

## 黄芩素对 HaCaT 细胞光老化模型 ERK 信号通路的影响

李建民, 杨 柳, 王业秋, 张丽宏\*, 吴 迪, 张春雷, 张 宁, 刘俊辰, 傅 云, 董 蕊  
黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

**摘要:**目的 研究黄芩素对皮肤光老化模型中细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路的影响。方法 使用照射强度为 0.5 mJ/cm<sup>2</sup> 的 UVB 型紫外线辐照计, 照射不同时间制备光老化细胞模型。细胞分为对照组, 模型组, 黄芩素 1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-5</sup> mol/L 组。使用流式细胞仪检测各组细胞中活性氧(ROS)量的变化, qRT-PCR 检测各组细胞中白细胞介素-1α(IL-1α)、IL-8 mRNA 表达量, 蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测各组细胞中 IL-1α、IL-8、p-ERK、ERK 蛋白的表达量。结果 与对照组比较, 模型组细胞出现皱缩、椭圆形, 细胞边缘有破损现象, 趋于死亡状态。与模型组相比, 1×10<sup>-7</sup> mol/L 黄芩素组细胞破损现象减轻, 1×10<sup>-6</sup> mol/L 黄芩素组细胞无明显的皱缩及破损现象, 1×10<sup>-5</sup> mol/L 黄芩素组细胞状态良好, 接近于正常状态; 与对照组比较, 模型组细胞中 ROS 的量显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-5</sup> mol/L 黄芩素组细胞中 ROS 的量显著降低( $P < 0.01$ ); 与对照组比较, 模型组 IL-1α、IL-8 mRNA 表达量显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-5</sup> mol/L 黄芩素组细胞中 IL-1α、IL-8 mRNA 的表达量显著降低( $P < 0.01$ ); 与对照组比较, 模型组细胞 IL-1α、IL-8、p-ERK 蛋白表达量显著升高( $P < 0.01$ ), ERK 蛋白表达量不变。与模型组比较, 1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-5</sup> mol/L 黄芩素组细胞中 IL-1α、IL-8、p-ERK 蛋白表达量显著降低( $P < 0.05$ 、0.01), ERK 蛋白表达量不变。结论 黄芩素对 HaCaT 细胞光老化模型的保护作用主要通过降低 ROS 的量, 阻断 ERK 信号通路, 进而降低炎症因子的产生实现的。

**关键词:** 黄芩素; HaCaT; UVB; 活性氧; 细胞外调节蛋白激酶信号通路; 白细胞介素-1α; 白细胞介素-8

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)20-4289-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.025

## Effect of baicalein on ERK signaling pathways of HaCaT cell with light aging

LI Jian-min, YANG Liu, WANG Ye-qiu, ZHANG Li-hong, WU Di, ZHANG Chun-lei, ZHANG Ning, LIU Jun-chen, FU Yun, DONG Rui

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

**Abstract: Objective** To study the effect of baicalein on the skin cell light aging and ERK signaling pathways. **Methods** Using UVB phototherapy device, of which light intensity was 0.5 mJ/cm<sup>2</sup>, different exposure time was tried before establishing the best exposure time light aging model. The experiment can be divided into control group, model group and baicalein group (1 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L) since the results of preliminary experiments shown that these three concentration of baicalein is the most effective concentration. Using flow cytometry instrument to test cells reactive oxygen species (ROS) content changes of each group. quantitative Real-time RCR (qRT-PCR) and Western blotting were respectively used to detect mRNA and protein expression in each group. **Results** The best exposure time for 5 min, and cell shrinkage, damage, apoptosis were observed in model group. Compared with model group, cell damage, shrinking phenomenon obviously reduced in 1 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup> mol/L baicalein group, and cell obviously tended to normal form in 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L baicalein group. Compared with the control group, the ROS content of cells in model group was increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the ROS content was decreased significantly in 1 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L baicalein group ( $P < 0.01$ ); Compared with the control group, the expression of IL-1α and IL-8 mRNA was increased significantly ( $P < 0.01$ ), and the expression of IL-1-α, IL-8, and p-ERK protein was also increased significantly ( $P < 0.01$ ) and ERK protein expression quantity remains the same in the model group. In 1 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L baicalein group, compared with model group, IL-1α and IL-8 mRNA expression were decreased significantly ( $P < 0.01$ ), and IL-1-α, IL-8, and p-ERK protein expression were also decreased significantly ( $P < 0.05$ , 0.01) and ERK protein expression quantity remains the same. **Conclusion** Protection of baicalein on UVB induced cell light aging, mainly through reducing ROS content, blocking ERK signaling pathway and inhibiting inflammatory cytokines.

