

刺五加提取物对人脐静脉内皮细胞紫外线辐射损伤的防护作用

张智¹, 化洪苓¹, 尹文哲², 李晴¹, 吕歌¹, 刘洋¹, 武天琦¹

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 研究刺五加提取物对紫外线辐射损伤人脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 的影响。将进入对数生长期的 HUVEC 细胞分为空白对照组、辐射组、给药预防组 (低、中、高剂量) 和给药修复组 (低、中、高剂量)。各组均接受相同辐射, 给药预防组提前加入不同质量浓度的刺五加提取物孵化 12 h。采用 MTT 法检测细胞存活率, TBA 法检测丙二醛 (MDA) 含量, WST 法检测超氧化物歧化酶 (SOD) 水平, 通过 DNA-Ladder 检测细胞凋亡。结果表明: 经辐射后, 给药预防组和给药修复组细胞存活率均有所提高, 且呈质量浓度依赖性。与空白对照组相比, 辐射组 MDA 含量升高, SOD 水平下降; 与辐射组比较, 实验组给药后 MDA 含量降低, SOD 水平升高。DNA-Ladder 可以得到明显 DNA 凋亡条带。刺五加提取物能有效预防和修复辐射损伤的 HUVEC 细胞, 且上述试验中给药预防组效果均优于给药修复组。

关键词: 紫外辐射; 预防; 修复; 人脐静脉内皮细胞

文章编号: 1673-9078(2018)02-44-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.008

Protective Effect of Acanthopanax Senticosus Extract on the Ultraviolet Radiation Injury of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ZHANG Zhi¹, HUA Hong-ling¹, YIN Wen-zhe², LI Qing¹, LV Ge¹, LIU Yang¹, WU Tian-qi¹

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2. Harbin Medical University the 2nd Affiliated Hospital, Harbin 150086, China)

Abstract: The effect of Acanthopanax senticosus extract on the ultraviolet radiation injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was investigated. The HUVEC cells entering the logarithmic growth phase were divided into blank control group, radiation group, drug prevention group (low, middle and high dose) and drug repair group (low, middle and high dose). Each group received the same radiation, and the drug prevention group was hatched for 12 h by adding different concentrations of Acanthopanax senticosus extract. The cell viability was measured by MTT assay and the content of malondialdehyde (MDA) was detected by TBA method. The level of superoxide dismutase (SOD) was detected by WST method. The apoptosis was detected by DNA-Ladder. The result showed that after radiation, the cell viability in the drug prevention group and the drug repair group were both increased in a concentration-dependent manner. Compared with the blank control group, the content of MDA in radiation group increased and the level of SOD decreased. Compared with the radiation group, the content of MDA decreased and the level of SOD increased in the experimental group. DNA-Ladder could obtain obvious DNA apoptotic bands. Acanthopanax senticosus extract could effectively prevent and repair radiation-injured HUVEC cells, and the preventive effect of the drug prevention group of the above-mentioned test was superior to the drug repair group.

Key words: UV radiation; prevention; repair; human umbilical vein endothelial cell

在现代生活中, 紫外线 (UV) 辐射与我们联系紧密, 息息相关。紫外线照射会对人体皮肤造成严重伤害, 如可影响真皮组织中的胶原及弹力纤维, 产生皮

收稿日期: 2017-09-16

基金项目: 黑龙江省中医药管理局项目 (zhy-12-z160)

作者简介: 张智 (1964-), 女, 博士, 教授, 主要从事生物转化, 微生物发酵和功能食品研究

通讯作者: 尹文哲 (1971-), 男, 教授, 博士后, 主要从事骨科研究

肤光老化^[1,2]; 引起表皮层及真皮浅层的病变, 产生日晒红斑、免疫抑制及皮肤癌^[3-5]。目前国内外关注的焦点是开发天然的紫外线防护剂, 主要研究的有黄酮类化合物、萜类化合物、鞣质类和香豆素类等^[6]。张琛等^[7]研究枸杞多糖对中波紫外线辐射的 HaCat 细胞具有氧化损伤的保护作用, 可减轻细胞形态变化和脱片现象。辛蕾等^[8]研究羟基花色素 A 对紫外线对皮肤成纤维细胞抗皮肤光老化具有一定的保护作用。郭砚等

[9]研究减雪莲多糖可以通过 P38 丝裂原激活蛋白激酶通路减轻中波紫外线对皮肤角质形成细胞的炎症损伤作用。崔砾砾等^[10]研究苹果多酚对 UVB 辐射的 HepG2 细胞具有防护作用。喻晶等^[11]研究紫外线照射对血管内皮细胞的损伤效应,显示在紫外线作用于皮肤细胞,组织实质产生变化之前,血管细胞会先出现异常反应^[12]。由于 HUVEC 细胞对辐射具有强烈敏感性,因此选用 HUVEC 细胞进行抗紫外线辐射的研究。

刺五加是我国北方地区特产常用药材之一,素有“补中益精、强志意、久服轻身耐劳”等功效。其作为药物在古医书上已有记载,刺五加全身是宝,其根、茎和叶均可入药^[13],刺五加叶中含有丰富的黄酮类活性物质^[14]。刺五加在小鼠抗辐射方面已有大量研究,莫琳芳^[15]等研究了刺五加多糖对 ⁶⁰Co γ 射线辐照大鼠的胃肠道及生殖系统有保护作用。陈月^[16]等研究了刺五加皂苷可减轻经 X 射线照射的小鼠免疫功能的损伤,提高淋巴细胞转化率。本实验拟探讨四种刺五加提取物对经紫外线辐射的 HUVEC 细胞的预防和修复作用。

