

玉米幼芽提取物对小鼠皮肤UVA 照射损伤的保护作用

李宗伟^{a, b}, 欧阳五庆^{a, b}, 张黎^a, 刘玉梅^a, 杨光敏^a

(西北农林科技大学 a 动物科技学院, b 国家生命科学与技术人才培养基地, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 研究了玉米幼芽提取物(extract of maize plumule, EMP)对长波紫外线(UVA)损伤的小鼠皮肤超微结构、抗氧化酶活性及脂质过氧化作用的影响。结果表明, UVA 模型小鼠真皮细胞内出现空泡变性, 线粒体肿胀、嵴减少, 粗面内质网和核周间隙扩张; 表皮细胞微绒毛减少, 细胞固缩, 细胞核染色质边集。EMP 保护的小鼠皮肤细胞损伤程度明显减轻, 结构基本正常。EMP 可显著提高UVA 辐射小鼠皮肤组织中的SOD 活性($P < 0.01$)及CAT 活性($P < 0.05$), 降低MDA 含量($P < 0.05$), 与V_C 的抗氧化作用一致。表明EMP 能够抵抗UVA 对皮肤组织的氧化损伤。

[关键词] 玉米幼芽提取物; 长波紫外线; 氧化损伤; 皮肤超微结构; 小鼠

[中图分类号] R977.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0019-04

Protective effects of EMP on oxidative damage of mice skin irradiated by ultraviolet A

L I Zong-wei^{a, b}, OU YANG Wu-qing^{a, b}, ZHANG Li^a, LIU Yu-mei^a, YANG Guang-min^a

(a College of Animal Science and Technology, b The National Base of Life Science and Biotechnology Education,

Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to study the protective effects of EMP on mice skin damaged by ultraviolet A (UVA), the oxidative damaged models of mice irradiated by ultraviolet A were established. Dilated vacuolation, mitochondria swelling, decrease of mitochondrial crista, dilated endoplasmic reticulum and perinuclear spaces in fibroblasts and microvilli decreasing, endochylema atrophy and bordered nuclear chromatin in epidemic cells of mice in UVA model group were observed under electronic microscope. Normal cell ultrastructure of epidemic is and demis but slight cell damages were found in EMP protected groups. EMP could decrease the amounts of MDA and increase the activities of SOD and CAT in the skin of the mice irradiated by UVA, consistent with vitamin C. So EMP can resist oxidative damages of mice skin irradiated by UVA.

Key words: EMP; ultraviolet A; oxidation damage; skin ultrastructure; mice

近年来,随着大气臭氧层变薄,照射到地面的阳光紫外线大量增加。阳光中的紫外线包括短波(UVC)、中波(UVB)和长波紫外线(UVA),其中UVB和UVA可以穿过大气层到达地面。虽然UVA的能阶小,但其对皮肤的穿透能力远大于UVB^[1],

长时间的UVA照射可导致皮肤的严重伤害而更难于治疗,UVA已经成为皮肤真皮衰老的重要原因^[2]。

玉米幼芽提取物(extract of maize plumule, EMP)属于腺嘌呤类衍生物,其主要成分是激素

° [收稿日期] 2006-08-07

[基金项目] 西北农林科技大学校长专项基金项目(130709)

[作者简介] 李宗伟(1982-),男,山东沂南人,在读硕士,主要从事细胞工程研究。E-mail: liweizong@163.com

[通讯作者] 欧阳五庆(1960-),男,陕西凤翔人,教授,博士生导师,主要从事动物细胞工程和泌乳生理研究。E-mail: oywq506@sina.com

(kinetin, KT), 能够促进植物细胞的生长和分裂^[3], 并具有刺激转录起始, 控制细胞周期, 增加细胞内钙离子浓度和抗氧化应激等特性^[4]; 对果蝇和人皮肤成纤维细胞还表现出抗衰老作用^[5-7]。而KT在抗紫外线氧化损伤方面的研究还未见报道。因此, 本研究从形态学和生化水平上探讨KT对UVA照射致小鼠皮肤损伤的保护作用, 从而为KT抗紫外线辐射的研究及其药用价值的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 清洁级ICR小白鼠50只, 雌性(♀), 质量 (20 ± 2) g, 购自西安交通大学医学院实验动物中心, 合格证编号: 医动字第08-004号。

1.1.2 主要试剂 EMP由西北农林科技大学基础兽医实验室自行提取, KT含量为93.33% (气质联用法检测), 用0.06 mol/L的HCl配制成1 000 mg/L的储备液, 临用前稀释到200 mg/L, 用1 mol/L的NaOH调整pH值, 并用同样的方法配制不含EMP的空白对照液。维生素C针剂, 黄海制药厂生产; 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)检测试剂盒以及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 试验设计

