

# 甘草次酸对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化的保护作用及 相关细胞因子的影响

张丽宏<sup>1</sup>, 傅云<sup>1</sup>, 廖建<sup>2</sup>, 王业秋<sup>1</sup>, 张艳红<sup>1</sup>, 李建民<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 资阳川中医院, 四川 资阳 641300)

**[摘要]** 目的:研究甘草次酸对中波紫外线(UVB)诱导人皮肤角质形成细胞(HaCaT)细胞光老化的保护作用及相关炎症因子影响。方法:用不同浓度的甘草次酸作用于 HaCaT 细胞,噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞增殖率,筛选出药物最佳有效浓度;用 30 mJ·cm<sup>-2</sup>的 UVB 照射 HaCaT 细胞,建立光老化模型,用 3 个不同浓度的甘草次酸作用于光老化细胞,MTT 比色法检测光老化 HaCaT 细胞增殖率;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),过氧化氢酶(CAT)和乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒分别检测甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞中 GSH-Px, CAT 和 LDH 活性的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )蛋白表达量的影响。结果:筛选出 1  $\times$  10<sup>-7</sup>, 1  $\times$  10<sup>-6</sup>, 1  $\times$  10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>甘草次酸为最佳有效浓度。与空白组比较,UVB 组细胞增殖率显著降低( $P < 0.01$ ),GSH-Px, CAT 活性显著降低,LDH 活性显著升高( $P < 0.01$ ),IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  蛋白表达量显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与 UVB 组比较,1  $\times$  10<sup>-7</sup>, 1  $\times$  10<sup>-6</sup>, 1  $\times$  10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>甘草次酸 + UVB 组细胞增殖率显著上升( $P < 0.01$ ),GSH-Px, CAT 活性显著上升,LDH 活性显著降低( $P < 0.01$ ),IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  蛋白表达量显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:甘草次酸可通过提高 GSH-Px, CAT 活性,降低 LDH 活性,减少炎症因子 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达,从而抑制 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化。

**[关键词]** 甘草次酸; 中波紫外线; 光老化; 角质形成细胞; 细胞因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0129-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230129

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1152.016.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-12 11:52

## Protective Effect of Glycyrrhizin on Light Aging of HaCaT Cells Induced by UVB and Relevant Cytokines

ZHANG Li-hong<sup>1</sup>, FU Yun<sup>1</sup>, LIAO Jian<sup>2</sup>, WANG Ye-qi<sup>1</sup>, ZHANG Yan-hong, LI Jian-min<sup>1\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Ziyang Chuazhong Hospital, Ziyang 641300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of glycyrrhizin on light aging of human keratinocytes (HaCaT) cells induced by ultraviolet B (UVB) and relevant cytokines. **Method:** Different concentrations of glycyrrhizin were used to treat HaCaT cells. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to screen the effective and safe concentration of glycyrrhizin. The light aging model was set up through the irradiation of ultraviolet radiation B (UVB) at the irradiation dose of 30 mJ·cm<sup>-2</sup>, the activity of cells was determined by MTT method. The test kits were tested to determine the effect of glycyrrhizin on glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and lactate dehydrogenase (LDH) in each group of cells. Western blot method was used to detect the effect of glycyrrhizin on interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) protein expressions. **Result:**

**[收稿日期]** 20170714(001)

**[基金项目]** 黑龙江省应用技术与开发计划项目(PCI3S15)

**[第一作者]** 张丽宏, 硕士, 副教授, 从事中医药美容研究, Tel:18846926486, E-mail:1146850848@qq.com

**[通讯作者]** \* 李建民, 硕士, 主任药师, 从事中药药效物质基础及体内代谢研究, Tel:13836132760, E-mail:ljm\_1030@126.com

The optimum effective concentrations of glycyrrhizin were  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>. Compared with the blank group, the cell proliferation rate of the UVB group significantly decreased ( $P < 0.01$ ); the activities of GSH-Px and CAT were significantly decreased, the activity of LDH was significantly increased ( $P < 0.01$ ); the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the UVB group, the cell proliferation rate of  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> glycyrrhizin + UVB group was significantly increased ( $P < 0.01$ ); the activities of GSH-Px and CAT were significantly increased, the activity of LDH was significantly decreased ( $P < 0.01$ ); the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** Glycyrrhizin can improve the activities of GSH-Px and CAT, reduce the activity of LDH, decrease the secretion of cytokines, and thus inhibit light aging of HaCaT cells induced by UVB.

