

## 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤光损伤的防护作用机制

杨雅<sup>1</sup>, 周茂杰<sup>1</sup>, 刘荣昌<sup>1</sup>, 徐磊<sup>2</sup>, 高珊珊<sup>1</sup>, 谭为<sup>1,2\*</sup>, 顾政一<sup>2\*</sup>

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

**[摘要]** 目的:研究薰衣草总黄酮对中波紫外线(UVB)致小鼠皮肤光损伤的防护作用,并从核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)抗氧化损伤通路探讨其作用机制。方法:将84只雌性KM小鼠随机分为7组:空白组,模型组,溶媒组,维生素E组(0.013 g·kg<sup>-1</sup>),薰衣草总黄酮低、中、高剂量组(0.25, 1.25, 2.50 g·kg<sup>-1</sup>)。通过UVB辐照小鼠背部裸露皮肤建立光损伤模型,照射前30 min外涂薰衣草总黄酮,连续照射1周后,对小鼠背部皮肤进行评价并测得其水分和弹性;采用苏木素-伊红(HE)染色和苦味酸-酸性品红法(VG)染色考察薰衣草总黄酮对小鼠皮肤组织病理学改变的影响;生化比色法检测皮肤匀浆后丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),总抗氧化能力(T-AOC),一氧化氮合酶(NOS),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的水平;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测皮肤组织中炎症因子白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ );实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠Nrf2, Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1), BTB-CNC异体同源蛋白1(Bach1), 血红素加氧酶-1(HO-1), 醌氧化还原酶1(NQO1), 谷氨酸半胱氨酸合成酶催化亚基(GCLC)mRNA表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠外观评分显著升高( $P<0.01$ ),皮肤水分和弹性显著降低( $P<0.01$ );皮肤组织出现较为明显的病理学变化,表皮明显增厚且伴有结痂小脓肿,损伤程度严重;小鼠的MDA, NOS水平明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), SOD, T-AOC水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 炎症因子IL-1, IL-6和TNF- $\alpha$ 的水平明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Nrf2, Keap1, NQO1, GCLC mRNA表达明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bach1 mRNA的表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,薰衣草总黄酮低、中、高剂量组的小鼠外观评分显著降低( $P<0.01$ ),皮肤水分和弹性显著升高( $P<0.01$ ),各给药组小鼠的MDA, NOS水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), SOD, T-AOC水平明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 炎症因子IL-1, IL-6和TNF- $\alpha$ 的水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1, GCLC mRNA表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bach1 mRNA表达显著降低( $P<0.01$ )。结论:薰衣草总黄酮对UVB所致的小鼠皮肤光损伤防护效果显著,其作用机制可能与激活Keap1/Nrf2/ARE信号通路,调控氧化应激反应,改善炎症反应有关。

**[关键词]** 薰衣草总黄酮; 皮肤光损伤; 中波紫外线; Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)/核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R751 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)02-0112-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220238

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211118.1646.003.html>

[网络出版日期] 2021-11-20 7:26

### Protective Mechanism of Total Flavonoids of Lavender Against Skin Photoaging in Mice

YANG Ya<sup>1</sup>, ZHOU Mao-jie<sup>1</sup>, LIU Rong-chang<sup>1</sup>, XU Lei<sup>2</sup>, GAO Shan-shan<sup>1</sup>, TAN Wei<sup>1,2\*</sup>, GU Zheng-yi<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Uyghur Autonomous Region Institute of Pharmacy, Urumqi 830004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of total flavonoids of lavender on skin photoaging induced by ultraviolet B (UVB) in mice and to explore its mechanism from the perspective of nuclear factor E<sub>2</sub>-

[收稿日期] 20210819(019)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2019D01A81)

[第一作者] 杨雅,在读硕士,从事中药民族药的研究,E-mail:2537305669@qq.com

[通信作者] \*谭为,在读博士,副研究员,从事中药民族药的研究,E-mail:tw21cn@163.com;

\*顾政一,硕士,研究员,博士生导师,从事中药民族药新技术新方法应用研究,E-mail:zhengyi087@126.com

related factor 2 (Nrf2) antioxidant pathway. **Method:** Eighty-four female KM mice were randomly divided into seven groups, namely blank group, model group, solvent group, vitamin E ( $0.013 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) group, as well as low-, middle-, and high-dose ( $0.25, 1.25, 2.50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) groups of total flavonoids of lavender. The naked skin on the back of mice was irradiated with UVB for inducing optical damage. Thirty minutes before irradiation, the skin was coated with the total flavonoids of lavender. After continuous irradiation for one week, the skin moisture and elasticity on the back of mice were evaluated, and the effects of total flavonoids of lavender on histopathological changes in mouse skin were investigated by hematoxylin-eosin (HE) and Van Gieson (VG) staining. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), nitric oxide synthase (NOS), and glutathione peroxidase (GSH-Px) after skin homogenization were detected by colorimetry, the inflammatory factors interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in skin tissue by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the mRNA expression levels of Nrf2, Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 (Keap1), BTB-CNC homology 1 (Bach1), heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the blank group, the model group exhibited significantly increased appearance score ( $P<0.01$ ), reduced skin moisture and elasticity ( $P<0.01$ ), pronounced pathological changes in the skin tissue like epidermal thickening, scabbing, small abscess, and severe injury, elevated MDA, NOS, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P<0.05, P<0.01$ ), lowered SOD, T-AOC, Nrf2, Keap1, NQO1 and GCLC mRNA expression ( $P<0.05, P<0.01$ ), and up-regulated Bach1 mRNA expression ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the total flavonoids of lavender at the low, middle, and high doses all remarkably reduced the appearance score ( $P<0.01$ ), enhanced the skin moisture and elasticity ( $P<0.01$ ), diminished the MDA, NOS, IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  ( $P<0.05, P<0.01$ ), increased SOD, T-AOC, Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1 and GCLC mRNA expression ( $P<0.05, P<0.01$ ), and down-regulated the expression of Bach1 mRNA ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** The protective effect of the total flavonoids of lavender against skin photoaging in mice is significant, which may be related to its activation of Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway, regulation of oxidative stress, and improvement of inflammatory response.