**Key words:** baicalein; HaCaT; UVB; ROS; ERK signaling pathway; IL-1α; IL-8

收稿日期: 2017-04-13

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划项目(PC13S15); 黑龙江中医药大学科研基金项目(201309); 国家自然科学基金面上项目(81274035)

作者简介: 李建民(1964—), 男, 主任药师, 研究方向为中药药效物质基础研究。Tel: 13212980606 E-mail: ljm\_1030@126.com

\*通信作者 张丽宏, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中医药美容研究。Tel: 13836132760 E-mail: 419956419@qq.com

皮肤是人体最大的器官,由表皮、真皮以及皮下组织 3 部分组成。皮肤位于人体的最外层,不仅具有排汗、防寒作用,而且还具有抵御外来刺激的作用,是人体第一道防御系统<sup>[1]</sup>。皮肤老化是一种复杂的生理和病理现象,包括内源性及外源性<sup>[2]</sup>。内源性是人体自然衰老,外源性主要是由于外界刺激引起的,其中紫外线(UV)引起的皮肤老化称为光老化<sup>[3]</sup>。如今工业化生产日益增加,大气臭氧层被破坏,UV 到达地球表面,人们长期经受 UV 的照射,将导致皮肤的光老化,主要表现为皮肤出现红斑、松弛、粗糙、无光泽,严重可导致肿瘤发生等现象<sup>[4]</sup>。随着人们对面容的关注,皮肤光老化越来越受重视。因此,寻找预防及治疗皮肤光老化的天然植物药物成为当前研究热点。

杜仲是杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的树皮,有补肝肾、强筋骨、安胎的功效。近年来研究表明其具有清除氧自由基、抗衰老、抗菌、抗癌、抗高血压的作用<sup>[5-6]</sup>。杜仲主要成分包括黄酮类、苯丙素类、木脂素类、环烯醚萜类。本课题组前期实验研究发现杜仲提取物具有抗光老化效果,其有效物质可能为黄芩素<sup>[7]</sup>。本实验主要选择黄芩素为研究对象,观察黄芩素对光老化角质形成细胞中细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路的影响以及抗皮肤光老化作用机制,为进一步研究杜仲中有效成分提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人皮肤角质形成细胞 HaCaT 来源于上海中乔新舟有限公司。

### 1.2 药品与试剂

黄芩素对照品(质量分数 $\geq 98\%$ ,成都曼思特有限公司,批号 A0018);双抗(Hyclone 公司,批号 20111230);DMEM 培养液(Hyclone 公司,批号 NZM1301);胎牛血清 FBS(Hyclone 公司,批号 NYB0614);MTT(Sigma 公司,批号 021005);胰蛋白酶(Billab 公司,批号 J120028);活性氧试剂盒(碧云天生物技术公司,批号 S0033);目的基因及内参引物(上海生工生物股份有限工程);Trizol 细胞裂解液(美国 Invitrogen 公司);RIPA 细胞裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF(碧云天生物技术研究所);小鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 16A00205);兔抗人白细胞介素-1 $\alpha$

(IL-1 $\alpha$ )多克隆抗体(Santa 公司,批号 sc-73494);兔抗人 IL-8 多克隆抗体(Abcam 公司,批号 GR136011-6);兔抗人 p-ERK1/2 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 bs-3292R);兔抗人 ERK1/2 多克隆抗体(Abcam 公司,批号 GR251111-2);羊抗小鼠二抗(批号 BST10A01A)、羊抗兔二抗(批号 BST10C17B),武汉博士德生物有限公司;2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA,碧云天生物技术公司)。