[ **Key words** ] glycyrrhizin; ultraviolet B; light aging; keratinocyte; cytokine

近年来,臭氧层破坏日趋严重,导致长波紫外线(UVA)及中波紫外线(UVB)直接降落到地球表层。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<sup>[1]</sup>,长期接受过度的 UVB 照射将导致皮肤光老化,引发一系列形态学、及生理学转化<sup>[2-3]</sup>,导致皮肤皱缩、无弹性、无光泽,严重可导致色素沉着及恶性肿瘤发生<sup>[4]</sup>。

甘草,又名甜草,为豆科甘草属,入药部位为根和根茎。2015 年版《中国药典》记载,其具有缓急止痛、调和解毒、补气益肾、润肺止咳等功能<sup>[5]</sup>。甘草次酸作为甘草根茎中主要活性成分之一,具有抗氧化、抗过敏、抗炎、抗肿瘤、抗溃疡、抗心律失常、调节免疫力等功效<sup>[6]</sup>。查阅相关文献,目前,对于甘草次酸抑制皮肤光老化研究机制尚未见相关报道。因此,本实验采用中波紫外线(UVB)照射人皮肤角质形成细胞(HaCaT)细胞建立光老化模型,探讨甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞影响的分子机制,为日后临床应用甘草次酸预防和治疗皮肤光老化提供实验依据。

## 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** 甘草次酸(98%,南京泽朗医药科技有限公司,批号 ZL00380718)。胎牛血清 FBS,DMEM 培养液,双抗 P/S,胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司,批号分别为 NYB0614, NZM1301, 20161230, SH30042.01);磷酸盐缓冲液(PBS,北京中山金桥有限公司,批号 20160509);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 021005);二甲基亚砜(DMSO,天津市富宇精细化工有限公司,批号 20160716);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),过氧化氢酶(CAT),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170518,20170523,20170518);RIPA 细胞

裂解液,PMSF 蛋白酶抑制剂(碧云天生物技术研究,批号分别为 P0013B,ST506-2);兔抗人  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体,兔抗人白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )多克隆抗体,羊抗兔二抗(博奥森生物有限公司,批号分别为 bs-0061R,bs-0812R,bs-4587R,bs-0078R,BA1054)。

**1.3 仪器** BCM-1000A 型生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HF240 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);IX-71-21PH 型倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社);MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司);GTR16-2 型高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);miniPROTEANTetra Cell 型电泳仪,Trans-Blot SD Cell 型半干转膜仪(英国 Bio-Rad 公司);Smart chemi II 型一体式微型化学发光成像仪(北京赛智创业有限公司)。

## 2 方法

**2.1 10% 完全培养液配制** DMEM 培养基,FBS, P/S 分别以 89:10:1 进行配置,混合均匀,于 4 °C 冰箱保存。

**2.2 药物配制** 将甘草次酸加入 DMEM 培养液中,配制成  $1 \times 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup> 的药物母液,0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌,在实验需要时将母液稀释成  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> 的梯度浓度,4 °C 保存。

**2.3 细胞培养** 细胞生长至对数期,胰酶消化,离心,并使用计数板计数,以  $1 \times 10^4$  个/孔将细胞接种至 96 孔板,每组 6 个复孔,以  $1 \times 10^6$  个/孔将细胞接种至 6 孔板,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

**2.4 噻唑蓝(MTT)比色法筛选药物有效安全浓度** 96 孔板内细胞随机分为空白组,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> 甘草次酸组。96 孔板内细胞培养 24 h 后,吸弃培养液,空白组加入 200  $\mu$ L 新

培养液;甘草次酸组加入不同梯度浓度( $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )甘草次酸 200  $\mu\text{L}$ 。培养 24 h 后,每孔加入 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 20  $\mu\text{L}$ ,孵育 4 h,吸弃培养液,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养震荡器上震荡 10 min,在酶标仪 492 nm 波长处测定吸光度  $A$ 。

