

甘草苷对中波紫外线诱导人皮肤角质形成细胞凋亡的影响

张丽宏¹, 傅云¹, 廖建², 张琼¹, 周立禄³, 周丽³, 王业秋¹, 李建民^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 四川省中西医结合医院, 成都 610041;
3. 资中县中医医院, 四川 资中 641200)

[摘要] 目的:研究甘草苷对中波紫外线(UVB)诱导人皮肤角质形成细胞(HaCaT)凋亡的影响。方法:以不同浓度的甘草苷作用于HaCaT细胞,噻唑蓝(MTT)比色法筛选甘草苷的有效安全浓度;用30 mJ·cm⁻²的UVB作用于HaCaT细胞,建立光老化模型,MTT比色法检测光老化HaCaT细胞增殖率;流式细胞术检测各组细胞中活性氧自由基(ROS)含量和总凋亡率;实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测光老化HaCaT细胞中半胱氨酸天冬氨酸-3(Caspase-3),半胱氨酸天冬氨酸-9(Caspase-9)mRNA表达水平;蛋白免疫印记法(Western blot)检测光老化HaCaT细胞中B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Caspase-3,Caspase-9蛋白表达量。结果:筛选出甘草苷的最佳有效安全浓度为 $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与空白组比较,UVB组细胞增殖率显著降低($P < 0.01$),细胞中ROS含量和总凋亡率显著升高($P < 0.01$),Caspase-3,Caspase-9 mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$);Bcl-2蛋白表达量显著降低($P < 0.01$),Caspase-3,Caspase-9蛋白表达量显著升高($P < 0.01$)。与UVB组比较, $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷+UVB组细胞增殖率显著升高($P < 0.01$);细胞中ROS含量和总凋亡率显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),Caspase-3,Caspase-9 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);Bcl-2蛋白表达量显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),Caspase-3,Caspase-9蛋白表达量显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:甘草苷能通过促进抗凋亡因子Bcl-2蛋白的表达,减少促凋亡相关细胞因子Caspase-3,Caspase-9 mRNA和蛋白的表达,从而抑制UVB诱导的HaCaT细胞凋亡。

[关键词] 甘草苷; 中波紫外线; 人皮肤角质形成细胞; 凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸-3(Caspase-3); 半胱氨酸天冬氨酸-9(Caspase-9); B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)

[中图分类号] R24;R285.5;R275.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0096-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180696

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171212.1828.022.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 10:16

Effect of Liquiritin on UVB-induced Apoptosis of Human Keratinocytes

ZHANG Li-hong¹, FU Yun¹, LIAO Jian², ZHANG Qiong¹, ZHOU Li-lu³,
ZHOU Li³, WANG Ye-qiu¹, LI Jian-min^{1*}

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

2. Sichuan Integrative Medicine Hospital, Chengdu 610041, China;

3. Zizhong Country Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zizhong 641200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of liquiritin on ultraviolet B (UVB) -induced apoptosis of human keratinocytes (HaCaT cells). **Method:** Different concentrations of liquiritin were used to treat HaCaT cells, and the methyl thiazolyltetrazolium (MTT) assay was used to screen the effective and safe concentration of liquiritin; light aging model was set up by the irradiation of ultraviolet radiation B (UVB) at irradiation dose of 30 mJ·cm⁻². Then the activity of cells was determined by MTT method; the content of reactive oxygen species

[收稿日期] 20170913(020)

[基金项目] 黑龙江省应用技术与开发计划项目(PC13S15)