小鼠于试验前适应环境一周, 饲养温度22~25℃, 背部脱毛后随机分成4个小组: 空白对照组(背部涂抹0.5 mL空白对照液, 不经紫外线照射处理), UVA模型组(背部涂抹0.5 mL空白对照液1 h后, 进行紫外照射), EMP+UVA组(背部涂抹0.5 mL 200 mg/L的EMP 1 h后, 进行紫外线照射), V_c +UVA组(背部涂抹0.5 mL 100 g/L的 V_c 1 h后, 进行UVA照射)。

1.3 小鼠UVA照射及皮肤样品采取

3根UVA平行灯管(40 W, 荷兰Philips公司生产)用UVA辐照计(北京师范大学光学仪器厂)测定的功率为 $5 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 。UVA模型、EMP+UVA、 V_c +UVA 3组小鼠经过相应处理后, 置于经过预热稳定的UVA灯管下方20 cm处照射。UVA灯管第1天照射1 h, 第2天照射2 h, 以后每天照射3 h, 连续照射30 d, 总的辐射强度为 $1 566 \text{ J}/\text{cm}^2$ 。最后一次照射24 h后, 处死小鼠, 取背部皮肤组织备用。

1.4 小鼠皮肤超微结构观察

将各组小鼠的皮肤样品, 置体积分数为4%的戊二醛中固定24 h, 乙醇逐级脱水, 环氧树脂包埋后, 进行超薄切片和染色, 并制备透射电镜标本, 用H-600型透射电子显微镜观察皮肤的超微结构。

1.5 小鼠皮肤抗氧化酶SOD、CAT活性和MDA含量的检测

称量各组小鼠皮肤样品的质量, 加入预冷的生理盐水, 用玻璃匀浆器研磨并冷冻离心制备100 g/L的组织匀浆。在测定SOD、CAT活性和MDA含量之前, 先用考马斯亮蓝法测定皮肤组织匀浆的总蛋白含量。按试剂盒说明书要求, 测定SOD、CAT和MDA各管的A值, 计算SOD、CAT的活性和MDA含量。

1.6 数据处理

试验数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 采用第四军医大学医学统计软件SPSS 13.0对各组数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 EMP对UVA照射小鼠皮肤形态的影响

UVA模型组小鼠皮肤早期可见有轻度红斑形成, 并且增厚、脱屑, 颜色加深, 后期皮肤出现皱缩、粗糙变硬、失去弹性和光泽, 背毛生长缓慢; EMP+UVA和 V_c +UVA组小鼠皮肤表皮稍增厚, 颜色加深。

2.2 EMP对UVA照射小鼠皮肤超微结构的影响

电镜观察结果表明, 空白对照组细胞结构清晰, 核仁明显, 部分细胞有双核仁或多核仁, 细胞质内核糖体数量较多(图1-A)。UVA模型组真皮细胞质内出现空泡变性, 严重的出现细胞肿胀坏死, 大量细胞内出现线粒体肿胀、空泡化、嵴减少, 以及粗面内质网和核周间隙扩张; 表皮细胞微绒毛减少, 细胞固缩, 细胞核内染色质发生边集(图1-B)。EMP+UVA组中表皮和真皮细胞结构完整, 核仁明显, 部分细胞质内出现小空泡及轻度粗面内质网扩张, 个别细胞出现线粒体肿胀、嵴减少, 细胞间的连接不够紧密(图1-C)。 V_c +UVA组中大部分细胞结构致密, 核仁清晰, 与空白对照组细胞结构接近, 少数细胞发生轻微损伤(图1-D)。

2.3 EMP对UVA照射小鼠皮肤抗氧化酶活性和MDA含量的影响

由表1可见, 与空白对照组相比, UVA模型组SOD活力下降10.52%, 差异显著($P < 0.05$); CAT活力下降12.43%, 差异极显著($P < 0.01$); 而MDA

含量则上升 157.45%, 差异极显著 ($P < 0.01$)。与 UVA 模型组相比, EM P+ UVA 组 SOD 活力升高 21.05%, 差异极显著 ($P < 0.01$), CAT 活力升高 10.77%, 差异显著 ($P < 0.05$); 而MDA 的含量则降低30.30%, 差异显著 ($P < 0.05$)。EM P+ UVA 组和 Vc+ UVA 组之间比较, 各指标均无统计学意义上的差异。

