

低氘水对皮肤成纤维细胞及黑色素瘤细胞的影响

张亚茹¹ 吴 晟² 姜银凤² 丛峰松^{1*}

¹ 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; ² 上海家化联合股份有限公司, 上海市 200082

摘要: 研究不同浓度的低氘水对正常皮肤成纤维细胞 CCD-4095sk 增殖和乳酸代谢的影响, 及对 B16 黑色素瘤细胞酪氨酸酶活性和黑色素生成量的影响。同时, 观察低氘水对紫外损伤细胞修复的作用。用 MTT 法检测 25、50 和 105 ppm 三种不同浓度的低氘水对 CCD-4095sk 细胞增殖的影响, 并测定培养液中的乳酸含量; 取对数生长期小鼠 B16 黑色素瘤细胞, 分别加入不同浓度的低氘水作用 72 h 后, 测定黑色素含量和酪氨酸酶活性; 体外氧化多巴反应方法测定酪氨酸酶活性; 用不同浓度的低氘水作用经紫外辐射的皮肤成纤维细胞, 测定细胞增殖率。在细胞培养初期, 50 ppm 和 105 ppm 低氘水可促进 CCD-4095sk 细胞生长, 同时抑制乳酸代谢。体外生化实验表明, 三种不同浓度的低氘水均能不同程度地抑制酪氨酸酶活性。细胞实验表明, 作用 72 h 后, 50 ppm 和 105 ppm 低氘水能显著抑制酪氨酸酶活性, 减少 B16 黑色素瘤细胞黑色素的生成量, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。紫外损伤实验表明, 50 ppm 低氘水能减轻紫外辐射对细胞增殖的抑制作用, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。低氘水在化妆品应用方面具有潜在的价值。

关键词: 低氘水, 皮肤成纤维细胞, 黑色素瘤细胞 B16, 酪氨酸酶活性, 紫外损伤

中图分类号: R969.4

文献标识码: A

Effect of Deuterium-depleted Water on Skin Fibroblast and Melanoma Cells

ZHANG Ya-ru¹, WU Sheng², JIANG Yin-feng², CONG Feng-song^{1*}

¹ College of Life Sciences and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

² Shanghai Jahwa United Company Ltd., Shanghai 200082, China

Abstract: To study the effect of different concentrations deuterium-depleted water (DDW)¹ on normal skin fibroblast proliferation and LD metabolism and the UV damage repair, as well as on tyrosinase activity and melanin of melanoma cell. Using MTT method, measure the effect of 25ppm, 50ppm, 105 ppm DDW on the CCD-4095sk cell proliferation and lactate metabolism, on the tyrosinase activity in vivo and in vitro and the formation of melanin. The effects of DDW on normal skin fibroblast cells which was injured by UV were also detected. At early step of cell culture, 50 ppm and 105 ppm DDW increased CCD-4095sk cell proliferation, and inhibited the cell content of lactic acid metabolism. In vitro, three different concentrations DDW inhibited tyrosinase activity; In 72 h, 50 ppm and 105 ppm DDW can inhibit tyrosinase activity in B16 cells. And the inhibition ratio of DDW on the formation of melanin was significant, $P < 0.05$. For normal skin fibroblast injured by UV, 50 ppm DDW played an important role in the restoration, which relieves growth inhibitor caused by UV injured, $P < 0.05$. The DDW deserved going further study in the direction of cosmetic value.

Key words: Deuterium-depleted water, Skin fibroblasts, melanoma cells B16, tyrosinase activity, UV injured

低氘水的生物学效应已经有很多文献报道。最早 Somlyai 等^[1]报道, 低氘水可以抑制小鼠成纤维 L₉₂₉ 细胞的生长速率并且引起移植瘤小鼠肿瘤组织消退。俄罗斯研究人员最近^[2-4]发现, 如果把普通水中氘的体积分数减少 65%, 就会表现出一定的抗肿瘤特性, 抑制瘤小鼠实验结果也显示, 低氘水能抑制肿瘤生长, 延长小鼠存活期。丛峰松^[5]等报道, 低

