

不同防晒标准品对紫外线致大鼠皮肤光损伤的防护作用

徐颖愉, 黄晓辉, 江 漪, 李 敏, 庞增雄, 李光先, 陈秀娟, 陈梓灵, 孙 侠
(广东质量监督检测研究院, 广州 511447)

[摘要] 目的 研究不同防晒标准品对紫外线致大鼠皮肤光损伤的防护作用, 为防晒化妆品防晒功效评价提供背景数据。方法 采用长波紫外线(UVA, 320 ~ 400 nm, $4.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) + 中波紫外线(UVB, 280 ~ 320 nm, $0.036 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)辐射的方法建立皮肤光毒性损伤大鼠模型, 每周照射2次, 连续4周, 累计辐射时间440 min, 各防晒标准品组(S1、S2、P2、P3、P7)每次照射前30 min 涂抹防晒标准品。实验结束后, 对皮肤进行组织病理学观察, 并采用免疫组织化学方法检测皮肤黑色素瘤特异性标记(HMB45)的表达情况。结果 S2组在表皮增厚、皮脂腺增生、皮肤损伤评分和黑色素瘤特异性标记(HMB45)表达4项指标均较模型组显著减轻($P < 0.05$); P3组和P2组在表皮增厚、皮肤损伤评分和HMB45表达3项指标均较模型组显著减轻; S1组[对UVA的防御能力(PFA)4.5]在表皮增厚和皮肤损伤评分2项指标均较模型组显著减轻; P7组仅在表皮增厚1项指标较模型组显著减轻。总体来说标准品的防护效果符合PFA和防晒指数(SPF)值的大小。结论 防晒化妆品对紫外线致皮肤光损伤的防护效果与PFA和SPF值有关, 本研究方法可用于防晒化妆品防晒功效评价。

[关键词] 长波紫外线(UVA); 中波紫外线(UVB); 皮肤光毒性; 防晒标准品

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)01-0033-06

阳光中的紫外线(Ultraviolet), 主要是长波紫外线(Ultraviolet A, UVA)和中波紫外线(Ultraviolet B, UVB)可以对皮肤形成急、慢性损伤, 从红斑的形成、晒黑、胶原蛋白和弹性蛋白等大分子的合成减少, 导致癌组织DNA突变等^[1]。因此, 皮肤光损伤除了皮肤红斑、肿胀、松弛、色素沉着等各种表面损伤, 还表现为胶原蛋白降解、弹性组织变性、棘层变厚等深层损伤^[2]。

防晒化妆品可以减轻紫外线引起的皮肤损伤, 为评价其防晒功效, 国家食品药品监督管理总局发布的《化妆品安全技术规范》(2015版)推荐使用人体测试法^[3], 其中UVB多用SPF值人体测试法, 即通过紫外线照射人体皮肤后产生的红斑效应来计算防晒指数(SPF)值; UVA最为广泛的评价方法是持续性色素黑化法(PPD法), 即通过紫外线照射人体皮肤后产生的黑化效应来计算对UVA的防御能力(protection factor of UVA, PFA)值。但人体测试法只能反应防晒化妆品对紫外线引起的表皮损伤的防护作用, 却不能检测对皮肤深层光毒性损伤的防护作用。采用动物实验的方法可以有效评价深层皮肤的损伤作用, 但目前采用动物实验方法评价防晒化妆品防晒功效的研究较少。

[收稿日期] 2019-06-19

[基金项目] 广东省质量技术监督局科技项目(2017CZ05)