### 1.3 仪器

HF90 型二氧化碳培养箱(上海智城分析仪器有限公司);IX-71-21PH 型 Olympus 倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社);UVB 型紫外线辐照计(北京师范大学光电仪器厂);MS-500A 型半自动分析生化仪(四川美生科技有限公司);PCR 自动扩增仪(德国 Biometra 公司);M $\times$ 3000P 实时荧光定量 PCR(美国 Agilent Stratagene 公司);Smart chemi II 型一体式微型化学发光成像仪(北京赛智创业科技公司);MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 HaCaT 细胞光老化模型的制备

将生长密度达到 80%~90% 的 HaCaT 细胞,按照 10 000 个/孔的细胞密度接种到 96 孔板中,将细胞分为对照组和造模(UVB)组,培养液培养细胞 24 h,次日,更换培养液继续培养 24 h,参照文献实验方法<sup>[8]</sup>,弃去培养液,PBS 清洗 2 次,每孔加入 200  $\mu$ L 的 PBS 覆盖,使用铝箔纸将对照组覆盖,UVB 型紫外线辐照计照射(UVB 型紫外线辐照计平行放置于细胞上方,与细胞距离 6 cm,使用铝箔纸将 UVB 型紫外线辐照计及细胞均包裹于里面,照射剂量=照射强度 $\times$ 照射时间;照射强度为 0.5 mJ/cm<sup>2</sup>)造模组,照射时间分别设定为 1、3、5、7、10、15 min,弃去 PBS,加入培养液,培养 24 h 后加入 20  $\mu$ L MTT(无菌 PBS 溶解,5 mg/mL),4 h 后加入 150  $\mu$ L DMSO,摇床震荡 10 min,酶标仪检测各组细胞的吸光度(A)值,计算各组细胞存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{造模}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.2 黄芩素对光老化细胞增殖及形态影响

将生长密度达到 80%~90% 的 HaCaT 细胞,按照 10 000 个/孔细胞密度接种到 96 孔板中,将细胞分为对照组、模型组和黄芩素组,对照组以 DMEM 培养液培养细胞 24 h,次日,更换培养液,继续培养 24 h,弃去培养液,每孔覆盖 200  $\mu$ L PBS,然后使用铝箔纸覆盖对照组,照射完成后,将铝箔

纸和 PBS 弃去, 培养液继续培养 24 h。模型组以 DMEM 培养液培养细胞 24 h, 次日, 更换培养液, 继续培养 24 h, 弃去培养液, 每孔加入 200  $\mu$ L PBS, UVB 型紫外线辐照计平行放置于细胞上方, 与细胞距离 6 cm, 使用铝箔纸将 UVB 型紫外线辐照计及细胞均包裹于里面, UVB 型紫外线辐照计照射 5 min, 弃掉 PBS, 加入新培养液培养 24 h。经预试验确定  $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素对正常 HaCaT 细胞的增殖无明显影响, 因此确定黄芩素的作用浓度为  $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L, 黄芩素组以 DMEM 培养液培养细胞 24 h 后, 弃去培养液, 每孔分别加入 200  $\mu$ L 含  $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素的培养液, 继续培养 24 h, 弃去培养液, 每孔分别加入 200  $\mu$ L PBS, UVB 型紫外线辐照计平行放置于细胞上方, 与细胞距离 6 cm, 使用铝箔纸将 UVB 型紫外线辐照计及细胞均包裹于里面, 照射 5 min, 弃掉 PBS, 分别加入新培养液培养 24 h。将细胞放于倒置显微镜下观察各组细胞的增殖及形态变化。

### 2.3 黄芩素对光老化细胞中活性氧 (ROS) 水平的影响

将生长密度达到 80%~90% 的 HaCaT 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 每孔接种  $1 \times 10^5$  个细胞, 按照“2.2”项方法分组、造模及给药, 从 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中取出各组已培养好的细胞, 弃掉培养液, 加入 1 mL DCFH-DA (10  $\mu$ mol/L, 无血清的培养液以 1:1 000 的比例稀释) 溶液, 于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 20 min, 每隔 5 min 颠倒混匀一次, 使探针和细胞充分接触, 无血清的培养液洗涤 3 次, PBS 清洗 3 次, 加入胰蛋白酶进行消化, 培养液终止消化, 离心, 放于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL PBS 重悬细胞, 滤网滤过。最后, 使用流式细胞仪检测各组细胞中 ROS 水平。

