

玉米幼芽提取物对小鼠皮肤成纤维细胞、型前胶原 mRNA 表达的影响

余欣¹, 欧阳五庆¹, 张黎¹, 王莉²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 解放军总医院, 北京 100851)

[摘要] 分离培养小鼠皮肤成纤维细胞,用 2 种富含腺嘌呤类衍生物的玉米幼芽提取物(20 mg/L)提前保护细胞后,体外构建 H₂O₂ 急性氧化损伤细胞模型,应用 RT-PCR 对小鼠皮肤成纤维细胞、型前胶原 mRNA 的表达进行半定量检测。结果表明,损伤对照组(组)小鼠皮肤成纤维细胞、型前胶原 mRNA 的表达量分别为空白对照组(I组)的 24% ($P < 0.01$)和 20% ($P < 0.01$),而药物保护组(组、组)小鼠皮肤成纤维细胞型前胶原 mRNA 的表达量均高于损伤对照组,分别是损伤对照组的 3.5 倍 ($P < 0.01$)和 1.8 倍,型前胶原 mRNA 的表达量也均高于损伤对照组,分别是损伤对照组的 4.6 倍 ($P < 0.01$)和 3 倍 ($P < 0.01$)。说明在 H₂O₂ 致小鼠皮肤成纤维细胞急性氧化损伤过程中,这 2 种玉米幼芽提取物能够保护、型前胶原 mRNA 的表达,且 0501 提取物对小鼠皮肤成纤维细胞、型前胶原表达的保护作用优于 0502 提取物。

[关键词] 玉米幼芽提取物;氧化损伤;小鼠皮肤;成纤维细胞;型前胶原;型前胶原

[中图分类号] S857.5;R643

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0015-04

Effect of extracts of Maize plummule on expression of type procollagen and type procollagen in cultured mouse dermal fibroblasts

YU Xin¹, OU YANG Wu-qing¹, ZHANG Li¹, WANG Li²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 General Hospital of PLA, Beijing, 100851, China)

Abstract The mouse dermal fibroblasts had been separated from mouse skin and oxidative damage cell mode was cultured by H₂O₂ *in vitro*, after two kinds of *Maize plummule* extracts were used in test groups before damaging. The expression of type procollagen and type procollagen (mRNA level) were examined by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the type procollagen and type procollagen mRNA expression in the H₂O₂ damaged group were only 24% ($P < 0.01$) and 20% ($P < 0.01$) of that in the control group. The type procollagen mRNA expression in two test groups by using two kinds of *Maize plummule* extracts is 3.5 higher ($P < 0.01$) and 1.8 higher than that of the H₂O₂ damaged group respectively; the type procollagen mRNA expression in two test groups is 4.6 higher ($P < 0.01$) and 3 higher ($P < 0.01$) than that of the H₂O₂ damaged group, respectively. So, two kinds of *Maize Plummule* extracts effectively protected the mRNA expression of type procollagen and type procollagen from the short-time oxidative damage by H₂O₂ in mouse dermal fibroblasts culture. The 0501 extracts had a better protection for the mRNA expression of type procollagen and type procollagen in mouse dermal fi-

* [收稿日期] 2006-05-11

[基金项目] 西北农林科技大学校长专项基金(130709)

[作者简介] 余欣(1983-),男,陕西西安人,在读硕士,主要从事细胞生物学研究。

[通讯作者] 欧阳五庆(1960-),男,陕西凤翔人,教授,博士生导师,主要从事细胞生物学和生理学研究。

broblast than that of the 0502 extracts.

