论 著

隐丹参酮等中药单体对SZ95细胞内脂质合成的影响

吕全兴， 张金玉

作者单位:265400 山东,招远市人民医院皮肤科

作者简介:吕全兴(1970-),男,硕士研究生,主治医师,研究方向:中药治疗痤疮的机理研究。E-mail lvqx0001@yahoo.com.cn。

[摘要] **目的** 观察隐丹参酮等中药单体对SZ95细胞中脂质合成的影响。**方法** 用尼罗河红荧光染色结合流式细胞术,以异维A酸为对照,观察隐丹参酮、丹参酮II-A、盐酸小檗碱、黄芩甙、苦参碱作用SZ95细胞48 h后,1×10^4个尼罗河红染色的SZ95细胞中平均每个细胞的荧光强度变化。**结果** 1.25×10^{-7}M丹参酮II-A使尼罗河红染色荧光强度下降最为明显(-34.3%,$P<0.05$),其次为1×10^{-4}M黄芩甙(-30.1%,$P<0.05$)、1×10^{-7}M异维A酸(-21.0%,$P<0.05$)、1.25×10^{-7}M隐丹参酮(-16.2%)、1×10^{-6}M盐酸小檗碱(-7.8%)也有抑制作用,但没有统计学差异。1×10^{-3}M苦参碱则显示了促进脂质合成的作用(26.9%)。**结论** 丹参酮II-A、黄芩甙及异维A酸可能具有直接抑制皮脂腺细胞中脂质合成的作用。

[关键词] 隐丹参酮; 丹参酮II-A; 皮脂腺细胞; 痤疮

[中图分类号] R 758.73 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2009)03-0247-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.03.012

Effects of cryptotanshinone and other traditional chinese medicines on the lipid synthesis of SZ95 sebocytes in vitro

LU Quan-xing, ZHANG Jin-yu. Department of Dermatology, Zhaoyuan People's Hospital, Zhaoyuan 265400, *Shandong*

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of Chinese medicines cryptotanshinone, tanshinone II-A, berberine, baicalin, matrine on the lipid synthesis of SZ95 sebocytes compared with isotretinoin. **Methods** Lipid contents in the SZ95 sebocytes were labeled with a fluorescence dye(Nile red) and analyzed using flow cytometry. **Results** Lipid synthesis was inhibited by 1.25×10^{-7}M tanshinone II-A(-34.2%), 1×10^{-4}M baicalin(-30.1%), 1×10^{-7}M isotretinoin(-21.1%), 1.25×10^{-7}M Cryptotanshinone(-16.2%) and 1×10^{-5}M Berberine(-7.8%) also decreased lipogenesis but no statistical significance was found. Matrine increased lipogenesis(26.913%). **Conclusion** Tanshinone II-A and baicalin may have a direct effect on lipid synthesis in sebocytes.

[**Key words**] Cryptotanshinone; Tanshinone II-A; Sebocyte; Acne

痤疮是毛囊、皮脂腺慢性炎症性疾病,痤疮的发病机理比较复杂,脂质的过量分泌、毛囊皮脂腺导管的角化异常、痤疮丙酸杆菌的大量增殖及炎症等四个因素或病理过程构成了痤疮发生的主要环节。其中在青春期雄性激素的作用下,皮脂腺大量分泌脂质是痤疮发生的前提条件之一[1]。中医治疗痤疮历史悠久,我们在查阅治疗痤疮的中药方剂和药物时,发现丹参、黄连、黄芩、苦参等出现的频率较高,而且临床或动物实验也发现它们中一些药物可能具有抑制皮脂分泌的作用[2~5]。结合近年来的研究资料,我们选择了它们中的主要单体成分,黄连中的盐酸小檗碱(黄连素),黄芩中的黄芩甙,苦参中的苦参碱以及丹参酮中的隐丹参酮和丹参酮II-A,以异维A酸作为对照,采用流式细胞术,观察它们对SZ95[6]细胞脂质合成量的影响,在细胞及分子水平上探讨中药治疗痤疮的可能机理。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、试剂及其他材料

