

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200928001

甘俊英, 孙左义, 秦建新, 等. 重组人金属硫蛋白-III α 短肽对 UVB 致 HaCaT 细胞氧化损伤的缓解作用[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 240-249
Gan J Y, Sun Z Y, Qin J X, et al. Allievation effects of recombinant human metallothionein III α peptide on oxidative damage of HaCaT cells induced by UVB [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 240-249 (in Chinese)

重组人金属硫蛋白-III α 短肽对 UVB 致 HaCaT 细胞氧化损伤的缓解作用

甘俊英^{1,2}, 孙左义¹, 秦建新³, 原海亮³, 李强⁴, 薛玉英^{1,*}

1. 环境医学工程教育部重点实验室, 东南大学公共卫生学院, 南京 210000

2. 马鞍山市疾病预防控制中心, 马鞍山 243000

3. 苏州汇涵医用科技发展有限公司, 常熟 215500

4. 常熟市市场监督管理局, 常熟 215500

收稿日期: 2020-09-28 录用日期: 2020-12-06

摘要: 利用体外自由基清除实验研究重组人金属硫蛋白 III α 短肽(rh-MT-III α)自由基清除能力, 建立紫外线 B(UVB)损伤 HaCaT 细胞模型, 使用不同浓度 rh-MT-III α (25 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理损伤的 HaCaT 细胞 24 h 后观察细胞存活率、细胞形态、细胞凋亡及细胞内活性氧(ROS)水平, 从细胞水平上评价 rh-MT-III α 对 UVB 致 HaCaT 细胞氧化损伤的作用。体外自由基清除实验结果显示, 随着 rh-MT-III α 浓度升高, 其对 1,1-二苯基-2-苦苯肼(DPPH)自由基清除率也随之增加, 清除率为 50% 时所需 rh-MT-III α 浓度(IC₅₀)为 184.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。抗光氧化损伤实验结果显示, rh-MT-III α 可有效提高 UVB 损伤后 HaCaT 细胞的存活率、改善细胞形态并显著降低细胞凋亡及细胞内 ROS 含量, 且在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时修复作用最为明显。实验结果表明 rh-MT-III α 具有较强自由基清除能力, 可有效缓解 UVB 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤, 且在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下作用显著。

关键词: 金属硫蛋白; 紫外线 B; 人永生生化皮肤角质细胞; 抗氧化损伤; 自由基清除

文章编号: 1673-5897(2021)4-240-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Allievation Effects of Recombinant Human Metallothionein III α Peptide on Oxidative Damage of HaCaT Cells Induced by UVB

Gan Junying^{1,2}, Sun Zuoyi¹, Qin Jianxin³, Yuan Hailiang³, Li Qiang⁴, Xue Yuying^{1,*}

1. Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210000, China

2. Maanshan Center for Disease Control and Prevention, Maanshan 243000, China

3. Suzhou Huihan Medical Technology Development Co. Ltd., Changshu 215500, China

4. Changshu Municipal Market Supervision Administration, Changshu 215500, China

Received 28 September 2020 accepted 6 December 2020

Abstract: The ability of recombinant human metallothionein III α peptide (rh-MT-III α) to scavenge free radicals was determined by free radical scavenging experiments *in vitro*. After the HaCaT cells were damaged by UVB,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573186); 江苏省普通高校研究生实践创新计划(SJCX18_0078)

第一作者: 甘俊英(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为纳米毒理学, E-mail: 154912630@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yyxue@seu.edu.cn

they were treated with rh-MT-Ⅲ α at different doses (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24 h. The anti-oxidative function of rh-MT-Ⅲ α on oxidative damage of HaCaT cells induced by UVB was evaluated by the alternations of cell viability, cell morphology, cell apoptosis and the production of reactive oxygen species (ROS) in HaCaT cells. The results of free radical scavenging experiment showed that the scavenging rate of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) increased as the dose of rh-MT-Ⅲ α increased, and the required dose of rh-MT-Ⅲ α was 184.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ when the scavenging rate was 50%. The results of anti-oxidative function experiment showed that rh-MT-Ⅲ α treatment, especially at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, resulted in improved cell viability, more tightly cell connection, and reductions in apoptosis rate and ROS content in HaCaT cells when compared with the positive model group. The findings indicated that the rh-MT-Ⅲ α showed strong ability of scavenging free radical, which effectively alleviate UVB-induced oxidative damage in HaCaT cells with the mostly effective dose of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Keywords: metallothionein; UVB; HaCaT cells; anti-oxidation; scavenging free radical

随着环境中污染物的增加,大气层破坏导致紫外线辐射对人类健康的损伤十分严重,超氧化物侵袭超过机体耐受程度,最终出现炎症、衰老及代谢调节功能的紊乱,甚至诱发基因突变和癌症^[1]。对抗氧化和由脂质过氧化反应引起的疾病研究,已成为人类对健康的新追求^[2]。中波紫外线(ultraviolet B, UVB)是造成皮肤损伤的主要光谱,其引起的皮肤光损伤主要通过氧化应激反应产生过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致细胞发生凋亡及细胞氧化损伤,从而引起皮肤光老化,诱发皮肤癌^[3],多年来,研究者们致力于寻求一种天然无毒的防晒修复剂。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类分子量较低、富含半胱氨酸的金属结合性蛋白,在生物体内分布广泛^[4],其具有的清除自由基功能,可有效降低机体氧化损伤水平^[5],提示MT可用来预防和治疗UVB辐射造成的光氧化损伤。但内源性MT的抗氧化损伤作用有限,随着氧化损伤的积累,超过机体耐受临界值之后,MT应答效应逐渐减弱,因此研究者们开始关注外源性补充MT的抗氧化损伤作用研究。