Key words: extracts of *Maize plummule*; oxidative damage; mouse dermal fibroblast; type procollagen; type procollagen

氧化损伤可由多种氧自由基——活性氧簇(ROS)引起,过量的活性氧可以引起不同程度的细胞毒性^[1-2]。皮肤成纤维细胞与其分泌的胶原蛋白、弹性纤维及细胞外基质成分构成真皮的主体,而胶原蛋白及细胞外基质的氧化损伤是引起皮肤老化的主要原因^[3-4]。Talwar 等^[5]研究证明,在人皮肤光氧化损伤中 I 型和 II 型前胶原显著降低,其原因可能是成纤维细胞中前胶原的生物合成降低。而研究发现,外源性嘌呤类物质具有激素样特性,对动植物机体有抗氧化作用和保护修复作用^[6-7]。因此,本课题组自行提取获得了 2 种富含腺嘌呤类衍生物的玉米幼芽提取物,经初步研究发现,该提取物对家蚕皮肤具有显著的抗氧化作用^[8]。

本试验通过建立 H₂O₂ 致小鼠皮肤成纤维细胞氧化损伤模型,继续研究 2 种玉米幼芽提取物对小鼠皮肤成纤维细胞 I、II 型前胶原 mRNA 表达的保护作用,以进一步印证玉米来源的腺嘌呤类衍生物在动物细胞上的抗氧化损伤作用,为 2 种玉米幼芽提取物应用于氧化损伤的防治提供非常重要的试验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 玉米幼芽提取物 分别编号为 0501 和 0502,由西北农林科技大学动物科技学院生理学教研室从玉米幼芽中提取。经气相色谱-质谱联用检测,0501 和 0502 提取物中腺嘌呤类衍生物含量分别为 933.3 和 921.6 g/kg。两种提取物均配成 1 000 mg/L 的储备液,临用前稀释至所需质量浓度。

1.1.2 试验动物 昆白系小鼠,雌性,体重 18~22 g,由军事医学科学院提供。

1.1.3 试剂 高糖 DMEM 培养基,为 GIBCO 公司产品,批号为 12355136;胎牛血清,为北京元亨圣马生物技术研究所生产,批号为 050416;UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒、MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒和 PCR 扩增试剂盒,均为上海生工生物工程公司产品,批号分别为 1361250804,2027150302 和 2491550903;Biofuge 22R 型高速冷冻离心机,德国 Heraeus 制造;U2000 型紫外分光光度计,日本 HITACHI 制造;GeneAmp 2400 型 PCR 仪,美国

Perkin Elmer 公司制造;AlphaImage 2200 凝胶成像系统,美国 Alpha Innotech 公司制造。

1.1.4 引物设计与合成 利用 Primer5.0 引物分析软件,根据 GenBank 中小鼠 I 型前胶原、II 型前胶原和内参照 18S rRNA 基因组序列设计 3 对引物。I 型前胶原:上游 5'-TTCTCCTGGCAAA GACG GAC-3',下游 5'-GCA GTA GACCTTGA TGGCGT-3',扩增产物长度为 430 bp; II 型前胶原:上游 5'-CA GA GGCTTTGA TGGACGCA-3',下游 5'-TCTC CCTTCGCACCGTTCTT-3',扩增产物长度为 531 bp;内参照 18S rRNA:上游 5'-TATGGTTCCTTTG GTCGCTC-3',下游 5'-CTTGGATGTGGTA GC CGTTT-3',扩增产物长度为 358 bp。以上引物均由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.2 小鼠皮肤成纤维细胞培养

将小鼠背部皮肤进行脱毛处理,乙醚麻醉小鼠后,用眼科剪取下皮肤组织,清洗后剪碎,进行组织块原代培养,培养基为含体积分数 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基,培养条件为:37℃,体积分数 5%CO₂。待原代细胞长满整个培养瓶后,分瓶传代,稳定传代 3 次后进行后续试验。

1.3 试验设计

将小鼠皮肤成纤维细胞分为 4 组。I 组为空白对照组; II 组为损伤对照组,向培养体系中加入 H₂O₂ 至终质量浓度为 200 μmol/L,继续培养 2 h 后进行后续试验; III 组为 0501 玉米幼芽提取物保护组,向培养体系中加入该提取物至终质量浓度为 20 mg/L,继续培养 24 h 后,按照 II 组处理方法复制损伤模型,进行后续试验; IV 组为 0502 玉米幼芽提取物保护组,向培养体系中加入该提取物至终质量浓度为 20 mg/L,继续培养 24 h 后,按照 II 组处理方法复制损伤模型,进行后续试验。

