

京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞的保护作用及机制

王业秋, 陈巧云*, 李建民, 张宁

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] **目的:**研究京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞的保护作用及其机制。**方法:**取对数生长期的 HaCaT 细胞,调整其密度为 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板, 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,用总剂量 $64 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ (照射强度 $0.61 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2} \times$ 照射时间 105 s) 的紫外线 B (UVB) 照射细胞建立光老化模型,以 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的京尼平苷处理光老化细胞 24 h,分别检测细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、丙二醛 (MDA) 含量,RT-PCR 法检测细胞中 p38、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白介素 6 (IL-6) mRNA 的表达量,酶联免疫法检测细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 的含量。**结果:**UVB 照射 HaCaT 细胞后,SOD 活性、GSH-Px 活性明显降低,MDA 含量、p38 mRNA 表达量、TNF- α 和 IL-6 mRNA 及蛋白的表达量明显升高 ($P < 0.01$); 5×10^{-5} , $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 京尼平苷处理细胞后,SOD 活性升高为 (34.72 ± 2.03) , $(38.96 \pm 3.56) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; GSH-Px 活性升高为 (28.11 ± 2.76) , $(40.02 \pm 3.63) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; MDA 含量下降为 (4.82 ± 0.42) , $(4.60 \pm 0.41) \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$, p38 mRNA 的相对含量下降为 (0.97 ± 0.09) , (0.94 ± 0.09) ; TNF- α mRNA 的相对含量下降为 0.57 ± 0.05 , 0.53 ± 0.05 ; IL-6 mRNA 的相对含量下降为 0.65 ± 0.06 , 0.64 ± 0.06 ; TNF- α 蛋白的表达量降低为 (34.05 ± 2.43) , $(25.55 \pm 1.84) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, IL-6 蛋白的表达量降低为 (28.51 ± 1.95) , $(19.32 \pm 1.55) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,与模型对照组相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**京尼平苷能抵抗 UVB 对 HaCaT 细胞的损伤,其机制可能与抑制氧化损伤,调控 p38 信号通路,调节 TNF- α 和 IL-6 的表达有关。

[关键词] 京尼平苷; HaCaT; 光老化; p38 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0149-04

[doi] 10.11653/syjf2014010149

Protective Effects of Geniposide on Photoaging HaCaT Cell

WANG Ye-qiu, CHEN Qiao-yun*, LI Jian-min, ZHANG Ning

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of geniposide on photoaging HaCaT cells and explore its possible mechanism. **Method:** The logarithmic growth phase cells were inoculated at a density of 1×10^6 /mL in 6 hole plate, at a density of 5×10^4 /mL in 96 hole plate. The model of photoaging HaCaT was established by irradiating of $64 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Intensity of $0.61 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ multiply time of 105 s) UVB. The different concentrations of geniposide (5×10^{-5} , 5×10^{-6} , $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were used for photoaging cell. The superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, malondialdehyde (MDA) content were assayed by kit respectively. The mRNA levels of p38, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were determined by RT-PCR. The secretion levels of TNF- α and IL-6 of cultured HaCaT cells were detected by ELISA. **Result:** After the UVB irradiation, the activities of SOD and GSH-Px were decreased, the content of MDA, TNF- α and IL-6, the mRNA levels of p38, TNF- α and IL-6 were increased ($P < 0.01$). After treatment with 5×10^{-5} , $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ geniposide, the activities of SOD were risen to (34.72 ± 2.03) ,

[收稿日期] 20130723(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274035);黑龙江省青年科学基金项目(QC2010085);黑龙江省中医药管理局科研基金项目(ZHY12-W012);黑龙江中医药大学创新人才支持计划项目