**2.5** MTT 比色法检测光老化 HaCaT 增殖率 96 孔板内细胞随机分为空白组,UVB 组, $1 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸 + UVB 组。细胞培养 24 h 后,吸弃培养液,PBS 洗 2 次,每孔加 PBS 200  $\mu\text{L}$ ,用铝箔纸将空白组覆盖,使用 30  $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  UVB,照射 UVB 组和甘草次酸 + UVB 组,照射完毕,弃去 PBS,甘草次酸 + UVB 组加入  $1 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸 200  $\mu\text{L}$ ,UVB 组和空白组加入 200  $\mu\text{L}$  新培养液,孵育 24 h 后,每孔加入 MTT 20  $\mu\text{L}$ ,孵育 4 h 后,吸弃培养液,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养震荡器上震荡 10 min,在酶标仪 492 nm 波长处测定  $A$ 。

**2.6** 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),过氧化氢酶(CAT)和乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测 GSH-Px,CAT 和 LDH 活性 6 孔板细胞参照 2.5 项方法用 UVB 照射细胞,建立光老化模型。待细胞生长密度达 80% ~ 90% 时,收集 6 孔板中各组细胞,PBS 洗 2 次,RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 PMSF 以 99:1 混匀,按照 100  $\mu\text{L}$ /孔加入混合液,冰上静置 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$ ,13 200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  的条件下离心 15 min,收集上清液于离心管中,按照试剂盒说明书检测各组细胞中 GSH-Px,CAT 和 LDH 活性。

**2.7** 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$  蛋白表达量 收集 6 孔板中各组细胞,使用裂解液(RIPA)和蛋白酶抑制剂(PMSF)混合液提取蛋白,BCA 法测定各组细胞蛋白浓度,每孔加样 20  $\mu\text{L}$ ,聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳 60 min,半干转膜 10 V,30 min,室温封闭 2 h,加入一抗(1:500)孵育,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,缓冲液(TBST)洗膜 3 次,加二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,加 ECL 发光液显影,使用发光成像仪拍摄,利用 Lane ID 凝胶软件分析数据,用积分吸光度( $IA$ ) $_{\text{目的条带}}/IA$  $_{\text{内参条带}}$ 来表示检测目的蛋白的表达水平。

**2.8** 统计学处理 数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 21.0 软件进行分析采用 ANOVA 方差分析,多组间比较采用 LSD 法检验, $P < 0.05$  差异性具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** 甘草次酸对正常 HaCaT 细胞增殖率的影响 与空白组比较, $1 \times 10^{-10}$ , $1 \times 10^{-9}$ , $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸组细胞增殖率显著升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),可明显促进细胞增殖; $1 \times 10^{-4}$ , $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸组细胞增殖率显著降低( $P < 0.01$ ),可明显抑制细胞增殖; $1 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸组细胞增殖率无统计学差异,对细胞无明显的促增殖与抑制作用。因此,本实验选择 $1 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸用于后续实验研究。见表 1。

表 1 甘草次酸对正常 HaCaT 细胞增殖率的影响

Table 1 Effect of glycyrrhizin on normal HaCaT cells proliferation rate

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A(\bar{x} \pm s, n = 6)$	细胞增殖率/%
空白	-	0.541 $\pm$ 0.022	100
甘草次酸	$1 \times 10^{-10}$	0.564 $\pm$ 0.021 <sup>1)</sup>	104 <sup>1)</sup>
	$1 \times 10^{-9}$	0.590 $\pm$ 0.013 <sup>1)</sup>	109 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-8}$	0.619 $\pm$ 0.026 <sup>1)</sup>	114 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-7}$	0.523 $\pm$ 0.024	97
	$1 \times 10^{-6}$	0.533 $\pm$ 0.020	99
	$1 \times 10^{-5}$	0.547 $\pm$ 0.021	101
	$1 \times 10^{-4}$	0.462 $\pm$ 0.016 <sup>2)</sup>	85 <sup>2)</sup>
$1 \times 10^{-3}$	0.408 $\pm$ 0.013 <sup>2)</sup>	75 <sup>2)</sup>	

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

**3.2** 甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞增殖率的影响 与空白组比较,UVB 组细胞增殖率显著降低( $P < 0.01$ );与 UVB 组比较, $1 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸 + UVB 组细胞增殖率显著升高( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞增殖率的影响

Table 2 Effect of glycyrrhizin on photoaging model HaCaT cells proliferation rate

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A(\bar{x} \pm s, n = 6)$	细胞增殖率/%
空白	-	0.536 $\pm$ 0.021	100
UVB	-	0.454 $\pm$ 0.026 <sup>1)</sup>	85 <sup>1)</sup>
甘草次酸	$1 \times 10^{-7}$	0.518 $\pm$ 0.017 <sup>2)</sup>	97 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-6}$	0.527 $\pm$ 0.021 <sup>2)</sup>	98 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-5}$	0.532 $\pm$ 0.018 <sup>2)</sup>	99 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与 UVB 组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 3 同)。