[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

[通信作者] *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

(ROS) and the apoptosis of HaCaT cells were respectively measured by flow cytometry; the expression levels of cysteinyl aspartate-3 (Caspase-3) and cysteinyl aspartate-9 (Caspase-9) mRNA were determined by Real-time PCR method; and Western blot method was used to detect the effects of liquiritin on B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Caspase-3 and Caspase-9 protein expression. **Result:** The optimal safe and effective concentrations of liquiritin were 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , and $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. As compared with the blank group, the cell proliferation rate was significantly decreased in the UVB group ($P < 0.01$); the content of ROS and the total apoptosis rate of cells were significantly increased ($P < 0.01$); the expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA were significantly increased ($P < 0.01$); the expression level of Bcl-2 protein was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 protein were significantly increased ($P < 0.01$). As compared with the UVB group, the cell proliferation rate of the (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , and 1×10^{-5}) $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ liquiritin + UVB groups were significantly increased ($P < 0.01$); the content of ROS and the total apoptosis rate of cells were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the expression level of Bcl-2 protein was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 protein were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Liquiritin can promote the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 protein, and decrease the expression of the apoptosis-related factors Caspase-3 and Caspase-9 mRNA and protein, thus inhibiting the apoptosis of HaCaT cells induced by UVB.

[**Key words**] liquiritin; ultraviolet B; human keratinocytes; apoptosis; cysteinyl aspartate-3 (Caspase-3); cysteinyl aspartate-9 (Caspase-9); B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)

甘草,为豆科植物甘草的根和根茎,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^[1]。甘草苷是从甘草根部提取出的一种三萜皂苷类化合物^[2],现代研究表明,甘草苷具有抗氧化、抗过敏、增强机体免疫力、抑菌和神经保护等药理作用^[3]。人皮肤角质形成细胞(HaCaT细胞)位于人体皮肤的最表层,是紫外线(UV)作用的主要敏感靶细胞,辐射到表皮的紫外线95%被角质形成细胞所吸收^[4]。长期的UV辐射将导致大量活性氧自由基(ROS)堆积于体内^[5],引发炎症反应、细胞凋亡、氧化损伤和DNA破坏等,诱导凋亡相关细胞因子的表达,导致细胞凋亡^[6]。宁舒鹏等^[7]实验研究表明甘草苷对中波紫外线(UVB)引起的小鼠皮肤光老化具有保护作用,并证实具有抗氧化作用,可清除自由基,并能通过抑制半胱氨酸天冬氨酸-12(Caspase-12)的活化,阻断Caspase-3的激活,抑制细胞的凋亡。周玉杰等^[8]实验证明,当UVB照射剂量为 $30 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,即可导致HaCaT细胞光损伤,并且发生凋亡和坏死。目前,对于甘草苷能否抑制UVB诱导的HaCaT细胞凋亡及其机制尚不明确。因此,本实验选择用 $30 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB辐射HaCaT细胞,探讨甘草苷对UVB诱导的HaCaT细胞凋亡的影响及其相关机制,为日后紫外防护剂和化妆品的开发提供理论依据。

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 甘草苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-16082811);胎牛血清 FBS,青、链霉素,DMEM 培养液(美国 Hyclone 公司,批号分别为 NYB0614,20161230,NZM1301);AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒,GExcel UltraSYBR Mixture(With ROX)[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为 B532445,B532956];Annexin-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒,活性氧自由基(ROS)试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为 C1026,S0033);兔抗人活化 Caspase-3, Caspase-9, B 淋巴瘤细胞瘤-2(Bcl-2)多克隆抗体,兔抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体,羊抗兔二抗(博奥森生物有限公司,批号分别为 bs-0081R,bs-0049R,bs-0032R,bs-00611R,bs-0295G)。

1.3 仪器 HF240 型 CO_2 培养箱(上海智城分析仪器公司);IX-71-21PH 型倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社);GTR16-2 型高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司);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);miniPROTEANTetra Cell 型电泳仪,Trans-Blot SD

Cell 型半干转膜仪(英国 Bio-Rad 公司); Mx3000P 型实时定量 PCR 扩增仪(安捷伦科技有限公司); HPC-150 型流式细胞仪(Handyem 公司); Nano-100 型微量分光光度计(杭州奥胜仪器有限公司)。