[第一作者] 王业秋,讲师,从事中药抗光损伤研究,Tel:0454-6103261,E-mail:wyq8119@163.com

[通讯作者] *陈巧云,Tel:0454-6050350,E-mail:chenqy0114@163.com

(38.96 ± 3.56) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, the activities of GSH-Px were risen to (28.11 ± 2.76), (40.02 ± 3.63) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, the content of MDA were reduced to (4.82 ± 0.42), (4.60 ± 0.41) $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$, the mRNA levels of p38 were reduced to 0.97 ± 0.09 , 0.94 ± 0.09 , the mRNA levels of TNF- α were reduced to 0.57 ± 0.05 , 0.53 ± 0.05 , the mRNA levels of IL-6 were reduced to 0.65 ± 0.06 , 0.64 ± 0.06 , the content of TNF- α were reduced to (34.05 ± 2.43), (25.55 ± 1.84) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, the contents of IL-6 were reduced to (28.51 ± 1.95), (19.32 ± 1.55) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared with the model group, the differences have statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** The geniposide can inhibit the injury by UVB for HaCaT. And its mechanism may have relationship with the inhibition of oxidative damage, regulatory p38 signal pathway, adjusting the expression of TNF- α and IL-6.

[**Key words**] geniposide; HaCaT cells; photoaging; p38 signal pathway

UV 辐射对健康的危害已成为全球关注的重大环境与健康问题之一,有关 UV 损伤的机制和防治是目前的研究热点。中药以其独特的优势,在抗皮肤光损伤领域的研究工作得到广泛开展,本课题组前期研究发现,以木脂素类、环烯醚萜类和黄酮类为主要成分的杜仲提取物,能够明显对抗紫外线引起的皮肤细胞损伤^[1,2]。京尼平苷(geniposide)是一种环烯醚萜葡萄糖苷,易溶于水,是杜仲、梔子的主要成分^[3]。现代医学研究发现,京尼平苷有保肝利胆、镇痛、抗癌、解毒、抗炎、降糖和改善学习作用^[4-7]。但关于京尼平苷对光老化细胞的保护作用机制笔者未见相关报道,本实验以京尼平苷对照品为研究对象,在体外成功建立 UVB 诱导 HaCaT 细胞光损伤模型,探讨京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞的保护作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人皮肤角质形成细胞 HaCaT(武汉大学细胞中心)。

1.2 试剂 ,MEM 培养基(Thermo Fisher 公司,批号 NXL0746)、胎牛血清(Thermo Fisher 公司,批号 NVJ0313),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程公司,批号 20130328),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程公司,批号 20130302),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程公司,批号 20130312),TRIzol(invitrogen 公司),第一链 cDNA 合成试剂盒(生工生物工程(上海)有限公司,批号 20301206),PCR 扩增试剂盒(生工生物工程(上海)有限公司,批号 24921206),目的基因及内参引物、琼脂糖(生工生物工程(上海)有限公司),京尼平苷对照品(上海源叶生物科技有限公司),人白介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒(上海研吉生物科技有限公司,批号 CK-31304),人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA 试剂盒(上海研吉生物科技有

限公司,批号 CK-31304)。

1.3 仪器 紫外照射仪(Sigma 公司),紫外线辐照计(北京师范大学光电仪器厂),Reseach UV UF 型超纯水制备系统(上海和泰仪器有限公司),IX-71-21PH 型 Olympus 倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社),HF90 型二氧化碳培养箱(上海智城分析仪器有限公司),MS-500A 半自动生化分析仪(美生科技有限公司),MK3 酶标仪(美国热电公司),TGL-16G-C 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),Tprofessional 型 PCR 扩增仪(德国 biometra 公司),DYY-10C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),ChampGel5000 型凝胶成像系统(北京赛智创业有限公司)。

2 方法

2.1 药物配制 通过预实验确定京尼平苷浓度大于 $5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 HaCaT 细胞产生毒性,所以本实验将京尼平苷加入 MEM 培养液中,配制成高($5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、中($5 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、低($5 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)3 个浓度,调至 pH 7.0,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