MT可从动植物组织中提取^[6-8],但由于来源不足、纯度不高等原因,在一定程度上阻碍了MT的发展,相对于这种方法,基因工程制备的MT^[9]纯度高,性能更加稳定,使人源MT走向商品化成为可能。本试验用重组人金属硫蛋白Ⅲ α 短肽(recombinant human metallothionein Ⅲ α , rh-MT-Ⅲ α),由苏州汇涵医用科技发展有限公司利用基因工程制备,与完整MT比较,具有分子量更低,更易被吸收特点。这种rh-MT-Ⅲ α 在基因序列上与动植物中提纯的MT相比具有更高生物相容性,与内源性完整MT α 域在结构和巯基含量基本一致。由于rh-MT-Ⅲ α 属于新物质,目前尚未有其毒性评价及功能相关研究,

若能较完整地阐述和确证外源性补充这种新rh-MT-Ⅲ α 的安全性及抗氧化功能,将有望替代化学防晒剂。

在前期研究rh-MT-Ⅲ α 对细胞及线虫的毒性效应的基础上^[10],利用体外化学共浴方法研究rh-MT-Ⅲ α 对自由基清除功能并计算出IC₅₀(rh-MT-Ⅲ α 对自由基清除率达50%时所需的浓度),同时建立UVB损伤细胞模型,选用人类皮肤毒性评价常用模型HaCaT细胞,经UVB损伤处理后,加入不同浓度rh-MT-Ⅲ α 继续培养24 h后检测细胞存活率、细胞形态、细胞凋亡及细胞内ROS水平,从细胞水平上初步研究rh-MT-Ⅲ α 的抗光氧化损伤作用,为其作为化学防晒替代提供实验参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 主要试剂仪器与细胞来源

1.1.1 材料与试剂

rh-MT-Ⅲ α 由苏州汇涵医用科技发展有限公司提供,商品名为重组人巯基短肽,利用大肠杆菌基因工程高密度发酵并纯化获得的人源金属硫蛋白Ⅲ α 亚基片段,分子量3.7 kD,每分子蛋白含游离巯基6个,蛋白SDS-PAGE纯度 $\geq 98\%$ 。

DMEM高糖培养液(美国Gibco公司),胰蛋白酶(美国Gibco公司),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),磷酸盐缓冲液(PBS)(博士德生物工程有限公司),噻唑蓝(MTT)(美国Sigma公司),活性氧试剂盒(碧云天生物公司),细胞凋亡试剂盒(美国BD公司),分析纯无水乙醇(南京晚晴生物有限公司),1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH)(合肥博美生物科技有限公司)。

1.1.2 主要仪器

3423型CO₂培养箱(美国Thermo Scientific公

司);Biobase 生物安全柜(中国博科控股集团有限公司),FSX 型生物图像导航仪(日本 Olympus 公司),5424R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);Epoch 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司);MVS-1 型涡旋混合器(北京金紫光科技发展有限公司);5424R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);BS-210S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);MilliQ Advantage 型超纯水系统(美国密理博公司);UV1780 紫外分光光度计(日本岛津公司);UVB 灯管(313 nm 模拟太阳光老化,购自北京中仪商城);FV3000 激光共聚焦显微镜(日本 OLYMPUS 公司);BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)

1.1.3 实验细胞

HaCaT 细胞是非肿瘤来源的人正常皮肤永生角质形成细胞株,与正常人角质形成细胞分化特性相似,可以繁殖 150 代以上。HaCaT 细胞购自上海名劲生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

染毒液配制:使用超纯水配制不同浓度 rh-MT-III α 溶液(25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),现配现用。

80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DPPH 溶液配制:称取 DPPH 粉末 10 mg,加入无水乙醇定容至 125 mL,制得 DPPH 溶液备用。

1.2.2 实验剂量与程序

体外自由基清除试验:实验方法参照文献[11]并略作修改。向 1.5 mL DPPH 溶液中,分别加入 1.5 mL 不同浓度的 rh-MT-III α 溶液(25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),对照组加入同体积超纯水,混匀,室温避光静置 30 min 后,利用紫外分光光度计在 517 nm 条件下测定吸光度值(OD),每剂量组设 3 个平行。按公式计算自由基清除率(K), $K(\%)=(1-A_x/A_0)\times 100\%$,式中: A_x 为样品测定管 OD 值, A_0 为空白测定管 OD 值。计算 IC₅₀ 以评价 rh-MT-III α 体外清除自由基能力。

UVB 诱导 HaCaT 细胞损伤模型的构建:将 UVB 灯管垂直置于 UVB 照度计上方,调整灯管高度至辐照强度为 100 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$,固定灯管。选取对数生长期、生长状态良好的 HaCaT 细胞,调整细胞悬浮液浓度为 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,分别接种于 96 孔板(每孔 0.2 mL)中,每组设 3 个平行,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 12 h 后,弃去原培养液,加入 200 μL PBS 覆盖,置于 UVB 灯管正下方分别处

理 1、2、3、4 和 5 min,完全培养基为空白对照,含细胞避光处理组(锡箔纸盖住)为阴性对照。处理结束后,缓慢吸去 PBS,加入完全培养基 200 μL ,于培养箱中继续培养 24 h 后,依据 MTT 法检测各组细胞存活率,依据细胞存活率来确定 UVB 模型辐照剂量。细胞存活率($\%$)= $[(A_x - A_k)/A_0]\times 100\%$,式中: A_x 为各 UVB 处理组吸光度值, A_k 为空白对照组吸光度值, A_0 为避光对照组吸光度值。

建立的 UVB 模型:依据前期 rh-MT-III α 细胞毒性结果,在 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量时,乳酸脱氢酶释放实验结果显示,rh-MT-III α 对 HaCaT 细胞膜造成了明显的损伤,低于此剂量时未观察到明显毒性。选用不同浓度(25、50、100 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)rh-MT-III α 处理经 UVB 辐照的细胞,继续培养 24 h 后,从细胞存活率、细胞形态、细胞凋亡率及细胞内 ROS 含量各指标与避光对照组和单一 UVB 处理组进行比较,评价 rh-MT-III α 在细胞水平上的抗氧化损伤作用。

