

镰形棘豆黄酮类化合物对紫外线辐射引起的角质形成细胞损伤的保护作用

陈锦珊^①, 洪佳妮^{①②}, 杜青云^①, 李茂星^③

[摘要] 目的 探讨镰形棘豆黄酮类化合物对中波紫外线照射所致角质形成细胞损伤的保护作用。方法 体外培养角质形成细胞系,以 60、90、120 mJ/cm² 中波紫外线照射,加入镰形棘豆黄酮类化合物进行干预处理,倒置相差显微镜观察细胞受损程度,以 MTT 法检测细胞增殖活性,ELISA 检测上清液 TNF- α 、IL-10 分泌量,实时荧光定量 PCR 检测 TNF- α mRNA、IL-10 mRNA 表达。结果 中波紫外线照射后,细胞形态受损,随着照射剂量增加,细胞增殖活性下降,损伤程度加重,TNF- α 、IL-10 分泌量增加,TNF- α mRNA、IL-10 mRNA 表达水平增加。加入镰形棘豆黄酮类化合物干预后,细胞活性有所恢复,TNF- α 、IL-10 分泌量降低,TNF- α mRNA、IL-10 mRNA 表达水平下调,具有显著性差异。结论 镰形棘豆黄酮类化合物具有一定的光保护作用,抑制炎症细胞因子分泌可能是其减轻紫外线辐射损伤的机制之一。

[关键词] 镰形棘豆;黄酮类化合物;紫外线;角质形成细胞;光保护

[中图分类号] R 965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2011)04-0289-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.04.03

Prevention of Flavonoids from *Oxytropis falcate* Bunge Against UVB-induced Damage to HaCaT Keratinocytes

CHEN Jin-shan^①, HONG Jia-ni^{①②}, DU Qing-yun^①, LIMao-xing^③

^①Department of Pharmacy, Hospital 175 of PLA, Zhangzhou 363000 China

^②Department of Pharmacy, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005 China

^③Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050 China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of flavonoids from *Oxytropis falcate* Bunge on cultured HaCaT cells from ultraviolet radiation. **Methods** The cells were shammed or irradiated with different dosages of UVB radiation and treated with flavonoids from *Oxytropis falcate* Bunge. The damage to HaCaT cells was observed by the inverted phase contrast microscope. Cellular proliferation activity was detected by MTT method. The secretory volume of TNF- α and IL-10 was measured by ELISA. The levels of TNF- α mRNA and IL-10 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** The extent of damage to the cells irradiated was dependent on the irradiated doses. The secretory volume of cytokine was increased with UVB exposure, so was the level of TNF- α mRNA and IL-10 mRNA. The intervention of flavonoids from *Oxytropis falcate* Bunge could recover the cellular growth activity. The amount of cytokine secretion and the level of TNF- α mRNA and IL-10 mRNA decreased. The difference was significant. **Conclusion** The above results indicate that flavonoids from *Oxytropis falcate* Bunge has protective effect on HaCaT cells damaged by UVB. Inhibition of cytokine secretion may be the one of the mechanisms of reducing the damage from UVB irradiation.

[Key words] *Oxytropis falcate* Bunge; flavonoids; UV; HaCaT cell photoprotection

基金项目: 全军医药卫生“十一五”课题面上项目, No. 06MB100; 南京军区医药卫生科研课题, No. 06MA-95

作者简介: 陈锦珊, 学士, 主管药师。研究方向: 医院药学。Tel (0596) 2925193; E-mail: cjs1223@sohu.com

作者单位: ① 363000 福建漳州, 解放军 175 医院药剂科; ② 361005 福建厦门, 厦门大学医学院药理学系; ③ 730050 甘肃兰州, 兰州军区兰州总医院药材科

通讯作者: 李茂星, Tel (0931) 8994676

过量的紫外线照射可引起皮肤损伤等一系列生物反应^[1,2]。中波紫外线(UVB)是辐射到地面紫外线的主要部分,可引起角质形成细胞损伤,产生炎症因子,增加突变频率,甚至引起皮肤癌^[3]。

镰形棘豆(*Oxytropis falcate* Bunge)是棘豆属的一种药用植物,多年生草本,在我国青藏高原分布广泛^[4,5]。研究表明,镰形棘豆的主要化学成分包含黄酮类化合物(Flavonoids, FOF),且具有较强的紫