1.4 小鼠皮肤成纤维细胞 I、II 型前胶原 mRNA 表达的测定

1.4.1 小鼠皮肤成纤维细胞总 RNA 的提取 按照 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒说明书提取小鼠皮肤成纤维细胞总 RNA,吸取 1 μL 提取物测定 A_{260 nm} / A_{280 nm} 值,计算总 RNA 含量和纯度。

1.4.2 小鼠皮肤成纤维细胞 I、II 型前胶原 mRNA

NA 的 RT-PCR 应用 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒,加入其中的随机六合引物逆转录合成 cDNA,具体步骤参照试剂盒说明书进行。

型前胶原 PCR 反应总体积为 50 μL,其中 10 ×Buffer 5.0 μL,25 mmol/L MgCl₂ 3.0 μL,10 mmol/L dNTP 1.0 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,cDNA 2.0 μL,型前胶原引物 1.0 μL,内参照 18S rRNA 引物 0.5 μL,ddH₂O 37.0 μL。扩增反应条件为:95 预变性 2 min;95 变性 30 s,55 退火 30 s,72 延伸 40 s,共 32 个循环;最后 72 延伸 10 min。型前胶原 PCR 反应总体积为 50 μL,其中 10 ×Buffer 5.0 μL,25 mmol/L MgCl₂ 3.0 μL,10 mmol/L dNTP 1.0 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,cDNA 2.0 μL,型前胶原引物 1.0 μL,内参照 18S rRNA 引物 0.5 μL,ddH₂O 37.0 μL。扩增反应条件为:95 预变性 2 min;95 变性 30 s,54 退火 30 s,72 延伸 40 s,共 32 个循环;最后 72 延伸 10 min。

1.5 扩增产物检测

取 10 μL 扩增产物,加入 2 μL 6 ×Loading Buffer,混匀后加入到 12 g/L 琼脂糖凝胶加样孔中,100 V 恒压电泳 25 min,取出,在凝胶成像系统中拍照,并进行灰度分析,测量各组目的基因扩增条带与 18S rRNA 扩增条带的比值。

用 SPLM 医学统计软件处理、分析数据。

2 结果与分析

2.1 小鼠皮肤成纤维细胞总 RNA 的提取结果

所抽提各组小鼠皮肤成纤维细胞总 RNA 的 A_{260 nm}/A_{280 nm} 值均在 1.8 左右,说明提取的小鼠成纤维细胞总 RNA 纯度较高,适合进行后续试验。

2.2 玉米幼芽提取物对小鼠皮肤成纤维细胞 、 型前胶原 mRNA 表达的影响

2.2.1 对 型前胶原 mRNA 表达的影响 小鼠皮肤成纤维细胞 I 型前胶原 mRNA RT-PCR 扩增产物电泳结果见图 1,灰度分析结果见表 1。

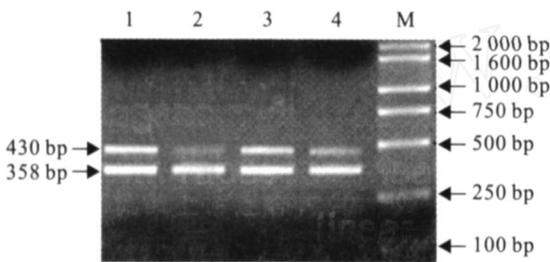


图 1 小鼠皮肤成纤维细胞 型前胶原 mRNA RT-PCR 产物的电泳图谱

1. 组;2. 组;3. 组;4. 组;M. Marker DGL2000

Fig.1 RT-PCR products of type I procollagen mRNA in cultured mouse dermal fibroblasts

