

绿原酸对光老化 ESF-1 细胞 ERK 信号通路的调控研究

王业秋, 陈巧云*, 李建民, 张 宁

黑龙江中医药大学, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要: 目的 探讨绿原酸对光老化人皮肤成纤维细胞 ESF-1 光损伤的保护作用, 及其对细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路的影响。方法 用 20 J/cm^2 的长波紫外线 (UVA) 照射 ESF-1 细胞制备光老化模型, 以不同浓度绿原酸处理光老化细胞, 检测细胞中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、丙二醛 (MDA) 量, RT-PCR 法检测细胞中 ERK1、ERK2、基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) 及基质金属蛋白酶抑制因子 1 (TIMP-1) mRNA 的表达量, Western blotting 法检测 p-ERK1/2 蛋白的表达, 酶联免疫法检测细胞上清液中 MMP-1、TIMP-1 的量。结果 UVA 照射 ESF-1 细胞后, SOD 活性、GSH-Px 活性、TIMP-1 mRNA 的表达量、TIMP-1 的量明显降低, MDA 水平、ERK1、ERK2、MMP-1 mRNA 的表达量、p-ERK1/2、MMP-1 水平明显升高 ($P < 0.01$); 10.0 、 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 绿原酸能够显著改善光老化 ESF-1 细胞的损伤 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 绿原酸调控光老化 ESF-1 细胞 ERK 信号通路, 从而减轻 UVA 对 ESF-1 细胞的损伤。

关键词: 绿原酸; ESF-1 细胞; 长波紫外线; 光老化; 细胞外调节蛋白激酶信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)03-0386-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.016

Regulation of chlorogenic acid on ERK signal pathway in photoaging ESF-1 cells

WANG Ye-qiu, CHEN Qiao-yun, LI Jian-min, ZHANG Ning

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China

Abstract: Objective To investigate the regulation of chlorogenic acid on ERK signal pathway and the protection of chlorogenic acid on photoaging ESF-1 cells. **Methods** The model of photoaging ESF-1 was established by irradiating of ultraviolet light (20 J/cm^2). The chlorogenic acid at different concentration was used for photoaging cell. The SOD and GSH-Px activities, and MDA content were assayed by hydroxylamine, colorimetric and TBA method, respectively. The mRNA expression levels of ERK1, ERK2, MMP-1, and TIMP-1 were determined by RT-PCR, the protein expression of p-ERK1/2 was determined by Western blotting assay and the secretion levels of MMP-1 and TIMP-1 of cultured ESF-1 cells were detected by ELISA. **Results** After the UVA irradiation, the activities of SOD and GSH-Px, the mRNA expression level of TIMP-1, and the content of TIMP-1 were decreased, the contents of MDA, p-ERK1/2 and MMP-1, the mRNA expression levels of ERK1, ERK2, and MMP-1 were increased ($P < 0.01$). The above changes were inhibited by 10.0 and $1.0 \mu\text{mol/L}$ chlorogenic acid to improve the injury of ESF-1 cells ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** The chlorogenic acid could regulate ERK signal pathway and inhibit the injury of ESF-1 cells by UVA.

Key words: chlorogenic acid; ESF-1 cells; UVA; photoaging; ERK signal pathway

日光中的长波紫外线 (UVA, $320 \sim 400 \text{ nm}$) 是引起皮肤光老化的最主要环境因素之一, UVA 穿透力强, 直接损伤真皮层中的成纤维细胞, 导致成纤维细胞的过早衰老, 胶原合成能力下降, 基质金属蛋白酶 (MMPs) 表达升高, 细胞外基质降解, 胶

原降解与合成的平衡被打破, 形成了光老化特征^[1]。国内外进行了大量抗光老化的研究, 但至今尚未找到确切的抗光老化方法。中药以其独特的优势, 在抗皮肤光老化领域的研究工作得到广泛开展。杜仲为杜仲科植物杜仲 *Euconia ulmides* Oliv. 干燥茎

