

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

果酸與紫外線 B 對人類皮膚角質細胞凋亡相互影響之作用 機轉 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2314-B-040-006-
執行期間：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：楊仁宏
共同主持人：陳健尉
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：賴婉文
臨時工：蕭玉屏、張慧敏、楊連泉、黃芯蘭、江怡馨

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 16 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

果酸與紫外線B對人類皮膚角質細胞凋亡相互影響 之作用機轉 研究成果報告 (精簡版)

計畫類別： 個別型

計畫編號： NSC 95-2314-B-040-006-

執行期間： 95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

執行單位： 中山醫學大學醫學系

計畫主持人： 楊仁宏教授

共同主持人： 陳健尉教授

協同研究人員： 魏耀揮教授、鍾景光教授

計畫參與人員： 碩士班研究生-兼任助理： 賴婉文

臨時工： 黃芯蘭、蕭玉屏、張慧敏、楊連泉、江怡馨

處理方式： 本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 31 日

中文摘要

近年來甘醇酸 (glycolic acid) 被廣泛應用於化妝品與皮膚淺層換膚之臨床治療，而臨床上陽光曝曬常會加重皮膚的光敏感性。但是目前有關甘醇酸引起光敏感性的研究仍然不足。我們先前的研究證實了甘醇酸與乳酸均可引發人類皮膚角質細胞 (HaCaT cells) 的凋亡作用，也發現此凋亡作用的機轉是經由粒線體途徑而誘導。

材料及方法：本研究選擇人類皮膚角質細胞 HaCaT，並分別進行甘醇酸(GA)、紫外線 B 光 (UVB)、以及 UVB 加上甘醇酸的試驗，以研究 GA 與 UVB 對人類皮膚細胞凋亡相互之影響。我們使用顯微鏡觀察細胞型態的改變、運用流式細胞儀技術來偵測細胞存活率，細胞週期以及粒線體膜電位變化、利用 DAPI 染色和彗星試驗偵測細胞受損的情形、以凝膠電泳分析 DNA 斷裂情形、以西方墨點法偵測細胞凋亡相關的蛋白質如: Bax, Bak, Bcl-2、P53, P21、及凋亡相關的蛋白水解酵素 caspases 3, 8, 9, 12, EndoG 等的活性，並測定細胞內 ROS 和 Ca^{2+} 的離子濃度的變化；我們也運用微陣分析技術 (microarray) 找尋與細胞凋亡相關的基因。

研究結果： (1) 抑制細胞增生的作用：無論是 GA 或是 UVB 本身均可以抑制 HaCaT 細胞增生，並呈現劑量-依賴性 (dose-dependent effects)，然而 UVB 的前處理可以明顯加強甘醇酸抑制 HaCaT 細胞增生的能力。(2) 促進細胞週期停滯：DNA 細胞週期分析顯示甘醇酸並沒有引起細胞週期停滯的現象，UVB 可以使細胞週期停滯在 G2-M 期，然而 UVB+GA 的處理，細胞週期會改變為停滯在 S 期，且調控細胞週期 S 期相關的蛋白質如 Cdc25A, cyclin A, 及 cyclin E，會隨著 UVB 劑量增加而下降。(3) 引發細胞凋亡：GA、UVB、UVB + GA 處理的 HaCaT 細胞均會引發細胞凋亡，且均無劑量-依賴性 (dose-dependent effect)，也未發現 UVB+GA 會產生細胞凋亡的加成性作用 (synergistic effect)。此外，發現 UVB+GA 處理的細胞，其產生細胞凋亡是經由多重途徑，包括 caspase-dependent 以及 caspase-independent 路徑，因為 caspases 3, 8, 9, 12 與 EndoG 等蛋白均有明顯上升的現象，但是 Fas 並未明顯改變，顯示 UVB+GA 處理的 HaCaT 細胞凋亡的發生與

內質網、粒線體路徑有較密切的關係，與 **Fas-ligand** 路徑則有待進一步釐清。

結論：我們發現 **GA** 本身並不引起細胞週期停滯，但是可以引發細胞凋亡；**UVB** 本身就會引起細胞週期停滯及細胞凋亡，並呈現劑量-依賴性的模式；但是 **UVB** 合併加上甘醇酸處理 **HaCaT** 細胞時，則產生明顯的 **S** 期細胞週期停滯，不同於單純的 **UVB** 引發 **G2-M** 期細胞週期遲滯。此外，研究顯示 **UVB** 加上甘醇酸引發 **HaCaT** 細胞凋亡的機轉，乃是經由 **caspase-dependent** 及 **caspase-independent** 等多種路徑，細胞凋亡的機轉與內質網、粒線體有較密切的關係。我們建立一甘醇酸與 **UVB** 對於 **HaCaT** 細胞的實驗模型，以增進甘醇酸對人類皮膚角質細胞光敏感作用機轉的進一步瞭解。

關鍵字：果酸、甘醇酸、紫外線**B**光、**HaCaT**細胞株、細胞週期、細胞凋亡、**Caspase**、粒線體、內質網。

Abstract

Glycolic acid (GA) has been widely used in cosmetic agents and superficial chemical peeling in recent years. Clinically, sunlight exposure would enhance the photosensitivity of skin. However, investigation for the pathogenesis of photosensitivity of glycolic acid is limited. We demonstrated that glycolic acid and lactic acid could induce apoptosis on human keratinocyte cell line (HaCaT) (data not published), and the mechanism of apoptosis is through mitochondrial pathway.