1.1.1 主要仪器 CO_2培养箱(Espec公司)、电动移液器(Hirschamann公司PIPEIUS牌)、移液枪

万方数据

(Eppendorf 公司)、96 孔培养板(Orange 公司)、酸度计(上海精密仪器有限公司)、电子分析天平(上海恒平科学仪器有限公司)、倒置显微镜(Olympus)、离心机、振荡混合仪(江苏泰县医疗器械厂)、酶联免疫检测仪(Bio-Tec 公司)。

1.1.2 主要试剂　四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma 公司)、Sebomed 基础培养基(Biochrom 公司)、表皮生长因子(EGF, sigma 公司),胎牛血清(杭州四季青公司)、胰酶(Gibco 公司)、青霉素和链霉素(山东鲁抗医药有限公司),乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、二甲基亚砜(DMSO)为国产分析纯。

1.1.3 其他材料　(1)药物标准品:隐丹参酮、丹参酮 II-A、盐酸小檗碱、黄芩甙、苦参碱标准品均购自北京中国药品生物制品检定所,纯度在 90% 以上。(2)SZ95 细胞系:永生化的人皮脂腺细胞系(SZ95)由中国医学科学院中国协和医科大学皮肤病研究所蒋明军博士惠赠。(3)尼罗河红荧光染料:由 Kodak 公司提供。(4)96 孔培养皿:由 Orange 公司提供。(5)流式细胞仪:由 Becton Dickinson 公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养　完全培养基是在 Sebomed 基础培养基中,添加 10% 小牛血清、10 ng/ml 表皮生长因子(EGF)、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素。SZ95 细胞在 37℃,含 5% CO_2 的饱和湿度的孵箱中培养,每 2 天更换培养液一次。

1.2.2 尼罗河红贮存液的配制:在 1.5 ml eppendorf 管中称取 10 μg 尼罗河红,用 1 ml 甲醇将其完全溶解,使其贮存浓度为 10 μg/ml,4℃ 避光保存,2 周内使用。

1.2.3 PBS 的制备方法　称取 KCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 8.0g, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 2.161 g 依次溶解于 800 ml 三蒸水中,补足三蒸水至 1000 ml。用 NaOH 或 HCl 调酸碱度,pH 计检查使 pH 值为 7.2。高压灭菌, 4℃保存。

1.2.4 药物的配制　隐丹参酮、丹参酮 II-A 用 DMSO 溶解为 25mM 的贮存液;盐酸小檗碱用 DMSO 溶解为 100 mM 贮存液;苦参碱和黄芩甙直接用培养液配制为 10mM 的贮存液,过滤除菌,4℃保存,临用前用完全培养基稀释至所需浓度,2 周内使用。异维 A 酸用 DMSO 溶解,浓度为 0.1M,4℃贮存,2 周内有效,使用前用完全培养基稀释至所需浓度,并调节 DMSO 浓度在 2‰。由于异维 A 酸见光易分解,所以对其操作均在暗光下进行。本实验采用的药物浓度为:隐丹参酮和丹参酮 II-A :1.25×10^{-7} M;黄芩甙:1×10^{-4}M;盐酸小檗碱:1×10^{-6}M;苦参碱:1×10^{-3}M;异维 A 酸:1×10^{-7}M。以含 2‰ DMSO 不含药物的培养基作为阴性对照。

1.2.5 含 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化液的配制　称取胰蛋白酶 0.25 g, EDTA0.02 g 分别溶解在适量无钙镁的 PBS 中,磁力搅拌器充分搅拌,混合后再补足溶液至 100 ml,调 pH 值 8.0,过滤除菌,Ependoff 管分装,-20℃储存备用。

1.3 实验步骤

1.3.1 取对数生长期的 SZ95 细胞接种于 96 孔板中,细胞数 2×10^5/孔,每孔加培养基 2 ml,每种药物浓度设 3 个平行孔;含 2‰DMSO 不加药物的培养基作为空白对照,做好标记。

1.3.2 在 37 ℃、5% CO_2 培养 48 h 后,PBS 清洗两次,加入不同浓度的含有待检药物的培养基。

1.3.3 继续培养 48 h 后,PBS 洗 2 遍,加入含 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶 0.5 ml 消化 5 min(时间可适当延长,使细胞全部消化下来)。