[作者简介] 徐颖愉(1994-), 女, 本科, 助理工程师。研究方向: 实验动物与比较医学。

E-mail: 550541976@qq.com

[通信作者] 孙 侠(1979-), 女, 硕士, 高级工程师。研究方向: 实验动物毒性病理与比较医学。

E-mail: 593533301@qq.com

本研究参考孙侠等^[4]UVA+UVB紫外线辐射的方法,建立紫外线致皮肤光毒性损伤实验动物模型,结合毒性病理学评价方法,分析比较表皮厚度、皮脂腺横截面积、皮肤损伤评分和表皮黑色素颗粒黑色素瘤特异性标记HMB45表达4个指标,以(SPF)和(PFA)防晒标准品为研究对象,研究不同防晒标准品对紫外线诱导的大鼠皮肤光毒性损伤的防护,为全面评价防晒化妆品防晒功效提供毒理学评价方法和背景数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠,28 只,体质量 180~220 g,由广东省医学实验动物中心提供[SCXK(粤)2013-0002]。动物饲养于广州质量监督检测研究院毒理实验室[SYXK(粤)2014-0137]。动物实验方法经本单位动物福利和伦理委员会审核批准,所有操作均符合 3R 原则。

1.2 主要试剂

S1 标准品(S1 Reference Standard, PFA 值 4.5,批号: 1003G)、S2 标准品(S2 Reference Sunscreen, PFA 值 12,批号: 3102F)、P7 标准品(P7 Low SPF Reference Standard, SPF 值 4.5,批号: 1151I)、P2 标准品(FDA SPF Standard Certified Formula P2 Certified Formula, SPF 值 16.5,批号: 1902K)和 P3 标准品(P3 High SPF Reference Standard, SPF 值 16,批号: 102J)均购自上海安普实验科技股份有限公司; Anti-Melanoma 抗体(产品编号: ab732,批号: GR3194686-3)购自英国 Abcam 公司; 小鼠二步法试剂盒(产品编号: PV-6002,批号: K183316B)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物技

术有限公司。

1.3 主要仪器

皮肤光毒性试验检测仪(型号: HOPE-MED 8130B)购自天津开发区合普工贸有限公司; ES 全封闭组织脱水机(型号: Excelsior)、组织包埋机(型号: HistoStar)、石蜡切片机(型号: HM340E)、烘片机(型号: Slimline Hotplate)、自动染片机(型号: Gemini AS)和自动封片机(型号: CTM 6)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 显微镜(型号: ZEISS Lab. A1)购自卡尔蔡司光学(中国)有限公司; 电子天平(型号: 双杰 JJ3000)购自双杰电子天平公司。

1.4 分组与干预方法

将动物按表 1 方案随机分成 7 组,包括正常对照组、模型组和 5 个防晒标准品组。每次照射前,在大鼠背部 3 cm × 3 cm 区域内剃毛,使皮肤充分暴露,将大鼠放在皮肤光毒性试验检测仪(UVA+UVB)灯具正下方的 30 cm 处照射,辐射参数设为 UVA (4.5 mJ · cm⁻² · s⁻¹) + UVB (0.036 mJ · cm⁻² · s⁻¹),每周照射 2 次,连续照射 4 周,8 次照射时间分别为 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min、80 min、90 min,累计共 440 min。各防晒标准品组每次照射前 30 min 涂抹防晒标准品,剂量为 2 mg/cm²,每次照射完毕 30 min 后轻轻擦除。

1.5 检测指标

1.5.1 病理学观察 取照射部位皮肤,用质量分数 4% 中性甲醛溶液固定,按常规步骤制作石蜡切片、进行 H&E 染色,光学显微镜观察并拍照。在高倍显微镜下,用 ZEN2 病理图文分析软件测量皮肤的表皮厚度和真皮层皮脂腺的横截面积,参照 GB7919-87 《化妆品安全性评价程序和方

表 1 动物分组及处理
Table 1 Grouping of the animals

组 别	n	处理方式	PFA/ SPF 值
正常对照组	4	不涂防晒品 + 不照射紫外线	—
模型组	4	不涂防晒品 + 照射紫外线	—
S1 组	4	涂 S1 标准品 + 照射紫外线	PFA 4.5
S2 组	4	涂 S2 标准品 + 照射紫外线	PFA 12
P7 组	4	涂 P7 标准品 + 照射紫外线	SPF 4.5
P3 组	4	涂 P3 标准品 + 照射紫外线	SPF 16
P2 组	4	涂 P2 标准品 + 照射紫外线	PFA 16.5