细胞内 ROS 观察:(1)激光共聚焦显微镜观察 ROS。处理结束后,弃去原培养液,PBS 缓慢清洗 2 遍。按照活性氧检测试剂盒说明书,用无血清的 DMEM 培养液将 DCFH-DA 探针按 1:1 000 比例稀释,混匀后加入到激光共聚焦小皿中,每孔 0.5 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内处理 20 min。孵育结束后,将探针液吸出,用不含血清的培养液洗 2 遍,再用 PBS 洗 2 遍,最后向每孔加入 1 mL PBS,放置生物导航仪下观察并拍照。

(2)流式细胞仪检测 ROS。染毒结束后,弃去原培养液,PBS 洗 2 遍,加入 0.25% 胰酶消化细胞,完全培养基终止消化,将细胞转移到 1.5 mL 离心管中,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。离心结束后,弃上清,加入 1 mL PBS,缓慢吹打混匀,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,离心后,重复 PBS 清洗一次。按照活性氧检测试剂盒说明书,用无血清的 DMEM 培养液将 DCFH-DA 探针按 1:1 000 比例稀释混匀,加入到含处理好细胞的 1.5 mL 离心管中,每管 1 mL,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,期间每隔 3 min 颠倒混匀一下。孵育结束后,用 PBS 洗 3 次,以充分去除未进入细胞的 DCFH-DA 探针,最后加入 500 μL PBS 悬浮细胞,用流式细胞仪在 $Ex/Em=488\text{ nm}/525\text{ nm}$ 波长下进行检测。

1.2.3 数据处理

采用 SPSS Statistics 22.0 软件进行数据分析,多组之间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析

(One-Way ANOVA)。两组之间比较,若符合方差齐性,则采用LSD-*t*检验方法,若方差不齐,则采用Games-Howell检验方法。实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,检测水平为 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

利用SPSS软件计算rh-MT-III α 清除DPPH自由基的 IC_{50} 。计算步骤参照文献[12]:(1)建立SPSS数据集,包括剂量组、清除率和总数等;(2)按要求计算好的实验数据输入,总数均填100;(3)根据顺序点击,Analyze \rightarrow Regression \rightarrow Probit \rightarrow 将剂量组导入Covariates,清除率导入Response frequency,总数导入汇总Total,Transform点击选择Log based 10 \rightarrow 选择Model Probit \rightarrow OK,从而计算出 IC_{50} 及其95%置信区间。

2 结果 (Results)

2.1 体外自由基清除率结果

DPPH是研究体外自由基清除的主要材料^[13],在乙醇中是一种稳定的自由基,溶液呈紫色,于517 nm处显示最大吸收峰。当DPPH遇到质子供体物质,例如抗氧化剂,颜色从紫色变为黄色,随后吸光度降低^[14],由此可测定化学物质的自由基清除能力。利用紫外分光光度计在517 nm测得吸光度值,按照1.2.2中的公式计算rh-MT-III α 对DPPH清除率,结果如图1所示,随着rh-MT-III α 剂量的增加,其对DPPH自由基的清除率逐渐增加,由SPSS软件计算出rh-MT-III α 对DPPH自由基的清除率达到50%时的浓度为 $184.23 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P > 0.05$),模型拟合度好。 IC_{50} 的95%置信区间为 $151.00 \sim 230.90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 UVB诱导HaCaT细胞氧化损伤模型构建

不同UVB辐照剂量对HaCaT细胞存活率影响测定结果如表1所示,随着UVB辐照时间的增加,HaCaT细胞存活率降低,与避光对照组存活率相比,3、4和5 min处理组显著降低($P < 0.05$)。考虑模型生物学意义,去除与避光对照组无差异的1 min和2 min(该辐照剂量下,细胞损伤不明显)和细胞损伤过于严重的4 min和5 min(该辐照剂量下,细胞损伤大,一定程度上会弱化受试物的抗氧化作用,不利于观察受试物真实的抗氧化能力),选定模型UVB辐照时间为3 min,辐照强度为 $100 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

2.3 rh-MT-III α 对UVB致HaCaT细胞氧化损伤的抗氧化作用研究

2.3.1 细胞存活率

HaCaT细胞经UVB处理后,利用不同浓度(25、

50、100和 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) rh-MT-III α 继续培养24 h后,测得细胞存活率结果如图2所示。结果显示,与避光对照组相比,UVB处理后细胞存活率均有所下降,随着rh-MT-III α 浓度的升高,各UVB+rh-MT-III α 处理细胞存活率呈现先增高后略有降低,在 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下与避光对照组无显著差异。尤其在 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率较单一UVB处理组细胞存活率显著升高。

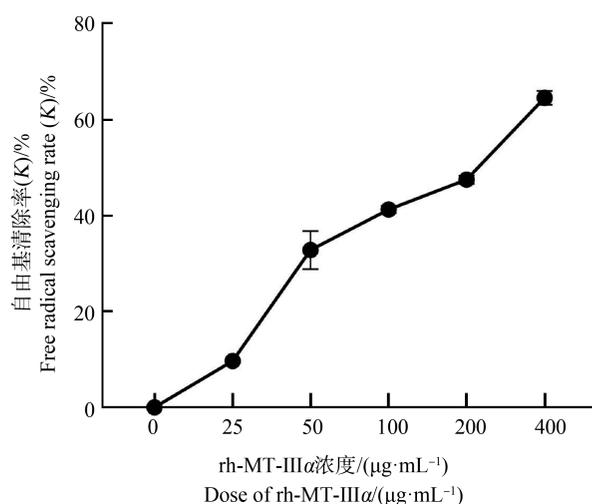


图1 重组人金属硫蛋白III α 短肽(rh-MT-III α)对1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)自由基的清除率

Fig. 1 The free radical scavenging rate on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by recombinant human metallothionein III α peptide (rh-MT-III α)

表1 不同UVB辐照剂量对HaCaT细胞存活率影响(mean \pm SD, n=3)

Table 1 The effect of different dose of UVB on viability of HaCaT cells (mean \pm SD, n=3)

UVB 辐照时间/min UVB radiation time/min	细胞存活率/% Cell viability/%
避光对照 Negative control group	100.00 \pm 0.98
1	99.27 \pm 0.11
2	94.34 \pm 3.23
3	59.39 \pm 12.01 ^a
4	39.80 \pm 8.75 ^a
5	8.95 \pm 0.68 ^a

注:UVB为紫外线B;与避光对照组比较,^a $P < 0.05$,差异有统计学意义。

Note: UVB stands for ultraviolet B; compared with negative control group, ^a indicates significant differences at $P < 0.05$ level.