氘水可以抑制肺癌移植瘤小鼠瘤体的生长。本文拟通过实验研究低氘水对正常皮肤成纤维细胞增殖、乳酸代谢以及对黑色素瘤细胞酪氨酸酶活性和黑色素生成等方面的影响, 并研究低氘水对紫外辐射后受损细胞的修复作用, 初步探讨低氘水在化妆品方面的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

CCD-4095sk 细胞和 B16 黑色素瘤细胞购自中

收稿日期: 2011-03-01 接受日期: 2011-10-07

* 通讯作者 E-mail: fscong@sjtu.edu.cn

科院细胞库。低氘水(DDW)由上海池天超轻水生物工程有限公司提供,氘含量分别为25、50和105 ppm;Hyclone血清购自赛默飞世尔生物制品有限公司;MTT试剂盒购自南京凯基生物有限公司;LD检测试剂盒购自南京建成;MEM、RPM1640培养基粉剂购自GIBCO公司。酪氨酸酶(25KU)购自Worthington公司,L-Dopa购自SIGMA公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人正常皮肤细胞株 CCD-4095sk 培养在含10%进口胎牛血清的 MEM 培养基中,在37℃、5% CO₂条件下培养。B16 黑色素瘤细胞培养在含10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,在37℃、5% CO₂条件下培养。

1.2.2 MTT 法测定 CCD-4095sk 细胞增殖

CCD-4095sk 细胞(1×10^4 个细胞/孔)接种于含100 μL 培养液的96孔培养板中,对照组用正常 MEM 培养基培养,实验组分别用25、50和105 ppm的低氘水配制的 MEM 培养基培养,处理8、10、12、24和48 h后,加入50 μL MTT 溶液继续培养4 h,吸净培养液后,每孔加150 μL DMSO,振荡10 min,在490 nm 波长条件下,测定各孔的吸光度 OD 值。每组设5个复孔。

1.2.3 LD 试剂盒测定 CCD-4095sk 细胞乳酸代谢

收集对数期 CCD-4095sk 细胞,悬浮,分别取等量细胞悬液至于用25、50和105 ppm的低氘水配置的 MEM 培养基中,在8、10、24和48 h 检测培养液中细胞代谢的乳酸含量。每组设三个平行对照。

乳酸(LD)含量 = (测定管吸光度值 - 空白管吸光度值) ÷ (标准管吸光度值 - 空白管吸光度值) × 标准浓度(3 mmol/L) × 样本稀释倍数

1.2.4 体外酪氨酸酶活性测定^[6,7]

根据酪氨酸酶活性测定参考文献,在3 ml 反应体系中,含有0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8),以0.5 mmol/L L-DOPA 作为测活底物,酪氨酸酶的终浓度为15.29 μg/mL。用分光光度计检测475 nm 波长处的光密度值随着反应时间的变化,从直线部分的斜率换算出酶活力,消光系数ε为3700(mol/L · cm)⁻¹。

1.2.5 细胞酪氨酸酶活性测定^[8-10]

分别用25、50和105 ppm的低氘水配置的1640培养基培养B16细胞,72 h后,弃上清。用pH 7.4的PBS洗涤细胞2次。每孔加10 ml/L的Tri-

onX-100 溶液90 μL,震荡5 min 溶解细胞。经37℃温浴后,每孔加1% L-Dopa 10 μL,继续孵育30 min,于490 nm 波长处检测吸光度。每组设五个复孔。

酪氨酸酶活性抑制率 = (1 - 各浓度平均吸光度值 ÷ 对照组平均吸光度值) × 100%

1.2.6 黑色素含量测定^[10,11]

采用改良的 Hideya Ando 方法,用不同浓度的低氘水培养 B16 细胞72 h后,调整细胞浓度至 10^5 个/mL。吸取细胞悬液分别置于离心管中,离心弃上清。用200 μL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀后,加入1 mL 1:1 乙醇乙醚液,在室温下放置30 min。3000 rpm 离心5 min 后弃上清。加入1 mL 含10% DM-SO 的1 mol/L NaOH 溶液,80℃水浴45 min 后于470 nm 波长处测定吸光度值。每组设三个平行对照。

