

丹参和枸杞对中波紫外线损伤角质形成细胞的保护作用

★ 邓琳 (青海大学医学院 西宁 810001)

★ 张莉* 白秦玉 陈光仍 (青海大学附属医院皮肤科 西宁 810001)

摘要:目的:观察丹参和枸杞对中波紫外线(UVB)损伤角质形成细胞的保护作用及作用机制。方法:用丹参和枸杞对 HaCaT 细胞进行预处理 24 小时,采用 20、40、60mJ/cm² 剂量的 UVB 照射细胞,以 MTT 法检测细胞生存率,以酶联免疫吸附实验检测细胞上清液中 TNF- α 及 IL-1 β 的分泌量。结果:角质形成细胞损伤程度与 UVB 照射剂量有关,丹参和枸杞均可提高 UVB 照射后角质形成细胞的生存率,丹参可抑制角质形成细胞释放 TNF- α 和 IL-1 β ;枸杞只抑制 TNF- α 的释放,而对 IL-1 β 无明显抑制作用。结论:UVB 对角质形成细胞有损伤作用,且与剂量相关;丹参、枸杞可以通过降低 UVB 引起的炎症因子 TNF- α 和 (或)IL-1 β 的分泌从而减轻紫外线辐射引起的皮肤损伤。

关键词:中波紫外线;角质形成细胞;光保护;中药

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Photo-protection of Salvia Miltiorrhiza and Fructus Lycii on Human Keratinocytes from Ultraviolet Irradiation

DENG Lin, ZHANG Li, BAI Qin-yu, CHEN Guang-reng

Department of Dermatology, Qinghai Medical College, Qinghai 810001

Abstract: Objective: To investigate the photo-protective effect of the traditional Chinese medicine (Salvia Miltiorrhiza and Fructus Lycii) on human keratinocytes from ultraviolet B (UVB) radiation. Methods: After pretreated with Salvia Miltiorrhiza or Fructus Lycii for 24 hours, HaCaT Cells were irradiated with different dosages of UVB. The cell viability was detected by MTT method. The supernatant was collected at 24 hours post irradiation to measure the secretion of cytokine TNF- α and IL-1 β by ELISA. Results: The cell viability was inverse correlating with the irradiated dosage. Both Salvia Miltiorrhiza and Fructus Lycii could boost the cell viability. Salvia Miltiorrhiza could reduce the secretion of TNF- α and IL-1 β , Fructus Lycii could only reduce the secretion of TNF- α . Conclusions: The damage of UVB irradiation on human keratinocyte was dose-dependent. Salvia Miltiorrhiza and Fructus Lycii have photo-protective potency. Inhibition of TNF- α or IL-1 β secretion may be one of the mechanisms for photo-protection.

Key words: Ultraviolet B; Keratinocytes; Photo-Protection; Traditional Chinese Medicine

皮肤是人类防御外界微生物、化学和物理损伤的第一道物理屏障,紫外线(UV)照射是引起皮肤损伤的最常见因素。角质形成细胞(KC)位于皮肤的表皮层,是中波段紫外线(UVB)作用的靶部位。UVB 能刺激皮肤角质形成细胞表达多种细胞因子,如 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 等^[1,2]。这些细胞因子具

有介导炎症反应、调节免疫应答和诱导细胞凋亡等生物学作用^[3]。有些中草药有一定的光防护作用,被用于治疗一些光敏性疾病,预防紫外线对皮肤的损伤,但它们的具体作用机制还不清楚。笔者用中草药预处理人角质形成细胞系 HaCaT,通过用不同剂量的 UVB 照射细胞,观察这两种中草药的光防

* 通讯作者:张莉, Tel: 0971-8808858.

护作用并在此基础上探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞:人永生角质形成细胞系 HaCaT 细胞(购于武汉大学细胞保藏中心)。

仪器:酶联检测仪(550 型, Bio-RAD 公司), 倒置显微镜(Olympus 公司), 光疗仪(SS-03B 型 UVB 光疗仪, Sigma 公司), 二氧化碳孵箱(Thermo 公司)。

培养基:DMEM(GIBCO 公司)+10%胎牛血清(PAA 公司)+青霉素(40 万 U/mL)+链霉素(40 万单位/mL)。

试剂:丹参和枸杞(均为水提取物, 购于中国医学科学院药用植物研究所), ELISA 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

2.1 方法

2.1.1 细胞培养 将人的永生角质形成细胞系 HaCaT 细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于细胞培养箱中。待完全融合时用 0.05% 胰酶和 0.02% EDTA 消化, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞浓度至 1.5×10^5 个/mL, 定量接种于 24 孔板上以及直径为 10 mm 的培养皿中, 继续培养 24 小时。