法》^[5]按文献^[4]标准进行皮肤损伤评分,总分按(a+b+c+d+e+f+g+i+j+k)或(h+i+j+k)选择总分较大者。

1.5.2 免疫组织化学检测 用小鼠二步法试剂盒检测HMB45抗体的变化,可表达皮肤表皮层黑素细胞变化情况。

1.6 防护作用综合评价

在表皮增厚、皮脂腺增生、皮肤损伤评分、HMB45表达这4项指标中有1项较模型对照组显著减轻,可判其对紫外线辐射致皮肤光损伤有轻微防护功效;4项指标中有2项较模型对照组显著减轻,可判其有轻度防护功效;4项指标中有3项较模型对照组显著减轻,可判其有中度防护功效;4项指标均较模型对照组显著减轻,可判其有高度防护功效。

1.7 统计分析

所测数据采用Excel录入和SPSS21.0统计分析软件进行统计分析,组间差异采用 t 检验、方差分析和多重比较(LSD法),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮肤组织病理学观察

正常对照组大鼠的背部皮肤表皮由角质层、颗粒层、棘细胞层和基底细胞层构成,颗粒层和棘细胞层的细胞数较少,表皮厚薄均匀;真皮层由乳头层(真皮浅层)和网状层(真皮深层)组成,胶原纤维是真皮结缔组织中最为丰富的成分,弹力纤维数量较胶原纤维少,较均匀的散在分布在胶原束之间(图1C-1);真皮层皮肤附件由毛囊、皮脂腺组成,均未见明显异常(图1C-2)。模型组大鼠背部部分皮肤表皮角化过度(角质层、颗粒层增厚),棘层肥厚(表皮为正常厚度1.5~2.9倍),表皮厚薄不均,皱纹明显,真皮层少量胶原纤维变性伴少量成纤维细胞增生,局部散在炎细胞浸润(图1M-1);真皮层毛囊增大,皮脂腺增生(图1M-2)。S1组大鼠背部部分表皮角化过度(颗粒层增厚),表皮增厚较模型组减轻(表皮为正常厚度1.2~1.9倍),真皮层少量成纤维细胞增生(图1S1-1);真皮层皮脂腺增生(图1S1-2)。S2组大鼠背部皮肤表皮增厚较模型组明显减轻(表皮为正常厚度1.0~1.2倍),

真皮层散在成纤维细胞增生(图1S2-1);真皮层皮脂腺增生较模型组明显减轻(图1S2-2)。P7组SD雌性大鼠部分表皮角化过度(角质层、颗粒层增厚),棘层肥厚(表皮为正常厚度1.4~1.9倍),皱纹明显,真皮层散在的成纤维细胞增生(图1P7-1);真皮层皮脂腺增生(图1P7-2)。P3组大鼠部分表皮角化过度(颗粒层增厚),表皮增厚较模型组减轻(表皮为正常厚度0.8~2.2倍),真皮层散在的成纤维细胞增生(图1P3-1);真皮层皮脂腺增生(图1P3-2)。P2组大鼠部分表皮角化过度(颗粒层增厚),表皮增厚较模型组减轻(表皮为正常厚度1.3~1.6倍),真皮层散在的成纤维细胞增生(图1P2-1);真皮层皮脂腺增生(图1P2-2)。

2.2 HMB45免疫组织化学观察

正常对照组皮肤未见明显的HMB45表达(图1C-3);模型组局部皮肤可见少量细胞表达HMB45,表达部位位于表皮基底层和毛囊的上皮层(图1M-3);S1组局部皮肤可见少量细胞表达HMB45,表达部位位于表皮基底层和毛囊的上皮层(图1S1-3);P7组局部皮肤可见散在细胞表达HMB45,表达部位位于表皮基底层和毛囊的上皮层(图1P7-3);S2组、P3组和P2组皮肤均未见明显HMB45的表达(图1S2-3、图1P3-3和图1P2-3)。

2.3 各组大鼠皮肤表皮厚度和真皮层皮脂腺横截面积比较

表皮厚度和真皮层皮脂腺横截面积测定结果显示(表2),模型组较正常对照组显著增厚($P<0.05$);5个防晒标准品组表皮增厚均较模型组显著减轻($P<0.05$)。真皮层皮脂腺横截面积测定结果显示,模型组较正常对照组显著增大($P<0.05$);S2组皮脂腺增生较模型组显著减轻($P<0.05$),其他防晒标准品组与模型组相比无显著差异。

