

黄芩素对中波紫外线诱导角质形成细胞凋亡及相关细胞因子表达的影响

张丽宏¹, 傅云¹, 廖建², 张琼¹, 王冬梅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. 内江市中医医院, 四川 内江 641000)

[摘要] 目的:研究黄芩素对中波紫外线(UVB)诱导角质形成细胞凋亡及相关细胞因子表达的影响。方法:体外培养人皮肤角质形成细胞(HaCaT),取对数生长期的细胞,随机分为空白组、模型组和黄芩素组,并用 $30\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的UVB照射模型组和黄芩素组,建立光老化模型。噻唑蓝(MTT)比色法筛选黄芩素的有效安全浓度,并测定黄芩素对光老化 HaCaT 细胞增殖率的影响;活性氧自由基(ROS)试剂盒测定各组细胞中 ROS 含量;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒测定各组细胞凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定各组细胞中 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),半胱氨酸天冬氨酸-3(Caspase-3)及 Caspase-9 蛋白表达水平。结果:筛选出 $1\times 10^{-7}, 1\times 10^{-6}, 1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素为最佳有效安全浓度。与空白组比较,模型组 ROS 含量和细胞凋亡率显著升高($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, $1\times 10^{-7}, 1\times 10^{-6}, 1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素组 ROS 含量和细胞凋亡率显著降低($P<0.05, P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.05, P<0.01$),Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平显著下降($P<0.05, P<0.01$)。结论:黄芩素可以通过降低细胞 ROS 含量和凋亡率,调控 Bcl-2 家族中抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白的表达,降低凋亡相关细胞因子 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达水平,抑制 UVB 诱导的细胞凋亡。

[关键词] 黄芩素; 中波紫外线; 角质形成细胞; 凋亡

[中图分类号] R222;R285.5;R275.9;R281 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0145-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20180632

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180103.1023.001.html>

[网络出版时间] 2018-01-05 15:14

Effect of Baicalein on Ultraviolet B-induced Apoptosis and Expression of Related Cytokines of Human Keratinocytes

ZHANG Li-hong¹, FU Yun¹, LIAO Jian², ZHANG Qiong¹, WANG Dong-mei³, 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. Neijiang City Chinese Medicine Hospital, Neijiang 641000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of baicalein on ultraviolet B (UVB) -induced apoptosis and the expression of related cytokines of human keratinocytes (HaCaT cells). **Method:** The HaCaT cells were cultured *in vitro*, and the logarithm of the cells was taken. Cells were randomly divided into blank control group, model group and baicalein group. The irradiation of UVB was given at irradiation dose of $30\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ to establish photoaging model for model group and baicalein group. The method of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to screen the effective and safe concentration of baicalein and screen the effects of baicalein on the proliferation

[收稿日期] 20170926(007)

[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, 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, E-mail:ljm_1030@126.com

rate of photoaging HaCaT cells; the content of reactive oxygen species (ROS) in each group was determined by reactive oxygen free radical (ROS) kit; the apoptosis of HaCaT cells was determined by the Annexin V-FITC apoptosis detection kit; and Western blot method was used for detecting the effects of baicalein on B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cysteinyl aspartate-3 (Caspase-3) and Caspase-9 protein expression. **Result:** The best safe and effective concentrations of baicalein were 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. As compared with the blank group, the content of ROS and the apoptosis rate of the model group were significantly increased ($P < 0.01$); the expression 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 model group, the content of ROS and the apoptosis rate in 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ baicalein groups were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the expression 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:** Baicalin can reduce the content of ROS and the apoptosis rate of HaCaT cells, regulate the expression of Bcl-2 protein in Bcl-2 family, decrease the expression of related cytokines Caspase-3 and Caspase-9, and inhibit the apoptosis induced by UVB.