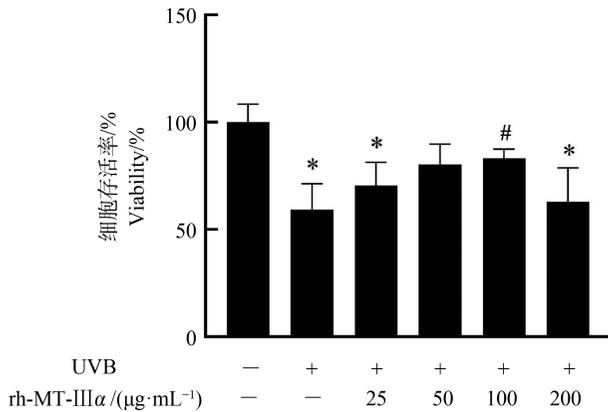


图2 rh-MT-III α 对UVB损伤后的HaCaT细胞存活率的影响

注:与避光对照组相比,* $P<0.05$;与单一UVB处理组相比, # $P<0.05$; -表示不含有,+表示含有。

Fig. 2 The effect of rh-MT-III α on viability of HaCaT cells after exposed to the UVB

Note: Compared with the negative control group, * indicates significant differences at $P<0.05$ level; compared with the single UVB group, # indicates significant differences at $P<0.05$ level; - means contained; + means not contain.

2.3.2 细胞形态学结果

经处理完成后,在激光共聚焦显微镜下观察 rh-MT-III α 对UVB损伤后的HaCaT细胞形态学的影响,结果如图3所示。经UVB处理后,与避光对照

组相比,单一UVB组细胞连接不紧密,细胞变圆,单个视野可见细胞数明显减少。在25~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下,随着rh-MT-III α 浓度的增加,细胞形态较UVB组逐渐改善,细胞连接逐渐紧密,呈铺路石状,单个视野可见细胞数明显增加,在100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时尤为明显。在高浓度时,这种改善作用有所降低。

2.3.3 细胞凋亡率

处理结束后,利用流式细胞仪检测HaCaT细胞凋亡率,结果如图4和图5所示,与避光对照组相比,UVB处理后细胞凋亡率均有所上升,随着rh-MT-III α 浓度的增加,细胞凋亡率呈现先降低后略有升高趋势。在100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下,细胞凋亡率较单一UVB处理组显著降低($P<0.05$),与避光对照组差异无统计学意义。

2.3.4 活性氧检测结果

激光共聚焦显微镜下观察细胞内ROS的含量情况如图6所示。与避光对照组相比,经UVB处理后的细胞荧光强度增加。与单一UVB处理相比,rh-MT-III α 处理后细胞荧光强度减弱,在50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下细胞荧光强度显著降低。

流式细胞仪检测细胞内ROS含量结果如图7和图8所示,与避光对照组相比,单一UVB及UVB+rh-MT-III α (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组细胞

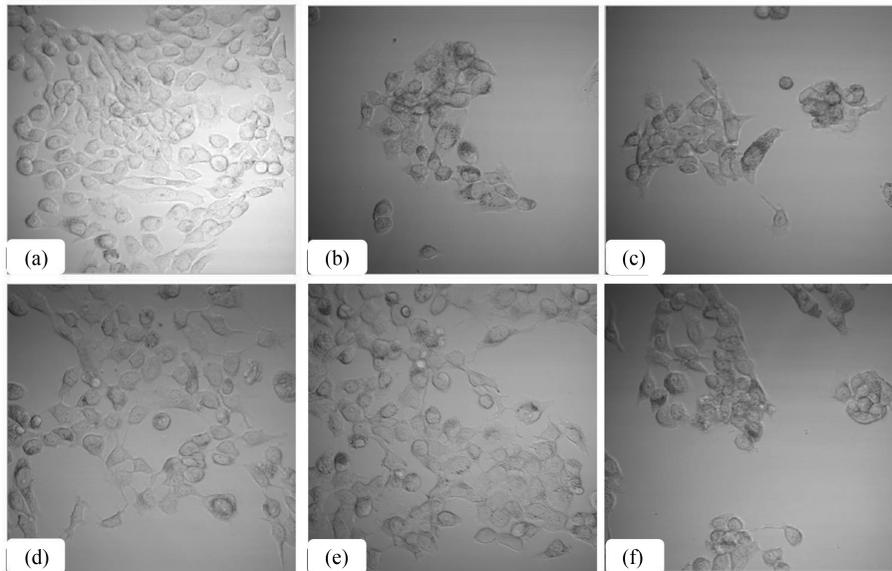


图3 rh-MT-III α 对UVB损伤后的HaCaT细胞形态的影响(400 \times)

注:(a)避光对照组;(b)单一UVB处理组;(c)~(f)UVB+25~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α 。

Fig. 3 Effect of rh-MT-III α on morphology of HaCaT cells after exposed to the UVB

Note: (a) negative control group; (b) single UVB expose group; (c)~(f) UVB+25~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α .