2 方法

2.1 噻唑蓝(MTT)比色法筛选甘草苷的有效安全浓度 取对数生长期的人皮肤角质形成细胞(HaCaT),用胰酶消化,离心,弃上清,加入 DMEM 培养液 3 mL,以 1×10^4 个/孔的细胞密度接种至 96 孔板,每组 6 个复孔,96 孔板的四周用 PBS 封闭,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养 24 h。96 孔板内细胞随机分为空白组和甘草苷组,吸弃培养液,空白组加入新培养液 200 μL ;甘草苷组每孔分别加入 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , $1 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘草苷药液 200 μL 。孵育 24 h 后,每孔加入 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 20 μL ,孵育 4 h,弃掉培养液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL ,置于恒温培养振荡器上震荡, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min,在酶标仪 492 nm 波长处测定吸光度 A 。

2.2 MTT 比色法检测光老化 HaCaT 细胞增殖率 细胞培养 24 h 后,将 96 孔板内细胞随机分为空白组,UVB 组,甘草苷 + UVB 组。弃培养液,用 PBS 清洗 2 次,每孔加 PBS 200 μL ,将空白组用铝箔纸覆盖,用 UVB 照射仪照射 UVB 组和甘草苷 + UVB 组,照射剂量为 $30 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。照射完毕,弃去 PBS,甘草苷 + UVB 组每孔分别加入 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘草苷药液 200 μL ,空白组和 UVB 组分别加入 DMEM 培养液 200 μL ,24 h 后,每孔加入 MTT 20 μL ,孵育 4 h,弃去培养液,每孔加入 DMSO 150 μL ,恒温培养振荡器上震荡, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min,在酶标仪 492 nm 波长处测定 A 。

2.3 流式细胞术测定 ROS 含量 细胞培养至对数期,以 1×10^6 个/孔将细胞悬液种植至 6 孔板,2 mL/孔,细胞按不同分组情况培养后,弃掉培养液,加入 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 1 mL/孔,将 6 孔板放在培养箱内静置 20 min,每 5 min 将孔板中的各孔混 1 次,使细胞充分接触探针。孵育结束,用无血清培养液洗涤细胞 3 次,收集细胞,加入无血清培养液 1 mL,上流式细胞仪检测,该实验重复 6 次。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 6 孔板内细胞参照 2.2 项方式进行分组和造模。收集 6 孔板中各组细胞,将旧培养液转移至 15 mL 离心管中,使用 PBS 清洗细胞 2 次,加入胰酶 2 mL 消化,消化完毕,用旧培养液终止消化, $1\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5 min,弃

上清,加入 PBS 3 mL 重悬并计数,取 4 ~ 12 万个细胞,置于 1.5 mL 离心管中, $1\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5 min,弃上清。按照试剂盒说明书,先加入 Annexin V-FITC 结合液 500 μL ,再加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液 5 μL ,室温下避光孵育 10 min,最后用流式细胞仪检测,实验重复 6 次并分析结果。

