

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学及实验验证探讨薰衣草对皮肤光损伤的防护作用机制

杨雅¹, 包海燕¹, 康莹莹¹, 刘荣昌¹, 周茂杰¹, 谭为^{1,2*}, 顾政一^{2*}

(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:运用网络药理学和分子对接技术预测薰衣草防护皮肤光损伤的活性成分及作用机制,并通过动物实验进一步验证可能的信号通路。方法:通过 SwissTargetPrediction, PharmMapper 数据库和查阅文献获取薰衣草的活性成分及潜在作用靶点;通过 GeneCards、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、DrugBank 和 DisGeNET 数据库获取皮肤光损伤相关靶点;筛选获得两者的共同靶点后,采用 STRING 分析靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,利用 Cytoscape 3.8.2 软件中“CytoNCA”插件对该 PPI 网络做拓扑分析和核心靶点筛选,使用 DAVID 数据库对交集靶点进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,选取薰衣草中的活性成分和信号通路上的蛋白通过 AutoDock vina 1.1.2 软件进行分子对接验证;最后通过 UVB 辐照小鼠背部裸露皮肤建立光损伤模型,肉眼观察小鼠的皮肤状态,采用苏木素-伊红(HE)和苦味酸-酸性品红法(VG)染色观察小鼠皮肤组织病理学改变,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠皮肤组织中蛋白的表达水平,进一步验证关键的信号通路。结果:该研究共筛选出薰衣草活性成分 6 个,潜在靶点 526 个,预测疾病相关靶点 2 688 个,药物-疾病交集靶点 258 个,PPI 网络筛选出核心靶点 16 个,KEGG 通路分析筛选了 113 条相关信号通路,其中磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)通路、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路可能在薰衣草防护皮肤光损伤中起关键作用,分子对接结果显示,活性成分和信号通路上的蛋白对接良好。动物实验结果表明,薰衣草总黄酮能够明显改善小鼠皮肤外观状态和组织病理学,并显著降低磷酸化(p)-PI3K、p-Akt、B 细胞淋巴瘤(Bcl)-2 蛋白的相对表达水平($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),明显升高 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的相对表达量($P < 0.05$)。结论:该结果表明,薰衣草抗皮肤光损伤具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点,为后续深入研究薰衣草抗皮肤光损伤的复杂机制提供依据。

[关键词] 薰衣草; 皮肤光损伤; 网络药理学; 分子对接; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0167-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220514 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220216.1531.008.html>

[网络出版日期] 2022-02-16 17:37

Protective Mechanism of Lavender Against Skin Photodamage Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

YANG Ya¹, BAO Hai-yan¹, KANG Ying-ying¹, LIU Rong-chang¹, ZHOU Mao-jie¹, TAN Wei^{1,2*},
GU Zheng-yi^{2*}

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

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To predict the active ingredients and mechanism of action of lavender in

[收稿日期] 2021-12-08

[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

protecting skin photodamage based on network pharmacology and molecular docking technology, and further verify possible signal pathways via animal experiments. **Method:** The active ingredients and potential targets of lavender were obtained by SwissTargetPrediction, PharmMapper, and literature. Skin photodamage-related targets were searched from GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), DrugBank and DisGeNET databases. After common targets of the two were screened out, STRING was adopted to analyze the protein-protein interaction (PPI) network, where topological analysis and core target screening were performed by CytoNCA plug-in of Cytoscape 3.8.2. Based on DAVID, gene ontology (GO) annotations and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out among the intersection targets, and the active ingredients of lavender and the signal pathway proteins were selected and verified via molecular docking with AutoDock vina 1.1.2. Finally, mouse photodamage model was established by UVB irradiating the bare skin of mouse back, and the skin condition was observed by naked eyes. Hematoxylin-eosin (HE) and picric acid-acid fuchsin staining (Van Gieson, VG) were used to observe the pathological changes of mouse skin tissues. Western blot was employed to detect the protein expression in mouse skin tissues to further validate the key signal pathways. **Result:** In this study, 6 active ingredients of lavender, 526 potential targets, 2 688 disease-related targets, and 258 intersection targets were screened out, and 16 core targets were obtained by PPI network. Additionally, 113 related signal pathways were obtained by KEGG pathway analysis, among which phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signal pathway might play a key role in skin photodamage protection by lavender. Molecular docking showed that the active ingredients and the signal pathway proteins were well docked. Animal experiments indicated that the total flavonoids of lavender improved the appearance and histopathological condition of mouse skin, reduced the relative expression levels of phosphorylated(p)-PI3K, p-Akt, and B cell lymphoma 2 (Bcl-2) proteins ($P<0.05$, $P<0.01$), and increased relative expression level of Bcl-2-associated X protein (Bax) ($P<0.05$). **Conclusion:** Lavender exerts synergistic effect in resisting skin photodamage, with the characteristics of multi-components, multi-targets, and multi-pathways, which provides a basis for subsequent in-depth research on the complex mechanism of lavender against skin photodamage.