1 材料与方法

1.1 原料

未发酵刺五加水提物 (Unfertilized Acanthopanax Extract, UAE)、未发酵刺五加醇提物 (Unfertilized Acanthopanax Alcohol Extract, UAA)、发酵刺五加水提物 (Fermented Acanthopanax Extract, FAE)、发酵刺五加醇提物 (Fermented Acanthopanax Alcohol Extracts, FAA) 均由东北林业大学食品微生物实验室提供。人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 由东北林业大学盐碱地实验室惠赠。

1.2 试剂

DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司; 0.25% 胰蛋白酶购自 HyClone 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 双抗购自 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自 Biosharp 公司; 非必需氨基酸购自 Biotopped 公司; 氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾和二甲亚砜 (DMSO) 购自天津天力化学试剂有限公司; 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测试盒和 DNA-Ladder 细胞凋亡试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器设备

经济型医用离心机, 北京鼎昊源科技有限公司; BCL-1000A 型超净工作台, 北京亚泰科隆仪器技术有限公司; GL-802A 型微型台氧式真空泵, 其林贝尔仪器制造有限公司; 倒置显微镜, Olympus 公司; 酶标仪, 基因有限公司; 二氧化碳培养箱, SANYO 公司; 高速冷冻离心机, ThermoFisher 公司; 数显恒温水浴锅, 上海博讯实业有限公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 722s 可见分光光度计, 中国上海精密科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养及实验分组

HUVEC 细胞用含 10% 的 FBS、1% 的双抗和 1% 的非必需氨基酸的 DMEM 高糖培养基, 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养^[17]。0.25% 胰蛋白酶消化传代, 隔天换液, 3 天一传代。HUVEC 细胞分为空白对照组, 实验组 (给药预防组, 给药修复组) 和辐射组。给药预防组于照射前 12 h 加入不同质量浓度的刺五加提取物进行孵化。

1.4.2 辐射模型的建立

取生长状态良好的 HUVEC 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化制得细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^4 个/孔, 每孔 200 μ L 加入 96 孔板中, 空白对照组不加细胞悬液。24 h 贴壁后吸出培养液, 每孔加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 200 μ L, 空白对照组用锡箔纸覆盖, 实验组和辐射组接受紫外线辐射, 每组设 4 个复孔, 每组试验重复三次。紫外灯强度 120 μ w/cm², 分别照射 1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、6 min, 辐射后换液培养 24 h 后用 MTT 法^[18]确定辐射剂量。

辐射剂量 (mJ/cm²) = 辐射强度 (mw/cm²) \times 辐射时间 (s)

1.4.3 MTT 法测刺五加提取物对 HUVEC 细胞增殖的影响

将对数生长期的 HUVEC 细胞制成细胞悬液, 以细胞浓度为 5×10^4 个/孔, 每孔 200 μ L 加入 96 孔板中, 24 h 贴壁后吸出上清液, 再分别加入终浓度为 50、100、200、400 和 800 μ g/mL 的刺五加提取物 200 μ L, 空白对照组只加入 200 μ L 的 DMEM 高糖培养基, 每组设 4 个复孔, 每组试验重复三次, 于 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养。24 h 后各孔加入质量浓度 5 mg/mL 的 MTT 50 μ L, 于 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中继续孵育 4 h 后弃上清, 加入 150 μ L DMSO 后振荡摇匀 3~5 min, 于酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度值 (OD) ^[19]。根据下式计算细胞存活率^[20]。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{(\text{实验组OD值} - \text{空白对照组OD值})}{(\text{辐射组OD值} - \text{空白对照组OD值})} \times 100\%$$

1.4.4 刺五加提取物对 HUVEC 细胞紫外辐射损伤的预防作用

根据 1.4.3, 细胞做相同处理。先加入不同质量浓度的刺五加提取物预孵化 12 h^[21]后用 1.4.2 得到的辐射剂量辐射细胞。再培养 12 h 后进行 MTT 检测, 每组设 4 个复孔, 每组试验重复三次。

1.4.5 刺五加提取物对 HUVEC 细胞紫外辐射损伤的修复作用

根据 1.4.3, 细胞做相同处理。根据 1.4.2 得到的辐射剂量辐射细胞后加入不同终质量浓度的刺五加提取物细胞悬液培养 24 h 后进行 MTT 检测, 每组设 4 个复孔, 每组试验重复三次。

1.4.6 MDA 和 SOD 的检测

根据 1.4.3, 细胞做相同处理后加胰酶消化, 收集细胞, 10000 r/min 离心 5 min, 并用 PBS 液洗 2 次, 放入高速冷冻离心机中, 4 ℃, 10000 r/min 离心 20 min。离心后, 取上清液据试剂盒说明测定各组 SOD 的活性和 MDA 的含量^[22-24]。

1.4.7 DNA-Ladder 试验

取生长状态良好的 HUVEC 细胞, 制成细胞悬浮液, 以每孔 2 mL 的量将细胞接种于 6 孔板上, 每孔 5×10^4 个, 试验按 1.4.3 和试剂盒说明进行。