**3.3** 甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞中 GSH-Px,CAT 和 LDH 活性的影响 与空白组比较,UVB 组

GSH-Px, CAT 活性显著降低, LDH 活性显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 UVB 组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘草次酸 + UVB 组 GSH-Px, CAT 活性显著升高, LDH 活性显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞中 GSH-Px, CAT 和 LDH 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of glycyrrhizin on GSH-Px, CAT and LDH activity in photoaging model HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-Px / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	CAT / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	LDH / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	6.372 ± 0.151	4.779 ± 0.050	1 039.377 ± 31.012
UVB	-	4.221 ± 0.119 <sup>1)</sup>	3.280 ± 0.147 <sup>1)</sup>	1 808.433 ± 169.209 <sup>1)</sup>
甘草次酸	$1 \times 10^{-7}$	4.820 ± 0.183 <sup>2)</sup>	3.775 ± 0.216 <sup>2)</sup>	1 446.780 ± 81.736 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-6}$	5.279 ± 0.076 <sup>2)</sup>	3.979 ± 0.089 <sup>2)</sup>	1 355.523 ± 82.278 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-5}$	5.648 ± 0.272 <sup>2)</sup>	4.224 ± 0.265 <sup>2)</sup>	1 208.893 ± 200.261 <sup>2)</sup>

3.4 甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞中 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达量的影响 与空白组比较, UVB 组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 UVB 组比较,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘草次酸 + UVB 组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 4, 图 1。

表 4 甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞中 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

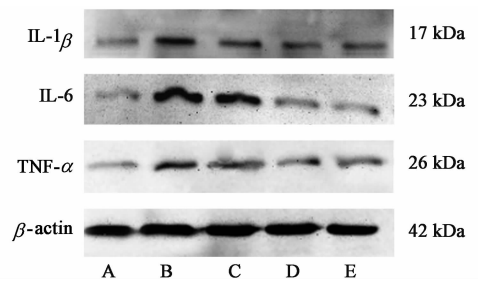
Table 4 Effect of glycyrrhizin on protein expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in photoaging model HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin	IL-6 / $\beta$ -actin	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin
空白	-	0.426 ± 0.034	0.395 ± 0.020	0.296 ± 0.013
UVB	-	0.772 ± 0.040 <sup>1)</sup>	0.884 ± 0.037 <sup>1)</sup>	0.517 ± 0.021 <sup>1)</sup>
甘草次酸	$1 \times 10^{-7}$	0.650 ± 0.030 <sup>3)</sup>	0.776 ± 0.049 <sup>2)</sup>	0.438 ± 0.062 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-6}$	0.532 ± 0.066 <sup>3)</sup>	0.642 ± 0.105 <sup>3)</sup>	0.394 ± 0.046 <sup>3)</sup>
	$1 \times 10^{-5}$	0.514 ± 0.025 <sup>3)</sup>	0.488 ± 0.015 <sup>3)</sup>	0.370 ± 0.017 <sup>3)</sup>

注: 与空白组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 UVB 组比 <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

紫外线是诱发皮肤光老化的重要因素, 表现为皮肤皱缩、红斑、无光泽等现象。据报道, 皮肤光老化发生机制一方面是由于紫外线刺激表皮角质形成细胞产生较多的活性氧 (ROS) 及炎症介质<sup>[7]</sup>, 如环氧化酶-2 (COX-2), IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  等<sup>[8]</sup>, 这些炎症介质之间存在着复杂的关系, 共同影响着细胞的免疫系统<sup>[9]</sup>。另一方面, UV 照射 HaCaT 细胞,



A. 空白组; B. UVB 组; C ~ E. 甘草次酸  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 1 甘草次酸对光老化 HaCaT 细胞中 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达量的影响

Fig. 1 Effect of glycyrrhizin on protein expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in photoaging model HaCaT cells

