

虾青素脂质体对小鼠皮肤紫外线损伤干预机制的初步研究*

李福民¹, 刘媛², 廖金凤¹, 段西凌^{1△}

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院 皮肤科(成都 610072); 2. 西南医科大学研究生院(泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨虾青素脂质体对小鼠皮肤中波紫外线(UVB)损伤的干预作用及机制。方法 将40只C57BL/6J小鼠随机分为4组,即空白组(不行UVB照射,不用药)、模型组(UVB光损伤组,只照射不用药)、对照组(照射+虾青素)、实验组(照射+虾青素脂质体),每组10只。UVB照射(辐照强度为 $2\text{ mW}\cdot\text{cm}^2$,辐照时间为60 s;前5日每日照射1次,后9日隔日照射1次,2周共照射10次)及药物干预(每次辐照前10 min用4 mL 0.2%虾青素或4 mL 0.2%虾青素脂质体涂抹于暴露皮肤)2周后,HE染色分别观察皮肤组织病理学改变,免疫组织化学染色观察皮肤Ki-67抗原、8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OHdG)表达情况,试剂盒测定皮肤超氧化物歧化酶(SOD)活力和血清基质金属蛋白酶-13(MMP-13)质量浓度。**结果** 模型组和对照组的HE染色显示真皮变薄、真皮胶原纤维细长、排列疏松紊乱,与空白组比较,Ki-67、MMP-13及8-OHdG表达增加以及SOD活力降低,其差异均有统计学意义($P<0.05$)。实验组与模型组相比皮肤组织病理变化得到明显改善,Ki-67、MMP-13及8-OHdG表达减少及SOD活力升高,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 外用虾青素脂质体可改善小鼠皮肤光损伤引起的病理变化及减轻胶原损伤,其强抗氧化作用可能是干预机制之一。

【关键词】 虾青素脂质体 光损伤 基质金属蛋白酶-13 超氧化物歧化酶

The Preliminary Study on Anti-photodamaged Effect of Astaxanthin Liposomes in Mice Skin LI Fu-min¹, LIU Yuan², LIAO Jin-feng¹, DUAN Xi-ling^{1△}. 1. Department of Dermatology, Sichuan Provincial People's Hospital & Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610072, China; 2. Graduate School, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

△ Corresponding author, E-mail: uanxilingd@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To study the protective effects of astaxanthin liposome (Asx-lipo) on photodamage by UVB in mice skin. **Methods** 40 C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: The blank group (no irradiation, no drug use), model group (UVB light injury group, no drug use), control group (irradiation + astaxanthin), experimental group (irradiation + astaxanthin liposome), each group with 10 mice. Each group was given the corresponding light (the radiation intensity was $2\text{ mW}\cdot\text{cm}^2$, the time of irradiation was 60 s, 1 times a day for the first 5 days, and 1 times every other day for the next 9 days, 10 times in a total of 2 weeks.) and drug intervention (topically treated with 4 mL 0.2% astaxanthin or 4 mL 0.2% Asx-lipo 10 min before the irradiation) for two weeks. After that, samples were examined by the following indicators: the histological changes of skin, Ki-67, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), superoxide dismutase (SOD) activities and serum matrix metalloproteinase-13 (MMP-13). **Results** HE staining the model group and the control group showed that the dermis became thin, the dermal collagen fibers were long and thin, and the arrangement was loose and disordered. Compared with the blank group, the expression of Ki-67, MMP-13 and 8-OHdG increased and SOD activity decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the pathological changes of skin tissues in the experimental group were significantly improved, with decreased expressions of Ki-67, MMP-13 and 8-OHdG and increased SOD activity, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The photodamage of mice skin can be improved by topical Asx-lipo. The mechanism may be related to the strong antioxidation of Asx-lipo.