外线吸收性能^[6]。在前期研究中,课题组对由大孔吸附树脂富集得到的镰形棘豆总黄酮成分^[7]进行初步分离,得到若干部分活性部位 FOF,并制成防晒护肤品^[8,9],动物实验证明对紫外线具有良好的防护性能。本研究以 UVB 辐射损伤的体外培养人角质形成细胞系 (HaCaT 细胞) 为模型,研究 FOF 的光保护性能,并探讨相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司), 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), 酶联免疫检测仪 (Thermo 公司), 超速低温离心机 (德国 Herais), GeneAmp PCR System 2700 型 PCR 仪 (Applied Biosystem 公司); DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (FCS 杭州四季青), 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 胰蛋白酶 (均为 Sigma 公司), ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司), TaKaRa RNA PCR 试剂盒 (宝生物工程大连有限公司), 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)。永生化人角质形成细胞株 (HaCaT, 西京医院皮肤科); FOF (自制, 批号: 20100403)。

1.2 细胞培养 在 37℃、5% CO₂ 条件下将 HaCaT 细胞培养于细胞培养箱中,以 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 消化,用含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基调整其密度为 1×10^6 /ml 定量接种于 96 孔板和 6 孔板,继续培养 24 h 待其贴壁后,前者用于细胞活性检测,实验各组设 6 个复孔,后者用于细胞因子水平检测及细胞总 RNA 提取,实验各组设 3 个复孔。

1.3 紫外线照射^[13,14] 接种于培养板中的细胞生长至 70% ~ 80% 融合时给予 UVB 照射,照射前先弃去各孔细胞培养液, PBS 洗 2 遍后再加入少量覆盖底面,置 UV 辐射仪照射,距离 15 cm,照射剂量视分组情况而定,照射后弃覆盖液换回 DMEM/F12 培养基继续培养。对照组用锡箔纸遮盖。

1.4 分组 实验分为模型组 1、模型组 2 和给药组。模型组 1 接受 3Q 60 mJ/cm² UVB 辐射,且分别孵育 0、2、6、12、24、48 h; 模型组 2 接受 6Q 9Q 120 mJ/cm² UVB 辐射,孵育 24 h; 给药组在照光前 3 h 加入 FOF 预处理,接受 6Q 9Q 120 mJ/cm² UVB 辐射孵育 24 h。根据预实验结果,选用对 UVB 引起的细胞生长抑制有明显保护作用且无细胞毒性的药物浓度,为 10 μg/ml (预实验浓度 5Q 25 1Q 5 μg/ml)。

1.5 MTT 法检测细胞增殖活性 模型组 1 于辐射后各时间点,模型组 2、给药组于辐射后 24 h 向每

100 μl 培养基中加入 20 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT, 孵育 4 h 后弃上清,加入 120 μl 二甲基亚砷 (DMSO), 室温震荡 15 min, 用酶标仪在 570 nm 波长处测吸光度 (A) 值, 空白试剂孔调零。

1.6 ELISA 法检测细胞因子分泌量 细胞照射后 24 h 收集细胞培养上清液, 冻存于 -70℃ 冰箱。使用 ELISA 试剂盒, 严格按说明书操作, 检测 TNF-α、IL-10 的分泌量。

1.7 细胞总 RNA 提取 以 DEPC 液 (1:1000 稀释) 过夜浸泡所需器械及耗材, 高温消毒。按照 Trizol 提取液操作步骤提取细胞总 RNA。紫外分光光度计测定提取的总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值, 并对 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳以观察 RNA 有无降解, -70℃ 保存。

1.8 实时荧光定量 PCR 按照试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 操作, 测定 TNF-α mRNA、IL-10 mRNA 表达水平: TNF-α (112 bp) 上游引物 5'-GTGACAAGCCTGTAGCCCATGTT-3', 下游引物 5'-TTATCTCTCAGCTCCACGCCATT-3'; IL-10 (138 bp) 上游引物 5'-ATCAAGCGCATGTGAAGCTC-3', 下游引物 5'-AGAGCCCCAGATCCGATTTT-3'; 内参 β-actin (205 bp) 上游引物 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游引物 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。逆转录体系总体积 20 μl 逆转录条件: 37℃ 15 min 85℃ 5 s; PCR 反应体系体积 20 μl 扩增反应条件: 95℃ 30 s 1 个循环; 95℃ 5 s 60℃ 31 s 40 个循环; 95℃ 15 s 60℃ 1 min 95℃ 15 s 1 个循环, 4℃ 保留。