[Keywords] lavender; skin photodamage; network pharmacology; molecular docking; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signal 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^[1]。长期过量辐射中波紫外线UVB(280~320 nm)会直接诱导蛋白质、DNA、脂质等生物大分子损伤,还可上调活性氧(ROS)的生成引起细胞氧化应激,诱发皮肤细胞凋亡、细胞外基质(ECM)降解,肿瘤相关信号激活,进而导致皮肤损伤、皱纹加深,癌变等^[2-4]。皮肤光损伤不仅会引起皮肤的日渐衰老,还会影响美观和容貌,且与临床上许多皮肤病密切相关,如日光性雀斑样痣、光化性弹力纤维病、日光性角化病、鳞状细胞癌等^[5-6]。皮肤光损伤的防御、治疗和改善已经成为了国际上热点关注的问题,因此,研究具有确切的抗皮肤光损伤作用的药物,并阐述其抗皮肤光损伤的作用机制是目前亟待解决的问题。

薰衣草为唇形科植物狭叶薰衣草(*Lavandula angustifolia*)的干燥地上部分。在新疆蕴藏丰富,薰

衣草含有挥发油、黄酮类、香豆素、有机酸类、甾醇类等多种生物活性成分,且药用历史悠久,具有抗抑郁、抗惊厥、抗焦虑、镇静催眠、解痉利尿、解腹胀和抗呼吸道感染的作用^[7-12],此外,在疼痛、偏头痛和癫痫等疾病的治疗中有着良好的效果^[13-14]。目前国内外有关薰衣草的研究主要集中在化学成分、精油提取等方面,对薰衣草抗皮肤光损伤方面的报道较少。

网络药理学是通过构建中药成分、靶点、通路、疾病的网络关系,是一门分析中药作用机制的新兴学科;以生物信息学理论为基础,结合了基因组学、药代动力学等多种学科,通过各种网络模型的可视化分析,明确药物治疗疾病的可能机制^[15-16]。本研究以网络药理学方法和分子对接技术为基础,结合动物实验验证,深入研究薰衣草抗皮肤光损伤的主要活性成分和相关信号通路,阐述了其可能的作用

机制,为后续实验设计和临床应用提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 薰衣草有效成分的收集及靶点的筛选 通过 CNKI、万方及 PubMed 数据库中查阅有关薰衣草化学成分文献,通过借助中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP (<http://tcmssp.com/tcmssp.php>) 根据药物体内的 ADME 过程,对其化学成分进行药代动力学筛选。以生物口服利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18 为筛选标准,筛选出活性成分。根据 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 分析平台和 PharmMapper (<https://www.pharmgkb.org/>) 预测各活性成分的靶点,采用 Cytoscape 3.8.2 软件对潜在活性成分和作用靶点的关系网络进行绘制和分析。

1.2 皮肤光损伤靶点的收集 利用 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)、DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库筛选疾病的靶点,选择物种为“Homo sapiens”,以“Skin inflammation”和“Skin damage”为关键词检索获取作用靶点,收集得到与皮肤光损伤发生、发展密切相关的靶点基因。将筛选到的薰衣草和皮肤光损伤靶点分别上传到 Venny 2.1 在线工具 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),绘制韦恩图,获得其交集靶点。