1.5 数据分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过软件 SPSS 21.0 和 Statistix 8.1 进行相关计算处理, 并做 Duncan^a 和 Dunnett T3 检验分析, 显著性差异 ($p < 0.05$); 作图利用 OriginPro 8.6 与 Excel 2010 进行处理。

2 结果与讨论

2.1 不同辐射剂量对细胞形态学影响

HUVEC 细胞于 10%FBS、1%的双抗和 1%的非必需氨基酸的 DMEM 高糖培养基中培养 96 h 后细胞形态见图 1a, 经紫外线辐射后形态变化如图 b、c、d。

由图 1 可知, HUVEC 细胞在 96 h 后基本达到对数生长期, 在倒置显微镜下观察细胞为单层生长细胞, 细胞贴壁生长, 呈梭形, 饱满, 铺路石状生长。生长汇合后互不重叠, 紧密镶嵌, 随着紧密程度的提高, 细胞体积还会稍微缩小^[25]。经过紫外线辐射 HUVEC 细胞, 细胞体积变小, 胞膜气泡化, 与邻近细胞分离, 细胞间连接松散, 空隙越来越大, 细胞凋亡。

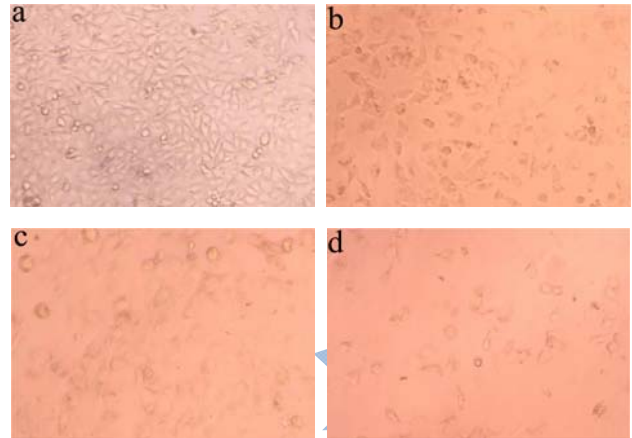


图 1 HUVEC 细胞形态

Fig.1 The morphology of HUVEC cell

2.2 不同辐射剂量对细胞存活率的影响

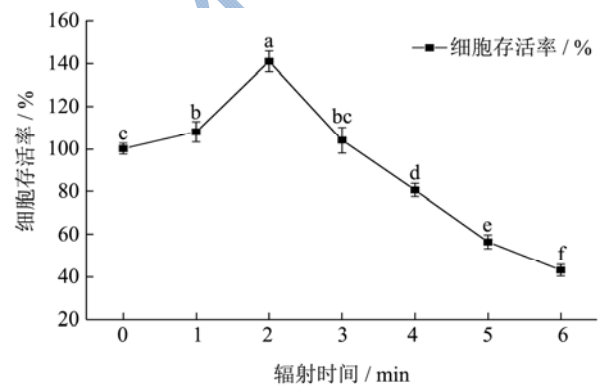


图 2 不同辐射剂量下的 HUVEC 细胞存活率

Fig.2 Cell viability of HUVEC cells under different doses of radiation

注: 图中 a~f 表示辐射时间对细胞存活率的显著性差异, $p < 0.05$ 。

按 1.4.2 建立辐射模型, 紫外灯管距离 HUVEC 细胞垂直 15 cm 处照射细胞, 时间分别为 1 min、2 min、3 min、4 min、5 min 和 6 min。经 MTT 染色测数, 得到图 2。

由图 2 可知, 0~3 min 内, HUVEC 细胞在紫外线辐射下能促进其增殖, 在第 2 min 中达到最高。第 3 min 后紫外线辐射开始抑制其增殖, 随着时间的增加, 辐射剂量的累积, 细胞所承受的损伤越大, 细胞存活率快速下降。应用 SPSS 21.0 分析得出在 5.5 min 时达到半致死剂量, 对应的辐射剂量为 39.6 mJ/cm^2 。

2.3 刺五加提取物对 HUVEC 细胞增殖的影响

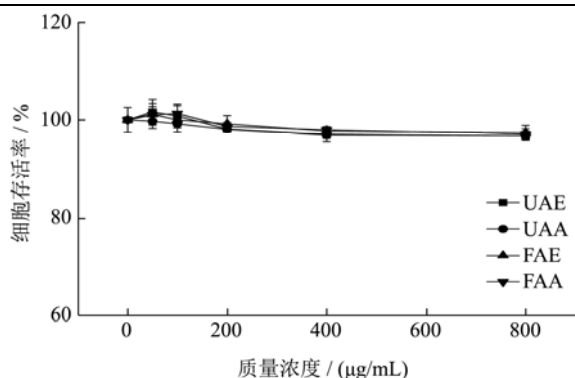


图3 四种刺五加提取物不同质量浓度下 HUVEC 细胞存活率

Fig.3 The cell viability of HUVEC cells at different concentrations of Acanthopanax senticosus extract

2.4 刺五加提取物对 HUVEC 细胞紫外辐射损伤的预防作用的结果

表 1 刺五加提取物对 HUVEC 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$) %

Table 1 Effects of Acanthopanax senticosus extract on the cell viability of HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