1.9 数据处理 以 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 光损伤的形态学观察 HaCaT 细胞在接受不同剂量 (6Q 9Q 120 mJ/cm²) UVB 照射后 24 h, 光损伤表现为细胞水肿、皱缩变小, 细胞片增多。该损伤作用呈现剂量依赖性, 其中以 120 mJ/cm² 最强, 表现为细胞形态模糊不清、细胞肿胀死亡, 细胞碎片多, 出现脱片, 见图 1。

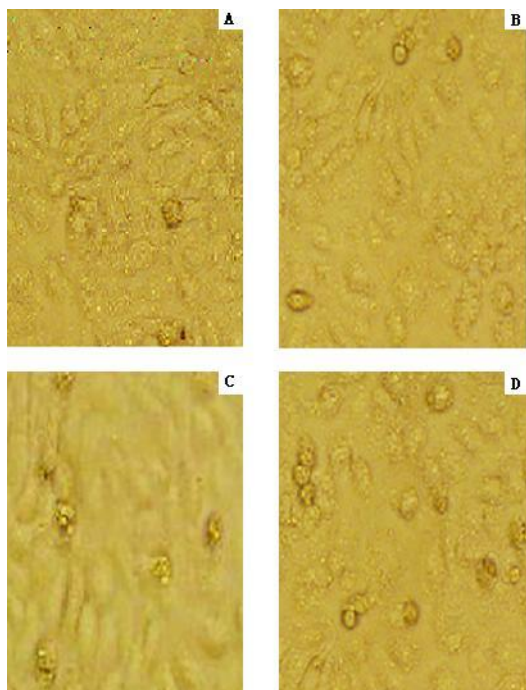
2.2 细胞增殖活性 HaCaT 细胞接受 30 mJ/cm² UVB 照射后, 细胞活性在各时段未发生明显改变, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 而经 60 mJ/cm² UVB 照射后, 细胞活性在 24、48 h 明显下降, 与未接受 UVB 照射组 (0 mJ/cm² UVB 剂量组) 相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 UVB 辐射对 HaCaT 细胞增生的时效性影响 ($\bar{x} \pm s, A$)

组别	剂量 (mJ/cm ²)	照射后培养时间 (h)					
		0	2	6	12	24	48
未接受 UVB 辐射组	0	0.401 ± 0.014	0.413 ± 0.015	0.502 ± 0.055	0.612 ± 0.012	0.826 ± 0.040	1.004 ± 0.024
UVB 辐射	30	0.409 ± 0.019	0.408 ± 0.013	0.496 ± 0.031	0.590 ± 0.019	0.775 ± 0.034	0.946 ± 0.054
	60	0.404 ± 0.016	0.395 ± 0.023	0.470 ± 0.035	0.552 ± 0.039	0.641 ± 0.040 ^b	0.693 ± 0.028 ^b

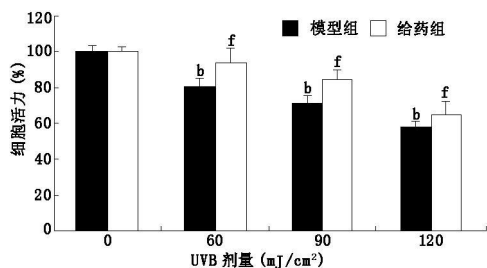
注: 与未接受 UVB 辐射组比较, ^b $P < 0.05$

细胞受损程度随孵育时间加长而加重, 呈现时效正相关性。模型组经不同剂量 UVB 辐射后 24 h 细胞活性下降, 其下降幅度与 UVB 照射剂量呈正相关, 分别为 20%、30%、42%, 有显著性差异, 而给药组细胞 A 值均较单纯照射组高, 细胞活性有所恢复, 分别提高约 15%、15%、10%, 提示药物对受试细胞有光保护作用, 见图 2。加 FOF (10 μg/ml) 预处理后, 显微镜下, 与单纯照射比较, 给药组的细胞形态有所恢复, 肿胀减轻, 碎片减少, 死细胞量降低, 见图 3。



