

# 黄芩素对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化 及相关 p38 信号通路的影响

杨柳, 王业秋, 张宁, 李建民\*  
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的:研究黄芩素对中波紫外线(UVB)诱导人皮肤角质形成细胞(HaCaT)光老化及相关 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路的影响。方法:选择  $1 \times 10^{-11}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup> 9 种浓度黄芩素作用于 HaCaT 细胞, 噻唑蓝(MTT)法筛选出最佳有效浓度。经预实验筛选出辐射强度为 0.5 mW·cm<sup>-2</sup> 的 UVB, 辐射时间为 5 min 建立光老化模型, 筛选出最佳有效浓度作用于光老化模型, 另设空白组 MTT 法检测各组细胞活性。超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 过氧化氢酶(CAT)及丙二醛(MDA)试剂盒检测 SOD, GSH-Px, CAT 活性及 MDA 含量。实时定量荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测各组细胞中 mRNA 及蛋白表达。结果:筛选出  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素为最佳有效浓度;与空白组比较, UVB 组对 HaCaT 细胞无明显的增殖作用。与 UVB 组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素组对光老化模型无明显增殖作用。与空白组比较, UVB 组 SOD, GSH-Px 及 CAT 活性明显的降低, MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ );与 UVB 组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素组 SOD, GSH, CAT 活性明显升高, MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与空白组比较, UVB 组肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 及 TNF- $\alpha$ , 磷酸化 p38(p-p38)蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );与 UVB 组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素组 TNF- $\alpha$  mRNA 及 TNF- $\alpha$ , p-p38 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:黄芩素对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化保护作用主要是通过提高氧化酶活性以及阻断 p38MAPK 信号通路, 抑制炎症因子产生。

**[关键词]** 黄芩素; 中波紫外线; 人皮肤角质形成细胞; 光老化; 氧化酶; p38MAPK 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0139-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160139

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1014.036.html>

**[网络出版时间]** 2017-05-26 10:14

## Effect of Baicalein on UVB-induced HaCaT Cell Light Aging and p38 Signaling Pathway

YANG Liu, WANG Ye-qiu, ZHANG Ning, LI Jian-min\*  
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of baicalein on ultraviolet B (UVB) induced-human skin keratinocyte (HaCaT) cell light aging and p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK) signaling pathways. **Method:** The  $1 \times 10^{-11}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup> baicalein were used on HaCaT cells, and the best effective concentration was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. In the preliminary experiments, UVB with radiation intensity of 0.5 mW·cm<sup>-2</sup> was selected, and with radiation time for 5 min to establish light aging models. Then the best effective concentration was used on the light aging models. MTT method was used to detect the cells activity in each group; superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) kits were

**[收稿日期]** 20170323(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81274035);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)

**[第一作者]** 杨柳, 硕士, 从事中药药效物质基础的研究, Tel:13212980606, E-mail:419956419@qq.com

**[通讯作者]** \*李建民, 硕士, 主任医师, 从事中药药效物质基础研究, Tel:13836132760, E-mail:ljm\_1030@126.com

used to detect SOD, GSH-Px, CAT activity and MDA content respectively. Real-time quantitative PCR and Western blot were used respectively to detect mRNA and protein expression levels in each group. **Result:**  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> baicalein were selected as the best effective concentrations. As compared with the blank group, UVB had no significant proliferation effect on HaCaT cells. As compared with UVB group,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ , and  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> baicalein had no obvious effect on the proliferation of light aging models. As compared with the blank group, SOD, GSH-Px and CAT activities were significantly decreased while MDA content was increased in UVB group ( $P < 0.01$ ). As compared with UVB model group,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> baicalein could increase SOD, GSH-Px and CAT activities, and decrease MDA content ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with the blank group, the expression levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  mRNA as well as TNF- $\alpha$  and p38 protein were significantly increased in UVB group ( $P < 0.01$ ). As compared with UVB model group,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> baicalein could decrease the expression levels of TNF- $\alpha$  mRNA as well as TNF- $\alpha$  and p38 protein ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Baicalein has the protective effect on UVB-induced cell light aging, and its mechanism is mainly associated with enhancing GSH-Px, SOD and CAT activities, blocking p38MAPK signaling pathway, and inhibiting inflammatory cytokines.