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将疾病-药物交集靶点通过 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库构建靶标蛋白 PPI 网络,选取“Homo sapiens”为蛋白属种,设置“Medium confidence=0.400”,获得 PPI 网络,并下载“tsv”格式文件,利用 Cytoscape 3.8.2 软件中的插件 CytoNCA 进行网络拓扑分析,得到薰衣草抗皮肤光损伤的核心靶点。

1.4 基因本体(GO)生物功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集 通过 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对药物-疾病核心靶基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析,选择 $P < 0.05$ 为筛选条件。利用微生信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将 GO 和 KEGG 通路富集结果绘制成柱状图及气泡图。

1.5 分子对接验证 利用 Pubchem 数据库和 Open Babel 软件得到薰衣草活性成分的“mol2”格式文件。从 RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下

载磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、B 细胞淋巴瘤(Bcl)-2 和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的 3D 结构,运用 PyMOL 软件对蛋白质进行去水、加氢等操作,保存为“pdb”格式,再经过 AutoDock Tools-1.5.6 软件将蛋白和活性成分的格式转置为“pdbqt”格式,最后经过 Autodock-vina 1.1.2 软件将对接盒子调整后,进行分子对接,得到结合能。

1.6 动物实验

1.6.1 动物 30 只 SPF 级雌性健康昆明小鼠,6~8 周龄,体质量 18~22 g,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。实验前分笼饲养,适应性喂养 1 周,该实验由新疆维吾尔自治区药物研究所伦理委员会审核批准(编号 XJIMM-2021007)。

1.6.2 药物、试剂与仪器 薰衣草总黄酮(由新疆维吾尔自治区药物研究所药理 1 室自制,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%)。苏木素染色液、伊红染色液、Van Gieson(VG)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为 BA4097、C210704、C210301),高效 RIPA 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、4×蛋白质上样缓冲液(索莱宝科技有限公司,批号分别为 20210512、20210729、20210719、20210131),蛋白预染 Marker(美国 Thermo Fisher 科技公司,批号 01042490),脱脂奶粉(德国 Bio Froxx 公司,批号 EZ7890D181),ECL 化学发光试剂(Biosharp 公司,批号 21208636),兔抗 PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、Akt 抗体、磷酸化(p)-Akt 抗体、 β -肌动蛋白(actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology,批号分别为 4257、4228、9272、9271、3700),兔抗 Bax(北京 Bioss 生物技术有限公司,批号 0127),兔抗 Bcl-2(英国 Abcam 公司,批号 ab182858),山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G/辣根过氧化物酶标记(中杉金桥,批号 210830106)。

1.6.3 仪器 Multiskan GO 型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher 科技公司),PowerPac 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad),GL-88B 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),SK-O180E 型摇床(美国 SCILOGEX),FluorChem E Alpha 化学发光凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司)。

1.6.4 小鼠皮肤光损伤模型的构建及药物干预方案 将 30 只雌性昆明小鼠随机分为 3 组,每组 10 只,分别为空白组(无 UVB 照射)、模型组(UVB 照射)、给药组(UVB 照射+2.50 g·kg⁻¹薰衣草总黄

酮), 给药剂量参考课题组前期研究^[17]。实验照射前1 d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4 cm×2 cm, 确定照射距离为鼠背离照射灯20 cm, UVB照射强度为13 mw·cm⁻², 持续照射1周, 第1天与最后1 d的照射时间为10 min, 其余5 d为15 min, 照射总剂量74.1 J·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^[17-18]。给药组每只小鼠给药量为1 mL, 照射前30 min平铺纱布(大小4 cm×2 cm)于小鼠裸露的皮肤处, 均匀外涂药物1 mL, 敷药时间约为10 min, 空白组给予等量蒸馏水, 每天照射前外涂用药1次, 连续7 d。

1.6.5 小鼠背部皮肤评价 实验结束后观察小鼠背部的皮肤形态, 将得到的皮肤组织, 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。

