

· 基础研究 ·

白藜芦醇对中波紫外线照射致成纤维细胞氧化损伤的影响

严月华 周新 宋韬 吴剑波 盛晚香 刘小明 袁春蓉

【摘要】目的 探讨白藜芦醇对中波紫外线(UVB)照射致体外培养人皮肤成纤维细胞氧化损伤的预防和治疗作用。**方法** 实验分为 5 组:正常对照组、白藜芦醇组、UVB 照射组、UVB 照射后白藜芦醇处理组及白藜芦醇预处理后 UVB 照射组。细胞处理后用甲基噻唑基四唑(MTT)法检测细胞增殖活性,酶生化法检测细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量。**结果** 白藜芦醇浓度 > 100 $\mu\text{mol/L}$ 时可抑制成纤维细胞增殖, < 100 $\mu\text{mol/L}$ 时可促进成纤维细胞增殖,最佳作用浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$;UVB 照射后细胞活性下降 31.7%,细胞 SOD 活性降低、MDA 产生增加;与单纯 UVB 照射相比,UVB 照射前或照射后用白藜芦醇处理均能使成纤维细胞存活率提高、SOD 活性增强、MDA 产生减少。**结论** 低浓度白藜芦醇可促进成纤维细胞增殖,从而对因 UVB 照射而损伤的体外培养成纤维细胞起到保护作用。

【关键词】 中波紫外线; 白藜芦醇; 人皮肤成纤维细胞

Resveratrol protects against oxidative damage of fibroblasts irradiated with UVB YAN Yue-hua*, ZHOU Xin, SONG Tao, WU Jian-bo, SHENG Wan-xiang, LIU Xiao-ming, YUAN Chun-rong. * Dermatology Department, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China
Corresponding author: SONG Tao, Email: songtao2829@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of resveratrol against oxidative damage to cultivated fibroblasts irradiated with UVB. **Methods** Fibroblasts from normal human skin cultured in vitro were divided into 5 groups (a normal control group, a group irradiated with UVB, a group treated with resveratrol before UVB irradiation, and a group treated after irradiation). A monolayer of fibroblasts was irradiated with UVB at 60 mJ/cm^2 . The vitality of the cells was measured using the methylthiazol tetrazolium (MTT) method. The activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) content were determined using enzyme biochemistry. **Results** Resveratrol over 100 μM inhibited the proliferation of fibroblasts. Resveratrol under 100 μM improved the proliferation of cells. The optimal concentration was 50 μM . UVB irradiation decreased the vitality of the cells and SOD activity, and it significantly enhanced MDA content. **Conclusions** Resveratrol treatment before or after UVB irradiation elevates the survival rate of fibroblasts, enhances the activity of SOD, and decreases MDA content. Resveratrol at low concentration could improve the proliferation of fibroblasts, and at high concentration could inhibit their proliferation. Resveratrol at 50 μM relieves the inhibited proliferation of fibroblasts damaged by UVB irradiation.

【Key words】 Ultraviolet B; Resveratrol; Dermal fibroblasts

紫外线对皮肤成纤维细胞的作用主要表现为氧化损伤,紫外线照射人体皮肤,产生 $\text{O}_2^- \cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 等活性氧族,使自由基增多。所谓氧化损伤是指氧化压力导致化学或代谢来源的活性氧族(reactive oxygen species, ROS)产生而引起的细胞或组织损伤。目前,寻找天然抗紫外线照射剂,阻止紫外线对皮肤的损伤是国内外研究的热点。白藜芦醇是一种天然的多酚植物抗毒素,存在于葡萄、红酒、花生、桑葚和水果中,是一种

有效的抗氧化剂,其是否具有对抗紫外线致皮肤成纤维细胞的损伤作用国内至今未见报道。本研究通过观察白藜芦醇对中波紫外线(ultraviolet B, UVB)照射下细胞的增殖能力、抗氧化能力等的影响,探讨白藜芦醇对皮肤成纤维细胞的光保护作用。

材料和方法

一、材料

试剂:白藜芦醇,纯度 98% 以上,广州华南农业大学提供;高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM);胎牛血清;胰蛋白酶;甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT),由美国 Sigma 公司生产;超氧化物歧化酶(su-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.07.006

作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院皮肤科(严月华、宋韬、吴剑波、盛晚香、袁春蓉),检验科(周新);武汉大学人民医院皮肤科(刘小明)

通信作者:宋韬,Email:songtao2829@sina.com

peroxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒由南京建成生物制品有限公司提供。

仪器:上海产 SS-03B 型紫外线辐照仪,UVB 光谱 290~320 nm,峰值 315 nm;深圳产 Rayto 6000 型酶联免疫分光光度仪;美国贝克曼公司产 DU530 型紫外-可见分光光度仪。