1.3.4 加含 10%小牛血清的培养基 0.5 ml 终止消化,吸出含细胞的培养基至 1.5 ml eppendorf 管中。(1)800~1000 转离心 5 min,小心弃上清,加入 1 ml PBS,轻轻吹打清洗细胞。(2)重复 5 min,并弃上清。(3)加入 PBS 990μl,用移液枪枪头轻轻吹打细胞,制备成单细胞悬液(在 PBS 中)。(4)根据文献报道[7],每管中加入尼罗河红荧光贮存染液 10 μl,使终浓度为 100ng/ml,室温孵育 30 min,短暂涡旋,300 目尼龙滤膜过滤至流式检测专用试管中。

1.3.5 流式细胞仪上检测每个标本中的 10000 个细胞中每个细胞的平均荧光强度;波长为激发波长 485nm,发射波长 565nm。

1.4 统计学分析　SPSS 分析软件,结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验确定各组差异显著性。

2 结果

药物作用 48 h 和对照组相比:(1)1.25×10^{-7}M 丹参酮 II-A 使尼罗河红染色 SZ95 细胞中荧光强度下降(34.3%, $P<0.05$),其次是 1×10^{-4}M 黄芩甙(-30.1%, $P<0.05$),1×10^{-7}M 异维 A 酸(-21.0%, $P<0.05$);(2) 1.25×10^{-7}M 隐丹参酮 -16.2%和 1×10^{-6}M 盐酸小檗碱(-7.9%)也较对照组下降,但无统计学意义($P>0.05$);(3)1×10^{-3}M 苦参碱则显示了促进脂质合成的作用(26.9%)。见表 1,图 1、图 2-1~6 和图 3。

万方数据

表1 隐丹参酮等中药单体对SZ95细胞脂质合成的影响($n=3,\bar{x}\pm s$,荧光单位)

组别	平均荧光单位	抑制率(%)	t	P
隐丹参酮 1.25×10^{-7}M组	527.8±33.1	−16.2	−1.822	0.210
丹参酮Ⅱ-A 1.25×10^{-7}M组	414.1±71.5	−34.2	−5.348	0.033*
黄芩甙 1×10^{-4}M	478.3±91.6	−30.1	−7.206	0.019△
小檗碱 1×10^{-6}M	628.0±41.9	−7.9	−0.791	0.512
苦参碱 1×10^{-3}M	853.4±65.0	26.9	2.084	0.172
异维A酸 1×10^{-7}M	538.3±72.8	−21.0	−6.181	0.025
对照组	681.9±79.1			