1.6.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析 选取各组小鼠的皮肤组织, 采用Western blot检测Bcl-2、Bax蛋白和PI3K、Akt蛋白及其磷酸化表达。提取蛋白后, 按BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白含量。制备10%的SDS-PAGE凝胶, 取蛋白样品15 μL上样, 进行凝胶电泳, 300 mA转膜60 min至PVDF膜上; 5%的脱脂奶粉室温封闭2 h, 4℃一抗置摇床上孵育过夜, TBST洗膜3次, 二抗室温孵育1 h, 再用TBST洗膜3次, 每次15 min, 后用ECL发光试剂显色, 于凝胶成像系统检测目的蛋白条带, 采用Image J对蛋白条带进行定量分析。

1.6.7 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, 若方差齐使用最小显著性差异法(LSD); 方差不齐使用Tamhane's T₂分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 薰衣草有效成分的收集及靶点筛选 在CNKI、万方及PubMed数据库中共搜索到薰衣草化学成分233个, 根据生物OB和DL参数对薰衣草化学成分筛选后得6种活性成分, 见表1。根据SwissTargetPrediction分析平台和PharmMapper预测成分靶点, 删除重复靶点后, 共得到526个潜在作用靶点。

2.2 药材-活性成分-靶点网络构建与分析 将上述

表1 薰衣草活性成分信息

Table 1 information of lavender active ingredients

MOL ID	化合物		OB/%	DL
	英文名称	中文名称		
MOL000006	luteolin	木犀草素	36.16	0.25
MOL001494	ethyl linoleate	亚油酸乙酯	42.00	0.19
MOL001506	squalene	鲨烯	33.55	0.42
MOL007180	tocopherol	生育酚	32.29	0.70
MOL001495	ethyl linolenate	亚麻酸乙酯	46.10	0.20
MOL000008	apigenin	芹菜素	23.06	0.21

活性成分及预测靶点采用Cytoscape 3.8.2对潜在活性成分和作用靶点的关系网络进行绘制和分析, 靶点对应成分越多, 说明该靶点重要性越高。见增强出版附加材料。

2.3 药物-疾病交集靶点获取 本研究通过检索疾病相关的数据库, 收集得到与皮肤光损伤发生、发展密切相关的靶点基因, 其中GeneCards、OMIM、DrugBank和DisGeNET数据库分别检索2 536、145、155和77个靶点, 删除重复靶点, 得到疾病相关作用靶点共2 688个。将筛选到的薰衣草和皮肤光损伤靶点分别上传到Venny 2.1.0在线工具, 绘制韦恩图, 获得其交集靶点共258个。见增强出版附加材料。

2.4 PPI网络构建及核心靶点筛选 将交集靶点通过STRING平台构建靶点蛋白的互作关系, 获得PPI蛋白互作网络图, 得到网络中共有258个相互作用节点, 3 954条边。并下载“.tsv”格式文件导入Cytoscape 3.8.2软件获得可视化网络图。最后利用Cytoscape 3.8.2软件中的插件CytoNCA进行网络拓扑分析, 计算参数度中心性(DC)、介数中心性(BC)和接近中心性(CC)的中位数分别为36、135.32和0.242, 筛选1倍中位数得到62个靶点, 2倍中位数得到16个靶点, 作为薰衣草抗皮肤光损伤的核心靶点, 见表2和增强出版附加材料。

2.5 GO和KEGG通路富集分析 通过DAVID 6.8.0数据库对药物-疾病核心靶基因进行GO基因功能注释和KEGG通路分析, 选择 $P < 0.05$ 对结果统计, 得到GO功能富集条目685条, 其中生物过程506条, 细胞组分63条, 分子功能116条, 涉及到113条KEGG信号通路。选取BP、CC和MF中排名前10的条目绘制条形图, 对P排名前20的KEGG通路绘制气泡图, 见增强出版附加材料。