Materials and methods: In our study, we used human keratinocyte cell line (HaCaT) as the cell model to investigate the effects of UVB co-treated with GA on human keratinocyte. We used phase microscope to observe morphological changes of the cells, and used flow cytometry to detect cell viability, cell cycle, and mitochondrial membrane potential. DAPI stain and comet assay were used to detect cell damage, agarose gel electrophoresis to investigate DNA damage, western blot to detect the activities of apoptosis-related protein such as Bax, Bak, Bcl-2, p53, p21 and the activities of caspase 3, 8, 9, 12, and EndoG. We detected intracytoplasmic reactive oxygen species (ROS) and calcium level change; we also used microarray analysis to evaluate the genes responsible for the apoptotic effects.

Results: (1) Inhibition of cell proliferation: both glycolic acid and UVB could inhibit cells proliferation in a dose-dependent manner. However, glycolic acid caused a significant enhancement in the antiproliferative response of UVB on HaCaT cells. (2) Induction of cell cycle arrest: DNA cell cycle analysis revealed that GA didn't induce cell cycle arrest. UVB induced HaCaT cells accumulated at G2-M phase, but co-treatment of UVB+GA induced cell shift at S phase, and the modulator proteins of S phase such as Cdc25A, cyclin A and cyclin E were decreasing while increasing doses of UVB irradiation. (3) Induction of apoptosis: all of the treatment of GA, UVB, or UVB+GA on HaCaT cells could induce apoptosis in a dose-independent manner, and no synergistic effect of apoptosis by co-treatment of UVB+GA. However, we suggested that co-treatment of UVB + GA

induced apoptosis are via multiple pathways including caspase-dependent and caspase-independent pathways. The increase of caspase 3, 8, 9, 12, and EndoG, and no significant change of fas, indicated that the mechanism of co-treatment of UVB+GA induced apoptosis on HaCaT cells may via endoplasmic reticulum and mitochondrium pathway. Further studies are needed to clarify the cell signaling of fas-ligand pathway.

In conclusion, we demonstrated that GA could incused apoptosis but had no effect on cell cycle in HaCaT cells; UVB would induce cell cycle arrest and apoptosis in a dose-dependent manner. Co-treatment of UVB + GA on HaCaT cells, the cell cycle was arrest at S phase, in contrast to the G2-M arrest by UVB treatment alone. The mechanisms of apoptosis induced by co-treatment of UVB+GA are via multiple pathways, including caspase-dependent and caspase-independent pathways. We establish a model to investigate the effects of GA and UVB on HaCaT cells. Our investigations are beneficial to a better understanding of the mechanism of the photo-sensitivity of UVB and GA on human keratinocytes.

Key words: Glycolic acid, Alpha-hydroxyacids (AHAs), Ultraviolet B (UVB), HaCaT cell, Cell cycle, Apoptosis, Caspase, Mitochondrium, Endoplasmic reticulum

前言

甘醇酸(glycolic acids, GA)是大眾熟知並且廣泛應用於化妝品與皮膚淺層換膚之臨床治療。但是目前有關甘醇酸光敏感性或光毒性的研究仍然不足。我們先前的研究證實了甘醇酸與乳酸均可引發人類皮膚角質細胞 (HaCaT cells)的凋亡作用，也發現此凋亡作用的機轉是經由粒線體途徑而誘導。其他相關研究如 Perricone (1996)報告外敷甘醇酸對紫外線 (UVB) 照射的皮膚具有光保護、抗發炎與抗氧化的效果，但 Kaidbey (2003)則發表甘醇酸會增加皮膚對 UVB 的刺激性與光敏感作用，此種相互矛盾的情形亟待進一步的研究加以釐清。目前對於研究甘醇酸對人類角質細胞相關的細胞毒性報告仍舊很缺乏，在 2001 年 Hong 等人發現甘醇酸可以抑制由 UV 在 SKH-1 hairless mouse 上所引起的皮膚癌的發展；而 2002 年韓國學者 Ahn 等人研究指出，甘醇酸 (glycolic acid) 可以抑制由 UVB 在角質細胞上所引起 c-fos , AP-1, 及 p53-p21 的表現。另外甘醇酸在抗腫瘤方面，有研究也指出其對血癌細胞 HL-60 有抑制生長作用並使細胞週期停滯在 G₂/M phase (Yang *et al.*, 2004)。而紫外線是造成皮膚光老化重要的因子，以紫外線照射皮膚角質細胞可以造成細胞的氧化性傷害和引發細胞凋亡作用。本研究目的在探討在臨床上常使用的甘醇酸對人類角質細胞 (HaCaT cell) 是否有產生細胞毒殺等影響生長的作用，進而去一連串探討甘醇酸與 UVB 對人類皮膚角質細胞是否有經由誘導細胞凋亡的路徑以及探討細胞週期的調控。

