

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.33.004

沙棘总黄酮防紫外线损伤的实验研究

徐 敏

(安顺职业技术学院应用医药系,贵州安顺 561000)

[摘要] **目的** 通过中波紫外线(UVB)辐射皮肤损伤模型来探讨沙棘总黄酮对皮肤的保护修复作用,为寻找新型抗紫外线的药物提供实验依据。**方法** 通过 UVB 反复照射,构建 UVB 辐射小鼠皮肤损伤模型,观察各组实验动物皮肤形态学变化、皮肤中超氧化物歧化酶(SOD)活性、皮肤内脂类受过氧化损伤的程度即丙二醛(MDA)的量和胶原蛋白量的变化程度。**结果** 模型组较正常组皮肤形态学变化明显,表皮层增加,真皮层增厚,UVB 辐射皮肤损伤模型构建成功;模型组较正常组 SOD 活性和 MDA 的量分别是极显著降低和升高($P<0.01$),而阳性对照组和沙棘总黄酮给药组较模型组 SOD 的活性和 MDA 的量分别是极显著升高和降低($P<0.01$);模型组较正常组胶原蛋白量显著降低($P<0.05$),阳性对照组和沙棘总黄酮给药组胶原蛋白量较高($P<0.01$),但阳性对照组出现了增生性瘢痕。**结论** 沙棘总黄酮能有效防止 UVB 反复照射对皮肤造成的损伤,提高皮肤组织中 SOD 活性和胶原蛋白量,抑制 MDA 的量升高和瘢痕增生,并对 UVB 导致小鼠皮肤光老化有拮抗作用。

[关键词] 紫外线;皮肤;超氧化物歧化酶;丙二醛;胶原蛋白;沙棘总黄酮

[中图分类号] R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)33-4618-03

The effect of seabuckthorn flavonoids against ultraviolet injury

Xu Min

(Department of Applied Medicine, Anshun Vocational and Technical College, Anshun, Guizhou 561000, China)

[Abstract] **Objective** Through the UVB rays radiation skin injury model, the study investigated the effect of seabuckthorn flavonoids on the protection and restoration of the skin, in order to provide experimental basis of looking for the new drugs against ultraviolet injury. **Methods** By UVB radiating repeatedly, the study built UVB radiation skin injury model in mice, to observed the morphological changes of the skin in every groups of experimental animal, the super oxide dismutase (SOD) activity of the skin and the peroxidation damage degree of the skin lipid, which is also the content changes of malondialdehyde (MDA) and collagen. **Results** The change of model group whose epidermis layer increased and the dermis thickened was more obvious than the normal group, so the UVB radiation skin injury model was built successfully. The model group compared with the normal group, its SOD activity was significantly lower and its MDA content was significantly higher ($P<0.01$). However, the SOD activities of positive control group and being fed with seabuckthorn flavonoids group were significantly higher and their MDA contents were significantly lower ($P<0.01$). The model group compared with the normal group, its collagen content was significantly lower ($P<0.05$), and the collagen contents of positive control group and being fed with seabuckthorn flavonoids group were higher, whose difference was extremely significant ($P<0.01$). However, the positive control group had hyperplastic scar. **Conclusion** Seabuckthorn flavonoids had the following effects: preventing the UVB repeating radiation damage to the skin, improving the SOD activity of skin tissue and the collagen content, inhibiting the increase of MDA content and scar hyperplasia, and having antagonism effect of UVB causing mice skin photoaging.

