

应用红细胞光敏模型评价抗光敏中药添加剂

张慧明^{1,2}, 王海涛¹, 何聪芬¹, 都晓伟², 董银卯¹

1. 北京工商大学化学与环境工程学院; 植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100048
2. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040

摘要 研究了紫外线或光敏药物单独存在的条件下以及不同照射时间和不同药物浓度条件对模型的影响。建立了长波紫外线诱导光敏药物致使红细胞溶血模型, 通过检测红细胞损伤后上清液中的血红蛋白含量, 计算溶血率, 从而反映细胞损伤程度。结果表明, 紫外线低剂量或氯丙嗪单一条件存在时, 并不能引起红细胞溶血; 当氯丙嗪含量为 0.33mg/mL, 紫外线照射 30min 可致红细胞 50% 溶血, 照射 60min 可使细胞 100% 溶血。应用此模型对 10 种中药及植物成分进行检测, 筛选出银杏叶提取液、茶多酚和葡萄籽提取液 3 种具有抗光敏功能的活性成分。其中, 银杏叶中主要成分黄酮类物质通过广泛的紫外吸收能力从源头阻止紫外线对细胞膜的损伤, 茶多酚、葡萄籽中的多酚类物质通过清除自由基等光产物对细胞膜起到保护作用。

关键词 紫外线; 溶血; 抗光敏活性成分

中图分类号 R284.1

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)05-0030-04

Application of Photosensitive Model of Red Blood Cell to Evaluate the Anti-photosensitive Additives in Traditional Chinese Medicine

ZHANG Huiming^{1,2}, WANG Haitao¹, HE Congfen¹, DU Xiaowei², DONG Yinmao¹

1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development; Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China
2. Pharmaceutical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract With the increase of UV-sensitive groups, more and more attention is paid on the problems of UV-sensitive skins. However, the methods to evaluate the photosensitive damage are more often than not for animal testing. In this paper, a relatively less time consuming and less expensive convenient method is developed to detect the damage of UV-A by red blood cell hemolysis, first to obtain the hemoglobin of the injured red blood cell, and then to calculate the hemolytic rate. The experiments on the effects of ultraviolet light or photo sensitizer alone, the different exposure times and the different drug concentrations show that the red blood cell hemolysis does not occur under ultraviolet light radiation alone without chlorpromazine nor only with chlorpromazine without ultraviolet light radiation. With the chlorpromazine content of 0.33mg/mL in red blood cell, 50% hemolysis can be resulted after being radiated by ultraviolet for about 30min, and 100% hemolysis after 60min of radiation. 10 kinds of Chinese medicine were found with the active ingredients of anti-photosensitive from ginkgo biloba leaf, tea polyphenols, grape seed extraction, as the most potential anti-photosensitive materials. Among them, the main components of ginkgo biloba flavonoids were shown be able to prevent the damage of UV on the cell membrane from the source through the broad UV absorption capacity, tea polyphenols and grape seed polyphenols could protect the cell membrane by scavenging free radicals and other optical products.

Keywords ultraviolet; hemolysis; anti-photosensitive active ingredient

收稿日期: 2009-12-15

作者简介: 张慧明, 硕士研究生, 研究方向为天然中药抗敏化妆品添加剂, 电子信箱: myzhanghuiming@163.com; 董银卯 (通信作者), 教授, 研究方向为植物源化妆品功效添加剂, 电子信箱: ymdong2008@163.com

0 引言

紫外线中,紫外线-B(Ultraviolet-B,UV-B)主要引起晒斑、晒伤等急性反应,紫外线-A(Ultraviolet-A,UV-A)由于其波长较长,能够透过皮肤表层进入真皮,对细胞膜结构及DNA均有损伤,且其损伤具有长期持续性的特点,因此对人体造成较大伤害^[1]。氯丙嗪是公认的能够导致皮肤光过敏的药物^[2],其在紫外线激发下,极易失去电子变成药物自由基,这些自由基与紫外线照射下产生的活性氧自由基等易攻击细胞膜脂双层的不饱和脂肪酸链,产生过氧化脂质,从而使细胞膜结构损伤。在氯丙嗪的存在下,较短的时间、较少的紫外线照射量就能引起膜损伤^[3]。本实验验证了氯丙嗪诱导紫外线过敏损伤的作用,并基于此原理对多种中药活性成分及植物提取物进行筛选,证实一些植物有效成分能够吸收紫外线,对细胞膜有保护作用,可开发作为功效化妆品添加剂使用。

