

· 短篇论著 ·

青蒿素对中波紫外线照射小鼠 IL-10、TNF- α 表达的影响

惠海英 张美芳 吴娜 李巧茹

【摘要】目的 研究青蒿素对紫外线照射后小鼠血清及皮肤组织 IL-10、TNF- α 表达的影响,初步探讨青蒿素光保护作用的可能机制。**方法** 40 只 BALB/C 小鼠随机分为 4 组即对照组(C),NB-UVB 照射组(UV),青蒿素组(AR),青蒿素 + NB-UVB 组(AR + UV)。C 组给予生理盐水灌胃,UV 组给予生理盐水灌胃后 NB-UVB 照射,AR 组给予青蒿素灌胃,AR + UV 组给予青蒿素灌胃后进行 NB-UVB 照射。各组灌胃均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每日 1 次,持续 2 周。UVB 照射每次剂量 1 J/cm^2 ,每日 1 次,共 2 周,累积剂量 14 J/cm^2 ,14 d 后取小鼠血清及背部皮肤组织。采用酶联免疫吸附试验检测各组小鼠血清及皮肤组织 IL-10、TNF- α 表达的变化。**结果** 与 C 组相比,UV 组血清及皮肤组织中 IL-10 明显增加,皮肤组织中 TNF- α 亦明显增加,有显著性差异($P < 0.05$),AR 组对 IL-10、TNF- α 的浓度没有明显影响($P > 0.05$);AR + UV 组与 UV 组相比,IL-10、TNF- α 的浓度增加明显减少,有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 青蒿素对紫外线所致小鼠光损伤的炎症因子 IL-10、TNF- α 的产生有一定的抑制作用,从而提示系统性应用青蒿素对 UVB 致小鼠光损伤有保护作用。

【关键词】 青蒿素; 白细胞介素 10; 肿瘤坏死因子 α

近年来,紫外线对人体的损伤已引起人们的广泛关注,资料表明日光中的紫外线特别是中波紫外线(ultraviolet B,UVB)与皮肤的光老化、光损伤和光致癌的发生密切相关。中波紫外线可被表皮和真皮上层吸收,引起红斑、晒斑、色素沉着并可致癌。因而开发紫外线防护药物就显得尤为重要。

青蒿为黄花蒿的地上部分,青蒿素(Artemisinin,AR)为其主要化学成分。现代药理研究发现,青蒿中含有多种药用成分具有抗菌、抗寄生虫、解热抗炎以及免疫抑制等作用,且毒性极低,无毒副作用。很多学者将青蒿素及其衍生物用于光敏性皮肤病的治疗^[1-4],取得了较好的疗效,但机制尚不清楚。本文就其对紫外线辐射引起光损伤的相关细胞因子进行了初步研究。

IL-10、TNF- α 是紫外线引起光损伤的两个重要细胞因子,为了观察青蒿素对小鼠的光保护作用,我们应用(narrow-band ultraviolet B,NB-UVB)照射小鼠模型,观察了其对血清及皮肤组织 IL-10、TNF- α 的影响,为青蒿素抗紫外线辐射的研究及其药用价值的开发提供参考。

一、材料和方法

1. 实验药物:青蒿素,西安昊轩生物科技有限公司,纯度 99.98%。

2. 实验动物:清洁级 BALB/C 小鼠 40 只,雌性,质量(20 ± 2)g,6~8 周龄,购自西安交通大学医学院实验动物中心。

3. 主要试剂和仪器:IL-10、TNF- α ELISA 试剂盒(联科生物技术有限公司)。酶标仪,SS-03B 型光疗仪(上海希格玛高技术有限公司)。

4. 中药制备:青蒿素用生理盐水充分混悬,浓度为 4 mg/ml 。

5. 动物分组: BALB/C 小鼠 40 只,按清洁动物标准喂养。小鼠随机分为 4 组即对照组(C),NB-UVB 照射组(UV),青蒿素组(AR),青蒿素 + NB-UVB 组(AR + UV)。每组 10 只小鼠。C 组给予生理盐水灌胃,UV 组给予生理盐水灌胃后 NB-UVB 照

射,AR 组给予青蒿素灌胃,AR + UV 组给予青蒿素灌胃后进行 NB-UVB 照射。

6. 动物脱毛:实验前适应环境 1 周,自由进食、饮水。1 周后将所有小鼠背部皮肤剃毛,暴露面积约 $3 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 。第 1 次脱毛时以眼科剪刀剪短背部鼠毛至 1 mm 长,然后用电动剃须刀将剩余鼠毛剃净。以后每次照射前用电动剃须刀脱毛。

