

虫草多糖对皮肤成纤维细胞抗氧化能力的影响

李华¹, 叶杰¹, 李伯勤², 孙祝美^{1*}

(1. 上海中医药大学生物教研室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 探讨虫草多糖(Cordyceps Polysaccharides, CP)对小鼠皮肤成纤维细胞抗氧化能力的影响。方法: 用 8-甲氧补骨脂素联合紫外线(8-MOP/UVA)制备皮肤成纤维细胞氧化模型, 通过检测细胞内丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px 含量反映细胞内自由基含量及清除能力, 并测定线粒体跨膜电位的破坏情况判断细胞线粒体功能。结果: 模型组细胞的自由基含量较对照组增多, 自由基清除酶系统活力下降, 虫草多糖保护组的自由基含量较模型组低, 自由基清除能力也有所改善; 线粒体跨膜电位的破坏程度也有所改善。结论: 虫草多糖能增加皮肤成纤维细胞的抗氧化能力。

[关键词] 虫草多糖; 成纤维细胞; 抗氧化; 自由基; 线粒体跨膜电位

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0160-03

Cordyceps polysaccharides reduce cell oxidative damage in cultured fibroblasts

LI Hua¹, YE Ting-jie¹, LI Bo-qing², SUN Zhu-mei^{1*}

(1. Department of Biology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To observe effects of cordyceps polysaccharides (CP) on reducing cell oxidative damage in cultured fibroblasts. **Methods:** Oxidative models were induced by 8-MOP/UVA. Cordyceps polysaccharides was administrated before 8-MOP/UVA. MDA, SOD, CAT, GSH-Px enzyme activities were measured for examination of free radicle amount and clearance ability of the cell. Mitochondrial transmembrane potential were tested to examine mitochondria function. **Results:** In the model group, free radicals increased compared with that in the control group and enzyme activities of free radical scavenging decreased. Severity of mitochondrial transmembrane potential damage were also relieved, which were reversed in CP protected groups. **Conclusion:** Cordyceps polysaccharide can increase the capacity of antioxidant in skin fibroblast cells.

[Key words] cordyceps polysaccharides (CP); fibroblast; anti-oxidation; free radicals; mitochondrial transmembrane potential

细胞的氧化损伤主要是由自由基引起, 自由基是线粒体在电子传递的过程中产生的。正常情况下, 机体的自由基清除系统可使自由基的产生与消除保持在极低的动态平衡水平上, 对机体是有利的,

但当体内蓄积过量自由基时, 损害细胞膜上的脂类和蛋白质等, 与生物体的衰老、癌症等相关^[1]。紫外线及其他辐射、疾病等会促使自由基大量产生, 这时就需要外源抗氧化物质的摄入, 而某些具有抗氧化作用的中药因其低毒性正被广泛研究。虫草(包括冬虫夏草和蛹虫草等)具有多种药理活性^[2-3], 对于虫草的抗氧化能力也有研究, 并发现虫草菌丝可减轻自由基引起的细胞氧化损伤^[4]。虫草多糖是虫草的主要化学成分, 本实验室也发现虫草多糖对小鼠皮肤的光老化具有保护作用^[5], 在皮肤成纤维细胞中也能影响胶原的合成^[6]。本文拟从线粒体功能改变着手研究虫草多糖对小鼠皮肤成纤维细胞抗氧化

[收稿日期] 2010-01-04

[基金项目] 上海市教育委员会青年基金(05cz02); 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50301)

[作者简介] 李华, 女, 博士, 讲师, 从事中医药抗衰老研究, Tel: (010) 51322585, E-mail: lhuagirl@163.com

[通讯作者] * 孙祝美, 女, 博士, 讲师, 从事中医药防治高血压及心脏病研究, Tel: (021) 51322585, E-mail: sunzhumei2000@yahoo.com.cn

能力的影响。

1 材料和方法

1.1 药物和制剂 虫草多糖由中草药冬虫夏草提取, 纯度大于 95%, 由上海中医药大学肝病所提供。PRMI 1640 培养基、EDTA-胰酶购自 GIBCO 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司, 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。线粒体跨膜电位检测试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司。

1.2 动物 昆明种小白鼠, 出生 24 h 内, 用于原代皮肤成纤维细胞培养, 由上海中医药大学实验动物中心提供。动物合格证号 SCXK(沪) 2007-0005。

1.3 方法

1.3.1 原代皮肤成纤维细胞的培养 出生 24 h 内的新生鼠于 75% 酒精浸泡片刻, 取出, 置于 Hank's 缓冲液, 取背部皮肤, 依次于 Hank's 缓冲液、1640 培养液、20% 胎牛血清的 1640 培养液中漂洗, 剪碎、植块培养。