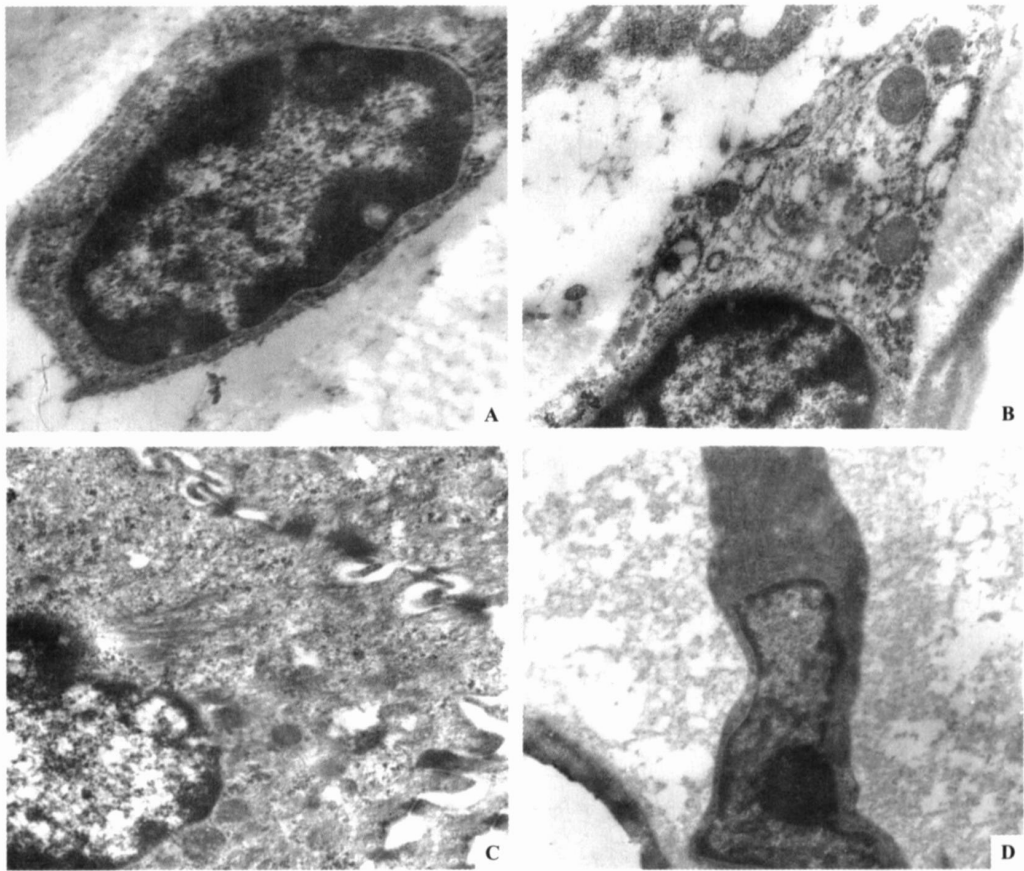


图1 EM P 对UVA 照射小鼠皮肤超微结构的影响结果(×17 000)
A. 空白对照组; B. UVA 模型组; C. EM P+ UVA 组; D. Vc+ UVA 组

Fig 1 Ultrastructure of mice skin in different groups

A. Control group; B. UVA model group; C. EM P+ UVA group; D. Vc+ UVA group

表1 EM P 对UVA 损伤小鼠皮肤SOD、CAT 活性和MDA 含量的影响(n= 6)

Table 1 Effect of EM P on activities of SOD and CAT and contents of MDA of mice skin irradiated by ultraviolet A

组别 Group	SOD 活力/(U · mg ⁻¹) A ctivity of SOD	CAT 活力/(U · g ⁻¹) A ctivity of CAT	MDA 含量/(nmol · mg ⁻¹) Content of MDA
空白对照组 Control group	23.95 ± 1.07	27.77 ± 0.65	1.41 ± 0.13
UVA 模型组 UVA model group	21.43 ± 1.12*	24.32 ± 1.17**	3.63 ± 0.69**
EM P+ UVA 组 EM P+ UVA group	25.94 ± 0.75	26.94 ± 0.95	2.53 ± 0.19*
Vc+ UVA 组 Vc+ UVA group	26.17 ± 1.23	27.11 ± 0.91	2.14 ± 0.15

注: 与空白对照组比较, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); 与UVA 模型组比较, 表示差异显著 ($P < 0.05$), 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Compared with the control group * and ** stand for significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels respectively; Compared with UVA model group: and stand for significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels respectively.