7. 中药灌胃:各组灌胃均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每日 1 次,持续 2 周。

8. NB-UVB 照射:小鼠灌胃后 1 h 给予紫外线照射。紫外线灯管距小鼠约 25 cm,NB-UVB 波长 311 nm。每天 1 次,每次照射剂量为 1.0 J/cm^2 ,共 14 d。UVB 总照射剂量累计为 14 J/cm^2 。每周使用紫外线辐照度监视计检测紫外线光疗仪辐照强度 1 次,及时调整照射时间以保证照射剂量精确。

9. 标本取材:最后 1 次照射结束 24 h 内,眼眶采血,分离血清,分装后置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存待用。同时将小鼠断颈处死后,立即取下背部脱毛处全层皮肤(不含皮下脂肪),冷冻于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内保存待用。

10. 皮肤组织匀浆的制备:(1)每个小鼠皮肤组织标本取 0.50 g ,在预冷的生理盐水中漂洗,除去血液,用滤纸拭干,用眼科小剪尽量剪碎组织块,将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中。(2)用量筒量取 4.5 ml 冷生理盐水,倒入匀浆器中进行充分匀浆,使组织匀浆化。(3)将浆液以 4000 r/min 的速度离心 10 min 。(4)取上清液进行各指标测定。

11. IL-10、TNF- α 检测:按 ELISA 试剂盒规定步骤操作。配标准品,留空白孔,分组加样品及标准品,洗板,加生物素化抗体工作液,洗板,加酶结合物工作液,洗板,加洗涤液板,加显色液,测量 OD450 值(10 min 内)。IL-10、TNF- α 浓度与 OD450 值之间呈正相关,通过 Curve Expert 1.3 分析软件绘制标准曲线;由标准方程求出各组样品中 IL-10、TNF- α 浓度。

12. 统计学分析:以 SPSS 14.0 统计软件分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,多组间比较采用多个样本均数比较的方差分析法。对组间总的比较差异有统计学意义者进一步用 SNK- q 检验法做两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。相关性采用 Pearson 相关性分析。

二、结果

1. 血清 IL-10、TNF- α 水平(表 1): (1) 与 C 组相比, UV 组及 AR + UV 组 IL-10 明显增加, 有显著性差异 ($P < 0.05$)、AR 组 IL-10 的浓度轻度增加, 但无明显差异 ($P > 0.05$); AR + UV 组与 UV 组相比, IL-10 的浓度增加明显减少, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。 (2) 各组小鼠血清 TNF- α 低于 5 pg/ml, 没有检测出来。

表 1 各实验组血清中 IL-10 表达水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 只数 | IL-10 |
|-----------|----|--------------------------------|
| C 组 | 10 | 4.62 \pm 1.22 |
| UV 组 | 10 | 28.91 \pm 10.57 ^a |
| AR 组 | 10 | 5.88 \pm 1.04 |
| AR + UV 组 | 10 | 13.33 \pm 5.15 ^{ab} |
| F 值 | | 278.71 |
| P 值 | | <0.05 |

注: 与 C 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 UV 组相比, ^b $P < 0.05$

2. 皮肤组织 IL-10、TNF- α 水平(表 2): 与 C 组相比, UV 组及 AR + UV 组 IL-10、TNF- α 明显增加, 有显著性差异 ($P < 0.05$), AR 组 IL-10、TNF- α 的浓度无明显变化 ($P > 0.05$); AR + UV 组与 UV 组相比, IL-10、TNF- α 的浓度增加明显减少, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 2 各实验组皮肤组织中 IL-10、TNF- α 表达水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 只数 | IL-10 | TNF- α |
|-----------|----|---------------------------------|---------------------------------|
| C 组 | 10 | 8.62 \pm 2.54 | 3.22 \pm 2.65 |
| UV 组 | 10 | 55.71 \pm 28.29 ^b | 36.53 \pm 16.13 ^a |
| AR 组 | 10 | 7.08 \pm 3.71 | 1.98 \pm 1.39 |
| AR + UV 组 | 10 | 36.53 \pm 16.13 ^{ac} | 26.08 \pm 21.05 ^{ac} |
| F 值 | | 434.23 | 232.75 |
| P 值 | | <0.05 | <0.05 |

注: 与 C 组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 UV 组相比, ^c $P < 0.05$

3. 皮肤组织 IL-10、TNF- α 相关性分析: AR + UV 组的 IL-10 及 TNF- α 表达水平不相关 ($r = 0.37, P > 0.05$)。

三、讨论

紫外线照射对皮肤有潜在的损害, 也是光线相关性疾病发生的重要诱发因素。中波紫外线可被表皮和真皮上层吸收, 其诱导的皮肤损伤和氧化应激与各种皮肤疾病如光老化、皮肤炎症和皮肤肿瘤都密切相关; 长期慢性紫外线辐射诱导皮肤炎症的发生, 产生大量的炎症因子, 导致不可逆的细胞损伤, UV 照射后其分泌的多种炎症因子及免疫调节因子对机体免疫系统调节有重要作用。如 UV 照射后角质形成细胞产生细胞因子 IL-1、IL-4、IL-6、IL-10 和 TNF- α 增加, 导致皮肤免疫抑制^[5,6]。

IL-10 又被称为细胞素合成抑制因子, 是近年来发现的一种细胞因子。IL-10 是一种由多种细胞生成的具有多种生物学活性的细胞因子, 能调节 T 细胞、B 细胞、肥大细胞及造血细胞的分化发育, 在炎症免疫反应、肿瘤、病毒感染、造血系统等多方面起重要作用。

惠海英, 张美芳, 吴娜, 等. 青蒿素对中波紫外线照射小鼠 IL-10、TNF- α 表达的影响 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(19): 6058-6059.

