

· 论 著 ·

葛根素对中波紫外线损伤 HaCaT 细胞的抗氧化作用*

黄绵庆, 杨照新, 姚茂忠, 田树红, 符 健[△]

(海南医学院, 海口 571101)

摘要:目的 研究葛根素不同处理方式对其抗氧化能力的影响。方法 以 30 mJ/cm² 中波紫外线(UVB)和 1.0 mg/mL 葛根素处理 HaCaT 细胞。实验分为阴性对照组、模型组、UVB 照射前给药组、UVB 照射后给药组和 UVB 照射前后给药组。UVB 照射后 24 h 收集细胞,检测细胞内活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)。结果 UVB 照射前给药处理和 UVB 照射前后给药处理,使细胞内 T-AOC、CAT、GSH-Px 升高,而 ROS 和 MDA 降低($P < 0.05$);UVB 照射后给药处理可以升高 SOD($P < 0.05$),但对其他指标无影响($P > 0.05$)。结论 葛根素不同处理方式影响其抗氧化能力,其中预防性结合治疗性处理效果最佳,单纯预防性处理其次,单纯治疗性处理最差。

关键词:葛根素;角质形成细胞;活性氧

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1915-02

Antioxidative effects of puerarin on HaCaT cells damaged by UVB*

Huang Mianqing, Yang Zhaoxin, Yao Maozhong, Tian Shuhong, Fu Jian[△]

(Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Objective To investigate the antioxidative effects of different treatments of puerarin. Methods HaCaT cells were treated by 30 mJ/cm² of UVB and 1.0 mg/mL of puerarin, then were divided into 5 groups, including control group, modeling group, pre-treated, post-treated, pre- & post-treated by puerarin groups. Cells were harvested after 24 h of UVB irradiation. Reactive oxygen species(ROS), super oxidative dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), catalase(CAT), total antioxidant capacity(T-AOC) and malondialdehyde(MDA) were detected. Results On the contrary to ROS and MDA, the levels of T-AOC, CAT, GSH-Px were elevated in the pre-treated and the pre- & post-treated groups($P < 0.05$). Except SOD increasement, the other indicators were showed no change in the post-treated group($P > 0.05$). Conclusion Puerarin shows different antioxidative effects in the three kinds of treatments. Preventive and therapeutic treatment of puerarin exerts the best influence on antioxidation, whereas therapeutic treatment is the worst.

Key words: puerarin; keratinocyte; reactive oxygen species

葛根素(puerarin)是从豆科植物野葛(*pueraria lobata*)的干燥根中提取的主要有效成分,其化学名称为 8-β-D-葡萄糖吡喃糖-4',7-二羟基异黄酮,临床上主要用于冠心病、各型心绞痛、心肌梗死、视网膜动、静脉阻塞及突发性耳聋的治疗。葛根素在体外有良好的清除氧自由基的能力^[1-2],其抗氧化作用是保护急性缺血心肌细胞的重要机制之一^[3]。为了深入研究葛根素是否对氧化损伤的上皮细胞也具有保护作用,作者以人角质形成细胞(HaCaT 细胞)建立中波紫外线(ultraviolet B, UVB)氧化损伤模型,研究葛根素不同处理方式对 HaCaT 细胞抗氧化指标的影响。

1 材料与方

1.1 细胞株 HaCaT 细胞株,购自中科院昆明细胞库。

1.2 仪器与试剂 MCO-15AC 二氧化碳培养箱为日本三洋公司产品, MK3 型酶标仪为上海赛默飞世尔仪器有限公司产品,流式细胞仪为美国 Becton Dickison 公司产品,紫外线测量仪为台湾先驰光电股份有限公司产品,葛根素为华北制药集团制剂有限公司产品,活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒为江苏碧云天生物技术研究所产品,超氧化物歧化酶(super oxidative dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、总

抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 方法

1.3.1 HaCaT 细胞培养 HaCaT 细胞以 DMEM 培养,置于 37 °C 和 5%CO₂ 的细胞培养箱环境生长。细胞融合至 80% 以上,倾去瓶中培养液,以 0.05% 胰蛋白酶和 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化细胞,1 000 r/min 离心 5 min 后去上清液,加入培养液调整细胞浓度为 5 × 10⁴/mL,将 HaCaT 细胞接种到 6 孔培养板生长,取指数生长期细胞进行实验。