刺五加提取物质量浓度/(μg/mL)	UAE	UAA	FAE	FAA
对照组	100.00±2.55	100.00±2.55	100.00±2.55	100.00±2.55
50	101.61±2.57	99.73±1.50	101.13±2.20	101.02±1.68
100	100.81±2.42	99.19±1.68	100.00±1.60	101.29±1.60
200	98.12±0.36	98.06±0.42	99.19±1.68	98.66±0.84
400	97.02±0.82	96.83±1.33	97.72±0.92	97.96±0.54
800	96.72±0.87	96.72±0.95	97.37±1.51	97.07±1.13

表 2 刺五加提取物对 HUVEC 细胞辐射损伤的预防作用

Table 2 Preventive effect of Acanthopanax senticosus extract on the radiation injury of HUVEC cells

细胞存活率/%	UAE	UAA	FAE	FAA
对照组	49.05±0.64	49.05±0.64	49.05±0.64	49.05±0.64
50 μg/mL	49.30±0.76 ^d	49.27±0.67 ^d	49.32±0.31 ^d	48.95±0.61 ^e
100 μg/mL	49.54±0.42 ^d	49.49±0.60 ^d	49.83±0.25 ^d	51.67±0.56 ^d
200 μg/mL	52.28±0.45 ^c	53.87±0.77 ^{c*}	53.33±0.47 ^{c*}	58.15±0.59 ^{c**}
400 μg/mL	54.25±0.39 ^{b*}	59.11±0.35 ^{b**}	55.65±0.47 ^{b**}	63.52±0.70 ^{b**}
800 μg/mL	56.64±0.38 ^{a**}	61.26±0.28 ^{a**}	59.25±0.57 ^{a**}	65.67±0.55 ^{a**}

注: a-e 为同类子集显著性差异 ($p < 0.05$); *为实验组与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$); **为实验组与对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$)。

2.5 刺五加提取物对 HUVEC 细胞紫外辐射损伤的修复作用的结果

按 1.4.5 所示方法, 经过处理的细胞直接紫外线辐射 5.5 min 后再加入不同质量浓度的四种刺五加提取物孵育 24 h, 经 MTT 测数得到表 3。

由表 3 可知, 四种刺五加提取物在低剂量 50~200 μg/mL 时, 均无明显的抗辐射修复作用。在中剂量

按 1.4.4 所示方法, 经过处理的细胞先加入不同质量浓度的四种刺五加提取物孵育 12 h 后, 用紫外线辐射 5.5 min, 继续培养 12 h 后, 经 MTT 测数得到表 2。

由表 2 可知, 对照组细胞存活率为 49.05%, 四种刺五加提取物在低剂量 50~200 μg/mL 时, 均无显著影响。

在中剂量 200~400 μg/mL 时, UAA, FAE 有显著差异 ($p < 0.05$), FAA 有极显著差异 ($p < 0.01$); 在高剂量 400~800 μg/mL 时, 除了 UAE 有显著差异外, 其余均有极显著差异。在最高剂量 800 μg/mL 时, UAE 仅仅到达 56.64% 的存活率与 FAE 在 400 μg/mL 时得细胞存活率相近。FAA 在 800 μg/mL 时, 细胞存活率达到 65.67%, 与对照组相比提高了 33.88%, 抗辐射预防效果显著。根据表 2 整体趋势, 可看出发酵组比未发酵组抗辐射效果显著, 醇提物比水提物抗辐射效果好。

200~400 μg/mL 阶段, 四种刺五加提取物均表现出极显著差异; 在高剂量阶段 400~800 μg/mL 阶段细胞存活率仍在上升, 只是逐渐缓慢, 可见继续增加给药浓度对 HUVEC 细胞仍有修复作用, 但必须在给药安全质量浓度范围内进行。

FAA 在 800 μg/mL 时, 细胞存活率为 59.83%, 仅为同一条件预防作用的 91.11%。对比表 2 和表 3, 可以得出刺五加提取物在 HUVEC 细胞抗紫外线辐射时, 预防效果要优于修复效果。

表3 刺五加提取物对 HUVEC 细胞辐射损伤的修复作用

Table 3 The recovery effect of Acanthopanax senticosus extract on the radiation injury of HUVEC cells

细胞存活率/%	UAE	UAA	FAE	FAA
对照组	49.29±0.58	49.29±0.58	49.29±0.58	49.29±0.58
50 µg/mL	49.33±0.70 ^d	49.55±0.68 ^e	49.61±0.36 ^{de}	49.77±0.60 ^{de}
100 µg/mL	50.22±0.61 ^d	50.72±0.58 ^d	50.56±0.51 ^d	51.00±1.04 ^d
200 µg/mL	51.61±0.81 ^c	52.01±0.67 ^c	51.83±0.73 ^c	52.72±0.67 ^c
400 µg/mL	53.83±0.58 ^{b**}	54.89±0.57 ^{b**}	54.50±0.63 ^{b**}	56.44±0.83 ^{b**}
800 µg/mL	56.22±0.75 ^{a**}	57.94±0.93 ^{a**}	57.33±0.50 ^{a**}	59.83±1.05 ^{a**}

注: a-e 为同类子集显著性差异 ($p < 0.05$); *为实验组与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$); **为实验组与对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$).