2.2 HaCaT 细胞的体外培养 HaCaT 细胞在含有 10% 胎牛血清的 MEM,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。取对数生长期的细胞以胰酶消化,调整其密度为 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板、 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板。

2.3 细胞光老化模型的建立 96 和 6 孔板细胞继续培养 24 h,参考文献^[6-7]方法,使用 $64 \text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 UVB 照射细胞,空白对照组用铝箔盖住,建立细胞光老化模型。紫外线照射剂量($\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$) = 照射强度($\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) \times 照射时间(s),紫外线辐照计测量照射强度为 $0.61 \text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,照射时间为 105 s。

2.4 分组 接种于孔板内的细胞随机分为空白对照组、模型对照组、京尼平苷高、中、低剂量组。空白

对照组,细胞给予 MEM 培养液培养;模型对照组细胞给予 MEM 培养液培养 24 h 后,按照 2.3 的方式进行 UVB 照射,加入 MEM 培养液培养继续培养;京尼平苷高、中、低剂量组细胞给予 MEM 培养液培养 24 h 后,按照 2.3 的方式进行 UVB 照射,给予含不同浓度(5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} mol·L⁻¹)京尼平苷的 MEM 培养液继续培养。

2.5 细胞中 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量 给药 24 h 后收集 6 孔板中各组细胞,用冷 PBS 清洗 2 次,超声破碎,严格按照试剂盒说明书操作,检测 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量。

2.6 细胞中 p38, TNF- α 及 IL-6 mRNA 的表达量 给药 24 h 后,使用 TRIzol 分别提取 6 孔板中各组每孔细胞的总 RNA;以 RNA 为模板按照第一链 cDNA 合成试剂盒操作说明书分别逆转录为 cDNA;以 cDNA 为模板进行 PCR 反应,以 actin beta 为 TNF- α 的内参, GAPDH 为 TNF- α 和 IL-6 的内参,内参基因与目的基因同时扩增,各基因的引物序列、产物长度及退火温度见表 1,反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;取扩增产物 4 μ L 上样于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 g·L⁻¹ EB),100 V 电泳 30 min,将凝胶放入凝胶成像系统摄像,荧光强度值即代表 DNA 样品的相对含量,与 β -actin 两两比较即得到各处理组的比值。

2.7 细胞上清液中 TNF- α 及 IL-6 的表达量 给药 24 h 后收集 96 孔板各组细胞的上清液,严格按照 ELISA 试剂盒操作说明书检测 TNF- α , IL-6 的含量。

2.8 数据处理 用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本间的方差分析采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HaCaT 细胞中 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 64 mJ·cm⁻² UVB 照射 HaCaT 细胞造成了氧化损伤,致使模型对照组细胞中 SOD, GSH-Px 活性明显降低,MDA 含量明显升高($P < 0.01$);

表 1 p38, TNF- α , IL-6, β -actin, GAPDH 的引物序列、产物长度及退火温度

基因	引物序列	产物长度 /bp	退火温度 / $^{\circ}$ C
p38	F:5'-CTGGAAGCCTGGACTCTAA-3'	171	52
	R:5'-ACATCCTATACGGGATAACTG-3'		
TNF- α	F:5'-CATCCAACCTTCCCAAACG-3'	291	55
	R:5'-CCAAAGGCTCCCTGGTCTC-3'		
IL-6	F:5'-CTAGAGTACCTCCAGAACAGAT-3'	389	53
	R:5'-AATAGTGTCTTAACGCTCATAC-3'		
β -actin	F:5'-GACTTAGTTGCGTTACACCCTTTC-3'	160	55
	R:5'-GCTGTACACCTTCACCGTTCC-3'		
GAPDH	F:5'-AGAAGGCTGGGGCTGATTTG-3'	258	52 或 53
	R:5'-AGGGGCATCCACAGTCTTC-3'		

