州迈新生物技术开发有限公司
紫外线照射仪(中波紫外线发射光谱 260~320 nm, 峰值 311 nm)	上海希格玛高技术有限公司
数码相机	日本 Nikon 公司

### 方法:

**实验分组:** Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠分为100和300 mJ/cm<sup>2</sup>实验组, Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠亦分为100和300 mJ/cm<sup>2</sup>对照组, 每组各8只。

**紫外线照射:** 小鼠正式实验当天背部全部剃毛。每次照射前, 先调好高度并固定紫外灯, 用紫外线强度测定仪测量照射强度, 根据公式: 照射剂量(mJ/cm<sup>2</sup>)=照射强度(mW/cm<sup>2</sup>)×照射时间(s)确定好中波紫外线的照射剂量, 再用小鼠固定器固定好小鼠, 暴露背部剃毛区域。

**中波紫外线单次照射:** 取Nrf2<sup>-/-</sup>和Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠各8只以100 mJ/cm<sup>2</sup>剂量的中波紫外线照射小鼠背部1次。

**中波紫外线长期照射:** 取Nrf2<sup>-/-</sup>和Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠各8只以300 mJ/cm<sup>2</sup>剂量的中波紫外线照射小鼠背部, 每周3次, 连续36周。

**免疫组化检测中波紫外线照射后小鼠皮肤中 8-OHdG 的表达:** 将皮肤标本用体积分数10%的中性甲醛固定, 石蜡包埋切片, 切片常规脱蜡脱水后, PBS洗涤, 灭活内源性过氧化物酶并封闭非特异性抗原后, 滴加兔抗小鼠 8-OHdG 单克隆抗体(1:100)37 °C 孵育1 h后, PBS洗涤, 滴加生物素化山羊抗兔IgG, 37 °C 孵育30 min后以DAB显色, 苏木精复染、脱水、透

明、封固, 以PBS代替一抗作阴性对照。结果判定: 阳性表达为细胞核内有被染成棕褐色的颗粒, 每组抽取8张片, 每张切片计数5个连续高倍视野( $\times 400$ )中8-OHdG阳性细胞数, 计算平均值。

**皮肤肿瘤计数与组织病理学观察:** 长期中波紫外线照射实验过程中, 每天观察小鼠背部皮肤的变化, 记录直径 $\geq 2$  mm且持续2周不消退的新生物, 自照射出现第1个肿瘤至36周停止, 每周分别记录两组发生皮肤肿瘤小鼠数和肿瘤数目, 死亡小鼠不计入内, 并根据公式1和2分别计算不同时间段平均肿瘤数量(即每只小鼠发生的肿瘤数)及肿瘤发生率。36周实验结束后, 以脱颈椎法处死全部小鼠, 切取皮肤肿瘤组织, 常规甲醛固定, 石蜡包埋, 切片0.5 cm, 进行苏木精-伊红染色, 显微镜下观察皮肤肿瘤组织病理学改变。

$$\text{平均肿瘤数} = \frac{\text{累计肿瘤数目}}{\text{发生肿瘤小鼠数}} \quad \text{公式 1}$$

$$\text{肿瘤发生率} = \frac{\text{发生肿瘤小鼠数}}{\text{存活小鼠数}} \times 100\% \quad \text{公式 2}$$

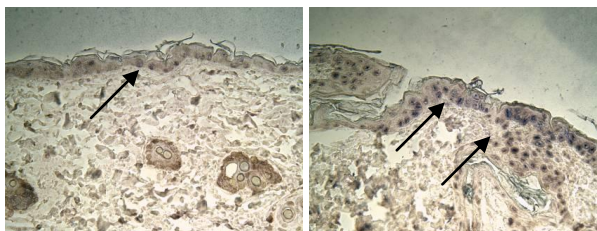
**主要观察指标:** 小鼠形成的平均皮肤肿瘤数量、肿瘤发生率及皮肤肿瘤组织病理学改变。

**统计学分析:** 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用云端软件平台SPSS 18.0软件包进行统计分析, 两组间比较选用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