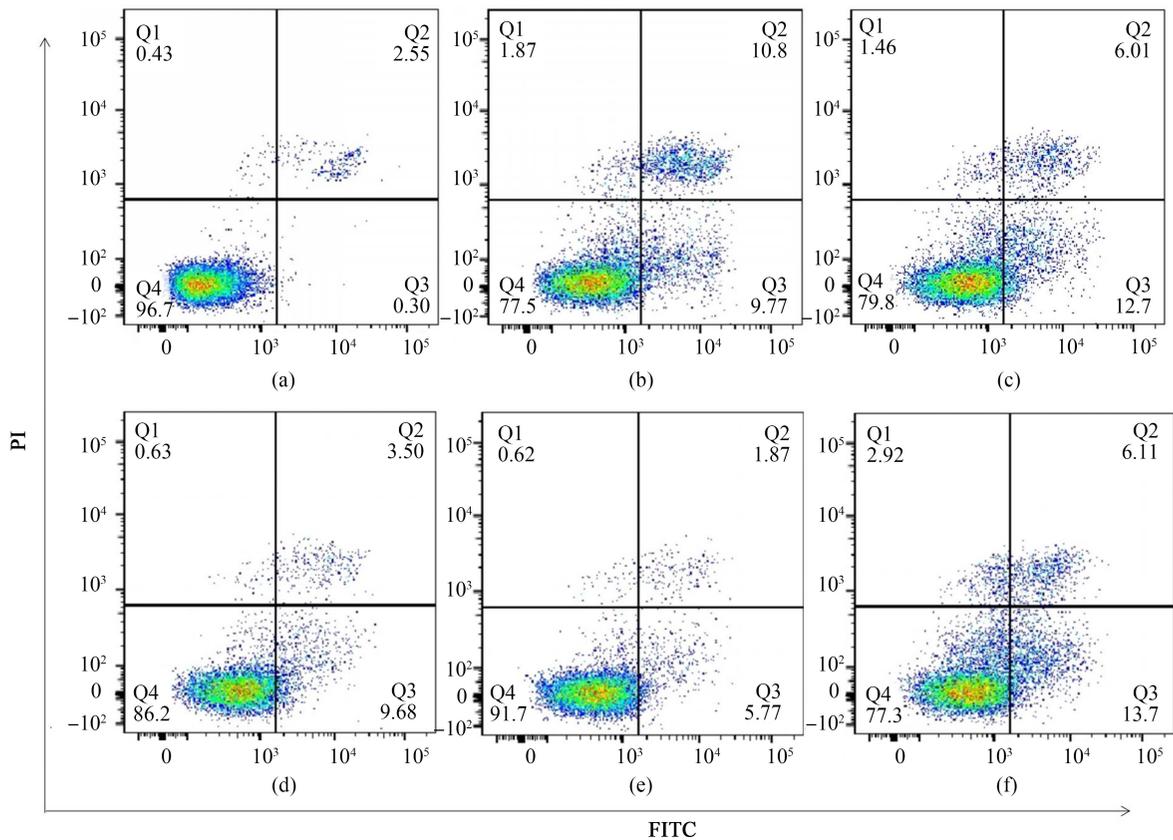


图 4 rh-MT-III α 对 UVB 损伤后的 HaCaT 细胞凋亡率的影响

注: FITC/PI 表示流式细胞仪荧光通道; (a) 避光对照组; (b) 单一 UVB 处理组; (c) ~ (f) UVB+25 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α 。

Fig. 4 Effect of rh-MT-III α on atopsis of HaCaT cells after exposed to the UVB

Note: FITC/PI represents flow cytometer fluorescence channel; (a) negative control group; (b) single UVB expose group;

(c) ~ (f) UVB+25 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α .

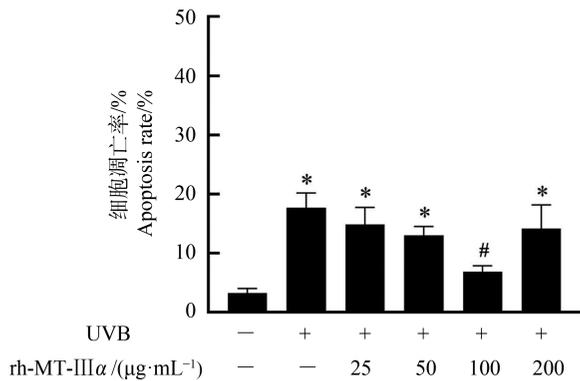


图 5 rh-MT-III α 对 UVB 损伤后 HaCaT 细胞凋亡率影响

注: 与避光对照组相比, * $P < 0.05$; 与单一 UVB 处理组相比,

$P < 0.05$; - 表示不含有, + 表示含有。

Fig. 5 Effect of rh-MT-III α on atopsis of HaCaT cells after exposed to the UVB

Note: Compared with the negative control group, * indicates significant differences at $P < 0.05$ level; compared with the single UVB group,

indicates significant differences at $P < 0.05$ level;

- means contained; + means not contain.

ROS 含量显著增加, UVB+rh-MT-III α (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组细胞 ROS 略有增加, 但无统计学意义。与单一 UVB 剂量组相比, 除 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组外均显著降低。UVB+rh-MT-III α 处理组细胞 ROS 含量随着 rh-MT-III α 剂量的增加, 呈现先降低后略有升高的趋势, 且在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时显著降低, 恢复至正常水平。

3 讨论 (Discussion)

DPPH 在实验体系中为稳定自由基, 其含有以氮为中心的吸电子基团, 体系呈紫色, 在 517 nm 可见光下出现强烈吸收峰。向体系中加入受试物, 如果受试物能够清除 DPPH, 则吸光度值降低, 表明其具有清除氧自由基作用, 该实验方法简捷、重复性好^[15]。依照加入 rh-MT-III α 后体系吸光度的改变, 可间接判断 rh-MT-III α 是否具有清除自由基功能及其功能大小。实验结果表明, rh-MT-III α 对 DPPH 自由基具有清除作用, 其半数清除率浓度为 184.23