2.4 皮肤损伤评分

与正常对照组比较,模型组皮肤损伤评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,4个防晒标准品组皮肤损伤评分均显著降低($P<0.05$)(表3)。

2.5 防护作用综合评价

S2标准品有高度防晒功效,P3标准品和P2标准品有中度防晒功效,S1标准品有轻度防晒功效,P7标准品的防晒功效轻微(表4)。

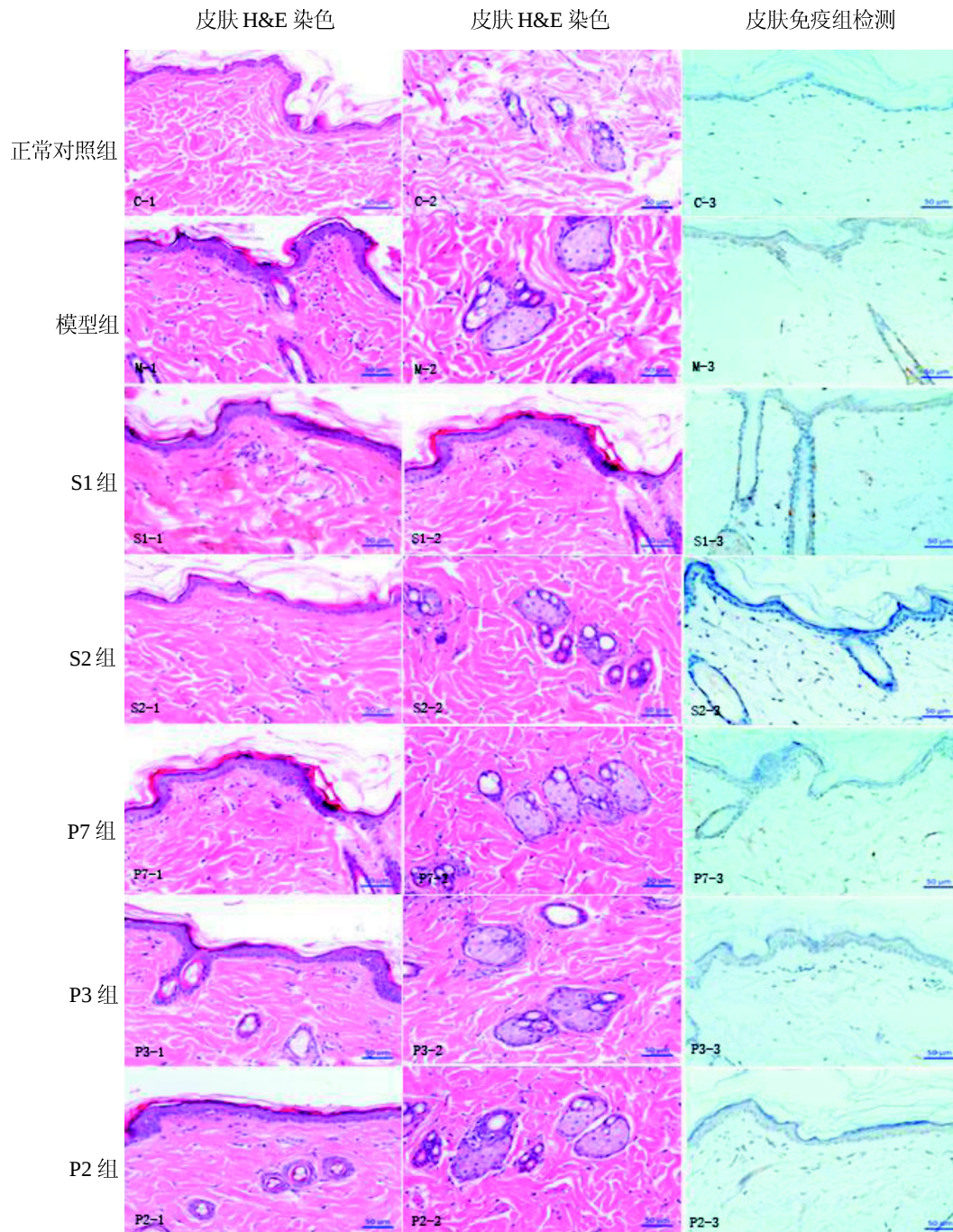


图 1 皮肤组织病理学观察和免疫组织化学观察

Figure 1 Histopathological and immunohistochemical observations of skin

3 讨论

本研究采用 $\text{UVA}(4.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}) + \text{UVB}(0.036 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$ 辐照方法, 每周照射 2 次, 连续 4 周, 累计辐射时间 440 min (UVA、UVB 累计照射量分别为 $118.8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $1.0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$),

建立皮肤光毒性损伤大鼠模型。与正常对照组比较, 模型组 SD 雌性大鼠背部部分皮肤表皮角化过度(角质层、颗粒层增厚), 棘层肥厚(表皮为正常厚度 1.5~2.9 倍), 表皮厚薄不均, 皱纹明显, 少量表皮细胞空泡化; 真皮层少量胶原纤维变性伴少量成纤维细胞增生, 局部散在炎细胞浸

表2 各组SD大鼠皮肤表皮厚度和真皮层皮脂腺横截面积比较

Table 2 Comparison of skin epidermal thickness and cross section area of sebaceous glands in dermis of SD rats in each group

组别	n	表皮厚度/ μm	皮脂腺横截面积/ $\times 10^3 \mu\text{m}^2$
正常对照组	4	10.72 $\pm$ 1.40	3.94 $\pm$ 2.08
模型组	4	25.43 $\pm$ 4.39*	12.04 $\pm$ 3.69*
S1组	4	16.84 $\pm$ 3.31#	11.74 $\pm$ 1.06