收稿日期: 2013-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274035); 黑龙江省青年科学基金资助项目 (QC2010085); 黑龙江省中医药管理局科研基金项目 (ZHY12-W012); 黑龙江中医药大学创新人才支持计划项目

作者简介: 王业秋 (1979—), 男, 讲师, 从事中药抗光损伤研究。Tel: (0454)6103261 E-mail: wyq8119@163.com

*通信作者 陈巧云 Tel: (0454)6050350 E-mail: chenqy0114@163.com

皮,在我国药用历史悠久,《神农本草经》将其列为上品,杜仲传统以干燥树皮入药,是名贵滋补药材,具有补中益气、强筋骨、强志、安胎,有久服轻身耐老之功效^[2-3]。现代药理学研究表明杜仲具有抗菌、抗病毒、抗氧化、清除自由基、降血压等作用^[4]。本课题组前期研究发现杜仲提取物具有很好的抗光老化效果,其药效物质可能是绿原酸^[5-6]。本实验以绿原酸为研究对象,考察绿原酸对光老化人皮肤成纤维细胞 ESF-1 细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路的调控作用,探讨其抗 ESF-1 细胞光老化的作用机制,为绿原酸及杜仲的进一步开发和应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人皮肤成纤维细胞 ESF-1,来源于中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院基础学院细胞资源中心。

1.2 试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗 (Thermo Fisher 公司),超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程公司), TRIzol (Invitrogen 公司), 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂盒、目的基因及内参引物、琼脂糖、丙烯酰胺、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺、SDS、Tris [生工生物工程 (上海) 有限公司], Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、TEMED、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)、超敏 ECL 化学发光试剂盒、显影定影试剂盒、PVDF 膜 (碧云天生物技术研究所), 磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 1/2 抗体、 β -actin 抗体 (内参抗体)、羊抗兔 IgG (北京博奥森生物技术有限公司), 基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) ELISA 试剂盒、基质金属蛋白酶抑制因子 1 (TIMP-1) ELISA 试剂盒 (上海研吉生物科技有限公司), 绿原酸对照品 (质量分数 $\geq 98\%$, 上海锐谷生物科技有限公司)。

1.3 仪器

紫外照射仪 (Sigma 公司), 紫外线辐照计 (北京师范大学光电仪器厂), Reseach UV UF 型超纯水制备系统 (上海和泰仪器有限公司), IX-71-21PH 型 Olympus 倒置显微镜 (日本 Olympus 株式会社), HF90 型二氧化碳培养箱 (上海智城分析仪器有限公司), MS-500A 半自动生化分析仪 (美生科技

有限公司), MK3 酶标仪 (美国热电公司), TGL-16G-C 型高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂), Tprofessional 型 PCR 扩增仪 (德国 Biometra 公司), DYY-10C 型电泳仪电源、DYCP-31DN 型水平电泳仪、DYCZ-24DN 型电泳仪、DYCZ-40B 型转印电泳仪 (北京市六一仪器厂), Champ Gel5000 型凝胶成像系统 (北京赛智创业有限公司)。

2 方法

2.1 药物配制

通过预试验发现绿原酸浓度大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时对 ESF-1 细胞产生毒性,所以本实验将绿原酸加入 DMEM 培养液中,配制成高、中、低 (10.0、1.0、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 3 个浓度,调 pH 值为 7.0, 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌。

2.2 ESF-1 细胞的体外培养

ESF-1 细胞在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。取对数生长期细胞以胰酶消化,调整其密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板、 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板。

2.3 细胞光老化模型的制备

96 孔和 6 孔板细胞继续培养 24 h, 参考文献方法^[7], 使用 20 J/cm^2 的 UVA 照射细胞, 对照组用铝箔盖住细胞, 建立细胞光老化模型。紫外线照射量 (J/cm^2) = 照射强度 (W/cm^2) \times 照射时间 (s), 紫外线辐照计测量照射强度为 8.33 mW/cm^2 , 照射时间为 2 400 s。