1. Group ;2. Group ;3. Group ;4. Group ; M. Marker DGL2000

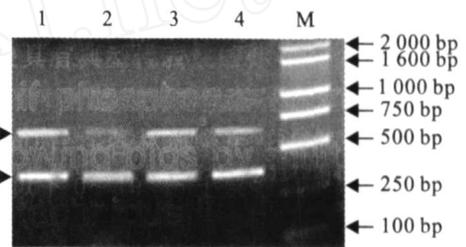


图 2 小鼠皮肤成纤维细胞 型前胶原 mRNA RT-PCR 产物的电泳图谱

1. 组;2. 组;3. 组;4. 组;M. Marker DGL2000

Fig.2 RT-PCR products of type I procollagen mRNA in cultured mouse dermal fibroblasts

1. Group ;2. Group ;3. Group ;4. Group ; M. Marker DGL2000

表 1 玉米幼芽提取物对小鼠皮肤成纤维细胞 、 型前胶原 mRNA 表达的影响 (X ± S)

Table 1 Effect of the Maize plummule extracts on expression of type I procollagen and type I procollagen in mouse dermal fibroblast (X ± S)

组别 Group	样本数 Sample	mRNA 表达量 mRNA expression	
		型前胶原 Type I procollagen	型前胶原 Type I procollagen
	3	0.822 ±0.003 A	0.541 ±0.020 A
	3	0.198 ±0.054 B	0.108 ±0.005 B
	3	0.699 ±0.074 A	0.491 ±0.008 A
	3	0.353 ±0.163 B	0.329 ±0.028 C

注:同列数据后标不同大写字母表示差异极显著 (P < 0.01)。

Note:Different capital letters indicate the significant difference (P < 0.01) in the same column.

由表 1 可知,组(损伤对照组)型前胶原的 mRNA 表达量明显下降,为组(空白对照组的 24% (P < 0.01)。组(0501 玉米幼芽提取物保护组)和组(0502 玉米幼芽提取物保护组)型前胶原的 mRNA 表达量均较组有明显提高,分别是组的 3.5 倍 (P < 0.01) 和 1.8 倍。其中 0501 玉米幼芽提取物的保护作用最强,与组相比差异极显著;0502 玉米幼芽提取物虽然能够提高损伤后型前胶原 mRNA 的表达量,但是与组相比差异不显著,与组相比差异却极显著,说明其对型前胶原 mRNA 表达的保护作用不明显。

2.2.2 对 型前胶原 mRNA 表达的影响 小鼠皮

皮肤纤维细胞型前胶原 mRNA RT-PCR 扩增产物电泳结果见图 2,灰度分析结果见表 1。由表 1 可知,组(损伤对照组)型前胶原的 mRNA 表达量明显下降,为组(空白对照组)的 20% ($P < 0.01$)。组(0501 玉米幼芽提取物保护组)和组(0502 玉米幼芽提取物保护组)型前胶原的 mRNA 表达量均较组有明显提高,分别是组的 4.6 倍 ($P < 0.01$) 和 3 倍 ($P < 0.01$)。其中也以 0501 玉米幼芽提取物的保护作用最强,与组相比差异极显著;0502 玉米幼芽提取物虽然能够显著提高损伤后型前胶原 mRNA 的表达量,但与组相比差异仍然极显著,说明其对型前胶原 mRNA 表达量也有保护作用,但保护作用略差于 0501 提取物。

3 讨论

皮肤是机体直接暴露于外界环境的第一道屏障,来自外界环境的各种活性氧物质所致的氧化损伤在皮肤老化中起着重要作用^[1]。真皮结构的改变是皮肤老化的主要原因,而成纤维细胞是皮肤真皮中的主体细胞成分,其分泌的胶原蛋白、弹性纤维和细胞外基质成分与成纤维细胞共同构成了真皮的主体。因此,皮肤成纤维细胞各种生物学特性的改变,是造成皮肤老化的最重要基础^[2,4,9]。

各种应激反应包括紫外线辐射均可产生活性氧,如 O_2^- ,这种自发的超氧阴离子在超氧化物歧化酶(SOD)作用下歧化产生 H_2O_2 ^[2]。有文献报道^[10],外源性 H_2O_2 可以模仿紫外线的作用,使皮肤产生一些光老化特征。 H_2O_2 通过 Fenton 和 Haber-Weiss 反应使电子进一步转移,形成了高度活跃的羟自由基($\cdot OH$)^[2]。 $\cdot OH$ 是 ROS 中最活跃的基团,能够直接引起 DNA 损伤,导致基因转录活性降低^[7,11]。而