2.6 刺五加提取物对 HUVEC 细胞中 SOD 和 MDA 的影响

根据 2.4 和 2.5 的结果选取对 HUVEC 细胞作用明显的高剂量组 (400、600、800 µg/mL) 来检测 MDA 的含量和 SOD 的活性。结果见表 4~表 7。

表4 药物预防组对 HUVEC 细胞中 MDA 含量 (nmol/mL) 的影响

Table 4 Effects of drug prevention group on the MDA content (nmol/mL) in HUVEC cells

µg/mL	UAE	UAA	FAE	FAA
空白对照组	6.55±0.21	6.55±0.21	6.55±0.21	6.55±0.21
辐射对照组	15.85±0.50	15.85±0.50	15.85±0.50	15.85±0.50
400	15.25±0.35 ^{a**}	11.92±0.52 ^{a**##}	14.64±0.35 ^{a**}	9.78±0.41 ^{a**##}
600	14.72±0.36 ^{a**}	11.29±0.41 ^{b**##}	12.99±0.57 ^{b**#}	8.65±0.52 ^{b**##}
800	13.36±0.33 ^{b**#}	10.31±0.35 ^{c**##}	11.66±0.55 ^{c**##}	7.99±0.31 ^{c**##}

表5 药物修复组对 HUVEC 细胞中 MDA 含量 (nmol/mL) 的影响

Table 5 Effects of drug repair group on the MDA content (nmol / mL) in HUVEC cells

µg/mL	UAE	UAA	FAE	FAA
空白对照组	6.55±0.21	6.55±0.21	6.55±0.21	6.55±0.21
辐射对照组	15.85±0.50	15.85±0.50	15.85±0.50	15.85±0.50
400	15.34±0.35 ^{a**}	14.96±0.26 ^{a**}	14.90±0.19 ^{a**}	12.61±0.37 ^{a**##}
600	14.93±0.28 ^{a**}	13.52±0.27 ^{b**#}	13.54±0.54 ^{b**}	12.20±0.19 ^{ab**##}
800	13.43±0.30 ^{b**#}	12.19±0.50 ^{c**##}	12.66±0.49 ^{c**##}	11.72±0.45 ^{b**##}

注: a-c 为同类子集显著性差异 ($p < 0.05$); *为实验组与辐射对照组相比差异显著 ($p < 0.05$); **为实验组与辐射对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$); #为实验组与空白对照组相比差异显著 ($p < 0.05$); ##为实验组与空白对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$).

由表 4 和表 5 可知, 紫外线辐射使辐射对照组的 MDA 含量较空白对照组增加, 但给药组均比辐射对照组降低, 随着给药浓度的增加, HUVEC 细胞中 MDA 含量也随之减少。

MDA 间接反映了细胞受自由基攻击的程度, 降低说明多余自由基已被清除, 直接说明了刺五加提取物能有效预防和修复紫外线辐射对 HUVEC 细胞带来的损伤。

由表 6 和表 7 可知, 辐射对照组与空白对照组相比, SOD 活性显著降低。但给药组均比辐射对照组增加, 随着给药浓度的增加, HUVEC 细胞中 MDA 含量也随之递增。SOD 间接反映了细胞清除自由基的能

力, SOD 活性的增强直接说明了刺五加提取物能有效预防和修复紫外线辐射对 HUVEC 细胞带来的损伤。

SOD 是需氧生物体内的一种含金属离子的酶蛋白, 其功能为催化超氧自由基的歧化反应, 对机体起保护作用^[16]。MDA 是脂质过氧化过程中的代谢产物, 其生成量间接反应过氧化氢对细胞的损伤程度, 它可在膜内形成交联, 使膜成分多聚化, 进而导致膜结构和流动性改变, 通透性上升^[26]。SOD 活性与 MDA 含量经常一起反应细胞内自由基的清除情况。经紫外线辐射, HUVEC 细胞产生大量多余自由基, 刺五加提取物可以降低细胞内 MDA 含量, 增加 SOD 活性, 减缓了细胞的凋亡, 其结果与卢芳^[22]和顾晓苏^[27]一致。

表 6 药物预防组对 HUVEC 细胞中 SOD 活力 (U/mL) 的影响

Table 6 Effects of drug prevention group on the activity of SOD (U/mL) in HUVEC cells

μg/mL	UAE	UAA	FAE	FAA
空白对照组	28.39±0.72	28.39±0.72	28.39±0.72	28.39±0.72
辐射对照组	12.48±0.97	12.48±0.97	12.48±0.97	12.48±0.97
400	15.46±0.55 ^{c**}	19.69±0.75 ^{b**##}	16.67±0.52 ^{b**}	21.24±0.63 ^{b**##}
600	16.55±0.63 ^{b**}	20.27±0.72 ^{ab**##}	17.70±0.78 ^{b**#}	22.49±0.95 ^{a**##}
800	17.65±0.40 ^{a**#}	21.33±0.88 ^{a**##}	19.92±1.04 ^{a**##}	23.13±0.72 ^{a**##}

表 7 药物修复组对 HUVEC 细胞中 SOD 活力 (U/mL) 的影响

Table 7 Effects of drug repair group on the activity of SOD (U/mL) in HUVEC cells

