

黑果腺肋花楸花色苷对人皮肤成纤维细胞紫外辐射损伤的保护作用

张永祥, 国石磊, 彭利沙, 朱凤妹, 李 军*

河北科技师范学院食品科技学院 河北省果品加工工程技术研究中心, 秦皇岛 066600

摘要: 为了探讨黑果腺肋花楸花色苷对紫外辐射所致人皮肤成纤维细胞氧化损伤的保护作用, 将体外培养的人皮肤成纤维细胞分为对照组、辐射组和辐射给药组。采用 MTT 法检测不同浓度花色苷添加量对细胞增殖的保护作用, 以选择最优添加浓度。采用化学荧光法检测细胞活性氧(ROS)含量, ELISA 法检测细胞 MMP-1 分泌水平。结果表明: UVA 辐照剂量为 10 J/cm² 条件下, 与辐射组相比, MTT 法显示花色苷添加组浓度为 125 μg/mL 对损伤细胞增殖保护作用有极显著的提高($P < 0.01$), 同时, 125 μg/mL 花色苷添加组能够显著降低辐射损伤后细胞 ROS 含量以及 MMP-1 分泌水平($P < 0.01$)。由此可见, 适宜浓度的黑果腺肋花楸花色苷能够降低细胞 ROS 含量及 MMP-1 分泌水平, 从而对辐射损伤的细胞起到一定的保护作用。

关键词: 黑果腺肋花楸花色苷; 皮肤成纤维细胞; 辐射损伤; 细胞内活性氧

中图分类号: TQ202

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.1018

Protective Effect of *Aronia melanocarpa* Anthocaynins Against UV-Induced Damages of Human Skin Fibroblast

ZHANG Yong-xiang, GUO Shi-lei, PENG Li-sha, ZHU Feng-mei, LI Jun*

School of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology,
Hebei Fruit Processing Engineering Center, Qinhuangdao 066600, China

Abstract: In order to study the protective effect of *Aronia melanocarpa* anthocaynins against UV-induced damages in human skin fibroblast, the cells were divided into control group, UVA radiation group and anthocyanidin group. The protective effects of different concentrations of anthocyanins on cell proliferation were investigated using MTT method. The reactive oxygen species(ROS) was evaluated by fluorescence and chemiluminescence, the MMP-1 protein in cells were detected by ELISA assay. The MTT analysis result showed that 125 μg/mL of anthocyanin had an excellent protective effect on cell proliferation. The contents of ROS and MMP-1 in 125 μg/mL anthocaynin group were significant lower than those in UVA radiation group($P < 0.01$). Hence, it was concluded that *A. melanocarpa* anthocaynins was able to reduce UV-induced oxidative damage and played an anti-UV radiation role in human skin fibroblast.

Key words: *Aronia melanocarpa* anthocaynins; fibroblasts; radiation damage; reactive oxygen species

人类生活环境中存在多种不同强度的电磁辐射源^[1], 如紫外线、红外线和无线电波等。紫外线是一种由原子外层电子受到激发后产生的电磁波, 波长短于可见光。长波紫外线(UVA, 波长为 320 ~ 400 nm), 可以穿透真皮, 直接作用于成纤维细胞, 主要表现在氧化损伤上, 其中 UVA 通过诱导生成活性氧(ROS), 间接破坏其他重要的细胞结构^[2-4], 是引起皮肤日晒伤、红斑、老化的主要因素^[5]。长期过量的高强度紫外线照射甚至能引起皮肤癌变等症状^[6]。

从自然资源中积极寻找并提取天然抗紫外线辐射剂, 防治紫外线对皮肤损伤是目前的主要研究方向。黑果腺肋花楸(*Aronia melanocarpa*)为蔷薇科, 多年生落叶灌木, 原产于美国东北部, 上世纪 90 年代, 由辽宁省干旱地区造林研究所引进我国。黑果腺肋花楸中的主要成分花色苷是一种天然的抗氧化剂, 具有抗炎、抗氧化、清除自由基等多种功能。Oszmianski J 等^[7]研究表明, 其含有 4 种花色苷单体, 分别为矢车菊素-3-阿拉伯糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-半乳糖苷和矢车菊素-3-木糖苷。国内外有关黑果腺肋花楸抗氧化、保护心血管、降低胆

固醇、抗癌作用和消除体内炎症等方面报道较多^[8-13]。然而关于黑果腺肋花楸花色苷对紫外辐射损伤保护作用的研究报道较少。为充分利用黑果腺肋花楸植物资源,本研究以黑果腺肋花楸花色苷为对象,对其抗紫外辐射损伤进行研究,旨在为黑果腺肋花楸的开发和综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂和仪器