二、细胞培养

取无菌状态下“包皮环切术”所切除的正常皮肤,要求供皮者年龄为 10~30 岁,非瘢痕体质。皮肤组织置于 75% 的酒精中漂洗数次后,迅速浸入含有低浓度双抗的磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 中。无菌条件下去除皮下组织,漂洗后剪成 0.5 cm × 0.5 cm 大小,置于培养皿中,加入 0.25% 的胰酶消化,4 °C 下过夜,次日分离表皮和真皮。培养基为 DMEM (含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素钠、100 mg/ml 硫酸链霉素),于 37 °C、5% CO₂ 条件培养箱中培养,待成纤维细胞生长至约 80% 融合时,用 1:2 的胰酶 (浓度为 0.25%) 消化细胞,按 1:3 或 1:4 进行传代培养。实验用细胞为处于对数生长期第 3~8 代细胞。

三、观察不同浓度白藜芦醇对成纤维细胞增殖的影响

选择生长状态良好的指数生长期细胞,随机分为 7 组,接种于 96 孔板,先培养 24 h,然后各组分别用含白藜芦醇浓度为 0 μmol/L、10 μmol/L、30 μmol/L、50 μmol/L、70 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L 的培养液培养 24 h 后,用 MTT 法检测,求最适作用浓度。每组 3 个复孔,共做 3 次。

四、实验分组及处理方法

选择生长状态良好的指数生长期细胞,随机分为正常对照组 (无 UVB 照射、无白藜芦醇作用)、白藜芦醇组 (用 50 μmol/L 白藜芦醇培养 24 h)、UVB 照射组 (UVB 照射后换液培养 24 h)、UVB 照射后白藜芦醇处理组 (UVB 照射后换 50 μmol/L 白藜芦醇培养 24 h) 和白藜芦醇预处理后 UVB 照射组 (50 μmol/L 白藜芦醇培养 24 h 后用 UVB 照射,照射后换液培养 24 h)。每组设 3 个复孔,共做 3 次。收集各组细胞进行检测。

UVB 照射应用台式紫外辐照仪,对置于一薄层 PBS 里的细胞进行照射,能量密度为 60 mJ/cm²,并以配套的测定仪定量 UVB 剂量。

五、测定细胞增殖活性

采用 MTT 法:上述处理后的各组细胞,每孔加入含 0.5 mg/ml MTT 的培养基 200 μl,37 °C 孵育 1 h,倒置弃去培养液,加入酸化异丙醇 200 μl,振荡致颗粒完

全溶解,用酶标仪在测定波长 570 nm (参考波长 630 nm) 处测定各孔的光密度 (optical density, OD) 值。计算各浓度组的促进增殖率和抑制增殖率:某浓度组促进增殖率 = (该浓度组 OD 值 - 对照组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%,抑制增殖率 = (对照组 OD 值 - 该浓度组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。

六、测定 SOD 活性、MDA 含量

采用酶化学法:各组细胞按上述方法处理完毕后,继续培养 4 h,离心收集细胞,用冷 PBS 清洗 2 次,超声破碎细胞,严格按照试剂盒说明书检测 SOD 活性及 MDA 含量。

七、统计学方法

各组数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 11.5 软件对结果进行单因素方差分析和 *q* 检验。

结 果

一、不同浓度白藜芦醇对成纤维细胞增殖活性的影响

白藜芦醇浓度 ≥ 100 μmol/L 时,成纤维细胞增殖活性下降,100 μmol/L 以内增殖活性增高,其中 50 μmol/L 时增殖活性最强,见表 1。

表 1 不同浓度白藜芦醇对成纤维细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

白藜芦醇浓度	样本数	OD 值	促进增殖率 (%)
0 μmol/L	9	1.42 ± 0.18	0
10 μmol/L	9	1.45 ± 0.16	2.1
30 μmol/L	9	1.63 ± 0.17 ^a	14.8
50 μmol/L	9	1.82 ± 0.21 ^b	28.2
70 μmol/L	9	1.65 ± 0.18 ^a	16.2
100 μmol/L	9	1.33 ± 0.15	-6.3
200 μmol/L	9	0.94 ± 0.11 ^c	-33.8

注:与 0 μmol/L 比较,^a*P* < 0.05,^b*P* < 0.01,^c*P* < 0.01

二、UVB 照射、50 μmol/L 白藜芦醇处理对成纤维细胞增殖活性的影响

UVB 照射组细胞活性下降平均幅度为 31.7%;与 UVB 照射组相比,预先加入 50 μmol/L 白藜芦醇处理的细胞活性平均可恢复 26.1%;与 UVB 照射组相比,UVB 照射后白藜芦醇处理组细胞活性平均可恢复 22.5%,后 2 组间差异无统计学意义,见表 2。

表 2 各组成纤维细胞增殖活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	样本数	OD 值	抑制增殖率 (%)
正常对照组	9	1.42 ± 0.18	0
UVB 照射组	9	0.90 ± 0.12 ^a	31.7
白藜芦醇预处理后 UVB 照射组	9	1.34 ± 0.15 ^b	5.6
UVB 照射后白藜芦醇处理组	9	1.29 ± 0.21 ^b	9.2

注:与正常对照组相比,^a*P* < 0.01;与 UVB 照射组相比,^b*P* < 0.01

三、50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理、UVB 照射对成纤维细胞 SOD 活性、MDA 含量的影响

