

杜仲对紫外线致 ESF-1 细胞光老化保护作用的研究

徐艳明, 张宁, 井丽巍, 陈巧云, 祁永华, 李建民*

(黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] 目的:研究杜仲抗紫外线致 ESF-1 细胞光老化作用,并初步探讨其作用机制。方法:杜仲 70% 乙醇提取物上 D101 大孔树脂制备不同浓度乙醇梯度洗脱部位,采用 $40 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的 UVA 或 $70 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的 UVB 照射 ESF-1 细胞后,立即加入不同浓度的杜仲 50% 乙醇洗脱部位,24 h 后 MTT 法测定细胞活性,试剂盒法测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)含量。结果:杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位 $250,500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的给药浓度能使 UVA 诱导的光老化细胞活性明显增强($P < 0.05$),细胞培养液中 LDH 活力明显降低($P < 0.05$),其中 $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的给药浓度能使细胞培养液中 SOD 活力明显升高($P < 0.05$),MDA 含量明显降低($P < 0.05$); $125,250,500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的给药浓度能使 UVB 诱导的光老化细胞活性明显增强,其中 $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的给药浓度能使细胞培养液中 LDH 活力明显降低($P < 0.05$),SOD 活力明显升高($P < 0.05$),MDA 含量明显降低($P < 0.05$)。结论:杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位对 UVA 和 UVB 致 ESF-1 细胞光老化具有良好的保护作用,推测其机制为通过提高 SOD 活力、加速氧自由基的清除和减少氧自由基的产生,使细胞的脂质过氧化损伤程度降低;同时,可能通过抗氧化作用,维持了细胞膜结构和功能的完整性,使 LDH 的漏出减少。

[关键词] 杜仲;紫外线;光老化;ESF-1 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0120-04

[收稿日期] 20101027(003)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11541332,1154G15);黑龙江省中医药管理局课题(ZHY08-Z33,ZHY10-W05);黑龙江省科技厅青年科学基金(QC08C11);黑龙江中医药大学校科研基金(200919)

[第一作者] 徐艳明,硕士研究生,主要从事中药新药研究与开发,Tel:0454-6103864,E-mail:xuyanming428@126.com

[通讯作者] *李建民,硕士,副教授,主要从事中药药效物质基础研究,Tel:0454-6105555,E-mail:ljm_1030@126.com

提示激素可降低 VEGF mRNA 的表达,停止应用激素后 VEGF mRNA 的表达增强。治疗组与对照组 VEGF mRNA 的表达趋势同模型组,但与模型组间有显著性差异($P < 0.05$)。提示复方巴戟天合剂可增加 VEGF mRNA 的表达,可起到与仙灵骨葆胶囊相近的治疗效果。激素性股骨头缺血性坏死后血管修复能力下降,血管内皮细胞的功能受到破坏影响,增加股骨头局部 VEGF 的表达,可能有助于股骨头坏死的修复。

[参考文献]

[1] 李文顺,孙克民,王和鸣,等. 复方巴戟天合剂治疗股骨头缺血性坏死的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(2): 9.

[2] 江中潮,邓友章,汪国友,等. 仙灵骨葆胶囊治疗股骨头缺血性坏死 30 例的临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(增刊): 56.

[3] 袁捷,林吉,徐传毅,等. 络生骨胶囊预防激素性股骨头缺血性坏死的药理学实验[J]. 中药新药与临

床药理, 2005, 16(3): 185.

[4] Wang G T. The Effect of core decompression on femoral head blood flow in steroid induced avascular necrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg(Am), 1985, 67(1): 121.

[5] 陈希哲,杨连甲. 血管内皮生长因子与骨的形成及修复[J]. 中华骨科杂志, 2001, 21(7): 440.

[6] Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia[J]. Circulation, 1998, 97(4): 1114.

[7] 王建华,尹庆水,黄清春,等. 血管内皮生长因子促血管形成作用及其调控[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(2): 210.

[8] Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, et al. Vascular endothelial growth factor directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts[J]. Fabs Letters, 2000, 473(3): 161.