[**Key words**] baicalin; ultraviolet B; human keratinocytes; apoptosis

人皮肤角质形成细胞 (human keratinocytes, HaCaT) 作为表皮结构中的重要组成细胞, 对于表皮功能的发挥和形态的构建以及保护机体免受外界侵害方面起着关键作用^[1]。近几年, 由于环境污染日益严重, 太阳光中辐射到人体皮肤的紫外线 (UV) 逐渐增加。UV 中导致人表皮急性光损伤的主要是波长为 290 ~ 320 nm 的 UVB, 长期的 UVB 辐射可导致氧化应激反应损伤, 使皮肤细胞中的重要生物大分子受累, 导致细胞内各种生物代谢功能的损伤, 从而诱导细胞凋亡及其他细胞内环境及功能紊乱^[2]。黄芩素是从常用的传统中药黄芩中提取的重要单体, 归属于黄酮类化合物, 是中药黄芩中的主要有效活性成分之一^[3]。经过对其药理作用的深入研究, 目前已经证实黄芩素具有抗氧化、清除自由基、抗过敏、抗菌、抗病毒、利尿、保肝以及抗肿瘤、抗胰蛋白酶活性和降低胆固醇等药理作用^[4], 具有较好的临床开发研究价值。杨柳等^[5-6] 实验研究证明, 黄芩素可通过阻断 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路和抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路, 抑制炎症因子的产生, 抵抗 UVB 辐射造成的 HaCaT 光老化。因此, 本实验用总剂量为 $30 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 UVB 作用于角质细胞, 制备光老化模型, 研究黄芩素是否能通过抑制 UVB 诱导的 HaCaT 细胞凋亡及相关细胞因子的表达, 对光老化 HaCaT 细胞起到保护作用, 为日后临床开发研究黄芩素预防和治疗皮肤光老化提供一定的理论基础。

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 药物与试剂 黄芩素 (成都曼思特生物科技有限公司, 批号 A0018); DMEM 高糖培养基和胎牛血清 (FBS) (美国 Hyclone 公司, 批号分别为 SH300022.01, SV30087.01); 活性氧 (ROS) 试剂盒, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天生物技术研究所, 批号分别为 S0033, C1026); 羊抗兔二抗, B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 多克隆抗体, 兔抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体, 兔抗人活化半胱氨酸天冬氨酸-3 (Caspase-3), Caspase-9 (博奥森生物有限公司, 批号分别为 bs-00611R, bs-0295G, bs-0032R, bs-0081R, bs-0049R)。

1.3 仪器 UVB 型紫外照射仪 (美国 Sigma 公司), MK3 型酶标仪 (中国上海热电仪器有限公司), DYY-10C 型电泳仪 (北京六一仪器厂), GTR16-2 型高速台式冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂), Smart chemi II 型化学发光成像仪 (北京赛智创业有限公司), HPC-150 型流式细胞仪 (加拿大 Handyem 公司), miniPROTEANTetra 系列电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 高糖 DMEM 培养基的配制 将胎牛血清 56 mL 和青霉素-链霉素 5.6 mL 加入至 500 mL DMEM 培养基中, 混合后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存备用。

2.2 黄芩素溶液的配制 根据黄芩素相对分子质量, 精密称取药物, 配成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药物母液, 按实验需求稀释成 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , $1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作

液, 0.22 μm 滤膜过滤, -20 °C 保存待用。

2.3 噻唑蓝 (MTT) 比色法筛选黄芩素的有效安全浓度 取对数期的细胞, 以 1×10^4 个/孔的密度将细胞接种到 96 孔板, 设置 6 个复孔, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养。将 96 孔板内细胞随机分为空白组和 (1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} mol·L⁻¹) 黄芩素组。孵育 24 h, 弃掉旧培养液, 空白组每孔加入新培养液 200 μL; 黄芩素组分别加入 8 个不同浓度的黄芩素 200 μL。孵育 24 h, 加入 MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 20 μL/孔, 孵育 4 h, 弃掉培养液, 加入 DMSO, 150 μL/孔, 在 492 nm 波长处用酶标仪测定吸光度 A。

2.4 MTT 法测定黄芩素对光老化 HaCaT 增殖率的影响 96 孔板内细胞随机分为空白组、模型组和 (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol·L⁻¹) 黄芩素组。孵育 24 h, 弃掉旧培养液, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS), 200 μL/孔, 用铝箔纸遮盖空白组, 使用 UVB 紫外照射仪作用于模型组和黄芩素组。照射完毕, 空白组每孔加入培养液 200 μL; 黄芩素组分别加入 3 个不同浓度的黄芩素 200 μL。孵育 24 h 后, 加入 MTT, 20 μL/孔, 孵育 4 h, 弃掉培养液, 加入 DMSO, 150 μL/孔, 在 492 nm 波长处用酶标仪测定 A。