【Key words】 Astaxanthin liposome Photodamage MMP-13 SOD

虾青素(astaxanthin, Asx)是一种类胡萝卜素含氧衍生物,并具备高度的抗氧化能力^[1-3],其在心

脑血管疾病、肝肾疾病等预防治疗作用方面的研究较多,被誉为“超级抗氧化剂”^[4]。由于虾青素可以吸收紫外线辐射并减少紫外线对皮肤的伤害,在抗皮肤光损伤中拥有广阔的应用前景;但虾青素为脂溶性分子,不易在水中溶解,且对外界刺激因素敏

* 四川省科技厅立项课题(No. 2017YSKY0001-5)资助

△ 通信作者, E-mail: uanxilingd@hotmail.com

感,容易被降解,导致其在皮肤中生物利用度很弱,临床应用效果受到了限制^[5-6]。本研究通过将虾青素制备成脂质体制剂来解决其皮肤利用度差这一难题,为虾青素的临床实际应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

虾青素购自美国 Sigma 公司;大豆磷脂、胆固醇、单硬脂酸甘油酯、泊洛沙姆购自成都科龙试剂有限公司;增殖细胞抗原 Ki-67 抗体购自 Cell Signaling 公司;蛋白定量(BCA 法)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒购自南京建成公司;基质金属蛋白酶-13(MMP-13)ELISA 试剂盒购自四川省医学科学院实验动物研究所;中波紫外线(UVB)辐照计、SS-01 紫外线治疗仪购自上海希格玛高技术有限公司;8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-OHdG)抗体购自 Santa Cruz 生物科技公司;全波长酶标检测仪购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 脂质体制作方法

使用乳化蒸发低温固化法制作 0.2% 虾青素脂质体^[7]。脂质体包封率的测定:取 3~5 mL 脂质体混悬液置超滤器上,加压过滤并收集滤液。用反相高效液相色谱方法检测未包入脂质体中虾青素的药量。色谱柱为 Discovery-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 482 nm。按以下公式计算包封率,从而得出脂质体混悬液中虾青素质量浓度^[8-9]。

包封率(%)=(脂质体混悬液中总药物量-未包入脂质体药物量÷脂质体混悬液中总药物量)×100%

1.3 实验动物分组和实验方法

SPF 级 C57BL/6J 雄鼠(体质量 18~22 g,4~6 周龄)购于四川省医学科学院实验动物研究所,适应性喂养 1 周后去除小鼠背部毛发,面积约 4 cm²,背部皮肤有红肿、糜烂渗液等病变者均被去除。采用随机数字法将 40 只小鼠分为 4 个组:分别为空白组(10 只)、模型组(10 只)、对照组(虾青素组,10 只)、实验组(虾青素脂质体组,10 只)。利用中波紫外线(UVB,280~320 nm)照射 C57BL/6J 小鼠背部暴露皮肤,建立小鼠皮肤光损伤模型^[10-11]。UVB 每日辐照各组(除空白组),剂量为 120 mJ·cm²,辐照强度为 2 mW·cm²,辐照时间为 60 s。前 5 日每日照射 1 次,后 9 日隔日照射 1 次,2 周共照射 10 次。空白组不照射不用药,模型组只照射不用药;对照组和实验组在每次照射前 10 min 分别使用 4 mL 0.2% 虾青素和 4 mL 0.2% 虾青素脂质体涂抹暴露皮肤。

1.4 检测指标

1.4.1 皮肤组织 HE 染色 各组小鼠取背部皮肤常规固定包埋及切片,HE 染色后常规脱水、透明、封片,观察皮肤组织病理学变化。

1.4.2 皮肤组织免疫组化染色 各组小鼠皮肤组织石蜡切片脱蜡至水,修复抗原及洗涤封闭后滴加 1:100 的 8-OHdG 抗体或 Ki-67 抗体,4 °C 孵育过夜;PBS 荡洗及二抗孵育后常规显色、脱水、吹干、封片。在 40×10 倍镜下观察免疫组化切片 Ki-67 或 8-OHdG 的表达情况。若出现棕黄色、淡黄色、黄色颗粒视为阳性细胞;若未出现则视为阴性细胞。随机挑选 10 个互不重叠的视野,每个视野取 100 个细胞分别进行阳性细胞计数,取其平均数计算 8-OHdG 或 Ki-67 抗原阳性表达率。

1.4.3 皮肤组织 SOD 活性的检测 取各组小鼠皮肤组织冰冷生理盐水中漂洗、擦干并称重,在皮肤组织质量 9 倍的预冷生理盐水中快速剪碎组织块;使用超声波细胞粉碎仪进行粉碎,将制备好的组织匀浆使用低温离心机离心约 10 min,取上清液按照水溶性四唑盐(WST)法 SOD 检测试剂盒说明书操作测定 SOD 活性。