材料及方法

本實驗以人類皮膚角質細胞 (HaCaT cell) 作為本研究的細胞株，HaCaT cells 來自人類皮膚表皮層的角質細胞，其具有無限生長 (immortalization) 的功能，能長期增殖而便於可以長期繼代。HaCaT 細胞源自於 Dr. Norbert E. Fusenig (Institute of Biochemistry, German Cancer Research Center)，其適合培養在培養液含 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 0.1 L-glutamine, 25mM HEPES, 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA)在

5%二氧化碳 37°C 潮濕的培養箱中。

甘醇酸 (Glycolic acid) 是由 sigma chemical co. (St. Louis, Missouri, USA) 訂購；UVB 照光儀機器型號為 Westinghouse FS-40，包括有 7 個燈管，波長為 290 – 320 nm，以 38 cm 的距離經 UVB photometer (IL 1350 photometer, International Light, MA) 校正，其能量的輸出為 0.07 mW/cm²。

我們培養 HaCaT 細胞，分成三大組進行實驗：(1) 甘醇酸、(2) UVB 光、以及 (3) UVB 加上甘醇酸作用 HaCaT 細胞的試驗。在第一組中，我們在 12 well 的培養盤中分別種 2X10⁵ 的 HaCaT 細胞，培養 24 小時後，我們以 PBS 潤洗細胞，換上 DMEM 培養液，加入不同濃度的甘醇酸 (最終濃度分別為 0, 5, 10, 15, 20, 25mM) 來處理 HaCaT 細胞，作用的時間分別 24 小時及 48 小時，之後我們收集 HaCaT 細胞以進行接下來的實驗；在第二組中，我們在 12 well 的培養盤中分別種 2X10⁵ 的 HaCaT 細胞，培養 24 小時後，我們以 PBS 潤洗細胞，然後移除 PBS，以不同劑量 UVB (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) 照射 HaCaT 細胞，之後加回 DMEM 培養液，培養 24 小時後，收集細胞進行接下來的實驗；在第三組中，我們一樣在 12 well 的培養盤中分別種了 2X10⁵ 的 HaCaT 細胞，培養 24 小時後，我們以 PBS 潤洗細胞，然後移除 PBS，以不同劑量 UVB (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) 照射 HaCaT 細胞，之後加入 DMEM 培養液，並馬上加入甘醇酸 (最終濃度分別為 20mM)，培養 24 小時後，收集細胞進行實驗。我們以倒立式位相顯微鏡觀察細胞型態的改變、利用 DAPI 染色與彗星試驗偵測細胞受損情形，以凝膠電泳偵測是否出現 DNA ladder，並運用流式細胞儀技術 (flow cytometry) 探討甘醇酸對細胞週期和細胞凋亡的作用，並進一步以西方墨點法偵測細胞凋亡相關的蛋白質包括: Bax, Bak, Bcl-2、P53, P21、及凋亡相關的蛋白水解酵素 caspases 3, 8, 9, 12, EndoG 等的活性，並測定細胞內 ROS 和 Ca²⁺ 的離子濃度的變化；我們也運用微矩陣分析技術 (microarray) 找尋與細胞凋亡相關的基因，以深入探討其分子機轉。

實驗結果與討論

實驗結果指出，當我們給予 HaCaT 細胞不同濃度的甘醇酸 (0, 5, 10, 15, 20, 25mM)，細胞存活率下降並有呈劑量-依賴性 (dose-dependent) 的模式 (Fig 1a)。單獨給予不同劑量(0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) UVB 處理 HaCaT 細胞時，細胞存活率也下降並呈現劑量-依賴性的模式 (Fig 1b)。然而，經由不同劑量 (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) UVB 照射並且合併甘醇酸 (20mM) 處理的 HaCaT 細胞，在 UVB 劑量由 0 mj/cm² 增加到 400 mj/cm² 時，明顯觀察到其存活率下降的地更厲害，然而在 UVB 劑量為 500 mj/cm² 時，細胞存活率有稍微上升的情形 (Fig 1c)。

由流式細胞儀偵測 DNA 細胞週期發現，在第一組中，HaCaT 細胞分別給予不同濃度的甘醇酸(0, 5, 10, 15, 20, 25mM)作用 24 小時，並沒有觀察到細胞週期停滯的現象 (Fig 2a)。在第二組中，以不同劑量 (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) UVB 照射 HaCaT 細胞時，發現隨著照射 UVB 的劑量上升，細胞週期會遲滯在 G2-M 期，而且細胞凋亡的比例也會上升 (Fig 2b)。然而在第三組，經由 UVB 照射並且合併甘醇酸處理的 HaCaT 細胞中，發現細胞週期改變，結果顯示 G2-M 期下降，而 S 期上升，細胞週期停滯在 S 期 (Fig 2c)，而且在第三組中，調控細胞週期 S 期相關的蛋白質如 Cdc25A, cyclin A, 及 cyclin E, 隨著 UVB 劑量增加而下降 (Fig 3)，由此證實第三組，經由 UVB 照射並且合併甘醇酸處理的 HaCaT 細胞，細胞週期改變停滯在 S 期。