注:实验组与阴性对照比较:*$P<0.05$,△$P<0.01$

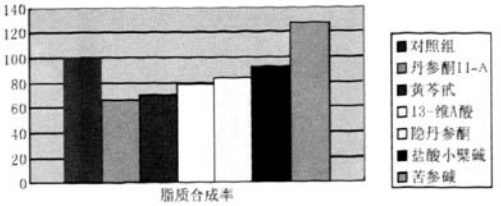

图1 药物对SZ95细胞内脂质合成的影响

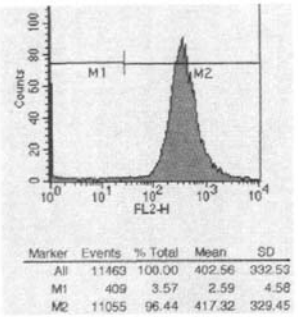

图2-1 1.25×10^{-7}M丹参酮Ⅱ-A

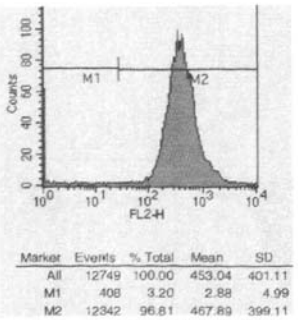

图2-2 1×10^{-4}M黄芩甙

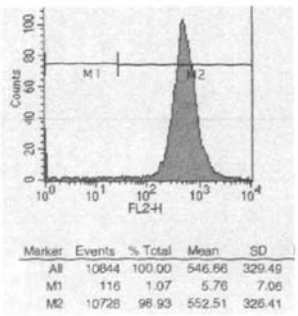

图2-3 1×10^{-7}M异维A酸

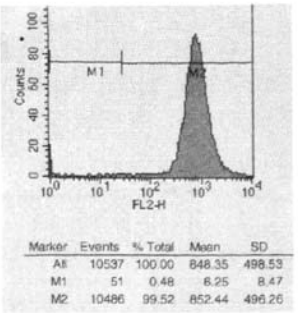

图2-4 1×10^{-3}M苦参碱

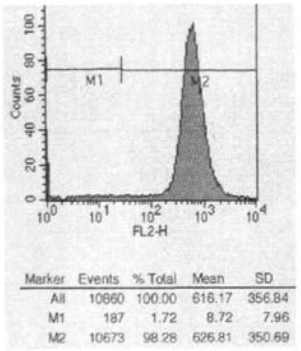

图2-5 1×10^{-6}M盐酸小檗碱

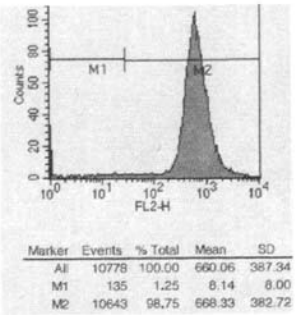

图2-6 阴性对照组

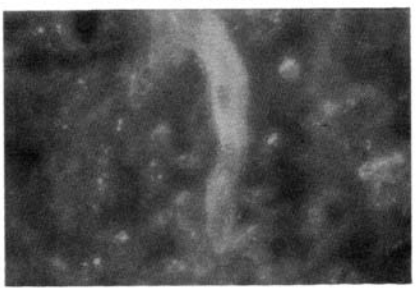

图3 尼罗河红染色的体外培养的人皮脂腺细胞

3 讨论

3.1 对活性细胞内脂质进行定性定量研究有好几种方法,较早采用的是^{3}H或C^{14}放免标记,目前已较少使用。多种荧光染料如尼罗河红、苯芘、罗丹明和非荧光染料如油红等也可对脂质进行特异性标记。Greenspan等[8]发现,尼罗河红在染色特异性和染色

万方数据

强度方面明显优于其他几种染料，是一种非常好的活细胞脂质荧光探针，可以通过荧光显微镜或流式细胞仪来进行定性和定量分析。尼罗河红染色是目前评价皮脂腺细胞中脂质含量的一种常规方法[6]。本次研究我们采用尼罗河红染色结合流式细胞仪方法检测细胞内脂质的含量具有较好的效果。

3.2 异维A酸是目前发现对皮脂腺脂质分泌抑制最强的药物[9]。有报道 0.1 mg/(kg·d)口服 4 周后，皮脂抑制率达 75%；0.3～0.4 mg/(kg·d)4 周后抑制率达 90%[10]。其对脂质分泌的机制研究是皮肤科的一个热点，目前仍在探索之中。体外研究发现该药能直接抑制皮脂腺细胞的增殖、脂质合成及分化[11]。Zouboulis 等[12]用^{3}H 标记脂质研究了几种维甲酸对体外培养的原代人皮脂腺细胞脂质活性的影响，发现 10^{-7}M 异维A酸，对脂质合成的抑制率达 48.2%，高于我们的 21.2%，其原因可能与我们采用的细胞培养模型及检测方法不同有关。我们的研究发现异维A酸对 SZ95 细胞的抑制率低于丹参酮 II－A 及黄芩甙，但没有统计学上的差异。