1.4.4 酶联免疫吸附法检测小鼠外周血 MMP-13 的质量浓度 抽取各组小鼠尾静脉血离心后取上清冻存备用。按照 MMP-13 ELISA 试剂盒设置标准样品孔和稀释样本血清,均加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体 50 μL,孵育及反复洗板后所有孔加入底物 A、B 各 50 μL,再孵育后加入终止液 50 μL,450 nm 波长测得各孔光密度(OD)值,绘制标准曲线后计算各样本 MMP-13 的质量浓度。

1.5 统计学方法

采用单因素方差分析或秩和检验,α=0.05。

2 结果

2.1 脂质体包封率

虾青素脂质体包封率为 80% 左右,外用虾青素脂质体药物质量浓度约为 16 μg/mL。

2.2 各组小鼠皮肤组织的病理变化

空白组小鼠皮肤色泽正常、弹性较好;模型组和对照组小鼠照光区皮肤出现不同程度的脱屑、松弛、弹性下降等改变;而实验组略有脱屑、皮肤稍松弛。HE 染色显示,与空白组比较,模型组和对照组的表皮和棘层肥厚,真皮层出现胶原纤维排列疏松,胶原束细长、断裂、排列紊乱、间隙增大等改变,实验组和模型组比较可见真皮胶原纤维断裂和紊乱明显恢复(图 1)。

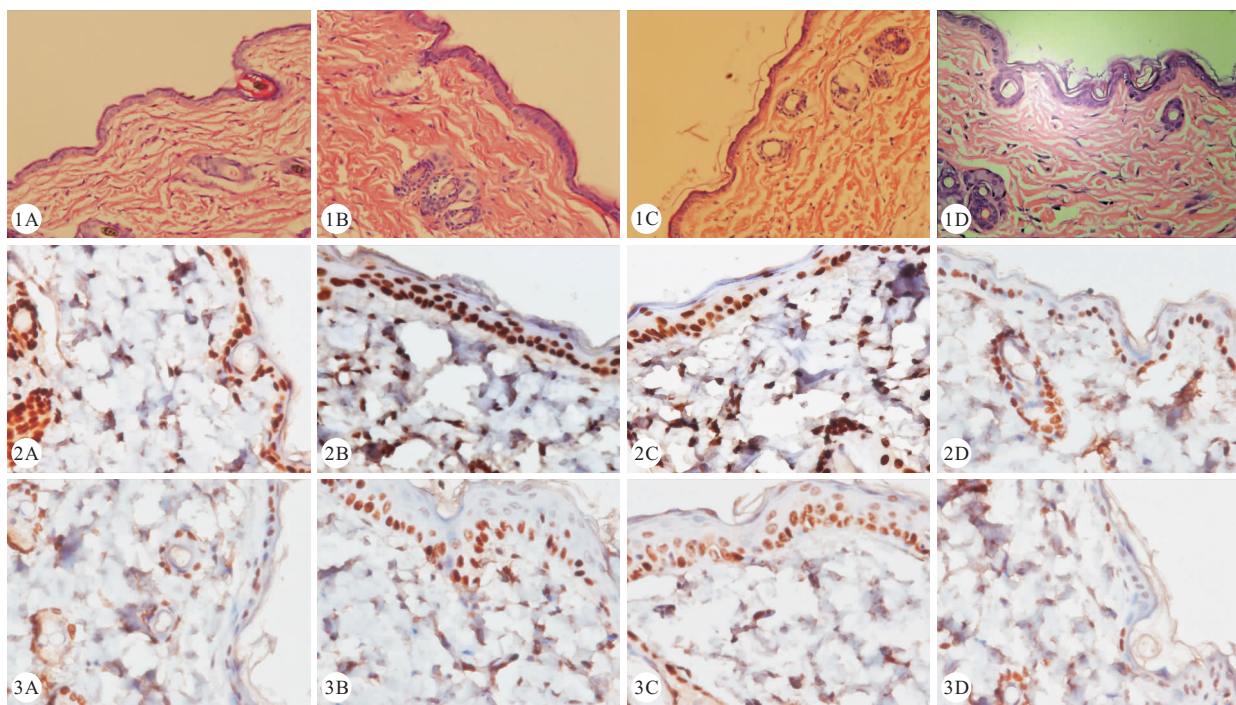
图 1 各组小鼠皮肤组织病理结果。HE $\times 400$ 图 2 各组小鼠皮肤 8-OHdG 表达情况。SP $\times 400$

图 3 各组小鼠皮肤 Ki-67

的表达结果。SP $\times 400$ Fig 1 The results of HE staining in mice skin. $\times 400$ Fig 2 Expression of 8-OHdG in mice skin. SP $\times 400$