2.1 实验动物数量分析 所有小鼠均进入结果分析。

2.2 Nrf2对中波紫外线照射诱导8-OHdG形成的影响 见图1。



Arrows show the 8-OHdG-positive cells; Nrf2<sup>+/+</sup>: Wild-type mice; Nrf2<sup>-/-</sup>: Nuclear factor E2-related factor 2 gene-deficient mice

Figure 1 Expression of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in mouse epidermis (Immunohistochemical staining,  $\times 400$ )

图1 小鼠表皮内8-OHdG的表达(免疫组化染色,  $\times 400$ )

免疫组化染色显示, 细胞核被染成棕褐色者即为8-OHdG阳性细胞。100 mJ/cm<sup>2</sup>剂量的中波紫外线照射4 h后, 8-OHdG在Nrf2<sup>+/+</sup>和Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠皮肤内都有表达, 见图1, 但表达强度有差异。

表1显示Nrf2因子对中波紫外线照射诱导8-OHdG产生的影响, 8-OHdG在Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠皮肤内呈高水平表达, 阳性细胞数显著高于Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠( $P < 0.05$ ), 表明转录因子Nrf2对急性中波紫外线照射引起皮肤中8-OHdG水平增高有明显抑制作用。

表1 两组小鼠皮肤内8-OHdG阳性细胞数  
Table 1 Number of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)-positive cells in the epidermis of mice in two groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=40$ ,  $n/400$ -fold field)

Group	8-OHdG-positive cells per view
Nrf2 <sup>+/+</sup>	16.5 $\pm$ 1.86
Nrf2 <sup>-/-</sup>	105.75 $\pm$ 2.75

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. Nrf2<sup>+/+</sup>; Nrf2<sup>+/+</sup>: Wild-type nuclear factor E2-related factor 2 gene-deficient mice; Nrf2<sup>-/-</sup>: Nuclear factor E2-related factor 2 gene-deficient mice

### 2.3 Nrf2对中波紫外线长期照射诱导皮肤癌的影响

2.3.1 小鼠皮肤肿瘤大体观察 随着中波紫外线照射累积量增加, 小鼠皮肤逐渐呈现光老化, 第4周小鼠皮肤增厚, 表面干燥, 弹性差, 第8周皮肤明显增厚粗糙。自中波紫外线照射16周起Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠先出现第1个肿瘤, 随后两组小鼠背部瘤体数目逐渐增多, 开始为针尖至粟粒大小丘疹, 随后可见结节、斑块或疣状损害, 部分迅速生长形成菜花样瘤体, 亦可见溃疡, 见图2。

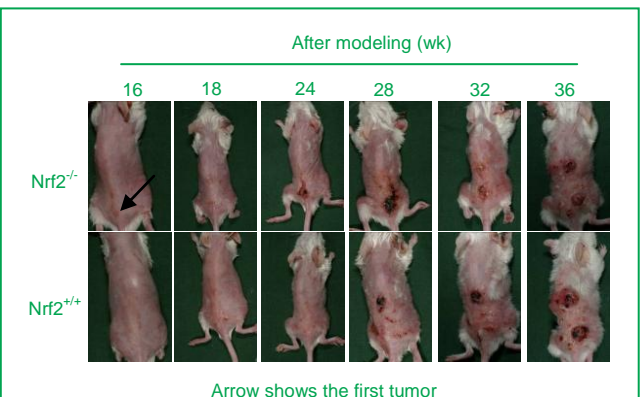


Figure 2 Skin tumors on nuclear factor E2-related factor 2 gene-deficient (Nrf2<sup>-/-</sup>) and wild-type (Nrf2<sup>+/+</sup>) mice back

图2 Nrf2<sup>-/-</sup>和Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠背部皮肤的肿瘤

2.3.2 Nrf2对中波紫外线照射诱导小鼠皮肤肿瘤数目和发生率的影响 从表2和图3a中可以看出, 2组小鼠生成肿瘤数都随着实验进程逐渐增多, 36周后Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠

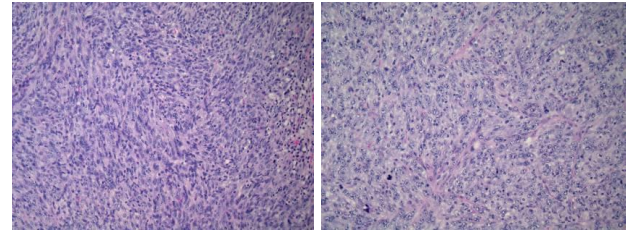
平均肿瘤数为14.5个/只,  $Nrf2^{+/+}$ 小鼠为16个/只, 两组小鼠肿瘤生成数量接近( $P > 0.05$ ); 从图3b可以看出,  $Nrf2^{+/+}$ 小鼠自17周起开始出现肿瘤, 肿瘤发生率12% (1/8), 在28周时发生率达100%(8/8);  $Nrf2^{-/-}$ 小鼠16周起开始出现肿瘤, 肿瘤发生率12%(1/8), 在29周时发生率达100% (7/7), 2组小鼠皮肤肿瘤发生率接近。

表 2 中波紫外线照射诱导两组小鼠皮肤肿瘤数量  
Table 2 The number of mice skin tumors induced by ultraviolet irradiation (n)

Time for ultraviolet irradiation (wk)	$Nrf2^{+/+}$		$Nrf2^{-/-}$	
	Total	Mean number per mouse	Total	Mean number per mouse
16	0	0	1	1
18	5	2.5	5	2.5
20	8	2.7	6	3
22	13	4.3	15	3.8
24	18	4.8	18	4.8
26	45	7.5	66	9.4
28	84	10	79	11.3
30	105	15	80	13.3
32	78	15.6	54	13.5
34	47	15.7	42	14
36	32	16	29	14.5

$Nrf2^{+/+}$ : Wild-type mice;  $Nrf2^{-/-}$ : Nuclear factor E2-related factor 2 gene-deficient mice

2.3.3 皮肤肿瘤病理形态 苏木精-伊红染色结果显示,  $Nrf2^{+/+}$ 和 $Nrf2^{-/-}$ 小鼠皮肤肿瘤组织病理学改变相似, 癌灶内皆含排列紊乱的纺锤形细胞, 层次不清, 细胞核大、深染, 可见多个有丝分裂象, 见图4。



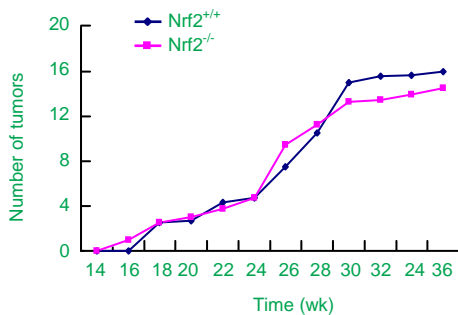
a:  $Nrf2^{+/+}$  mice

b:  $Nrf2^{-/-}$  mice

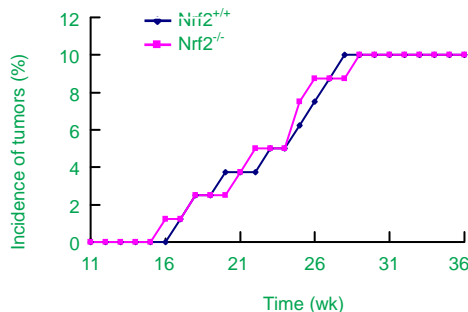
$Nrf2^{+/+}$ : Wild-type mice;  $Nrf2^{-/-}$ : Nuclear factor E2-related factor 2 gene-deficient mice

Figure 4 Histopathology of mouse skin tumors (Hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )

图 4 小鼠皮肤肿瘤组织病理 (苏木精-伊红染色,  $\times 200$ )



a: Number of tumors



b: Incidence of tumors

$Nrf2^{+/+}$ : Wild-type mice;  $Nrf2^{-/-}$ : Nuclear factor E2-related factor 2 gene-deficient mice

Figure 3 Effect of nuclear factor E2-related factor 2 on the number and incidence of mouse skin tumors induced by ultraviolet irradiation