**[Keywords]** total flavonoids of lavender; skin photoaging; ultraviolet B (UVB); Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway

皮肤光损伤是由于日光中的紫外线长期对皮肤照射而产生的一种特异性损伤<sup>[1]</sup>。过量紫外线(UV)辐射可引起皮肤细胞活性氧族(ROS)蓄积,损伤细胞内蛋白质、脂质、核酸等大分子物质生理功能,诱发机体细胞氧化应激损伤,是其重要的发病机制之一<sup>[2]</sup>。机体长期受到紫外线刺激后,不仅会晒黑,还会出现炎症反应、氧化损伤及光致癌等损伤反应<sup>[3-4]</sup>。当前,皮肤的美观和健康被人们重视,科学合理的预防皮肤病和降低皮肤癌的发病率,以及研究具有确切光保护作用的药物显得尤为重要。

薰衣草为唇形科植物狭叶薰衣草的干燥地上部分。在薰衣草的种植产区中,中国新疆的伊犁河谷是全球第二大产区,被誉为“中国薰衣草之乡”<sup>[5]</sup>。薰衣草作为新疆常用药材已经有着长远的发展历史。其作用主要有抗焦虑、抗抑郁、抗惊厥、镇静催

眠、解热和减轻腹胀、解痉利尿及有效对抗呼吸道感染,除此之外,薰衣草还可以治疗疼痛、偏头痛和癫痫等<sup>[6]</sup>。

近年来,对皮肤光损伤的研究越来越多,本课题组前期研究表明,薰衣草总黄酮对豚鼠皮肤光损伤具有一定的保护作用<sup>[7]</sup>。目前,在机体抗氧化信号通路中核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)被认为是最重要的通路,但薰衣草总黄酮是否通过调控Nrf2抗氧化通路发挥作用而对皮肤的光损伤产生保护作用,国内外学者们少有研究。本课题研究旨在明确中波紫外线(UVB)所致皮肤光损伤方面薰衣草总黄酮是否对其有防护作用,并初步探讨其机制是否与Nrf2氧化应激信号通路有关,为光损伤防御机制的研究奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 84只SPF级雌性健康昆明种小鼠,6~8周龄,体质量18~22g,购于新疆医科大学动物中心,合格证号SCXK(新)2018-0002,许可证号SYXK(新)2018-0003。动物饲养于新疆维吾尔自治区药物研究所,温度23~25℃,相对湿度50%~60%,单笼饲养,自由获取食物和水。该实验由药物研究所伦理委员会审核批准,编号XJIMM-2021007。

**1.2 药物** 薰衣草购自新疆乌鲁木齐二道桥药材市场,由新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定为唇形科植物狭叶薰衣草 *Lavandula augustifolia* 的地上部分,符合2020年版《中华人民共和国药典》项下规定。将薰衣草粉碎后,加水14倍量,回流提取2次,每次2h,过滤,滤液减压浓缩成浸膏,将其水溶得到混悬液上大孔树脂AB-8分离纯化,收集得到70%乙醇洗脱液,减压浓缩后真空干燥,芦丁作对照品,采用紫外分光光度法测定总黄酮质量分数为70.102%。

**1.3 试剂** 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号100080-201409);BCA蛋白浓度测定试剂盒,丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),总抗氧化能力(T-AOC),一氧化氮合酶(NOS),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为(20210511,20210519,20210520,20210518,20210512,20210518);小鼠白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(中国 Ousaid 公司,批号分别为 M1352, M0079, M0084);维生素E软胶囊(吉林万通药业有限公司,批号191218);薇婷脱毛膏(利洁时家化有限公司,批号20231205);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司,批号317905);DEPC水(中国Biosharp公司,批号70127930);VG染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号C210301);Prime Script RT Reagent Kit反转录试剂盒,TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号分别为AL12354A,AL13557A)。

**1.4 仪器** SS-01B型紫外光疗仪(美国Sigma公司);M-12 USB型皮肤检测仪(美博艺电子有限公司);Real Bubee型皮肤水分测定仪(宁夏市瑞尔芭比医疗设备有限公司);Multiskan GO型全波长酶标仪, Nanodrop 2000/2000C型分光光度计, QuantStudio型Real-time PCR仪(美国Thermo Fisher科技公司);UV-2700型紫外分光光度计(日本

岛津有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 将84只雌性昆明小鼠随机分为7组,每组12只,分别为空白组(无UVB照射),模型组,溶媒组(70%乙醇+2%氮酮),阳性药组(维生素E),薰衣草总黄酮低、中、高剂量组,均经UVB照射。按照小鼠与人等效剂量方法折算,根据小鼠体质量给予维生素E组 $0.013\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,根据课题组前期研究<sup>[7]</sup>,将豚鼠与小鼠体表面积折算的等效剂量比进行换算,薰衣草总黄酮低、中、高剂量组分别为 $0.25, 1.25, 2.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。每只小鼠的给药量为1mL,照射前30min平铺纱布(4cm $\times$ 2cm)于小鼠裸露的皮肤处,均匀外涂药物1mL,敷药时间约为10min,空白组给予等体积蒸馏水,溶媒组给予等量70%乙醇+2%氮酮,每天照射前外涂用药1次,连续7d。