[**Key words**] baicalein; ultraviolet B; HaCaT; light aging; oxidase; p38MAPK signaling pathway

紫外线(UV)是诱发皮肤光老化的主要因素,皮肤光老化主要表现为皮肤皱缩、红斑、无光泽等现象<sup>[1]</sup>。根据波长不同,UV分为长波紫外线(UVA,320~400 nm),中波紫外线(UVB,280~320 nm),短波紫外线(UVC,200~280 nm)<sup>[2]</sup>,UVC几乎被大气臭氧层吸收,UVA主要影响皮肤真皮层,大部分到达真皮的深层,UVB虽然对真皮层影响较小,但是对表皮层伤害较为严重,人皮肤表层主要由HaCaT细胞组成,UVB是HaCaT细胞的靶细胞<sup>[3]</sup>。有研究表明皮肤光老化影响表皮角质形成细胞主要表现为产生较多的活性氧(ROS)及分泌炎症细胞因子,如环氧化酶-2(COX-2),白细胞介素-8(IL-8),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(IL-6),引起皮肤组织结构发生变化,造成皮肤皱缩、无光泽等现象<sup>[4-5]</sup>。近年来,根据相关文献报道,紫外线诱导皮肤光老化已研究到分子水平<sup>[6]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路调控皮肤光老化过程,通过氧化应激产生ROS作为第二信使激活MAPK信号通路<sup>[7]</sup>。杜仲来源于杜仲科植物杜仲的干燥树皮,有补肝肾,强筋骨,安胎的功效<sup>[8]</sup>。现已证明杜仲中有多种成分,具有清除氧自由基、抗衰老、抗菌、抗癌、抗高血压的作用<sup>[9]</sup>。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>[10]</sup>。因此本实验旨在通过UVB照射HaCaT细胞建立光老化模型,通过观察杜仲中活性成分黄芩素对光老化细胞中p38MAPK信号通路及炎症因子表达的影响,在此基础上探讨其

可能的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人皮肤角质形成细胞 HaCaT(上海中乔新舟有限公司,批号 ZQ0044)。

**1.2 药物及试剂** 黄芩素对照品(成都曼思特公司,批号 A0018);DMEM 培养液,胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 NZM1301,NYB0614);四甲基噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 021005);超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),过氧化氢酶(CAT),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20151215,20151214,20151214,20151208);SGExcel UltraSYBR Mixture(With ROX)(生工生物有限公司,批号 B532956);小鼠抗人  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 16A00205);小鼠抗人 p-p38 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 SC-166182);鼠抗人 TNF- $\alpha$  单克隆抗体及兔抗人 p38 多克隆抗体(博奥森生物有限公司,批号分别为 AD06235847E,AF01277008E);羊抗小鼠 IgG,羊抗兔 IgG(博士德生物有限公司,批号分别为 BST10101A,BST10C17B)。

**1.3 仪器** 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),Trans-Blot SD Cell 型半干转膜仪(美国 Bio-Rad 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),M  $\times$  3000P 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR,美国

Agilent Stratagene 公司), Nano-100 微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 实验分组及药物浓度的筛选** 将生长融合达到 80% ~ 90% 的细胞进行消化,  $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 使用培养液将细胞混悬, 从混悬液中取出细胞 100  $\mu\text{L}$  放于新离心管中, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 700  $\mu\text{L}$  进行混悬, 使用计数板进行计数, 根据  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 计算出所需的细胞体积数, 将细胞接于 96 孔板, 分为 10 组, 每组 6 个复孔。每孔加入细胞混悬液 200  $\mu\text{L}$ , 放于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h 后进行分组实验, 分为空白组、不同浓度黄芩素组, 将制备好的药物于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅复温。空白组将旧培养液弃去, 加入新的培养液 200  $\mu\text{L}$ , 放于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱进行 24 h 的培养, 次日, 更换培养液, 再次培养 24 h。不同浓度黄芩素组分别将旧培养液弃去, 分别加入  $1 \times 10^{-11}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素 200  $\mu\text{L}$ , 放于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱进行 24 h 的培养, 次日, 更换培养液, 再次培养 24 h。最后, 培养 24 h 后每孔加入 MTT 20  $\mu\text{L}$  进行培养, 4 h 后弃去培养液, 加二甲基亚砜 (DMSO) 150  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床上震荡 10 min 使结晶溶解, 波长为 492 nm 处的酶标仪进行检测吸光度  $A$ , 计算细胞的活性。