2.4 实验分组及药物处理

接种于孔板内的细胞随机分为对照组, 模型组, 绿原酸高、中、低剂量组。对照组细胞给予 DMEM 培养液培养, 模型组细胞给予 DMEM 培养液培养 24 h 后, 按照“2.3”项方法进行紫外线照射, 加入 DMEM 培养液继续培养, 绿原酸高、中、低剂量组细胞给予 DMEM 培养液培养 24 h 后, 按照“2.3”项方法进行紫外线照射, 给予含不同浓度 (10.0、1.0、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 绿原酸的 DMEM 培养液继续培养。

2.5 细胞中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 测定

给药 24 h 后收集 6 孔板中各组细胞, 用冷 PBS 清洗 2 次, 超声破碎, 严格按照试剂盒说明书操作, 检测 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 的量。

2.6 RT-PCR 法检测细胞中 ERK1、ERK2、MMP-1 及 TIMP-1 mRNA 表达

给药 24 h 后, 使用 Trizol 分别提取 6 孔板中各

组每孔细胞的总 RNA; 以 RNA 为模板按照第一链 cDNA 合成试剂盒操作说明书分别逆转录为 cDNA; 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 以 β -actin 为内参, 内参基因与目的基因同时扩增, 各基因的引物序列、产物长度及退火温度见表 1, 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 退火

40 s, 72 °C 延伸 40 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min; 取扩增产物 4 μ L 上样于 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/mL EB), 100 V 电泳 30 min, 将凝胶放入凝胶成像系统摄像, 荧光强度值即代表 DNA 样品的相对量, 与 β -actin 两两比较即得到各处理组的比值。

表 1 RT-PCR 反应引物序列、产物长度及退火温度

Table 1 Primer sequences, products length, and annealing temperature of RT-PCR reaction

基因	引物序列	产物长度 / bp	退火温度 / °C
ERK1	正向: 5'-AGCAGGTTGGAGGGCTTAGAT-3' 反向: 5'-GGGAGGTGGAGATGGTGAAG-3'	442	56
ERK2	正向: 5'-AAAAGCCACAACACTACCAGAAAC-3' 反向: 5'-ACCCACACAAGAGGATTGAAGT-3'	353	54
MMP-1	正向: 5'-GGAAGGGCAAGGACTCTAT-3' 反向: 5'-CAGGGTTTCAGCATCTGGT-3'	366	53
TIMP-1	正向: 5'-GCTTCTGGCATCCTGTTGTTG-3' 反向: 5'-ACTCCTCGCTGCGGTTGTG-3'	295	56
β -actin	正向: 5'-GACTTAGTTGCGTTACACCCTTTC-3' 反向: 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'	160	同各目的基因

2.7 Western blotting 检测细胞中 p-ERK1/2 蛋白表达

给药 24 h 后, 弃去 6 孔板中培养液, 用预冷的 PBS 液洗涤 3 次, 置冰上, 加入 WIP 裂解液 (含 PMSF 1 mmol/L) 150 μ L 裂解, 4 °C、12 000 \times g 离心, 取上清, 加入上样缓冲液, 沸水煮 5 min, 然后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上; TBST 震荡洗涤 3 次; 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h; 一抗封闭 4 °C 过夜; TBST 震荡洗涤 3 次; 二抗封闭 2 h; TBST 震荡洗涤 3 次; 在暗室中, 用滤纸将膜上液体吸干, 在 ECL 反应混合液中反应 5 min 后, 压 X 光片, 后显影, 定影; 放入凝胶成像系统对 X 光片观察, 照相, 对条带进行定量分析, 确定各蛋白的表达量。

2.8 ELISA 法检测细胞上清液中 MMP-1 及 TIMP-1 水平

给药 24 h 后收集 96 孔板各组细胞的上清液, 严格按照 ELISA 试剂盒操作说明书检测 MMP-1 及 TIMP-1 水平。

2.9 数据处理

用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 数据

均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本间的方差分析采用 LSD 法。

3 结果

3.1 绿原酸对 ESF-1 细胞中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 量的影响

UVA 照射 ESF-1 细胞造成了氧化损伤, 致使模型组细胞中 SOD、GSH-Px 活性明显降低, MDA 的量明显升高 ($P < 0.01$); 而绿原酸各剂量组均能提高 SOD、GSH-Px 活性, 降低 MDA 的量, 且 10.0、1.0 μ mol/L 剂量组与模型组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 2。