TNF- α 的生物学效应较多, 可诱导炎症反应, 在炎症反应中具有中枢调节作用, 与 UVB 辐射引起的炎症反应密切相关。UV 照射后, 皮肤神经末梢释放降钙素, 其诱导肥大细胞释放 TNF- α , TNF- α 可诱导表皮朗格汉斯细胞迁移至局部淋巴结, 造成该部位朗格汉斯细胞数量锐减, 对变应原的抗原提呈功能下降^[7]。同时, TNF- α 还是细胞发生凋亡的诱导因子, 它在 UVB 诱导的皮肤细胞凋亡过程中发挥着主要作用, 长期的 UVB 辐射可剂量依赖性增加细胞凋亡对 TNF- α 的易感性, 并且 TNF- α 还参与了 UVB 诱导角质形成细胞 (KC) 凋亡的机制。UV 对人体免疫系统的影响极其复杂, UV 照射后不是单一的反应而是启动一系列变化, 相互作用引起免疫功能受损。

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。青蒿素又名黄蒿素, 是一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物。青蒿素及其衍生物有抗疟、抗孕、抗纤维化、抗血吸虫、抗弓形虫、抗心律失常和肿瘤细胞毒性等作用, 并具有复杂的免疫调节机制^[8], 这为其光保护作用提供了一定的理论依据。近年来, 在临床上以青蒿为主的复方用来治疗风湿或类风湿疾病、系统性红斑狼疮、盘形红斑狼疮、皮肤病 (湿疹、多形红斑、多形日光疹、夏令水疱病) 等, 均取得了较好的疗效。有学者认为青蒿素有抑制变应性皮炎, 抗光感作用^[1-3], 这为其光保护作用提供了一定的临床依据。

本实验以 ELISA 方法分析青蒿素是否对 UVB 损伤模型中的 IL-10、TNF- α 变化有影响, 结果显示与 UVB 辐射组相比, AR 组血清及皮肤组织中 IL-10 表达处于较低水平, 差异具有显著性。同时 AR 组皮肤组织中 TNF- α 表达与 UVB 辐射组相比亦较低, 差异具有显著性。说明青蒿素能下调紫外线照射后小鼠血清 IL-10 及局部皮肤组织中 IL-10、TNF- α 的表达, 提示青蒿素的光保护作用机制可能与免疫炎症因子 IL-10、TNF- α 有关, 它可能参与了紫外线照射所致的免疫抑制作用。其作用机制有待于进一步研究, 为临床选药组方提供更多的实验依据。另外, 本研究结果还显示, IL-10 和 TNF- α 在青蒿素组的表达不相关, 提示二者之间在青蒿素参与紫外线的免疫抑制中可能是通过不同的作用途径起作用, 尚需在今后的研究工作中进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] 陈华, 高玉祥. 青蒿琥酯治疗湿疹-皮炎及光敏性皮肤病临床观察. 蚌埠医学院学报, 1991, 16: 251-252.
- [2] 余其斌, 高玉祥. 青蒿琥酯治疗多形性日光疹 50 例. 中华皮肤科杂志, 1999, 32: 55-56.
- [3] 邓丹琪, 陈浩, 周晓鸿, 等. 蒿甲醚治疗多形性日光疹、慢性光化性皮炎的临床疗效观察. 昆明医学院学报, 2006, 27: 55-58.
- [4] 钟嘉熙, 刘亚敏, 刘红姣, 等. 青蒿琥酯治疗系统性红斑狼疮的安全性观察. 中药新药与临床药理, 2002, 11: 336.
- [5] Kindo S. The roles of cytokines in photoaging. J Dermatol Sci, 2000, 23: 30-36.
- [6] Artukovic M, Ilic M, Kusteleaga J, et al. Influence of UV radiation on immunological system and occurrence of autoimmune diseases. Coll Antropol, 2010, 34: 175-178.
- [7] Bennett MF, Robinson MK, Baron ED, et al. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging. J Investing Dermatol Symp Proc, 2008, 13: 15-19.
- [8] 舒贝, 马行一. 青蒿素及其衍生物的免疫调节作用. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6: 176-178.

(收稿日期: 2012-04-17)

(本文编辑: 戚红丹)