

论 著

五味子丙素对H₂O₂诱导的HaCaT细胞衰老作用的影响及机制苏小明¹, 王岳杨¹, 徐铭晨¹, 陈悦琪¹, 李贺², 王春梅², 陈建光², 李正祎³, 庄文越^{1*}¹北华大学医学技术学院, 吉林省吉林市 132013; ²北华大学药学院, 吉林省吉林市 132013; ³吉林医药学院检验学院, 吉林省吉林市 132013

[摘要] **目的** 探讨五味子丙素(SchC)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人永生角质形成细胞(HaCaT)衰老作用的影响及其可能机制。**方法** 体外培养HaCaT细胞, 设置对照组、H₂O₂模型组、SchC处理组。采用CCK-8法检测细胞存活率; 采用试剂盒检测细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、活性氧(ROS)水平; qRT-PCR检测基质金属蛋白酶、环氧合酶-2(COX-2)、凋亡相关基因mRNA的表达; Western blotting检测COX-2、基质金属蛋白酶、凋亡相关蛋白、衰老相关蛋白、转录因子NF-E₂相关因子2(Nrf-2)、血红素加氧酶-1(HO-1)以及核因子-κB(NF-κB)、p-NF-κB的表达。**结果** SchC浓度<100 μmol/L时对HaCaT细胞的增殖活性无明显影响; H₂O₂浓度为800 μmol/L时, 细胞存活率降至对照组的(57.0 ± 3.0)%(*P*<0.001)。与H₂O₂模型组相比, 加入SchC对细胞进行预保护, 可增高细胞存活率以及SOD、GSH水平, 降低MDA、ROS水平(*P*<0.05或*P*<0.01)。Western blotting检测结果显示, SchC可下调P16、P21、p-NF-κB的表达(*P*<0.01), 上调Nrf-2、HO-1的表达(*P*<0.05)。qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, SchC可通过调控NF-κB通路上调caspase-3、caspase-9 mRNA和蛋白的表达, 下调Bcl-2、基质金属蛋白酶(MMP-1、MMP-9)、炎性因子COX-2 mRNA和蛋白的表达(*P*<0.05或*P*<0.01)。**结论** SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞氧化应激损伤衰老模型具有保护作用, 可为五味子抗皮肤衰老产品的开发奠定基础。

[关键词] 五味子丙素; 过氧化氢; 抗氧化; 抗炎; 抗凋亡**[中图分类号]** R285.5**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0577-7402(2021)03-0221-10**[DOI]** 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.03.02Anti-aging effects of Schisandrin C on H₂O₂-induced HaCaTSu Xiao-Ming¹, Wang Yue-Yang¹, Xu Ming-Chen¹, Chen Yue-Qi¹, Li He², Wang Chun-Mei², Chen Jian-Guang², Li Zheng-Yi³, Zhuang Wen-Yue^{1*}¹College of Medical Technology, Beihua University, Jilin City, Jilin Province 132013, China²College of Pharmacy, Beihua University, Jilin City, Jilin Province 132013, China³College of Laboratory Academy, Jilin Medical University, Jilin City, Jilin Province 132013, China

*Corresponding author, E-mail: wenyuezhuang@163.com

This work was supported by the Jilin Province Science and Technology Development Project (20200404053YY), the "Thirteen Five-Year" Science and Technology Research Project of the Education Department of Jilin Province (JJKH20191068KJ, JJKH20200076KJ), the Jilin City Science and Technology Innovation Development Project (20200502096), and the Innovation Plan for Graduate Students of Beihua University (2019021, 2019027)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Schisandrin C (SchC) on hydrogen peroxide (H₂O₂) treated human immortalized keratinocyte cells (HaCaT) and to understand its potential mechanisms on ageing. **Methods** HaCaT cells were cultured *in vitro* and divided into control group, H₂O₂ model group, and SchC treatment group. Cell viability was evaluated by CCK-8 assay. The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were determined by WST-1 assay. The level of reactive oxygen species (ROS) was determined by chemical fluorescence assay. The mRNA expression of matrix metalloproteinase, cyclooxygenase-2 (COX-2) and apoptosis-related genes were detected by qRT-PCR. The expression of COX-2, matrix metalloproteinase, apoptosis-related protein, ageing-related protein, transcription factor NF-E₂ related factor 2 (Nrf-2), heme oxygenase (HO-1), cytoplasmic transcription factor-κB (NF-κB) and p-NF-κB was detected by Western blotting. **Results** SchC at the concentration of less than 100 μmol/L had no significant effects on the proliferation of HaCaT cells; while cell viability

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20200404053YY); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20191068KJ, JJKH20200076KJ); 吉林市科技创新发展计划项目(20200502096); 北华大学研究生创新计划(2019021, 2019027)

[作者简介] 苏小明, 硕士研究生, 主要从事五味子药理作用及机制方面的研究。E-mail: 158396222@qq.com

[通信作者] 庄文越, E-mail: wenyuezhuang@163.com

decreased to $(57.0 \pm 3.0)\%$ ($P < 0.001$) after treated with $800 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Compared with the H_2O_2 model group, the cell viability, SOD, and GSH levels were significantly increased; MDA and ROS levels were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Western blotting results showed that the expression of P16, P21 and p-NF- κ B were significantly down-regulated, and the expression of Nrf-2 and HO-1 were up-regulated by SchC ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). qRT-PCR and Western blotting results showed that SchC could up-regulate the expression of caspase-3 and caspase-9, and down-regulate the expression of Bcl-2, matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-9) and inflammatory factor COX-2 by regulating NF- κ B pathway ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** SchC had a protective effect on the aging model of oxidative stress damage of H_2O_2 -induced HaCaT cells, which could lay a foundation for the development of anti-ageing products of Schisandra C.