人皮肤成纤维细胞,江阴齐氏生物有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清、PBS 溶液、青霉素、链霉素、胰蛋白酶,均产于上海立菲生物技术有限公司;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;活性氧(ROS)测试盒,南京建成生物工程研究所;人 MMP-1 定量分析试剂盒,上海巧伊生物科技有限公司;CO₂ 培养箱,造鑫企业有限公司;FLUOstar Omega 全自动多功能酶标仪,德国 BMG 公司;Nikon eclipse Ti-u 倒置显微镜,日本 Nikon 公司。

1.2 黑果腺肋花楸花色苷的制备

采用文献^[14]的方法,取出保存的黑果腺肋花楸用打浆机粉碎成匀浆状,按照液料比为 89:1 加入体积分数为 40% 的乙醇(含 0.1% 乙酸)作为溶剂进行超声波辅助提取 23 min,真空抽滤去除残渣,旋转蒸发仪浓缩去除乙醇,经 HP-20 大孔树脂吸附纯化后真空冷冻干燥得到花色苷粉。

1.3 花色苷溶液的配制

精确称取黑果腺肋花楸花色苷冻干粉 10 mg,溶解于 10 mL DMEM 培养基中,配置成浓度为 1 mg/mL 的溶液,摇匀后过 0.22 μm 滤膜除菌,置于 4 °C 冰箱中避光保存。

1.4 人皮肤成纤维细胞的培养

将人皮肤成纤维细胞置于含有 10% 胎牛血清及各 100 U/mL 青链霉素的 DMEM 培养基,在 37 °C,5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,常规换液维持细胞生长,待传代次数达到要求后^[15]取对数生长期状态细胞进行试验。

1.5 UVA 辐射及试验分组

采用 UVA 辐照监视仪标定紫外灯管 SUV-100 紫外线模拟器辐照度。紫外辐射剂量 = 辐照度 × 时间。辐射剂量为 10 J/cm²,辐射距离为 15 cm。将细胞分为对照组、辐射组和辐射 + 给药组,继续培养 24 h 后进行检测,3 次重复测定。

1.6 MTT 法检测细胞活性

将人皮肤成纤维细胞接种于 96 孔板中,每孔 1 × 10⁵ 个/mL 的细胞悬液 100 μL,37 °C,5% CO₂ 培养,倒置显微镜下观察至细胞单层铺满孔底时,吸去培养基,PBS 冲洗 3 次,每孔加入 100 μL PBS 于紫外灯下辐照后,给药组用黑果腺肋花楸花色苷浓度为 25、50、75、100、125、150、175、200 μg/mL DMEM 培养基,辐射组用 DMEM 培养基,每组设 5 个复孔,继续培养 24 h,每孔加入 10 μL MTT 染色液,继续培养 4 h,去除培养基,每孔加入 100 μL Formazan 溶解液,室温避光震荡 10 min,置于酶标仪 490 nm 下测量 OD 值。

1.7 ELISA 检测细胞 MMP-1 分泌水平

将接种于试剂盒培养板中的人皮肤成纤维细胞(1 × 10⁵ 个/mL,100 μL),辐射处理按照 1.5 进行,每组设 5 个复孔,测量操作步骤按照 MMP-1 试剂盒步骤严格执行。

1.8 细胞活性氧的检测

将接种于 12 孔板中的人皮肤成纤维细胞(浓度为 2.5 × 10⁵ 个/mL,2 mL),辐射处理按照 1.5 进行,每组设 3 个复孔,操作步骤按照 ROS 试剂盒步骤严格进行,于荧光酶标仪,激发波长 485 nm,发射波长 520 nm 条件下检测。测定结果以荧光强度/细胞数表示。

1.9 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,各组数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 黑果腺肋花楸花色苷的鉴定

提取的花色苷经 HP-20 树脂纯化色价由 14.3 提高到了 121.5。纯化后样品经 HPLC-DAD 分析,具体条件参照文献^[16],520 nm 下图谱见图 1,表明果实中含有 4 种花色苷单体,分别为:矢车菊素-3-

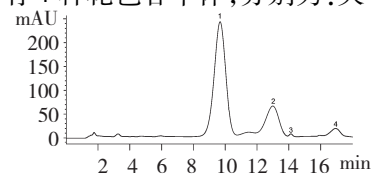


图 1 经 HP-20 大孔树脂纯化后花色苷在 520 nm 下的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of *A. melanocarpa* anthocyanins after purified by HP-20 resin at 520 nm