2.5 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 法检测 Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达水平 6 孔板细胞依照不同分组情况培养后,消化离心,收集细胞到 15 mL 的离心管中,PBS 洗涤 2 次,按照每孔 1 mL 的量加入细胞裂解液(trizol),10 min 后用移液枪轻轻吹打 5 min,转移至 2 个 1.5 mL 离心管中,加入三氯甲烷,200 μL /管,用力摇动 15 s,放置 3 min 后,离心($4\text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min),将上清吸到新离心管中,每管加入等量的异丙醇,混匀,静置 10 min, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,离心($4\text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min),弃上清,每管加入提前冷制的 75% 乙醇 2 mL 洗涤,涡旋,离心($4\text{ }^\circ\text{C}$, $10\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min),轻轻倒出上清,倒扣离心管 10 min,每管加入 10 μL 无 RNA 酶水溶解 RNA 沉淀, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。紫外分光光度计检测提取的总 RNA 浓度及纯度,要求 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.0,调整总 RNA 浓度为 $2\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。取 200 μL PCR 管,分别加入总 RNA 1 μL , RNase water 9 μL ,引物 oligo (dT) 1 μL , $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 5 min,冰浴 10 s,瞬时离心收集液滴,依次加入 $5 \times$ Reaction Buffer 4 μL , RNase Inhibitor 1 μL , dNTP Mix 2 μL , AMV RT 2 μL ,微型离心机瞬时离心 3 ~ 5 s 收集液滴, $42\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 1 h, $70\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 10 min, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 储存备用。使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒,进行 Real-time PCR 检测。反应体系为每孔包括 $2 \times$ SYBR Mixture 10 μL ,上下游引物各 0.4 μL ,反转录产物 0.8 μL 分别加入八联管中等待检测。反应条件为预变性($95\text{ }^\circ\text{C}$, 3 min),变性($95\text{ }^\circ\text{C}$, 20 s),退火/延伸($72\text{ }^\circ\text{C}$, 20 s),40 个循环。结果采用 MxPro QPCR 软件分析 cDNA 的溶解曲线及扩增曲线,目的基因 mRNA 的相对表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。引物序列信息见表 1。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bel-2, Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达量 6 孔板中各组细胞生长达 80% ~ 90% 时,收集至 15 mL 离心管中,以 1:99 将蛋白酶抑制剂(PMSF)和裂解液(RIPA)混匀,按照每孔 100 μL 的量加入混合液提取蛋白,上样缓冲液和蛋白样品以 1:4 的比例混匀,煮沸 10 min 使蛋白变性。根据蛋白浓度计算出每孔上样量,聚丙烯

表 1 PCR 引物序列信息

Table 1 Primers sequence information of Real-time PCR

名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物大小/bp
Caspase-3	CTGCCGTGGTACAGAACTGG	CCAGGTGCTGTGGAGTATGC	162
Caspase-9	TTGGTGATGTGGTGCTCTT	GGACTCACGGCAGAAGTTCA	171
β -actin	CCTGGCACCCAGCACAAAT	GGGCCGGACTCGTCATAC	164

酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 80 V, 30 min, 更换电压 110 V, 60 min。半干转膜 30 min, 室温下在封闭液中封闭 2 h, 加入一抗(1:500), 4 °C 过夜, TBST 洗膜 4 次, 加二抗(1:10 000), 置于水平摇床上孵育 2 h, TBST 洗膜 4 次, ECL 发光液显影(A 液-B 液 1:1), 利用 Lane ID 凝胶软件分析数据, 每组实验重复 6 次。

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

3 结果

3.1 甘草苷对 HaCaT 细胞增殖率的影响 与空白组比较, $1 \times 10^{-10}, 1 \times 10^{-9}, 1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷组细胞增殖率显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 提示该浓度可促进细胞增殖; $1 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷组细胞增殖率显著降低 ($P < 0.01$), 提示该浓度可抑制细胞增殖; $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷组对细胞增殖率无明显影响, 差异无统计学意义, 提示该浓度下甘草苷对细胞无明显的促增殖与抑制作用。因此, $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷为最佳有效安全浓度。见表 2。

表 2 甘草苷对 HaCaT 细胞增殖率的影响

Table 2 Effect of liquiritin on 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	-	0.533 \pm 0.014	100
甘草苷	1×10^{-10}	0.551 \pm 0.021 ¹⁾	103 ¹⁾
	1×10^{-9}	0.580 \pm 0.021 ²⁾	109 ²⁾
	1×10^{-8}	0.607 \pm 0.017 ²⁾	114 ²⁾
	1×10^{-7}	0.521 \pm 0.015	98
	1×10^{-6}	0.530 \pm 0.008	99
	1×10^{-5}	0.537 \pm 0.013	101
	1×10^{-4}	0.434 \pm 0.013 ²⁾	81 ²⁾
	1×10^{-3}	0.407 \pm 0.063 ²⁾	76 ²⁾

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

3.2 甘草苷对光老化 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, $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷 + UVB 组细胞增殖率显著升高 ($P < 0.01$)。该结果表明, 甘草苷能保护 HaCaT 细胞, 且其保护作用对浓度具有一定的依耐性。见表 3。