此外，我們發現在經由 UVB 照射的 HaCaT 細胞之中，隨著不同劑量 (200, 300, 400, 500 mj/cm²) 的 UVB 照射，P21 蛋白表現呈大幅減少 (Fig 4)，這與其他文獻發現的結果不同，Nades(1998)等人的研究 UVB 會使 HaCaT 細胞的 P21 蛋白表現量增加，Ahn 等人(2002)也觀察到經過 UVB 照射的 HaCaT 細胞，其 p21 的 mRNA 表現量反而增加，因此這個 P21 蛋白表現大幅減少的現象值得吾人繼續探討。

至於西方墨點法探討引起細胞凋亡的機轉，在不同劑量 (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) UVB 照射 HaCaT 細胞時，發現隨著照射 UVB 的劑量上升，內質網路徑的相關蛋白 caspase 12 表現增加，Fas-ligand 路徑的相關蛋白 caspase 8 表現也增加，

而粒線體路徑的相關蛋白 caspase 9 與 EndoG 的表現也呈增加的趨勢，顯示 UVB 照射可以引起 HaCaT 細胞產生細胞凋亡，而發生可經由多重途徑，包括 caspase-dependent 以及 caspase-independent 路徑 (Fig 4)。經由不同劑量 (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) UVB 照射並且合併甘醇酸 (20mM) 處理的 HaCaT 細胞中，發現隨著照射 UVB 的劑量上升，內質網路徑的相關蛋白 caspase 12 表現量在高劑量 UVB 照射時有增加的情形，Fas-ligand 路徑的相關蛋白 procaspase 3 和 procaspase 9 表現量下降，caspase 9 表現量上升，而 procaspase 8 及 caspase 8 沒有明顯差異，粒線體路徑相關的蛋白表現如 EndoG 表現也呈現增加的趨勢，顯示 UVB 照射合併加上可以引起 HaCaT 細胞產生細胞凋亡，而發生是經由多重途徑 (Fig 5)。但是在本實驗中，Bax 及 Bcl-2 的表現反而並未有明顯的改變，是否顯示 UVB 或 UVB 合併加上甘醇酸會引起 HaCaT cells 細胞凋亡，尚有其他因素的影響，也待進一步的探討，由於 microarray 的實驗仍在進行分析，或許可從中得到一些解答。

綜合上述的研究發現，甘醇酸本身不能引起細胞週期停滯，但是可以引起細胞凋亡；UVB 本身就會引起細胞週期停滯及細胞凋亡，並呈現劑量-依賴性的模式；但是 UVB 合併加上甘醇酸處理 HaCaT 細胞時，則產生明顯的 S 期細胞週期停滯，不同於單純的 UVB 引發 G2-M 期細胞週期遲滯。單獨 UVB 引起 G2-M 細胞週期遲滯，但 UVB 加上甘醇酸則誘導產生 S 期細胞週期停滯，至於什麼機轉造成的細胞週期的改變，目前並不清楚也有待進一步研究探討。此外，UVB 加上甘醇酸所引發細胞凋亡的發生機轉，研究顯示是經由多重 caspase-dependent 以及 caspase-independent 路徑，尤其與內質網與粒線體路徑有較密切的關係 (Fig.6)。

計畫成果自評

我們的研究顯示，甘醇酸僅有誘導細胞凋亡但並不引起細胞週期停滯，甘醇酸處理可以使 UVB 照射的 HaCaT 細胞細胞週期改變停滯在 S 期並加強 UV 抑制細胞增生的能力。雖是 *in vitro* 之研究，但值得提醒臨床醫師與一般大眾在使用含有甘醇酸等產品時，更須審慎以對，留意光敏感的作用。

預估本研究內容與原計畫相符程度與預期目標情況約為 70%，目前現將研究成果整理中，擬發表論文於國際學術期刊。

參考文獻

Ahn KS, Park KS, Jung KM, et al., 2002. Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet B-induced c-fos expression, AP-1 activation and p53-p21 response in a human keratinocyte cell line. *Cancer Lett.* 186: 125-35.

Brent J, 2001. Current management of ethylene glycol poisoning. *Drugs.* 61: 979-988.

Brody H, Coleman WP, Piacquadi D, et al., 1996. Round table discussion of alpha hydroxyl acids. *Dermatol. Surg.* 22: 475-477.

Hong JT, Kim EJ, Ahn KS, et al., 2001. Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet-induced skin tumorigenesis in SKH-1 hairless mice and its mechanism of action. *Mol. Carcinog.* 31: 152-160.

Kaidbey K, Sutherland B, Wamer WG, et al., 2003. Topical glycolic acid enhances photodamage by ultraviolet light. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 19: 21-7.