S2组	4	12.26 $\pm$ 1.27#	7.62 $\pm$ 4.43#
P7组	4	18.72 $\pm$ 2.10#	12.10 $\pm$ 4.56
P3组	4	15.74 $\pm$ 6.51#	10.54 $\pm$ 1.67
P2组	4	15.72 $\pm$ 1.17#	10.53 $\pm$ 5.08

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;下表同

表3 各组SD大鼠皮肤损伤评分比较

Table 3 Comparison of skin injury scores of SD rats in each group

组别	n	皮肤损伤评分
正常对照组	4	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	4	5.75 $\pm$ 1.26*
S1组	4	3.50 $\pm$ 0.58#
S2组	4	1.75 $\pm$ 0.50#
P7组	4	5.00 $\pm$ 1.15
P3组	4	2.50 $\pm$ 1.00#
P2组	4	2.50 $\pm$ 1.29#

表4 各防晒标准品组防护作用综合评价

Table 4 Comprehensive evaluation of the protective effect of each sunscreen standard group

组别	有效指标数	综合评价
S1组	2	轻度
S2组	4	高度
P7组	1	轻微
P3组	3	中度
P2组	3	中度

润,真皮层毛囊增大,皮脂腺增生,主要病变与文献报道一致^[6]。根据前期研究结果^[4],表皮增厚、皮脂腺增生、皮肤损伤评分可以较好地评估紫外线对皮肤的损伤作用。HMB45是能与黑素瘤抗原结合的单克隆抗体^[7],能识别前黑素小体球蛋白,并可与增生活跃的黑素瘤细胞和黑素细胞起反应^[8],从而可用于评价皮肤黑色素细胞的增生情况。

防晒化妆品对紫外线的防晒性能评价,目前国际上主要采用人体测试法和体外仪器测定法^[9],存在对人造成伤害、结果不准确等缺陷,而且对皮下组织损伤的防护不好直接判定。为解决这一难题,本研究建立动物模型来评价光毒性损伤。实验结果显示,S2组在表皮增厚、皮脂腺增生、皮肤损伤评分和HMB45表达4项指标均较模型组显著减轻;P3组和P2组在表皮增厚、皮肤损伤评分和HMB45表达3项指标均较模型组显著减轻;S1组在表皮增厚和皮肤损伤评分2项指标均较模型组显著减轻;P7组仅在表皮增厚1项指标较模型组显著减轻。从防护效果上讲,各标准品对皮肤的防护作用存在差异,总体防护效果符合PFA和SPF值的大小。

