

芦荟凝胶对成纤维细胞紫外辐射损伤的保护作用*

袁慧杰¹, 廖紫琼², 欧阳道福³, 李晓敏³, 孙常磊³,
陈明毅², 谢智勇², 赖志辉^{1,4}

1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;
2. 中山大学药学院(深圳), 广东 深圳 518000;
3. 完美(中国)有限公司, 广东 中山 528400;
4. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275)

摘要: 为了探讨芦荟凝胶对紫外辐射所致皮肤成纤维细胞氧化损伤的保护作用和机制, 利用长波紫外线(UVA)辐射体外培养小鼠成纤维细胞株(NIH 3T3), 建立紫外线损伤成纤维细胞模型。UVA辐射NIH 3T3细胞后, 分别采用CCK-8法以及生化比色法检测不同质量浓度的芦荟凝胶对其增殖及抗氧化酶活性的影响。结果显示, UVA辐射对NIH 3T3细胞造成明显损伤, 100、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芦荟凝胶均可以提高受UVA辐射损伤的NIH 3T3细胞的增殖活性, 提高细胞中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量, 降低脂质过氧化物酶的活性, 且呈剂量依赖性。说明UVA对NIH 3T3细胞有损伤作用, 100~400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦荟凝胶可以拮抗UVA所致的NIH 3T3细胞损伤, 具有光保护作用。

关键词: 芦荟凝胶; 小鼠成纤维细胞(NIH 3T3); 长波紫外线(UVA)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2018)02-0155-05

Protective effect of *Aloe vera* gel against UV-induced damages of fibroblast

YUAN Huijie¹, LIAO Ziqiong², OUYANG Daofu³, LI Xiaomin³, SUN Changlei³,
CHEN Mingyi², XIE Zhiyong², LAI Zhihui^{1,4}

1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518000, China;
3. Perfect (China) Company Limited, Zhongshan 528400, China;
4. Instrumental Analysis & Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The long wave ultraviolet (UVA) was used to radiate mouse fibroblast cell line (NIH 3T3) and establish a model of cell injury in order to probe the protective function and mechanism of *Aloe vera* gel in cell oxidative damage. After UVA radiated NIH 3T3 cells, the effects of different concentrations of *Aloe vera* gel on the proliferation and antioxidant enzyme activities of NIH 3T3 cells were detected by CCK-8 and biochemical colorimetric assay respectively. The results show that UVA radiation caused a significant damage to the NIH 3T3 cell, but 100, 200, 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Aloe vera* gel can improve the proliferation activity of damaged cells, increase the content of superoxide dismutase (SOD) and glutathione per-

* 收稿日期: 2017-06-21

基金项目: 国家自然科学基金(81473540, 81473319); 广东省科技计划项目(2013B090800011, 2014A020221027, 2014A020209026, 2015A030401031, 2015B090903063); 中山市科技计划项目(2016C1015)

作者简介: 袁慧杰(1991年生), 女; 研究方向: 药物分析; E-mail: 1575195634@qq.com

通信作者: 赖志辉(1962年生), 男; 研究方向: 药物分析、仪器分析; E-mail: puslzh@163.com

oxidase (GSH-Px) in cells. It can simultaneously decrease the activity of lipid peroxidase. In conclusion, that UVA could damage NIH 3T3 cells, while 100 ~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Aloe vera* gel can antagonize the damage of NIH 3T3 cells induced by UVA and have the effect of light protection.

Key words: *Aloe vera* gel; NIH 3T3; UVA

紫外线辐射是导致人体皮肤晒伤、色素沉着、炎症和光老化等的主要因素^[1-2], 高紫外线暴露人群比低暴露人群皮肤老化风险高一倍, 老化发生提前 10 年, 其造成的氧化损伤被认为是光老化的重要原因^[3]。长波紫外线 (UVA, 波长 320 ~ 400 nm) 还会诱导细胞产生活性氧簇 (ROS), 间接破坏其他重要的细胞结构^[4-5], 成纤维细胞是其重要的辐射靶位之一。