2.1.2 药物孵育 待 80% 融合时将 HaCaT 细胞分成四组, I 组:正常对照组; II 组:未加药照射组; III 组:UVB+丹参组; IV 组 UVB+枸杞组。丹参浓度为 200 μg/mL, 枸杞为 100 μg/mL。每组 3 个复孔, 重复实验 3 次。III、IV 组药物孵育 24 小时后, 再进行照光。照光后弃 PBS 液, 每孔加入 DMEM 培养基各 1 mL, 放入培养箱中继续孵育。

2.1.3 紫外线照射 药物孵育 24 小时后 PBS 液洗涤两遍, 每孔加入 1 mL PBS, 接受紫外线照射, 对照组用锡箔纸遮盖。每次照射前先用 UV-Meter 定量, 选择合适的剂量, 距离为 25 cm。

2.1.4 细胞生长曲线绘制 培养皿中的 HaCaT 细胞 UVB(mJ/cm²)照射后 0、12、24、48 小时用 MTT 法检测细胞活性, 并绘制生长曲线。

2.1.5 MTT 检测细胞生存率 HaCaT 细胞 UVB 照射后 24h, 每孔中加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 100 μL, 孵育 4 小时, 弃培养基, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO)1 mL, 室温震荡 5 分钟, 以 490 nm 波长检测各孔的光吸收值(OD 值)。

2.1.6 ELISA 法检测细胞因子 不同剂量的 UVB 照射后 24 小时收集细胞上清。使用 ELISA 试剂盒, 按照产品操作说明分别检测 TNF-α 和 IL-1β 的

分泌量。

2.1.7 数据统计分析 以 SPSS12.0 统计软件分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 多组间比较采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 检验。对各组间的总的比较差别有统计学意义的进一步用 LSD 法做两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 未加药处理的细胞生长曲线

UVB 照射后 12 小时两组细胞均未明显增长, 24 小时后对照组细胞数量呈直线上升, 72 小时细胞数增长了近 5 倍。UVB 照射组细胞则无明显增长, 各时间点细胞数量相当(见图 1)。

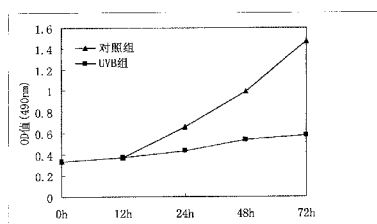


图 1 UVB(40mJ/cm²)照射后细胞生长曲线(MTT 法)

2.2 细胞生存率

亚融合状态的细胞分别经 20、40、60 mJ/cm² UVB 照射 24 小时后, 细胞受到不同程度的损伤。随着剂量的增大, 细胞受到的损伤越大, 细胞生存率越小, 见表 1。

表 1 不同剂量 UVB 照射后 24 小时 MTT 实验的 OD 值

分组	OD 值		
	UVB 照射剂量 /mJ·cm ⁻²	20	40
对照组		1.023 ± 0.031	1.102 ± 0.073
未加药照射组		0.698 ± 0.076	0.556 ± 0.035
UVB+丹参组		0.876 ± 0.053 *	0.771 ± 0.087 *
UVB+枸杞组		0.789 ± 0.079 *	0.669 ± 0.078 *

注:与相同照射剂量下未加药照射组比较, * $P < 0.05$ 。

从表 1 可知, 丹参和枸杞两种中草药预处理后的 HaCaT 细胞, 在照射 UVB 后 24 小时, 生存率相比未加药照射组均有明显的增加(约 10%~22%), $P < 0.05$ 。用 20、40 mJ/cm² UVB 照射, 丹参组的光防护作用明显高于枸杞组, $P < 0.05$ 。但 60 mJ/cm² 照射后, 两组间的作用无明显差异, $P > 0.05$, 说明这两种药物有明显的光保护作用。

2.3 ELISA 法检测细胞因子

与对照组比较, UVB 照射后角质形成细胞分泌 TNF-α、IL-1β 的量大幅增加, 并且随着剂量的增加分泌量也增大, 而对照组则无明显变化。丹参预处理组在 20、40、60 mJ/cm² 照射时 TNF-α 和 IL-1β 的分泌量均小于未加药照射组, $P < 0.05$, 而枸杞组仅 TNF-α 分泌量小于未加药照射组, $P < 0.05$, IL-1β

则无明显变化, $P > 0.05$ 。详见表 2、表 3。

表 2 中药对角质形成细胞分泌 TNF- α 的影响

分组	TNF- α /pg·ml ⁻¹			
	UVB 照射剂量 /mJ·cm ⁻²	20	40	60
对照组		<10 *	<10 *	<10 *
未加药照射组		16.899±1.274	25.392±1.927	38.277±3.228
UVB+丹参组		11.549±1.336 Δ	18.834±2.889 Δ	25.862±4.318 Δ
UVB+枸杞组		13.267±0.879 Δ	20.466±2.771 Δ	29.142±3.339 Δ