### 2.4 qRT-PCR 法检测细胞中的 IL-1 $\alpha$ 、IL-8 mRNA 表达水平

将生长密度达到 80%~90% 的 HaCaT 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 每孔接种  $1 \times 10^5$  个细胞, 按照“2.2”项方法分组、造模及给药, 弃去培养液,

PBS 洗 2 次, 按照每孔 1 mL 加入 Trizol 细胞裂解液, 将其充分接触细胞, 室温放置 2 min。用移液枪轻轻吹打细胞, 将细胞悬液放于 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管中。将 0.2 mL 氯仿加入到 1 mL Trizol 中, 盖紧 EP 管盖, 用手剧烈震荡, 观察溶液乳白色无分层现象。室温放置 5 min, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min。取出 1.5 mL 离心管, 将上层透明的水相吸出, 放于新的 EP 管中, 每个管中分别取出 400  $\mu$ L 溶液, 吸取过程中切勿碰到中间层。往 EP 管中加入等体积异丙醇, 上下颠倒, 将其充分混匀。常温放置 10 min, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min。弃去上清液, RNA 为白色的沉淀, 向其中加入 75% 乙醇 1 mL, 充分混悬, 洗涤沉淀, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 除去上清液, 倒扣 EP 管 5 min, 将其壁上液体除尽。最后, 加入 20  $\mu$ L 无 RNA 酶于 EP 管中溶解沉淀, Nano-100 微量分光光度计检测总 RNA 的浓度及纯度, 根据逆转录体系需要 RNA 1 000 ng, Nano-100 分光光度计检测 RNA 的浓度, 计算所需的体积数。RT-PCR 20  $\mu$ L 反应体系每孔包括 2 $\times$ SYBR Mixture 10  $\mu$ L, 上游引物和下游引物各 0.4  $\mu$ L, cDNA 0.8  $\mu$ L, 分别加入八联管中等待检测。反应条件: 预变性 95  $^{\circ}$ C、3 min, 变性 95  $^{\circ}$ C、20 s, 退火/延伸: 60  $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环, 将八联管分别放入 qRT-PCR 仪中进行检测, 引物序列见表 1。最后根据相对定量计算方法得出  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值, 进行定量。

### 2.5 Western blotting 检测细胞中 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK、ERK 蛋白表达水平

将生长密度达到 80%~90% 的 HaCaT 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 每孔接种  $1 \times 10^5$  个细胞, 按照“2.2”项方法分组、造模及给药, 弃掉培养液, 使用 PBS 清洗 3 次, 加入胰蛋白酶进行消化, 培养液终止消化, 收集细胞于 1.5 mL EP 管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 使用预冷的 PBS 清洗 2~3 次, 弃去 PBS, 按照 99:1 的比例制备裂解液, 将 RIPA 和 PMSF 进行混合, 2 min 后, 按照每孔 200  $\mu$ L 裂解液加入到 1.5 mL EP 管中, 待细胞充分裂解。12 000 r/min 离

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列信息

Table 1 Primers of qRT-PCR

引物名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	片段长度/bp
$\beta$ -actin	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	165
IL-1 $\alpha$	GGCGTGGAGCTGAGAGATAA	GTGTGGGTGAGGAGCACAT	119
IL-8	AGCTCTGTGTGAAGGTGCACT	AATTTCTGTGTTGGCGCACT	148