目前, 从自然资源中寻找天然抗紫外药物, 防治紫外线对皮肤的损伤越来越受到人们的重视。芦荟 (*Aloe*) 作为一种多年生百合科 Liliaceae 草本植物^[6], 富含多种生物活性物质, 其中具有重要药用价值的有库拉索芦荟、好望角芦荟、木立芦荟和中华芦荟等^[7]。芦荟资源在我国分布广泛, 广东、广西、海南、云南等地均有种植。芦荟叶由两部分组成, 外层的绿色外皮和内部透明的叶肉 (芦荟凝胶), 芦荟凝胶中含有丰富的生物活性成分, 具有抗炎、抗氧化、清除自由基等多种功效^[8-10]。然而关于芦荟凝胶对紫外辐射保护作用的研究报道较少, 为充分利用芦荟资源, 本研究以芦荟凝胶冻干粉为研究对象, 对其抗紫外辐射损伤作用进行研究, 旨在为芦荟的进一步开发和综合利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 小鼠成纤维细胞株 (NIH 3T3)

细胞株由中山大学细胞房提供; 实验所用细胞传代数均控制在 50 代以内, 以保证细胞活力及实验数据的准确性。

1.2 主要试剂与仪器

芦荟凝胶冻干粉 (云南万绿生物股份有限公司, 批号: 20160704, w (多糖) = 64%); 胎牛血清 (四季青产品); 青链霉素混合液、 $w = 0.05\%$ 胰酶、低糖 DMEM 培养基 (GIBCO 公司); CCK-8 试剂 (同仁化学研究所); RIPA 裂解液 (碧云天生物技术有限公司); SOD、MDA、GSH-PX、BCA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

AB135-S 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司, 型号: GB/T 23111); UVA 灯管 (飞利浦公司, 型号: TL 8W); 超净工作台 (上海苏净, 型

号: SW-CJ-ID); 显微镜 (日本 OLYMPUS 公司, 型号: SZ51/SZ61); 二氧化碳培养箱 (日本三洋, 型号: MCO-15AC); 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司, 型号: iMark)。

1.3 小鼠成纤维细胞的培养

NIH 3T3 细胞以 DMEM 作为培养基 (内含 $w = 1\%$ 双抗, $w = 10\%$ 胎牛血清), 接种于含 4 mL 培养液的培养瓶中, 将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 饱和湿度的培养箱。2 d 后, 倒置显微镜下观察, 当细胞融合达 80% 以上, 弃去培养液, 用 0.05% 胰酶润洗培养瓶, 再加入 $w = 0.05\%$ 胰酶 1 mL, 置于培养箱中消化 30 s, 当细胞变圆、间隙变大时, 加入 DMEM 培养基终止消化。将细胞移至离心管, 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 DMEM 培养基 2 mL 吹打 40 次使成为细胞悬液, 按 1:3 比例传代, 获取足够的细胞用于后续实验。

1.4 UVA 最适剂量的选择

随机将细胞分为两组: 正常对照组和 UVA 损伤组。取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板, 接种细胞密度约为 10^5 mL^{-1} , 体积为 100 μL , 每组设 6 个复孔, 另设置 6 个调零孔 (内加 100 μL 培养基)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中培养 48 h 后, 损伤组用 8 W UVA 紫外线照射细胞, 细胞距离辐射光源 8 cm, 辐射时间分别为 20 min、30 min、1 h、2 h, 在显微镜下观察辐照后的细胞形态, 更换培养基, 然后继续培养 24 h, 从培养箱中取出, 各孔加入 CCK-8 试剂 10 μL , 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中孵育培养 4 h, 在波长 450 nm 处用酶标仪测定细胞液的 A 值。根据细胞生长状态、细胞液 A 值确定 UVA 辐射 NIH 3T3 细胞的半致死剂量 (LD_{50})。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖活力

实验分为 5 组: 正常对照组和 UVA 组 (模型组、芦荟凝胶 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组、芦荟凝胶 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组、芦荟凝胶 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组)。

细胞照射方法同 1.4, 辐射结束后弃上清, 样品干预组加入用培养基配制的芦荟凝胶溶液 100 μL , 模型组加入相同量的培养基。将细胞放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中继续孵育, 24 h 后从培养箱中取出, 各孔 (包括调零孔) 加 CCK-8

试剂 10 μL ，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ ， $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中孵育培养 4 h，在波长 450 nm 处用酶标仪测定细胞液的 A 值。

每孔实际 A 值 = 每孔实测 A 值 - 调零孔实测 A 均值

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{样品组实际 A 值}}{\text{正常对照组实际 A 值}} \times 100\%$$