**2.2 皮肤光损伤模型的制备** 实验照射前1d用剃毛器剃除小鼠颈背部的所有毛发,后用脱毛膏涂抹去除颈背部的绒毛使背部裸露面积约为4cm $\times$ 2cm,确定照射距离为鼠背离照射灯20cm,UVB的照射强度为 $13\text{ mW}/\text{cm}^2$ ,持续照射1周,第1天与最后1d的照射时间为10min,其余5d为15min,照射总剂量为 $74.1\text{ J}/\text{cm}^2$ 。小鼠背部照射区域出现大量色素沉着、鳞屑、红斑、皱纹,局部甚至出现溃烂、结痂、皮革样触感,表明模型组小鼠皮肤光损伤模型构建成功<sup>[8]</sup>。

**2.3 小鼠背部皮肤评价** 记录小鼠受照射区的皮肤外观情况、皮下血管图且用M-12 USB皮肤检测仪分别记录小鼠背部皮肤表皮层、真皮层和UV层;小鼠皮肤含水量用Real Bubee皮肤水分测定仪进行测定,分别记录每只小鼠的水份和弹性;辐照结束后,参照皮肤光老化的临床分型(Glogau分型法)<sup>[8]</sup>,对照射区皮肤损伤程度进行积分:0分,无色素沉着、无鳞屑、无红斑、无皱纹、皮肤弹性良好、皮肤厚度正常;1分,具有淡褐色色素、少量鳞屑、轻度红斑、轻度皱纹、皮肤弹性尚可、皮肤轻度增厚;2分,中褐色色素、中等量鳞屑、中度红斑、中度皱纹、皮肤弹性较差、皮肤中度增厚;3分,深褐色色素、显著量鳞屑、重度红斑(即伴水肿、痂皮及坏死)、皱纹明显、皮肤弹性完全丧失、皮肤明显增厚。

**2.4 皮肤组织病理学变化** 实验完成后得到的皮肤组织,用4%多聚甲醛固定,经脱水、包埋、切片等处理后,进行苏木素-伊红(HE)和VG染色,光学显微镜下观察其组织病理学改变,并对其综合分析评判,实验组小鼠均可见轻微病理组织学改变,对小

鼠皮肤损伤程度进行分级：“-”皮肤结构形态正常；“+”少部分皮肤组织可见病变范围<25%；“++”部分皮肤组织可见病变范围25%~50%；“+++”大部分皮肤组织可见病变范围>50%。

**2.5 皮肤组织氧化指标及促炎因子的检测** 准确称取小鼠皮肤组织质量,按质量(g)-体积(mL)1:9的比例,加入9倍体积量的生理盐水,冰水浴条件下匀浆,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径8.5 cm),取上清液,根据试剂盒说明书分别测定皮肤组织中的SOD,MDA,T-AOC,GSH-Px和NOS水平,以及ELISA检测IL-1,IL-6和TNF- $\alpha$ 的含量。

**2.6 Real-time PCR检测皮肤组织中Nrf2,Keap1,Bach1,HO-1,NQO1,GCLC mRNA的表达** 称取皮肤组织约100 mg,用TRIzol试剂提取皮肤组织的RNA,用Nanodrop 2000/2000C分光光度计检测RNA的含量及纯度,吸光度A<sub>260/280</sub>在1.9~2.1,可以认为RNA的纯度较好,逆转录试剂盒进行反转录,应用TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)进行Real-time PCR扩增反应,反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性5 s,56℃退火34 s,共40个循环。结果采用相对定量法进行分析,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,采用2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法分析目的mRNA相对表达水平。各引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	上游 TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTGT	140
	下游 GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC	
Keap1	上游 TCGAAGGCATCCACCCCTAAG	135
	下游 CTCGAACCACGCTGTCAATCT	
Bach1	上游 AGAGTGCGGTATTGCTTACG	190
	下游 TCAGTCTGGCCTACGATTCTC	
HO-1	上游 CACAGCACTATGTAAAGCGTCT	80
	下游 GTAGCGGGTATATGCGTGGG	
NQO1	上游 GAAGACATCATTCAACTACGCC	179
	下游 GAGATGACTCGGAAGGATACTG	
GCLC	上游 CTATCTGCCCAATTGTATGGC	120
	下游 CCTCCCGTGTCTATCATCTAC	
GAPDH	上游 CCAATGTGTCCGTCGTGGATC	149
	下游 GTTGAAGTCGCAGGAGACAA	

**2.7 统计学分析** 采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方

差分析,若方差齐性使用最小显著性差异法(LSD);方差不齐使用Tamhane's T2分析。等级资料采用Ridit分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 小鼠背部皮肤评价