[责任编辑 聂淑琴]

Protective Effect of *Eucommia ulmoides* on Photoaging Induced by Ultraviolet Radiation in ESF-1 Cell

XU Yan-ming, ZHANG Ning, JING Li-wei, CHEN Qiao-yun, QI Yong-hua, LI Jian-min*
(Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of *Eucommia ulmoides* against UV irradiation-induced damage in ESF-1 cells and its mechanism. **Method:** *E. ulmoides* was extracted by 70% ethanol, then the extract was eluted with gradient of ethanol by macroporous resin, ESF-1 cells were immediately treated with different concentrations of 50% ethanol eluate after UVA irradiation ($40 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) or UVB irradiation ($70 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$). Twenty-four hours later, the proliferation of cells was detected by MTT, SOD, LDH and MDA content were assayed by colorimetry and TBA methods respectively. **Result:** Compared with the UVA group, the concentration of 125, 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could increase the proliferation ($P < 0.05$) and reduce the activity of LDH ($P < 0.05$). The concentration of 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could increase the activity of SOD ($P < 0.05$) and decreased the content of MDA ($P < 0.05$). Compared with the UVB group, the concentration of 125, 250 and 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could increase the proliferation ($P < 0.05$). The concentration of 125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could increase the activity of SOD ($P < 0.05$) and reduce the activity of LDH ($P < 0.05$) and decreased the content of MDA ($P < 0.05$). **Conclusion:** The ethanol eluate of 50% can inhibit UV irradiation-induced damage in ESF-1 cells. Its mechanism is due to its abilities of increasing SOD, scavenging oxygen free radicals, inhibiting lipid peroxidation, and protecting membrane structure.

[Key words] *Eucommia ulmoides*; ultraviolet; photoaging; ESF-1 cell

皮肤由表皮、真皮、皮下组织三部分组成,其中表皮与真皮部分与皮肤老化密切相关。角质形成细胞是表皮层的主要组成细胞,起着维持表皮层结构和功能的重要作用。皮肤成纤维细胞与其代谢产物共同构成了皮肤真皮层的主体,其对整个皮肤结构和功能维持起着重要作用。因此,紫外线照射引起皮肤细胞——角质形成细胞和成纤维细胞生物学特性的改变,是皮肤光老化形成的直接原因。前期研究结果显示杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位对 UVA 和 UVB 致角质形成细胞光老化具有良好的保护作用,表明杜仲大孔树脂富集物能够抵抗表皮角质形成细胞的氧化损伤、具有抗皮肤光老化的潜力。在此基础上,本课题组继续研究杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位对皮肤成纤维光老化细胞模型的作用,以更加全面、系统地评价杜仲抗皮肤光老化作用。

1 材料

1.1 药材与试剂 人皮肤成纤维细胞 ESF-1 (北京协和细胞中心),杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv (购于佳木斯市药材公司,经鉴定符合药典规定),DMEM 培养基 (Gibco 公司,批号 1280330),胎牛血清

(Sigma 公司,批号 20091101),乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20100609)。

1.2 仪器 UVA 紫外光疗仪、UVB 紫外光疗仪 (Sigma 公司),紫外线辐照计(北京师范大学光电仪器厂),离心机(上海安亭科学仪器厂),酶标仪(上海热电仪器有限公司),Olympus 倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社),生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),小容量恒温培养振荡器(上海智城分析仪器有限公司),半自动生化分析仪(四川美生科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞光老化模型的建立 将处于对数生长期的 ESF-1 细胞接种于 96 孔板,待细胞单层贴壁后,弃培养液,每孔加入 150 μL PBS,置于 UVA 紫外光疗仪下 5 cm 处,采用 $40 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 UVA 照射建立 UVA 致细胞光老化模型。同样,将细胞置于 UVB 紫外光疗仪下 5 cm 处,采用 $70 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 UVB 照射建立 UVB 致细胞光老化模型,空白组用铝箔盖住^[1]。按公式 1^[2] 计算紫外线的照射剂量,照射强度通过紫外线辐照计测量来测定。

$$\text{照射剂量}(J \cdot \text{cm}^{-2}) = \text{照射强度}(W \cdot \text{cm}^{-2}) \times \text{照射时间}(s) \quad (1)$$

2.2 药液的制备 取杜仲 70% 乙醇提取浓缩制得的浸膏, 上 D101 大孔吸附树脂经水、50% 乙醇洗脱, 收集 50% 乙醇洗脱部位冷冻干燥后用 DMEM 完全培养液溶解, 配制成浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药液, 调节 pH 至 6.8, $0.22 \mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤除菌, 以 DMEM 完全培养液稀释成实验所需浓度, 浓度由预实验确定, 药液临用现配。

2.3 分组及给药 将对数期 ESF-1 细胞接种于 96 孔板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱培养, 待细胞贴壁后, 分为空白对照组、模型组、给药组, 各组细胞均设 5 个复孔。空白对照组: ESF-1 细胞给予 DMEM 完全培养液, 培养 48 h; 模型组: ESF-1 细胞培养 24 h, $40 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 UVA 或 $70 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 UVB 照射后, 给予不含药的 DMEM 完全培养液培养 24 h; 给药组: ESF-1 细胞培养 24 h, UVA 或 UVB 照射后分别给予 500, 250, 125, 62.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个含不同质量浓度药物的 DMEM 完全培养液, 培养 24 h。