黑色素合成抑制率 = [1 - (药物孔吸光度值 ÷ 药物孔细胞密度) ÷ (对照孔吸光度值 ÷ 对照孔细胞密度)] × 100%

1.2.7 紫外损伤实验

收集对数期 CCD-4095sk 细胞,调整细胞浓度为 10^5 个/mL。 1×10^4 个细胞/孔接种于含100 μL 培养液的96孔培养板中,分别用25、50和105 ppm的低氘水配置的 MEM 培养基及正常 MEM 培养基培养4 h后,进行紫外照射。照射条件:UVC 灯管功率15 W,波长254 nm,垂直照射距离20 cm,照射时间2 h。然后继续培养8 h,用MTT检测细胞的生长增殖情况。以不照射的细胞作为阳性对照组。每组设6个复孔。

1.2.8 统计学方法

数据均以 means ± SD 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件包进行数据分析,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 低氘水对正常皮肤成纤维细胞 CCD-4095sk 的影响

用不同浓度的低氘水培养 CCD-4095sk 细胞,在培养的初期,低氘水表现为促进细胞生长。在8 h 时,25 ppm 和50 ppm 的低氘水作用的细胞增殖率分别为102.27%和104.09%,与对照组相比较,差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 如图1A、1B所示。在10 h 时,25 ppm 的低氘水作用的细胞增殖率为104.75%,与对照组相比较,差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。当培养至12 h 以后,用低氘水培养的细胞逐

渐开始出现生长抑制现象。当继续培养至 48 h 时, 低氘水又开始促进细胞生长。其中, 105 ppm 的低氘水作用最为明显, 增殖率为 103.66%, 与对照组

相比较, 差异具有统计学意义 $P < 0.05$, 如图 1C 所示。

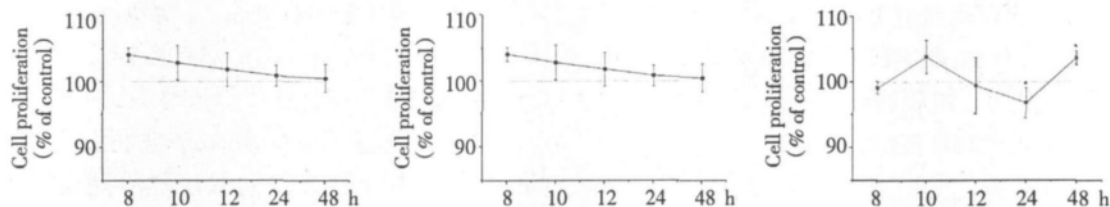


图 1 不同浓度的低氘水对正常皮肤成纤维 CCD-1095sk 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of DDW on the proliferation of CCD-1095sk cells.

A: 25 ppm DDW; B: 50 ppm DDW; C: 105 ppm DDW. *: $P < 0.05$, vs control

2.2 低氘水对细胞 CCD-1095sk 细胞乳酸生成的影响

用不同浓度的低氘水培养 CCD-1095sk 细胞, 取上清培养液检测细胞代谢的乳酸(LD)的含量。结果显示, 培养至 10 h 时, 用 50 ppm 和 105 ppm 的低氘水培养的细胞液中乳酸产量明显低于正常对照组, 乳酸产率分别为正常组的 68.47% 和 85.87%, 差异具有统计学意义 $P < 0.05$ 。培养至 48 h 时, 用 25 ppm 和 50 ppm 的低氘水作用的 CCD-1095sk 细胞液中, 乳酸产率分别为正常组的 81.22% 和 82.64%, 差异具有统计学意义 $P < 0.05$, 如图 2 所示。实际乳酸的含量见表 1。

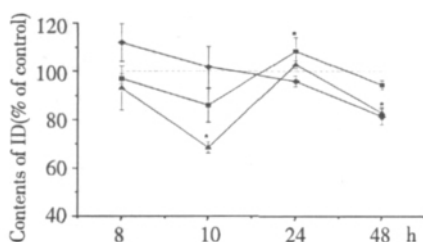


图 2 不同浓度的低氘水对 CCD-1095sk 细胞 LD 生成的影响

Fig. 2 DDW affects contents of LD of CCD-1095sk cells.