$$\text{细胞增殖率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

**2.2 黄芩素对 HaCaT 细胞光老化模型的影响** 将细胞接种于 96 孔板中, 进行分组空白组 (DMEM 培养液培养细胞 48 h 后, 然后使用铝箔纸覆盖空白组, 照射完成后, 将铝箔纸和旧培养液弃去, 新的培养液继续培养 12 h); UVB 组 (模型组, 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 PBS 200  $\mu\text{L}$ , 根据预实验选定照射强度为  $0.5\ \text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  UVB 光疗仪进行照射, 照射时间为 5 min, 照射后弃去 PBS, 继续培养 12 h);  $1 \times 10^{-7}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素组,  $1 \times 10^{-6}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素组,  $1 \times 10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素组 (DMEM 培养液培养细胞 24 h 后, 弃去每孔培养液, 每组分别加浓度为  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素 200  $\mu\text{L}$ , UVB 光疗仪进行照射, 照射后弃去 PBS, 培养液继续培养 12 h); 最后, 加入 MTT 20  $\mu\text{L}$  进行培养, 4 h 后加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床上震荡 10 min 使结晶溶解, 波长为 492 nm 处的酶标仪进行检测细胞的活性。

照射剂量 = 照射强度  $\times$  照射时间

**2.3 HaCaT 细胞中 SOD, GSH, CAT 活性和 MDA 含量的检测** 收集已培养好的分组细胞, 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 离心管中,  $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 再使用预冷的 PBS 清洗 2 ~ 3 次, 弃去 PBS, 2 min 后, 按照每孔裂解液 200  $\mu\text{L}$  [细胞裂解液 (RIPA) 和蛋白酶抑制剂 (PMSF) 按 99:1 混匀] 加入到 1.5 mL 离心管中, 待细胞充分的裂解。12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 吸取上清液待用。最后按照 SOD, GSH, CAT, MDA 及 ROS 试剂盒操作说明检测各组细胞中 SOD, GSH, CAT 活性及 MDA 含量。

**2.4 Real-time PCR 法检测细胞中的 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平** 取出已培养好的 6 孔板, 将培养液弃去, PBS 洗 2 次, 按照每孔 1 mL 加入细胞裂解液 (Trizol), 将其充分接触细胞, 室温放置 2 min。用移液枪轻轻的吹打细胞, 将细胞悬液放于 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中。按照 Trizol 1 mL 加入三氯甲烷 0.2 mL 加入到离心管中, 盖紧管盖, 用手剧烈的震荡, 观察溶液乳白色无分层现象。室温放置 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min。取出 1.5 mL 的离心管, 将上层透明的水相析出, 放于新的离心管中, 每个管中可以取出 400  $\mu\text{L}$  的溶液, 吸取过程中切勿碰到中间层。往离心管中加入等体积的异丙醇, 上下颠倒, 将其充分混匀。常温放置 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  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, 充分的混悬, 洗涤沉淀, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下于 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 除去上清液, 倒扣离心管 5 min, 将其壁上的液体除尽。最后将其离心管中加入无 RNA 酶 20  $\mu\text{L}$  溶解沉淀。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, 计算各所需的体积数。20  $\mu\text{L}$  反应体系 (RT-PCR) 每孔包括 2  $\times$  SYBR Mixture 10  $\mu\text{L}$ , 上游引物和下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 0.8  $\mu\text{L}$  分别加入八联管中等待检测。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火/延伸 30 s, 40 个循环, 将八联管分别放入 Real-time PCR 仪中进行检测。最后根据相对定量的计算方法, 相对定量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算, 求出各组相对值。

**2.5 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测各组细胞中的 TNF- $\alpha$ , p-p38, p38 蛋白表达水平** 取出已培养好的 6 孔板, 将培养液弃去, 冷 PBS 洗 2 次, 加入细

