

环糊精对紫外线损伤保护作用的实验研究

马淑梅¹ 刘晓冬¹ 龚平生² 牟颖² 阎岗林² 罗贵民²

¹ (吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

² (吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室 长春 130023)

摘要 探讨谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)模拟物-环糊精(2-Se-CD)对中波紫外线损伤的防护作用。以小鼠成纤维细胞(NIH3T3)制备紫外线损伤模型,采用荧光分光光度法测定DNA裂解率,改良硫代巴比妥酸荧光法测定细胞脂质过氧化作用,流式细胞术测定H₂O₂。1.5kJ m⁻²紫外线(UVB)照射后24h可引起NIH3T3细胞DNA裂解率、脂质过氧化、H₂O₂产生增高,2-Se-CD可使前述变化发生不同程度逆转,即与紫外线损伤模型组相比,DNA裂解率、脂质过氧化、H₂O₂产生降低($p < 0.05-0.01$)。结果提示,本实验室合成的GPX模拟物2-Se-CD具有防护紫外线损伤的作用。

关键词 2-Se-CD, UVB, 防护作用

中图分类号 R811.5

短期集中或长期间断紫外线(UVB)辐射可引起皮肤损伤,尤其是日光中的中波紫外线,与皮肤肿瘤发生具有一定的相关性,故对紫外线损伤防护作用的研究近年来倍受关注^[1]。许多研究结果证明,紫外照射引起皮肤损伤的发生与活性氧(ROS)造成的细胞损伤有关,因而设计合成具有清除ROS能力的抗氧化酶模拟物受到学术界的广泛关注。谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)是抗氧化酶系的重要成员之一,与其他抗氧化酶不同,它除了能清除ROS(H₂O₂、OH•)外,还能降解脂质过氧化物,防止细胞过氧化损伤。这种独特的细胞保护功能使它在抗氧化酶系中占有特别重要的位置,因而对GPX的模拟显得特别重要。目前,已有不少小分子有机硒化合物可以模拟GPX,其中最著名的是Ebselen(PZ51)。然而,它们显著的缺点是活力低,水溶性差,有的还有毒性。因此,当前急需开发高活力、溶解度好、无毒性的小分子GPX模拟物。本实验室研制的GPX模拟物-环糊精(2-Se-CD)克服了PZ51活力低、水溶性差的弱点,显示了很大的应用潜力。

本实验采用NIH3T3(小鼠成纤维细胞)制备紫外线辐射皮肤损伤模型,通过加入本实验室合成的GPX模拟物2-Se-CD,检测DNA裂解率、脂质过氧化及氧自由基等改变,以研究GPX模拟物2-Se-CD对紫外线损伤的防护作用,并将进一步探讨可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及药物

DMEM培养液(GIBCO),2,7-二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA Sigma),MTT(Sigma),4,6-二脒基二苯基吲哚(DAPI,华美公司),环糊精(2-Se-CD)由吉林大学酶工程实验室合成,酶活力是7.4U·μmol⁻¹。

1.2 细胞培养

小鼠成纤维细胞株NIH3T3(本室冻存),细胞复苏,加含有10%小牛血清的DMEM培养基常规培养。

1.3 照射条件

光源为UVB紫外灯管(上海金光灯具厂,6W),剂量率为6J m⁻² min⁻¹(由吉林大学公共卫生学院环境卫生教研室进行测量)。胰酶消化贴壁细胞,接种于24孔培养板中(5×10⁵细胞/孔),每孔加500μL DMEM培养液(含10%小牛血清),2-Se-CD终浓度分别为8、16、32、64μmol L⁻¹,1.5kJ m⁻² UVB照射后24h细胞为研究对象。

1.4 MDA

改良硫代巴比妥酸荧光法测定^[2]。

第一作者:马淑梅,女,1971年11月出生,2001年在吉林大学获博士学位,放射医学专业,讲师,现在吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室作博士后工作

收稿日期:初稿2003-01-05,修回2003-07-03

1.5 细胞内 H₂O₂ 检测

DCFH-DA 用无水乙醇溶解 (终浓度为 20 μmol L⁻¹), 收集细胞, 加 DCFH-DA 染料 37°C 复染 30 min, 0.01 mol L⁻¹ PBS 洗 2 次, 流式细胞仪收 1×10⁴ 细胞, Cellquest 软件分析结果。在细胞中, DCFH-DA 被 H₂O₂ 氧化成 2, 7-二氯荧光黄 (DCF), DCF 能产生绿荧光, 测定细胞内 DCF 的荧光强度, 即可相对定量细胞内 H₂O₂ 水平。