3.2 绿原酸对 ESF-1 细胞中 ERK1、ERK2、MMP-1 及 TIMP-1 mRNA 表达的影响

UVA 照射使 ESF-1 细胞中 ERK1、ERK2、MMP-1 mRNA 的表达量明显升高, 而 TIMP-1 mRNA 的表达量明显降低 ($P < 0.01$); 绿原酸各剂量组均能降低 ERK1、ERK2、MMP-1 mRNA 的表达量, 并提高 TIMP-1 mRNA 的表达量, 且 10.0、1.0 μ mol/L 剂量组与模型组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 1 及表 3。

3.3 绿原酸对 ESF-1 细胞 p-ERK1/2 蛋白表达的影响

UVA 照射使 ESF-1 细胞中 p-ERK1/2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 绿原酸各剂量组均能降低

表 2 绿原酸对 ESF-1 细胞中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of chlorogenic acid on SOD and GSH-Px activities and MDA content in ESF-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SOD / ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	GSH-Px / ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	MDA / ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
对照	—	44.752 ± 4.753**	43.486 ± 4.621**	3.245 ± 0.362**
模型	—	21.115 ± 2.254	23.972 ± 2.293	5.829 ± 0.561
绿原酸	0.1	22.534 ± 2.319	25.097 ± 2.438	5.778 ± 0.562
	1.0	35.091 ± 3.348**	26.679 ± 2.955*	4.936 ± 0.425*
	10.0	37.449 ± 3.926**	38.176 ± 3.732**	4.323 ± 0.419**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

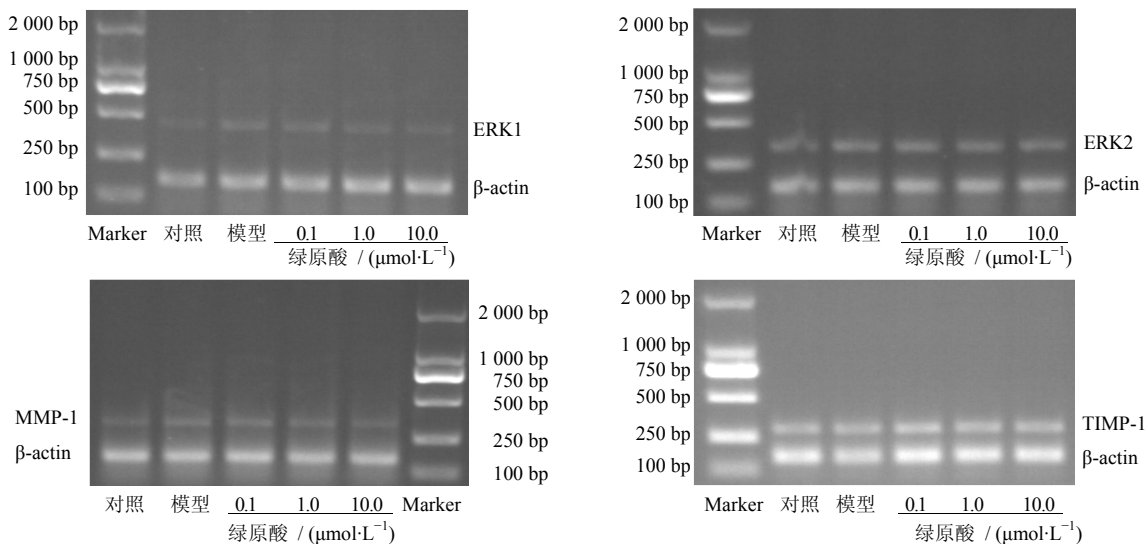


图 1 各组 ESF-1 细胞中 ERK1、ERK2、MMP-1 及 TIMP-1 mRNA 表达的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 RT-PCR electropherograms on mRNA expression of ERK1, ERK2, MMP-1, and TIMP-1 in ESF-1 cells of each group