◆: 25 ppm DDW group; ▲: 50 ppm DDW group; ■: 105 ppm DDW group; *: $P < 0.05$, vs control

表 1 CCD-1095sk 细胞 LD 含量 (mmol/L)

Table 1 LD content of CCD-1095sk cell (mmol/L)

	25 ppm group	50 ppm group	105 ppm group	150 ppm group
8 h	0.801 ± 0.0061	0.666 ± 0.0043	0.693 ± 0.0001	0.715 ± 0.0018
10 h	0.962 ± 0.0066	0.647 ± 0.0004*	0.812 ± 0.0252	0.945 ± 0.0229
24 h	1.319 ± 0.0008	1.415 ± 0.0005	1.493 ± 0.0058*	1.376 ± 0.0013
48 h	2.051 ± 0.0067*	2.087 ± 0.0041*	2.382 ± 0.0022	2.525 ± 0.0347

* $p < 0.05$, vs control (150 ppm group)

2.3 DDW 对酪氨酸酶活性的影响

在体外生化反应体系中, 25 ppm 与 105 ppm 的低氘水对酪氨酸酶活力抑制率为 3.67% 50 ppm 的低氘水对酪氨酸酶活力抑制率为 11.89%, 如图 3 所示。

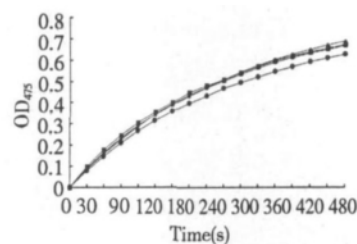


图 3 不同浓度的低氘水对酪氨酸酶活性的影响

Fig. 3 Effects of DDW on tyrosinase activity.

◆: 25 ppm DDW group; ●: 50 ppm DDW group; ▲: 105 ppm DDW group; ■: control group

2.4 DDW 对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

用不同浓度的低氘水作用 B16 黑色素瘤细胞 72 h 后, 以 L-DOPA 作为测活底物, 检测细胞中酪氨酸酶的活性。50 ppm 和 105 ppm 的低氘水对酪氨酸酶的抑制率分别达到 44.32% 和 24.51%, 差异具有统计学意义 $P < 0.05$, 如图 4。

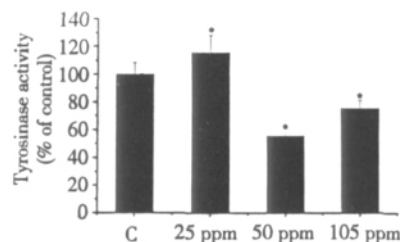


图 4 不同浓度的低氘水对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

Fig. 4 Effects of DDW on tyrosinase activity in B16 cells.

*: $P < 0.05$, vs control.

2.5 低氘水对 B16 细胞黑色素生成的影响

用不同浓度的低氘水作用 B16 黑色素瘤细胞 72 h 后, 50 ppm 的低氘水对 B16 细胞的黑色素生成的抑制率为 39.59%, 25 ppm 和 105 ppm 低氘水对 B16 细胞的黑色素生成的抑制率分别为 26.45% 和 24.61%, 与对照组相比较, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$, 如图 5 所示。

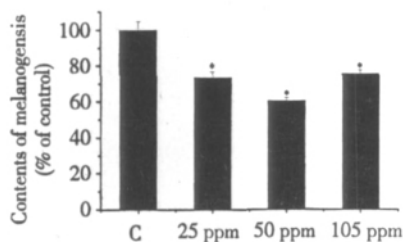


图5 不同浓度的低氘水对 B16 细胞黑色素生成的影响

Fig. 5 Effects of DDW on melanogenesis.

* : $P < 0.05$

2.6 低氘水对受到紫外损伤细胞的修复作用

与阳性对照组相比较, 经紫外照射的细胞受到损伤, 细胞增殖降低了 30.43%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明紫外损伤的模型是成功的 (阳性对照组细胞不经过紫外照射)。用不同浓度的低氘水作用经紫外照射的 CCD-1095sk 细胞, 结果显示, 用 50 ppm 的低氘水培养的细胞增殖率为 105.37%, 与对照组相比较, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$, 如图 6 所示。

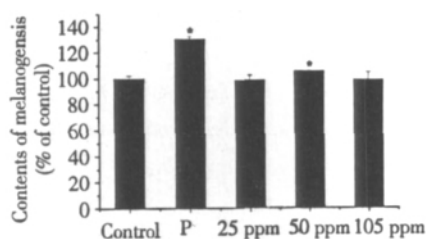


图6 低氘水对紫外损伤细胞增殖的影响

Fig. 6 Effects of DDW on cell proliferation after irradiation of UVC

C: control group; P: positive group (no UV injured). * : $P < 0.05$, vs control group.