2.4 指标测定

2.4.1 细胞活性 向每孔 (含 $80 \mu\text{L}$ 培养液) 加入 $20 \mu\text{L}$ 质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT, 孵育 4 h, 弃上清, 加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 置恒温培养振荡器内振荡 10 min, 酶标仪测定各孔在 492 nm 处吸光度 (A)。按公式 2 计算细胞活性。

$$\text{细胞活性} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\% \quad (2)$$

2.4.2 LDH, SOD, MDA 测定 按 LDH, SOD, MDA 测定试剂盒说明进行检测。

2.5 统计处理 所有数据均以 SPSS 13.0 软件完成数据分析, 计算资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均值比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 UVA 致细胞光老化的作用

3.1.1 对细胞活性的影响 结果见表 1, 与空白对照组相比, 模型组细胞活性显著降低, 二者具有显著性差异 ($P < 0.01$), 表明造模成功; 与模型组相比, 各给药组均能不同程度的增加细胞活性, 药物浓度为 250, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞活性明显增强 ($P < 0.05$), 表明杜仲能抵抗 UVA 对细胞活性的抑制。

3.1.2 对细胞培养液中 LDH 活力的影响 结果见表 1, 与空白对照组相比, 模型组细胞培养液中 LDH 活力明显升高 ($P < 0.05$), 表明造模型成功; 与模型组相比, 各给药组均能不同程度的降低培养液中 LDH 活力, 药物浓度为 250, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞培养液中 LDH 活力明显降低 ($P < 0.05$), 表明杜仲能够抑制 UVA 辐射引起的 ESF-1 细胞 LDH 的泄漏量。

3.1.3 对细胞培养液中 SOD 活力及 MDA 含量的影响 结果见表 1, 与空白对照组相比, 模型组细胞培养液中 SOD 活力明显降低 ($P < 0.05$), MDA 活力明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 各给药组均能不同程度的升高培养液中 SOD 活力、降低 MDA 含量, 药物浓度为 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞培养液中 SOD 活力明显升高 ($P < 0.05$)、MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$), 表明杜仲能够抵抗 UVA 辐射引起的细胞氧化损伤。

表 1 杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位对 UVA 致 ESF-1 细胞光老化模型的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	终浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力(A)	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	-	$0.416 \pm 0.020^{2)}$	$676.95 \pm 18.50^{1)}$	$16.54 \pm 1.75^{1)}$	$0.81 \pm 0.09^{1)}$
模型	-	0.293 ± 0.020	750.81 ± 37.35	13.39 ± 1.53	1.12 ± 0.11
杜仲 50% 乙醇洗脱部位	500	$0.336 \pm 0.026^{1)}$	$688.57 \pm 27.55^{1)}$	15.68 ± 1.51	1.00 ± 0.05
	250	$0.339 \pm 0.020^{1)}$	$688.50 \pm 30.35^{1)}$	$16.23 \pm 1.46^{1)}$	$0.94 \pm 0.10^{1)}$
	125	0.315 ± 0.024	695.62 ± 27.43	15.29 ± 0.92	0.98 ± 0.09
	62.5	0.308 ± 0.019	696.08 ± 44.55	14.40 ± 1.48	0.99 ± 0.08

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对 UVB 致细胞光老化的作用

3.2.1 对细胞活性的影响 结果见表 2, 与空白对照组相比, 模型组细胞活性显著降低, 二者有显著性差异 ($P < 0.01$), 表明造模成功; 与模型组相比, 各给药组均能不同程度的增加细胞活性, 浓度为 125,

250, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞活性明显增强 ($P < 0.05$), 表明杜仲能抵抗 UVB 对细胞活性的抑制。

3.2.2 对细胞培养液中 LDH 活力的影响 结果见表 2, 与空白对照组相比, 模型组细胞培养液中 LDH 活力明显升高 ($P < 0.05$), 表明造模成功; 与模型组

相比,各给药组均能不同程度的降低培养液中 LDH 活力,药物浓度为 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞培养液中 LDH 活力明显降低 ($P < 0.05$),表明杜仲能够抑制 UVB 辐射引起的 ESF-1 细胞 LDH 的泄漏量。

3.2.3 对细胞培养液中 SOD 活力及 MDA 含量的影响 结果见表 2,与空白对照组相比,模型组细胞培养液中 SOD 活力明显降低 ($P < 0.05$),MDA 含量

