

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2021. 01. 009

# 复方黄柏液涂剂对中波紫外线致 HaCaT 细胞急性光损伤的修复作用\*

黄艳丽, 钱丽洁, 陈凤娟, 王 雄<sup>△</sup>

上海交通大学附属上海市第六人民医院东院皮肤科, 上海 201306

**摘要:**目的 探讨复方黄柏液涂剂对中波紫外线(UVB)致人表皮角质形成细胞(HaCaT 细胞)急性光损伤的修复作用。方法 用 CCK8 法确定复方黄柏液最佳处理浓度。体外培养 HaCaT 细胞, 设对照组、模型组和实验组。其中实验组加入复方黄柏液后, 模型组和实验组分别予 10、20、30 mJ/cm<sup>2</sup> 的 UVB 照射, 24 h 后比较各组 HaCaT 细胞增殖率, 以及培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(CAT)、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)表达水平。结果 分别予 10、20、30 mJ/cm<sup>2</sup> 的 UVB 照射后, 发现在同等 UVB 剂量下, 实验组 HaCaT 细胞增殖率、SOD 水平及 CAT 水平显著高于模型组, LDH 及 MMP-1 表达低于模型组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 复方黄柏液涂剂对 UVB 致 HaCaT 细胞急性光损伤具有防护作用。

**关键词:** 复方黄柏液涂剂; 人表皮角质形成细胞; 急性光损伤

中图法分类号: R758.14

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)01-0034-04

## Repair effects of Compound Cortex Phellodendri Solution Pigment on HaCaT cells acute photodamage caused by ultraviolet B\*

HUANG Yanli, QIAN Lijie, CHEN Fengjuan, WANG Xiong<sup>△</sup>

Department of Dermatology, East Branch Hospital, Affiliated Shanghai Municipal Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201306, China

**Abstract: Objective** To explore the repair effect of Compound Cortex Phellodendri Solution Pigment on acute light damage of human skin keratinocytes cells (HaCaT cells) caused by ultraviolet B (UVB). **Methods**

The CCK8 method was used to determine the optimal treatment concentration of Compound Cortex Phellodendri Solution. The HaCaT cells were cultured in vitro, the control group, model group and experimental group were set, in which after adding Compound Cortex Phellodendri Solution in the experimental group, the model group and experimental groups were respectively given 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 20 mJ/cm<sup>2</sup> and 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB exposure. Then the HaCaT cell proliferation rate and expression levels of lactatic dehydrogenase(LDH), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) and matrix metalloproteinase-1(MMP-1) in culture solution after 24 h were compared among the various groups. **Results** After the respective exposure of 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 20 mJ/cm<sup>2</sup> and 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB, it was found that the same dose of UVB, the HaCaT cell proliferation rate, SOD and CAT activity in the experimental group were significantly higher than those in the model group, while the LDH and MMP-1 expression levels were lower than those in the model group, and the differences were statistically significant( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Compound Cortex Phellodendri Solution has the protective effect on HaCaT cells acute photodamage caused by UVB.

**Key words:** Compound Cortex Phellodendri Solution; HaCaT cells; acute photodamage

到达地球表面的紫外线包括 UVA(320~400 nm)和 UVB(290~320 nm)。虽然 UVB 只占 0.5%, 但在同等剂量下对皮肤的损伤量是 UVA 的 1 万倍。紫外线辐射后急性皮肤光损伤包括日晒红斑和黝黑反应, 可有红斑、水疱等表现。目前 UVB 所致急性皮肤光损伤具体机制不明确, 研究认为氧化损伤起重要

作用。防晒剂和抗氧化剂的协同使用是机体光防护的主要方法, 天然抗氧化剂是近些年研究的热点<sup>[1]</sup>。中药提取物是天然抗氧化剂的重要来源, 目前已有研究证实五味子、肉豆蔻、黄柏、黄芪、麦冬、金银花、红景天等具有抗皮肤光老化作用。复方黄柏液涂剂主要组分为黄柏、连翘、金银花等中药, 有清热燥湿、泻

\* 基金项目: 上海交通大学附属第六人民医院东院区院级课题(20180002)。

作者简介: 黄艳丽, 女, 主治医师, 主要从事光老化皮肤病的保护方面的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 578780158@qq.com。

本文引用格式: 黄艳丽, 钱丽洁, 陈凤娟, 等. 复方黄柏液涂剂对中波紫外线致 HaCaT 细胞急性光损伤的修复作用[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 34-37.