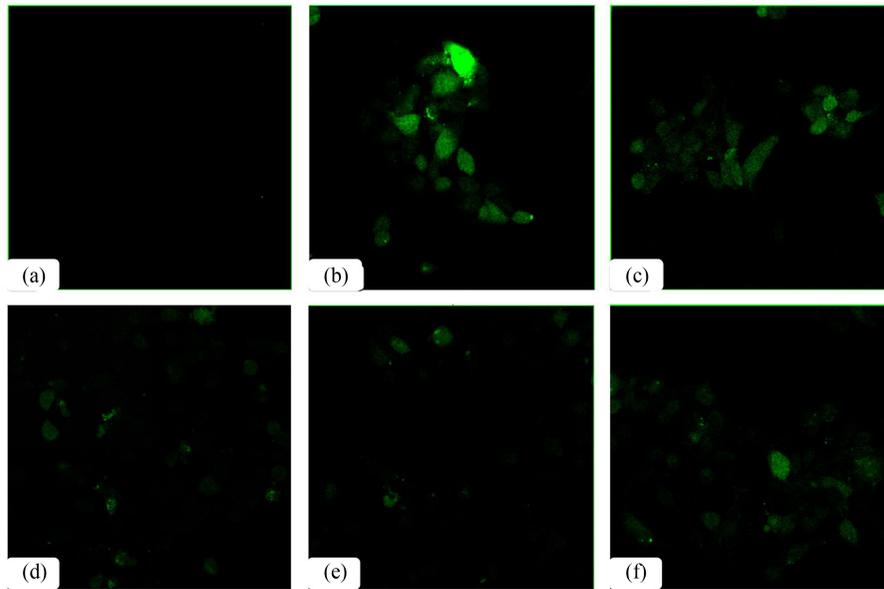


图6 rh-MT-III α 对UVB损伤后的HaCaT细胞活性氧(ROS)含量的影响(400 \times)

注:(a)避光对照组;(b)单一UVB处理组;(c)~(f)UVB+25~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α 。

Fig. 6 Effect of rh-MT-III α on reactive oxygen species (ROS) content of HaCaT cells after exposed to the UVB (400 \times)

Note: (a) negative control group; (b) single UVB expose group; (c) ~ (f) UVB+25 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α .

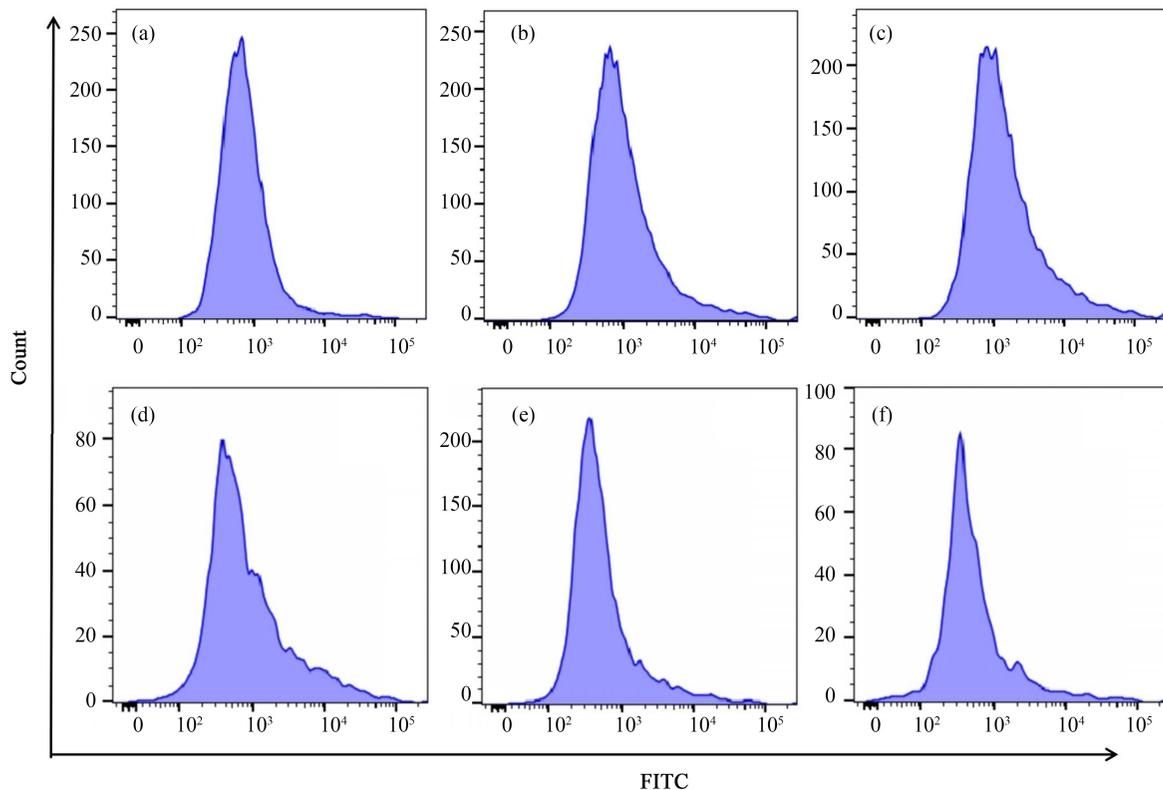


图7 流式细胞术检测rh-MT-III α 对UVB损伤后的HaCaT细胞ROS含量的影响

注:FITC/Count为流式细胞仪荧光通道;(a)避光对照组;(b)单一UVB处理组;(c)~(f)UVB+25~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α 。

Fig. 7 Effect of rh-MT-III α on ROS content of HaCaT cells after exposed to the UVB by flow cytometry

Note: FITC/Count represents flow cytometer fluorescence channel; (a) negative control group; (b) single UVB expose group;

(c) ~ (f) UVB+25 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rh-MT-III α .