促进 COX-2 表达, COX-2 能介导炎症损伤及毒性发生<sup>[10]</sup>, 诱使皮肤光老化。UV 辐射诱导 HaCaT 细胞产生的细胞因子不仅可以导致局部炎症反应、组织水肿及通透性增加等, 还可激活活化蛋白-1 (AP-1) 及核转录因子 (NF)- $\kappa$ B 通路, 增强 UV 辐射效应, 促进光老化产生<sup>[11]</sup>, 也可通过旁分泌机制作用于成纤维细胞 (HDF), 导致基质金属蛋白酶 (MMP) 含量升高, 加速光老化<sup>[12]</sup>。TNF- $\alpha$  作为机体中广泛分布的关键促炎因子, 具有介导炎症、免疫应答和凋亡等多种生物学效应<sup>[13]</sup>, 可促进细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 等的合成。IL-1 $\beta$  是具有免疫调节和执行宿主防御功能的炎症因子<sup>[14]</sup>, 它可激活蛋白 AP-1, 促进 MMP-1 的产生<sup>[15]</sup>。IL-6 是炎症反应过程中的重要促发剂, 可诱导 T 细胞的增殖和分化, 激活 B 细胞产生抗体, 参与机体的免疫应答<sup>[16]</sup>。IL-6 可诱导 MMP-1 的表达, 导致细胞外基质的降解, 诱使皮肤光老化的发生<sup>[17]</sup>。

本实验结果显示, UVB 辐射后, GSH-Px, CAT 活性降低, LDH 活性升高, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  蛋白表达量升高, 提示 UVB 可导致氧化损伤, 刺激细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达。而加入甘草次酸干预后, GSH-Px, CAT 活性升高, LDH 活性降低, 细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量降低。以上结果证明, 甘草次酸可通过减轻氧化损伤, 抑制细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  的合成和分泌, 从而抵抗 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化。

#### [参考文献]

[1] 李红光. 枸杞多糖在 UVB 辐射人角质形成细胞氧化损伤中的保护作用[D]. 太原: 山西医科大学, 2014.  
[2] Hwang E, Park S Y, YIN C S, et al. Antiaging effects of the mixture of *Panax ginseng* and *Crataegus pinnatifida* in human dermal fibroblasts and healthy

- human skin[J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(1):69-77.
- [ 3 ] 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.
- [ 4 ] XUE P, WANG Y, ZENG F, et al. Paeonol suppresses solar ultraviolet-induced skin inflammation by targeting T-LAK cell-originated protein kinase [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16):27093-27104.
- [ 5 ] 王兵,王亚新,赵红燕,等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2013, 34(3):215-218.
- [ 6 ] 张英杰,苑述刚,马少丹,等. 甘草的中药学及临床文献研究概述[J]. *中医临床研究*, 2010, 3(5):92-94.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] WU D, YUAN P, KE C, et al. Salidroside suppresses solar ultraviolet-induced skin inflammation by targeting cyclooxygenase-2 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18):25971-25982.
- [ 9 ] Rijken F, Kiekens R C, Bruijnzeel P L. Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin[J]. *Br J Dermatol*, 2005, 152(2):321-328.
- [ 10 ] 杨春涛,杨战利,莫利球,等. 环氧酶-2 介导化学性缺氧诱导的人角质形成细胞的炎症损伤作用[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(1):69-73.
- [ 11 ] 张荣利. Toll 受体在 UVB 诱导 NF- $\kappa$ B 激活中的作用及其在光线相关性皮肤病中意义的初步观察[D]. 西安:第四军医大学, 2014.
- [ 12 ] 陈静,陈燕,吴丹丹,等. 枸杞多糖对紫外照射成纤维细胞活力及 MMP-1、MMP-3、MMP-9 表达的影响[J]. *成都中医药大学学报*, 2017, 40(1):9-12.
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] 杨林芳. 新化合物 ECPIRM 及 ATRA 对角质形成细胞炎症因子的影响和相关机制研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2015.
- [ 15 ] 宋秀祖,夏济平,毕志刚. 茶多酚和芦荟甙对 UVB 诱导人角质形成细胞合成和分泌 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  的影响[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2002, 1(1):7-10.
- [ 16 ] 杨柳,王业秋,张宁,等. 异补骨脂素对人皮肤角质形成细胞光老化模型 p-ERK1/2 及炎症因子影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(6):775-778
- [ 17 ] 陶冶,张小卿,吴景东. 绞股蓝总皂苷含药血清对皮肤光老化 HaCaT 细胞分泌炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的影响[J]. *河南中医*, 2013, 33(1):48-50.
- [责任编辑 邹晓翠]