1 材料与方法

1.1 材料

光源:广州百明汇电光源有限公司生产,飞利浦 PHILIPS TLK-40W/10R BL40W 紫外灯,发射光谱在320~390nm之间,峰值在365nm左右。

药品来源:市售盐酸氯丙嗪片,每片含25mg有效成分。经紫外线扫描显示的吸收光谱在190~350nm之间。

样品来源:陕西森弗生物技术有限公司提供茶多酚、黄芪、葡萄籽、大黄、肉桂、银杏叶、卫矛、厚朴、五味子、黄芩提取物。

血标本:鸡血细胞。

试剂:氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、葡萄糖、柠檬酸、柠檬酸钠等常规试剂均为国产分析纯。

仪器:ZEISS Primo Star P95-C型显微镜;UV2300型分光光度计;4K15型离心机。

1.2 方法

1.2.1 血细胞(RBC)的准备和储存

屠宰场取新鲜三黄鸡血10mL,盛装于聚乙烯塑料容器中,与5mL柠檬酸缓冲液混匀,随即将混匀血样保温于保温箱中,温度为21~22℃。30min内运送于实验室,若血样没有受到污染,时间可延长至1h^[4]。

1.2.2 RBC的分离

首先用10mL聚乙烯无菌离心管分装采集的血液样本,室温下离心10min,1500r/min;然后用一次性注射器小心吸取上清液,弃之,用等量PBS缓冲液混洗离心管中的RBC,去除大量的白细胞、血浆和黄色的碎片;最后将离心管中的RBC添加适量葡萄糖,使葡萄糖终浓度为10mmol/L,4℃密封保存。实验前,提前30min将RBC从4℃环境取出放置,使其温度稳定于室温。

1.2.3 细胞悬液的配制

取红细胞200μL于2mL EP管中,加入1.8mL缓冲液,即将悬液稀释10倍,重复此操作一次,即将细胞悬液稀释100

倍,在显微镜下计数,调整细胞个数。

1.2.4 氯丙嗪药物的配制

市售盐酸氯丙嗪药品,每片含盐酸氯丙嗪25mg,取10片去糖衣,碾碎使其溶解于PBS中,定容至250mL容量瓶,制成1mg/mL溶液。

1.2.5 实验方法

1) 氯丙嗪在紫外照射下致红细胞溶血实验

在6孔细胞培养板各孔中加入1mL红细胞悬液,1mL PBS缓冲液,氯丙嗪溶液1mL(1mg/mL);另一块板中加入1mL红细胞悬液,2mL PBS缓冲液。同时置于紫外灯下照射。照射功率固定不变,每照射一定时间分别取出加氯丙嗪与未加氯丙嗪混合液,观察氯丙嗪对红细胞的致溶血反应^[5]。

2) 紫外照射致红细胞溶血实验

取两块6孔板,操作同1)中第一步。一块置暗室中静置,另一块置UV-A光源下照射,一定时间后取出,离心1min,10000r/min,取上清液,于UV2300型分光光度计540nm处测吸收值。

3) 氯丙嗪含量考察

分别取5、1、0.5mg/mL氯丙嗪溶液各1mL,加入到1mL红细胞悬液中,之后每孔中再加入1mL PBS缓冲液,总体积为3mL(氯丙嗪在体系中含量为5mg/3mL,1mg/3mL,0.5mg/3mL)。置于紫外灯下照射。观察不同含量氯丙嗪所致溶血效果。

4) 溶血时间考察

6孔板各孔中分别加入1mL红细胞悬液、1mL氯丙嗪溶液(1mg/mL)、1mL PBS缓冲液,总体积3mL。置于紫外灯下照射,每10min取出混合液测吸收值。观察随时间延长红细胞溶血率的变化。