3 讨 论

UVA 具有很强的穿透力,能穿透表皮影响到真皮组织。生物体内存在的一些内源性的光敏物质吸收紫外线后,经一系列复杂的生物化学反应,产生活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS),导致脂类物质、蛋白质和DNA的氧化损伤^[8-9]。本试验中,小鼠背部皮肤经UVA照射后,肉眼可见皮肤有轻度红斑形成,随后出现增厚、脱屑和颜色加深,后期皮肤出现皱缩、粗糙变硬、失去弹性和光泽;透射电镜观察可见真皮细胞质内出现空泡变性,严重的细胞肿胀坏死,线粒体肿胀、空泡化、嵴减少,粗面内质网和核周间隙扩张;表皮细胞微绒毛减少,细胞固缩,染色质发生边集,这与房丽华等^[10]的研究结果基本一致。而照射前应用EMP保护的小鼠皮肤细胞损伤程度明显减轻,表明EMP能够保护UVA对表皮和真皮细胞结构及细胞器的损伤,维持皮肤结构和功能的完整性,具有抗UVA氧化损伤的作用,这与V_C的作用相一致。

皮肤内的抗氧化系统是皮肤对抗氧化损伤的主要因素,包括小分子抗氧化物质(如V_C、V_E等),以及SOD、GSH-Px、CAT三者组成的抗氧化酶保护系统。剧烈或长时间紫外照射后,皮肤内的抗氧化酶及非酶类抗氧化剂均被消耗^[11],而局部应用抗氧化剂则可以避免皮肤内抗氧化酶及非酶类抗氧化剂的丢失,抵抗紫外辐射引起的光氧化损伤^[12],并且这些抗氧化剂的光保护作用与其清除自由基的能力密切相关^[13]。本研究发现,UVA照射后,皮肤中的丙二醛(MDA)含量明显上升,SOD和CAT活力则明显下降。这主要是由于UVA辐射产生大量ROS,超出了机体的正常防御能力,其在消耗皮肤内抗氧化酶SOD和CAT的同时,攻击生物膜膜上磷脂中的多不饱和脂肪酸,引发膜脂质过氧化链式反应,最终导致MDA含量增加。而应用EMP则可以提高SOD和CAT活力,降低MDA的含量,与V_C的效果类似。

有研究表明,EMP能够明显保护Fenton反应系统引起的DNA的氧化损伤,抑制8-oxo-dG产物的形成;并且能够抑制蛋白质的氧化损伤以及由此而引起的蛋白质结构改变^[14-15]。因此作者推测,EMP可能通过下面两种机制保护UVA对皮肤的氧化损伤:(1)阻断UVA照射下机体ROS的产生途径,从而抑制ROS的生成;(2)通过增加机体内相关抗氧化物质(如SOD、GSH-Px、CAT等)的表达,而间接清除ROS。但其具体机制还有待于更进一步研

究

[参考文献]

- [1] Guorong T U, Wang X H. Research on the protection for ultraviolet radiation of sun light on skin[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2002, 32(1): 55-58
- [2] Klignan L H, Akin F J, Klignan A M. The contribution of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice [J]. J Invest Dermatol, 1985, 84(4): 272
- [3] Zhang K, Letham D S, John P C. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase[J]. Planta, 1996, 200(1): 2-12
- [4] Barciszewski J, Rattan S I S, Siboska G, et al. Kinetin-45 years on[J]. Plant Science, 1999, 148: 37-45
- [5] Shama S P, Kaur J, Rattan S I. Increased longevity of kinetin-fed *Zaprionus fruitflies* is accompanied by their reduced fecundity and enhanced catalase activity [J]. Biochem Mol Biol Int, 1997, 41(5): 869-875
- [6] Shama S P, Kaur P, Rattan S I. Plant growth hormone kinetin delays ageing, prolongs the lifespan, and slows down development of the fruitfly *Zaprionus parviteger* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 216(3): 1067-1110
- [7] Rattan S I, Clark B F. Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 201(2): 665-672
- [8] Cunningham M L, Krinsky N I, Giovanazzi S M, et al. Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components[J]. J Free Radic Biol Med, 1985, 1(5-6): 381-385
- [9] Vile G F, Tyrrell R M. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen[J]. Free Radic Biol Med, 1995, 18(4): 721-730
- [10] 房丽华, 王海青, 刘晓萍. 天然生物膜对UVA辐射无毛小鼠皮肤的保护作用[J]. 齐鲁医学杂志, 2002, 17(2): 112-115
- [11] Shindo Y, Witt E, Han D, et al. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in epidermis and dermis of human skin [J]. J Invest Dermatol, 1994, 102: 122-124
- [12] Weber C, Podda M, Rallis M, et al. Efficacy of topically applied tocopherols and tocotrienols in protection of murine skin from oxidative damage induced by UV-irradiation [J]. Free Radic Biol Med, 1997, 22(5): 761-769
- [13] Jurkiewicz B A, Bissett D L, Buettner G R. Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin [J]. J Invest Dermatol, 1995, 104: 484-488
- [14] Verbeke P, Siboska G E, Clark B F, et al. Kinetin inhibits protein oxidation and glycooxidation *in vitro* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 276(3): 1265-1270
- [15] Olsen A, Siboska G E, Clark B F C, et al. N⁶-furfuryladenine, kinetin, protects against fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 265(2): 499-502