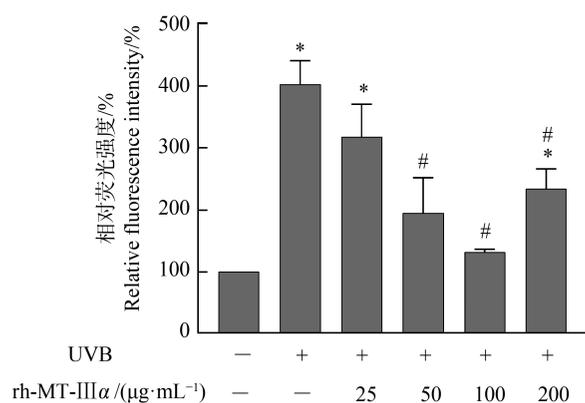


图8 流式细胞术检测 rh-MT-III α 对 UVB 损伤后 HaCaT 细胞 ROS 含量的定量影响

注:与避光对照组相比,* $P<0.05$;与单一 UVB 处理组相比,
$P<0.05$;-表示不含有,+表示含有。

Fig. 8 Effect of rh-MT-III α on ROS content of HaCaT cells after exposed to the UVB by flow cytometry

Note: Compared with the negative control group, * indicates significant differences at $P<0.05$ level; compared with the single UVB group, # indicates significant differences at $P<0.05$ level; - means contained; + means not contain.

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本实验结果与前人的研究结果存在差异^[16-17],已有研究者采用锌合金属硫蛋白(Zn-MT)及酵母源金属硫蛋白 I 和 II,研究 MT 对 DPPH 自由基清除能力,并获得 IC_{50} 约为 $58 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,远低于 $184.23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。金属硫蛋白主要有 4 种异构体,MT-I、MT-II 主要分布于哺乳动物器官如肝、肾组织中,MT-III 主要分布于中枢神经系统,MT-IV 主要在皮肤和胃肠道上部表达。本研究所用材料为人源大肠杆菌发酵所得的金属硫蛋白 III α 短肽,分析研究结果相差较大的主要原因可能有两方面:一是不同来源及不同亚型的 MT 在功能方面存在原始差异;二是完整 MT 包含 α 和 β 这 2 个结构域,其巯基含量远大于只含 α 结构域的 MT 短肽,从而造成其功能上的差异。不同制备方式及 MT 成品纯度在一定程度上,也会对其功能产生影响。对于 rh-MT-III α 与不同亚型及来源的完整 MT 抗氧化能力的差异机制探索及比较,有待进一步研究。

紫外线主要有 3 种波长范围:长波紫外线(ultraviolet A, UVA)、UVB 和短波紫外线(ultraviolet C, UVC),波长为 280 ~ 320 nm 的中波紫外线是致人体皮肤光氧化损伤的主要光谱^[18]。长期的紫外线辐射,尤其是中波紫外线还可引起皮肤角质形成细胞分泌一系列的炎症因子,诱导各种皮肤病甚至是皮

肤癌的发生^[19-21]。体外自由基清除实验表明, rh-MT-III α 具有较强的自由基清除能力,提示其可能存在抗 UVB 氧化损伤的作用。我们建立了以细胞为基础,UVB 为处理因素的评价 rh-MT-III α 抗氧化损伤功能的模型。结果表明,单一 UVB(强度为 $100 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$)处理 HaCaT 细胞后,随着辐照时间的增加,细胞存活率随之降低,表明细胞损伤越严重,依据细胞存活结果及损伤修复生物学意义,选定辐照时间为 3 min ($59.39\% \pm 12.01\%$),此剂量下既可以观察到 UVB 对细胞的损伤,又可以减少过度损伤导致弱化 rh-MT-III α 抗氧化损伤的功能,使观察结果更具可靠性。

UVB 辐射使机体内自由基含量增加,超出机体耐受范围后产生氧化损伤,而氧化损伤的发生常伴有 ROS 含量的异常升高,如果 ROS 生成量超过机体的耐受水平,则会导致应激损伤,破坏遗传大分子及关键蛋白质,从而导致衰老与疾病的发生^[22]。ROS 是细胞代谢不可避免的产物^[23],UVB 辐照后可通过直接作用和间接作用产生大量的 ROS。UVB 模型处理的 HaCaT 细胞,再经不同浓度(25、50、100 和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)rh-MT-III α 处理后,在 25 ~ $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下细胞存活率呈上升趋势,且在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下,细胞存活率显著高于单一 UVB 染毒组。细胞形态、细胞凋亡和活性氧含量指标与细胞存活率结果一致,均在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下显著改善,与单一 UVB 处理组细胞相比, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组细胞连接更加紧密,细胞凋亡率及活性氧含量均显著降低,这些结果表明, rh-MT-III α 具有抗氧化损伤功能,且在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下作用显著,可使细胞恢复至正常水平。这种作用在高剂量下有所减弱,结合前期细胞毒性评价研究,考虑是随着 rh-MT-III α 剂量的增加,其对细胞膜的损伤作用越来越明显,在安全有效剂量(考虑在 $100 \sim 200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)之间,但需要进一步研究来确证)内,其抗氧化作用随着剂量的增加而增强,一旦超过安全剂量, rh-MT-III α 对于细胞膜的损伤削弱了其抗氧化损伤作用,从而导致抗氧化损伤作用在高剂量时降低。ROS 含量从侧面反映了氧化损伤水平,未来需进一步探讨氧化损伤程度指标,如丙二醛含量、谷胱甘肽含量以及抗氧化损伤基因的表达量等。

研究首先探索了不同浓度 rh-MT-III α 对 DPPH 自由基的体外清除能力,继而通过构建 UVB 损伤 HaCaT 细胞模型,研究不同浓度 rh-MT-III α 对 UVB