表 1 Real-time PCR 引物序列信息

Table 1 Primers sequence information of Real-time PCR

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	预扩增片段长度/bp
$\beta$ -actin	TGTCACCAACTG GGACGATA	GGGGTGTGAAG GTCTCAA	165
TNF- $\alpha$	GTGGCAATGAGG ATGACTTG	TGGTGGTCGGAG ATTCGTA	121

胞裂解液,使其充分接触细胞,静置 3 min,使用移液枪将细胞混悬,将混悬液移入 1.5 mL 离心管中,冰上孵育 30 min,然后 4 °C 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,将离心管中的上清液移至新的 1.5 mL 的离心管中,即总蛋白。蛋白样品和上样缓冲液 = 按照 4:1 的比例混合,沸水加热 5 min 使其变性。聚偏氟乙烯(PVDF)膜进行转膜,转膜结束后取下 PVDF 膜,做好标记正反面。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,分别加入目的蛋白及内参蛋白的一抗(1:300 稀释),放于 4 °C 的冰箱中进行过夜,次日后将 PVDF 膜取出,放于培养皿中洗涤缓冲液(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(1:1 万稀释),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 膜放于发光试剂(ECL)板上,将发光液 A: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 凝胶分析系统进行分析条带的灰度,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** 采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,多组间比较采用 LSD 法检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 不同浓度黄芩素对 HaCaT 细胞活性的影响** 与空白组比较,  $1 \times 10^{-11}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup> 4 个浓度组细胞增殖率明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup> 2 个浓度组细胞增殖率显著降低 ( $P < 0.01$ )。  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 3 个浓度组细胞增殖率无统计学差异,可用于后续实验研究。见表 2。

表 2 黄芩素对 HaCaT 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 2 Effect of baicalein on HaCaT cell proliferation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	A	细胞增殖率/%
空白	-	0.450 ± 0.022	100.00
黄芩素	$1 \times 10^{-11}$	0.503 ± 0.016 <sup>1)</sup>	111.78 <sup>1)</sup>
	$1 \times 10^{-10}$	0.507 ± 0.035 <sup>1)</sup>	112.67 <sup>1)</sup>
	$1 \times 10^{-9}$	0.511 ± 0.011 <sup>1)</sup>	113.56 <sup>1)</sup>
	$1 \times 10^{-8}$	0.521 ± 0.026 <sup>2)</sup>	115.78 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-7}$	0.444 ± 0.024	98.67
	$1 \times 10^{-6}$	0.455 ± 0.040	101.11
	$1 \times 10^{-5}$	0.452 ± 0.046	100.44
	$1 \times 10^{-4}$	0.366 ± 0.045 <sup>2)</sup>	81.33 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-3}$	0.292 ± 0.033 <sup>2)</sup>	64.89 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 黄芩素对光老化模型细胞活性的影响** 与空白组比较,模型组对 HaCaT 细胞无明显增殖作用。与模型组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素组对光老化模型无明显的增殖作用,差异无统计学意义,根据实验结果,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素用于后续的实验研究。见表 3。

表 3 黄芩素对光老化模型细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 3 Effect of baicalein on photoaging model cell proliferation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	照射时间/min	浓度 /mol·L <sup>-1</sup>	A	细胞增殖率/%
空白	-	-	0.463 ± 0.029	100.00
模型	5	-	0.446 ± 0.033	96.33
黄芩素 + UVB	5	$1 \times 10^{-7}$	0.452 ± 0.044	97.62
	5	$1 \times 10^{-6}$	0.461 ± 0.039	99.57
	5	$1 \times 10^{-5}$	0.486 ± 0.063	104.97

**3.3 黄芩素对各组细胞中 SOD, GSH-Px, CAT 活性和 MDA 含量的影响** 与空白组比较,模型组 SOD, GSH-Px 及 CAT 活性显著降低,MDA 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素组 SOD, GSH-Px 及 CAT 活性明显升高,MDA 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。由此可知,黄芩素能够提高光老化细胞中 SOD, GSH-Px, CAT 活性,降低 MDA, ROS 含量。见表 4。

**3.4 黄芩素对细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响** 与空白组比较,模型组 TNF- $\alpha$  mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ),与 UVB 组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 黄芩素组 TNF- $\alpha$  mRNA 表达显著