图 3  $Nrf2$  对中波紫外线照射诱导小鼠皮肤肿瘤数目和肿瘤发生率的影响

### 3 讨论

皮肤肿瘤是人类最常见的恶性肿瘤之一, 近年来由于环境污染问题, 大气层中的臭氧逐渐减少, 其发病率在全球范围内逐年上升。引起皮肤肿瘤的原因复杂, 但长期紫外线照射是目前比较明确的致病因素, 而中波紫外线是紫外线照射致癌作用最强的因素。紫外线照射引起的许多皮肤光损伤反应与产生过量的活性氧有关, Halliday<sup>[4]</sup>研究表明紫外线辐射介导的氧化应激反应使皮肤细胞中自由基产生增多, 其引起的炎症、基因突变以及光免疫抑制是促发光致癌的原因之一。

皮肤可通过大量的酶类和非酶类抗氧化物质对抗紫外线辐射导致的有害影响, 如非酶类抗氧化物多酚类和维生素E<sup>[5-6]</sup>, 局部应用或饮食摄取, 表现出对抗皮肤光氧化损伤的保护作用。抗氧化剂能阻止紫外线诱导皮肤急慢性病变发生并降低其反应严重性。 $Nrf2$ -Keap1系统是近年来新发现的机体抵抗内外环境氧化刺激的重要防护性传导通路, 对维持细胞氧化还原状态和防御氧化损伤有重要作用。 $Nrf2$ -Keap1系统是皮肤重要的内源性抗氧化应激反应途径, 细胞内低水平谷胱甘肽能导致皮肤对紫外线辐射敏感性的提高<sup>[7]</sup>。有研究表明,  $Nrf2$ 是皮肤抗紫外线辐射损伤的重要调节因子, 可诱导谷胱甘肽过氧化物酶表达, 有效清除活性氧, 防御紫外线辐射导致的皮肤损害<sup>[8-9]</sup>。与作者前期的研究结果类似,  $Nrf2$ 因子可提高皮肤细胞抗氧化能力, 参与抑制皮肤急性反应, 对抗中波紫外线所致的急性日晒伤反应。因此,

本实验在前期工作基础上, 运用Nrf2基因敲除小鼠模型, 观察转录因子Nrf2对长期中波紫外线照射诱导小鼠皮肤肿瘤的影响, 拟探讨Nrf2因子在长期紫外线暴露光致癌过程中的作用。

Nrf2基因敲除小鼠的基础及诱导性抗氧化基因表达明显降低, 而氧化应激损伤明显增强, 提示Nrf2信号通路是调节细胞内氧化还原状态的关键。8-OHdG是氧自由基作用于DNA的碱基氧化产物, 是评估活性氧引起DNA氧化损伤的敏感标记物<sup>[10]</sup>。本实验免疫组化染色结果显示, 100 mJ/cm<sup>2</sup>剂量中波紫外线照射4 h后8-OHdG在Nrf2<sup>+/+</sup>和Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠表皮内都存在, 但Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠表皮内8-OHdG阳性细胞数显著高于Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠( $P < 0.05$ )。该结果表明转录因子Nrf2可明显抑制8-OHdG水平增高, 减轻急性中波紫外线照射引起的DNA氧化损伤, 提示Nrf2-Keap1系统的激活对抵抗紫外线致皮肤氧化损伤有一定的保护作用。DNA链中8-OHdG的存在, 可以引起DNA复制时碱基的错误配对及编码, 导致细胞发生癌变而可能引起肿瘤的发生<sup>[11]</sup>。研究发现, 肿瘤患者靶组织8-OHdG含量常高于非肿瘤组织, 说明8-OHdG与细胞癌变有密切关系, 8-OHdG水平增高亦被报道与紫外线光致癌效应有关<sup>[12-13]</sup>。Nrf2缺失或激活障碍, 细胞内II相解毒酶和内源性抗氧化剂的水平下降, 会引起细胞对应激源的敏感性增加, 与细胞凋亡、炎症修复进程延长、化学促癌的发生等病变过程密切相关<sup>[14]</sup>。本次实验结果表明Nrf2因子可明显减少中波紫外线照射引起的8-OHdG的生成, 推测Nrf2可能对紫外线诱导的皮肤肿瘤形成具有一定的拮抗作用, 故Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠有可能因为体内Nrf2因子表达缺失对中波紫外线照射诱导皮肤癌的敏感性增加。