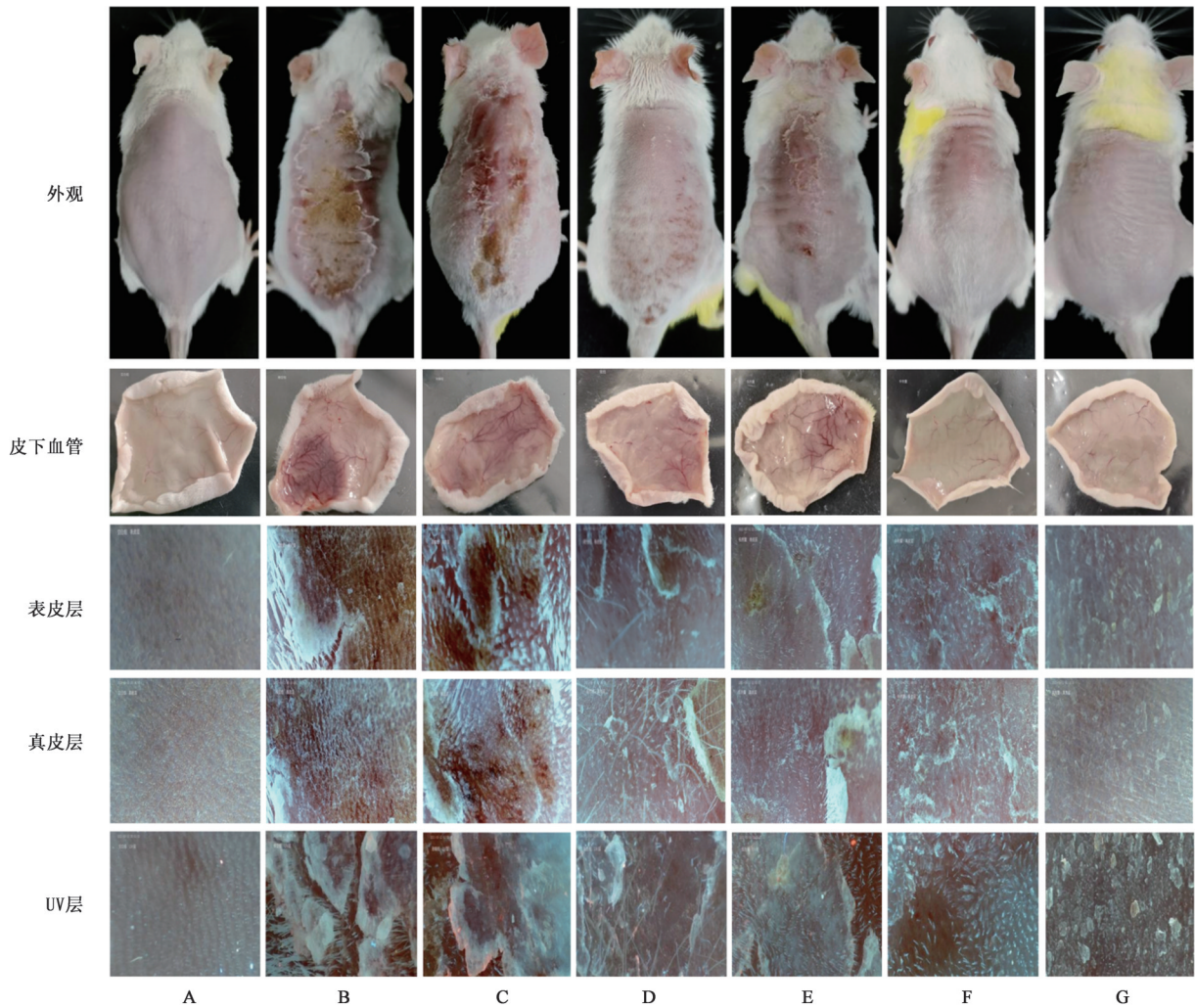
**3.1.1 对小鼠皮肤外观形态的影响** 肉眼观察小鼠、皮下血管、表皮、真皮和UV层的皮肤,模型组和溶媒组中小鼠背部皮肤粗糙增厚明显、皱纹加深加粗、色素大量沉积、皮下毛细血管扩张、有瘀点和瘀斑,表现出脱屑、皮革样外观,红斑和焦痂表现得较为明显。经维生素E及薰衣草总黄酮预防后的小鼠均出现一定程度的改善,其皮肤皱纹减轻、色素沉着变少、皮下血管扩张减轻,瘀点和瘀斑较少甚至无,红斑和焦痂出现较少;维生素E组的小鼠,皮肤损伤程度得到一定的改善,但无薰衣草总黄酮中、高剂量组显著,随着薰衣草总黄酮浓度的增加,光损伤小鼠皮肤外观改善的更为显著。见图1。

**3.1.2 皮肤外观损伤情况评分及水分、弹性的比较** 与空白组比较,模型组和溶媒组的外观评分显著升高( $P<0.01$ ),皮肤水分和弹性显著降低( $P<0.01$ ),表明损伤程度较为严重;与模型组比较,维生素E及薰衣草总黄酮低、中、高剂量组的外观评分显著降低( $P<0.01$ ),皮肤水分和弹性明显升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表2。

**3.2 对小鼠皮肤组织病理学变化的影响** 空白组小鼠的皮肤结构正常,真皮层可见胶原纤维平行排列,分布均匀、呈波浪状,未见炎细胞浸润等病理性改变;与空白组比较,模型组和溶媒组的表皮可见明显增厚,表皮层可见明显的结痂小脓肿,伴有不同程度的角化过度,棘层细胞增厚明显,可见棘突延长起伏。真皮层胶原纤维排列呈现紊乱、变性,交错无序状,同时伴有不同程度的炎细胞浸润、红细胞渗出;与模型组比较,维生素E组、薰衣草总黄酮低、中、高剂量组均有一定程度的减轻,其中高剂量组皮肤结构基本正常,在真皮层中未见明显排列混乱的胶原纤维。结合本实验中小鼠皮肤病理组织学改变,以表皮增厚、结痂脓肿、胶原纤维变性、炎细胞浸润等病理组织学改变为主要观察指标,综合分析评判。见图2,3,表3。