半乳糖苷、矢车菊素-3-阿拉伯糖苷、矢车菊素-3-木糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷,与文献^[7]报道相符,由峰面积计算花色苷含量,所占含量比例分别为:73.88%、20.02%、0.32%和3.87%。

2.2 UVA 辐射对细胞形态的影响

倒置显微镜下观察发现,与正常细胞相比,UVA 辐射后,细胞数量减少,细胞之间间隙增大,其形态出现膨胀变圆的趋势,图中也显示出,辐射后细胞特有纤维状末端有所减少,部分细胞死亡成球形聚集。结果表明 UVA 辐射能够引起细胞形态结构变化,降低细胞融合度等不良影响,说明其对成纤维细胞有较强损伤。这与文献^[17,18]描述一致。

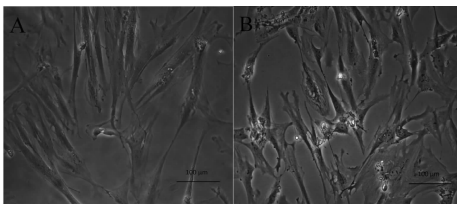


图2 正常(A)及UVA(10 J/cm²)辐射后(B)的人皮肤成纤维细胞光镜图片

Fig. 2 The image of normal (A) and treated with UVA (10 J/cm²) (B) human skin fibroblast by light microscopy

2.3 细胞增殖活性测定结果

如表1所示,辐射组与对照组相比,辐射组 OD

表1 花色苷对UVA辐射人真皮成纤维细胞增殖活性的影响

Table 1 The effect of anthocyanins on cell proliferation of UVA radiation human skin fibroblast

| 组别 Group | OD 值 Absorbance | 存活率 Survival rate (%) |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 空白对照组 Control | 0.3462 ± 0.015 | 100 |
| 辐射组 UV radiation | 0.1055 ± 0.012 [*] | 30.5 |
| 25 μg/mL Anthocyanidin | 0.174 ± 0.014 [#] | 50.3 |
| 50 μg/mL Anthocyanidin | 0.229 ± 0.012 [#] | 66.1 |
| 75 μg/mL Anthocyanidin | 0.2496 ± 0.016 [#] | 72.1 |
| 100 μg/mL Anthocyanidin | 0.3178 ± 0.015 ^{##} | 91.8 |
| 125 μg/mL Anthocyanidin | 0.3281 ± 0.021 ^{##} | 94.8 |
| 150 μg/mL Anthocyanidin | 0.225 ± 0.012 ^{##} | 65.0 |
| 175 μg/mL Anthocyanidin | 0.153 ± 0.017 [#] | 44.2 |
| 200 μg/mL Anthocyanidin | 0.132 ± 0.004 [#] | 38.1 |

注:与空白对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与辐射组比较,[#] $P < 0.05$;^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, ^{*} $P < 0.01$; Compared with radiation, [#] $P < 0.05$; ^{##} $P < 0.01$.

值明显低于对照组 ($P < 0.01$),表明模型建立成功。而紫外辐射后加入不同浓度的黑果腺肋花楸花色苷对损伤具有一定的修复作用,且在此剂量范围内,不同浓度于辐照组有显著差异,从表中可以看出 125 μg/mL AAM 的添加量对于辐照后的细胞增殖有着较好的保护作用。所以 MMP-1 分泌水平及细胞 ROS 的测定均采用此浓度的添加量进行分析。

2.4 细胞 MMP-1 分泌水平结果

以 OD 值为横坐标,MMP-1 标准品的不同浓度为纵坐标,经 CurveExpert 1.3 拟合标准曲线,得到公式为 $y = 67.216111 + 145.17133x + 2037.2571x^2$ 的 MMP-1 标准曲线,其 $r = 0.9977$,说明方程拟合有效。

经标准曲线换算,所得实验结果如表2所示。表明人皮肤成纤维细胞经过紫外辐射后,其 MMP-1 分泌水平发生了变化。与对照组相比,辐射组 MMP-1 分泌水平明显高于对照组 ($P < 0.01$),达到了 6.68 ± 0.05 ng/mL。而辐射后添加 125 μg/mL 的黑果腺肋花楸花色苷组 MMP-1 分泌量降至 4.47 ± 0.04 ng/mL,且与辐射组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