而京尼平苷各剂量组都能够提高 SOD, GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,且 5×10^{-5} , 5×10^{-6} mol·L⁻¹ 剂量组与模型对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞中 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度 /mol·L ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹
空白对照	-	44.28 \pm 3.96	45.65 \pm 4.33	3.52 \pm 0.32
模型对照	-	20.89 \pm 1.96	25.15 \pm 2.11	6.33 \pm 0.59
京尼平苷	5×10^{-7}	22.30 \pm 2.02	26.35 \pm 2.36	6.18 \pm 0.55
	5×10^{-6}	34.72 \pm 2.03 ¹⁾	28.11 \pm 2.76 ¹⁾	4.82 \pm 0.42 ²⁾
	5×10^{-5}	38.96 \pm 3.56 ²⁾	40.02 \pm 3.63 ²⁾	4.60 \pm 0.41 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 HaCaT 细胞中 p38, TNF- α , IL-6 mRNA 表达的影响 64 mJ·cm⁻² UVB 照射使 HaCaT 细胞中 p38, TNF- α , IL-6 mRNA 的表达量明显升高($P < 0.01$);京尼平苷各剂量组均能降低 p38, TNF- α , IL-6 mRNA 的表达量,且 5×10^{-5} , 5×10^{-6} mol·L⁻¹ 剂量组与模型对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1 及表 3。

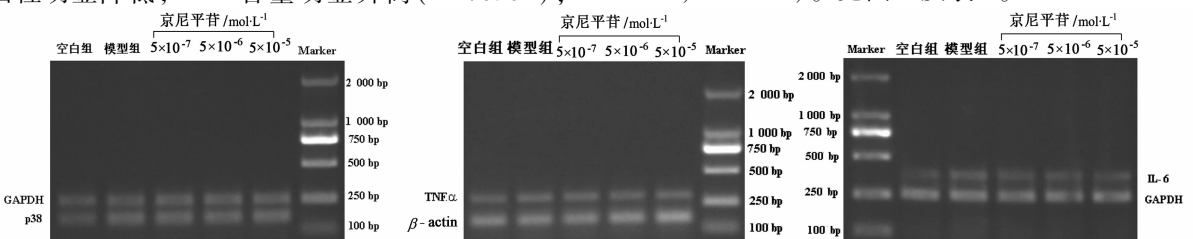


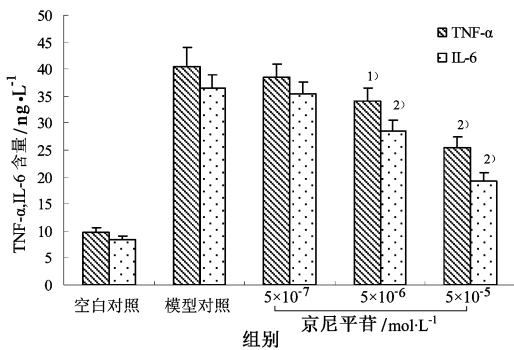
图 1 京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞中 p38, TNF- α , IL-6 mRNA 表达的影响

表 3 京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞中 p38, TNF- α , IL-6 mRNA 相对含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度 /mol·L ⁻¹	p38 mRNA	TNF- α mRNA	IL-6 mRNA
		/GAPDH	/ β -actin	/GAPDH
空白对照	-	0.91 \pm 0.09	0.50 \pm 0.05	0.60 \pm 0.06
模型对照	-	1.21 \pm 0.12	0.68 \pm 0.07	0.82 \pm 0.09
京尼平苷	5 \times 10 ⁻⁷	1.17 \pm 0.11	0.67 \pm 0.06	0.82 \pm 0.08
	5 \times 10 ⁻⁶	0.97 \pm 0.09 ²⁾	0.57 \pm 0.05 ¹⁾	0.65 \pm 0.06 ²⁾
	5 \times 10 ⁻⁵	0.94 \pm 0.09 ²⁾	0.53 \pm 0.05 ²⁾	0.64 \pm 0.06 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对 HaCaT 细胞上清液中 TNF- α , IL-6 表达量的影响 64 mJ·cm⁻² UVB 照射使 HaCaT 细胞上清液中 TNF- α , IL-6 含量明显升高 ($P < 0.01$); 京尼平苷各剂量组均能减低上清液中 TNF- α , IL-6 含量, 且 5 \times 10⁻⁵, 5 \times 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 剂量组与模型对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 2。



