

## 预防性葛根素抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡

黄绵庆 杨照新 姚茂忠 田树红 谢学立 符健

**摘要:** **目的** 探讨预防性葛根素对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的影响。 **方法** HaCaT 细胞与 0.49、1.0mg·mL<sup>-1</sup> 葛根素孵育 1h 后,以 30mJ·cm<sup>-2</sup>UVB 直接照射细胞,24h 后收集细胞测定细胞凋亡率和 p53 蛋白。 **结果** 葛根素预处理 HaCaT 细胞的凋亡率下降,同时细胞表达的 p53 蛋白减少。 **结论** 预防性葛根素抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡,可能与下调 p53 蛋白有关。

**关键词:** 葛根素 细胞凋亡 角质形成细胞 p53 蛋白

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2011)11-1379-02

**Prophylactic Puerarin Inhibits HaCaT Cells Apoptosis Induced by UVB.** HUANG Mian-qing, YANG Zhao-xin, YAO Mao-zhong et al.(Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan P. R. China)

**Abstract Objective** To investigate the effect of prophylactic puerarin on HaCaT cells apoptosis induced by UVB. **Methods** HaCaT cells were irradiated by UVB at 30mJ·cm<sup>-2</sup> an hour after incubated with puerarin at 0.49 and 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>. The cells were collected 24 hours later and the apoptotic rates and p53 protein were determined. **Results** The apoptotic rate of HaCaT cells pretreated by puerarin was decreased and their p53 protein expression was reduced at the same time. **Conclusion** Prophylactic puerarin can inhibit the apoptosis of HaCaT cells induced by UVB, which is probably associated with p53 protein down-regulation.

**Key words:** Puerarin Cellular apoptosis Keratinocytes p53 protein

葛根素是从豆科植物野葛(Pueraria lobata)的干燥根中提取的主要有效成分,其化学名称为 8-β-D-葡萄糖吡喃糖-4',7-二羟基异黄酮,临床上主要用于冠心病、各型心绞痛、心肌梗塞、视网膜动脉、静脉阻塞、突发性耳聋的治疗<sup>[1]</sup>。近年来的研究显示,葛根素能保护不同应激引起的心肌细胞、胰腺细胞、肝细胞和神经细胞损伤,减少细胞凋亡<sup>[2-5]</sup>。众所周知,阳光紫外线可以引起皮肤晒伤,造成皮肤角质形成细胞凋亡。为探究葛根素对紫外线照射的人角质形成细胞的影响,我们在 HaCaT 人角质形成细胞上建立 UVB 损伤模型,研究预防性葛根素对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞的抗凋亡作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 HaCaT 细胞株 购自中科院昆明细胞库。

1.1.2 仪器和试剂 MCO-15AC 二氧化碳培养箱(日本三洋); MK3 型酶标仪(上海赛默飞世尔仪器有限公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickison 公司);紫外线测量仪(台湾先驰光电股份有限公司);葛根素(华北制药集团制剂有限公司);MTT(美国 Sigma 公司);人 P53 蛋白 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

#### 1.2 方法

1.2.1 HaCaT 细胞培养 HaCaT 细胞以 DMEM 培养,置于 37℃ 和 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱环境生长。细胞融合至 80%以上,倾去瓶中培养液,以 0.05%胰酶和 0.02%EDTA 消化液消化,1 000rpm 离心 5min 后去上清,加入培养液调整细胞浓度为 5×10<sup>4</sup>·mL<sup>-1</sup>,将 HaCaT 细胞接种到培养板生长,取指数生长期细胞

进行试验。

1.2.2 葛根素细胞毒性试验 HaCaT 细胞在 96 孔培养板上生长到细胞融合至 80%时,从细胞培养箱取出,加入葛根素溶液,设置 7 个葛根素浓度(0、0.34、0.49、0.70、1.0、1.4、2.0mg·mL<sup>-1</sup>),每浓度 12 孔,加药后置于二氧化碳培养箱孵育 1h,每孔再加 0.5%MTT20μL 孵育 4h,弃上清,最后每孔加二甲亚砜 100μL,15min 后在酶标仪上以 492 nm 波长检测各孔上清液 OD 值。