Neades RL, Pelling CJO, 1998. S-phase arrest in mouse keratinocytes exposed to multiple doses of ultraviolet B/A radiation, *Mol. Carcinog.* 23: 159-167.

Perricone NV, DiNardo JC, 1996. Photoprotective and antiinflammatory effects of topical glycolic acid. *Dermatol. Surg.* 22, 435-437.

Yang JH, Chou CC, Cheng YW, Sheen LY et al., 2004. Effects of glycolic acid on the induction of apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia cell line HL-60. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1777-1784.

黃芯蘭(指導教授：楊仁宏)。探討乳酸對人類皮膚角質細胞株(HaCaT)誘發細胞凋亡及細胞週期停滯的影響。中山醫學大學醫學研究所碩士論文，2006。

Legends to Figures

Fig.1(a) GA

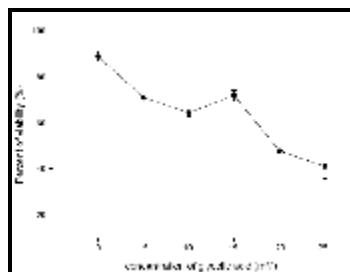


Fig.1(b) UVB

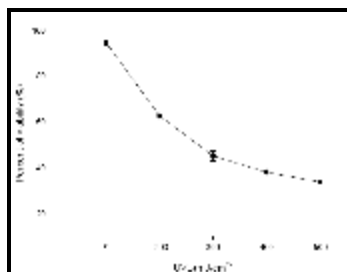


Fig.1(c) UVB+GA

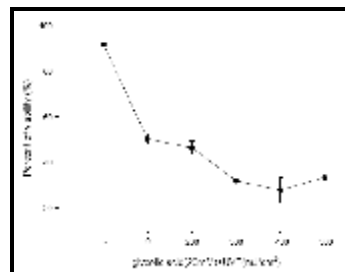


Fig. 1 The cell viabilities of HaCaT cells treated with glycolic acid, UVB irradiation, and co-treatment with UVB and GA.

- HaCaT cells were incubated with varying concentrations of glycolic acid (0, 5, 10, 15, 20, and 25 mM) for 24 hours, and the viability of HaCaT cells revealed a dose-dependent manner (90, 75, 65, 76, 43, and 40%, respectively).
- HaCaT cells exposed with different doses of UVB (0, 200, 300, 400, and 500 mj/cm²) for 24 hours, and the viability of HaCaT cells revealed a dose-dependent manner (93, 62, 45, 40, and 37%, respectively).
- The viability of HaCaT cells which were treated with different doses of UVB (0, 200, 300, 400, and 500 mj/cm²), and a fixed concentration of glycolic acid (20 mM). The viability decreased more prominently than the cells UVB-treated alone.

Fig.2(a) GA

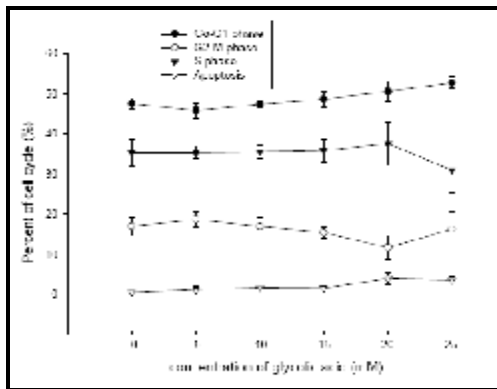


Fig.2(b) UVB

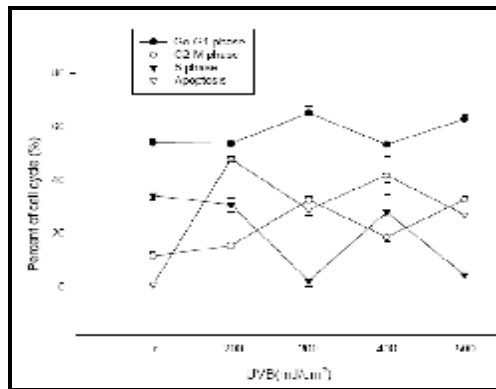


Fig.2(c) UVB+GA

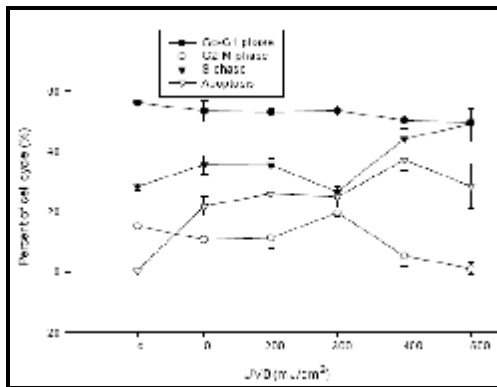


Fig. 2 The cell cycles of HaCaT cells treated with glycolic acid, UVB irradiation, and co-treatment with UVB and GA.