表 3 绿原酸对 ESF-1 细胞中 ERK1、ERK2、MMP-1 及 TIMP-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of chlorogenic acid on mRNA expression of ERK1, ERK2, MMP-1, and TIMP-1 in ESF-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ERK1	ERK2	MMP-1	TIMP-1
对照	—	0.314 ± 0.032**	0.414 ± 0.047**	0.203 ± 0.021**	0.552 ± 0.065**
模型	—	0.401 ± 0.041	0.493 ± 0.044	0.295 ± 0.028	0.387 ± 0.037
绿原酸	0.1	0.386 ± 0.034	0.481 ± 0.051	0.267 ± 0.026	0.402 ± 0.043
	1.0	0.375 ± 0.042*	0.467 ± 0.042	0.251 ± 0.022*	0.486 ± 0.049*
	10.0	0.338 ± 0.037**	0.435 ± 0.043*	0.213 ± 0.024**	0.515 ± 0.058**

胞中 p-ERK1/2 蛋白表达量, 且 10.0、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组与模型组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 2。

3.4 绿原酸对 ESF-1 细胞上清液中 MMP-1 及 TIMP-1 水平的影响

UVA 照射使 ESF-1 细胞上清液中 MMP-1 水平明显升高, TIMP-1 水平明显降低 ($P < 0.01$); 绿原

酸各剂量组均能降低上清液中 MMP-1 水平, 提高 TIMP-1 水平, 且 10.0、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组与模型组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 3。

4 讨论

正常情况下, 细胞自身存在酶及非酶的抗氧化防御机制, 但在大剂量或长期 UV 作用下, 活性氧

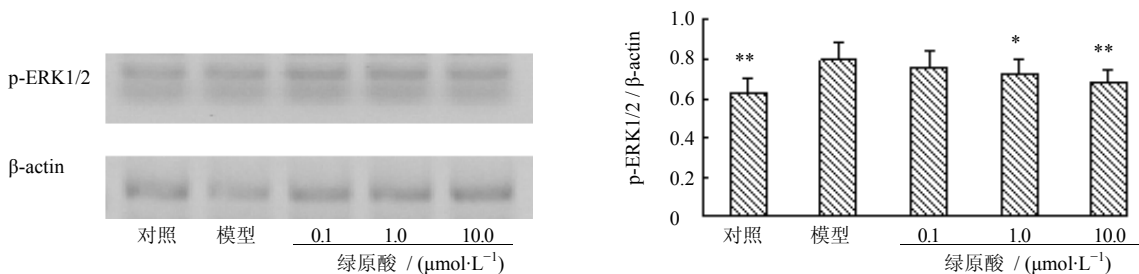


图 2 绿原酸对 ESF-1 细胞 p-ERK1/2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of chlorogenic acid on protein expression of p-ERK1/2 in ESF-1 cells

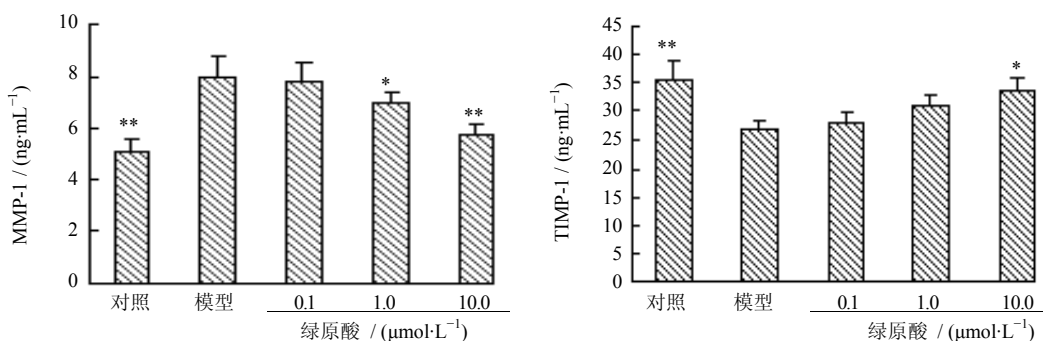


图 3 绿原酸对 ESF-1 细胞上清液中 MMP-1 和 TIMP-1 水平的影响

Fig. 3 Effect of chlorogenic acid on MMP-1 and TIMP-1 levels in culture supernatant of ESF-1 cells