表 3 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞增殖率的影响

Table 3 Effect of liquiritin 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	-	0.525 \pm 0.013	100
UVB	-	0.442 \pm 0.014 ¹⁾	84 ¹⁾
甘草苷 + UVB	1×10^{-7}	0.512 \pm 0.014 ²⁾	97 ²⁾
	1×10^{-6}	0.518 \pm 0.012 ²⁾	99 ²⁾
	1×10^{-5}	0.521 \pm 0.013 ²⁾	99 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 UVB 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞总凋亡率的影响 与空白组比较, UVB 组细胞 ROS 含量和总凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 与 UVB 组比较, $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷 + UVB 组细胞 ROS 含量和总凋亡率显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。该结果表明甘草苷可抑制细胞的凋亡, 且总凋亡率随着浓度的增大而降低。见表 4。

表 4 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞中 ROS 含量和总凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of liquiritin on content of ROS and total apoptosis rate of photoaging model HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ROS/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	总凋亡率/%
空白	-	3.479 \pm 0.420	4.930 \pm 0.082
UVB	-	5.102 \pm 0.201 ¹⁾	8.853 \pm 0.159 ¹⁾
甘草苷 + UVB	1×10^{-7}	4.591 \pm 0.180 ²⁾	8.503 \pm 0.190 ²⁾
	1×10^{-6}	4.407 \pm 0.194 ³⁾	8.087 \pm 0.215 ³⁾
	1×10^{-5}	3.946 \pm 0.080 ³⁾	6.243 \pm 0.222 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 UVB 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 5, 6 同)。

3.4 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞中 Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较,

UVB 组 Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 UVB 组比较, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷 + UVB 组 Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 5。

表 5 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞中 Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

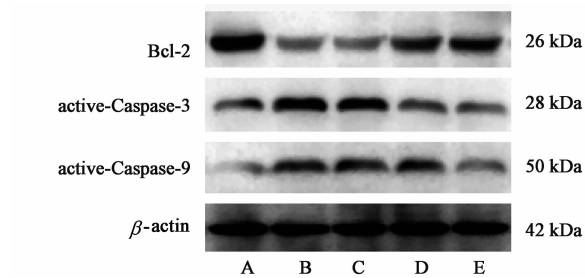
Table 5 Effect of liquiritin on mRNA expression of Caspase-3 and Caspase-9 in photoaging model HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3	Caspase-9
空白	-	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
UVB	-	1.505 ± 0.025 ¹⁾	1.594 ± 0.084 ¹⁾
甘草苷 + UVB	1×10^{-7}	1.359 ± 0.091 ²⁾	1.303 ± 0.230 ²⁾
	1×10^{-6}	1.305 ± 0.065 ³⁾	1.296 ± 0.153 ²⁾
	1×10^{-5}	1.206 ± 0.079 ³⁾	1.185 ± 0.180 ³⁾

表 6 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞中 Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of liquiritin on protein expression of Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in photoaging model HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	Caspase-9/ β -actin
空白	-	0.438 ± 0.012	0.128 ± 0.017	0.089 ± 0.017
UVB	-	0.145 ± 0.012 ¹⁾	0.361 ± 0.014 ¹⁾	0.281 ± 0.016 ¹⁾
甘草苷 + UVB	1×10^{-7}	0.173 ± 0.019 ²⁾	0.323 ± 0.012 ²⁾	0.253 ± 0.014 ²⁾
	1×10^{-6}	0.316 ± 0.010 ³⁾	0.182 ± 0.014 ³⁾	0.246 ± 0.017 ²⁾
	1×10^{-5}	0.357 ± 0.014 ³⁾	0.151 ± 0.025 ³⁾	0.126 ± 0.006 ³⁾



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

图 1 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞中 Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达量的影响

Fig. 1 Effect of liquiritin on protein expression of Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in photoaging model HaCaT cells