火祛腐功用,临床上适用于疮溃疡后、伤口感染等症<sup>[2]</sup>。李慎新等<sup>[3]</sup>比较了几种中草药的抗氧化活性,发现黄柏和连翘抗氧化活性优于其他几种中草药。本研究旨在通过 UVB 照射建立永生化人表皮角质形成细胞(HaCaT 细胞)急性光损伤模型,初步探讨复方黄柏液涂剂是否有光防护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

复方黄柏液涂剂(山东汉方制药有限公司,国药批号 Z10950097); HaCaT 细胞(武汉大学中国典型培养物保藏中心); CCK8(日本同仁公司);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、过氧化物酶(CAT)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒及基质金属蛋白酶-1(MMP-1)试剂盒均购自碧云天生物科技; UVB 光疗仪(Sigma 公司);酶标仪(Bio-Rad 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HaCaT 细胞培养

将含 10% FBS 的 DMEM 培养液加入 HaCaT 细胞培养瓶,在 100% 湿度、5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养。取 3~8 代对数生长期的 HaCaT 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化后传代接种于 96 孔板上,密度约为 10<sup>5</sup> 个/mL。

#### 1.2.2 复方黄柏液处理浓度

将复方黄柏液涂剂分别按 1:10、1:30、1:50、1:100、1:200 稀释加入 HaCaT 培养板,继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液孵育 4 h,在酶标仪上选择 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值,检测波长 450~490 nm,参比波长 600~650 nm。

#### 1.2.3 实验分组及 HaCaT 细胞急性光损伤模型建立

将培养的 HaCaT 细胞分为对照组、模型组、实验组。对照组为正常培养的 HaCaT 细胞,不作任何处理。模型组 HaCaT 细胞接受不同剂量 UVB 照射,其中光疗仪灯管距离培养板 15 cm,UVB 照射剂量分别为 10、20、30 mJ/cm<sup>2</sup>,PBS 覆盖细胞上层,UVB 照射结束后继续培养<sup>[4]</sup>。实验组 HaCaT 细胞采用 1:100 稀释复方黄柏液培养 6 h,96 孔板中 HaCaT 细胞达到 95% 融合时,然后接受 10、20、30 mJ/cm<sup>2</sup> 剂量 UVB 照射。

#### 1.2.4 观察指标

(1) HaCaT 细胞增殖率:各组 HaCaT 细胞培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK8 溶液,继续孵育 4 h 后,在酶标仪上选择 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值。(2) LDH、SOD 及 CAT 水平:采用比色法测定,细胞培养 24 h 后收集上清液,依据 LDH、SOD、CAT 及 MMP-1 试剂盒说明书,计算各组 LDH、SOD、CAT 及 MMP-1 水平。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UVB 诱导 HaCaT 细胞急性光损伤模型

正常培养条件下 HaCaT 细胞表现为贴壁生长的不规则细胞,数量较多(图 1),随着 UVB 剂量增加,细胞开始变形,细胞碎片增多,细胞数量逐渐较少(图 2)。

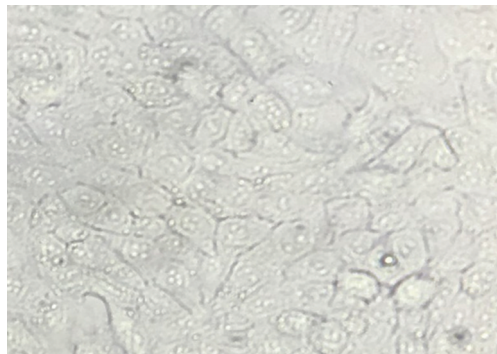


图 1 正常培养条件下 HaCaT 细胞(×100)

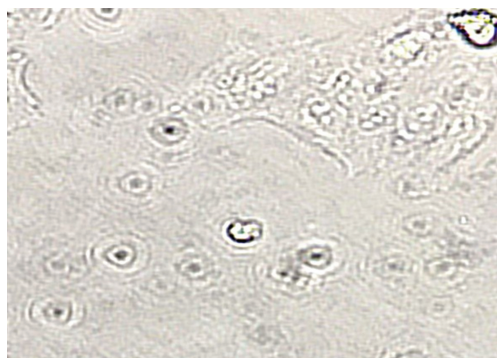


图 2 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB 照射下 HaCaT 细胞(×100)