心 15 min, 吸取上清液为总蛋白。BCA 法检测各组蛋白浓度, 剩下蛋白按照样品与上样缓冲液 4 : 1 的比例混合, 沸水加热 5 min 使其变性。将玻璃板放于电泳槽中, 倒入电泳缓冲液, 将梳子拔出, 赶走气泡, 将蛋白样品和 Marker 加入到每孔中, 连接电泳仪, 120 V, 45 min, 紧接着转膜 35 min, 转膜结束后, 将 PVDF 膜转移到含有封闭液的培养皿中, 放于室温摇床进行封闭 2 h。封闭结束后, 从封闭液中取出膜, 使用滤纸吸去残留液, 将膜正面朝上放于塑封膜中, 分别加入目的蛋白及内参蛋白的一抗 (1 : 300 稀释), 放于 4 °C 冰箱过夜, 次日将 PVDF 膜取出, 放于培养皿中 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。取出 PVDF 膜, 正面朝上放于另一个塑封袋中, 加入二抗 (1 : 10 000 稀释), 放于室温摇床孵育 1 h, 放于培养皿中 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。取出 PVDF 膜放于 ECL 板上, 将发光液 A 和 B 按照 1 : 1 的比例混匀, 将其淋到 PVDF 膜上, 确保发光液覆盖整张膜, 将周围多余的发光液吸去。最后将膜放于 SmartChemi500 型一体式微型化学发光成像仪中, 曝光照相及进行图像分析。使用 Lane ID 凝胶分析系统分析条带的灰度, 得到各条带的灰度值, 将目的条带的灰度值与内参的灰度值的比值作为目的蛋白的表达水平。

### 2.6 统计学分析

使用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 ANOVA 方差分析, 多组间比较采用 LSD 法检验。

## 3 结果

### 3.1 不同照射时间对 HaCaT 细胞增殖的影响

如表 2 所示, 与对照组相比, UVB 照射 7 min 对 HaCaT 细胞的增殖有显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 随着照射时间增加至 10、15 min, 对 HaCaT 细胞的增殖具有显著的抑制作用, 差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。UVB 照射 1、3、5 min 对 HaCaT 细胞的增殖无显著

表 2 不同照射时间对 HaCaT 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of different irradiation time on proliferation of HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	照射时间/min	A 值	存活率/%
对照	—	0.469 ± 0.041	100.00
UVB 造模	1	0.475 ± 0.034	101.28
	3	0.467 ± 0.026	99.57
	5	0.468 ± 0.045	99.79
	7	0.421 ± 0.032*	89.77*
	10	0.353 ± 0.028**	75.27**
	15	0.188 ± 0.024**	40.09**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

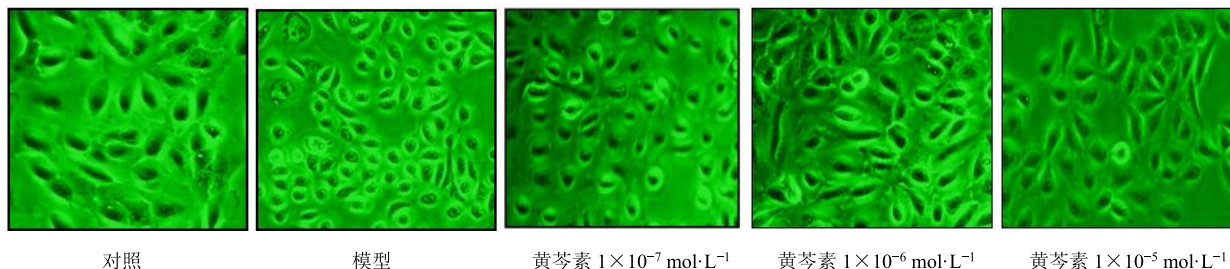
抑制作用, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 本实验选择介于正常细胞与受损细胞之间的临界值, 对细胞损伤较小的 5 min 的照射时间用于后续的实验研究。

### 3.2 黄芩素对光老化细胞形态的影响

如图 1 所示, 倒置显微镜下观察 HaCaT 细胞形态变化, 对照组细胞细长、饱满、形态正常, 生长状态良好。与对照组比较, 模型组细胞出现皱缩、椭圆形, 细胞边缘有破损现象, 趋于死亡状态; 与模型组相比,  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 黄芩素组细胞破损现象减轻,  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 黄芩素组细胞无明显的皱缩及破损现象,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素组细胞状态良好, 接近于正常状态。结果表明,  $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素对 UVB 照射引起 HaCaT 细胞光老化具有保护作用, 且作用趋势呈剂量依赖性。