- (a) The HaCaT cells incubated with varying doses of glycolic acid (0, 5, 10, 15, 20, and 25 mM) showed no significant changes of cell cycle.
- (b) The cell cycle of HaCaT cells treated with different doses of UVB (0, 200, 300, 400, and 500 mJ/cm²) showed G2/M phase arrest.
- (c) The cell cycle of HaCaT cells treated with different doses of UVB (0, 200, 300, 400, and 500 mJ/cm²) and a fixed concentration of glycolic acid (20 mM) showed S phase arrest.

Fig.3(a)

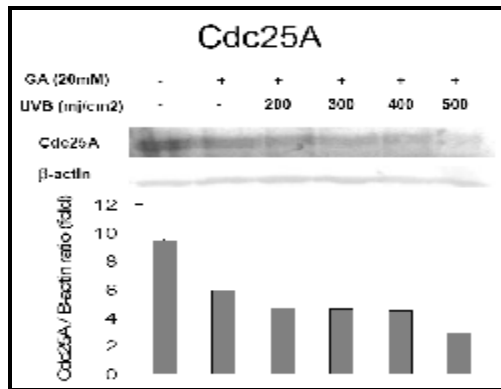


Fig.3(b)

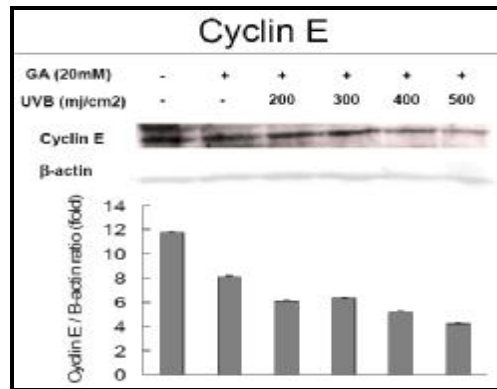


Fig.3(c)

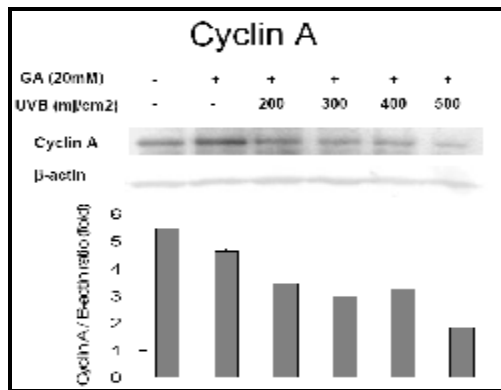


Figure 3 The effects of cell cycle protein expression by co-treatment with UVB and GA on HaCaT cells.

HaCaT cells were treated with different doses of UVB (0, 200, 300, 400, and 500 mj/cm²) and a fixed concentration of glycolic acid (20mM). In contrast to the consistent levels of β -actin, the expression levels of cdc25A, cyclin A and cyclin E decreased with increasing doses of UVB irradiation, indicating cell cycle arrest at S phase.

Fig.4 (a)

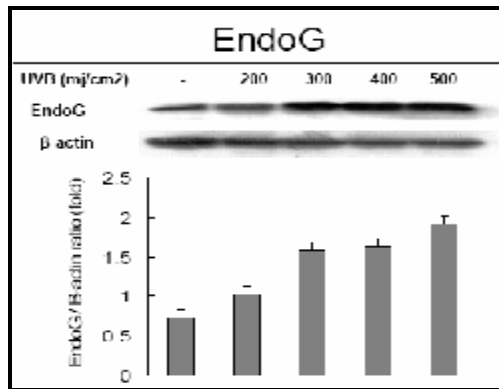


Fig.4 (b)

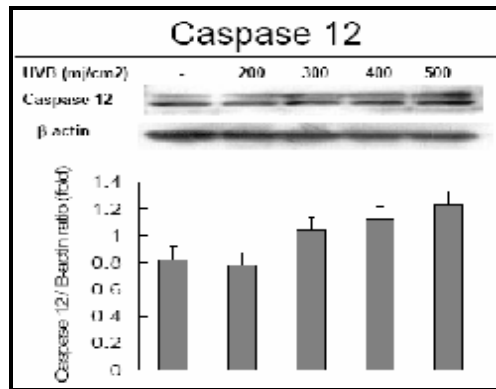


Fig.4 (c)

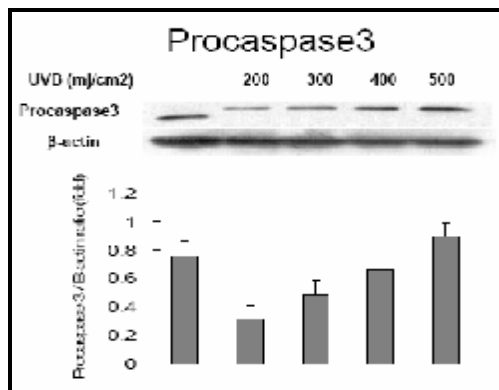


Fig.4 (d)