### 2.2 复方黄柏液处理浓度

CCK8 法检测结果表明,空白组细胞增殖率为(87.433±3.761)%,复方黄柏液稀释组中 1:10 组、1:30 组、1:50 组、1:100 组、1:200 组 HaCaT 细胞增殖率分别为(70.932±4.131)%、(74.597±4.822)%、(78.325±3.063)%、(85.875±3.314)%、(86.075±3.225)%。其中 1:10 组、1:30 组、1:50 组 HaCaT 细胞增殖率显著低于空白组( $P < 0.05$ ),复方黄柏液抑制 HaCaT 细胞增殖。1:100 组和 1:200 组 HaCaT 细胞增殖率与空白组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),考虑复方黄柏液的有效浓度,后续实验采取的浓度为复方黄柏液按 1:100 稀释。

### 2.3 各组上清液 LDH、SOD、CAT 水平及细胞增殖率

对照组中 HaCaT 细胞培养上清液 LDH 水平显著低于模型组和实验组,SOD、CAT 水平及细胞增殖率显著高于模型组和实验组。实验组和模型组中随着 UVB 剂量逐渐增加,HaCaT 细胞培养上清液 LDH 水平显著提高,SOD、CAT 水平及细胞增殖率显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。同一 UVB 剂量下,模型组 LDH 水平显著高于实验组,SOD、CAT 水平及细胞增殖率显著低于实验组,差异

均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同 UVAB 剂量下各组 HaCaT 细胞培养上清液 LDH、SOD、CAT 水平及细胞增殖率的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	UVB 剂量( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )	LDH(U/L)	SOD(U/mg)	CAT(U/mL)	细胞增殖率(%)
对照组		680.316 $\pm$ 19.554	12.480 $\pm$ 0.224	90.276 $\pm$ 1.668	87.432 $\pm$ 3.761
模型组	10	840.316 $\pm$ 10.320 <sup>*◇</sup>	8.947 $\pm$ 0.091 <sup>*◇</sup>	81.042 $\pm$ 1.491 <sup>*◇</sup>	82.542 $\pm$ 2.652 <sup>*◇</sup>
	20	995.385 $\pm$ 20.922 <sup>*△</sup>	7.549 $\pm$ 0.152 <sup>*△</sup>	63.255 $\pm$ 1.578 <sup>*△</sup>	75.754 $\pm$ 2.318 <sup>*△</sup>
	30	1336.957 $\pm$ 60.755 <sup>*△◇</sup>	6.426 $\pm$ 0.121 <sup>*△◇</sup>	43.607 $\pm$ 2.301 <sup>*△◇</sup>	64.797 $\pm$ 2.429 <sup>*△◇</sup>
实验组	10	723.748 $\pm$ 20.721 <sup>*#◇</sup>	11.190 $\pm$ 0.130 <sup>*#◇</sup>	88.361 $\pm$ 1.903 <sup>*#◇</sup>	83.525 $\pm$ 2.995 <sup>*#◇</sup>
	20	848.814 $\pm$ 54.500 <sup>*#△</sup>	8.245 $\pm$ 0.561 <sup>*#△</sup>	70.751 $\pm$ 1.837 <sup>*#△</sup>	78.025 $\pm$ 1.931 <sup>*#△</sup>
	30	1182.610 $\pm$ 79.360 <sup>*#△◇</sup>	7.079 $\pm$ 0.148 <sup>*#△◇</sup>	52.740 $\pm$ 1.541 <sup>*#△◇</sup>	67.900 $\pm$ 1.590 <sup>*#△◇</sup>

注:与对照组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;同一 UVB 剂量下,与模型组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与组内 UVB 剂量 10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  相比,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与组内 UVB 剂量 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  相比,<sup>◇</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 各组上清液 MMP-1 水平** 在同一 UVB 剂量下,实验组 HaCaT 细胞 MMP-1 水平比模型组明显减少,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。UVB 照射的实验组和模型组 HaCaT 细胞培养上清液 MMP-1 水平均高于对照组 [(5.763 $\pm$ 0.592)  $\text{ng}/\text{mL}$ ],差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 各组 HaCaT 细胞培养上清液 MMP-1 水平 ( $\bar{x} \pm s, \text{ng}/\text{mL}$ )

UVB 剂量( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )	模型组	实验组
10	7.739 $\pm$ 0.685	6.981 $\pm$ 0.632 <sup>*</sup>
20	9.385 $\pm$ 0.826	8.017 $\pm$ 0.803 <sup>*</sup>
30	10.957 $\pm$ 1.254	9.891 $\pm$ 1.060 <sup>*</sup>