#### 3.3 皮肤组织氧化指标及促炎因子的检测

**3.3.1 对小鼠皮肤组织氧化指标水平的影响** 与空白组比较,模型组和溶媒组的MDA和NOS的水平明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),SOD和T-AOC的水



A. 空白组; B. 模型组; C. 溶媒组; D. 维生素E组; E. 薰衣草低剂量组; F. 薰衣草中剂量组; G. 薰衣草高剂量组(图2,3同)

图1 薰衣草总黄酮对UVB致小鼠皮肤光损伤的防护作用

Fig. 1 Protective effect of total flavonoids of lavender on skin light damage of KM mice induced by UVB

表2 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤外观损伤情况评分及水分、弹性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 2 Effect of lavender total flavonoids on skin appearance damage score, moisture and elasticity of mice ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	外观评分/分	水分/%	弹性/分
空白		0.13±0.12	22.92±3.83	46.42±2.64
模型		13.21±1.76 <sup>2)</sup>	11.17±1.40 <sup>2)</sup>	40.92±0.99 <sup>2)</sup>
溶媒		13.07±1.65 <sup>2)</sup>	10.83±1.19 <sup>2)</sup>	41.33±1.15 <sup>2)</sup>
维生素E	0.013	8.85±2.54 <sup>4)</sup>	13.67±2.67 <sup>3)</sup>	42.58±1.24
薰衣草总黄酮	0.25	5.49±1.71 <sup>4)</sup>	14.83±2.89 <sup>4)</sup>	42.33±1.07
	1.25	3.36±1.21 <sup>4)</sup>	22.00±3.30 <sup>4)</sup>	46.00±2.62 <sup>4)</sup>
	2.50	1.79±0.38 <sup>4)</sup>	22.08±2.71 <sup>4)</sup>	45.42±1.73 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表3-6同)。

平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ), GSH-Px有下降趋势, 但差异无统计学意义;与模型组比较, 薰衣草总黄酮低、中、高剂量组MDA和NOS水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ), 其中低剂量组有下降趋势, 但差异无统计学意义; SOD和T-AOC水平明显升高( $P<0.05,$

$P<0.01$ ), 高剂量组的GSH-Px含量明显升高( $P<0.05$ ), 在低、中剂量中有上升趋势, 但与模型组比较差异无统计学意义。见表4。

3.3.2 对小鼠皮肤炎症细胞因子含量的影响 与空白组比较, 模型组和溶媒组的IL-1, IL-6和TNF- $\alpha$

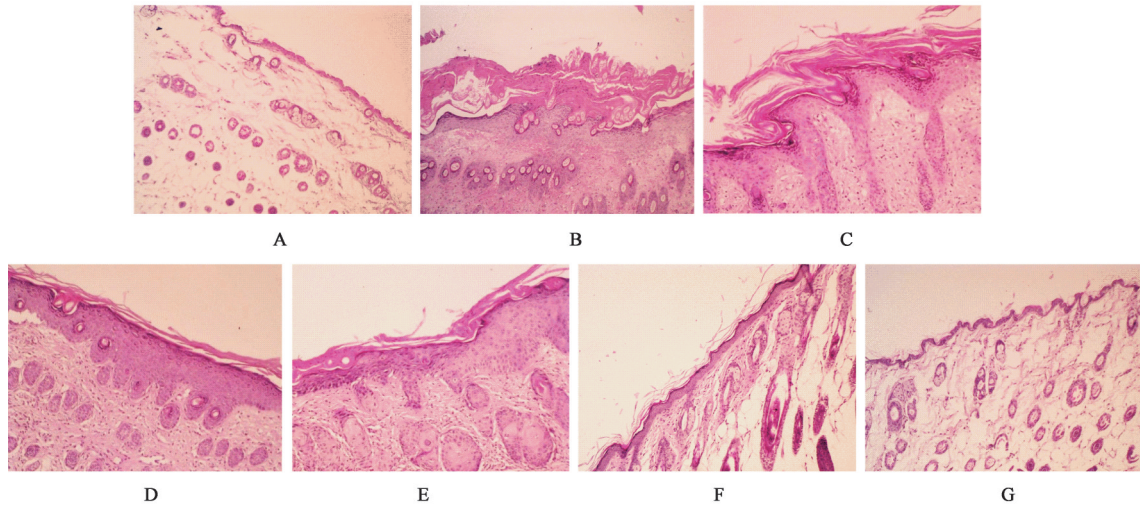


图2 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤组织病理学改变的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effect of lavender total flavonoids on skin histopathological changes in mice (HE, ×100)