[Key words] ultraviolet rays; skin; super oxide dismutase; malondialdehyde; collagen; seabuckthorn flavonoids

沙棘总黄酮是胡颓子科沙棘属沙棘的主要活性成分。沙棘别名醋柳、酸柳果,为落叶性小乔木或灌木^[1-4]。沙棘在我国资源丰富,尤其是食用和药用价值世界公认,因此合理开发沙棘资源,提高沙棘资源的附加值具有重要的意义^[5]。沙棘的生态价值、营养价值和药用价值都很高。沙棘是具有枝叶茂密、根系发达、生长迅速、抗干旱、御严寒、保持水土、防风固沙、改良土壤、适应性强等特点的优质植物,其内含有蛋白质、糖类、脂类、维生素等多种营养物质。另外,沙棘因富含多种生物活性成分尤其是沙棘中的黄酮类化合物具有重要的药用价值。沙棘总黄酮在心血管、消化、呼吸、抗肿瘤、抗衰老、提高机体免疫力等多方面具有治疗优势,具有活血、养胃、健脾、利肺、祛痰等药理功效,在临床上有着广泛前景及应用价值,并记载在古代的《月王药珍》、《四部医典》和《晶珠本草》等医书中^[6-7]。沙棘总黄酮还可吸收紫外线,有直接捕获超氧自由基和羟基自由

基的作用,对皮肤系统具有清除自由基、抗氧化、抗辐射、抗衰老的作用^[8-9]。本实验采用从一次利用后的高原沙棘果渣和籽渣中提取黄酮,通过对小鼠中波紫外线(UVB)辐射皮肤损伤模型的影响,初探其抗紫外线辐射的作用,以便为深度开发和综合利用沙棘资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物 KM 小鼠,雌性,42~56 d,体质量 22~25 g,购自贵阳医学院实验动物中心,按清洁动物标准条件分笼喂养。

1.2 药品及试剂 1%沙棘总黄酮提取物自制药剂;高原护肤霜由第二军医大学药学院研制生产;6%硫化钠,成都化学试剂厂;1%戊巴比妥钠,北京普博斯生物科技有限公司;羟脯氨酸标准品由中国药品生物制品检定所提供;考马斯亮蓝蛋白测试、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒均是南京建成生物工程研究所产品。

1.3 方法

1.3.1 沙棘总黄酮的提取 沙棘除汁,晾干,用中药粉碎机粉碎,60℃烘干12 h,用超临界CO₂萃取装置去油。称取去油粉末100 g,用超声波以5倍体积的纯水萃取1 h,过滤得滤液I;滤渣重复萃取,过滤得滤液II;合并滤液I、II。60℃以下减压蒸馏浓缩,然后加95%乙醇至60%醇沉,放置低温过夜。过滤溶液,4 000 r/min离心,取液体减压蒸馏,回收乙醇,浓缩液体。冷冻干燥得20 mg干粉,所得干粉即沙棘总黄酮给药组的主要成分。

1.3.2 UVB辐射小鼠皮肤损伤模型的构建、分组设计、给药途径^[10-14] 小鼠注射1%戊巴比妥钠进行麻醉,并把小鼠背部鼠毛剪短至1 mm,用配制好6%Na₂S液体脱掉面积约为5 cm×5 cm的鼠毛。将已脱毛的小鼠分为4组,每组10只:正常对照组(正常组)、UVB照射组(模型组)、UVB照射+高原护肤霜(阳性对照组)、UVB照射+1%沙棘总黄酮给药组(沙棘总黄酮给药组)。给予普通基础颗粒饲料,每日1次。正常组不做UVB照射,模型组只做UVB照射。阳性对照组和沙棘总黄酮给药组的小鼠用戊巴比妥钠麻醉后,皆为均匀的一层覆盖涂抹给药,10 min后与模型组一起置于40 w紫外光源下(光源距小鼠皮肤垂直距离为35 cm)UVB辐射20 min(辐照强度为0.17 mW/cm²,放射270~400 nm连续波谱,光谱集中在313 nm)。持续相同时间辐射7 d,第7天辐射结束后24 h内,把小鼠背部脱毛区的皮肤取下,然后去除血液和皮下脂肪,并用生理盐水漂洗,最后固定和冷冻保存以备。