5) 抗光敏添加剂筛选

建立模型后,在此基础上检测10种样品在紫外照射下对细胞保护作用。步骤与上实验基本相同,每孔中加入红细胞悬液1mL后,先加入0.1mg/mL的样品溶液1mL,静置10min,再加1mg/mL氯丙嗪溶液1mL,紫外灯下照射,每5min取出并测值。

6) 100%溶血值细胞液制备

6孔细胞培养板中加入1mL红细胞悬液,再加入2mL超纯水,摇匀10min使其全部溶血,540nm处测吸收值。

7) 氯丙嗪自身氧化性测定

1mg/mL氯丙嗪溶液,每孔中3mL,紫外灯下照射,每5min取出测定吸光度,消除药物本身经UV-A照射可能引起吸光度改变的影响因素。

2 计算溶血率

溶血率按下式进行计算:

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{\text{照射后样品} - \text{未照射样品} - \text{无红细胞样品}}{100\% \text{ 溶血值} - \text{未照射样品}} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 氯丙嗪在紫外照射下致红细胞溶血模型的建立

3.1.1 紫外照射下氯丙嗪致红细胞溶血实验

在未加入氯丙嗪溶液条件下,照射 60min 吸光度未有明显变化,证明单纯 UV-A 照射不引起红细胞溶血。加入氯丙嗪溶液后,在 UV-A 照射下,可明显看出细胞发生溶血现象。证明了氯丙嗪在紫外线照射下可诱导红细胞溶血的发生。

图 1 为紫外线照射对溶液体系的影响,在同样加入氯丙嗪溶液的条件下,置于暗室的红细胞吸光度没有大变化,经照射的红细胞悬液吸光度增大,说明细胞与氯丙嗪溶液混合后,不经紫外线照射不会引起溶血发生。

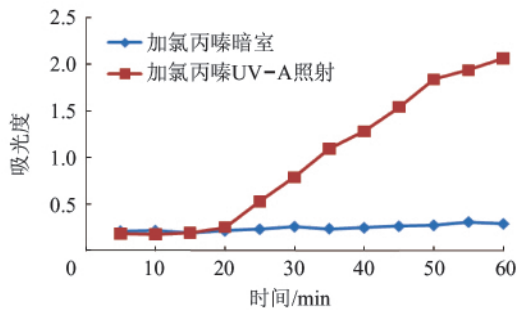


图 1 紫外线照射与未照射溶液红细胞溶血率
Fig. 1 Red blood cell hemolysis rate under UV exposure and non-irradiated solution

3.1.2 氯丙嗪含量考察

图 2 为氯丙嗪含量对溶血率的影响,氯丙嗪含量为 0.5mg/3mL 时照射 60min 未见溶血(溶液总体积为 3mL);当含量为 5mg/3mL 时,仅照射 10min 溶血即可发生,说明相同照射时间内,溶血率随氯丙嗪含量的增高而增大;高含量氯丙嗪会缩短发生溶血的时间。

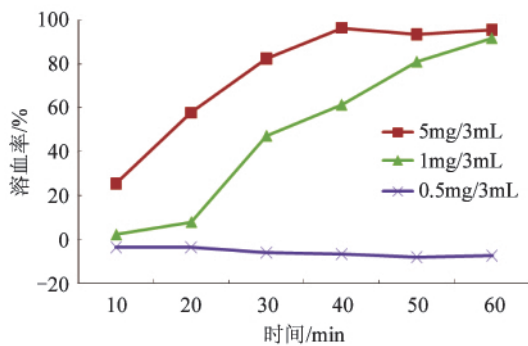


图 2 不同浓度氯丙嗪溶液所致红细胞溶血率
Fig. 2 Different concentrations of chlorpromazine solutions due to the rate of red blood cell hemolysis

3.1.3 溶血时间考察

图 3 为氯丙嗪含量为 1mg/3mL 时红细胞溶血率随时间变化,达到 50%溶血时间平均为 30min,60min 溶血率可达

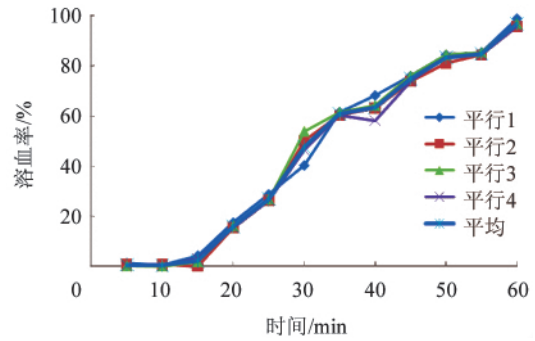


图 3 加入 1mg/mL 氯丙嗪溶血率随时间变化
Fig. 3 Variation of hemolysis rate over time with 1mg/mL chlorpromazine