2.5 ROS 试剂盒测定各组细胞中 ROS 含量 取对数期的细胞, 以 1×10^6 个/孔的密度将细胞接种到 6 孔板, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养。孵育 24 h 后, 将细胞随机分为空白组、模型组和 (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol·L⁻¹) 黄芩素组。参照 2.4 项方式造模, 根据不同分组情况培养后, 移除培养液, 每孔加入浓度为 $10 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 1 mL, 将 6 孔板置于培养箱内静置 20 min, 各孔每 5 min 混匀 1 次, 使细胞充分接触探针。孵育结束, 用不含血清的培养液洗涤细胞 3 次, 收集细胞, 加入无血清培养液 1 mL, 上流式细胞仪检测。

2.6 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒测定各组细胞凋亡率 6 孔板中细胞生长达 80% ~ 90% 时, 收集各组细胞, 将上清液吸至 15 mL 离心管, 用 PBS 洗涤 6 孔板中的细胞 1 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 然后用吸出的上清液停止消化, 离心后对细胞进行收集, 添加 PBS 1 mL 重悬细胞并计数, 取含约 1×10^5 个细胞的重悬液, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后移除上清, 按照凋亡试剂盒说明书操作, 进行流式细胞仪检测。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Bcl-2,

Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平 6 孔板中细胞生长达 80% ~ 90% 时, 收集各组细胞, 将上清液吸至 15 mL 离心管, 按每孔 100 μL 的量添加 RIPA 裂解液 (含 1% PMSF), 静置 3 min 后将液体移至 1.5 mL 离心管中, 冰上静置 30 min 然后离心 (4 °C , $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 将上清吸出至另 1 个新 1.5 mL 离心管中, 即为蛋白。将蛋白样品与 $5 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液以 4:1 比例混合, 沸水加热 7 min, 使蛋白充分变性。配制分离胶和浓缩胶, 将制好的凝胶放入电泳槽内, 内外槽加入新鲜配制的电泳缓冲液, 拔出样梳, 加入蛋白样品, 上样量为 60 μg。电泳结束切割凝胶, 置于半干转印仪上转膜 (10 V , 30 min)。一抗 ($1:500$) 封闭, 4 °C 过夜, 二抗 ($1:10\ 000$) 孵育 1 h, ECL 发光液 A 液和 B 液按照 1:1 的比例混合均匀, 滴至 PVDF 膜上, 使其均匀覆盖, 于暗室中曝光并显影, 分析结果。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较使用单因素方差处理, 两样本比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素对正常 HaCaT 细胞增殖率的影响 与空白组比较, 1×10^{-10} , 1×10^{-9} , 1×10^{-8} mol·L⁻¹ 黄芩素可明显促进细胞增殖 ($P < 0.01$); 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol·L⁻¹ 黄芩素对细胞无明显的促增殖与抑制作用, 对细胞增殖率无显著影响; 1×10^{-4} , 1×10^{-3} mol·L⁻¹ 黄芩素可显著抑制细胞增殖, 对细胞有毒性作用 ($P < 0.01$)。因此, 本实验选择对细胞无显著影响的 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol·L⁻¹ 的黄芩素用于后续实验研究。见表 1。

表 1 黄芩素对正常 HaCaT 细胞增殖率的影响

Table 1 Effect of baicalin on normal HaCaT cells proliferation rate

组别	浓度/mol·L ⁻¹	A ($\bar{x} \pm s, n=6$)	细胞增殖率/%
空白	-	0.541 ± 0.022	100
黄芩素	1×10^{-10}	0.571 ± 0.012 ¹⁾	106 ¹⁾
	1×10^{-9}	0.590 ± 0.013 ¹⁾	109 ¹⁾
	1×10^{-8}	0.614 ± 0.026 ¹⁾	114 ¹⁾
	1×10^{-7}	0.523 ± 0.024	97
	1×10^{-6}	0.528 ± 0.014	98
	1×10^{-5}	0.537 ± 0.022	99
	1×10^{-4}	0.462 ± 0.016 ¹⁾	85 ¹⁾
	1×10^{-3}	0.415 ± 0.014 ¹⁾	77 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 黄芩素对光老化 HaCaT 细胞增殖率的影响
与空白组比较,模型组细胞增殖率显著降低($P < 0.01$),提示 UVB 可抑制细胞的增殖。与模型组比较, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素组细胞增殖率显著升高($P < 0.01$),提示黄芩素对于光老化 HaCaT 细胞有一定的保护作用,其保护作用与浓度呈现一定的依耐性。见表 2。