μg/mL	UAE	UAA	FAE	FAA
空白对照组	28.39±0.72	28.39±0.72	28.39±0.72	28.39±0.72
辐射对照组	12.48±0.97	12.48±0.97	12.48±0.97	12.48±0.97
400	15.33±0.56 ^{b**}	15.53±0.65 ^{c**}	15.50±0.85 ^{c**}	17.81±0.70 ^{b**##}
600	16.36±0.73 ^{ab**}	17.55±0.90 ^{b**#}	17.40±0.74 ^{b**#}	19.52±0.96 ^{a**##}
800	17.41±0.52 ^{a**#}	19.49±0.68 ^{a**##}	18.64±0.74 ^{a**##}	20.33±0.79 ^{a**##}

注: a-c 为同类子集显著性差异 ($p < 0.05$); *为实验组与辐射对照组相比差异显著 ($p < 0.05$); **为实验组与辐射对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$); #为实验组与空白对照组相比差异显著 ($p < 0.05$); ##为实验组与空白对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$).

2.7 DNA-Ladder 评价细胞 DNA 损伤

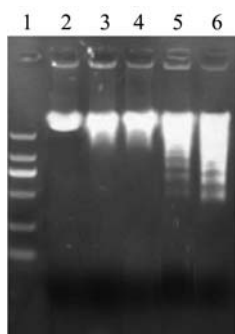


图 4 刺五加提取物对 HUVEC 细胞辐射损伤的预防作用

Fig.4 Preventive effect of Acanthopanax senticosus extract on the radiation injury of HUVEC cells

注: 从左至右分别为 DNA Marker: DL2000、空白对照组、800 μg/mL、600 μg/mL、400 μg/mL 组、辐射组。

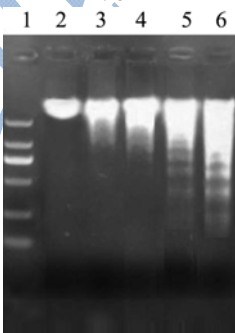


图 5 刺五加提取物对 HUVEC 细胞辐射损伤的修复作用

Fig.5 Effects of Acanthopanax senticosus extract on the radiation injury of HUVEC cells

注: 从左至右分别为 DNA Marker: DL2000、空白对照组、

800 μg/mL、600 μg/mL、400 μg/mL 组、辐射组。

按 1.4.7 进行 DNA-Ladder 检测细胞凋亡, 运用凝胶成像系统拍照, 结果如图 4 和图 5。

紫外线辐射造成细胞凋亡的机制已有大量研究, 其中主要热点为丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号转导通路, 紫外线可将其激活, 是调节紫外线诱导多重细胞反应中的关键因素^[28,29]。MAPK 主要由四个家族组成, 其中其中 p38 介导的炎症反应和凋亡在维护表皮完整性和对抗紫外线诱导的肿瘤效应方面具有重要作用^[30]。刺五加提取物含有大量的黄酮类成分, 是天然的强抗氧化剂。猜想加入干预后可抑制 p38MAPK 途径活化和炎症因子分泌, 进而减轻紫外线辐射造成的细胞凋亡。

图 4 为药物预防组的 DNA 条带, 从左至右分别为 DNA Marker: DL2000、空白对照组、800 μg/mL、600 μg/mL、400 μg/mL 组、辐射组。由图 4 可知, 经紫外线辐射后, 不同的给药浓度处理后均产生典型的 DNA 条带。空白对照组 (未经紫外线辐射) 与辐射组比较, 未产生 DNA-Ladder 明显条带, 说明空白对照组 DNA 含量多且完整; 辐射组则有明显的 DNA-Ladder 凋亡条带。给药组三个浓度均比辐射组条带有所改善。随着给药浓度的增加, DNA 凋亡减少。同理图 5 为药物修复组的 DNA 条带, 组内趋势与给药预防组相同。对试验结果分析, 可见刺五加提取物可有效的预防和修复经紫外线辐射对 HUVEC 细胞的损伤, 且与给药浓度呈剂量依赖性关系。

紫外线现已成为主要的辐射伤害源, 紫外线引起

的皮肤光老化的主要机制有：氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、胶原和弹性蛋白的降解等。由于紫外线损伤是皮肤健康的主要危险因素，也是皮肤衰老过程的主要原因，保护人体皮肤免受紫外线损伤具有重要价值^[31]。刺五加提取物中含有大量的皂苷类成分，主要包括紫丁香苷，金丝桃苷和齐墩果酸等，此外还含有丰富的黄酮类活性成分，均具有优良的抗氧化抗衰老作用。为解释刺五加提取物抗辐射作用提供一定的理论支持。

3 结论

人脐静脉内皮细胞是重要的辐射敏感细胞，用其构建紫外线辐射模型可有效的解释和说明刺五加提取物抗紫外线辐射的能力。经试验 HUVEC 细胞半致死紫外线辐射剂量为 39.6 mJ/cm²，质量浓度≤800 μg/mL 均为安全浓度，在其范围内不会因为刺五加自身引起 HUVEC 细胞的凋亡。刺五加提取物可有效预防和修复经紫外线辐射后的 HUVEC 细胞，减少其凋亡数量，DNA-Ladder 试验出现明显的凋亡条带。FAA 在给药预防组浓度 800 μg/mL 时，可提高细胞存活率 33.88%，预防组效果均优于修复组。通过 SOD 水平和 MDA 含量可协同反映出刺五加提取物含有有效的天然抗氧化成分，为开发天然抗氧化剂提供一定参考依据。