### 3.3 黄芩素对 HaCaT 细胞中 ROS 量的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 ROS 的量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,  $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素组细胞中 ROS 的量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 随着黄芩素浓度增加, ROS 的量逐渐降低。



对照 模型 黄芩素  $1 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素  $1 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>

图 1 黄芩素对光老化细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of baicalein on cell morphology of HaCaT cells injured by UVB

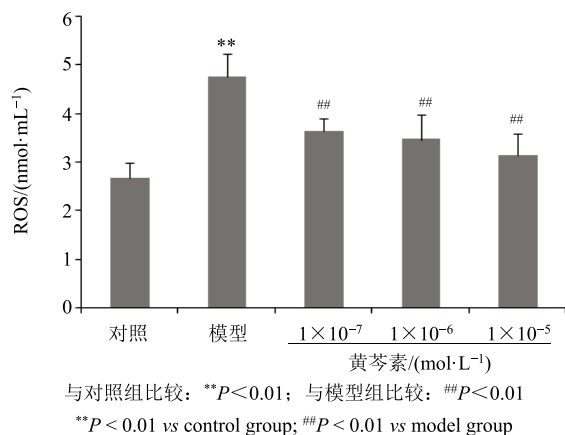


图2 黄芩素对 HaCaT 细胞中 ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 2 Effect of baicalein on ROS content in HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.4 黄芩素对 HaCaT 细胞 IL-1 $\alpha$ 、IL-8 mRNA 表达的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组 HaCaT 细胞中 IL-1 $\alpha$ 、IL-8 mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,  $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素组细胞中 IL-1 $\alpha$ 、IL-8 mRNA 的表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性。

### 3.5 黄芩素对 HaCaT 细胞 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK、ERK 蛋白表达的影响

如图 3、表 4 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ), ERK 蛋白表达量不变; 与模型组比较,  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 黄芩素组细胞中 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), ERK 蛋白表达量不变;  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 黄芩素组细胞中 IL-1 $\alpha$  蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), IL-8、p-ERK 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ), ERK 蛋白的表达量不变;  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素组细胞中 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ), ERK 蛋白的表达量不变。

表 3 黄芩素对 HaCaT 细胞 IL-1 $\alpha$ 、IL-8 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of baicalein on mRNA expression of IL-1 $\alpha$  and IL-8 in HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	C/(mol·L <sup>-1</sup> )	2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup> 值	
		IL-1 $\alpha$	IL-8
对照	—	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型	—	4.480 ± 0.043**	4.613 ± 0.083**
黄芩素	1 × 10 <sup>-7</sup>	3.587 ± 0.035###	2.199 ± 0.056###
	1 × 10 <sup>-6</sup>	2.187 ± 0.065###	1.322 ± 0.064###
	1 × 10 <sup>-5</sup>	2.034 ± 0.088###	1.244 ± 0.078###

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.01$   
\*\* $P < 0.01$  vs control group; ### $P < 0.01$  vs model group

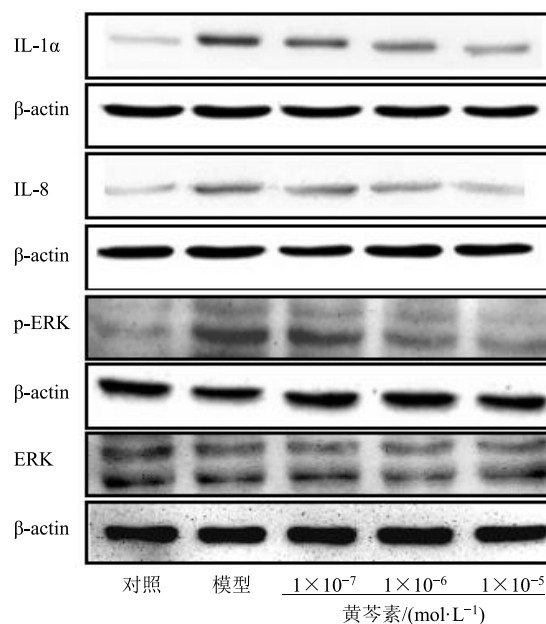


图3 黄芩素对细胞 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK、ERK 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effect of baicalein on protein expression of IL-1 $\alpha$ , IL-8, p-ERK, and ERK in HaCaT cells