表 4 黄芩素对细胞中 SOD, GSH-Px, CAT 活性和 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of baicalein on SOD, GSH-Px, CAT activity and MDA content in HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	照射时间/min	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mL <sup>-1</sup>	CAT/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	-	37.96 ± 2.521	4.787 ± 0.231	6.312 ± 0.394	1.351 ± 0.111
模型	5	-	25.40 ± 1.996 <sup>1)</sup>	2.427 ± 0.400 <sup>1)</sup>	3.990 ± 0.692 <sup>1)</sup>	3.559 ± 0.506 <sup>1)</sup>
黄芩素 + UVB	5	1 × 10 <sup>-7</sup>	34.03 ± 4.096 <sup>3)</sup>	3.553 ± 0.523 <sup>3)</sup>	5.057 ± 0.463 <sup>2)</sup>	2.625 ± 0.513 <sup>2)</sup>
	5	1 × 10 <sup>-6</sup>	34.62 ± 2.078 <sup>3)</sup>	3.890 ± 0.437 <sup>3)</sup>	5.321 ± 0.640 <sup>3)</sup>	2.493 ± 0.453 <sup>3)</sup>
	5	1 × 10 <sup>-5</sup>	35.54 ± 3.803 <sup>3)</sup>	4.017 ± 0.512 <sup>3)</sup>	5.484 ± 0.283 <sup>3)</sup>	2.197 ± 0.354 <sup>3)</sup>

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

降低(P < 0.01)。由此可知,1 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>黄芩素能够抑制光老化细胞中 TNF-α mRNA 表达。见表 5。

**3.5 黄芩素对细胞 TNF-α, p-p38, p38 蛋白表达水平的影响** 与空白组比较,模型组 TNF-α, p-p38 蛋白表达显著升高(P < 0.01), p38 蛋白表达不变。与 UVB 组比较,1 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>黄芩素组 TNF-α, p-p38 蛋白表达明显降低(P < 0.05, P < 0.01), p38 蛋白表达量不变,差异无统计学意义。说明 1 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-6</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>黄芩素能够抑制光老化细胞中 TNF-α, p-p38 蛋白表

表 5 黄芩素对细胞 TNF-α mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Effect of baicalein on mRNA expression of TNF-α in HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	照射时间/min	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	TNF-α
空白	-	-	1.000
模型	5	-	4.342 ± 0.087 <sup>1)</sup>
黄芩素 + UVB	5	1 × 10 <sup>-7</sup>	3.120 ± 0.066 <sup>2)</sup>
	5	1 × 10 <sup>-6</sup>	3.065 ± 0.080 <sup>2)</sup>
	5	1 × 10 <sup>-5</sup>	1.785 ± 0.031 <sup>2)</sup>

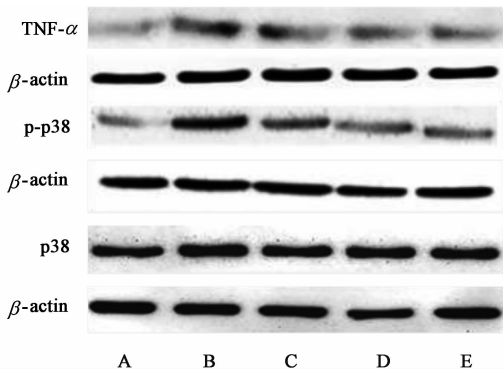
注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.01。

达。见表 6,图 1。

表 6 黄芩素对细胞 TNF-α, p-p38, p38 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Effect of baicalein on protein expression of TNF-α, p-p38 and p38 in HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	照射时间/min	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	TNF-α/β-actin	p-p38/β-actin	p38/β-actin
空白	-	-	0.332 ± 0.049	0.320 ± 0.056	0.894 ± 0.021
模型	5	-	0.647 ± 0.046 <sup>1)</sup>	0.701 ± 0.014 <sup>1)</sup>	0.893 ± 0.041
黄芩素 + UVB	5	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.536 ± 0.059 <sup>2)</sup>	0.633 ± 0.027 <sup>2)</sup>	0.850 ± 0.034
	5	1 × 10 <sup>-6</sup>	0.443 ± 0.040 <sup>3)</sup>	0.616 ± 0.012 <sup>3)</sup>	0.854 ± 0.028
	5	1 × 10 <sup>-5</sup>	0.415 ± 0.028 <sup>3)</sup>	0.418 ± 0.025 <sup>3)</sup>	0.898 ± 0.043