明显升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,各给药组均能不同程度的升高培养液中 SOD 活力、降低 MDA 含量,药物浓度为 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞培养液中 SOD 活力明显升高 ($P < 0.05$),MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$),表明杜仲能够抵抗 UVB 辐射引起的细胞氧化损伤。

表 2 杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位对 UVB 致 ESF-1 细胞光老化模型的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	终浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力(A)	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	-	$0.503 \pm 0.009^{2)}$	$590.14 \pm 25.03^{1)}$	$17.63 \pm 1.42^{1)}$	$0.84 \pm 0.1^{1)}$
模型	-	0.412 ± 0.034	671.13 ± 25.61	14.11 ± 0.84	1.04 ± 0.06
杜仲 50% 乙醇洗脱部位	500	$0.456 \pm 0.038^{1)}$	639.90 ± 25.44	14.70 ± 1.07	1.02 ± 0.11
	250	$0.464 \pm 0.023^{1)}$	631.11 ± 30.01	15.00 ± 1.07	0.96 ± 0.05
	125	$0.466 \pm 0.034^{1)}$	$571.30 \pm 33.90^{1)}$	$16.97 \pm 1.05^{1)}$	$0.89 \pm 0.10^{1)}$
	62.5	0.412 ± 0.012	647.51 ± 35.27	14.17 ± 1.02	1.01 ± 0.04

4 讨论

以上结果表明,杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位具有抗紫外线致成纤维细胞(ESF-1 细胞)光老化的作用。本研究在确定了杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位具有抗表皮角质形成细胞光老化作用的基础上^[3],又通过真皮成纤维细胞光老化模型,进一步研究其对皮肤真皮层细胞的影响。综合结果表明杜仲 50% 乙醇洗脱部位对紫外线致真皮成纤维细胞及表皮角质形成细胞光老化均有保护作用,证实了杜仲抗皮肤角质层衰老和真皮层衰老的潜力,为抗皮肤光老化新药和功效型化妆品的开发奠定基础。

本实验用不同浓度的药液处理光老化细胞,发现给药浓度在 $125, 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能最大程度的保护细胞,推测其保护作用与细胞培养液中 MDA 含量及 LDH 活力的降低有关。MDA 含量降低的机制一方面可能与药物增加 SOD 等抗氧化酶的活性有关,另一方面可能是药物本身也具有抗活性氧和清除自由基的能力;LDH 泄漏量减少的机制可能是药物通过抗氧化作用,维持了细胞膜结构和功能的完整性,至于药物是否有直接地抑制 LDH 合成或加速 LDH 代谢的作用尚待进一步的研究。

皮肤光老化的发生和发展与皮肤角质形成细胞和成纤维细胞的代谢情况有密切的关系。紫外线照射引起皮肤中胶原蛋白、TIMP-1、透明质酸含量降低^[4],弹性蛋白、MMPs 含量升高^[5],导致表皮层厚

度不均一,表皮真皮交界处界面扁平,胶原纤维断裂、紊乱,弹性纤维缠绕、片段化,毛细血管扩张,淋巴细胞增多,出现皮肤粗糙、松弛、下垂、起皱、良或恶性肿瘤等各种皮肤老化症状。因此,本课题组还将应用免疫组化法检测 MMPs 及其组织抑制剂(TIMPs)等相关蛋白的含量以及 RT-PCR 法检测相关蛋白的 mRNA 水平,从细胞分子水平上进一步阐明杜仲抗皮肤光老化的作用机制。

[参考文献]

- [1] 杨智荣,张宁,陈巧云.玉屏风散对皮肤光老化成纤维细胞生长增殖的影响[J].中医药信息,2009,26(6):76.
- [2] 李薇.长波紫外线对人角质形成细胞和成纤维细胞的形态、数目及诱导型一氧化氮合酶表达的影响[D].长沙:中南大学,2007:8.
- [3] 李建民,徐艳明,陈巧云,等.杜仲对 UVA 致 HaCat 细胞光老化保护作用的实验研究[J].中国美容医学杂志,2010,19(9):1316.
- [4] 夏济平,宋秀祖,毕志刚.紫外线对皮肤角质形成细胞和成纤维细胞产生 MMP-1 和 MMP-3 的影响[J].中国麻风皮肤病杂志,2006,22(1):11.
- [5] 周华,朱惠刚,张振农.紫外线对人角朊细胞和成纤维细胞抗原成分表达的影响[J].环境与健康杂志,1999,16(6):322.

[责任编辑 聂淑琴]