2.6 分子对接验证 为了进一步验证薰衣草对皮

表2 PPI网络拓扑分析核心靶点

Table 2 Core targets of PPI network topology analysis

序号	基因名	靶点名	DC	BC	CC
1	ALB	Serum albumin	134	2 392.268	0.662
2	Akt1	Akt Serine/Threonine Kinase 1	128	2 641.779	0.652
3	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	122	2 237.556	0.638
4	EGFR	Epidermal growth factor receptor	117	1 788.914	0.635
5	SRC	Tyrosine-protein kinase SRC	111	2 297.887	0.628
6	CASP3	Caspase-3	108	1 473.631	0.615
7	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	104	2 101.921	0.609
8	HRAS	GTPase HRas	101	1 486.757	0.609
9	ESR1	Estrogen receptor alpha	97	1 231.510	0.602
10	MMP-9	Matrix metalloproteinase-9	83	1 096.650	0.581
11	IGF1	Insulin-like growth factor I	82	848.733	0.574
12	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2	81	1 929.366	0.580
13	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	81	708.334	0.574
14	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	81	560.679	0.574
15	BCL2L1	Bcl-2-like protein 1	79	579.175	0.562
16	ANXA5	Annexin A5	72	576.215	0.565

肤光损伤的防护作用,检索相关文献且结合网络药理学 KEGG 通路富集结果,筛选出 PI3K/Akt 通路上的蛋白与薰衣草的活性成分进行分子对接,一般认为,对接能量值 $< -4.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} \approx 4.186 \text{ J}$) 表示两者间有一定的结合活性, $< -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示有较好的结合活性, $< -7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示有强烈的结合活性,分子对接结果见表3。将对接结果进行热图分析,见增强出版附加材料。

表3 薰衣草活性成分与靶蛋白的结合能

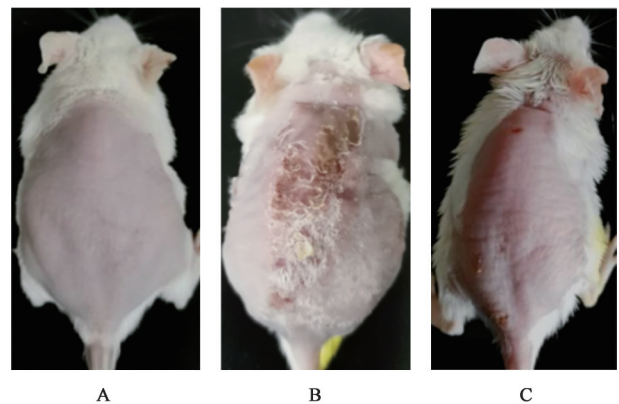
Table 3 Binding energy between Lavender active components and target proteins

薰衣草活性成分	结合能/ $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$			
	PI3K	Bax	Bcl-2	Akt
木犀草素	-9.7	-8.1	-8.0	-7.5
亚油酸乙酯	-6.2	-4.4	-5.1	-6.0
鲨烯	-7.6	-5.8	-6.3	-8.8
芹菜素	-9.6	-7.8	-7.9	-8.3
亚麻酸乙酯	-6.2	-4.6	-5.0	-5.7
生育酚	-9.6	-7.4	-8.2	-11.3

2.7 动物实验验证

2.7.1 小鼠背部皮肤评价 通过对小鼠皮肤外观形态的观察,与空白组比较,模型组小鼠背部皮肤出现大量色素沉积、有瘀斑瘀点出现、皮肤明显的增厚变糙、皱纹加粗加深,进一步出现皮革样外观,

红斑和焦痂表现较为明显。经给药干预后的小鼠外观可见较少的皱纹。见图1。



注:A. 空白组;B. 模型组;C. 给药组(图2-图4同)

图1 小鼠背部皮肤外观

Fig. 1 Appearance of mice back

2.7.2 组织病理学 空白组的皮肤结构正常,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;与模型组相比,给药组有一定程度的减轻,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。见图2和图3。