表 4 黄芩素对细胞 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK、ERK 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of baicalein on protein expression of IL-1 $\alpha$ , IL-8, p-ERK, and ERK in HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	C/(mol·L <sup>-1</sup> )	IL-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin	IL-8/ $\beta$ -actin	p-ERK/ $\beta$ -actin	ERK/ $\beta$ -actin
对照	—	0.113 ± 0.049	0.203 ± 0.038	0.365 ± 0.057	0.743 ± 0.051
模型	—	0.437 ± 0.052**	0.569 ± 0.034**	0.706 ± 0.021**	0.745 ± 0.019
黄芩素	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.347 ± 0.046#	0.480 ± 0.062#	0.569 ± 0.023###	0.734 ± 0.030
	1 × 10 <sup>-6</sup>	0.330 ± 0.035#	0.414 ± 0.037###	0.502 ± 0.020###	0.731 ± 0.031
	1 × 10 <sup>-5</sup>	0.214 ± 0.036###	0.271 ± 0.029###	0.484 ± 0.019###	0.758 ± 0.046

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ### $P < 0.01$   
\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ### $P < 0.01$  vs model group

#### 4 讨论

近年来,大气臭氧层破坏日趋严重,UVA 及 UVB 不能被臭氧层吸收,到达地球表面,皮肤位于人体的最表层,因此对皮肤的损害比较严重<sup>[9]</sup>。与 UVA 相比,UVB 对皮肤的损伤较为严重,UVB 波长在 290~320 nm,主要影响表皮细胞,表皮细胞大部分由角质形成细胞组成,因此人皮肤的光老化损伤是由于 UVB 长期照射皮肤角质形成细胞产生的。

大量研究已证实<sup>[10]</sup>,皮肤光老化与产生过多 ROS 有关。正常情况下,人体产生的 ROS 能够促进细胞的增殖,对人体是有好处的,但当 UV 长期照射,ROS 过量的产生,体内抗氧化酶不能及时将其清除,破坏细胞中 DNA、脂质细胞膜及蛋白质的表达,引起皮肤光老化发生<sup>[11]</sup>。曹波等<sup>[12]</sup>研究发现南五味子提取物能够显著降低 UVB 损伤的 HaCaT 及人皮肤成纤维细胞(HDF) ROS 的量以及提高谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性,同时,也可以抑制细胞的凋亡,进而减轻皮肤的氧化损伤。皮肤的光老化也与分泌过多的炎症因子有关,正常条件下,细胞因子对于维持皮肤疾病炎症反应过程是有利的,长期 UV 照射皮肤时会产生过多的炎症因子(如 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  等),体内不能排泄出去,堆积在体内,最终导致皮肤光老化现象<sup>[13]</sup>。IL-1 $\alpha$  主要由巨噬细胞、表皮细胞、单核细胞等分泌,能够激活核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路,参与炎症反应的发生,在皮肤光老化中起到重要的作用<sup>[14]</sup>。IL-8 是一种中性粒细胞分泌的,参与炎症反应的重要介质<sup>[15]</sup>。近年来,UV 照射皮肤导致炎症反应及反应过程中 MAPK 及 NF- $\kappa$ B 信号通路的参与引起人们广泛的重视。MAPK 是生物体内一组重要的生物大分子,主要是由 ERK、JNK、p38MAPK 3 条通路组成,其中 ERK 及 p38MAPK 信号通路与炎症反应的关系比较密切<sup>[16]</sup>。当 UVB 照射 HaCaT 时,激活细胞表面生长因子及细胞因子受体,激活 MAPK 信号通路,使 ERK 及 p38MAPK 发生磷酸化,同时,体内产生过多的 ROS 及促炎症因子也可以作为第二信使激活 MAPK 信号通路,MAPK 的上游分子 MAPPK 和 MAPPKK 发出活化信号,各级蛋白发生磷酸化,激活 MAPK 信号通路,促使细胞内下游基因的表达<sup>[17]</sup>。王琮<sup>[18]</sup>发现 UVB 诱导小鼠表皮以及真皮中炎症因子、MAPK