注:与模型组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

皮肤是人体最大的器官,具有屏障作用和免疫功能,是防御各种物理性、化学性损伤的第一道防线。皮肤光损伤不仅影响皮肤美观,还与多形性日光疹、慢性光化性皮炎、日光性荨麻疹、皮肤癌等疾病相关,容易对人们生活质量造成负面影响,因此如何更好地预防光损伤一直是皮肤研究领域的热点。UVB 辐射引起的皮肤急性光损伤机制主要包括细胞凋亡、氧化应激、脂质蛋白作用、DNA 损伤修复、线粒体损伤,其中氧化应激起重要作用。UVB 辐射导致大量活性氧簇(ROS)产生,激活氧化应激通道,调控炎症因子及抗氧化酶等表达。清除 ROS,维持 ROS 与抗氧化酶动态平衡,减轻氧化应激损伤<sup>[5]</sup>。此外,光损伤可造成皮肤胶原降解,基质金属蛋白酶(MMPs)是调节胶原降解的重要因素。MMP-1 为 MMPs 家族中降解胶原蛋白活性最高的酶,UVB 照射可以诱导 HaCaT 分泌 MMP-1 增多<sup>[6]</sup>。角质形成细胞为皮肤吸收 UVB 的主要细胞,HaCaT 细胞是人皮肤良性角质形成细胞的永生细胞株,常用于替代表皮角质形成细胞做体外实验研究。研究发现姜黄素、茶多酚、

补骨脂素、枸杞多糖等中药提取物能提高机体抗氧化能力,防御 HaCaT 细胞光老化<sup>[7-9]</sup>,对中药抗皮肤氧化的研究可扩展天然抗氧化剂的选择范围。

SOD 及 CAT 作为重要的抗氧化物质,可减少细胞内氧化应激产物及活性氧的产生。而紫外线可抑制抗氧化酶活性,过量的活性氧使细胞膜的脂质双层结构氧化,提高细胞膜通透性,细胞内 LDH 可通过细胞膜渗出到上清液中,血清 LDH 水平是反映 HaCaT 细胞膜氧化损伤程度的重要标志。本研究结果显示,在同一组别中,随着 UVB 剂量增加,LDH 水平显著升高,SOD、CAT 及细胞增殖率显著降低,这与此前研究结果类似<sup>[5]</sup>,细胞氧化损伤程度与 UVB 剂量相关。本研究也发现在同一剂量 UVB 照射下,相比模型组,复方黄柏液显著降低 SOD、CAT 水平及细胞增殖率,提高 LDH 水平,说明复方黄柏液可显著提高 HaCaT 细胞抗氧化能力,减轻细胞膜氧化应激损伤,进而提高细胞增殖率。本次实验中发现,UVB 照射组与对照组比较,MMP-1 表达显著增多,在同一 UVB 剂量下实验组 HaCaT 细胞 MMP-1 水平比模型组明显减少,说明复方黄柏液可以抑制 UVB 诱导的 MMP-1 分泌,减少 UVB 对组织的损伤,但对其具体信号通道作用仍需进一步研究。

复方黄柏液中黄柏和连翘为君药,金银花、蒲公英为臣药,具有清热泻火、消肿祛腐功效。有研究发现黄柏中黄酮类化合物含量丰富,可清除自由基和超氧阴离子,具有较强的抗氧化作用<sup>[10-11]</sup>。连翘提取物中的总黄酮、绿原酸、连翘酯苷、芦丁等具有抗氧化抗衰老等作用<sup>[12]</sup>。金银花、蒲公英中也有多种抗氧化活性分子,包括绿原酸、黄酮、挥发油等<sup>[13-14]</sup>,二者均可吸收紫外线,具有较强的防晒能力。所以复方黄柏液可能通过上述抗氧化分子对 HaCaT 细胞进行光防护作用。

本次研究初步发现复方黄柏液可能对 UVB 照射 HaCaT 细胞造成的急性光损伤具有防护作用,但对

具体细胞信号通路作用未明确,之后将对炎症因子及细胞衰老凋亡相关蛋白等进行进一步研究。复方黄柏液在皮肤应用范围较广,对湿疹、接触性皮炎、脂溢性皮炎、带状疱疹、中毒性表皮松解症具有显著效果<sup>[15-16]</sup>,对皮肤无明显刺激作用,安全性高,可进行更多的研究,使其更好地用于临床工作中。

### 参考文献

[1] 李岷,甄雅贤.外用含维生素 C、阿魏酸和根皮素的抗氧化制剂对紫外线诱导的皮肤光损伤的保护功效[J].中华皮肤科杂志,2010,43(6):447.

[2] 姚俊,赵霞.复方黄柏液最新临床应用进展[J].中国新药杂志,2014,23(3):308-312.

[3] 李慎新,曹新志,钟俊波,等.几种中草药抗氧化性成分的还原能力及总酚含量比较研究[J].安徽农业科学,2008,36(29):12755-12756.