Fig 3 Expression of

Ki-67 in mice skin. SP $\times 400$

A: Blank group; B: Model group; C: Control group; D: Treatment group

2.3 各组小鼠皮肤 8-OHdG 表达的比较

8-OHdG 主要表达于角质细胞胞核,模型组阳性细胞率最高(43.2% \pm 13.0%),对照组次之(32.0% \pm 4.5%),实验组为 21.0% \pm 5.2%,空白组为 1.4% \pm 2.4%。模型组和对照组比较差异无统计学意义,实验组表达量均少于模型组和对照组,但仍高于空白组,其差异均有统计学意义($P < 0.01$)(图 2)。

2.4 各组小鼠皮肤 Ki-67 表达的比较

Ki-67 主要表达于角质细胞胞核,Ki-67 在空白组中低表达,阳性细胞率为 15.5% \pm 6.9%;实验组 Ki-67 阳性细胞率为 26.4% \pm 6.0%,低于模型组(45.1% \pm 6.4%)和对照组(41.8% \pm 5.0%),但仍高于空白组(P 均 < 0.01),模型组和对照组比较差异无统计学意义(图 3)。

2.5 各组小鼠皮肤 SOD 活力的比较

空白组、模型组、对照组和实验组小鼠皮肤 SOD 活力分别为(30.77 \pm 3.35)、(19.07 \pm 2.24)、(22.45 \pm 2.08)和(27.60 \pm 1.81) U/mg prot.,实验组均高于对照组和模型组($P < 0.01$);实验组与空白组比较、模型组和对照组比较差异均无统计学意义。

2.6 各组小鼠血清 MMP-13 质量浓度的比较

空白组血清 MMP-13 质量浓度[(21.35 \pm 4.51) ng/mL]低于模型组[(52.27 \pm 5.27) ng/mL],其差异有统计学意义($P < 0.01$);实验组血清 MMP-13 质量浓度[(28.74 \pm 2.45) ng/mL]低于模型组和对照组[(44.89 \pm 3.37) ng/mL],但仍高于空白组,其差异均有统计学意义($P < 0.01$);模型组和对照组比较差异无统计学意义。

3 讨论

紫外线照射皮肤后出现干燥、粗糙和纹理变厚等改变,主要原因是紫外线照射皮肤产生过量的活性氧(ROS),导致表皮细胞分裂增殖速度加快,以及细胞外基质的降解和胶原纤维合成的减少^[12]。8-OHdG 是细胞 DNA 受到氧化损伤导致基因突变和个体衰老的重要标志物,检测 8-OHdG 可以评估体内氧化损伤和修复的程度^[13]。SOD 可以使细胞内氧自由基处于低水平无害状态,并及时修复受损细胞^[14]。Ki-67 抗原表达水平也可体现包括角质形成细胞在内的非肿瘤细胞的增殖情况^[15]。基质金属蛋白酶(MMPs)是一个内源性的锌依赖性酶家族,能够降解除多糖以外所有的细胞外基质成分^[16]。

本实验使用 UVB 照射 C57BL/6J 小鼠建立小鼠皮肤光损伤模型,病理结果显示真皮变薄、胶原纤维排列疏松紊乱,皮肤 Ki-67、8-OHdG 表达及血清 MMP-13 质量浓度增加,皮肤 SOD 活力降低,实验结果与国外研究结果相符合^[11]。

国内外学者在心脑血管及肝脏疾病等研究中发现虾青素具有明显的抗氧化活性。NAKAYIMA 等^[17]研究发现虾青素可抑制 ROS 的产生,降低一氧化氮(NO)和 DNA 损伤,从而减轻小鼠视网膜损伤。WU 等^[18]在研究大鼠痴呆模型保护作用时,发现虾青素可提高谷胱甘肽(GSH)的含量。在皮肤光损伤研究方面,YOSHIHISA 等^[19]研究发现虾青素可通过降低 NO 和环氧合酶-2(COX-2)形成而阻止 UVA 诱导的炎症反应,并抑制角质形成细胞凋亡。虾青素传统制剂皮肤生物利用度差,限制了其在皮肤科外用制剂中的应用。因此将虾青素制备成脂质体制剂能提高其皮肤利用度,并且可提高药物的稳定性和经皮透过吸收能力,以及减少活性物质的降解与变质^[20]。