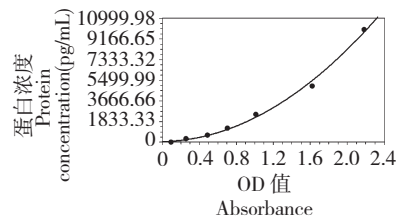


图3 MMP-1 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of MMP-1

表2 花色苷对UVA辐射人真皮成纤维细胞MMP-1分泌水平的影响

Table 2 Effect of *A. melanocarpa* anthocyanins on the levels of MMP-1 in UVA radiation human skin fibroblast

| 组别 Group | 空白对照组 Control | 辐射组 UV radiation | 125 μg/mL anthocyanidin |
|------------------|------------------|--------------------------|----------------------------|
| MMP-1 (ng/mL) | 3.67 ± 0.03 | 6.68 ± 0.05 [*] | 4.47 ± 0.04 ^{##} |

注:与空白对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与辐射组比较[#] $P < 0.05$;^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, ^{*} $P < 0.01$; Compared with radiation, [#] $P < 0.05$; ^{##} $P < 0.01$.

2.5 细胞活性氧测定结果

活性氧检测结果见表3,细胞经过紫外辐射后,由于细胞受到了损伤,细胞活性氧含量发生变化。

辐射组 ROS 比浓度变为 0.66738 ± 0.0036 , 明显高于对照组, 而辐射后添加 $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的黑果腺肋花楸花色苷组 ROS 降至 0.53313 ± 0.0025 , 与辐射组比较明显下降, 比较具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表3 花色苷对 UVA 辐射人真皮成纤维细胞 ROS 的影响

Table 3 Effect of *A. melanocarpa* anthocaynins on the levels of ROS in UVA radiation human skin fibroblast

| 组别 Group | 空白对照组 Control | 辐射组 UV radiation | $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ anthocyanidin |
|--------------------------|----------------------|------------------------|--|
| ROS 比浓度 Levels of ROS | 0.33778 ± 0.0025 | $0.66738 \pm 0.0036^*$ | $0.53313 \pm 0.0025^{##}$ |

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与辐射组比较 # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.01$; Compared with radiation, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$.

3 讨论

花色苷是黑果腺肋花楸中的主要成分, 具有抗炎、抗氧化、改善血液循环和抗辐射等功能。黑果腺肋花楸中提取的紫红色色素被欧洲国家广泛应用于食品的生产, 同时美国和欧洲国家将其作为民间药材也有很长历史, 自引入我国以来, 对其开发利用仍处于发展阶段, 因此对黑果腺肋花楸功能产品开发极具有市场应用价值。

花色苷具有抗辐射作用, 但是关于黑果腺肋花楸这方面的具体研究不多。本研究探讨了黑果腺肋花楸花色苷对人皮肤成纤维细胞紫外辐射损伤的保护作用, 为今后其作为抗辐射药物的研究奠定基础。本研究采用 MTT 法测定细胞增殖活性, 结果显示辐射组 OD 值明显低于对照组, 表明损伤模型创建成功。花色苷保护组各组 OD 值高于辐射组, 添加浓度为 $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞的保护作用最明显。另外, 随添加量增加, 花色苷对细胞修复作用逐步下降, 显示出一定的细胞毒性, 推测添加过量的花色苷改变了培养基 pH, 对细胞生长可能产生不利影响, 但其对细胞凋亡是否具有影响以及机制如何, 还有待进一步研究。

紫外线对皮肤呈纤维细胞的作用主要表现在氧化损伤上, 其通过诱导皮肤产生活性氧簇, 主要有: 氢氧根离子、超氧阴离子、单线态氧和过氧化氢等^[19], 来引起细胞或组织损伤。有研究表明 UVA 诱导生成活性氧 (ROS) 可间接对 DNA 和其他细胞结构进行破坏^[20]。同时, 生成的活性氧激活细胞信号转导途径引起 MMPs 表达, 对细胞外基质进行降解^[21]。MMP-1 是 MMPs 家族中重要的一员, 能够降

解包括 I、II、III、VII 和 X 型胶原以及酪蛋白等蛋白。本次研究可见, 辐射组 MMP-1 分泌水平和 ROS 比浓度显著高于对照组, 而花色苷添加浓度为 $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组 MMP-1 分泌水平及 ROS 比浓度均显著低于辐射组。提示黑果腺肋花楸花色苷能够通过减少细胞活性氧生成从而降低对 MMP-1 表达的影响, 从而减少了 MMP-1 分泌, 对成纤维细胞起到保护作用。

综上所述, 通过对黑果腺肋花楸花色苷抗辐射的研究表明, 黑果腺肋花楸花色苷有较好的抗 UVA 效果, 能够提高辐射后人皮肤成纤维细胞的存活率, 降低细胞 ROS 的含量, 以及 MMP-1 分泌水平, 这对黑果腺肋花楸花色苷抗辐射机理研究及抗辐射药物的开发具有很好的参考价值。

