



探讨姜黄素和茶多酚对不同时间 UVB 致无毛鼠急性光损伤的防御作用

高爱莉¹, 江娜^{1,2}, 刘清^{1,2}, 张倩雯^{1,2}, 范君文³, 王鹏³, 邓蕙妍¹,
田歆¹, 梁碧华¹, 李润祥¹, 马少吟¹, 李振洁¹, 龚业青¹, 朱慧兰¹

(1. 广州市皮肤病防治所, 广州 510095; 2. 广州医科大学, 广州 510182; 3. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 探讨姜黄素和茶多酚对不同时间 UVB 致无毛鼠急性光损伤的防御作用。方法 取清洁级无毛鼠 36 只, 随机分为对照组及药物组(0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 240 s); 每组各 2 只。于照射前 30 min 在无毛鼠背部涂抹姜黄素或茶多酚, 照射距离为 15 cm, 采用 3 倍最小红斑量(MED)的 UVB 约 200 ~ 540 mJ/cm² 分别照射各组, 取皮肤组织, 制成石蜡切片, 光学显微镜观察。结果 对照组无毛鼠皮肤出现不同程度鳞屑, 胶原间可见散在淋巴细胞, 且 120 s 及 240 s 时出现胶原红染、排列紊乱、均质化等改变。药物组无毛鼠真皮中炎症细胞浸润减少, 胶原受损现象得到改善。结论 外用姜黄素和茶多酚可通过减轻炎症细胞浸润及减轻胶原受损程度而防御 UVB 致无毛鼠皮肤急性光损伤。

【关键词】 UVB; 无毛鼠; 模型; 动物; 光损伤

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0009-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.003

Protective effect of Curcumin and Tea Polyphenols against different time of UVB-induced acute photodamage in hairless mice skin

GAO Ai-li¹, JIANG Na^{1,2}, LIU Qing^{1,2}, ZHANG Qian-weng^{1,2}, FAN Jun-wen³, WANG Peng³,
DENG Hui-yan¹, LI Run-xiang¹, LIANG Bi-hua¹, LI Zhen-jie¹, GONG Ye-qing¹, ZHU Hui-lan¹

(1. Guangzhou Institute of Dermatology, Guangzhou 510095, China; 2. Guangzhou Medical University,

Guangzhou 510182, China;

3. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To assess the protective of Curcumin and Tea Polyphenols against different time of UVB-induced acute photo damage in hairless mice skin. **Methods** Thirty six BALB/C hairless mice were randomly divided into control groups and treatment groups (all of them were divided into 0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 240 s groups with two hairless mice). Curcumin and Tea Polyphenols were applied to the mice's skin before 30min irradiation. The irradiation distance was 15cm. The mice in each group were given three times of UVB MED about 200 ~ 540 mJ/cm² and the irradiation time were 30 s, 60 s, 120 s, 240 s. After irradiation, the skin on the back of the radiation center were taken into

【基金项目】 2013 年广州市医药卫生科技项目(20131A011131); 2013 年广东省科技计划项目(2013B021800044); 2014 年广东省医学科研基金(A2014592); “十二五”专项课题(2011ZXJ09201-031)。

【作者简介】 高爱莉, (1978 -), 女, 主治医师, 硕士, 光线性皮肤病与真菌性皮肤病, E-mail: alicegao197897@163.com; 江娜(1987 -), 女, 研究生, 光线性皮肤病。两者为共同第一作者。

【通讯作者】 朱慧兰, (1966 -), 女, 主任医师, 硕士生导师, 光线性皮肤病与变态反应性皮肤病, E-mail: zhlhulan@126.com。

paraffin section for light microscopy observation. **Results** Different amount of squamae appeared in the control group of hairless rat, and lymphocytes scattered in collagen tissues. In the 120 s and 240 s UVB irradiated group, the collagen was red stained, disorderly arranged, even homogenized. In the treatment group, inflammatory cell infiltration was lessened, and collagen damage weakened. **Conclusion** By weakening inflammatory cell infiltration and collagen damage, topical application of Curcumin and Tea Polyphenols can protect hairless mice from acute photodamage caused by UVB irradiation.