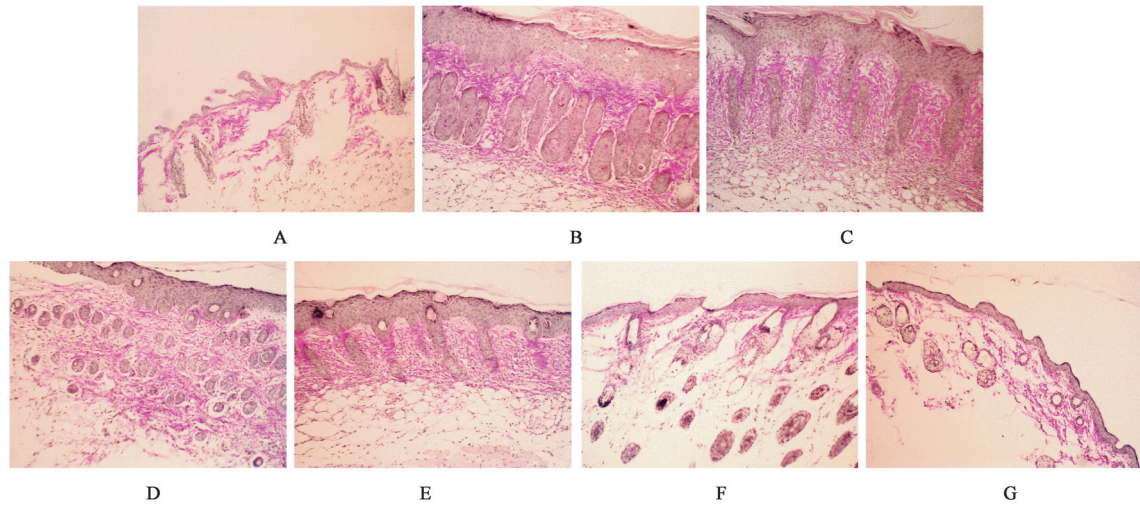


图3 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤组织病理学改变的影响 (VG, ×100)

Fig. 3 Effect of lavender total flavonoids on skin histopathological changes in mice (VG, ×100)

表3 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤光损伤防护作用的病理组织学检查结果分析 (n=12)

Table 3 Analysis of histopathological examination results of protective effect of lavender total flavonoids on skin photoaging in mice (n=12)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	病变程度分级				Ridit ( $\bar{x}\pm s$ )
		-	+	++	+++	
空白		12	0	0	0	0.18±0.00
模型		0	1	9	2	0.82±0.11 <sup>2)</sup>
溶媒		0	5	5	2	0.72±0.18 <sup>2)</sup>
维生素E	0.013	2	6	4	0	0.56±0.22 <sup>4)</sup>
薰衣草总黄酮	0.25	3	7	2	0	0.49±0.21 <sup>4)</sup>
	1.25	5	5	2	0	0.43±0.24 <sup>4)</sup>
	2.50	8	4	0	0	0.29±0.16 <sup>4)</sup>

的水平明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与模型组比较, 维生素E组 IL-1, IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平显著降低 ( $P<0.01$ ), 薰衣草总黄酮低、中、高剂量组的 IL-1, IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 其中薰

衣草低剂量组的 IL-1, IL-6 水平有下降趋势, 但与模型组比较差异无统计学意义。见表5。

3.4 对小鼠皮肤组织中 Nrf2, Keap1, Bach1, HO-1, NQO1, GCLC mRNA 表达的影响 与空白组比较,

表4 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤组织MDA, SOD, T-AOC, GSH-Px和NOS水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of lavender total flavonoids on levels of MDA, SOD, T-AOC, GSH-Px and NOS in skin tissue of mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	T-AOC/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	NOS/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白		1.34±2.92	724.96±88.25	3.25±0.76	12.06±2.96	1.83±0.32
模型		1.83±0.63 <sup>1)</sup>	590.85±108.07 <sup>1)</sup>	2.07±0.27 <sup>2)</sup>	11.07±2.04	2.62±0.95 <sup>2)</sup>
溶媒		1.88±0.47 <sup>1)</sup>	559.61±73.74 <sup>1)</sup>	2.01±0.76 <sup>2)</sup>	10.94±1.89	2.67±0.51 <sup>2)</sup>
维生素E	0.013	1.38±0.44 <sup>3)</sup>	757.00±185.46 <sup>3)</sup>	3.76±0.75 <sup>4)</sup>	13.32±2.81	1.89±0.33 <sup>3)</sup>
薰衣草总黄酮	0.25	1.64±0.38	738.96±127.19 <sup>3)</sup>	2.96±0.61 <sup>3)</sup>	12.76±1.87	2.16±0.42
	1.25	1.36±0.31 <sup>3)</sup>	730.38±111.09 <sup>3)</sup>	3.04±0.68 <sup>3)</sup>	12.70±1.95	1.93±0.29 <sup>3)</sup>
	2.50	1.18±0.28 <sup>4)</sup>	765.64±66.58 <sup>4)</sup>	3.52±0.69 <sup>4)</sup>	13.46±1.93 <sup>3)</sup>	1.83±0.30 <sup>4)</sup>

表5 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤炎症细胞因子表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of lavender total flavonoids on expression level of inflammatory cytokines in skin of mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1	IL-6	TNF- $\alpha$
空白		165.86±4.94	1 570.45±51.73	1 514.05±55.96
模型		182.66±9.13 <sup>2)</sup>	1 707.55±142.11 <sup>1)</sup>	1 783.40±186.09 <sup>2)</sup>
溶媒		185.74±9.53 <sup>2)</sup>	1 723.18±127.69 <sup>1)</sup>	1 806.05±211.92 <sup>2)</sup>
维生素E	0.013	164.49±13.58 <sup>4)</sup>	1 548.09±51.04 <sup>4)</sup>	1 554.75±70.65 <sup>4)</sup>
薰衣草总黄酮	0.25	173.12±8.29	1 631.50±59.66	1 595.80±92.95 <sup>3)</sup>
	1.25	166.92±9.11 <sup>3)</sup>	1 493.68±96.39 <sup>4)</sup>	1 602.75±107.34 <sup>3)</sup>
	2.50	159.10±12.86 <sup>4)</sup>	1 559.64±55.51 <sup>3)</sup>	1 533.05±56.27 <sup>4)</sup>

模型组的Nrf2, Keap1, NQO1, GCLC mRNA表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ), Bach1 mRNA的表达显著升高( $P<0.01$ ), HO-1 mRNA的表达有上升趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,维生素E组及薰

衣草总黄酮低、中、高剂量组的Nrf2, Keap1, HO-1, NQO1, GCLC mRNA的表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ), Bach1 mRNA的表达显著降低( $P<0.01$ )。见表6。