3 结论

现代科学技术的飞速发展和广泛应用给化妆品行业带来全新的发展机遇, 化妆品已从洁肤、润肤为目的的基础护肤品向延缓衰老、美化肤色为目的的功效性化妆品方向发展^[12]。人们对化妆品的关注

已经不再是单纯的美丽动人, 而是转向其安全性。普通水中, 氕和氘的比率 (D/H) 大约是 1:6600, 即水中氘的体积分数为 0.015%^[13]。我们把氘体积分数低于 0.015% 的水称为低氘水 (deuterium-depleted water, DDW)。氕和氘由于质量不同导致氢的这两种稳定同位素之间物理和化学性质的不同^[14, 15]。

皮肤的弹性、光滑等外观一定程度上由构成皮肤不同组分的细胞的增殖和分裂所决定^[16]。本次实验结果表明, 在细胞培养的初期, 不同浓度的低氘水均表现出促进细胞增殖活力, 同时细胞中乳酸的产量减少。

皮肤色调的主要因素是皮肤内的黑色素, 肤色的深浅主要决定于黑色素细胞合成黑色素的能力^[16]。酪氨酸酶 (tyrosinase) 俗称多酚氧化酶, 普遍存在于人和动植物体内, 是黑色素生物合成过程中必不可少的关键酶。它可将 L-多巴氧化成多巴醌, 多巴醌不稳定, 可以经一系列的非酶促反应后, 形成由 5,6-二羟吲哚和 5,6-二羟吲哚-2-羧酸单元构成的异聚体-黑色素^[17]。如果该酶活力过高, 可形成黑色素瘤, 因此引起了人们对酪氨酸酶的关注。体外生化实验表明, 三种不同浓度的低氘水能不同程度地抑制酪氨酸酶活性。细胞实验证实, 50 ppm 和 105 ppm 的低氘水能显著抑制 B16 细胞的酪氨酸酶活性, 降低细胞黑色素生成量, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

随着臭氧层破坏的加重, 到达地球表面的紫外线日益增多。紫外线辐射 (UVR) 会导致皮肤细胞的活性氧 (ROS) 增加, 引起 DNA 和角膜损伤, 促进皮肤光老化和癌变以及白内障、免疫抑制等疾病的发生^[18-20]。Bild 等^[21]人用 30 ppm 的低氘水喂养小鼠 15 天, 然后用 8.5 Gray 的半致死量射线进行照射。对照组小鼠用普通水喂养, 用同样剂量的射线照射。结果显示, 实验组的小鼠存活率为 61%, 而对照组小鼠的存活率仅有 25%。我们实验也证实: 50 ppm 的低氘水能促进受到紫外损伤的 CCD-1095sk 成纤维细胞的增殖生长, 与正常对照组比较, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。以上结果提示, 低氘水对细胞 DNA 损伤具有一定修复作用, 但其具体的分子机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Somlyai G, Jancsó G, Jákli G *et al.* Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. *FEBS*,