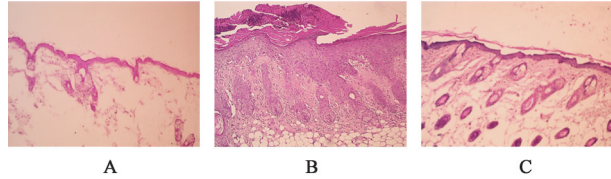


图2 薰衣草对小鼠皮肤组织病理学改变的影响(HE, ×100)
Fig. 2 Effect of lavender on histopathological changes of mouse skin (HE, ×100)

2.7.3 Western blot分析 Western blot对薰衣草抗皮肤光损伤关键信号通路上的蛋白进行验证。结果显示,与空白组比较,模型组的p-PI3K、p-Akt、

表4 薰衣草总黄酮对PI3K/Akt信号通路相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of lavender total flavonoids on PI3K/Akt signal pathway related proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin
空白组		0.92±0.08	0.61±0.07	1.25±0.21	0.88±0.14
模型组		0.51±0.14 ²⁾	0.41±0.02 ²⁾	0.87±0.12 ¹⁾	1.41±0.18 ²⁾
给药组	2.50	0.96±0.10 ⁴⁾	0.79±0.07 ⁴⁾	1.22±0.11 ³⁾	1.12±0.09 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

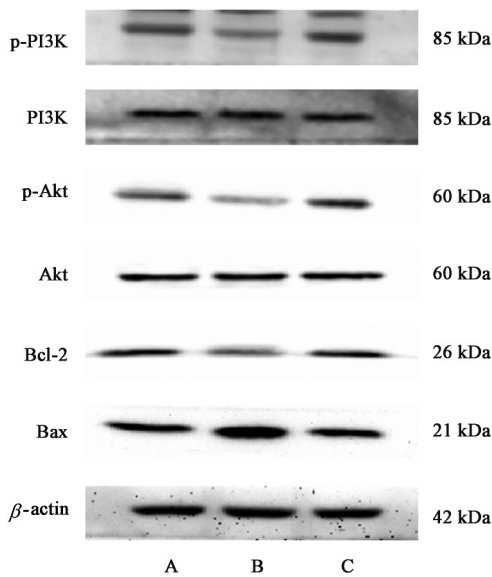


图4 各组小鼠皮肤组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2、Bax蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Bcl-2 and Bax proteins in skin tissues of mice in each group

3 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。有研究报道,全世界新诊断出的恶性肿瘤中有30%是皮肤恶性肿瘤,而90%皮肤恶性肿瘤的发生与UV,特别是UVB相关^[19]。据统计,全

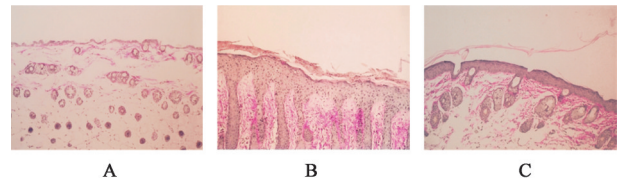


图3 薰衣草对小鼠皮肤组织病理学改变的影响(VG, ×100)
Fig. 3 Effect of lavender on histopathological changes of mouse skin (VG, ×100)

Bcl-2蛋白的相对表达水平降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$), Bax蛋白的相对表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,给药组的p-PI3K、p-Akt、Bcl-2蛋白的相对表达水平升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$),Bax蛋白的相对表达量显著降低($P<0.05$),见表4和图4。

球最常高发的癌症就包括皮肤癌,尤其是非黑色素瘤皮肤癌(NMSCs)仅美国每年有200多万人被确诊^[20]。在皮肤光损伤的机制研究中发现,其机制复杂多样,包含了细胞凋亡,炎症反应,氧化应激反应以及基质金属蛋白酶的作用等方面^[21]。本文利用网络药理学和分子对接技术探讨薰衣草的主要活性成分对皮肤光损伤的防护的潜在作用机制,为后续的实验设计和临床应用提供一定的理论基础和研究思路。