表 2 黄芩素对光老化 HaCaT 细胞增殖率的影响
Table 2 Effect of baicalin 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/%
空白对照	-	0.518 ± 0.011	100
模型	-	$0.443 \pm 0.022^{1)}$	86 ¹⁾
黄芩素	1×10^{-7}	$0.499 \pm 0.008^{2)}$	96 ²⁾
	1×10^{-6}	$0.504 \pm 0.015^{2)}$	97 ²⁾
	1×10^{-5}	$0.512 \pm 0.017^{2)}$	99 ²⁾

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

3.3 黄芩素对 HaCaT 细胞 ROS 含量及凋亡率的影响
与空白组比较,模型组 ROS 含量和凋亡率显著升高($P < 0.01$),提示 UVB 可促进细胞凋亡。与模型组比较, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素组 ROS 含量和凋亡率显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示黄芩素可抑制 UVB 诱导细胞凋亡。见表 3。

表 3 黄芩素对 HaCaT 细胞 ROS 含量及凋亡率的影响
Table 3 Effect of baicalin on content of ROS and apoptosis rate of HaCaT cells

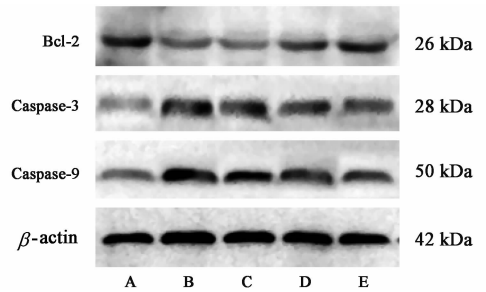
组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ROS/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白	-	3.812 ± 0.250	2.950 ± 0.260
模型	-	$6.168 \pm 0.327^{1)}$	$9.280 \pm 0.590^{1)}$
黄芩素	1×10^{-7}	$5.548 \pm 0.290^{2)}$	$7.123 \pm 0.427^{3)}$
	1×10^{-6}	$4.870 \pm 0.216^{3)}$	$6.396 \pm 0.150^{3)}$
	1×10^{-5}	$4.072 \pm 0.221^{3)}$	$5.540 \pm 0.185^{3)}$

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

3.4 黄芩素对 HaCaT 细胞中 Bcl-2, Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平的影响
与空白组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$),Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4,图 1。

表 4 黄芩素对 HaCaT 细胞中 Bcl-2, Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平的影响
Table 4 Effect of baicalin on protein expression of Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in HaCaT cells

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	Caspase-9/ β -actin
空白	-	0.852 ± 0.051	0.270 ± 0.044	0.317 ± 0.023
模型	-	$0.341 \pm 0.059^{1)}$	$0.426 \pm 0.041^{1)}$	$0.603 \pm 0.009^{1)}$
黄芩素	1×10^{-7}	0.415 ± 0.022	$0.366 \pm 0.016^{2)}$	$0.561 \pm 0.010^{2)}$
	1×10^{-6}	$0.451 \pm 0.047^{2)}$	$0.352 \pm 0.014^{2)}$	$0.552 \pm 0.008^{3)}$
	1×10^{-5}	$0.678 \pm 0.035^{3)}$	$0.305 \pm 0.008^{3)}$	$0.405 \pm 0.033^{3)}$



A. 空白组;B. 模型组;C ~ E. 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素组

图 1 黄芩素对细胞中 Bcl-2, Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达电泳
Fig. 1 Effect of baicalin on protein expression of Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in HaCaT cells

4 讨论

细胞凋亡是指为维持机体内环境处于稳定状态,由于细胞内外环境的变化或死亡信号的刺激,在基因控制下遵循细胞自主有序死亡的过程,这一过程可以消除体内老化细胞或潜在性异常生长的细胞,从而使机体维持在稳定状态^[7]。目前研究显示,细胞凋亡主要由 3 条通路控制,线粒体信号通路和死亡受体介导的信号通路以及内质网介导的信号通路^[8]。研究表明,细胞凋亡与线粒体结构及功能的改变密切相关^[9]。长期的 UV 辐射可促使活性氧(ROS)在机体内过度累积,过量的 ROS 可损伤细胞内 DNA、线粒体内膜等精细结构^[10],导致线粒体功能丧失,引起脂质过氧化、蛋白质和核酸等被破坏,直接促进细胞的凋亡^[11]。Bcl-2 蛋白家族是一类可以调控 Caspase 介导的级联反应的重要细胞因子,可通过控制线粒体膜的通透性来调控细胞凋亡^[12]。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,Caspase 蛋白可通过阻滞细胞周期、标记凋亡细胞以及分解细胞骨架中的结构蛋白并使 DNA 修复酶失活等方式导致细