本实验模拟阳光中致癌作用最强的中波紫外线作为光源, 对小鼠背部剃毛区皮肤进行长期照射, 诱导建立小鼠皮肤肿瘤模型。Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠在中波紫外线照射16周时开始出现第1个肿瘤, 29周时肿瘤发生率达100%; 而Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠在17周时开始出现肿瘤, 28周时肿瘤发生率达100%; 至36周照射停止, Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠形成肿瘤数为14.5个, Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠为16个, Nrf2<sup>-/-</sup>和Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠在肿瘤形成数量及发生率方面接近( $P > 0.05$ ), 且两组小鼠皮肤肿瘤组织病理学改变亦相似。Leung等<sup>[15]</sup>和Hirota等<sup>[16]</sup>研究发现Nrf2-Keap1途径激活可通过调节细胞内氧化平衡降低细胞对凋亡信号的敏感性, 而Nrf2因子缺失或激活障碍能提高活性氧诱导细胞凋亡的敏感性。凋亡细胞的形成是防止上皮细胞恶变的防御机制。但有研究发现Nrf2对肿瘤细胞也有保护作用, 提高

Nrf2活性有助于肿瘤细胞抵抗活性氧诱导凋亡, 导致肿瘤进一步发展<sup>[17-18]</sup>。Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠由于Nrf2基因敲除, 经中波紫外线照射后皮肤细胞内8-OHdG的生成水平明显增高可能促进皮肤肿瘤的发生, 但同时Nrf2因子表达缺失亦能增加细胞凋亡的易感性可能会阻止癌变, 故在Nrf2<sup>+/+</sup>和Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠中中波紫外线诱导皮肤癌形成无明显差异性可能是由于上述两种因素的相互作用所致。

有研究证实Nrf2是化学致癌作用的重要保护因子, 某些天然化合物如莱菔硫烷、姜黄素、表儿茶素酸酯等强Nrf2诱导剂, 能通过激活Nrf2-Keap1信号通路, 诱导II相代谢酶基因表达进而发挥化学防癌作用<sup>[19]</sup>。在暴露于亚硝胺致癌物时, 与野生型小鼠比较, Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠膀胱癌的发生率显著增加<sup>[20]</sup>。这与本次实验结果存在很大差异, 可能是由于紫外线光致癌和化学致癌的作用机制不同, 紫外线暴露诱导细胞凋亡作用比化学致癌物明显。故Nrf2因子缺乏所引起的促进细胞凋亡作用可拮抗其促进肿瘤作用, 这种表现在光致癌中比化学致癌更明显。

不同剂量中波紫外线辐射角质形成细胞后, 均有p53的显著表达, p53信号传导通路参与DNA损伤修复、细胞周期调控及细胞凋亡等关键性的细胞生命进程<sup>[21]</sup>。Faraonio等<sup>[22]</sup>研究表明紫外线辐射引起细胞氧化压力增大时, P53蛋白显著表达, 可抑制依赖于Nrf2因子的抗氧化酶的转录活化, 促进细胞发生凋亡。Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠可能由于长期暴露于中波紫外线照射, p53表达增加, 导致细胞内抗氧化酶水平表达低下, 导致氧化损伤的蓄积及对中波紫外线致癌的敏感性增加, 这也可能是中波紫外线照射诱导Nrf2<sup>+/+</sup>和Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠发生皮肤癌无差异的原因之一。

不同剂量的紫外线或氧化剂在调节转录因子Nrf2中的作用不同甚至相反。Nrf2在调节内源性抗氧化剂和II相解毒酶表达中具有重要作用, Nrf2激活剂能激活Nrf2依赖的基因表达, 在应激条件下对皮肤起到保护作用。有研究发现, 绿花椰菜籽提取物包含莱菔硫烷等Nrf2激活剂, 其能提高II相解毒酶和谷胱甘肽水平及防御氧化损伤, 在表皮局部应用可保护小鼠抵抗紫外线诱导的皮肤致癌作用<sup>[23]</sup>。考虑紫外线光致癌的形成是一个长期的致病过程, 本实验中Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠接受长期中波紫外线照射刺激又没有及时有效的干预, 则可能慢慢的消耗掉Nrf2蛋白, 使机体的抗氧化能力降低, 促使皮肤癌的发生。