1.3.3 制作病理切片 将取材的部分皮肤组织,放入固定液(10%福尔马林溶液)固定,石蜡包埋,用切片机切成薄片,一般为厚为4 μm,用苏木精-伊红(HE)染色法染色,显微镜下观察病理变化。

1.3.4 制备皮肤组织匀浆 用滤纸将取材的部分皮肤组织拭干称取组织质量,加9倍的组织质量的预冷的匀浆介质放在冰上,并将组织充分剪碎进行匀浆,在冰浴中多次研磨以研碎皮

肤组织,匀浆后皮肤组织用低温高速离心机4 000 r/min离心15 min,取适量上清液待测。组织匀浆上清液中蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法(Bradford法)检测,以牛血清清蛋白为标准绘制标准曲线。

1.3.5 SOD活性的测定 SOD活性的测定采用黄嘌呤氧化酶法,具体测定按测试盒说明书进行。

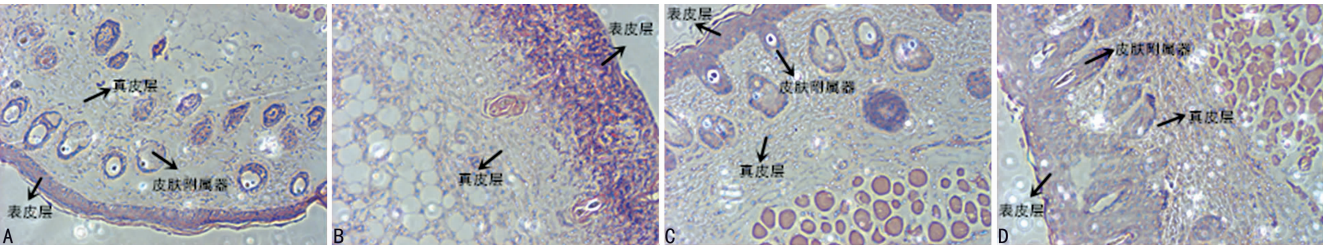
1.3.6 MDA量的测定 MDA量的测定采用TBA法,具体测定按测试盒说明书进行。

1.3.7 胶原蛋白量的测定 胶原蛋白中的羟脯氨酸占其总氨基酸的13.4%^[15],分析其中羟脯氨酸的含量,可换算出胶原蛋白的量^[16]。羟脯氨酸含量的测定用氯胺-T法:即氯胺-T作为氧化剂能把羟脯氨酸氧化,再用高氯酸终止氧化,最后加入对二甲氨基苯甲醛溶液生成紫红色化合物进行比色测定;然后取不同量的羟脯氨酸标准品制作标准曲线;最后根据胶原蛋白量=羟脯氨酸测定浓度/组织质量/0.134,计算出胶原蛋白的量。

1.4 统计学处理 采用SPSS12.0统计软件进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验期间小鼠的皮肤形态学观察 正常组小鼠皮肤各层细胞纹理清晰,有较薄的真皮层,有排列有序的波浪状弹性纤维,未见盘曲打结、聚集成团的现象,有束状定向疏松排列的胶原纤维,皮肤附属器完整。模型组小鼠皮肤有层次增加的表皮细胞,有增厚的真皮层,有呈嗜碱性变、无定形、破坏、变粗、盘曲打结、聚集成团、甚至消失的弹性纤维,有不规则排列、粗大致密的胶原纤维,皮肤附属器缺失。阳性对照组小鼠皮肤有呈结节状或旋涡状不规则排列、粗大致密的胶原纤维。沙棘总黄酮给药组小鼠皮肤和模型组相比,表皮及其附属器较完整,真皮层中弹性纤维破坏较小,有排列较规则的胶原纤维。见图1。



A:正常组;B:模型组;C:阳性对照组;D:沙棘总黄酮给药组。

图1 各组小鼠皮肤组织 HE 染色(×100)