[4] 邓蕙妍,肖峰,高爱莉,等.人表皮角质形成细胞急性光损伤模型的构建[J].新医学,2013,44(8):556-559.

[5] HU S, HUANG J, PEI S, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide inhibits UVB-induced melanogenesis by antagonizing cAMP/PKA and ROS/MAPK signaling pathways [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7330-7334.

[6] WANG X Y, BI Z G. UVB-irradiated human keratinocytes and interleukin-1 $\alpha$  indirectly increase MAP kinase/AP-1 activation and MMP-1 production in UVA-irradiated dermal fibroblasts [J]. Chinese Med J, 2006, 119(10): 827-831.

[7] 高爱莉,江娜,刘清,等.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[J].中国比较医学杂志,2015,25(5):9-12.

[8] 李建民,杨柳,王业秋,等.补骨脂素对中波紫外线导致人皮肤 HaCaT 细胞光老化的保护作用[J].现代生物医学进展,2017,17(2):214-219.

[9] 彭丽倩,江娜,刘清,等.枸杞多糖抗氧化机制及其在皮肤科的研究进展[J].国际皮肤性病学期刊,2017,43(1):39-42.

[10] 曾一,回瑞华,侯冬岩.黄柏中黄酮类化合物的提取及其抗氧化性分析[J].鞍山师范学院学报,2010,12(6):60-62.

[11] 滕杨,谭天,罗时旋,等.关黄柏的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物成分分析及抗氧化活性研究[J].中国现代应用药学,2014,31(7):824-827.

[12] 梅雪,周安琴,李静,等.连翘的化学成分、药理学与毒理学研究概况[J].中国药房,2015,26(22):3143-3146.

[13] 沈奇,沈小青,吴国荣.蒲公英绿原酸白芨多糖包合物的抗氧化作用[J].南京师大学报(自然科学版),2010,33(3):81-84.

[14] 青杰超,林子然,莫开林.金银花和蒲公英抑菌、抗氧化以及抗紫外作用初探[J].四川林业科技,2018,39(6):61-63.

[15] 李元红.复方黄柏液皮肤科新用[J].中国中医急症,2006,15(6):672.

[16] 韩锋,王晓鹏,安金刚,等.复方黄柏液湿敷治疗中毒性表皮坏死松解症的临床疗效观察[J].中国皮肤性病学期刊,2019,33(2):130-134.

(收稿日期:2020-05-16 修回日期:2020-11-15)

(上接第 33 页)

[5] BELLOC S, HAZOUT A, ZINI A, et al. How to overcome male infertility after 40; influence of paternal age on fertility [J]. Maturitas, 2014, 78(1): 22-29.

[6] ROSIAK A, GILL K, JAKUBIK J, et al. Is advanced paternal age a reproductive risk? Part II: embryo development, achieve pregnancy and health of offspring [J]. Post Androl Online, 2017, 4: 33-40.

[7] BENCHAI B, BRAUN V, LORNAGE J, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique [J]. Hum Reprod, 2003, 18(5): 1023-1028.

[8] ROSIAK-GILL A, GILL K, JAKUBIK J, et al. Age-related changes in human sperm DNA integrity [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(15): 5399-5411.

[9] WU Y, KANG X, ZHENG H, et al. Effect of paternal age on reproductive outcomes of in vitro fertilization [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0135734.

[10] ALFARAJ S S, YUNUS F. Advancing paternal age does not affect in-vitro fertilization (IVF) outcomes in a Saudi population [J]. Middle East Fertil Soc J, 2015, 20(3): 204-208.

[11] HAGSTROM H, NASR P, EKSTEDT M, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD [J]. Hepatol, 2017, 67(6): 1265-1273.

[12] REX A S, AAGAARD J, FEDDER J. DNA fragmentation in spermatozoa; a historical review [J]. Andrology, 2017, 51(4): 622-630.

[13] KOH S A, SANDERS K, BURTON P. Effect of male age on oxidative stress markers in human semen [J]. J Reprod Biotechnol Fertil, 2016, 5: 1-10.

[14] ASADI N, BAHMANI M, KHERADMAND A, et al. The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it; a review [J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(5): IE01-IE05.

[15] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [J]. Clin Interv Aging, 2018, 13: 757-772.

[16] SABETI P, POURMASUMI S, RAHIMINIA T, et al. Etiologies of sperm oxidative stress [J]. Int J Reprod Biomed (Yazd), 2016, 14(4): 231-240.

(收稿日期:2020-03-14 修回日期:2020-10-28)