1.3.2 细胞氧化损伤模型建立及虫草多糖的保护 将培养 2~3 代的皮肤成纤维细胞转入六孔板, 细胞长至 50%~60%。正常对照组: 正常培养液培养; 氧化损伤模型组: 加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 8-MOP 预先孵育 24 h, 予 UVA 照射 $2.7 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射, (UVA 功率为 $190 \text{ } \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$), 造模完成后换正常培养液; 虫草多糖保护组: $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 8-MOP 与虫草多糖共同孵育 24 h 后, 予 UVA 照射 $2.7 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射, 据前期实验结果选择虫草多糖浓度为 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3.3 MDA 含量及酶活力检测 造模后 24 h, 取细胞培养液测 MDA, 细胞用胰酶消化收集, PBS 洗 2 遍, 各组加 400 μL 三蒸水, 反复冻溶 3 次, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清测 SOD, CAT, GSH-Px 酶活力。方法按试剂盒说明书进行, 每次检测同时进行总蛋白检测, 重复 3 次。

1.3.4 线粒体跨膜电位检测 细胞造模后 24 h 用试剂盒检测线粒体跨膜电位。操作方法按照说明书进行。结果用荧光显微镜观察, 正常细胞在双色滤光片观察则为绿 ++ 红 ++ (高绿高红), 如在同一滤光片下观察则为黄绿色。线粒膜电位破坏的细胞在双色滤光片观察则为绿 ++ 红 + (高绿低红), 如在同一滤光片下观察则为绿色。记数并计算线粒体跨膜电位被破坏的细胞的百分比。

1.4 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间以 t 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 虫草多糖对细胞活力的影响 MTT 法检测细胞活力。结果显示: 细胞氧化损伤模型组细胞活力 24 h 内即已较对照明显下降, 虫草保护组有所改善。由于该原代细胞增殖较慢, 所以在检测的 4 d 里细胞的增殖仍成上升趋势。见图 1。

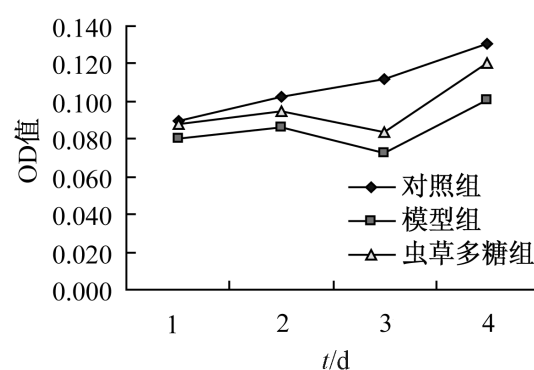


图 1 虫草多糖对细胞活力影响

2.2 对细胞自由基含量的影响 MDA 是氧自由基作用于脂质的不饱和脂肪酸生成的过氧化脂质分解形成, 间接反映细胞内自由基含量。在模型组, MDA 较对照组明显增高, 虫草多糖保护组 MDA 含量则较模型组明显降低, 结果见表 1。

表 1 虫草多糖对细胞内自由基的影响

组别	浓度 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA / $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白
对照	—	$0.913 \pm 0.034^{1)}$
模型	—	1.015 ± 0.055
虫草多糖	100	$0.832 \pm 0.004^{1)}$

注: 与模型组比较, $^{1)} P < 0.05$ (下同)

2.3 对细胞清除自由基相关酶的影响 在模型组, 该 3 项指标较对照组明显降低, 虫草多糖保护组较模型组明显增高, 结果见表 2。

表 2 虫草多糖对细胞清除自由基酶系统活力的影响

组别	SOD 活力 / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白	GSH-Px 活力 / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白	CAT 活力 / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白
对照	$0.332 \pm 0.014^{1)}$	$0.759 \pm 0.221^{1)}$	$39.580 \pm 2.078^{1)}$
模型	0.303 ± 0.004	0.259 ± 0.038	21.243 ± 1.919
虫草多糖	$0.346 \pm 0.009^{1)}$	$0.463 \pm 0.042^{1)}$	$53.871 \pm 12.015^{1)}$

2.4 对线粒体跨膜电位的影响 检测线粒体跨膜电位, 计数跨膜电位破坏的细胞数, 结果显示模型组跨膜电位破坏的细胞比例明显高于正常对照组, 虫草多糖组的比例明显低于模型组, 差异均有显著性, $P < 0.05$ 。结果见表 3。

表 3 虫草多糖对线粒体跨膜电位的影响

组别	浓度 / ng · mL ⁻¹	跨膜电位破坏的细胞数 / %
对照	—	1.73 ± 0.002 1 ¹⁾
模型	—	4.23 ± 0.002 1
虫草多糖	100	2.27 ± 0.001 5 ¹⁾