1.2.3 HaCaT 细胞处理 细胞种植在 6 孔板上,细胞融合至 80%时加葛根素溶液处理,葛根素终浓度为 0.49 和 1.0mg·mL<sup>-1</sup>(MTT 试验提示无细胞毒性)。加药孵育 1h 后弃上清,以 30 mJ·cm<sup>-2</sup>UVB 直接照射细胞,再加培养液培养 24h。试验设阴性对照和 UVB 模型细胞,阴性对照细胞不接收药物和 UVB 处理,UVB 模型细胞只接受 UVB 照射。

1.2.4 流式细胞分析 细胞以 30mJ·cm<sup>-2</sup>UVB 照射 24h 后消化和离心,以 4℃PBS 洗涤 2 次,调节细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>,加入浓度 50μg·mL<sup>-1</sup> 碘化丙啶染液,染色后细胞以流式细胞仪检测和分析。

1.2.5 ELISA 法检测 p53 蛋白 细胞在 UVB 照射后 24h 消化洗涤,调节细胞浓度为 1×10<sup>7</sup>·mL<sup>-1</sup>,在 0℃以细胞裂解液孵育 15min,离心后将细胞上清液转移至干净试管,按照人 P53 蛋白 Elisa 试剂盒说明书操作,在波长 450nm 检测 OD 值。

1.3 统计学分析 实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,在 SPSS15.0 软件中进行统计学处理。多组间比较采用单因素方差分析。

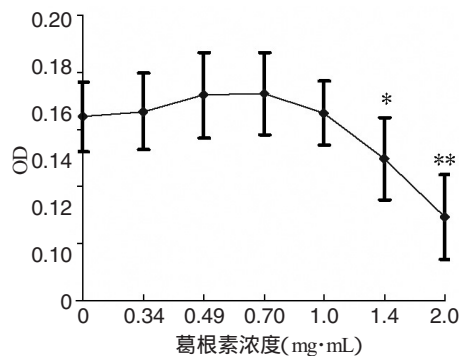
基金项目 海南省自然科学基金项目(No.309031)

作者单位 海南医学院,海南 海口 571101

作者简介 黄绵庆(1974~),男,硕士,助理研究员,主要从事药理毒理学研究。

## 2 结果

2.1 不同浓度葛根素对 HaCaT 细胞活性的影响 与正常生长 HaCaT 细胞比较,  $0.34 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  浓度葛根素不影响细胞活性。从  $1.4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  浓度开始, HaCaT 细胞活性下降 ( $P < 0.05$ ) 提示葛根素在  $1.4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  及以上浓度具有细胞毒性 (见图 1)。因此, 以  $0.49$  和  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  浓度进行后面试验。



注: 与不给药细胞比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 1 葛根素对 HaCaT 细胞活性的影响

2.2 葛根素对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的影响 流式细胞术试验结果显示 (见图 2), 与正常 HaCaT 细胞 (图 A) 相比, 照射 UVB 的细胞的凋亡率 (图 B) 显著增加, 达 25.8%。与模型组相比,  $0.49$  和  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  葛根素预处理细胞的凋亡率均降低, 分别为 18.9% (图 C) 和 14.9% (图 D), 表明预防性葛根素可减少 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡。

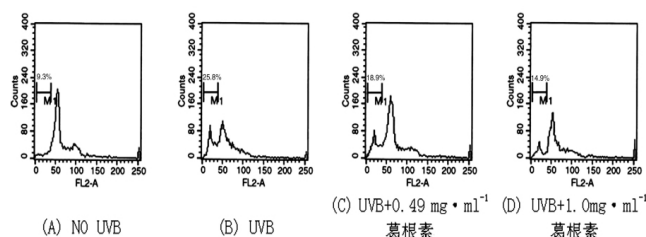
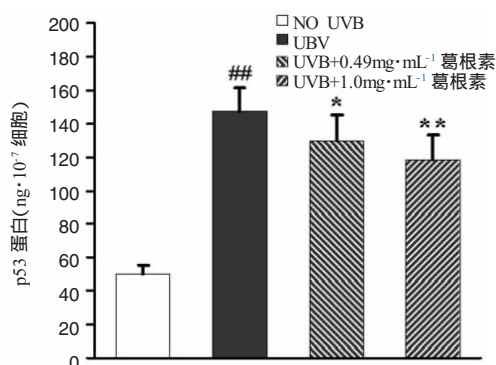