型前胶原 mRNA 转录活性的高低直接影响型胶原蛋白的含量^[12]。从本研究可以看出,

组(损伤对照组)成纤维细胞型前胶原 mRNA 的表达量分别为组(空白对照组)的 24% 和 20%;组和组成纤维细胞型前胶原 mRNA 的表达量分别为组的 3.5 倍和 1.8 倍,型前胶原 mRNA 的表达量分别为组的 4.6 倍和 3 倍。说明在外源性 H_2O_2 引起的急性氧化损伤过程中,2 种富含腺嘌呤类衍生物的玉米幼芽提取物均能提高损伤后型前胶原 mRNA 的转录活性,有效减弱活性氧自由基对 DNA 造成的损伤,且在相同剂量(20 mg/L)下,0501 提取物对皮肤成纤维细胞型胶原表达的保护作用优于 0502 提取物。本研

究与文献报道的腺嘌呤类衍生物能够保护动物细胞免受氧化损伤的结果相一致^[6,7,13],进一步印证了玉米来源的腺嘌呤类衍生物在动物细胞上的抗氧化损伤作用,也为这 2 种玉米幼芽提取物应用于氧化损伤的防治提供了非常重要的试验依据。玉米幼芽提取物保护 DNA 免受氧化损伤的机理可能是:直接清除 $\cdot OH$ 从而保护 DNA;通过结合 Fe^{2+} 阻止 $\cdot OH$ 的产生;结合 Fe^{2+} 后,使得 Fenton 反应产生的 $\cdot OH$ 不能接近 DNA 而保护 DNA 免受损伤,具体通过何种机制保护 DNA 仍需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 陈 昆,常宝珠,郑家润. 氧化损伤与皮肤疾病[J]. 国外医学:皮肤性病学分册,2004,30(2):81-84.
- [2] 闫 言,王宝玺. 紫外线引起氧化应激与细胞凋亡机制研究进展[J]. 国外医学:皮肤性病学分册,2004,30(3):167-169.
- [3] Bryce G F, Bogdan N J, Brown C C. Retinoic acid promote the repair of the dermal damaged and the effacement of wrinkles in the UVB-irradiated hairless mouse [J]. J Invest Dermatol, 1998,91:175-180.
- [4] 王 曦,李 利. 成纤维细胞与细胞老化[J]. 中国美容医学,2005,14(2):243-245.
- [5] Talwar H S, Griffiths C E M, Fisher G J, et al. Reduced type and type procollagens in photodamaged adult human skin[J]. J Invest Dermatol, 1995,105:285-290.
- [6] 史 明,游思维. 嘌呤类物质在中枢神经系统损伤中的作用[J]. 中华创伤杂志,2005,21(3):236-239.
- [7] Anders O, Gunhild E S, Brian F C C, et al. N^6 -Furfuryladenine, kinetin, protects against fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999,265:499-502.
- [8] 张 黎,欧阳五庆,胡 颖,等. 玉米幼芽提取物对家蚕抗氧化作用的影响[J]. 蚕业科学,2005,31(4):458-462.
- [9] Fisher G J, Wang Z Q, Datta S C, et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light [J]. N Eng J Med, 1997,337(20):1419-1428.
- [10] 夏济平,毕志刚. 皮肤光老化机制研究进展[J]. 国外医学:皮肤性病学分册,2002,28(5):287-291.
- [11] 郑荣梁,黄中洋. 自由基医学与农学基础[M]. 北京:高等教育出版社;海德堡:施普林格出版社,2001.
- [12] 黄 辉,李宇明,陈东明,等. 消癭醌对癭痕疙瘩成纤维细胞型胶原蛋白的影响[J]. 中国微创外科杂志,2003,3(3):249-251.
- [13] Philippe V, Gunhild E S, Brian F C C, et al. Kinetin inhibits protein oxidation and glycoxidation in vitro [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000,276:1265-1270.