参考文献

- [1] Kato S, Matsui H, Saitoh Y, et al. Fish collagen-containing drink is subcutaneously absorbed and attenuates the UVA-induced tissue-integrity destruction and DNA damages in 3D-human skin tissue model [J]. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3(1): 50-55
- [2] Mukherjee P K, Maity N, Nema N K, et al. Bioactive compounds from natural resources against skin aging [J]. *Phytomedicine*, 2011, 19(1): 64-73
- [3] Iannacone M R, Wang W, Stockwell H G, et al. Patterns and timing of sunlight exposure and risk of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin—a case-control study [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 417
- [4] Pratheeshkumar P, Son Y O, Wang X, et al. Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF-κB signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 280(1): 127-137
- [5] Martinez R M, Pinho-Ribeiro F A, Steffen V S, et al. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation [J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2016, 15(4): 554-563
- [6] 路婷婷,陈亚泽,卢涛,等.紫外线的皮肤损伤机制及具有紫外线防护作用的天然产物的研究进展[J].*中国药理学通报*,2012,28(12):1655-1659
LU Ting-ting, CHEN Ya-ze, LU Tao, et al. Mechanism of UV damage and the protective effect of natural products against UV damage [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, 28(12): 1655-1659
- [7] 张琛,杨亚,加杨娥,等.枸杞多糖对UVB辐射后角质形成细胞炎症因子表达的影响[J].*中国医药导报*,2017, 14(19):20-23
ZHANG Chen, YANG Ya, JIA Yang-e, et al. Effect of Lyciumbarbarum polysaccharide on expression of inflammatory cytokines in keratinocytes after UVB irradiation [J]. *China Medical Herald*, 2017, 14(19): 20-23
- [8] 辛蕾,苏欣,李莎,等.羟基红花黄色素 A 对紫外线致人皮肤细胞系损伤的保护作用[J].*西北药学杂志*,2017,32(5): 636-639
XIN Lei, SU Xin, LI Sha, et al. Protection effect of hydroxysafflower yellow a against ultraviolet radiation injury on cultured human skin cell [J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2017, 14(19): 20-23
- [9] 郭砚,孙娟,王丽雯.藏雪莲多糖通过P38丝裂原激活蛋白激酶通路减轻中波紫外线辐射后皮肤角质形成细胞凋亡引起炎症损伤的研究[J].*中国全科医学*,2015, 18(27):3314-3319
GUO Yan, SUN Juan, WANG Li-wen. Alleviation of Inflammatory damage induced by the apoptosis of HaCaT Cells after ultraviolet B radiation by saussurea tridactyla Sch.-Bip. polysaccharides through P38MAPK passage [J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2015, 18(27): 3314-3319
- [10] 崔砾砾.苹果多酚对UVB诱导HepG₂细胞损伤的防护与修复研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2008
CUI Li-li. Research on the effects of protection and renovation of apple polyphenols on UVB-induced HepG₂ cell injury [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2008
- [11] 喻晶,刁波,张宜.紫外线照射对血管内皮细胞的损伤效应[J].*华南国防医学杂志*,2016,30(4):235-238
YU Jing, DIAO Bo, ZHANG Yi. UV irradiation mediated damage in HUVEC cells [J]. *Military Medical Journal of South China*, 2016, 30(4): 235-238
- [12] Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light