胞凋亡,在细胞凋亡机制网络中居中心地位^[13]。生理情况下,促进细胞凋亡的 Bcl-2 家族成员 Bad, Bid, Bax 和 Bim 位于胞浆中,但在受到外界刺激激活凋亡信号后,可转移到线粒体中,引起线粒体膜通透性的改变,促使细胞色素 C (CytoC) 由线粒体内膜向胞浆中转移^[14]。Caspase-9 作为在线粒体凋亡通路中起关键作用的凋亡始动子,处于级联反应的上游^[15],在 CytoC 等的参与下可与凋亡蛋白酶激活因子 (Apaf-1) 结合形成活性复合物,激活下游的凋亡效应 Caspase-3,活化的 Caspase-3 能酶解凋亡抑制蛋白及修复相关分子等,最终激活线粒体通路介导的细胞凋亡^[16]。此外,释放到胞浆中的 CytoC 能通过活化的 Caspase-3 进一步激活 Caspase-8,活化后的 Caspase-8 又能激活位于胞浆中的 Bcl-2 蛋白家族成员 Bid,被激活后的 Bid 可以转移至线粒体膜上,导致线粒体在核周围聚集,使 CytoC 的释放量增加,由此形成一个正反馈通路^[17],而抗凋亡因子 Bcl-2 则能抑制整个过程中的 Caspase 自身正反馈激活,减少 CytoC 的释放,从而发挥抑制凋亡的作用^[18]。

本实验研究结果显示,UVB 作用于细胞后,细胞中 ROS 含量和凋亡率均显著升高,Bcl-2 蛋白表达水平显著下降,而 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达水平显著升高,提示 UVB 可激活由线粒体通路介导的细胞凋亡,启动 Caspase 凋亡级联反应导致细胞凋亡。黄芩素作用于细胞后,细胞中 ROS 含量和凋亡率均显著降低,Bcl-2 蛋白表达水平显著上升, Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达水平显著下降。以上结果说明黄芩素可以通过降低细胞 ROS 含量和凋亡率,调控 Bcl-2 家族中抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白的表达,降低凋亡相关细胞因子 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达水平,抑制 UVB 诱导的细胞凋亡。

[参考文献]

[1] 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.
[2] 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(6):403-405,424,481.
[3] 安宏元,向川南,喻小兰,等. 黄芩素联合 U0126 诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡的分子机制研究[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(10):6-13.

[4] 王永周,夏纪毅,唐小平,等. 黄芩素通过抑制胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 促进 HeLa 细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(11):1507-1512.
[5] 杨柳,王业秋,张宁,等. 黄芩素对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化及相关 p38 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16):139-144.
[6] 杨柳,王业秋,张宁,等. 黄芩素对 UVB 导致人皮肤角质形成细胞光老化的保护作用[J]. 中医药信息,2017,34(4):18-21.
[7] 卢军. 黄芩素对人皮肤鳞状细胞癌细胞系 SCL-1 增殖抑制及诱导凋亡作用的研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2008.
[8] 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.
[9] 刘昭晗. 纳米铁车菊-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.
[10] 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.
[11] 孙霞. PCF 经 ROS/UCP2/cytoC 信号通路对 UVA 诱导的 HaCaT 细胞凋亡的调控[D]. 青岛:中国海洋大学,2011.
[12] 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.
[13] 张丽宏,傅云,廖建,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(6):96-101.
[14] 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.
[15] Bhattacharya S, Ray R M, Johnson L R. Cyclin-dependent kinases regulate apoptosis of intestinal epithelial cells[J]. Apoptosis,2014,19(3):451-466.
[16] 马月璐. 铁车菊素-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.
[17] 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.
[18] 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.

[责任编辑 全燕]