1.6 DNA 裂解率

1×10⁷ 细胞加入细胞裂解液 I (0.01 mol L⁻¹ Tris pH7.4, 0.001 mol L⁻¹ EDTA pH7.5, 0.5% Triton X-100) 100 μL 混匀, 4°C 放置 30 min, 14000 rpm 离心 20 min, 分离上清与沉淀, 沉淀中加入细胞裂解液 I 100 μL 混匀, 同前离心, 将上清合并得到片段化 DNA, 向沉淀中加入细胞裂解液 II (细胞裂解液 I 加入蛋白酶 K, 终浓度 0.1 g L⁻¹) 200 μL, 超声破碎得到完整 DNA。取 3 mL 荧光缓冲液 (0.01 mol L⁻¹ Tris pH7.4, 0.01 mol L⁻¹ EDTA pH7.5, 0.1 mol L⁻¹ NaCl), 加 DAPI (0.1 g L⁻¹) 60 μL, 加入 DNA 样品 10 μL, 用 PE LS50B 荧光分光光度计检测荧光强度。激发波长 355 nm, 发射波长 455 nm。DNA 裂解率 (%)

$$= \frac{\text{片段化 DNA (上清)}}{\text{片段化 DNA (上清)} + \text{完整 DNA (沉淀)}} \times 100\%$$

统计学处理采用 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 2-Se-CD 对紫外线所致 DNA 损伤的防护作用

采用 DAPI 荧光染色法测定 DNA 裂解率结果见表 1。1.5 kJ m⁻² UVB 照射后 24 h, DNA 裂解率明显增高, 2-Se-CD 终浓度分别为 8、16、32、64 μmol L⁻¹ 时, 均可降低由 UVB 所致增高的 DNA 裂解率, 以至于恢复到假照水平。

Table 1 Protective effects of 2-Se-CD on the UVB-induced increase of DNA lysis rate

Group	DNA lysis rate / %
Control	47.54±2.18 ⁽¹⁾
UVB alone	51.89±3.59 ⁽²⁾
UVB+8 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	46.39±3.13 ⁽¹⁾
UVB+16 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	47.15±2.05 ⁽¹⁾
UVB+32 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	46.86±3.12 ⁽¹⁾
UVB+64 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	46.51±4.56 ⁽¹⁾

n=6, ⁽¹⁾ vs, ⁽²⁾ *p*<0.05

2.2 2-Se-CD 对紫外线所致脂质过氧化反应及 H₂O₂ 分子产生的抑制作用

采用 MDA 法检测脂质过氧化反应, 流式细胞术检测 H₂O₂ 含量结果见表 2。1.5 kJ m⁻² UVB 照射后 24 h, 细胞脂质过氧化水平和 H₂O₂ 含量明显增高, 2-Se-CD 终浓度分别为 8、16、32、64 μmol L⁻¹ 时, 均可降低 UVB 所致的脂质过氧化水平增高, 32 和 64 μmol L⁻¹ 时可降低 UVB 所致 H₂O₂ 含量增高。

Table 2 Suppressive effects of 2-Se-CD on the lipid peroxidation and the production of H₂O₂ induced by UVB

Group	LPO(OD value)	H ₂ O ₂ / %
Control	0.524±0.017 ⁽³⁾	10.95±2.28 ⁽²⁾
UVB	0.693±0.041 ⁽¹⁾	17.01±5.01 ⁽¹⁾
UVB+8 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	0.638±0.050 ⁽²⁾	13.71±5.39
UVB+16 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	0.647±0.061 ⁽²⁾	14.39±7.90
UVB+32 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	0.563±0.010 ⁽²⁾	9.69±3.51 ⁽²⁾
UVB+64 μmol·L ⁻¹ 2-Se-CD	0.636±0.150 ⁽²⁾	10.02±4.94 ⁽²⁾

n=6, ⁽¹⁾ vs, ⁽²⁾ *p*<0.05, ⁽³⁾ *p*<0.01

3 讨论

早在 19 世纪后期人们就认识到紫外线 (UV) 对人皮肤产生的影响, 以后又发现了 UV 照射引起的晒伤和促进皮肤老化的作用。在 UV 的研究中发现其产生生物学效应的能力, 以短波紫外线 (UVC) 最强, 约是中波紫外线的 (UVB) 10 倍, 是长波紫外线 (UVA) 的 10 万倍。阳光中的 UVC 几乎全部被大气同温层所阻断, 大部分 UVB 亦被臭氧层过滤掉, 故仅有 UVA 和小部分 UVB 能到达地面, 而这部分 UVB 却是阳光引起人体生物学效应的主要光谱。