A. 空白组; B. 模型组; C. 1 × 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>黄芩素 + UVB 组; D. 1 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>黄芩素 + UVB 组; E. 1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>黄芩素 + UVB 组

图 1 各组细胞 TNF-α, p-p38, p38 蛋白的表达

Fig.1 Protein expression of TNF-α, p-p38 and p38 in each HaCaT cells

#### 4 讨论

MAPK 包含 3 个亚家族,如 ERK, JNK, p38MAPK,参与细胞间多种功能的调控, p38MAPK 在 UV 照射皮肤中研究比较多<sup>[11]</sup>。MAPK 参与 UV 诱导的下游一系列基因的表达(TNF-α, IL-6, IL-1)<sup>[12]</sup>,其中, TNF-α 主要是由 T 及 B 细胞、单核细胞分泌,在炎症反应中占主导地位<sup>[13]</sup>。同时, ROS 还可以作为第二信使刺激多条信号通路蛋白的磷酸化,启动下游信号传导<sup>[14]</sup>。有研究报道<sup>[6]</sup>,杜仲中的有效成分桃叶珊瑚苷是通过调节 p38MAPK 信号通路,进一步抑制炎症因子的产生,达到抗光老化的效果。本实验主要以 UVB 诱导 HaCaT 细胞建立光老化模型,细胞中 SOD, GSH-Px, CAT 活性降低, MDA 含量升高,过多 ROS 作为第二信使激活

p38MAPK 信号通路, 激活 p-p38 蛋白表达, 进一步诱导下游 TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达。将黄芩素作用于光老化细胞后, 结果表明  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芩素提高氧化酶的活性以及降低 p-p38, TNF- $\alpha$  蛋白表达。

综上所述, 黄芩素对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化保护作用主要是通过提高氧化酶活性以及阻断 p38MAPK 信号通路, 抑制炎症因子产生来实现的, 但是黄芩素是否通过 ERK 及 JNK 信号通路对皮肤光老化起保护作用有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 徐清. 茶叶水提物抗皮肤光老化的作用探讨[J]. 中国医疗美容, 2017, 7(1): 66-68.

[2] 崔一森. 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]. 长春: 东北师范大学, 2014.

[3] 王业秋, 陈巧云, 李建民, 等. 京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 149-152.

[4] 李俊. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 改善氧化应激引起的糖皮质激素抵抗的实验研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.

[5] 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.

[6] 陈巧云, 王业秋, 张宁. 桃叶珊瑚苷对紫外线 B 波损伤皮肤角质形成细胞的保护作用[J]. 中国药学杂

志, 2014, 49(7): 554-558.

[7] 叶希韵. 紫外线致皮肤光老化研究进展[J]. 生物学教学, 2015, 40(11): 2-5.

[8] 彭璐, 金鑫, 李志群, 等. 红杜仲不同乙醇浓度提取物对 HaCaT 细胞抗氧化作用的比较及其抗氧化机制的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(1): 23-27.

[9] 曾鸣. 皮类药用植物美容护肤功效的研究进展[J]. 中国美容医学, 2016, 25(1): 100-104.

[10] 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): 120-123.

[11] 吴昊, 葛新红, 唐真真, 等. ERK1/2, JNK 和 P38MAPK 在皮肤黑素瘤中的表达[J]. 中国皮肤性病杂志, 2016, 30(7): 678-682.

[12] 沈奎亚, 刘梅, 吴新安. IL-17 与 TNF- $\alpha$  对 HaCaT 细胞 IL-17R、p-p38MAPK 和炎症因子表达的影响[J]. 安徽医药, 2016, 20(7): 1292-1295.

[13] 冀元元, 李纲, 刘志远, 等. 阿托伐他汀对冠心病炎症因子 hs-CRP、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的干预作用[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(7): 147-149.

[14] 魏丹丹, 林旭红, 王慧超. 香草乙酮改善葡聚糖硫酸钠诱发溃疡性结肠炎小鼠的炎症反应与 NOXs-ROS-p38MAPK 信号通路的关系[J]. 生理学报, 2015, 67(1): 74-82.

[责任编辑 周冰冰]