- induced alteration to the skin [J]. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomoue Czech Repub., 2006, 150(1): 25-38
- [13] 李强,靳书滨,余在霞,等.刺五加注射液预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响[J].中国细胞生物学学报,2016, 38(12):1505-1511
- LI Qiang, JIN Shu-bin, YU Zai-xia, et al. Effect of acanthopanax senticosus pretreatment on renal ischemia reperfusion injury in rats [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2016, 38(12): 1505-1511
- [14] Huang L Z, Zhao H F, Huang B K, et al. Acanthopanax senticosus: review of botany, chemistry and pharmacology [J]. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 66(2): 83-97
- [15] 莫琳芳,沈先荣,何颖,等.刺五加多糖对 ^{60}Co γ 射线辐照大鼠胃肠道及生殖系统的保护作用[J].中国辐射卫生,2012, 21(2):153-155
- MO Lin-fang, SHEN Xian-rong, HE Ying, et al. Protective effect of acanthopanax senticosus polysaccharides on gastrointestinal tract and reproductive system in ^{60}Co γ - ray irradiated rats [J]. Chinese Journal of Radiological Health, 2012, 21(2): 153-155
- [16] 陈月,王宝贵,张桂英,等.刺五加皂苷的抗辐射损伤作用[J].吉林大学学报:医学版,2005,31(3): 423-425
- CHEN Yue, WANG Bao-gui, ZHANG Gui-ying, et al. Protective effects of acanthopanax senticosus saponins on mice with irradiation damage induced by X-rays [J]. Journal of Jilin University: Medicine Edition, 2005, 31(3): 423- 425
- [17] 喻晶,张宜,刁波.中波紫外线辐照对人脐静脉血管内皮细胞 JAK-STAT 信号通路和 IL-6,IL-8 表达的影响[J].辐射研究与辐射工艺学报,2016,34(2):20204-020204
- YU Jing, ZHANG Yi, DIAO Bo. Effect of UVB irradiation on JAK-STAT pathway and IL-6,IL-8 in Human umbilical vein endothelial cells [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2016, 34(2): 20204-020204
- [18] 孙延芳,梁宗锁,刘文婷,等.刺五加皂苷抗乳腺癌细胞活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(4):926-927
- SUN Yan-fang, LIANG Zong-suo, LIU Wen-ting, et al. Anti-breast cancer cell activity of saponins in acanthopanax senticosus harms [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(4): 926-927
- [19] 廖明志.抗光敏剂对 中波紫外线所致 HaCaT 细胞增殖活性变化,细胞凋亡及周期的影响[D].北京:北京中医药大学,2014
- LIAO Ming-zhi. Effects of anti-light sensitive agent on proliferation activity, apoptosis and cycle of HaCaT cells induced by UVB [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014
- [20] 申玉莉,葛玲,张继青,等.染料木黄酮对 X 射线辐射所致 HUVEC 损伤的防护作用[J].广东药学院学报,2013, 29(1):55-59
- SHEN Yu-li, GE Ling, ZHANG Ji-qing, et al. Protective effect of genistein on HUVEC damage caused by X- ray radiation [J]. Editorial Board of Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2013, 29(1): 55-59
- [21] 许金龙,陈芳芳,庞佳楠,等.酪蛋白水解物类蛋白反应修饰产物对 H_2O_2 诱导的人脐静脉内皮细胞(HUPVC)氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2016,32(11):41-47
- XU Jin-long, CHEN Fang-fang, PANG Jia-nan, et al. Protective Effect of Plastein Reaction-modified Casein Hydrolysates on H_2O_2 induced Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(11): 41-47
- [22] 卢芳,刘树民.刺五加有效部位对 MPP^+ 损伤 PC12 细胞的保护作用[J].中华中医药学刊,2015,33(4):831-834
- LU Fang, LIU Shu-ming. The protective effect of effective part of acanthopanax senticosus harms on the damage of PC12 cells induced by MPP^+ [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2015, 33(4): 831-834
- [23] 杨澜,赵清,韩知峡,等.转染抗辐射菌 recO 基因对紫外线所致皮肤成纤维细胞氧化及炎症损伤的保护作用[J].癌变畸变 突变,2009,21(2):114-118
- YANG Lan, ZHAO Qing, HAN Zhi-xia, et al. Protective effect of transfection of reco gene from deinococcus radiodurans on oxidation and inflammatory injury of UVB-induced HSF in vitro [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2009, 21(2): 114-118
- [24] 封士成,崔凤梅,涂彧.硫酸镁对人脐静脉血管内皮细胞辐射防护的作用[J].辐射研究与辐射工艺学报,2014, 32(2): 20204-020204
- FENG Shi-cheng, CUI Feng-mei, TU Yu. Protective effects of MgSO_4 on the human umbilical vein endothelial cell injury induced by radiation [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2014, 32(2): 20204-020204
- [25] 杨丽娟,游育红,林志彬,等.灵芝多糖肽对人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2010, 26(5): 657-660
- YANG Li-juan, YOU Yu-hong, LIN Zhi-bin, et al. Protective effects of ganoderma lucidum polysaccharides peptide on human umbilical vein endothelial cells injury by reactive oxygen species [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010,

- 26(5): 657-660
- [26] 许晶兰,王孝铭,王东霞.复方丹参滴丸对过氧化氢损伤的人脐静脉血管内皮细胞的保护作用[J].中国病理生理杂志,2006,22(5):929-932
- XU Jing-lan, WANG Xiao-ming, WANG Dong-xia. The protection of composite salviae dropping pills against HUVECs injure in-duced by H₂O₂ [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2006, 22(5): 929-932
- [27] 顾晓苏,顾永健,姜正林.刺五加皂甙对自由基作用和无血清培养条件下两种神经元衰老模型细胞的保护作用[J].中国临床康复,2005,9(25):123-125
- GU Xiao-su, GU Yong-jian, JIANG Zheng-lin. Protective effects of acanthopanax senticosus saponins on two kinds of aged neuron models under free radicals function under the condition of serum free culture [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(25): 123-125
- [28] Farrukh M R, Nissar U A, Kaiser P J, et al. Glycyrrhizic acid (GA) inhibits reactive oxygen Species mediated photodamage by blocking ER stress and MAPK pathway in UV-B irradiated human skin fibroblasts [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2015, 148: 351-357
- [29] Jnawali H N, Lee E, Shin A, et al. Effect of quercetin in the UV-irradiated human keratinocyte HaCaT cells and a model of its binding to p38 MAPK [J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2014, 35(9): 2787-2790
- [30] 陈小娥,骆丹,徐晶,等.P38 丝裂原活化蛋白激酶在紫外线诱导角质形成细胞凋亡中的作用[J].中华微生物学和免疫学杂志,2008,28(1):65-68
- CHEN Xiao'e, LUO Dan, XU Jing, et al. Role of P38 mitogen-activated protein kinase in UV-induced keratinocyte apoptosis [J]. Journal of Microbiology and Immunology, 2008, 28(1): 65-68
- [31] Hermoni K L, Raz G. Tomato based supplement protects skin from UV damage and photo-aging processes [J]. The FASEB Journal, 2017, 31(1 Supplement): 635.4