表6 薰衣草总黄酮对皮肤组织中Nrf2, Keap1, Bach1, HO-1, NQO1, GCLC mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 6 Effect of lavender total flavonoids on Nrf2, Keap1, Bach1, HO-1, NQO1, GCLC mRNA expression in skin tissue ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nrf2	Keap1	Bach1	HO-1	NQO1	GCLC
空白		1.02±0.26	1.17±0.32	1.12±0.48	1.03±0.27	1.08±0.49	1.11±0.65
模型		0.70±0.10 <sup>1)</sup>	0.38±0.60 <sup>1)</sup>	4.21±1.71 <sup>2)</sup>	1.40±0.63	0.23±0.15 <sup>2)</sup>	0.34±0.19 <sup>1)</sup>
溶媒		0.65±0.13 <sup>2)</sup>	0.40±0.52 <sup>1)</sup>	1.52±0.96	1.09±0.41	0.05±0.47 <sup>2)</sup>	0.36±0.20 <sup>1)</sup>
维生素E	0.013	1.11±0.24 <sup>4)</sup>	1.50±0.22 <sup>3)</sup>	1.50±0.70 <sup>4)</sup>	1.62±0.47	1.90±0.45 <sup>4)</sup>	1.39±0.63 <sup>4)</sup>
薰衣草总黄酮	0.25	0.79±0.38	1.09±1.18	0.11±0.14 <sup>4)</sup>	3.33±5.39	0.53±0.31	0.79±0.69
	1.25	1.00±0.17 <sup>3)</sup>	2.91±0.73 <sup>4)</sup>	1.88±0.71 <sup>4)</sup>	2.77±0.56	1.34±0.44 <sup>4)</sup>	0.49±0.13
	2.50	1.41±0.22 <sup>4)</sup>	3.49±0.87 <sup>4)</sup>	2.81±1.03 <sup>4)</sup>	9.10±2.00 <sup>4)</sup>	3.05±1.28 <sup>4)</sup>	1.48±0.76 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

近年来,随着大气臭氧层的破坏及人类生活方式发生改变,因紫外线而造成的各种皮肤病的发生率逐年递增。2019年,美国癌症协会根据其监测的数据发现,皮肤黑色素瘤在最常见的三种癌症中排名第三位<sup>[9]</sup>。皮肤光损伤主要是由紫外线照射引起的,其介导的氧化应激和炎症反应是光损伤发病机制中的关键因素。因此,开发有效抗紫外的药物将

重点放在预防光损伤过程中的氧化损伤和炎症反应<sup>[10]</sup>。

当过量紫外线辐照皮肤时,机体将会产生氧化应激反应<sup>[11]</sup>。此时ROS在体内生成过多或者机体对其清除减缓,导致ROS大量堆积、氧化及抗氧化系统在机体内失去平衡,进而导致皮肤组织受到损伤<sup>[12-13]</sup>。其中,多种小分子量的抗氧化剂构成了抗氧化系统,当机体受到活性氧介导的干扰,主要由

SOD, CAT, GSH-Px 等保护细胞免受损伤<sup>[14]</sup>。SOD, GSH-Px 活性水平与MDA是相辅相成的, SOD, GSH-Px 活性的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力, 而MDA水平的高低又间接的反映了机体受到自由基攻击的严重程度。本实验研究发现, 薰衣草总黄酮能够显著降低MDA, NOS的含量, 升高SOD, GSH-Px和T-AOC的活力, 从而防护小鼠皮肤光损伤。

紫外线长期反复的照射会导致局部皮肤甚至全身免疫系统的免疫应答能力降低<sup>[15]</sup>。IL-6是炎细胞因子的一种, 生物学活性十分广泛, 与紫外辐射引起的炎症反应密切相关<sup>[16]</sup>。当受到紫外线等外来因素刺激时, 可诱导包括自身在内的多种细胞因子IL-1和TNF- $\alpha$ 及一些炎症介质的产生, 形成恶性循环, 损伤组织, 继而加重炎症反应<sup>[17]</sup>。本实验研究发现, 薰衣草总黄酮能够显著降低IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 等细胞炎症因子的表达, 从而可以抑制UVB诱导的皮肤炎症。

在抗炎活性和抗氧化能力方面, 薰衣草总黄酮有着较强的作用。在目前发现的众多抗氧化通路中, Nrf2信号通路是极为重要的, Kelch样环氧氯丙胺相关蛋白1(Keap1)/Nrf2/抗氧化反应元件(ARE)信号通路是最重要的抗氧化应激通路<sup>[18]</sup>, 其调控的下游II相代谢酶和抗氧化蛋白/酶在细胞防御保护中发挥重要作用。在生理状态下, Keap1负性调控Nrf2, 在泛素连接酶3的作用下Nrf2与Keap1结合成二聚体, 使Nrf2无法进入细胞核内进行转录而停留在细胞质中, 之后进一步被迅速分解; 此时Bach1基本存在于胞核中, 与Maf识别元件(MAREs)结合, 而形成一种异二聚体抑制ARE, 导致下游受其调控的抗氧化物酶的表达受到抑制<sup>[19-20]</sup>。在氧化应激时, Keap1与Nrf2发生解偶联后, Nrf2进入细胞核后与MAREs结合成异二聚体, 后识别并结合ARE, 调控下游解毒酶和抗氧化蛋白的表达, 转录出血红素氧合酶-1(HO-1), 醌氧化还原酶1(NQO1)和谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)等, 因此能够降低UVB对组织和细胞的氧化损伤, 而起到防护作用<sup>[21-22]</sup>。本实验研究表明, 薰衣草总黄酮通过显著升高Nrf2, Keap1, HO-1, NQO1, GCLC mRNA的表达, 降低Bach1 mRNA的表达, 来抑制UVB诱导的皮肤光损伤。