表1 UVB辐射后小鼠皮肤组织 SOD、MDA 和胶原蛋白含量变化($\bar{x} \pm s, n=10$)			
组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	胶原蛋白含量($\mu\text{g}/\text{mg}$)
正常组	84.25±7.87	1.82±0.33	1.26±0.10
模型组	61.17±3.59 [#]	3.19±0.45 [#]	1.01±0.09 [*]
阳性对照组	75.10±6.27 [△]	1.63±0.26 [△]	1.79±0.15 [△]
沙棘总黄酮给药组	72.41±4.05 [△]	1.45±0.30 [△]	1.38±0.14 [△]

[#]: $P < 0.01$,^{*}: $P < 0.05$,与正常组比较;[△]: $P < 0.01$,与模型组比较。

2.2 小鼠皮肤组织 SOD 活性测定结果 模型组小鼠经 UVB 辐射后,与正常组相比,皮肤组织中的 SOD 活性极显著降低

($P < 0.01$);与模型组相比,阳性对照组和沙棘总黄酮给药组 SOD 的活性极显著升高($P < 0.01$)。见表1。

2.3 小鼠皮肤组织 MDA 量的检测结果 与正常组比较,模型组含 MDA 的量多($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组和沙棘总黄酮给药组含 MDA 的量少($P < 0.01$)。见表1。

2.4 小鼠皮肤组织胶原蛋白量的测定结果 与正常组比较,模型组小鼠胶原蛋白的量降低($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和沙棘总黄酮给药组较高($P < 0.01$),而阳性对照组产生了增生性瘢痕。

3 讨论

本实验选7 d UVB辐射小鼠,展示UVB累加损伤皮肤的过程,客观具体地模拟了生活中UVB对皮肤的损害。紫外线

根据波段可分为长波紫外线（UVA）、UVB、短波紫外线（UVC）。大量资料显示，UVB 是预防皮肤光老化的重点^[14]。所以，本实验选择 UVB 为主要波段的光源。本实验通过 UVB 辐射小鼠来构建皮肤损伤模型，并把小鼠背部脱毛区的皮肤取下做组织病理切片，进行病理学观察。模型组小鼠皮肤形态学变化明显，表皮细胞层增加，真皮层增厚，说明成功造模，同时也验证了长时间 UVB 辐射可诱导皮肤的老化。紫外线引起的效应不是单个因素，而是多个因素的综合。紫外线辐射，自由基增多，使构成细胞组织的糖类、脂类、蛋白质等大分子物质被氧化而受损，从而破坏细胞的结构和功能、组织构成，导致器官老化及病变。其中构成生物膜脂类成分中的多不饱和脂肪酸由于化学性质活跃，容易被自由基破坏而形成 MDA 等脂类过氧化物。因此，MDA 的量是皮肤内脂类受过氧化损伤程度的标志，间接地反映出氧自由基的含量及细胞受损伤的程度^[16]。本实验中检测 MDA 的量，模型组比正常组极显著增高，沙棘总黄酮给药组比模型组极显著降低，说明沙棘总黄酮在防紫外线抗氧化的作用中效果好。SOD 是人体不可缺少的一类重要的清除氧自由基的生物活性蛋白质，起到抗衰老作用，即催化并消除超氧阴离子，在维护体内自由基产生和清除的平衡中起着重要作用，故 SOD 活性已成为抗衰老的重要指标^[8]。本实验中，沙棘总黄酮给药组 SOD 的活性极显著升高，说明沙棘总黄酮可提高 SOD 的活性，减少皮肤损伤，为今后阻止和解决 UVB 辐射诱导的皮肤老化问题提供了支撑。