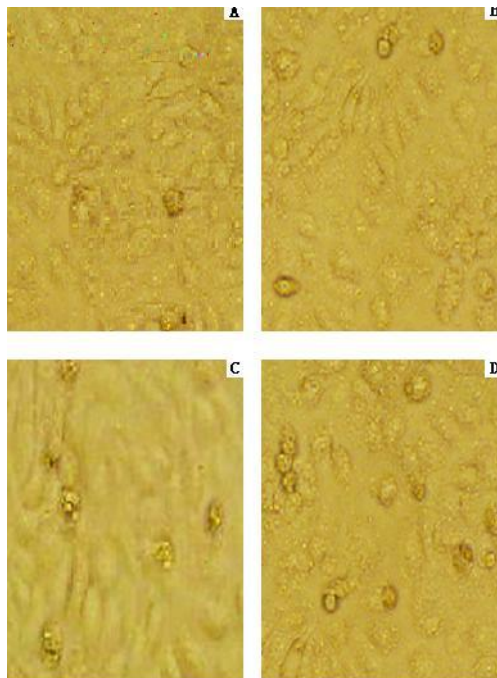
A: 0 mJ/cm²; B: 60 mJ/cm²; C: 90 mJ/cm²; D: 120 mJ/cm²

图 1 不同剂量 UVB 对 HaCaT 细胞光损伤的形态学影响



注: 与 0 mJ/cm² UVB 剂量组比较, ^b $P < 0.05$ 与模型组比较, ^f $P < 0.05$

图 2 FOF (10 μg/ml) 对 UVB 辐射后 24h 的 HaCaT 细胞增殖影响



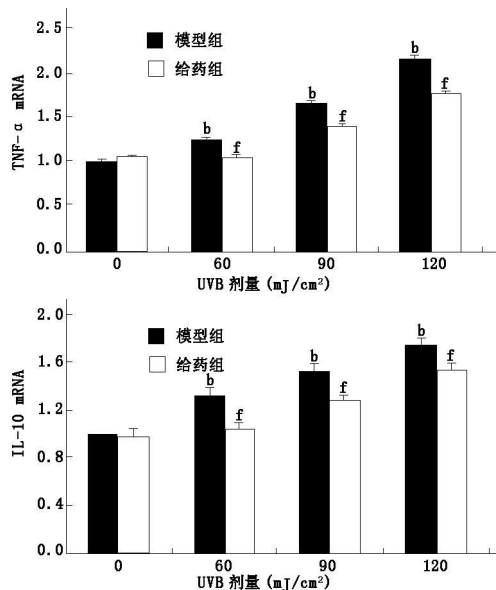
A: 0 mJ/cm²; B: FOF+ 60 mJ/cm²; C: FOF+ 90 mJ/cm²; D: FOF+ 120 mJ/cm²

图 3 加 FOF (10 μg/ml) 预处理后, 不同剂量 UVB 对 HaCaT 细胞光损伤的形态学影响

2.3 细胞因子分泌量 正常情况下 (0 mJ/cm²), HaCaT 细胞分泌一定量的 TNF-α、IL-10 随着 UVB 辐射剂量增加, TNF-α、IL-10 分泌量显著增加, 与未接受照射对照组之间比较均有显著性差异 ($P < 0.05$); 加入 FOF 处理后各剂量水平与模型组相比, 其分泌量显著降低 ($P < 0.05$) 见图 4。

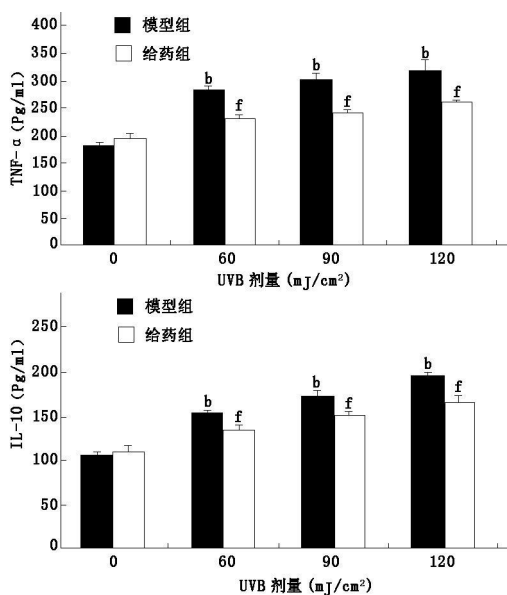
2.4 实时荧光定量 PCR 检测结果 由系统分析软件确定阈值, 进而确定各反应样本的 C_t 值, 采用相对定量的 2^{-ΔΔC_t} 分析结果, 确定各样本之间基因的表达差异。

模型组细胞的 TNF-α mRNA、IL-10 mRNA 表达水平明显高于未接受照射对照组 ($P < 0.05$), 且随着辐射剂量加大, 表达水平增加, 具有一定的剂量相关性; 给药组细胞分泌的 TNF-α mRNA、IL-10 mRNA 水平明显低于模型组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$) 见图 5。