- 1993 317:1-4.
- 2 Siniak IuE ,Turusov VS ,Grigorev AI *et al.* Consideration of the deuterium-free water supply to an expedition to Mars. *Aviakosm Ekolog Med* 2003 37(6) : 60-63.
- 3 Turusov VS ,siniak IuE ,Grigor'ev AI *et al.* Low-deuterium water effect on transplantable tumors. *Vopr Onkol* 2005 51: 99-102.
- 4 Tyrtsov VS ,Siniak IuE ,Antoshina EE *et al.* The effect of preliminary administration of water with reduced deuterium content on the growth of transplantable tumors in mice. *Vopr Onkol* 2006 52: 59-62.
- 5 Cong FS ,Zhang YR ,Wang JY *et al.* Inhibitory effect of deuterium-depleted water on proliferation of lung carcinoma cells and the possible mechanism. *Chin J Cancer Biotherapy* , 2009 ,16 484-489.
- 6 Qiu L ,Chen Qx ,Wang Q *et al.* Irreversibly inhibitory kinetics of 3,5-dihydroxyphenyl decanoate on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Bioorganic& Medicinal Chemistry* , 2005 ,13: 6206-6211.
- 7 Zhuang JX ,Qiu L ,Zhong X *et al.* Inhibitory Effect of Ginkgolic Acids GA1 on Mushroom Tyrosinase and B-16 Cell. *J Xiamen Univ Nat Sci* 2009 48: 103-106.
- 8 Ernest V ,Cecil K ,Heino H *et al.* Inhibitors of mammalian Melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharm* , 1999 57: 633.
- 9 Nakajima M ,Shinoda I ,Fukuwatari Y *et al.* Arbutin increases the pigmentation of cultured melanocytes through mechanism other than the induction of tyrosinase activity. *Pigment Cell Res* ,1998 ,11: 12.
- 10 Ma JB ,Feng SF ,Li F *et al.* Effects of Glabridin on B16 Cell Metabolism. *Fudan Univ J Med Sci* 2003 , 30: 353-355.
- 11 Hidey A ,Akira I ,Yutaka M *et al.* Correlation between the number of melanosomes ,tyrosinase mRNA levels and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cell in response to various melanogenesis regulatory agents. *J Cellular Physiol* , 1995 ,163: 608.
- 12 Yan SX(阎世翔) . 化妆品科学. Beijing: Science Academic Press. 1995
- 13 Yurtsever Y and Gat JR. Stable Isotope Hydrology (JR Gat and R Gonfiantini ,Eds.) ,International Atomic Energy Agency ,Vienna ,1981 ,103-142.
- 14 Collins CJA and Bowman NS (Eds) : Isotope Effects in Chemical Reactions. Van Nostrand Reinhold ,New York , 1971.
- 15 Winberg KB. The deuterium isotope effect. *Chem Rev* ,1955 , 55: 713-43.
- 16 Wang ZM ,Li L ,Guo SY. Application of bioactive polysaccharides in cosmetics. *China Surfactant Detergent & Cosmetics* , 2004 245-248.
- 17 Sánchez-Ferrer A ,Rodríguez-López JN ,García-Cánovas F *et al.* Tyrosinase: a comprehensive review of it ' s mechanism. *BBA-protein and Molecular Enzymology* ,1995. 1247: 1-11.
- 18 Kim TY, Kripke ML ,Ulrich SE. Immunosuppression by factors released from UV-irradiated epidermal cells: selective effects on the generation of contact and delayed hypersensitivity after exposure to UVA or UVB radiation. *J Invest Dermatol* ,1990 94: 26-32.
- 19 Moan J ,Peak M J. Effects of UV radiation of cells. *J Photochem Photobiol B* ,1989 4: 21-34.
- 20 Shimmura S ,Suematsu M ,Shimoyama M *et al.* Subthreshold UV radiation-induced peroxide formation in cultured corneal epithelial cells: the protective effects of lactoferrin. *Exp Eye Res* ,1996 63: 519-526.
- 21 Bild W ,Stefanescu I ,Haulica I *et al.* Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water. *Romanian J Physiol* ,1999 36: 205-218.

(上接第 56 页)

- 9 Pan J ,Kai G ,Yuan C *et al.* Separation and determination of the structural isomers of m adecassoside by HPLC using β -cyclodextrin as mobile phase additive. *Chromatographia* , 2007 66: 121-123.
- 10 Shao Y(邵燕) ,Chen YY(陈云艳) ,Huang WW(黄文武) , *et al.* Quantity on Extract of Centella Triterpenes and Its Preparation. I. Determination of Asiaticoside and Madecassoside in Centella Triterpenes Cream by HPLC(积雪草总苷及其制剂的含量研究. I. 积雪草霜软膏中积雪草苷和羟基积雪草苷的 HPLC 法测定) . *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志) 2010 41: 205.