及 NF- $\kappa$ B 表达均升高,水飞蓟宾治疗后,皮肤损伤明显减轻。

本实验研究结果显示,光老化模型组细胞中 ROS 的量显著升高,IL-1 $\alpha$ 、IL-8 mRNA 表达量显著升高,IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK 蛋白表达量显著升高。 $1\times 10^{-7}$ 、 $1\times 10^{-6}$ 、 $1\times 10^{-5}$  mol/L 黄芩素可使细胞中 ROS 的量显著降低,使细胞中 IL-1 $\alpha$ 、IL-8 mRNA 的表达量显著降低,使 IL-1 $\alpha$ 、IL-8、p-ERK 蛋白表达量显著降低。综上所述,黄芩素对 HaCaT 细胞光老化模型的保护作用主要是通过降低 ROS 的量,阻断 ERK 信号通路,进而降低炎症因子的产生来实现的。

#### 参考文献

- [1] 陈洁,陈莉莉,杜星颜. 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导人皮肤角质形成细胞 $\beta$ -防御素的体外表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(50): 9431-9436.
- [2] 陈高敏,王顺春,王璐,等. 中药植物多糖抗皮肤光老化的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(4): 396-400.
- [3] 杨智,王雪,郭冰心,等. 皮肤光老化的研究进展[J]. 实用老年医学, 2012, 26(6): 449-452.
- [4] 李张军,牛新武,肖生祥,等. 小鼠皮肤光老化动物模型建立方法的改良[J]. 西安交通大学学报, 2016, 37(1): 144-156.
- [5] 王珂欣,高丽,段丹丹,等. 基于<sup>1</sup>H-NMR代谢组学的黄芩素干预D-半乳糖致衰老大鼠作用研究[J]. 中草药, 2017, 48(3): 511-518.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Fuehs J, Paeker L. *Oxidative Stress in Dermatology* [M]. New York: Marcel Dekker, 1993.
- [9] 崔一淼. 根皮苷保护表皮细胞抵抗UVB损伤的作用及分子机制研究[D]. 哈尔滨: 东北师范大学, 2014.
- [10] 杜伟,申勇,李宝俊,等. 细胞因子IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP3与颈椎间盘退变机制的相关性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(3): 258-262.
- [11] 杨斌. 皮肤光老化、活性氧簇与抗氧化剂[J]. 中国美容医学, 2005, 14(5): 637-639.
- [12] 曹波,路婷婷,魏菲,等. 南五味子提取物对UVB辐射的防护作用观察[J]. 中国皮肤病学杂志, 2016, 30(8): 771-775.
- [13] 赵敏玲. 川芎嗪对长波紫外线诱导人皮肤成纤维细胞衰老的拮抗作用及其机制研究[D]. 广州: 广州中医

- 药大学, 2015.
- [14] 杨灵霞. 甘草酸及甘草黄酮对中波紫外线辐射后 HaCaT 细胞损伤的保护作用及其机制初探 [D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [15] 李海鹏. 中性粒细胞在炎症反应中的作用及机制 [J]. 医学综述, 2015, 21(9): 1576-1578.
- [16] 陈小娥. EGCG 对急性 UVB 辐射后表皮角质形成细胞保护机制的探讨及对慢性 UVA 辐射后小鼠皮肤光老化的防护作用 [D]. 南京: 南京医科大学, 2008.
- [17] Li J L, Zhou Y B, Wang C B. p38MAPK in regulating cellular response to ultraviolet radiation [J]. *J Biomed Sci*, 2007, 14(3): 303-312.
- [18] 王 琼. 水飞蓟宾对中波紫外线 (UVB) 诱导小鼠皮肤炎症保护作用及机制研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.