与正常对照组相比,UVB 照射组 SOD 活力明显降低,MDA 含量增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 UVB 照射组比较,用白藜芦醇预处理或 UVB 照射后用白藜芦醇处理的细胞 SOD 活力均有显著提高,MDA 的含量均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组成纤维细胞 SOD 活性、MDA 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	SOD 活性 (U/mg 蛋白)	MDA 含量 (nmol/mg 蛋白)
正常对照组	9	41.60 \pm 4.06	3.21 \pm 0.95
UVB 照射组	9	27.79 \pm 2.61 ^a	5.74 \pm 0.69 ^a
白藜芦醇预处理后 UVB 照射组	9	35.64 \pm 2.73 ^b	4.73 \pm 0.45 ^b
UVB 照射后白藜芦醇处理组	9	37.78 \pm 2.92 ^b	4.53 \pm 0.54 ^b

注:与正常对照组相比,^a $P < 0.01$;与 UVB 照射组相比,^b $P < 0.05$

讨 论

紫外线是一种重要的氧化应激源,经常被用来诱导氧化损伤,多种生物分子可经由 UVB 照射而产生活性氧中间产物。UVB 照射产生的活性氧活性很强,可通过一系列的反应,再生成一些活性更强、寿命更长而且危害更大的过氧化物,如脂氢过氧化物,进一步造成细胞损伤。紫外线照射后,细胞中产生的活性氧可以破坏细胞蛋白质和酶的活性,如使细胞 SOD 活性降低。

近年有学者研究白藜芦醇对紫外线照射永生角质形成细胞(HaCat cell)的影响,得出了不同的结论:Seve 等^[1]认为,白藜芦醇会加重 UVA 照射 HaCat 细胞所引起的 DNA 损伤;Chen 等^[2]的研究显示,白藜芦醇能减轻 UVA 照射 HaCat 细胞所引起的氧化损伤;Park 和 Lee^[3]研究认为,白藜芦醇对 UVB 照射 HaCat 细胞具有保护作用。而白藜芦醇对 UVB 照射人皮肤成纤维细胞的损伤作用有怎样的影响,国内外尚鲜见报道。

本研究采用 MTT 法测定细胞增殖活性,研究结果显示白藜芦醇在低浓度($< 100 \mu\text{mol/L}$)时促进成纤维细胞增殖,较高浓度($\geq 100 \mu\text{mol/L}$)则抑制成纤维细胞增殖,50 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞增殖活性最强。

SOD 的活性可间接反映机体清除氧自由基的能

力。紫外线直接作用于成纤维细胞,产生氧自由基攻击生物膜上的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,形成脂质过氧化产物,进而引起细胞损伤。MDA 的含量可反映机体内脂质过氧化的程度和细胞损伤程度。本研究采用 MTT 法测定细胞增殖活性,研究结果显示 UVB 照射组的 OD 值明显低于正常对照组,差异具有统计学意义;UVB 照射组的 MDA 含量明显高于正常对照组,SOD 活性明显低于正常对照组。这说明 60 mJ/cm^2 UVB 照射可引起人皮肤成纤维细胞氧化损伤。UVB 照射前或后用白藜芦醇处理者与 UVB 照射组比较,SOD 活性增高、MDA 含量降低,说明白藜芦醇对成纤维细胞具有保护作用,可预防或者治疗 UVB 照射致成纤维细胞氧化损伤。

综上所述,本研究显示,UVB 对皮肤成纤维细胞可造成一定的损伤,可降低细胞存活率,使 SOD 活性减弱,引起脂质过氧化反应;白藜芦醇在较低浓度($< 100 \mu\text{mol/L}$)时可提高细胞存活率,较高浓度($\geq 100 \mu\text{mol/L}$)则可抑制细胞存活率;白藜芦醇处理可减轻 UVB 照射引起的细胞脂质过氧化,并且提高 SOD 酶活性。为减轻 UVB 对皮肤的损伤,应用抗氧化剂已成为人们防护皮肤的有效选择^[4-5]。本研究结果提示白藜芦醇具有一定拮抗 UVB 氧化损伤的作用,对防护 UVB 产品的开发具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Seve M, Chimienti F, Devergnas S, et al. Resveratrol enhances UVA-induced DNA damage in HaCaT human keratinocytes. *Med Chem*, 2005, 1:629-633.
- [2] Chen ML, Li J, Xiao WR, et al. Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2006, 31:635-639.
- [3] Park K, Lee JH. Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncol Rep*, 2008, 19:413-417.
- [4] Chang H, Oehrl W, Elsner P, et al. The role of H_2O_2 as a mediator of UVB-induced apoptosis in keratinocytes. *Free Radic Res*, 2003, 37:655-663.
- [5] Papucci L, Schiavone N, Witort E, et al. Co-enzyme Q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization in dependent of its free radical scavenging property. *J Biol Chem*, 2003, 278:28220-28228.

(修回日期:2010-05-22)

(本文编辑:吴 倩)