本研究通过网络药理学对薰衣草的活性成分进行筛选,筛选出防护皮肤光损伤的6种有效成分,其中木犀草素、芹菜素是对应靶点与信号通路数量较多的有效成分,且具有较好的口服利用度与成药性。同时也是薰衣草总黄酮的主要成分,本课题组前期对薰衣草化学成分进行了初步研究,已从薰衣草中分离得到了7个黄酮及酚酸类化合物^[22-24]。且前期实验表明,薰衣草总黄酮对小鼠^[17]、豚鼠^[25]皮肤光损伤有较好的防护作用。因此选用薰衣草总黄酮进行动物实验的验证。

通过KEGG富集分析的结果及参考文献报道^[26-27],其中PI3K/Akt信号通路、核转录因子(NF)- κ B信号通路在薰衣草防护皮肤光损伤中起关键作用,核心靶点Akt1、PTGS2、Bcl-2等在此富集,控制皮肤光损伤的基因表达过程。PI3K/Akt是细胞内

重要的信号传导通路之一,不仅与人类多种肿瘤的发生发展密切相关,而且在细胞凋亡、增殖及细胞周期方面发挥重要作用^[28]。PI3K是磷脂激酶家族中的一个重要成员,是由一个p110催化亚单位和一个p85调节亚单位组成的异源二聚体,具有脂类激酶活性和蛋白激酶活性^[29]。Akt是一种相对分子质量约为60 kDa,具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的蛋白质。PI3K/Akt通路中激活后的PI3K催化PIP2转化为PIP3,使得Akt发生磷酸化,p-Akt可抑制多种促凋亡蛋白表达及活化,发挥抗凋亡作用^[30-31]。本研究中,薰衣草总黄酮能够显著升高p-PI3K、p-Akt蛋白的相对表达,从而保护细胞,防护皮肤光损伤。

UV照射可导致线粒体功能障碍,最终引起细胞凋亡^[32]。内源性凋亡通路的线粒体通路中,促凋亡基因Bax和抗凋亡基因Bcl-2是线粒体凋亡途径过程中最为重要的调节因子^[33-34]。Bax主要通过升高线粒体膜通透性和促进细胞色素C的释放而起到诱导细胞凋亡作用,而Bcl-2主要通过减少线粒体细胞色素C的释放而发挥抗细胞凋亡作用^[35]。本研究中,薰衣草总黄酮能够显著升高Bcl-2蛋白的相对表达,同时,能够显著抑制Bax蛋白的相对表达,从而抑制细胞凋亡,防护皮肤光损伤。

综上所述,本文基于网络药理学及建立小鼠皮肤光损伤模型,探讨了薰衣草防护皮肤光损伤的作用机制,并选取PI3K/Akt信号通路进行进一步的验证。结果表明薰衣草可以通过多靶点、多通路对皮肤光损伤进行调控,且通过激活PI3K/Akt信号通路,起到抑制细胞凋亡、保护皮肤细胞的作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 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

[2] 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- κ B pathway in HaCaT keratinocytes[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(2): 343-352.

[3] 余金铭,车静,陈聪颖,等. 紫外线致皮肤光老化及光癌变机制的研究进展[J]. 中华整形外科杂志,2021, 37(2):220-224.

[4] LIN P, HWANG E, NGO H T, et al. *Sambucus nigra* L. ameliorates UVB-induced photoaging and inflammatory response in human skin keratinocytes

[J]. Cytotechnology, 2019, 71(5):1003-1017.

[5] 彭林. 中药抗皮肤光老化的作用机制与应用进展[J]. 内蒙古中医药,2021,40(5):160-161.

[6] 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

[7] 张轶,贺芳,何叶成,等. 薰衣草精油对抑郁症大鼠海马、杏仁核 pCREB 及 c-fos 表达影响的研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(2):194-198.

[8] 刘文彬,齐一凡,曹军,等. 薰衣草精油治疗小鼠烧伤的实验研究[J]. 四川生理科学杂志,2019,41(2): 99-102.

[9] 宋旺弟,申静,江敏,等. 薰衣草精油的纯化及安眠功效的研究[J]. 中国医院药学杂志,2018,38(18): 1911-1917.

[10] 朱燕. 薰衣草精油的提取及抑制枯草芽孢杆菌组效关系研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2018.