【Key words】 UVB; Hairless mice; Model, animal; Photo damage

过量紫外线 (ultraviolet, UV) 辐射可明显引起皮肤细胞活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 堆积, 损伤细胞内蛋白质、脂质、核酸的生理功能, 引起皮肤细胞氧化应激损伤或凋亡, 因此 UV 诱导皮肤产生 ROS 所致的氧化应激是光线性皮肤病的重要发病机制之一^[1-3]。而中波紫外线 (UVB) 照射与日晒伤、皮肤老化、皮肤癌发生的关系十分密切。核因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路是目前最重要的抗氧化应激通路, 当氧化应激发生时, Nrf2 激活剂可通过激活 Nrf2 信号通路对皮肤起到保护作用^[4-6]。目前用于研究皮肤光损伤的动物模型多种多样, 但大多都是用有毛小鼠, 无法排除因化学或物理剃毛产生的急性应激作用。

国内外不乏关于急性光损伤的动物模型, 根据相关文献及前期预实验结果^[7], 本实验采用无毛鼠构建 UVB 致皮肤急性光损伤的动物模型, 模拟 UVB 对人皮肤造成的急性光损伤, 探讨 Nrf2 激活剂姜黄素和茶多酚防御不同时间 UVB 致无毛鼠急性光损伤的作用, 通过光学显微镜观察使用 Nrf2 激活剂姜黄素和茶多酚前后无毛鼠皮肤急性光损伤的组织病理学特点, 为光损伤机制的研究奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组、试剂和仪器

清洁级 BALB/C 突变无毛鼠, 军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK (京) 2012 - 0004】, 实验在军事医学科学院实验动物中心进行【SYXK (京) 2012 - 0021】。姜黄素 (上海阿拉丁试剂有限公

司), 用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (上海阿拉丁试剂有限公司) 作为助溶剂; 茶多酚 (中国农业科学院杭州茶叶研究所), 用双蒸水溶解。UV 光疗仪 (上海 SIGMA 公司), UVB 灯管 (荷兰 PHILIPS 公司), 辐照强度值为 11.4 mW/cm², UVB 波长范围 290 ~ 320 nm, 峰值 297 nm。

姜黄素组分为对照组 (0 s、30 s、60 s、120 s、240 s)、姜黄素 + UVB 急性光损伤 (30 s、60 s、120 s、240 s) 组; 茶多酚组分为对照组 (0 s、30 s、60 s、120 s、240 s)、茶多酚 + UVB 急性光损伤 (30 s、60 s、120 s、240 s) 组, 各对照组分别加入 0.5% 羧甲基纤维素钠、双蒸水; 每组各 2 只。

1.2 预处理—UVB MED 的确定

将无毛鼠固定, 暴露背部皮肤, 置于 UVB 光源正下方 15 cm 处, 分别对无毛鼠背部皮肤照射 30、90、180、300、600 mJ/cm² 剂量的 UVB, 把照射后 24 h 无毛鼠背部皮肤出现肉眼可见红斑所测得的 UVB 剂量定为本次实验的 MED。

1.3 给药及 UVB 照射方法

照射前 30 min, 在各无毛鼠的背部标记面积范围, 将 0.5% 羧甲基纤维素钠、双蒸水、姜黄素和茶多酚分别涂于各实验组无毛鼠背部皮肤的标记范围内, 将各组无毛鼠置于 UVB 光疗仪下 15 cm, 用 3 倍 MED 约 200 ~ 540 mJ/cm², 各对照组无毛鼠分别照射 0 s、30 s、60 s、120 s、240 s, 各实验组无毛鼠亦分别照射 30 s、60 s、120 s、240 s, 每天一次, 连续 3 d。

1.4 大体观察无毛鼠皮肤外观状态变化

在实验过程中, 每天由专人记录无毛鼠照射部位皮肤的外观状态, 其评分标准见表 1。

表 1 皮肤外观状态评分标准
Tab. 1 The score standard of skin appearance

评分等级 Grade	皮肤状态 Skin condition
0	背部皮肤外观呈肉色 The back skin present flesh-color
0.5	背部皮肤呈现少量红斑 The back skin show a small amount of erythema
1.0	背部皮肤呈现部分红斑 The back skin present some of erythema
1.5	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皱纹 There were lots of erythema on the back region, and wrinkles
2.0	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皱纹, 部分脱屑 There were lots of erythema on the back region, with wrinkles and some scaling
2.5	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皱纹, 大量脱屑 There were lots of erythema on the back region, with wrinkles and a lot of scaling
3.0	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皮肤松懈、粗糙 There were lots of erythema on the back region, with sagging and rough

1.5 无毛鼠皮肤石蜡切片 HE 染色、光镜观察

末次 UVB 照射实验结束后,颈椎脱臼法将各组动物处死,在其背部照射区中心 $1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 的范围内,用锐利刀片取 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小的皮肤组织,经固定、洗涤、脱水、透明、透蜡、包埋,制成蜡块,HE 染色并观察记录。

2 结果

2.1 大体观察无毛鼠皮肤外观状态变化

用 30、90、180、300、600 mJ/cm^2 剂量的 UVB 照射无毛鼠背部皮肤后,无毛鼠皮肤从外观正常到出现不同程度脱屑的改变(彩插 3 图 1),把照射后 24 h 出现的肉眼可见红斑所测得的 UVB 剂量定为本次实验的 MED(彩插 3 图 1C),MED 约 $66 \sim 180\text{ mJ}/\text{cm}^2$ 。