本研究中实验组的病理结果和抗氧化指标检测与对照组相比有明显差异,说明将虾青素制备成脂质体制剂能有效提高其皮肤利用度。实验组的组织病理结果还显示虾青素脂质体可明显改善 UVB 所致小鼠背部皮肤的胶原损伤程度,证实了其在防御 UVB 所致的急性光损伤中发挥重要作用。本研究中实验组小鼠皮肤 SOD 活力明显升高说明虾青素脂质体可激活 SOD 或提高其活性,更有利于 ROS 的清除。实验组小鼠皮肤 Ki-67 和 8-OHdG 表达减少,表明虾青素脂质体可能通过阻断氧自由基所引起的细胞膜、DNA、蛋白质等成分的破坏。本研究还发现虾青素脂质体可通过降低 MMP-13 的表达,从而减少真皮纤维胶原的降解。

综上所述,外用虾青素脂质体可显著改善小鼠皮肤光损伤的病理变化及胶原损伤,这可能为皮肤光老化相关疾病的防治和探索新型光防护剂提供新思路及理论依据。

参 考 文 献

[1] ROH E, KIM JE, KWON JY, *et al.* Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(8): 1631-1637.

[2] JENSEN JD, WING GJ, DELLAVALLE RP. Nutrition and melanoma prevention. *Clin Dermatol*, 2010, 28(6): 644-649.

[3] NAITO Y, UCHIYAMA K, AOI W, *et al.* Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Biofactors*, 2004, 20(1): 49-59.

[4] YUAN J, PENG J, YIN K, *et al.* Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(1): 150-165.

[5] HAMA S, UENISHI S, YAMADA A, *et al.* Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(12): 2238-2242.

[6] HAMA S, TAKAHASHI K, INAI Y, *et al.* Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage. *J Pharm Sci*, 2012, 101(8): 2909-2916.

[7] 李国峰, 周日红, 曾 抗, 等. 维生素 E 脂质体的制备. *中国现代应用药学*, 1997, 14(4): 18-22.

[8] 张玉珍, 刘 喆. 高效液相测定虾青素的含量. *中国食品添加剂*, 2007, 38(4): 15.

[9] WU H, NIU H, SHAO A, *et al.* Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases. *Mar Drugs*, 2015, 13(9): 5750-5766.

[10] SHARMA MR, WERTH B, WERTH VP. Animal models of acute photodamage: comparisons of anatomic, cellular and molecular responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c mice. *Photochem Photobiol*, 2011, 87(3): 690-698.

[11] SUMIYOSHI M, KIMURA Y. Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice. *Phytother Res*, 2009, 12(1): 510-515.

[12] WONDRAK GT. Let the sun shine in mechanisms and potential for therapeutics in skin photodamage. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8(5): 390-400.

[13] FISCHER TW, KLESZCZYŃSKI K, HARDKOP LH, *et al.* Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in *ex vivo* human skin. *J Pineal Res*, 2013, 54(3): 303-312.

[14] GĘGOTEK A, BIERNACKI M, AMBROŻEWICZ E, *et al.* The cross-talk between electrophiles, antioxidant defence and the endocannabinoid system in fibroblasts and keratinocytes after UVA and UVB irradiation. *J Dermatol Sci*, 2016, 81(2): 107-117.

[15] LYONS NM, O'BRIEN NM. Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *J Dermatol Sci*, 2002, 30(1): 73-84.

[16] LEE J, KO S, YE S, *et al.* 8-Oxo-2'-deoxyguanosine ameliorates UVB-induced skin damage in hairless mice by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MMP expression. *J Dermatol Sci*, 2013, 70(1): 49-57.

[17] NAKAJIMA Y, INOKUCHI Y, SHIMAZAWA M, *et al.* Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress *in-vitro* and in mice *in-vivo*. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(10): 1365-1374.

[18] WU W, WANG X, XIANG Q, *et al.* Astaxanthin alleviates brain aging in rats by attenuating oxidative stress and increasing BDNF levels. *Food Funct*, 2014, 5(1): 158-166.

[19] YOSHIHISA Y, REHMAN MU, SHIMIZU T. Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes. *Exp Dermatol*, 2014, 23(3): 178-183.

[20] LIPKA D, GUBERNATOR J, FILIPCZAK N, *et al.* Vitamin C-driven epirubicin loading into liposomes. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 3573-3585 [2017-06-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3790897/>. doi: 10.2147/IJN.S47745.

(2018-03-20 收稿, 2018-07-15 修回)

编辑 余琳