综上所述, 本实验中单次中波紫外线照射使Nrf2<sup>+/+</sup>和Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠处于一个急性应激刺激状态, 结果表明

Nrf2因子的表达起到保护性抗氧化效应。在慢性中波紫外线照射致癌过程中, 转录因子Nrf2的活性可能受到多种因素的调节, 其具体机制有待进一步研究。

**致谢:** 感谢日本国立筑波大学人间综合科学研究科皮肤病研究室为此研究提供的大力支持。

#### 4 参考文献

- [1] MacKie RM. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1):92-96.
- [2] Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, et al. UV-induced skin damage. *Toxicology.* 2003;189(1-2):21-39.
- [3] Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;244(1):57-65.
- [4] Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res.* 2005;571(1-2):107-120.
- [5] Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis.* 2003;24(5):927-936.
- [6] Packer L, Valacchi G. Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2002;15(5):282-290.
- [7] Tyrrell RM, Pidoux M. Correlation between endogenous glutathione content and sensitivity of cultured human skin cells to radiation at defined wavelengths in the solar ultraviolet range. *Photochem Photobiol.* 1988;47(3):405-412.
- [8] Schäfer M, Dütsch S, auf dem Keller U, et al. Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev.* 2010;24(10):1045-1058.
- [9] Tian FF, Zhang FF, Lai XD, et al. Nrf2-mediated protection against UVA radiation in human skin keratinocytes. *Biosci Trends.* 2011;5(1):23-29.
- [10] Mukherjee B, Das T, Ghosh S, et al. Changes in the antioxidant defense and hepatic drug metabolizing enzyme and isoenzyme levels, 8-hydroxydeoxyguanosine formation and expressions of c-raf.1 and insulin-like growth factor II genes during the stages of development of hepatocellular carcinoma in rats. *Eur J Cancer Prev.* 2007;16(4):363-371.
- [11] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-139.
- [12] Nishigori C, Hattori Y, Toyokuni S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(3):561-570.
- [13] Kunisada M, Sakumi K, Tominaga Y, et al. 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005;65(14):6006-6010.
- [14] Kobayashi A, Ohta T, Yamamoto M. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. *Methods Enzymol.* 2004;378:273-286.
- [15] Leung L, Kwong M, Hou S, et al. Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. *J Biol Chem.* 2003;278(48):48021-48029.
- [16] Hirota A, Kawachi Y, Itoh K, et al. Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2005;124(4):825-832.
- [17] Hayes JD, McMahon M. The double-edged sword of Nrf2: subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer. *Mol Cell.* 2006;21(6):732-734.
- [18] Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell.* 2006;21(5):689-700.
- [19] Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer.* 2010;62(7):919-930.
- [20] Iida K, Itoh K, Kumagai Y, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(18):6424-6431.
- [21] Wang P, Bi ZG, Jin SQ, et al. *Zhonghua Pifu Ke Zazhi.* 2006;39(2):83-85.  
王平, 毕志刚, 金淑贤, 等. 中波紫外线辐射损伤角质形成细胞的 p53 信号传导通路研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2006, 39(2):83-85.
- [22] Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, et al. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem.* 2006;281(52):39776-39784.
- [23] Talalay P, Fahey JW, Healy ZR, et al. Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(44):17500-17505.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 大连市科技计划项目(2008E13SF209)。

**作者贡献:** 实验设计由第一作者完成, 第二、四作者进行实施, 第三、五作者进行评估。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中没有与相关动物伦理道德冲突的内容。

**本文创新性:** 关于转录因子核因子 E2 相关因子 2 与紫外线反复照射诱导皮肤癌的研究尚未见报道, 本实验为前瞻性研究, 运用核因子 E2 相关因子 2 基因缺陷小鼠, 建立小鼠皮肤肿瘤模型, 研究核因子 E2 相关因子 2 对长期中波紫外线照射诱导小鼠皮肤肿瘤形成的影响, 探讨核因子 E2 相关因子 2 在紫外线光致癌病中的作用, 为皮肤肿瘤的防治寻找新的理论依据和途径, 此点具有创新性。