2.2 光学显微镜下观察各组毛鼠皮肤组织结构的变化。

经 UVB 照射 30 s 后,可见角质层增厚,毛囊及皮脂腺较正常增多,胶原正常,皮下组织少量炎症细胞浸润。经茶多酚及姜黄素干预后,角质层增厚程度、毛囊及皮脂腺等仍较正常对照组增多,但较 UVB 照射组减轻,胶原正常(彩插 4 图 3);经 UVB 照射 60 s 后,可见胶原轻度红染,炎症细胞浸润程度较 UVB 照射 30 s 组增多。经茶多酚干预后,胶原基本正常,炎症细胞浸润程度较 UVB 照射 60 s 组减轻,但毛囊及皮脂腺等仍较多,经姜黄素干预后,其病理学改变基本同茶多酚干预组,但上皮层仍较多(彩插 4 图 4);经 UVB 照射 120 s 后,其角化程度进一步增加,胶原轻度红染,均质化,炎症细胞浸润减轻。经茶多酚干预后,胶原基本正常,排列规则,炎症细胞浸润减轻,毛囊增生明显,姜黄素干预组其组织病理改变基本同茶多酚干预组,但上皮层仍增厚(彩插 5 图 5)。经 UVB 照射 240 s 后,出现胶原增生,排列紊乱,经茶多酚干预后,胶原基本正常,炎症细胞浸润减轻,毛囊增生仍明显。经姜黄素干预后,其组织病理学改变基本同茶多酚干预组,但上皮层仍增厚(彩插 5 图 6)。

3 讨论

UV 辐射分为长波紫外线(UVA)、UVB 和短波紫外线(UVC),而 UVB 致皮肤红斑能力比 UVA 强 1000 倍,因此日光性红斑主要是由 UVB 所致。UVB 照射皮肤后,表皮细胞结构、功能改变,释放各

种如组胺、前列腺素、细胞因子等炎性介质,真皮血管扩张,血管通透性增加,出现红肿、水疱等症状,组织病理改变见表皮细胞水肿、核固缩,胶原卷曲、溶解,排列紊乱,真皮血管扩张、管周淋巴细胞浸润,附属器萎缩,皮下脂肪减少等^[8]。

近年来,天然抗氧化植物在光损伤防护及治疗方面受到广泛关注,茶多酚、姜黄素等 Nrf2 激活剂一直是国内外研究的热点^[9]。当氧化应激发生时,Nrf2 激活剂可通过激活 Nrf2 信号通路对皮肤起到保护作用。Nrf2 信号通路是迄今为止最为重要的抗氧化应激通路,在机体抵抗外界氧化应激的防御中具有重要作用。正常状况下,Nrf2 与胞浆蛋白 Kelch 样 ECH 联合蛋白 1(kelch like ECH-associated protein 1,Keap1)结合,处于相对抑制的状态并被锚定在胞浆中,氧化应激条件下,Nrf2 从 Keap1 上解离下来,进入胞核与 Maf 蛋白形成异二聚体,然后该异二聚体再与抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)结合,最终导致 II 相解毒酶基因的转录,对因 ROS 过量产生而导致的一系列疾病有积极的防御作用^[10-11]。姜黄素等 Nrf2 激活剂可激活 Nrf2 - Keap1 系统并能使谷胱甘肽等表达量增加^[4-6],且姜黄素可防御 UV 所致的光老化和光致癌,并且初步证实姜黄素的该功能与减弱 UV 诱导 ROS 的形成有关。我们前期研究发现不同波长的紫外线诱导损伤的 HaCaT 细胞,姜黄素均可降低急性光损伤引起 ROS 水平升幅,具有抗氧化保护作用,并且呈浓度依耐性^[12]。Elmets 等^[13]证实了绿茶提取物对红斑与晒斑细胞、朗格汉斯细胞分布以及 UV 介导的 DNA 损伤有影响。研究表明,使用 EGCG 预处理可抑制 UV 照射引起的炎症白细胞浸润,特别是表皮内被认为是 ROS 主要产物的 CD11b (+) 细胞^[14]。

无毛鼠(hairless mice)是军事医学科学院实验动物中心于 1990 年在 BALB/c 小鼠群中发现的一种被毛稀疏的突变鼠,并命名为 Uncovered,基因标记为 Unev。与裸鼠相比,无毛鼠的胸腺结果无异常,无免疫缺陷。无毛鼠皮肤的组织结构更接近于人的皮肤,且可避免由物理剃毛或化学除毛产生的应激损伤,是研究皮肤急性光损伤及筛选防晒药物的更为理想、更有价值的动物模型。