1.6 抗氧化损伤指标的测定

实验分组同 1.5。取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板，每组 3 个复孔，接种细胞密度约为 10^5 mL^{-1} ，每孔接种细胞悬液 2 mL，于 37 $^{\circ}\text{C}$ ， $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中培养 48 h 后，紫外线辐照 UVA 组损伤细胞，照射方法同 1.4，弃上清，样品干预组加入用培养基配制的芦荟凝胶溶液 2 mL，模型组加入相同量的培养基。将细胞放入 37 $^{\circ}\text{C}$ ， $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中继续孵育，24 h 后取出，加入 RIPA 细胞裂解液 200 μL ，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触，5 s 后吸出裂解液，14 000 r/min 离心 5 min，取上清液，加入 500 μL RIPA 细胞裂解液稀释，稀释液严格参照试剂盒说明分别测细胞内的 SOD、GSH-Px 和 MDA 水平。

1.7 数据分析

数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。所有实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组数据之间比较，采用独立样本 t 检验 (Independent-Samples T Test)， $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 UVA 辐射损伤 NIH 3T3 细胞结果

显微镜下观察，UVA 辐射组与正常细胞对照组相比，NIH3T3 细胞均有不同程度的损伤，且呈现出剂量依赖性：辐射 20 min 时损伤程度最轻，只有约 10% 的细胞损伤；2 h 时损伤最重，已有超过 60% 的细胞死亡。综合分析实验结果，选择 1 h 的 UVA 辐射时间作为实验造模的理想剂量。结果见图 1。

2.2 芦荟凝胶对 UVA 辐射损伤 NIH 3T3 细胞修复作用的结果

在图 2 所示的质量浓度下，芦荟凝胶对 UVA 损伤的 NIH 3T3 细胞有显著的修复作用。经方差分析，不同组间的测量指标总的来讲差别有统计学意义，UVA 辐照组 A 值显著低于正常对照组 ($P < 0.01$)，细胞存活率仅为 73.14%；芦荟凝胶干预组 A 值虽仍低于正常对照组，但已明显高于 UVA 辐照组 ($P < 0.05$)，且芦荟凝胶的紫外修复作用

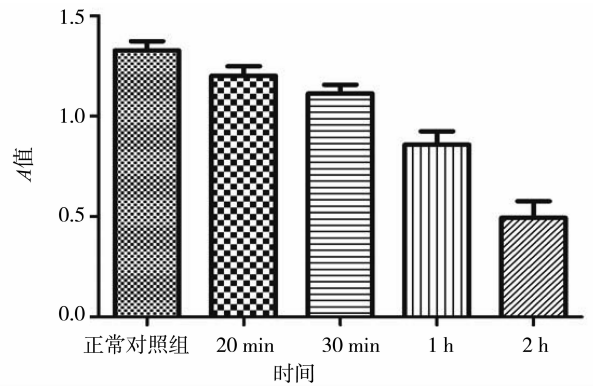


图 1 UVA 辐射损伤 NIH 3T3 细胞结果

Fig. 1 Damage results of NIH 3T3 cells irradiated by UVA

呈剂量依赖性。结果表明，UVA 辐射对 NIH 3T3 细胞造成明显损伤，而芦荟凝胶可以提高受 UVA 损伤 NIH 3T3 细胞的增殖活性。

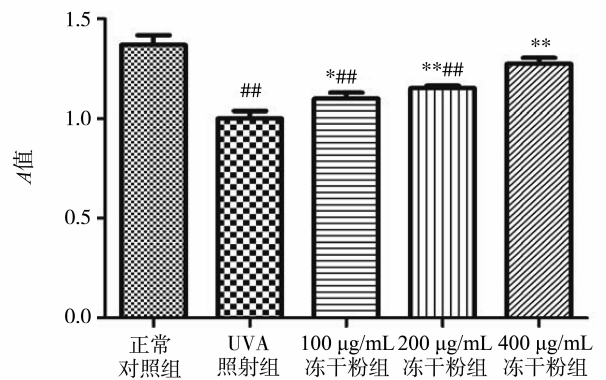


图 2 不同质量浓度芦荟凝胶对 UVA 辐射 NIH 3T3 细胞增殖活性的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of *Aloe vera* gel on the proliferation of NIH 3T3 cells irradiated by UVA

(与 UVA 照射组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 与正常对照组比较 ### $P < 0.01$)

2.3 芦荟凝胶抗氧化损伤检测结果

表 1 经方差分析，不同给药组的测量指标与模型组相比，总的来讲差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。UVA 照射组、芦荟凝胶处理组的 SOD、GSH-Px 值均较正常对照组低，但芦荟凝胶组的 SOD、GSH-Px 含量虽然低于正常对照组，却明显高于 UVA 照射组 ($P < 0.05$)，且呈剂量依赖性，提示了芦荟凝胶可以对抗 UVA 辐射所致的 SOD、GSH-Px 消耗；MDA 结果显示，UVA 辐射组显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)，芦荟凝胶高、中、低剂量组较 UVA 照射组 MDA 含量均有不同程度的下降，说明 UVA 照射引起了脂质过氧化产物 MDA 含