与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 2 京尼平苷对光老化 HaCaT 细胞上清液中 TNF- α , IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

紫外线辐射是皮肤物理性损伤的主要因素, 长期的紫外线辐射可导致光老化和皮肤癌。波长短能量较高的 UVB (290 ~ 320 nm) 主要作用于表皮, 角质形成细胞是其靶细胞。

本实验以 64 mJ·cm⁻² UVB 照射角质形成细胞, 细胞内 SOD 和 GSH-Px 的活性下降, MDA 含量升高, 过多的 ROS 作为第二信使激活 p38/MAPK 通路, p38/MAPK 是控制炎症反应最主要的 MAPK 家族成员, 可影响多种细胞因子的产生^[8], p38 mRNA 表达量升高, 诱导 TNF- α , IL-6 的表达。TNF- α 是细胞因子网络中心之一, 能促进其他致炎细胞因子如 IL-1, IL-6, IL-8 和 IL-12 等的合成^[9], IL-6 是一重要的细胞因子, 是角质形成细胞-成纤维细胞相互作用环路中的重要中介物质^[10], TNF- α , IL-6 一方面作用

于角质形成细胞, 放大炎症反应, 另一方面通过旁分泌机制作用于真皮层的成纤维细胞, 诱导成纤维细胞的损伤。

加入药物处理后, 实验结果显示京尼平苷 5 \times 10⁻⁵, 5 \times 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 剂量组能提高 SOD 和 GSH-Px 的活性, 清除氧自由基, 抗脂质过氧化, 从而保护细胞免受氧化损伤; 京尼平苷还能通过抑制 p38 mRNA 的表达, 减少炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 表达和分泌来拮抗 UVB 对角质形成细胞的损伤。

【参考文献】

- [1] 史卉妍, 何鑫, 欧阳冬生, 等. 京尼平苷及其衍生物的药效学研究进展[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(1): 4.
- [2] 杨轶舜, 张彤, 于筛成. 京尼平的研究进展及其药理价值[J]. 中成药, 2011, 33(1): 130.
- [3] 晋玉章, 何瑞波, 王义和, 等. 京尼平苷对慢性前列腺炎大鼠的治疗作用[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 1073.
- [4] Liu H T, He J L, Li W M, et al. Geniposide inhibits interleukin-6 and interleukin-8 production in lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells by blocking p38 and ERK1/2 signaling pathways [J]. Inflamm Res, 2010, 59(6): 451.
- [5] Liu J H, Yin F, Guo L X, et al. Neuroprotection of geniposide against hydrogen peroxide induced PC12 cells injury: involvement of PI3 kinase signal pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(2): 159.
- [6] 陈巧云, 王业秋, 张宁, 等. 玉屏风散抗角质形成细胞光损伤作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 847.
- [7] 王业秋, 陈巧云, 张宁, 等. 玉竹对 UVB 诱导 HaCaT 细胞损伤的保护作用[J]. 中国美容医学, 2012, 21(4): 599.
- [8] Kirkwood K L, Rossa C Jr. The potential of p38 MAPK inhibitors to modulate periodontal infections [J]. Curr Drug Metab, 2009, 10(1): 55.
- [9] Fank S, Kanpfer H, Wetzler C, et al. Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression [J]. Biochem J, 2000, 347(1): 265.
- [10] 李文海, 张建中. 热休克对 HaCaT 细胞产生 IL-6 的作用研究 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2007, 21(12): 724.

[责任编辑 聂淑琴]