国内外虽不乏关于急性光损伤的损伤,但目前尚未形成统一的动物模型。既往研究表面,急性炎症反应是 UVB 引起的急性光损伤的主要表现之一。

UVB 照射后可诱导生成 ROS 作为第二信使,促进角质形成、细胞增殖及淋巴细胞、中性粒细胞等浸润,甚至促进血管形成。有文献显示中药抗光敏剂可明显减轻 UVB 辐射引起的炎症损伤以发挥其对光损伤的干预保护作用^[15]。另有研究发现日本刺参胶原蛋白多肽可通过有效改善胶原纤维的受损程度而对紫外线诱导的光老化模型小鼠皮肤的保护作用^[16]。本研究采用 3 倍 MED 约 200 ~ 540 mJ/cm² 剂量的 UVB 照射无毛鼠背部皮肤,经 30 s 及 60 s 后照射后,其外观基本正常,而 120 s 或 240 s,无毛鼠皮肤出现少量至大量鳞屑。其组织病理学改变显示,经 UVB 照射后,出现上皮层增厚,毛囊、皮脂腺增生,胶原轻度红染、排列紊乱,甚至均质化,胶原间可见散在较多的淋巴细胞,经茶多酚及姜黄素等药物干预后,在组织病理学上可逆转炎性细胞浸润、胶原增生、排列紊乱、均质化等现象,但对上皮层增厚及毛囊、皮脂腺增多等改变不理想。上述结果提示外用姜黄素或茶多酚可通过减轻炎症细胞浸润及逆转胶原破坏而对 UVB 所致无毛鼠皮肤急性光损伤可能有防御作用。

参考文献:

- [1] Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, *et al.* UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J Biol Chem*, 2003, 278(25):22432 - 22436.
- [2] Valencia A, Kochevar IE. Nox1 - based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(1):214 - 222.
- [3] Lovatt TJ, Lear JT, Bastrilles J, *et al.* Associations between ultraviolet radiation, basal cell carcinoma site and histology, host characteristics, and rate of development of further tumors. *J Am Acad Dermatol*, 2005, 52(3 Pt 1):468 - 473.
- [4] Jiang H, Tian X, Guo Y, *et al.* Activation of nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 cytoprotective signaling by curcumin protect primary spinal cord astrocytes against oxidative toxicity [J]. *Biol Pharm Bull*. 2011,34(8):1194 - 1197.
- [5] Kleszczyński K, Ernst IM, Wagner AE, *et al.* Sulforaphane and phenylethyl isothiocyanate protect human skin against UVR-induced oxidative stress and apoptosis: Role of Nrf2 - dependent gene expression and antioxidant enzymes. *Pharmacol Res*, 2013, 78:28 - 40.
- [6] Tufekci KU, Civi Bayin E, Genç S, *et al.* The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease [J]. *Parkinsons Dis*. 2011;314082.
- [7] Jin XJ, Kim EJ, Oh IK, *et al.* Prevention of UV-induced skin damages by 11,14,17 - eicosatrienoic acid in hairless mice in vivo. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(6):930 - 937.
- [8] 贾丽丽,李远宏,吴严,等.白藜芦醇对模拟日光照射所致皮肤急性光损伤的保护作用[J].*中国美容医学*,2010,19(9):1036 - 1038.
- [9] Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, *et al.* Cyclooxygenase - 2 generates anti-inflammatory mediators from omega - 3 fatty acids [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 433 - 441.
- [10] 高爱莉,朱慧兰. Nrf2 - Keap1 系统防御紫外线所致皮肤光损伤的研究进展[J].*国际皮肤性病杂志*,2011,37(5):61 - 63.
- [11] 江娜,朱慧兰. 核因子 E2 相关因子 2 信号通路及其在紫外线致皮肤蛋白氧化应激损伤中的作用[J].*国际皮肤性病杂志*,2015,41(1):54 - 57.
- [12] 邓惠妍,高爱莉,张倩雯,等. 姜黄素对紫外线诱导损伤的 HaCaT 细胞的保护作用[J].*中国中西医结合皮肤性病杂志*,2014,13(3):137 - 141.
- [13] Rivas M, Araya MC, Caba F, *et al.* Ultraviolet light exposure influences skin cancer in association with latitude [J]. *Oncol Rep*, 2011,25(4):1153 - 1159.
- [14] Tsai PY, Ka SM, Chang JM, *et al.* Epigallocatechin - 3 - gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing theNrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med*. 2011 Aug 1;51(3):744 - 754.
- [15] 孙丽蕴,张广中,李蜀平,等. 抗光敏剂对 BALB/C 小鼠急性光损伤所致表皮细胞炎症损伤干预作用的研究[J].*中国中医基础医学杂志*,2012,18(7):743 - 744.
- [16] 王奕,王静凤,高森,等. 日本刺参胶原蛋白多肽对紫外线诱导的光老化模型小鼠皮肤的保护作用[J].*中国医科大学学报*,2008,39(1):64 - 67.

[修回日期]2015 - 04 - 03