量的显著升高, UVA 产生的氧自由基大量攻击细胞生物膜, 引发脂质过氧化反应, 而芦荟凝胶可以减少 MDA 的生成, 阻止大量氧自由基对生物膜的攻击。

UVA 照射使 NIH 3T3 细胞受损, 生长受到抑制, 加入一定量的芦荟凝胶可以减轻 NIH 3T3 细胞的损伤, 说明了芦荟凝胶对细胞受到的光损伤有保护作用。

表 1 不同质量浓度芦荟凝胶对 UVA 辐射 NIH 3T3 细胞内的 SOD、MDA 及 GSH-Px 含量的影响¹⁾ ($n=6$)

Table 1 Effects of different concentrations of *Aloe vera* gel on the contents of SOD, MDA and GSH-Px in NIH 3T3 cells irradiated by UVA ($n=6$)

组别	SOD 含量	MDA 含量	GSH-PX 含量
	U	nmol	U
正常对照组	431.01 ± 14.02	0.728 ± 0.158	462.98 ± 17.01
UVA 照射组	313.54 ± 25.36 ^{##}	3.930 ± 0.473 ^{##}	228.20 ± 23.58 ^{##}
100 μg · mL ⁻¹ 芦荟凝胶组	350.39 ± 36.09 [#]	2.534 ± 0.398 ^{**##}	293.57 ± 31.13 ^{**##}
200 μg · mL ⁻¹ 芦荟凝胶组	380.40 ± 10.12 ^{**##}	2.357 ± 0.274 ^{**##}	368.35 ± 9.88 ^{**##}
400 μg · mL ⁻¹ 芦荟凝胶组	392.38 ± 21.93 ^{**##}	2.177 ± 0.409 ^{**##}	422.90 ± 32.38 ^{**}

1) 表中 SOD、MDA 和 GSH-Px 的含量均以每 mg 蛋白计; 与 UVA 照射组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

3 讨论和结论

皮肤是最早反映机体衰老的组织, 而紫外辐射是诱发皮肤老化重要的, 也是最常见的环境因素之一。成纤维细胞是真皮层的结构基础, 是主要的功能细胞, 同时也是紫外线辐射的重要靶位之一。UVA 辐射是一种重要的氧化应激因素^[11], UVA 照射皮肤能够增加细胞中活性氧簇 (ROS) 的产生, 生物膜是 ROS 的主要攻击目标, ROS 攻击生物膜上磷脂中的多不饱和脂肪酸, 引发膜脂质过氧化链式反应^[12-13]。

芦荟多糖是芦荟凝胶中的主要成分^[14], 研究表明, 中药多糖具有广泛的抗氧化活性, 可以通过提高皮肤组织或细胞中的抗氧化酶活性、增强其清除自由基的能力、降低脂质过氧化物水平, 从而改善紫外线辐射引起的细胞损伤^[15]。本研究中, 经 UVA 照射后, 模型组细胞增殖受到了显著抑制; 芦荟凝胶不同剂量组给药后均有一定的促进细胞增殖作用, 说明芦荟凝胶在体外研究中能够促进成纤维增殖, 延缓皮肤光老化。

正常皮肤细胞中有比较完善的氧化与抗氧化系统, 如: 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、抗坏血酸、维生素 E 等, 它们可以快速清除细胞内的 ROS, 保持细胞与组织的稳定与平衡^[16]。SOD 是机体抗自由基损伤的重要物质基础, 其活力的提高, 有利于机体抗氧化, 能保护细胞免受损伤; MDA 的量常用来反映机体脂质过氧化的程度, 间接反映细胞受自由基攻击的严

重程度; GSH-Px 是广泛存在于机体中的一种催化过氧化氢分解的酶, 起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。本实验结果表明, 紫外线可以通过抑制细胞内 SOD、GSH-Px 的酶活性, 降低其清除 ROS 的能力, 使机体中脂质过氧化物含量增多, 造成细胞及组织损伤; 而加入芦荟凝胶后, 药物干预组细胞内 SOD、GSH-Px 含量均较模型组显著提升, MDA 含量下降, 提示一定量的芦荟凝胶可以对抗 UVA 引起的成纤维细胞氧化损伤, 为开发天然防晒剂提供科学的理论依据。

参考文献:

- [1] 骆丹, 林向飞, 徐晶, 等. 3 种中药对中波紫外线辐射 HaCaT 细胞的干预及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(6):750-755.
LUO D, LIN X F, XU J, et al. Effect and regulatory mechanisms of three traditional Chinese medicines on HaCaT cells irradiated by UVB [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(6):750-755.
- [2] 刘昕, 骆丹, 沈春花, 等. 黄芩苷和川芎对 UVB 辐射皮肤成纤维细胞的影响 [J]. 中国美容医学杂志, 2007, 16(7):977-980.
LIU X, LUO D, SHEN C H, et al. Effects of Baicalin and Szechwan Lovge Rhizome on fibroblasts damaged by UVB irradiation [J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2007, 16(7):977-980.
- [3] 唐桦, 孙磊, 谢红付, 等. 白藜芦醇对中波紫外线照射后人角质形成细胞的保护作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3):197-200.
TANG Y, SUN L, XIE H F, et al. Protective effect of

- Resveratrol on human keratinocytes after UVB irradiation [J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2007, 18(3):197-200.
- [4] TEWARI A, SARKANY R P, YOUNG A R. UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin in vivo [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132(2):394-400.
- [5] 张永祥, 国石磊, 彭利沙, 等. 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[J]. *天然产物研究与开发*, 2016(7):1088-1092.
ZHANG Y X, GUO S L, PENG L S, et al. Protective effect of *Aronia melanocarpa* anthocyanins against UV-Induced damages of human skin fibroblast [J]. *Natural Product Research and Development*, 2016(7):1088-1092.
- [6] 何玲, 甄汉深, 潘翠柳. 芦荟的研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2016, 25(6):47-48.
HE L, ZHEN H S, PAN C L. Research progress of *Aloes* [J]. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacology*, 2016, 25(6):47-48.
- [7] 任奕. 芦荟多糖的提取工艺研究进展[J]. *农业科技与装备*, 2016, 9:47-48.
REN Y. Research progress on extraction technology of *Aloe* polysaccharide [J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2016, 9:47-48.
- [8] 吴广枫, 汤坚. 芦荟多糖的纯化与体外抗氧化活性的研究[J]. *郑州工程学院学报*, 2002, 23(2):75-78.
WU G F, TANG J. Study on the purification of *Aloe* polysaccharide and its antioxidation in vitro [J]. *Journal of Zhengzhou Grain College*, 2002, 23(2):75-78.
- [9] 李建华. 芦荟的药理作用[J]. *中国实用医药*, 2012, 15:245-247.
LI J H. Pharmacological action of *Aloe* [J]. *China Practical Medicine*, 2012, 15:245-247.
- [10] CHITHRA P, SAJITHLAL G B, CHANDRAKASAN G. Influence of *aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rat [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 59(3):195-201.
- [11] PODHAISKY H P, RIEMSCHEIDER S, WOHLRAB W. UV light and oxidative damage of the skin [J]. *Die Pharmazie*, 2002, 57(1):30-33.
- [12] 程若城, 李澄, 王清, 等. 雌二醇拮抗紫外线所致大鼠表皮角质形成细胞损伤作用的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009(14):1773-1775.
CHENG R C, LI C, WANG Q, et al. Study on the effect of estradiol on the damage of rat epidermal keratinocytes induced by UV irradiation [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2009(14):1773-1775.
- [13] DISSEMOND J, SCHNEIDER L A, BRENNEISEN P, et al. Protective and determining factors for the overall lipid peroxidation in ultraviolet A1-irradiated fibroblasts: *in vitro* and *in vivo* investigations [J]. *British Journal of Dermatology*, 2003, 149(2):341-349.
- [14] 王世静. 芦荟中有效成分的分离、提取、提纯[J]. *中国医药指南*, 2013(5):66-68.
WANG S J. Isolation, extraction and purification of effective components in *Aloe* [J]. *Guide of China Medicine*, 2013(5):66-68.
- [15] 陈静, 陈燕, 吴丹丹, 等. 枸杞多糖对紫外照射成纤维细胞活力及 MMP-1、MMP-3、MMP-9 表达的影响[J]. *成都中医药大学学报*, 2017, 40(1):9-12.
CHEN J, CHEN Y, WU D, et al. Influence of MMP-1, MMP-3, MMP-9 protein expression in fibroblasts cells acted by *Lycium Barbarum* Polysaccharides after UVA irradiation [J]. *Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 40(1):9-12.
- [16] SVOBODOVA A R, GALANDAKOVA A, SIANSKA J, et al. Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 34(4):471-479.