

冬瓜粗提物对小鼠紫外线晒伤皮肤的修复作用

周 琪, 曹雪姣, 刘丽坤, 赵子楠, 张翠丽*

大连医科大学基础医学院, 大连 116044

摘要:为探讨冬瓜(*Benincasa hispida*)粗提物对小鼠紫外线晒伤皮肤的修复作用, 建立小鼠紫外线晒伤模型。观察冬瓜粗提物对晒伤小鼠内源性血管内皮生长因子(VEGF)及碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)表达的影响。冬瓜提取物组(浓度均为31 mg/mL), 药物组(利多卡因氯己定气雾剂), 正常对照组和阴性组(生理盐水), 每天2次涂药并观察创面, 分别在0、1、3、7、14 d处死小鼠, 取皮肤组织, 做病理切片, 取晒伤组织提取蛋白并检测VEGF、FGF-2的表达状况。3~7 d时, 阳性对照组和实验组的VEGF和FGF-2的表达明显高于阴性对照组和正常组, 且阳性组与实验组VEGF和FGF-2表达水平有显著差异。病理切片显示实验组炎性细胞和血管数量明显多于阴性对照组, 且两组间差异明显。即冬瓜粗提物能提高皮肤组织的生长因子VEGF和FGF-2的表达, 促进晒伤皮肤的愈合。

关键词:冬瓜粗提物; 紫外线晒伤; VEGF; FGF-2

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.024

Rehabilitation Effects of *Benincasa hispida* Extract on UV-induced Sunburn Skin in Mice

ZHOU Qi, CAO Xue-jiao, LIU Li-kun, ZHAO Zi-nan, ZHANG Cui-li*

Dalian medical University, Dalian 116044, China

Abstract: To evaluate the rehabilitation effects of *Benincasa hispida* extract on sunburn mice skin by ultraviolet radiation. The mice model was developed by UV radiation, and the model mice were divided into normal control, negative control, positive control (lidocaine) and experimental group (freeze drying group) randomly. The mice in positive control and experimental group were applied with lidocaine and *B. hispida* extract twice a day respectively, both normal group and negative group were applied with saline twice a day. Then, executed the mice on 0, 1, 3, 7, 14 d respectively. The back skin was separated to make biopsy and western-blot assay. The expressions of growth factor of VEGF and FGF-2 were higher in positive control and experimental group than those in other groups, and significant difference was detected between negative control group and experimental group. The pathological analysis results showed that the number of blood vessels, fiber cells and fibroblasts in experimental group was significantly higher than those in negative group. *B. hispida* extract enhanced the expressions of VEGF and FGF-2, and promoted wound healing.

Key words: *Benincasa hispida* extract; ultraviolet; VEGF; FGF-2

冬瓜性微寒, 味甘淡无毒, 皮和种子可入药。具清肺热化痰、除烦止渴, 消除水肿、护肝肾之功效。民间常用来治疗肺热咳嗽、糖尿病、鱼蟹中毒等^[1]。Grover等^[2]研究发现冬瓜鲜汁对于大白鼠棉球状肉芽肿和卡拉胶诱导的水肿具有明显的抗炎活性。紫外线(UV)是人类生活和职业环境中的重要物理因素。机体在过量的UV辐射后产生大量的自由基, 引起细胞氧化、衰老甚至突变。VEGF和FGF-2是促进血管生成、细胞生长并使创面愈合的重要因

子^[3], 促进创面愈合。本实验通过建立小鼠紫外线UVB(波长280~320 nm, 又称为中波红斑效应紫外线)晒伤模型, 探究冬瓜粗提物对小鼠晒伤皮肤组织VEGF和FGF-2表达的影响, 为冬瓜粗提物治疗紫外线晒伤提供实验依据。

1 仪器与材料

MV-II型垂直板电泳装置、ST-I型半干式转移电泳仪(大连竞迈生物科技有限公司); HC-3018R高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

冬瓜(购自大商新玛特超市);利多卡因氯己定气雾剂(广东同德药业有限公司);脱毛膏[利洁时家化(中国)有限公司];兔抗鼠 VEGF 及 FGF-2 抗体、 β -actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体(武汉博士德生物有限公司);Pierce ECL 化学发光试剂盒(Thermo 公司)。SPF 级昆明小鼠(体重 22 ~ 25 g),大连医科大学实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 冬瓜冻干粉的提取^[4,5]