[11] 杨子微. 薰衣草油对昆明小鼠深 II 度烫伤创面和瘢痕的治疗作用[D]. 天津:天津医科大学,2018.

[12] 吴晶,朱金芳,薛顺,等. 复方薰衣草霜防治痤疮的试验研究[J]. 中医药导报,2018,24(4):14-17.

[13] 徐攀,王克柱,卢聪,等. 薰衣草对神经系统药理作用的研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,30(10): 1298-1302.

[14] 杨懿涵. 薰衣草精油的提取工艺及应用研究进展[J]. 当代化工研究,2018(11):152-153

[15] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读[J]. 中草药,2021,52(14):4119-4129.

[16] LUO T T, LU Y, YAN S K, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective[J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(1): 72-80.

[17] 杨雅,周茂杰,刘荣昌,等. 薰衣草总黄酮对小鼠皮肤光损伤的防护作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(2):112-120.

[18] 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.

[19] 涂颖. UVB 及其诱导合成的 DNA-PKcs-SIN1 复合物激活 PI3K/Akt/mTOR 细胞信号通路在皮肤肿瘤发病机制中的作用研究[D]. 昆明:昆明医科大学,2015.

[20] PAL H C, ATHAR M, EKMETS C A, et al. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathways in SKH-1 hairless mice[J]. Photochem Photobiol, 2015, 91(1):225-234.

[21] 刘陶,刘洋,夏庆梅,等. 中药及其复方抗皮肤光老化

- 的机制及应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 224-230.
- [22] 赵军, 徐芳, 谭为, 等. 狭叶薰衣草的化学成分[J]. 光谱实验室, 2012, 2(9): 147-150.
- [23] 李晨阳, 谭为, 陈燕, 等. 狭叶薰衣草特征指纹图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(4): 87-91.
- [24] 李晨阳, 赵军, 徐芳, 等. 狭叶薰衣草药材中迷迭香酸的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(3): 230-232.
- [25] 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.
- [26] ZHANG B, ZHAO Z, MENG X, et al. Hydrogen ameliorates oxidative stress via PI3K-Akt signaling pathway in UVB-induced HaCaT cells[J]. Int J Mol Med. 2018, 41(6): 3653-3661.
- [27] 张哈. 基于网络药理学、分子对接与实验验证探讨七宝美髯丹延缓皮肤光老化的机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [28] OZPOLAT B, BENBROOK D M. Targeting autophagy in cancer management strategies and developments[J]. Cancer Manag Res, 2015, 11(7): 291-299.
- [29] SHAWR J, CANTLEY L C. PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth[J]. Nature, 2006, 441(7092): 424-430.
- [30] RODRIGUEZ K J, WONG H K, ODDOS T, et al. A purified feverfew extract protects from oxidative damage by inducing DNA repair in skin cells via a PI3-kinase-dependent Nrf2/ARE pathway[J]. Dermatol Sci, 2013, 72(3): 304-310.
- [31] LI H, JIANG N, LIANG B, et al. Pterostilbene protects against UVB-induced photo-damage through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent Nrf2/ARE pathway in human keratinocytes[J]. Redox Rep, 2017, 22(6): 501-507.
- [32] YE J W, LI J, WANG X F, et al. Medicinal supplement genipin induces p53 and Bax-dependent apoptosis in colon cancer cells[J]. Oncol Letters, 2018, 16(3): 2957-2964.
- [33] EDISON N, CURTZ Y N. Degradation of Bcl-2 by XIAP and ARTS promotes apoptosis[J]. Cell Rep, 2017, 21(2): 442-454.
- [34] CHEN F, TANG Y, SUN Y, et al. 6-shogaol, a active constituents of ginger prevents UVB radiation mediated inflammation and oxidative stress through modulating Nrf2 signaling in human epidermal keratinocytes (HaCaT cells)[J]. Photochem Photobiol B, 2019, 197: 111518.
- [35] PIAO M J, KANG K A, ZHEN A X, et al. Horse oil mitigates oxidative damage to human HaCaT keratinocytes caused by ultraviolet B irradiation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1490.

[责任编辑 顾雪竹]