注:与 0 mJ/cm² UVB 剂量组比较, ^b P < 0.05; 与模型组比较, ^f P < 0.05

图 4 ELISA 检测 FOF 对 UVB 辐射损伤 HaCaT 细胞分泌 TNF-α、IL-10 的影响



注:与 0 mJ/cm² UVB 剂量组比较, ^b P < 0.05; 与模型组比较, ^f P < 0.05

图 5 RT-PCR 检测 FOF 对 UVB 辐射损伤 HaCaT 细胞表达 TNF-α mRNA、IL-10 mRNA 的影响

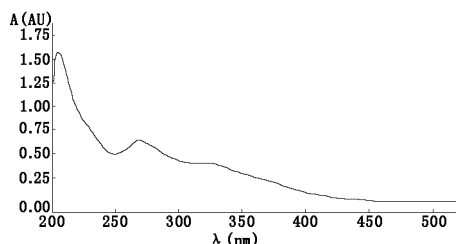


图 6 FOF 紫外吸收扫描图

3 讨论

镰形棘豆含有大量黄酮及生物碱类成分,紫外吸收扫描结果显示,FOF 有较强的紫外吸收作用,见图 6。本研究显示 FOF 能减轻 UVB 对 HaCaT 细胞的损伤,有一定光保护作用。

UV 照射可使皮肤发生大量的生物学效应,其中主要是对皮肤免疫系统的抑制作用^[10-11]。主要表现为众多细胞因子的释放。其中, TNF-α、IL-10 是由表皮角质形成细胞合成的主要表皮细胞因子,参与紫外线引起的皮肤炎症反应过程及免疫调节,在紫外线介导的细胞凋亡中起着重要作用^[12-14]。TNF-α 与 UVB 辐射引起的皮肤损伤、炎症反应、接触超敏反应和细胞凋亡等密切相关^[15]。而 IL-10 在 UV 所引起的免疫抑制中起重要作用,一般认为 IL-10 是通过调节抗原呈递细胞的活性来完成其免疫抑制作用。研究发现,免疫抑制因子 IL-10 在紫外照射后的皮肤炎症浸润中增加^[16-17]。研究显示,UVB 辐射不仅影响细胞因子分泌量,同时改变转录因子的表达和活性^[18],并对 TNF-α、白介素(包括 IL-10)等许多因子的 mRNA 表达产生影响^[19,20]。本文研究 UVB 对 HaCaT 细胞因子分泌的影响,结果提示,UVB 能促进 TNF-α、IL-10 的分泌,且分泌量与照射剂量呈正相关。同时,经实时荧光定量 PCR 检测, TNF-α mRNA、IL-10 mRNA 表达水平随 UVB 照射剂量增加而升高。加入 FOF 干预后, TNF-α、IL-10 分泌量及其 mRNA 表达均下降,与单纯照光相比较,具有显著性差异。

本研究在国内首次证实了镰形棘豆中黄酮类化合物具有一定的体外光保护性能,抑制炎症细胞因子分泌可能是其减轻紫外线辐射损伤的机制之一。

研究结果为进一步研究镰形棘豆这一高原特色植物在紫外线辐射引起皮肤损伤的防护及其机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Beaton TR, Pavone A, Fischer SM. Ultraviolet B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis in vivo[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(5): 1171-1178
- [2] Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, et al. UV-induced skin damage[J]. *Toxicology*, 2003, 189(1-2): 21-39
- [3] Athar M, Kim AL, Ahmad N, et al. Mechanism of ultraviolet B induced cell cycle arrest in G₂/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective P53[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277(1): 107-111

(下转 295 页)

速进行渗漉提取。

2.3 验证试验 按照上述优选工艺,提取 3次,计算每次黄芩苷的提取率。结果见表 4

表 4 正交试验验证结果

试验次数	黄芩苷含量 (%)	提取率 (%)
1	12.81	84.29
2	12.72	83.72
3	12.77	84.03

由表 4 验证试验结果表明,其结果与正交试验结果基本一致,且指标成分提取率高,说明该工艺合理可行。

3 讨论

本文采用高效液相色谱法测定该方中的指标成分黄芩苷,结果显示,供试品色谱图中,在与对照品色谱图相应位置上,出现相同的色谱峰,而阴性对照色谱图在此保留时间无干扰,表明本试验的专属性高,而且该方法线性关系良好,精密度较高,稳定性好,此方法操作简单可行。