取适量新鲜冬瓜,切片、匀浆,汁液-20 °C 过夜,真空冷冻干燥,得干粉-20 °C 保存。

2.2 紫外晒伤小鼠模型建立^[6,7]及分组给药

以脱毛膏脱去小鼠背部(2.5 cm × 1.5 cm)毛发,过夜,随机分为正常对照组、阴性对照组、阳性对照组和实验组。除正常组,其他小鼠置 18w 紫外灯

10 cm 处照射 30 min。阳性组和实验组每日早晚于患处涂抹利多卡因氯己定气雾剂和冬瓜液(31 mg/mL, 0.5 mL),阴性组和正常对照组均涂抹等量生理盐水。每日涂药时观察创面是否有水肿、渗出、分泌物,结痂形成时间及边缘翘起和结痂脱落。并于晒伤的 0、1、3、7、14 d 各组随机取鼠处死,分别切取 1 cm × 1 cm 的创面皮肤组织,分别用于病理切片的制作^[8,9]和 Western-blotting 实验。

2.3 组织蛋白质提取^[10]及 Western-blotting

以 2 倍体积的提取缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, pH 7.4, 10 mM PMSF)冰上匀浆,4 °C 离心,取上清液,以考马斯亮蓝法检测蛋白质含量。常规 SDS-PAGE(蛋白质上样质量为 90 μ g)电泳,半干电转,封闭,一抗结合,4 °C 过夜,洗膜,二抗孵育,ECL 显色,凝胶成像。

2.4 数据统计

所有计量数据均采用 SPSS Statistics 11.5 统计

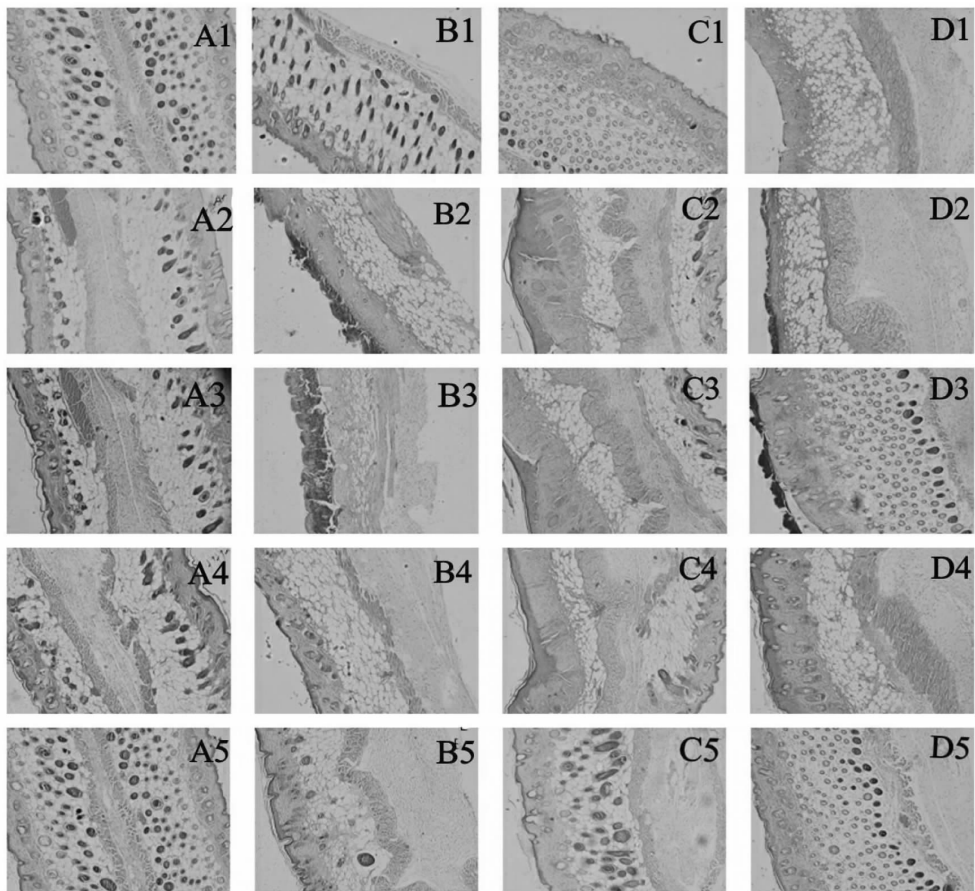


图 1 正常对照组(A)、阳性对照组(B)、阴性对照组(C)、冬瓜粗提组(D)小鼠皮肤病理切片(1-5 分别为 0h,24h,3d,7d,14d,HE × 400)

Fig. 1 The pathologic slice of mice skin after UV from normal group (A), positive group (B), negative group (C), and *B. hispida* extract group (D) (1-5 represents 0h,24h,3d,7d,14d respectively, HE × 400)