1.3.2 HaCaT 细胞分组和处理 实验设 5 个组,分别为阴性对照组、模型组、UVB 照射前给药组、UVB 照射后给药组和 UVB 照射前后给药组。细胞生长融合至 80% 时,UVB 照射前给药组细胞以 1.0 mg/mL 葛根素孵育 1 h,弃上清液后以 30 mJ/cm² UVB 直接照射细胞;UVB 照射后给药组细胞在 UVB 照射后以 1.0 mg/mL 葛根素处理 1 h;UVB 照射前后给药组细胞在 UVB 射前后各以 1.0 mg/mL 葛根素处理 1 h。选择 1.0 mg/mL 葛根素浓度,是因为课题组先前研究结果显示该浓度葛根素对 HaCaT 细胞无细胞毒性,并且对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡抑制作用最佳^[4]。阴性对照组不接收药物和

UVB 处理,模型组细胞只接受 UVB 照射。各处理组细胞在 UVB 射后 24 h 进行指标检查。

1.3.3 检测细胞内 ROS UVB 照射后 24 h,细胞消化和离心,以 4 ℃ 磷酸缓冲液洗涤 2 次,调节细胞浓度为 1×10^6 /mL,按照 ROS 检测试剂盒装载 DCFH-DA 荧光探针,以流式细胞仪检测每万个细胞的平均荧光强度,激发波长为 488 nm,荧光强度代表细胞内 ROS 水平。

1.3.4 检测细胞内抗氧化指标 细胞在 UVB 照射后 24 h 消化洗涤,调节细胞浓度为 1×10^7 /mL,在 0 ℃ 制备细胞匀浆,离心后将细胞上清液转移至干净试管,按照各试剂盒说明书检测 T-AOC、MDA、SOD、CAT、GSH-Px 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 葛根素对 HaCaT 细胞内 ROS 水平的影响 照射 UVB 的 HaCaT 细胞内 ROS 水平显著升高,给予葛根素处理后 ROS 水平均下降,见图 1。

2.2 葛根素对 HaCaT 细胞内 T-AOC 和 MDA 水平的影响 与阴性对照组相比,模型组 T-AOC 水平明显下降,而 MDA 水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较,

UVB 照射前给药组与 UVB 照射前后给药组 HaCaT 细胞内 T-AOC 水平下降,而 MDA 水平上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);UVB 照射后给药组 HaCaT 细胞内 T-AOC 和 MDA 水平与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 葛根素对 HaCaT 细胞内 T-AOC 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	T-AOC(U/mL)	MDA(nmol/mL)
阴性对照组	13.62 ± 3.07	2.78 ± 0.55
模型组	6.47 ± 1.35 ^{##}	14.12 ± 1.88 ^{##}
UVB 照射前给药组	9.44 ± 2.21 [*]	9.28 ± 1.91 ^{**}
UVB 照射后给药组	6.82 ± 2.04	13.66 ± 1.73
UVB 照射前后给药组	11.77 ± 2.58 ^{**}	8.46 ± 1.55 ^{**}

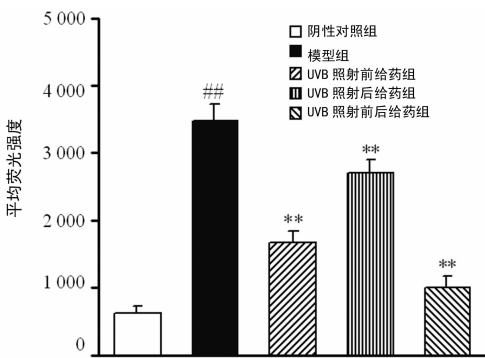
^{##}: $P < 0.01$,与阴性对照组比较; ^{*}: $P < 0.05$, ^{**}: $P < 0.01$,与模型组比较。