人体中含量最丰富的胶原蛋白在皮肤组成成分中占有主导地位，可使皮肤维持张力和承受外界拉力，增加皮肤弹性和韧性，使皮肤充盈和丰满。胶原蛋白是惟一含羟脯氨酸较多的蛋白质，因此，测定胶原蛋白的量可通过羟脯氨酸的量来确定。本实验的检测结果表明，沙棘总黄酮给药组胶原蛋白的量比模型组极显著的升高，说明沙棘总黄酮对皮肤中胶原的合成和分泌具有促进作用。阳性对照组胶原蛋白的量最高，并产生了增生性瘢痕。增生性瘢痕与胶原的代谢失衡有关，瘢痕组织中胶原合成和降解都增加，但胶原合成超过降解，使其过度沉着，由此产生了瘢痕增生。

总之，沙棘总黄酮可防止氧化损伤，增强胶原蛋白的合成和分泌，抑制瘢痕增生，从而为其用于防紫外线损伤提供了有利的证据，但沙棘总黄酮用于防紫外线损伤的机制还需要进一步研究与探索。

参考文献

[1] 牛广财,朱丹,王军,等.沙棘酒清除自由基作用的研究(上接第 4617 页) Dis,2011,21(4):245-253.

[4] Chen MP,Chung FM,Chang DM,et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B-Cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Endocrinol Metab,2006,91(1):295-299.

[5] Dogru T,Sonmez A,Tasci I,et al. Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance[J]. Diabetes Res Clin Pract,2007,76(1):24-29.

[J]. 中国食品学报,2010,10(1):36-41.

[2] 张立明,杨凤琴,袁本香,等.沙棘总黄酮对 4 种念珠菌的体外抑菌作用[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(16):1355-1357.

[3] 杨云裳,张应鹏,李春雷,等.沙棘汁中总黄酮提取及纯化研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(3):570-572.

[4] 谢久祥,林恭华,都玉蓉,等.青海沙棘不同部位总黄酮含量比较研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(1):45-48.

[5] 孙天宇.沙棘叶黄酮的提取分离及降血脂作用小鼠试验的研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2012.

[6] 王新瑞,侯霄.沙棘黄酮对心血管系统的药理作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(9):1085-1086.

[7] 焦岩.大果沙棘黄酮分离纯化及生物活性研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2010.

[8] 刘瑜.大果沙棘黄酮对糖尿病小鼠生理功能的影响[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2010.

[9] 金钟.沙棘叶黄酮提取物体内抗氧化活性、应用与护肝作用的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2014.

[10] 兰芝荟.镰形棘豆总黄酮防紫外线损伤作用及机制研究[D]. 兰州:兰州大学,2011.

[11] 李茂星,兰芝荟,何希瑞.镰形棘豆总黄酮防紫外线损伤作用研究[J]. 中药材,2011,34(3):93-97.

[12] 李建民,刘琦,王雪,等.杜仲提取物对小鼠皮肤光老化保护作用的实验研究[J]. 中国美容医学,2012,21(4):584-586.

[13] 陈旭,王莹,鞠梅,等.皮肤光老化小鼠模型的构建[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2014,30(3):131-136.

[14] 马立文,赵宏伟,周炳荣,等.大豆低聚肽对中波紫外线诱导的光老化小鼠皮肤的保护作用[J]. 中国皮肤性病杂志,2014,28(2):119-122.

[15] 刘肃.二甲氨基乙醇和复方氨基酸延缓大鼠皮肤老化的实验研究[D]. 广州:南方医科大学,2014.

[16] 周湘君,叶才果,杨广丽,等.丹酚酸 B 对小鼠皮肤光老化的保护效应[J]. 中国组织工程研究,2013,17(2):275-279.

(收稿日期:2015-07-08 修回日期:2015-08-16)

[6] Silvia L,Matilde B,Amelia M,et al. Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes[J]. Clin Sci,2009,117(3):243-249.

[7] 董莹,刘伟.不同糖代谢状态下大鼠肝 X 受体的表达及其对肝糖代谢的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志,2011,27(2):148-151.

(收稿日期:2015-07-08 修回日期:2015-08-16)