酶 (Caspase) 家族介导的蛋白酶解级联反应, 最终促使细胞凋亡^[11]。Caspase 家族是一系列具有相似氨基酸序列、二级蛋白质结构的半胱氨酸蛋白酶, 被认为是细胞凋亡的中心环节和执行者, 是一种调控细胞凋亡的蛋白水解酶^[12]。Caspase 可阻滞细胞周期、分解细胞骨架中的结构蛋白并使 DNA 修复酶

3.5 甘草苷对光老化 HaCaT 细胞 Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达量的影响 与空白组比较, UVB 组 Bcl-2 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与 UVB 组比较, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷 + UVB 组 Bcl-2 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 6, 图 1。

4 讨论

细胞凋亡是细胞在受到环境的生理性或者病理性的刺激时, 引起的由多基因调控的细胞主动有序变化的死亡过程, 亦可称之为程序性细胞死亡^[9]。紫外线激活诱导的细胞凋亡主要有两个途径为一是通过线粒体途径引起细胞凋亡的内途径, 二是具有死亡受体依赖性的外途径^[10], 以上两种途径最后都汇聚到同一通路, 即半胱氨酸天冬氨酸蛋白

失活^[13]。线粒体是调控细胞凋亡的中心^[14], UVB 作用于角质细胞, 诱导产生并使大量的 ROS 堆积于体内, 导致线粒体膜外膜损伤, 细胞中 DNA, 蛋白质结构、脂质等被破坏^[15], 直接促进细胞的凋亡。抗凋亡和促凋亡调节因子 Bcl-2 是 Bcl-2 家族中重要的成员之一, 其编码的蛋白可以抑制细胞凋亡^[16]。此外, Bcl-2 可通过调节线粒体功能稳定线粒体膜并通过蛋白相关转换孔维持膜的通透性, 从而调节细胞凋亡, 延长细胞的存活期^[17]。过量的 ROS 作用于线粒体, 激活位于膜上的 Bcl-2 家族, 增加线粒体膜的通透性, 线粒体内细胞色素 C 释放到细胞质内, 胞质内的细胞色素 C 激活 Caspase 蛋白家族, 进而启动 Caspase 级联反应^[18], 激活的 Caspase 效应蛋白可以酶解细胞中的结构蛋白、切割各种特异性底物, 通过改变其结构或影响特定凋亡信号分子导致细胞凋亡^[19]。Caspase-9 位于级联反应的上游, 为凋亡始动子, 可以与细胞色素 C 结合形成活性复合物, 从而激活下游的 Caspase 成员并且自我活化^[20]。

Caspase-3 位于级联反应的下游,为凋亡效应子,生理状况下以酶原的形式存在于细胞浆中^[21],活化的 Caspase-9 可激活 Caspase-3,活化后的 Caspase-3 可以作用于细胞内各种特异性底物,使细胞形成典型的凋亡小体,导致细胞凋亡^[22]。因此,通过测定细胞中 Bcl-2, Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白的表达量,可以间接反映细胞的凋亡情况。

本研究结果显示,UVB 辐射后,细胞中 ROS 含量和总凋亡率显著升高,Bcl-2 蛋白表达量显著降低,Caspase-3, Caspase-9 mRNA 和蛋白表达量显著升高,提示 UVB 辐射可激活 Caspase 蛋白家族,启动 Caspase 级联反应诱导细胞的凋亡。加入甘草苷干预后,细胞中 ROS 含量和总凋亡率显著降低,Bcl-2 蛋白表达量显著升高,Caspase-3, Caspase-9 mRNA 和蛋白表达量显著降低,提示甘草苷可减少 Caspase 家族的表达,进而抑制细胞凋亡。以上结果表明,甘草苷可通过降低细胞中 ROS 含量和总凋亡率,促进抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白的表达,减少促凋亡相关细胞因子 Caspase-3, Caspase-9 mRNA 和蛋白的表达,从而抑制 UVB 辐射诱导的细胞凋亡。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 孙国庆,罗正里. 甘草苷对衰老模型大鼠的抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志,2014,34(7):1895-1896.