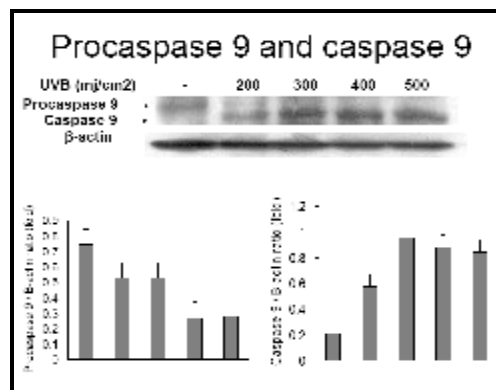


Fig.4 (e)

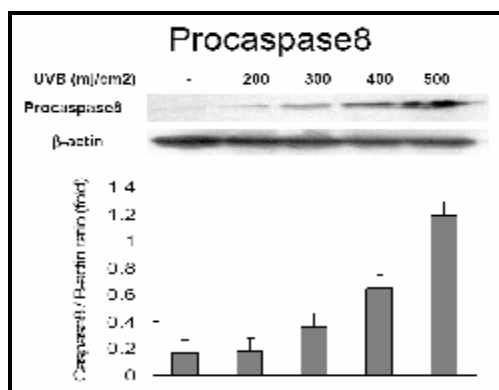


Fig.4 (f)

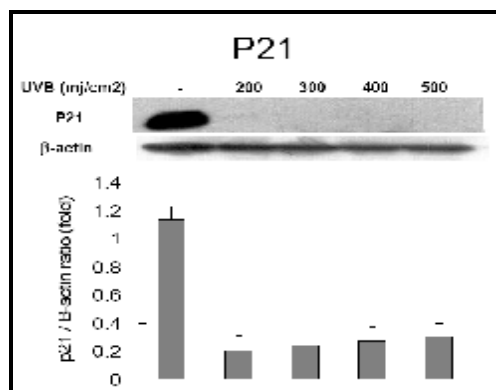


Figure 4 The effects of apoptosis protein expression by treatment with UVB irradiation on HaCaT cells.

The HaCaT cells were treated with different doses of UVB (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²). UVB induced the increase of EndoG, caspase 12, and caspase 9 and decrease of procaspase 3 and procaspase 9, indicating that the mechanism of apoptosis in HaCaT cells being through multiple pathways, including caspase-dependent and caspase-independent pathway. The expression of P21 was reduced by the treatment of UVB irradiation

Fig.5 (a)

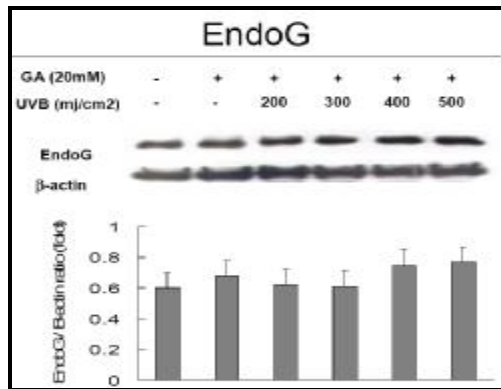


Fig.5 (b)

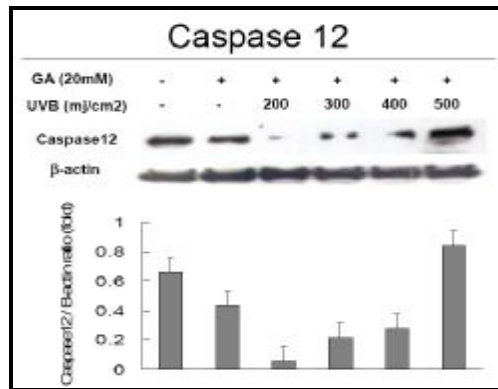


Fig.5 (c)

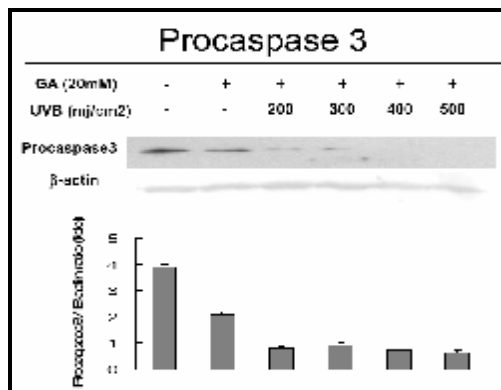


Fig.5 (d)

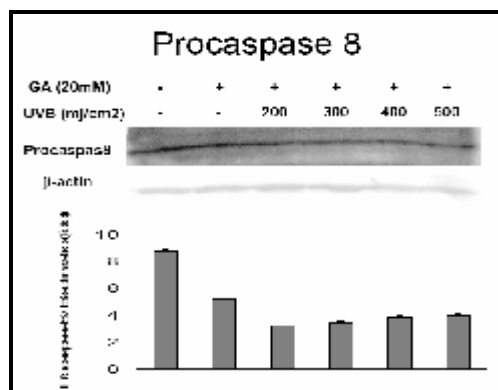


Fig.5 (e)