软件分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为统计学差异有显著性; $P < 0.01$ 有极显著差异;病理结果采用 Ridit 法统计。

3 实验结果

3.1 大体观察结果

晒伤后 0 h,小鼠背部皮肤发紫;24 h 后,阴性对照组背部皮肤肿胀逐渐出现红肿,3 d 的阴性对照组小鼠背部皮肤出现大量红色斑点,其他组斑点减少;7 d 时,除阴性对照组外其他组小鼠背部皮肤创面均干燥,形成结痂,无不良反应;14 d 后,各组小鼠背部皮肤均恢复正常。

3.2 创面愈合时间

以结痂全部脱落为愈合标准,冬瓜粗提物治疗的小鼠愈合天数与阴性组相比有差异($P < 0.05$)。

3.3 病理学观察

病理切片观察可见(图 1):紫外晒伤 24h 后,实验组水肿减轻,炎性细胞增加;3d 时,镜下可见实验组的肉芽组织形成,毛细血管新生和成纤维细胞增生;7~14 d 时,冬瓜粗提物能加速皮肤及皮肤附属器的再生。

3.4 相关细胞及血管数量统计分析

冬瓜粗提物组和阳性对照组作用 3 d 后血管数目与阴性对照组比有显著差异($P < 0.01$)(表 1),炎性细胞浸润与阴性组比有显著差异($P < 0.01$)(表 2)。

表 1 冬瓜粗提物对紫外线晒伤小鼠血管数目的影响

Table 1 Effect of *B. hispida* extract on numbers of blood vessels of UV-induced sunburn mice

组别 Group	血管数目 Numbers of blood vessels				
	0 h	24 h	3 d	7 d	14 d
正常对照组 Normal	12.2 ± 1.2	11 ± 1	11 ± 1	12 ± 0.7	11.2 ± 1
阴性对照组 Negative	2.4 ± 0.3	2 ± 0.3	3 ± 0.7	4 ± 0.3	8 ± 1
阳性对照组 Positive	2.4 ± 0.3	3 ± 0.3	7 ± 1.2**	8.2 ± 0.7**	10 ± 0.7
冬瓜粗提组 <i>B. hispida</i> extract	2 ± 1	3 ± 0.7	7.8 ± 0.7**	8.4 ± 0.3**	11 ± 0.3

注:与阴性对照组相比,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with negative group, ** $P < 0.01$.

表 2 冬瓜粗提物对紫外线晒伤小鼠炎性细胞浸润的 Ridit 统计结果

Table 2 Results of Ridit Statistics for infiltration of inflammatory cells of UV-induced sunburn mice treated with *B. hispida* extract

组别 Group	炎性细胞浸润 Infiltration of inflammatory cells		
	P 值 P Value	Ridit 均值 Ridit Mean	95% 可信限 95% Confidence Intervals
正常对照组 Normal	1.000	0.927 ~ 1.213	< 0.05
阴性对照组 Negative	0.500	0.347 ~ 0.633	-
阳性对照组 Positive	0.840	0.677 ~ 0.963	< 0.01
冬瓜粗提组 <i>B. hispida</i> extract	0.780	0.597 ~ 0.983	< 0.01

3.5 Western-Blot 检测结果

Western blot 结果显示,冬瓜能促进 VEGF 及 FGF-2 的表达。3 d 时,实验组与阴性组相比,VEGF 表达量提高有所提高,比阳性对照组略高;FGF-2 表达量提高 7 倍左右。7 d 时,实验组与阴性组比,VEGF 表达量提高 2 倍左右,比阳性对照组略高;FGF-2 提高 4 倍左右。14 d 时,冬瓜粗提组与阴性组相比,VEGF 的表达量仍然高出许多,比阳性对照组略高;FGF-2 的表达也高出 3 倍左右。

4 讨论与结论

晒伤皮肤愈合是一个受多因素影响的过程,其中各种生长因子的调节作用是创伤修复领域的研究热点^[11-13]。新生血管是修复过程中一切修复程序得以正常进行的保障系统,VEGF 在很多病理和生理过程中对血管形成有着极其重要的作用^[14]。碱性成纤维细胞生长因子 FGF-2 在细胞受损后,参与组织的修复过程^[15]。