(ROS) 的产生超过其被清除的速度, 导致 SOD、GSH-Px 活性下降, 损伤的抗氧化防御体系会导致更多 ROS 的产生, ROS 可直接攻击细胞膜脂质, 引发膜脂质过氧化链式反应产生 MDA, ROS 还可作为第二信使, 参与启动 UV 照射后的细胞内信号传导, 激活 ERK 信号传导通路, ERK 活化最终可上调 c-jun 的基因表达, c-jun 蛋白和 c-fos 蛋白组成的二聚体复合物 AP-1 刺激 MMPs 基因转录^[8]。MMPs 是一类含有锌离子、活性依赖于钙离子的蛋白酶, 具有广泛的生物学活性。皮肤中的胶原纤维首先由 MMP-1 降解为小分子肽, 然后被 MMP-3 及 MMP-9 进一步降解^[9]。TIMPs 是 MMPs 天然的特异性内源性抑制剂, TIMP-1 为相对分子质量 28 500 的分泌型糖蛋白, 主要抑制 MMP-1、MMP-3、MMP-7 及 MMP-9, TIMPs 与 MMPs 的精密平衡在细胞外基质 (ECM) 的合成和降解中发挥着重要作用, 皮肤光老化是二者动态平衡失调的结果。

本实验以 20 J/cm² UVA 照射 ESF-1 细胞, 细胞内 SOD 和 GSH-Px 的活性下降, MDA 的量升高, ERK1、ERK2 mRNA 和 p-ERK1/2 蛋白表达量升高, MMP-1 mRNA 及蛋白表达量升高、TIMP-1 mRNA

及蛋白表达量降低, 加入绿原酸处理后, 上述指标发生明显改变, 在绿原酸的安全剂量范围内呈一定的量效关系。光老化的 ESF-1 细胞在加入 1.0 μmol/L 绿原酸后可引起 MMP-1 明显降低 (P<0.05), 而 TIMP-1 变化不明显, 随浓度增大, 加入 10.0 μmol/L 绿原酸后, TIMP-1 才明显增加 (P<0.05), 提示绿原酸对光老化 ESF-1 细胞的 MMP-1 影响较大。上述结果表明, 绿原酸可以明显拮抗 UVA 引起的抗氧化酶活性的改变, 清除氧自由基, 抗脂质过氧化, 从而保护细胞免受氧化损伤; 同时绿原酸可以抑制 ERK 信号传导通路中 ERK1、ERK2 mRNA 的转录及 p-ERK1/2 的表达, 抑制 MMP-1 的分泌, 提高 TIMP-1 的分泌来拮抗光老化。

参考文献

[1] Bennett M F, Robinson M K, Baron E D, et al. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2008, 13(1): 15-19.
 [2] 张康健, 张 檀. 中国神树——杜仲 [M]. 北京: 经济管理出版社, 1997.
 [3] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.

- [4] 周程艳, 艾凌艳, 王 美, 等. 杜仲多糖抗肝纤维化作用的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 324-329.
- [5] 张 宁, 陈巧云, 徐艳明, 等. 杜仲对紫外线诱导的人皮肤角质形成细胞光老化模型的影响 [J]. 中医药信息, 2010, 27(1): 31-33.
- [6] 徐艳明, 张 宁, 井丽巍, 等. 杜仲对紫外线致 ESF-1 细胞光老化保护作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 147-150.
- [7] 陈巧云, 王业秋, 张 宁, 等. 杏仁超临界 CO₂ 萃取物抗 UVA 对成纤维细胞的损伤作用 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(9): 778-781.
- [8] Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 973: 31-43.
- [9] Quan T, Qin Z, Xia W, *et al.* Matrix-degrading metalloproteinases in Photoaging [J]. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2009, 14(1): 20-24.