注: * TNF- α 最小可检测到 10 pg/mL;与相同照射剂量下未加药照射组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表 3 中药对角质形成细胞分泌 IL-1 β 的影响

分组	IL-1 β /pg·mL ⁻¹			
	UVB 照射剂量 /mJ·cm ⁻²	20	40	60
对照组		<13 *	<13 *	<13 *
未加药照射组		17.884±1.102	36.178±2.927	44.175±2.188
UVB+丹参组		<13 Δ *	20.366±1.876 Δ	31.454±3.256 Δ
UVB+枸杞组		16.156±1.879	33.589±2.855	45.250±4.351

注: * IL-1 β 最小可检测到 10 pg/mL;与相同照射剂量下未加药照射组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

来自日光中的紫外线对皮肤晒伤、皮肤炎症、皮肤老化的发生发展有重要影响^[4]。自然界中能穿过臭氧层引起人皮肤损伤的紫外线成分主要是 UVB 和 UVA,而对正常人的皮肤能产生红斑等致病作用的光谱主要是 UVB^[5]。UVB 可通过以下机制对角质形成细胞造成损伤,对 DNA 的直接损伤从而诱导细胞凋亡^[6];产生活性氧基团(ROS),引起一系列的氧化损伤;刺激细胞分泌大量炎症因子而诱发炎症反应;本实验结果表明,UVB 照射可以损伤角质形成细胞,损伤程度与照射剂量相关,剂量越大损伤程度也越大。

TNF- α 和 IL-1 β 是由表皮角质形成细胞合成的主要细胞因子,参与紫外线引起的皮肤炎症反应及免疫调节。许多实验研究证实,HaCaT 细胞经 UVB 照射后,TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的分泌量明显增加^[7,8]。UVB 照射后立即加入 TNF- α 或 IL-1 β 抗体,则可明显减少细胞肿胀、破碎情况,由此证实了 TNF- α 和 IL-1 β 在 UVB 造成 HaCaT 细胞损伤中起着至关重要的作用^[3]。在本实验中,不同剂量的 UVB 照射 HaCaT 细胞后 24h 收集细胞上清,用 ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-1 β 的含量,结果显示,UVB 照射后 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌量明显增加,并且随着 UVB 剂量的增大,分泌量也逐渐增多。

中草药对皮肤的光保护作用已被证实,但其具体的机制不详。传统中草药丹参具有抗氧化功能,

是良好的自由基清除剂,防止脂质过氧化,保护生物膜的完整性,维持细胞功能等作用。枸杞中的枸杞多糖,也有良好的抗氧化和清除自由基作用。本实验中,两组中药处理细胞组生存率均明显高于未加药照射组。从而证实了中药丹参和枸杞可以减轻 UVB 对 HaCaT 细胞的光损伤,有提高细胞存活率的作用。

ELISA 检测发现这两种中药均可以减少 UVB 照射引起的 TNF- α 分泌增加,丹参还可以减少 IL-1 β 的分泌。从而初步推测,丹参、枸杞的光保护作用的保护环节与减少炎症损伤程度、恢复细胞生长增殖能力及减少表皮细胞炎症因子的分泌等有关,但是否还具有抗氧化、减少细胞凋亡等其它途径还需要进一步的探讨。

参考文献

- [1] Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling [J]. *Inv Ophth Vis Sci*, 2006;47(6):2 430~2 437
- [2] Marionnet AV, Chardonnet Y, Viac J et al. Differences in responses of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production and secretion to cyclosporin-A and ultraviolet B-irradiation by normal and transformed keratinocyte cultures[J]. *Exp Dermatol*, 1997,6(1):22~28
- [3] Wachter T, Sprick M, Hausmann D et al. cFLIPL inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated NF-kappaB activation at the death-inducing signaling complex in human keratinocytes[J]. *J Biol Chem*, 2004,279 (51):52 824~52 834
- [4] Mukhtar H, Elmetts CA. Photocarcinogenesis; mechanisms; mechanisms, models and human health implications[J]. *Photobiol*. 1996; 63(4):356~357
- [5] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 第三版. 南京:江苏科学技术出版社, 2001:574
- [6] D. Kulms, T. Schwarz, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2000, 16: 195~201
- [7] Beata Skiba, Bronwyn Neill, Terrence J. Piva Gene expression profiles of TNF- α , TACE, furin, IL-1 β and matrilysin in UVA and UVB-irradiated HaCat cells [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005, 21:173~182
- [8] Marionnet AV, Chardonnet Y, Viac J, et al. Differences in responses of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production and secretion to cyclosporin-A and ultraviolet B-irradiation by normal and transformed keratinocyte cultures [J]. *Exp Dermatol*, 1997, 6:22~28

(收稿日期:2007-03-27)

欢迎投稿! 欢迎订阅!