本研究采用UVA+UVB紫外线辐射的方法,建立紫外线致皮肤光毒性损伤实验动物模型,结合毒性病理学评价方法,分析比较表皮厚度、皮脂腺横截面积、皮肤损伤评分和表皮黑色素颗粒HMB45表达4个指标,这些指标易于观察和量化,相比人体SPF和SPA测试结果,更能直观反映防晒化妆品对紫外线引起的皮肤深层光损伤的防护作用,可用于防晒化妆品防晒功效评价。

参考文献:

- [1] Romanhole RC, Ataide JA, Moriel P, et al. Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin[J]. Int J Cosmet Sci, 2015, 37(4):366-370.
- [2] 邓映,钟建桥.皮肤光损伤与氧化应激研究进展[J].临床皮肤科杂志,2017,46(9):671-673.
- [3] 化妆品安全技术规范[S]. 2015:546-556.
- [4] 孙侠,刘香梅,庞增雄,等.不同时间紫外线照射对SD大鼠的皮肤光毒性损伤作用[J].实验动物与比较医学,2019,39(2):124-130.
- [5] 化妆品安全性评价程序和方法[S]. 1987.
- [6] 楼彩霞,高擎,孙侠,等.维生素C对紫外线诱导的光老化大鼠皮肤结构的影响[J].中国比较医学杂志,2015(6):79-80.
- [7] Gown AM, Vogel AM, Hoak D, et al. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes [J]. Am J Pathol, 1986, 123(2):195-203.
- [8] 尹占东,夏建新,王延龙,等. MITF、S-100蛋白、

HMB45 在黑素瘤以及色素痣中的表达及意义[J].中国实验诊断学, 2011, 15(12):2039-2040.

[9] 韩高伟, 高子怡, 展俊岭, 等. 防晒品防晒性能评价方法研究现状[J]. 农业技术与装备, 2018, 347(11):78-79+81.

Protective Effects of Different Sunscreen Standards on Skin Photodamage Induced by Ultraviolet Radiation in Rats

XU Yingyu, WANG Xiaohui, JIANG Yi, LI Min,

PANG Zengxiong, LI Guangxian, CHEN Ziling, SUN Xia

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

[Abstract] Objective To study the protective effects of different sunscreen standards on skin photodamage induced by ultraviolet radiation in rats, and to provide background data for the evaluation of sunscreen efficacy of sunscreen cosmetics. **Methods** The skin phototoxicity damage rat models were established by ultraviolet radiation of Ultraviolet A (UVA, $4.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) + Ultraviolet B (UVB, $0.036 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). The rats were irradiated twice a week for 4 weeks, and the cumulative radiation time was 440 minutes. The sunscreen standard products (S1、S2、P2、P3 and P7) were applied 30 minutes before each exposure. After the experiment, the skin was observed histopathologically and the expression of Melanoma marker (human), mAb (HMB45) was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, the four indexes of epidermal thickening, sebaceous gland hyperplasia, skin injury score and HMB45 expression in group S2 were significantly alleviated; the three indexes of epidermal thickening, skin injury score and HMB45 expression in group P3 and group P2 were significantly alleviated compared with the model group; the two indexes of skin thickening and skin injury score in group S1 were significantly alleviated compared with the model group. In the group P7, only one index of epidermal thickening was significantly reduced compared with the model group. Generally speaking, the protective effect of the standard conforms to the values of PFA and SPF. **Conclusion** The protective effect of sunscreen cosmetics on skin photodamage caused by ultraviolet radiation is related to PFA and SPF values. This method can be used to evaluate the sunscreen efficacy of sunscreen cosmetics.

[Key words] Ultraviolet A (UVA); Ultraviolet B (UVB); Skin phototoxicity; Sunscreen standard