本处方来源于多年临床应用的医院制剂,药效

显著,无毒副作用。但是提取工艺落后,消耗工时,经改进的渗漉法能够大大缩短工时,有利于工业大生产。使用渗漉法提取,确定 30 倍量 60% 乙醇,以 7 ml/min 的流速进行渗漉为最佳提取工艺。

[参考文献]

- [1] 李艳荣,潘海峰,魏红. 中药材黄芩的研究近况 [J]. 承德医学院学报, 2009, 26(4): 418-420
- [2] 冯友根,邹晓华. 国内黄芩苷药理研究和临床应用概述 [J]. 中国医药情报, 2004, 10(2): 35-44
- [3] 朱伟,张守勤,孙红光,等. 黄芩有效成分提取及对炎症反应的影响 [J]. 生物加工过程, 2009, 7(1): 69-73
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010 282-283
- [5] 张凤梅. 反相高效液相色谱法优选黄芩中黄芩苷的提取工艺 [J]. 药学实践杂志, 2008, 26(5): 359-361
- [6] 崔福德. 药剂学(第五版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003 204-205
- [7] 潘燕,李瑾,张磊,等. 黄芩中黄芩苷醇提方法的优化 [J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(1): 52-53

(收稿日期: 2011-02-25; 修回日期: 2011-05-11)

(本文编辑 梁爱君)

(上接 292页)

- [4] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志(第 2 卷) [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1999. 233
- [5] 姜华,胡君茹,刘霞. 镰形棘豆的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 413-513
- [6] 刘斌. 中国棘豆属药用植物及其现代研究 [J]. 中国野生植物资源, 1997, 16(2): 15-18
- [7] 刘延彤,李茂星,杜青云,等. 大孔吸附树脂富集藏药镰形棘豆总黄酮的工艺研究 [J]. 药学实践杂志, 2008, 22(6): 561-563
- [8] 杜青云,洪佳妮,郭文勇,等. 镰形棘豆防晒霜的研制与质量评价 [J]. 医学药导报, 2010, 29(2): 229-231
- [9] 胡永狮,洪佳妮,杜青云,等. 含镰形棘豆黄酮化合物及纳米 TiO_2 防晒霜的配方研究 [J]. 解放军药学报, 2010, 26(4): 335-338
- [10] 杨敏,王宝玺,常建民. 紫外线照射对皮肤免疫系统的抑制作用 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2004, 18(5): 302-304
- [11] 杨希川. 紫外线对角质形成细胞与炎症反应及免疫调节作用的影响 [J]. 国外医学·皮肤性病学分册, 1999, 25(5): 273-275
- [12] Schwarz A, Bhardwaj R, Aragone Y, et al. Ultraviolet-B induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells [J]. *J Invest Dermatol*, 1995, 104(1): 922-927
- [13] Strickland FM, Darvill A, Albersheim P, et al. Inhibition of UV-induced immune suppression and interleukin 10 production by plant oligosaccharides and polysaccharides [J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 69(2): 141-147
- [14] Kang K, Gilliam AC, Chen G, et al. In human skin UVB

initiates early induction of IL-10 over IL-12 preferentially in the expanding dermal monocyte/macrophage population [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 111(1): 31-38

- [15] Suganum AM, Sueoka E, Sueoka N, et al. Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF- α expression [J]. *Biofactors*, 2000, 13(1-4): 67-72
- [16] Kang K, Hamnerberg C, Meunier L, et al. CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potently produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein [J]. *J Immunol*, 1994, 153(11): 5256-5264
- [17] Weiss E, Manolak AJ, Lamorgina S, et al. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2004, 50(5): 657-675
- [18] Andersson E, Rosdahl I, Törnä H, et al. Differential effects of UV irradiation on nuclear retinoid receptor levels in cultured keratinocytes and melanocytes [J]. *Exp Dermatol*, 2003, 12(5): 563-571
- [19] Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, et al. A soybean Kunitz trypsin inhibitor reduces tumor necrosis factor- α production in ultraviolet exposed primary human keratinocytes [J]. *Exp Dermatol*, 2005, 14(10): 765-774
- [20] Enk CD, Sredni D, Blauvelt A, et al. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro [J]. *J Immunol*, 1995, 154(9): 4851-4856

(收稿日期: 2011-01-05; 修回日期: 2011-02-21)

(本文编辑 金杨红)