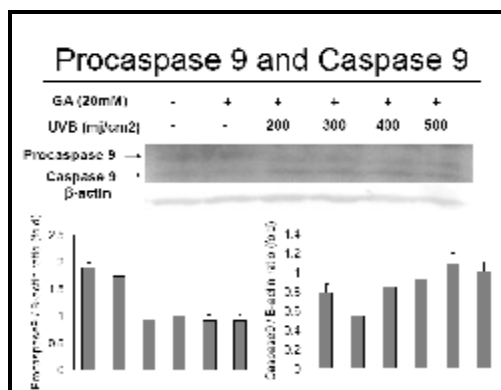


Fig.5 (f)

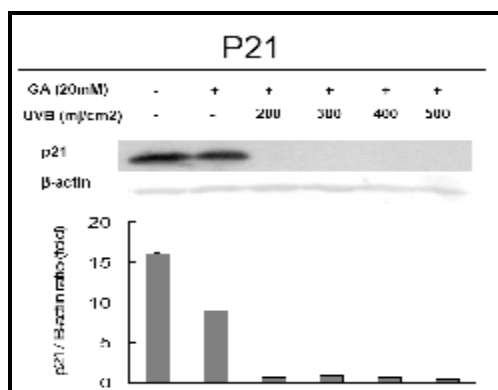


Figure 5 The expressions of apoptosis-related proteins on HaCaT cells with co-treatment with UVB and glycolic acid (GA)

The HaCaT cells were treated with different doses of UVB (0, 200, 300, 400, 500 mj/cm²) and a fixed concentration of glycolic acid (20mM). Co-treatment with UVB and GA induced the increase of EndoG, caspase 12, and caspase 9 and decrease of procaspase 3 and procaspase 9, indicating that the mechanism of apoptosis in HaCaT cells being through multiple pathways, including caspase-dependent and caspase-independent pathway. The P21 level was reduced by co- treatment of UVB and GA.

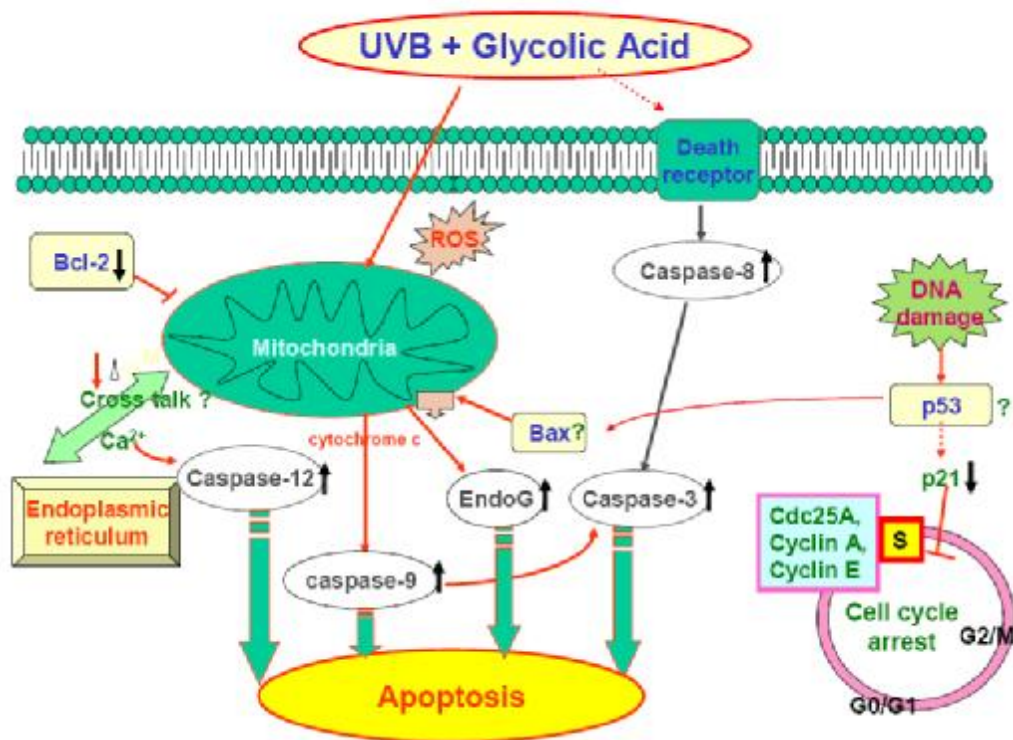


Fig. 6 The scheme of the molecular pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis on HaCaT cell co-treated with UVB and glycolic acid.

Table 1. Summary of the mechanisms of the apoptotic effects of glycolic acids and ultraviolet B irradiation on human skin keratinocytes

| | UVB | GA | UVB+ GA |
|-------------------|------------|----|---------|
| Cell survival | ↓ | ↓ | ↓↓ |
| Cell cycle arrest | G2-M phase | — | S phase |
| Apoptosis | + | + | + |