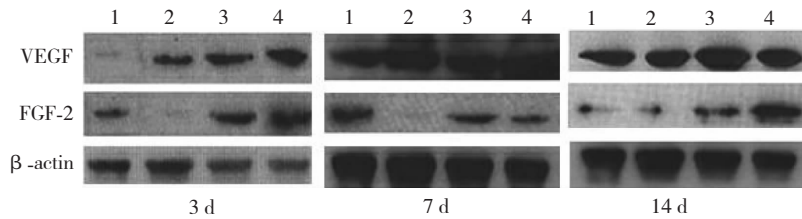


图2 正常对照组(1)、阴性对照组(2)、阳性对照组(3)及冬瓜粗提组(4)中 VEGF 和 FGF-2 蛋白表达

Fig. 2 The protein expression of VEGF and FGF-2 in normal group (A), postive group (B), negative group (C) and *B. hispida* extract group (D)

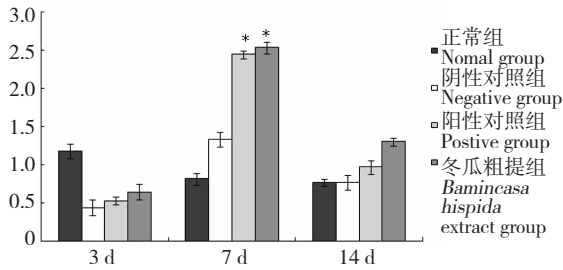


图3 VEGF 与 β -actin 灰度值比值

Fig. 3 The gray scale value ratio of VEGF and β -actin

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$

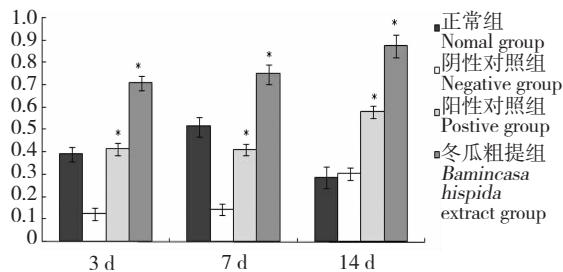


图4 FGF-2 与 β -actin 灰度值比值

Fig. 4 The gray scale value ratio of FGF-2 and β -actin

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$

本研究表明:通过病理切片可知,冬瓜粗提物作用于晒伤小鼠 3~7 d 后能降低炎症反应,增强肉芽组织的形成及表皮再生,促进创面愈合,减少愈合天数。通过 Western-blot 检测结果分析,3 d 时冬瓜粗提组 VEGF 和 FGF-2 的表达量有所提高,7 d 时表达量最高,阳性对照组次之,明显高于阴性对照组和正常组表达量。表明冬瓜粗提物有明显的促进 VEGF 及 FGF-2 表达的作用,和病理切片结果一致。提示冬瓜有修复皮肤紫外晒伤的作用。相关研究表明,晒伤修复过程中,既有通过改善相关细胞的数量和功能,促进内源性生长因子的合成分泌^[12-15];也有

通过相关生长因子的基因表达上调而提高生长因子的合成分泌^[16,17]。冬瓜提高 VEGF 和 FGF-2 表达水平的机制有待进一步研究。

参考文献

- Zhang W(张文), Xie LS(谢良商), Fu CL(符传良), et al. Response of wax gourd to nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium and zinc fertilization. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 2010, 26(20): 212-216.
- Grover JK, Rathi SS. *Benincasa hispida*: an anti-inflammatory agent with cytoprotective activity. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994, 72: 269.
- Zhu HF(朱华锋), Wang CL(汪春兰), Zhao Y(赵宇). VEGF and FGF-2 synergy research progress in angiogenesis. *Chin J Plas Surg*(中华整形外科杂志), 2006, 22(1): 72-74.
- Liu B(刘斌). Preparation, identification and primary anti-tumor bioactivity screening of polysaccharides from the Chinese Madecine-Sargassum Pallidum. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学), Msc. 2005.
- Ren JT(任建廷), Sang JL(桑建利). The occurrence of DNA damage and skin cancer induced by Ultraviolet ray. *Bull Biol*(生物学通报) 2004, 39(1): 4-5.
- Li XM(李旭梅). The mechanism of ultraviolet radiation to skin cancer. *For All Health*(大家健康), 2013, 7: 125.
- Trejo-Gonzalez A, et al. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol*, 1996, 55(1): 27-33.
- Yang LM(杨黎明). Pathology biopsy technique. *Med Inf*(医学信息) 2011, 24: 1158-1160.
- Ye RG(叶任高). Internal Medicine(内科学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2001. 955.
- Lu TT(路婷婷). Mechanism of UV damage and the protective effect of natural products against UV damage. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2012, 28: 1655-1659.

(下转第 1498 页)