在 UV 光化学效应作用下, 皮肤组织内水分子、含半胱氨酸蛋白发生光分解以及 UV 光子诱导的酶-底物反应过程中均可产生自由基。当 UV 照射所促成的自由基生成量超过清除机制的清除极限时, 发生自由基的积累, 这些自由基主要为氧自由基 (ROS), 如 O₂[·], OH[·], H₂O₂ 分子等^[3]。

本实验采用小鼠成纤维细胞 NIH3T3 制备紫外线辐射皮肤损伤模型, 加入本实验室合成的 GPX 模拟物 2-Se-CD, 检测其辐射防护作用。环糊精 (2-Se-CD) 是谷胱甘肽过氧化物模拟酶, 具有 GPX 活性。本实验结果显示, 在应用 DAPI 法测定 DNA 裂解率实验中, 加入模拟物 2-Se-CD 后可抑制 UVB 所致的 DNA 裂解率增加, 使得重要的生物大分子

DNA 得到保护。Cejkova 等报道^[4], 由于 UVB 使抗氧化酶活性降低或丧失进而导致角膜细胞发生损伤。Masaki 等报道 UVB 使 H_2O_2 产生增多^[5], 最终导致细胞损伤。2-Se-CD 可能通过提高抗氧化酶活性及清除自由基两方面阻止细胞发生损伤。为了验证上述改变是否是由于模拟物通过清除自由基进而减少的 DNA 损伤, 我们进一步检测了 H_2O_2 的变化。在应用流式细胞术测定 ROS 实验中, 加入模拟物 2-Se-CD, 可抑制 UVB 所致活性氧自由基的产生。可见 GPX 模拟物 2-Se-CD 具有清除自由基的能力。Black 等报道, 紫外线可引起皮肤产生自由基, 导致脂质过氧化反应产物 MDA 含量升高^[6]。我们又应用 MDA 法检测了脂质过氧化作用, 加入 2-Se-CD 后可使 UVB 增加的 MDA 含量百分比降低。其机理可能为环糊精是 GPX 模拟酶, 具有 GPX 活性, 可使氧化型的谷胱甘肽还原成具有清除自由基能力的还原型谷胱甘肽, 最终使体内脂质过氧化反应水平下降, 从而导致 MDA 含量降低。

上述实验结果表明, 本实验室制备的 GPX 模拟物 2-Se-CD 具有抗紫外线损伤的作用。我们认为, GPX 模拟物 2-Se-CD 对紫外线损伤的防护功效, 主

要源于对自由基的清除, 而这种作用对过量紫外线照射所致疾病的防治具有重要价值。

参考文献

- 1 Naylor M F, Farmer K C. The case for sunscreen Arch Dermatol, 1997, **133**(9): 1146-1154
- 2 张秀明, 严丽娟, 柴建开. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23**(2): 175-178
ZHANG Xiuming, YAN Lijuan, CHAI Jiankai. 1996, **23**(2): 175-178
- 3 丁立新, 陈景藻. 中华物理医学杂志, 1998, **20**(1): 49-50
DING Lixin, CHEN Jingzao **20**(1): 49-50
- 4 Cejkova J, Stipek S, Crkovska J *et al.* Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the corneal epithelium after UVB rays. Histochemical and biochemical study. Histochem J, 2000, **15**(4): 1043-1050
- 5 Masaki H, Atsumi T, Sakurai H *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1995, **206**(2): 474-479
- 6 Black H S. Photochem Photobiol, 1987, **46**(2): 213-221

Experimental studies on the protective effect of 2-selenium bridged β -cyclodextrin on damage induced by moderate wave ultraviolet rays

MA Shumei¹ LIU Xiaodong¹ GONG Pingsheng² MU Ying² YAN Ganglin² LUO Guimin²

¹(MH Radiobiology Research Unit, Jilin University, Changchun 130021)

²(Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130023)

ABSTRACT The work was to study protective effect of 2-selenium Bridged β -cyclodextrin (2-Se-CD), a GPX mimic, on the damages induced by moderate-wave ultraviolet rays. UVB damage model was established with murine fibroblast, NIH3T3. DAPI and MDA were used to evaluate DNA lysis rate and lipid peroxidation level respectively, Flow cytometry was used to detect production of H_2O_2 . Significant increases were found in the DNA lysis rate, the lipid peroxidation level and the H_2O_2 production 24 h after the treatment of 1.5 kJ m^{-2} UVB. However, adding 2-Se-CD to the sample solutions could reduce all the changes to different extent. The DNA lysis rate, lipid peroxidation level and the H_2O_2 production decreased as compared with the damage model group ($p < 0.05 - 0.01$). The results suggested that 2-Se-CD might protect NIH3T3 from the damage induced by moderate-wave ultraviolet rays,

KEYWORDS 2-Se-CD, UVB, Protective effect

CLC R811.5