图 2 葛根素对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的影响

2.3 葛根素对 HaCaT 细胞 P53 蛋白的影响 与正常 HaCaT 细胞相比, UVB 照射的细胞表达的 p53 蛋白显著增加 ( $P < 0.01$ )。  $0.49$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  葛根素预处理细胞接受  $30 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$  UVB 照射后, 细胞内 p53 蛋白与 UVB 模型细胞相比均减少, 提示预防性葛根素可抑制 UVB 诱导的 P53 蛋白表达。结果见图 3。



注: 与不给药细胞比较 ## $P < 0.01$ ; 与模型细胞比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 3 葛根素对 HaCaT 细胞 P53 蛋白的影响

## 3 讨论

葛根素目前批准上市的剂型只有注射剂和滴眼液, 主要作为心血管和眼科用药, 尚未有在皮肤上使用的报道。笔者以 UVB 照射人角质形成细胞, 试验了预防性葛根素的抗细胞凋亡作用。选择 UVB 是因为阳光对皮肤的损害主要由其中的 UVB 引起<sup>[6]</sup>。因此本研究为葛根素的皮肤防晒研究提供了理论基础。HaCaT 人角质形成细胞是一种可以无限传代的非肿瘤细胞株, 其 p53 等位基因在密码子 179 和密码子 281/282 发生突变<sup>[7]</sup>, UVB 照射能激活 p53 在 Ser15 和 Ser20 的转录后修饰<sup>[8]</sup>, 形成稳定的 p53 蛋白并使其在细胞核聚集, 接着激活下游靶基因 p21Waf1/Cip1 和 Bax, 从而启动细胞凋亡程序<sup>[9]</sup>。在本研究中, 葛根素抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的同时, 下调了 p53 蛋白。不少学者的研究结果与我们一致。潘登等人研究葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用, 结果提示海马细胞凋亡减少与葛根素下调 p53 蛋白有关<sup>[10]</sup>。程丽彩等发现葛根素对力竭性游泳训练引起的大鼠海马细胞凋亡有保护作用, 其机制可能与葛根素下调 P53 蛋白有关<sup>[11]</sup>。综合国内外有关葛根素和 HaCaT 细胞的研究, 本文结果表明预防性葛根素抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡可能与下调 p53 蛋白有关。

## 参考文献:

- [1] 孙泽铃, 李以菊, 闫玉芹. 葛根素的临床应用[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(16): 2830-2832.
- [2] 常志文, 刘琦. 缺血再灌注心肌细胞凋亡及药物干预[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(1): 28-30.
- [3] 曹莉, 茅彩萍, 顾振纶. 葛根素对胰岛素抵抗大鼠糖耐量及胰腺组织形态学的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2008, 18(1): 47-48.
- [4] 赵敏, 杜艳秋, 李长喻. 葛根素对急性酒精中毒大鼠保护作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(17): 2610-2603.
- [5] 张海英, 胡海涛, 刘亦恒, 等. 葛根素对 Aβ25-35 诱导 PC12 细胞凋亡的影响[J]. 中药材, 2008, 31(4): 543-546.
- [6] Brozyna Anna, Zbytek Blazej, Granese Jacqueline, et al. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma [J]. Expert Rev Dermatol. 2007, 2(4): 451-469.
- [7] Lehman TA, Modali R, Boukamp P, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines [J]. Carcinogenesis. 1993, 14(5): 833-839.
- [8] El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression[J]. Cell. 1993, 75(4): 817-825.
- [9] Abd Elmageed ZY, Gaur RL, Williams M, et al. Characterization of coordinated immediate responses by p16INK4A and p53 pathways in UVB-irradiated human skin cells [J]. J Invest Dermatol. 2009, 129(1): 175-183.
- [10] 潘登, 谭军, 赵秀娟, 等. 葛根素对脑缺血-再灌注损伤细胞凋亡和 p53 表达的影响[J]. 中国热带医学, 2007, 7(7): 1100-1101.
- [11] 程丽彩, 何玉秀. 补充葛根素对力竭游泳训练大鼠海马细胞凋亡及 Bcl-2、P53 蛋白表达的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2010, 29(3): 332-334.

收稿日期: 2011-07-14 编辑: 符式刚