损伤后的细胞各生物学终点的影响,在细胞水平上验证了 rh-MT-III α 抗氧化损伤功能,为天然防晒剂探索提供了实验数据支持。

通讯作者简介:薛玉英(1965—),女,博士,教授,主要研究方向为纳米毒理学。

参考文献(References):

- [1] 朱茂祥,杨陟华,龚诒芬. 活性氧及其对 DNA 氧化损伤在启动细胞癌变中作用[C]// 中国生物物理学会自由基生物学与自由基医学专业委员会. 第五届全国自由基生物学与自由基医学学术讨论会论文集. 张家界: 中国生物物理学会自由基生物学与自由基医学专业委员会, 2000: 76
- [2] 王颖,王欣卉,徐炳政,等. 金属硫蛋白体内抗氧化功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 377-380, 385
Wang Y, Wang X H, Xu B Z, et al. Research progress of metallothionein function *in vivo* antioxidant [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 377-380, 385 (in Chinese)
- [3] Chen L, Hu J Y, Wang S Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review [J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2012, 67(5): 1013-1024
- [4] Cherian M G, Jayasurya A, Bay B H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis [J]. Mutation Research, 2003, 533(1-2): 201-209
- [5] 唐秀丽,秦春晶,孙瑞成,等. 金属硫蛋白抗氧化作用研究进展[J]. 山东化工, 2015, 44(11): 42-44, 48
Tang X L, Qin C J, Sun R C, et al. The study on antioxidant of metallothionein [J]. Shandong Chemical Industry, 2015, 44(11): 42-44, 48 (in Chinese)
- [6] 孟范平,肖静,赵顺顺,等. 海洋动物金属硫蛋白的提取与分析技术研究进展[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2010, 40(6): 41-46
Meng F P, Xiao J, Zhao S S, et al. Research progress on the extraction and analysis of metallothioneins in marine animals [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(6): 41-46 (in Chinese)
- [7] 党蕊叶,齐凡,赵淑琳,等. 兔肝金属硫蛋白提取工艺研究[J]. 西北农业学报, 2012, 21(6): 22-25
Dang R Y, Qi F, Zhao S L, et al. Study on extraction technology of metallothionein from rabbit liver [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2012, 21(6): 22-25 (in Chinese)
- [8] 李砥. 植物金属硫蛋白提取液对镉中毒小鼠的损伤修复作用[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2009: 6
Li D. Orthogonal experimental analysis of the renovating effect of three categories of plant-metallothionein on cadmium poisoning mice [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2009: 6 (in Chinese)
- [9] Duarte-Gutiérrez J, Leyva-Carrillo L, Martínez-Téllez M A, et al. Cloning, expression, purification and biochemical characterization of recombinant metallothionein from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Protein Expression and Purification, 2020, 166: 105511
- [10] 甘俊英,秦建新,原海亮,等. 重组人金属硫蛋白-III α 短肽毒性效应的初步研究[J]. 生态毒理学报, 2020, 16(2): 227-234
Gan J Y, Qin J X, Yuan H L, et al. Preliminary study on toxic effects of recombinant human metallothionein III- α peptide [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 16(2): 227-234 (in Chinese)
- [11] Khantaphant S, Benjakul S, Ghomi M R. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(4): 1139-1148
- [12] 王月,韩梅玲,成丽娟,等. 用统计软件计算肾小球系膜细胞对顺铂的半数抑制浓度[J]. 预防医学论坛, 2016, 22(6): 407-408, 412
Wang Y, Han M L, Cheng L J, et al. Calculation of the IC₅₀ of the glomerular mesangial cells to cisplatin by statistical software [J]. Preventive Medicine Tribune, 2016, 22(6): 407-408, 412 (in Chinese)
- [13] Adejumo O A, Omobowale T O, Oyagbemi A A, et al. *In vitro* antioxidant, anti-inflammatory and antihypertensive activities of methanol leaf extract of *Peasea americana* [J]. The FASEB Journal, 2020, 34(S1): 1
- [14] Khantaphant S, Benjakul S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 151(4): 410-419
- [15] 姜君君,王莹,施洋,等. 维药唇香草乙醇提取物抗氧化活性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(9): 1138-1141
Jiang J J, Wang Y, Shi Y, et al. Study on the *Ziziphora clinopodioides* Lam ethanol extract antioxidant activity [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2017, 40(9): 1138-1141 (in Chinese)
- [16] 江洁,王东扬,孙艺. 羊肚菌菌丝体锌-金属硫蛋白体外抗氧化活性的研究[C]. 大连: 中国食品科学技术学会第十二届年会暨第八届中美食品业高层论坛, 2015:

- 419
- [17] 王欣卉, 王颖, 徐炳政, 等. 酵母源金属硫蛋白体外抗氧化能力测定[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(9): 917-923
- Wang X H, Wang Y, Xu B Z, et al. Determination of *in vitro* antioxidant capacity of metallothionein from yeast [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2017, 30(9): 917-923 (in Chinese)
- [18] Cavinato M, Jansen-Dürr P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin [J]. Experimental Gerontology, 2017, 94: 78-82
- [19] Biniek K, Levi K, Dauskardt R H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin [J]. PNAS, 2012, 109(42): 17111-17116
- [20] Olson E R, Melton T, Dong Z G, et al. Stabilization of quercetin paradoxically reduces its proapoptotic effect on UVB-irradiated human keratinocytes [J]. Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa), 2008, 1(5): 362-368
- [21] Moan J, Grigalavicius M, Baturaite Z, et al. The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer [J]. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 2015, 31(1): 26-35
- [22] Lyu M, Liu H J, Ye Y L, et al. Inhibition effect of thiol-type antioxidants on protein oxidative aggregation caused by free radicals [J]. Biophysical Chemistry, 2020, 260: 106367
- [23] 谢玉英. 谈活性氧与人类疾病[J]. 现代农业科技, 2009 (15): 285-286, 288 ◆