3 讨论

虫草多糖是冬虫夏草的主要活性成分之一,具有抗肝纤维化、抗肿瘤、免疫调节、降血糖、抗急慢性肾衰等药理作用^[5-9],抗衰老方面的研究相对较少,李连德等^[10]采用从虫草深层发酵产物中提取的多糖进行果蝇抗衰老试验,结果表明,不同来源的虫草多糖对果蝇寿命均有不同程度的延长作用,从而证明虫草多糖有延缓衰老的作用,并且延寿的效果随纯度的增大而提高。本实验室也发现虫草多糖在小鼠体内均对光老化具有保护作用。细胞衰老是整体衰老的基础,根据衰老的自由基学说,细胞老化时自由基清除能力下降,细胞内自由基增多,攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸,诱发膜上饱和脂肪酸过氧化反应,引起膜脂间或脂质与膜蛋白之间的交联,导致膜的结构和功能发生改变。所以抗衰老的一个方面就是细胞的抗氧化,即清除自由基。本实验通过光敏药物合并 UVA 诱导细胞氧化损伤,并用虫草多糖先期进行保护,分析线粒体的功能,从而观察虫草多糖对细胞抗氧化能力的影响。

成纤维细胞是真皮中最主要的细胞成分,在皮肤光老化的形成中具有重要作用,对成纤维细胞在皮肤光老化形成中的作用进行研究,可以为阐明皮肤光老化的形成机制及寻找有效的防治手段提供理论依据,同时也为阐明细胞衰老与器官老化之间的关系提供线索。以 8-MOP/UVA 作用于体外培养的真皮成纤维细胞可以为体外研究皮肤光老化提供很好的模型^[11-12]。

本实验结果中,8-MOP/UVA 可引起细胞活力下降,虫草多糖保护组的细胞活力高于模型组。MDA 是自由基对不饱和脂肪酸引发的脂质过氧化作用的产物,其含量的多少间接反映细胞内自由基的量;SOD、CAT 及 GSH-Px 等酶类组成机体内自由基清除的酶系统。在正常情况下,机体代谢过程中产生的超氧阴离子自由基被细胞的 SOD 歧化为 H₂O₂,后者再由 CAT 和 GSH-Px 催化降解为水和氧。本实验结果发现在 8-MOP/UVA 制备的氧化模型中 MDA 较对照增加,自由基清除酶系统各种酶活力均降低,而

虫草多糖保护组的细胞,MDA 的量及各种酶活力的改变较模型组均有所改善。另外线粒体跨膜电位也是反应线粒体功能的指标。在实验中发现,模型组线粒体跨膜电位遭破坏的细胞数较对照组也有明显增加,而虫草多糖保护组则有明显改善。据本实验结果可看出虫草多糖可通过保护线粒体功能增加细胞的抗氧化能力,可能为虫草多糖抗光老化的机制之一。

[参考文献]

- [1] Poulsen H E, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion[J]. *European Journal of Cancer Prevention*, 1998, 7(1) : 9.
- [2] Zhu J S, Halpem G M, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part [J]. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1998(4) : 289.
- [3] Zhu J S, Halpem G M, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part [J]. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1998(4) : 429.
- [4] 顾宇翔,宋聿文,范立强,等.虫草减轻自由基引起的细胞氧化损伤[J]. *食品科学*, 2008, 29(2) : 387.
- [5] 李华,叶杰,李伯勤,等.虫草多糖对 8-MOP/UVA 诱导光老化的皮肤成纤维细胞胶原的影响[J]. *上海中医药大学*, 2009, 23(4) : 75.
- [6] 李华,叶杰,李伯勤,等.虫草多糖对小鼠皮肤光老化的保护作用[J]. *时珍国医国药杂志*, 2008, 19(159) : 2679.
- [7] 郭风彩,陈国民.冬虫夏草多糖的药理学研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2006, 22(7) : 999.
- [8] 尹鸿萍,王小波,陈希.虫草多糖治疗家犬夹闭肾动脉引起的急性肾衰[J]. *生物加工过程*, 2007, 5(4) : 70.
- [9] 尹鸿萍,王小波,陈涛.虫草多糖对腺嘌呤诱发慢性肾衰大鼠的治疗作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(6) : 451.
- [10] 李连德,樊美珍,李增智.14 种虫草多糖对果蝇成虫寿命的影响的试验[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(6) : 428.
- [11] Ma W, Wlaschek M, Tanccheeva-Poor I, et al. Chronological ageing and photoaging of the fibroblasts and the dermal connective tissue [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2001, 26(7) : 592.
- [12] Yin L, Morita A, Tsuji T. Skin aging inducing by ultraviolet exposure and tobacco smoking: Evidence from epidemiological and molecular studies[J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2001, 17(4) : 178.