2.3 葛根素对 HaCaT 细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 水平的影响 与阴性对照组比较,模型组细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 水平均明显下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较,UVB 照射前给药组和 UVB 照射前后给药组细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 水平均上升 ($P < 0.05$);UVB 照射后给药组细胞内 SOD 水平上升 ($P < 0.05$),但 CAT 和 GSH-Px 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 葛根素对 HaCaT 细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	SOD(NU/mL)	CAT(U/g)	GSH-Px(U/mL)
阴性对照组	1 380.0 ± 88.1	2 027.8 ± 159.2	3 877.3 ± 319.3
模型组	850.8 ± 63.2 ^{##}	1357 ± 198.6 ^{##}	2 250.0 ± 293.2 ^{##}
UVB 照射前给药组	1 062.7 ± 74.9 ^{**}	1615.2 ± 169.2 [*]	3 053.5 ± 269.7 ^{**}
UVB 照射后给药组	931.0 ± 64.9 [*]	1 425.8 ± 164.3	2 468.2 ± 328.1
UVB 照射前后给药组	1 269.3 ± 73.9 ^{**}	1 913.8 ± 150.8 ^{**}	3 450.2 ± 254.1 ^{**}

^{##}: $P < 0.01$,与阴性对照组比较; ^{*}: $P < 0.05$, ^{**}: $P < 0.01$,与模型组比较。



^{##}: $P < 0.01$,与阴性对照组比较; ^{**}: $P < 0.01$,与模型组比较。

图 1 葛根素对 HaCaT 细胞内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨 论

阳光紫外线根据波长分为 UVA、UVB 和 UVC,UVB 虽然只占其中 4%,但对皮肤晒伤和皮肤癌的形成起主要作用。首先,UVB 可被皮肤角质形成细胞 DNA 吸收,直接导致 DNA 损伤、癌基因和抑癌基因突变。其次,UVB 可触发光氧化反应,增加细胞内 ROS。ROS 水平超过细胞抗氧化系统防御能力引起细胞损伤^[5-6]。因此针对 UVB 的抗氧化剂一直是这一领域的热点。葛根素药用制剂从 2003 年起被 SFDA 批准注

册,主要作为心血管治疗药物使用。虽然葛根素在心脑血管病治疗中显示抗氧化作用,但是尚未有抗紫外线氧化损伤的研究报道。

有关葛根素的大多数研究显示,葛根素能直接清除氧自由基,对多种细胞损伤具有保护作用,可减轻缺血-再灌注引起的心肌细胞、胰岛细胞、肝细胞和神经细胞损伤,此外对糖尿病腺细胞、乙醇中毒肝细胞和阿尔茨海默病神经细胞也有很好的保护作用^[3,7-13]。在抗氧化机理方面,Zhao 等^[14] 研究显示葛根素提高乙醇损伤大鼠肝脏内 SOD 和 GSH-Px 水平,同时降低 MDA 水平;Wan 等^[15] 发现葛根素可提高缺血-再灌注大鼠脑组织 SOD 水平并降低 MDA 水平。与此一致的是,本文无论预防性还是治疗性葛根素处理,均不同程度增加 UVB 照射细胞相关抗氧化指标和减少 ROS 水平。相比之下,UVB 照射前后均给葛根素增加细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平的效果更佳,而 UVB 照射后给葛根素处理除了增加细胞内 SOD 水平外,对其他指标均无影响。这表明葛根素不同处理方式影响其抗氧化能力,其中预防性结合治疗性处理效果最佳,单纯预防性处理其次,单纯治疗性处理最差。

参考文献:

[1] 邝枣园,吴伟,葛根素,等.川芎嗪注射液对羟自由基水平的影响[J].中药新药与临床药理,1998,(下转第 1919 页)

较少,还需要更多的大样本的重复实验来证实。

参考文献:

- [1] Thuong NT, Hawn TR, Thwaites GE, et al. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis[J]. *Genes Immun*, 2007, 8(5): 422-428.
- [2] 张丽, 陈元堂, 余冰, 等. 5-羟色胺转运体基因 rs9863857 与抑郁症及其临床特征的相关性研究[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2009, 18(5): 401-403.
- [3] 刘玮, 张芳, 赵秋敏, 等. 甘露糖结合凝集素基因多态性与肺结核易感性的研究[J]. *中国热带医学*, 2006, 6(3): 387-389.
- [4] Geijn FE, Man Y, Wuhler M, et al. Mannose-binding lectin does not explain the course and outcome of pregnancy in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(1): 2-7.
- [5] Elshimi MS, Khafagy SM, Abdel-al H, et al. Mannose-binding lectin deficiency in preterm neonates[J]. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol*, 2010, 8(2): 75-80.
- [6] Chang WC, White MR, Moyo P, et al. Lack of the pattern recognition molecule mannose-binding lectin increases susceptibility to influenza A virus infection[J]. *BMC Immunol*, 2010, 11(23): 64-75.
- [7] 金韬, 叶松. 结核分枝杆菌临床分离 RFP 耐药株 rpoB 基因突变研究[J]. *按摩与康复医学: 下旬刊*, 2010, 1(8): 7-8.
- [8] Ferwerda B, Kibiki GS, Netea MG, et al. The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania[J]. *AIDS*, 2007, 21(10): 1375-1377.
- [9] Ben-Selma W, Harizi H, Boukadida J. Association of TNF- α and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations[J]. *Microbes Infect*, 2011, 13(10): 837-843.
- [10] Cosar H, Ozkinay F, Onay H, et al. Low levels of mannose-binding lectin confers protection against tuberculosis in Turkish children[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008, 27(12): 1165-1169.
- [11] El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, et al. The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups[J]. *Scand J Infect Dis*, 2004, 36(2): 106-108.
- [12] Hellemann D, Larsson A, Madsen HO, et al. Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage(heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(24): 3071-3080.
- [13] 方桂兴, 银春莲. 甘露糖结合凝集素基因多态性与壮族人群肺结核易感性的关系研究[J]. *国际呼吸杂志*, 2011, 31(6): 428-430.
- [14] 王墨, 李秋, 王晓刚. 重庆地区人群血清甘露聚糖结合凝集素水平测定及意义[J]. *重庆医学*, 2005, 34(6): 864-865.
- [15] 冯福民, 郝金奇, 陈怡, 等. 河北唐山汉族人群 VDR 和 MBP 基因交互作用与肺结核发病的相关性[J]. *重庆医学*, 2010, 39(12): 1527-1529, 1532.

(收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2012-02-13)

(上接第 1916 页)

- 9(2): 92-93.
- [2] 朱庆磊, 吕欣然, 何爱霞. 葛根素对氧自由基的清除和抗氧化性损伤作用[J]. *解放军药学报*, 2001, 17(1): 1-3.
- [3] 卢金萍, 任江华, 姜黎. 葛根素对心肌缺血-再灌注损伤能量代谢的影响[J]. *山东中医杂志*, 2009, 28(12): 867-868.
- [4] 黄绵庆, 杨照新, 姚茂忠, 等. 预防性葛根素抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡[J]. *中国热带医学*, 2011, 11(11): 1379-1380.
- [5] Saitoh Y, Miyanishi A, Mizuno H, et al. Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS Generation and DNA damages[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2011, 102(1): 69-76.
- [6] Afaq F, Zaid MA, Khan N, et al. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin[J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(6): 553-561.
- [7] 王嵘, 苏晓灵, 周白丽. 葛根素对兔心肌缺血-再灌注损伤时 SOD、ANF 含量的变化[J]. *青海医学院学报*, 2005, 26(2): 102-104.
- [8] 李卫东, 刘顺英. 葛根素清除急性胰腺炎大鼠氧自由基作用的实验研究[J]. *江苏中医药*, 2007, 39(1): 55-56.
- [9] 李涛, 邹志森. 葛根素对大鼠肝缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2004, 20(4): 15-16.
- [10] 王玉, 朱慧渊, 郭莹, 等. 葛根素对局灶性脑缺血-再灌注模型大鼠脑组织水肿及神经细胞 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase 活性的影响[J]. *中国中医急症*, 2007, 16(1): 70-71.
- [11] 曹莉, 茅彩萍, 顾振纶. 葛根素对胰岛素抵抗大鼠糖耐量及胰腺组织形态学的影响[J]. *中国血液流变学杂志*, 2008, 18(1): 47-48, 95.
- [12] 赵敏, 杜艳秋, 李长喻. 葛根素对急性酒精中毒大鼠保护作用的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(17): 2610-2612, 2615.
- [13] 张海英, 胡海涛, 刘亦恒, 等. 葛根素对 A β_{25-35} 诱导 PC12 细胞凋亡的影响[J]. *中药材*, 2008, 31(4): 543-546.
- [14] Zhao M, Du YQ, Yuan L, et al. Protective effect of puerarin on acute alcoholic liver injury[J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(2): 241-249.
- [15] Wan H, Zhu H, Tian M, et al. Protective effect of chuanxiong-zine-puerarin in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia[J]. *Nucl Med Commun*, 2008, 29(12): 1113-1122.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2012-01-06)