100%;说明相同氯丙嗪含量条件下,红细胞溶血率会随照射时间的延长而增大。

3.2 抗光敏中药添加剂筛选

图 4 为在此方法基础上添加待检测的样品溶液,显示加入 0.1mg/mL 的银杏、茶多酚、葡萄籽溶液后,明显降低了红细胞的溶血率,证明其能够吸收 UV-A 波段紫外线,阻止紫外线照射下产生的各种自由基对红细胞造成的损伤。

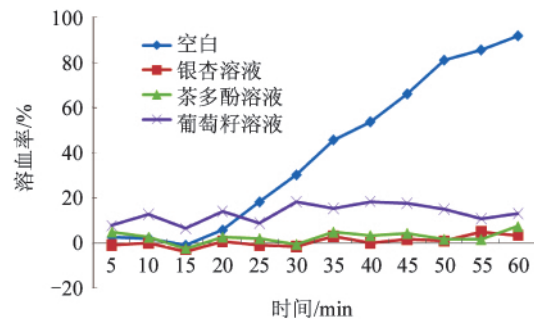


图 4 不同样品对红细胞膜的保护作用
Fig. 4 Protective effect of different samples for red cell membrane

图 5 表明,氯丙嗪溶液经紫外线照射后自身也会发生氧化颜色加深,随时间延长吸光度逐渐增大,在计算溶血率时应将此因素考虑在内。

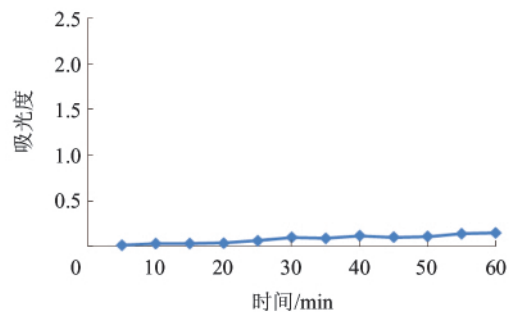


图 5 氯丙嗪紫外线照射下自身氧化吸光度
Fig. 5 Self-oxidation absorbance of chlorpromazine under ultraviolet light

4 结论

实验建立了紫外线照射氯丙嗪溶液导致红细胞溶血模型,考察了氯丙嗪用量、照射时间等因素影响,为检测光敏物质对细胞的损伤程度确立了实验方法,并应用此方法筛选出银杏、茶多酚、葡萄籽3种有效抗光敏成分。

从图4可看出,紫外线照射60min内,银杏提取液可保护红细胞不发生溶血。银杏主要化学成分为黄酮类化合物,根据其结构可分为单黄酮类(如槲皮素)、双黄酮类(如银杏双黄酮)和儿茶素类(如没食子酸儿茶素)。这些黄酮类物质能够有效清除活性氧自由基及羟自由基,对脂质过氧化具有显著的防护作用^[6]。大多数黄酮类化合物的紫外吸收光谱主要由两个吸收带组成:出现在300~400nm之间的吸收带I和出现在240~280nm之间的吸收带II,其吸收覆盖了几乎整个紫外线波段^[7]。

茶多酚、葡萄籽中都含有多酚类及黄酮类化合物,如黄酮醇类、花色素类等,不仅能够吸收紫外线,而且可以清除紫外线照射下产生的活性氧自由基,抑制脂质过氧化反应,从而达到保护细胞膜的作用^[8]。

紫外线不仅能够造成细胞膜的损伤,还能通过诱导活性氧及细胞因子产生DNA链断裂、突变等,致使细胞凋亡。此外,紫外线对细胞内线粒体、溶酶体、细胞骨架等均会造成损害^[9]。深入了解紫外线损伤机制,从各种途径采取措施阻止紫外线给人体带来的危害,需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 蒲爱萍,宋琦如,汪岭.紫外线对皮肤的损伤及其防护[J].宁夏医学院学报,2003,25(4):302-303.
Pu Aiping, Song Qiru, Wang Ling. *Journal of Ningxia Medical College*, 2003, 25(4): 302-303.