3.3 隐丹参酮和丹参酮 II－A 在临床药理作用方面并不完全相同，体外试验证明，隐丹参酮对金葡菌作用较强，而丹参酮 II－A 则对杆菌的作用较强[13～14]。有研究发现，口服隐丹参酮对金葡菌感染的小鼠无治疗作用，可能是隐丹参酮在体内经过转化为丹参酮 II－A 后抗金葡菌的作用下降[5]。另有研究表明，丹参酮 II－A 具有较强的清除自由基及阻断脂质过氧化反应的作用[15]；而且在一些降脂药物中，发现丹参酮 II－A 是主要成分[16～17]，而隐丹参酮则未见到类似的报道。我们的研究发现，丹参酮 II－A 对 SZ95 细胞内脂质合成的抑制(－34.268%)高于隐丹参酮(－16.219%)。由于丹参酮总酮中以隐丹参酮为主要成分，是否在体内转化为丹参酮 II－A 使隐丹参酮获得更强的抑制脂质合成活性的能力值得深入研究。

3.4 日本一学者发现黄芩中的一种单体成分汉黄芩素，在 10^{-4}M 浓度时能明显抑制鼠耳模型的皮脂腺脂质分泌达 54%，而盐酸小檗碱抑制率则达 63%[18]，认为中药黄芩及盐酸小檗碱可能有抑制脂质分泌的作用，但机理不清。本研究中我们发现黄芩甙有较强的抑制皮脂腺细胞脂质合成作用，而盐酸小檗碱却没有，这说明两者的抑制脂质分泌的途径可能不同。由于文献中尚未发现有关盐酸小檗碱和黄芩甙抑制皮脂分泌的临床报道，因此对这两种药物有待临床方面的研究证实。

参考文献

1 赵　辨.临床皮肤病学[M],第3版.南京:江苏科学技术出版社,2001:935－939.

2 魏　辉.100首痤疮专方的用药分析[J].中国美容医学,2002,11(1):19－20.

3 杨增慧,刘敏言.中医治疗痤疮的临床进展[J].江苏中医,1998,19(7):45－46.

4 黄映君,中医药治疗痤疮的临床研究进展[J].河北中医,2000,22(8):636－639.

5 顾克显.丹参酮的药理及其在皮肤科的应用[J].国外医学皮肤性病分册,1994,16(3):11－13.

6 Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, et al. Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95) [J]. J Invest Dermatol,1999, 113(6): 1011－1020.

7 Zouboulis CC, Xia L, Akamatsu H. The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne[J]. Dermatology, 1998, 196(1): 21－31.

8 Greenspan P, Fowler D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red[J]. Lipid, 1985, 26: 781－789.

9 Orfanos CE, Zouboulis CC, Almond－Roesler B, et al. Current use and future potential role of retinoids in dermatology[J]. Drugs, 1997, 53(3):359－387.

10 Strass JS. Sebaceous gland, acne and related disorders an epiloque [J]. Dermatology,1998, 196:182－184.

11 Orfonas CE, Zouboulis CC. Oral retinoids in the treatment of seborrhea and acne[J] .Dermatology, 1998, 196:14－147.

12 Zouboulis CC, Korge B, Akamatsu H, et al. Effects of isotretinoin, and acitretin on the proliferation, lipid synthesis and keratin expression of cultured human sebocytes in vitro[J] .J Invest Dermatol,1991, 96:792－797.

13 薛　明,崔　颖,汪汉卿,等.隐丹参酮及其代谢产物在猪体内的药代动力学研究[J].药学学报,1999,34(2): 81－84.

14 高玉桂,宋玉梅,杨友义.丹参酮的药理[J].药学学报,1979,14(2):75.

15 曹恩华,刘晓麒,李景福,等.天然抗氧化剂丹参酮 II－A 对肝细胞脂质过氧化物与DNA相互作用的影响[J].生物物理学报,1996, 12(2):339－345.

16 封士兰,陈立仁,赵富虎.高效液相色谱法测定大黄降脂粉中大黄酸、大黄素及丹参酮 II－A 的含量[J].药物分析学杂志,2000,20(6):368－370.

17 郝旭亮,刘振权,王瑞明.降脂靖血胶囊的质量标准[J].陕西中医学院学报,2001, 2(1):54－56.

18 Seki T, Morohashi M. Effect of some alkaloids, flavonoids and triterpenoids, contents of Japanese-Chinese traditional herbal medicines, on the lipogenesis of sebaceous glands[J]. Skin Pharmacol,1993,6(1):56－60.

[收稿日期　2008－12－30][本文编辑　宋卓孙　刘京虹]

万方数据