参考文献

- 1 Yao ZB(姚智兵), Jiang H(蒋昊), Wu T(吴婷). The harm and prevention of electromagnetic radiant. *Chin J Soc Med* (中国社会医学杂志), 2007, 24: 177-179.
- 2 Zhang Y(张英), Wu CJ(吴聪俊). Research progress on bio-flavonoids as natural radioprotectant. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 552-557.
- 3 Mouret S, Baudouin C, Charveron M, et al. UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin *in vivo*. *J Investigat Dermatol*, 2011, 132: 394-400.
- 4 Mouret S, Baudouin C, Charveron M, et al. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceed Nat Acade Sci*, 2006, 103: 13765-13770.
- 5 Young AR, Boles J, Herzog B, et al. A sunscreen's labeled sun protection factor may overestimate protection at temperate latitudes: a human *in vivo* study. *J Investig Dermatol*, 2010, 130: 2457-2462.
- 6 Tewari A, Grage MML, Harrison GI, et al. UVA1 is skin deep: molecular and clinical implications. *Photochem Photobiol Sci*, 2013, 12: 95-103.
- 7 Oszmianski J, Wojdylo A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*, 2005, 221: 809-813.
- 8 Valcheva-kuzmanova S, Gadjeva V, Ivanova D, et al. Antioxidant activity of *Aronia melanocarpa* fruit juice *in vitro*. *Acta Alimentaria*, 2007, 36: 425-428.
- 9 Aikaterini T, Panagiotis K, Eugene K. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chem*, 2006, 98: 599-608.

- 10 Micha B, Joanna S, Adam A, *et al.* *Aronia melanocarpa* as a protector against nitration of fibrinogen. *Int J Biol Macromol*, 2013, 55:264-268.
- 11 Bohkyung K, Chai SK, Tho XP, *et al.* *Aronia melanocarpa* (chokeberry) polyphenol-rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. *Nutritionresearch*, 2013, 33:406-413.
- 12 Malik M, Zhao C, Schoene N, *et al.* Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr Cancer*, 2003, 46:186-196.
- 13 Zapolska-Downar D, Hajdukiewicz K, Bryk D, *et al.* *Aronia melanocarpa* fruit extract exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Eur Nutr*, 2012, 51:563-572.
- 14 Guo SL(国石磊), Zhu FM(朱凤妹), Wang N(王娜), *et al.* Purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* by resins and its stability features. *Nat Prod Res Dev*(天然产物与开发), 2015, 27:1636-1642.
- 15 Cao XJ(曹晓佳). Regulation of extraction of semen coicis on the expression of MMP1, MMP3 induced by ultraviolet B radiation in the human skin fibroblast. Tianjin: Tianjin Medical University(天津医科大学), MSc. 2012.
- 16 Guo SL(国石磊). Purification, structure identification of anthocyanins and its antioxidant activity from *Aronia melanocarpa*. Hebei: Hebei Normal University of Science & Technology(河北科技师范学院), MSc. 2015.
- 17 Wang LX(王刘祥). Protective effect of EGCG against oxidative damages induced by UVA in human skin fibroblast. Zhejiang: Zhejiang University(浙江大学), MSc. 2013.
- 18 Wang LJ(王丽娟). The protective effects of vitamin E against UVA induced photoamage in human skin fibroblasts. Chongqing: Chongqing University(重庆大学), MSc. 2013.
- 19 Afanas'ev IB. Signaling by reactive oxygen and nitrogen species in skin diseases. *Curr Drug Metab*, 2010, 11:409-414.
- 20 Epe B. DNA damage spectra induced by photosensitization. *Photochem Photobiol Sci*, 2012, 11:98-106.
- 21 Sárdy M. Role of metalloproteinases in skin ageing. *Connective Tissue Res*, 2009, 50:132-138.

(上接第 1087 页)

- 18 Ye XY, Wang HX, Ng TB. First chromatographic isolation of antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263:130-134.
- 19 Ye XY, Ng TB. Delandin, a chitinase-like protein with antifungal, HIV-1 reverse transcriptase inhibitory and mitogenic activities from the rice bean *Delandia umbellata*. *Protein Expr Purif*, 2002, 24:524-529.
- 20 Wang LB(王丽波), Yu ZY(于泽源), Xu YQ(徐雅琴), *et al.* Isolation and characterization of a novel antifungal protein from pumpkin seeds. *J Chin Cereals oils Ass*(中国粮油学报), 2014, 29:63-66.