[3] 冯月. 甘草酸和甘草苷提取工艺及抗氧化活性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.

[4] 王丽雯,孙娟,燕华玲,等. 藏雪莲水提取物减轻中波紫外线辐射后 HaCaT 细胞凋亡的体外研究[J]. 实用医学杂志,2016,32(8):1240-1243.

[5] 李辰,齐雪松,李宁,等. UVB 辐射对人角质形成细胞 HaCaT 的 DNA 损伤及其机制[J]. 中国工业医学杂志,2015,28(60):403-405,424,481.

[6] 朱开梅,陈丹,李美波,等. 构树叶总黄酮调控 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达及 Caspase-3 活性诱导 HepG-2 细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):128-133.

[7] 宁舒鹏. 甘草黄酮对 UVB 损伤的保护作用及其对内质网应激相关调控分子影响的初步探索[D]. 兰州:兰州大学,2012.

[8] 周玉杰,李瑞欣,孙凯,等. 五味子乙素对 UVA 损伤组织工程皮肤保护作用的研究[J]. 中国美容医学,2014,23(6):457-461.

[9] 孙百慧. 晚期氧化蛋白产物诱导人角质形成细胞凋亡机制的研究[D]. 广州:南方医科大学,2016.

[10] 王丽雯. 藏雪莲水提取物减轻 UVB 辐射后 HaCaT 细胞凋亡的机制研究[D]. 西宁:青海大学,2016.

[11] 秦兰英,邢卫斌,叶文静,等. Bcl-2、Caspase-3、Survivin 与银屑病的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(6):1001-1003.

[12] 陈巧云,王业秋,曲岩,等. 桃叶珊瑚苷对光损伤 HaCaT 细胞 Bax, Bcl-2, Caspase-3 表达的影响[J]. 现代生物医学进展,2017,17(1):24-27.

[13] 马月璐. 矢车菊素-3-葡萄糖苷对 HaCaT 细胞光损伤的 ROS、p53 调控机制初步研究[D]. 广州:暨南大学,2015.

[14] Pereira C, Lopes-Rodrigues V, Coutinho I, et al. Potential small-molecule activators of Caspase-7 identified using yeast-based Caspase-3 and-7 screening assays[J]. Eur J Pharm Sci, 2014,11(54):8-16.

[15] 陈琼. 半边莲对 BGF 诱导的 HaCaT 细胞增殖与凋亡的影响[D]. 杭州:浙江中医药大学,2013.

[16] 李冷,钟晓琴,卢传坚,等. 紫草素对人角质形成细胞 HaCaT 增殖抑制以及细胞毒性的初步研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(4):857-860.

[17] 许丽. 寻常型银屑病皮损面积和严重程度评分与表皮生长因子受体、Bcl-2 及 Caspase-14 的相关性研究[D]. 桂林:桂林医学院,2014.

[18] 王莹. Caspase-3、Bax、Bcl-2 和 Beclin-1 在慢性紫外线损伤小鼠模型表皮角质形成细胞中的表达及意义[D]. 天津:天津医科大学,2012.

[19] 李哲. 苦杏仁精油诱导 HaCaT 细胞凋亡和抑制 NF- κ B 途径的机理[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016.

[20] Bhattacharya S, Ray R M, Johnson L R. Cyclin-dependent kinases regulate apoptosis of intestinal epithelial cells [J]. Apoptosis, 2014, 19(3):451-466.

[21] 程晓晖. PGRN 在 AD 模型小鼠海马内的表达及与凋亡相关因子 Bax/Bcl-2/Caspase-3 关系的研究[D]. 广州:广东药科大学,2016.

[22] 刘昭晗. 纳米矢车菊-3-葡萄糖苷干预 UVB 急性光损伤小鼠皮肤 p53 线粒体凋亡通路的研究[D]. 广州:暨南大学,2016.

[责任编辑 邹晓翠]