本研究采用紫外光疗仪照射KM小鼠背部皮肤, 通过肉眼观察及病理切片结果显示, 模型组小鼠外观、皮下血管扩张, 表皮层、真皮层和UV层皮

肤损伤程度严重; 皮肤水分和弹性明显降低, 以及MDA, NOS明显升高, SOD, T-AOC明显降低, IL-1, IL-6和TNF- $\alpha$ 显著升高, Nrf2, Keap1, HO-1, NQO1, GCLC mRNA的表达明显降低, Bach1 mRNA的表达显著升高, 表明皮肤光损伤小鼠模型构建成功。薰衣草总黄酮可有效抑制紫外线辐射引起小鼠皮肤粗糙和皮肤损伤等表观现象, 并具有一定的剂量效应关系, 且实验所用溶剂对该模型结果几乎没有影响, 薰衣草总黄酮能够保护小鼠背部皮肤中的抗氧化酶类, 提高其生物活性, 且能够发挥抗炎作用, 降低促炎性因子表达, 同时减少脂质过氧化产物的堆积, 抑制氧化应激反应。

本实验结果表明, 薰衣草总黄酮能够预防中波紫外线诱导的小鼠皮肤光损伤模型, 对小鼠皮肤组织具有明显的防护作用, 其作用机制可能与激活Keap1/Nrf2/ARE信号通路, 减轻炎症反应, 调节氧化应激反应的平衡有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] WANG M L, ZHONG Q Y, LIN B Q, et al. Andrographolide sodium bisulfate attenuates UV induced photodamage by activating the keap1/Nrf2 pathway and downregulating the NF- $\kappa$ B pathway in HaCaT keratinocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(2): 343-352.
- [2] 高爱莉, 周欣, 江娜, 等. Nrf2及其下游抗氧化因子在茶多酚防御UVB致无毛鼠皮肤急性光损伤中的表达及意义[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2017, 31(8): 842-845.
- [3] 苟军丽, 杨程, 李元杰, 等. 基于网络药理学研究甘草-石榴皮复配抗紫外线致皮肤光损伤的保护作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 178-186.
- [4] 龚婕, 马良娟. 皮肤光老化和抗氧化剂研究进展[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2019, 35(11): 692-695.
- [5] 蔡永智, 郝晓云, 王力, 等. 中国薰衣草产业发展现状及对策[J]. *北方园艺*, 2020, doi: 10.11937/bfyy.20194260.
- [6] 徐攀. 薰衣草益智药效组分及基于抗氧化作用的机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [7] 谭为, 张兰兰, 徐磊, 等. 薰衣草总黄酮抗UVB致皮肤光损伤的防护作用[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(5): 1087-1090.
- [8] 王诗萌, 李甜, 杨田野, 等. 紫外线照射实验动物的皮肤光老化模型研究进展[J]. *中国美容医学*, 2018, 27(7): 146-150.

- [9] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5):363-385.
- [10] XIAN D, GAO X, XIONG X, et al. Photoprotection against UV-induced damage by skin-derived precursors in hairless mice [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 175:73-82.
- [11] 李小婷, 王丹, 庞玉新, 等. 左旋龙脑对UVB辐射后小鼠皮肤光损伤的影响[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(4):518-524.
- [12] 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.
- [13] SEO W Y, GOH A R, JU S M, et al. Celastrol induces expression of heme oxygenase-1 through ROS/Nrf2/ARE signaling in the HaCaT cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(3):535-540.
- [14] WU P Y, LYU J L, LIU Y J, et al. Fisetin regulates Nrf2 expression and the inflammation-related signaling pathway to prevent uvb-induced skin damage in hairless mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2118.
- [15] 王业秋, 陈巧云, 李建民, 等. 绿原酸对紫外线损伤的HaCaT细胞肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白细胞介素6表达的调节[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(1):63-67
- [16] LIN P, HWANG E, NGO H T T, et al. *Sambucus nigra* L. ameliorates UVB-induced photoaging and inflammatory response in human skin keratinocytes [J]. *Cytotechnology*, 2019, 71(5):1003-1017.
- [17] LEE C, PARK G H, AHN E M, et al. Protective effect of *Codium fragile* against UVB-induced pro-inflammatory and oxidative damages in HaCaT cells and BALB/c mice [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86:54-63.
- [18] GREENWALD M B, ANZI S, BEN S S, et al. Can nitroxides evoke the Keap1-Nrf2-ARE pathway in skin? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 77:258-269.
- [19] WANG P W, CHENG Y C, HUNG Y C, et al. Red raspberry extract protects the skin against UVB-induced damage with antioxidative and anti-inflammatory properties [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, doi:10.1155/2019/9529676.
- [20] 张尔婷. Bach1在紫檀芪防御UV致HaCaT细胞急性光损伤中的作用[D]. 广州:广州医科大学, 2017.
- [21] YANG S, ZHOU B, XU W, et al. Nrf2-and Bach1 may play a role in the modulation of ultraviolet a-induced oxidative stress by acetyl-11-Keto- $\beta$ -boswellic acid in skin keratinocytes [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2017, 30(1):13-23.
- [22] JANJETOVIC Z, JARRETT S G, LEE E F, et al. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: involvement of NRF2-mediated pathways [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):1274.

[责任编辑 孙丛丛]