2003, 25(4): 302-303.

- [2] 宋廷生,王步玲,陈勇.氯丙嗪光敏性皮肤色素沉着机理探讨[J].上海精神医学,1989,1(1):25-27.
Song Tingsheng, Wang Buling, Chen Yong. *Shanghai Archives of Psychiatry*, 1989, 1(1): 25-27.
- [3] Arlett C, Earl L, Ferguson J, et al. Predictive *in vitro* methods for identifying photo sensitizing drugs: A report [J]. *Br J Dermatol*, 1995, 132: 271.
- [4] 廖艳,王雪,张立实,等.溶血试验作为眼刺激试验替代方法的研究[J].现代预防医学,2002,29(4):595-595.
Liao Yan, Wang Xue, Zhang Lishi, et al. *Modern Preventive Medicine*, 2002, 29(4): 595-595.
- [5] 胡跃,阎春林,廖康煌.光溶血反应检测氯丙嗪光毒性的实验研究[J].中华皮肤科杂志,1997,30(6):377-379.
Hu Yue, Yan Chunlin, Liao Kanghuang. *Chinese Journal of Dermatology*, 1997, 30(6): 377-379.
- [6] 陈季武,胡天喜,朱振勤.银杏叶黄酮抗氧化作用研究[J].华东师范大学学报:自然科学版,1998(3):86-90.
Chen Jiwu, Hu Tianxi, Zhu Zhengqin. *Journal of East China Normal University: Natural Science*, 1998(3): 86-90.
- [7] 匡海学.中药化学[M].北京:中国中医药出版社,2003:278-279.
Kuang Haixue. *Traditional Chinese Medicine chemistry*[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2003: 278-279.
- [8] 方若莹,陈季武,胡天喜.茶多酚和槲皮素清除自由基作用的研究[J].辐射研究与辐射工艺学报,1993,11(4):193-197.
Fang Ruoying, Chen Jiwu, Hu Tianxi. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 1993, 11(4): 193-197.
- [9] 戴维德,刘凡光,顾瑛.细胞光敏损伤位点的研究进展[J].中华物理医学与康复杂志,2004,26(2):120-122.
Dai Weide, Liu Fanguang, Gu Ying. *Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2004, 26(2): 120-122.

(责任编辑 王芷)

·学术动态·

“第七届全国光生物学 学术研讨会”征文



由中国生物物理学会举办的“第七届全国光生物学学术研讨会”定于2010年8月6—9日在贵阳市召开,展示6年来中国光生物学及相关领域研究的最新进展和成绩。

会议正在征文,内容包括:光化学与光物理学(光谱学、光技术与光工程),光敏作用,光合作用作用与光能转换,光形态建成,光感应生物学,环境光生物学,时间生物学,光保护,光毒性,视觉,光医学,DNA损伤与修复,光致癌症发生,光治疗与光动力疗法,光皮肤病学,光免疫学,生物发光与化学发光,纳米光生物学等。

征文方式:通过电子邮件附件(.rtf或.doc文件)形式发送。论文摘要截稿日期:2010年6月5日。

联系方式:北京市朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所(100101)魏舜仪,徐文丽;电话:010-64889894,64888458;传真:010-64889892;电子信箱:wsy@moon.ibp.ac.cn,findwayfrom@163.com。

·学术动态·

“中国电子学会第十七届 信息论学术年会”征文



“中国电子学会第十七届信息论学术年会”将于2010年10月16—17日在西安电子科技大学召开。

会议现面向相关科技工作者征文,征文范围如下:信息论、网络编码、多媒体处理技术与应用系统、信号处理、通信系统、最新技术、网络与信息安全、数字版权管理、内容安全、信息隐藏。

全文截稿日期:2010年8月30日。

联系方式:北京邮电大学287信箱(100876)段老师;电话:010-62286409;电子信箱:csit2010@tom.com。