[Key words] Schisandra C; hydrogen peroxide; anti-oxidation; anti-inflammatory; anti-apoptosis

皮肤衰老是人体衰老的一部分,由内源性和外源性的多种因素引起,主要包括基因对皮肤衰老过程的调控、自由基损伤和光刺激老化作用等。近年来,衰老与抗衰老已成为科学研究的热点^[1-3]。五味子丙素(Schisandrin C, SchC)是五味子的主要木脂素类成分之一,可抑制细胞炎症反应、抗氧化及抑制凋亡蛋白的表达^[4]。侯微等^[5]研究发现,在 H_2O_2 诱导的细胞自由基氧化损伤衰老模型中,SchC可提高细胞存活率,但其对细胞的抗衰老和抗凋亡作用及其机制尚不清楚。为此,本研究分析了SchC对 H_2O_2 诱导的HaCaT细胞氧化应激损伤的保护作用及其可能机制,以期为SchC相关抗皮肤衰老产品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 SchC(四川省维克奇生物科技有限公司); HaCaT细胞(中国科学院细胞库); CCK-8(上海碧云天生物技术有限公司); 超氧化物歧化酶(SOD)、微量丙二醛(MDA)、微量还原型谷胱甘肽(GSH)、活性氧(ROS)试剂盒及BCA蛋白试剂盒(南京建成生物工程研究所); NF- E_2 相关因子2(Nrf-2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-9、caspase-3、caspase-9、Bcl-2、核因子- κ B(NF- κ B)、p-NF- κ B(ABclonal公司); RNA抽提试剂盒、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR、2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(美国Vazyme公司)。全自动凝胶成像系统、ImageJ分析软件(上海天能科技有限公司); Nrf-2抑制剂ML385(美国Abmole公司); NF- κ B抑制剂SN50(美国Selleck公司)。

1.2 细胞培养 用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养HaCaT细胞,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中。待细胞生长至80%融合时,用0.25%胰蛋白酶消化,分瓶传代。

1.3 CCK-8法检测HaCaT细胞增殖活性 将HaCaT细胞加入96孔板中(10^5 个/孔,每孔 $200 \mu\text{l}$),于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养24 h使细胞贴壁。设置对照组与实验组,每组分别设置6个平行组,

按照SchC(2.5、5、10、20、40、80、100、200、320 $\mu\text{mol/L}$,作用24 h)和 H_2O_2 (200、400、600、800、1000 $\mu\text{mol/L}$,作用4 h)浓度梯度上样。每孔加入 $20 \mu\text{l}$ CCK-8孵育2 h,使用酶标仪检测450 nm波长处的光密度(OD)值。对比对照组,筛选细胞存活率为60%时的 H_2O_2 浓度,即 H_2O_2 最终使用浓度^[6-7];筛选对细胞增殖无明显影响的SchC浓度,即SchC最终浓度。细胞存活率($\%$)=(OD_{处理}/OD_{对照}) $\times 100\%$ 。

1.4 实验分组及细胞氧化应激模型建立 将HaCaT细胞接种于6孔板中,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养24 h使其贴壁,设置对照组、 H_2O_2 模型组与SchC处理组。对照组、 H_2O_2 模型组用含1%血清的DMEM培养基培养24 h,对照组给予2.5 ml 1% DMEM培养基, H_2O_2 模型组加入2.5 ml确定浓度的 H_2O_2 (1% DMEM)作用4 h; SchC处理组用SchC预处理24 h后,加入2.5 ml确定浓度的 H_2O_2 (1% DMEM)作用4 h。Nrf-2抑制剂组和NF- κ B抑制剂组分别加入 $0.25 \mu\text{mol/L}$ ML385和 $20 \mu\text{mol/L}$ SN50预处理2 h。

1.5 细胞中SOD、MDA、ROS及GSH水平检测 取对数生长期细胞接种于6孔板中,设置对照组、 H_2O_2 模型组与SchC处理组,每组设3个复孔,按1.4方法处理后,收集细胞,按照SOD、MDA、ROS和GSH试剂盒说明书步骤检测细胞SOD、MDA、ROS和GSH水平。

1.6 qRT-PCR检测环氧合酶-2(COX-2)、MMP-1、MMP-9、caspase-3、caspase-9、Bcl-2 mRNA的表达

按1.4方法处理后,应用RNA抽提试剂盒提取细胞总RNA,按HiScript II Q RT SuperMix for qPCR反转录试剂盒说明书步骤合成cDNA。按ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明书步骤行实时荧光定量PCR扩增反应,在NCBI(National Coalition Building Institute)中查找基因序列,用Primer Premier 6.0软件设计引物。扩增反应条件: 95°C 30 s (1个循环), 95°C 10 s、 60°C 30 s (40个循环), 95°C 15 s、 60°C 60 s、 95°C 15 s。绘制溶解曲线,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量。引物序列如表1所示。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences of qRT-PCR

| 基因 | 序列(5'-3') | 大小(bp) |
|---------------------|------------------------|--------|
| β-actin (Forward) | GGCTGTATTCCCCTCCATCG | 154 |
| β-actin (Reverse) | CCAGTTGGTAACAATGCCATGT | |
| Caspase-3 (Forward) | AAGCGAATCAATGGACTCT | 133 |
| Caspase-3 (Reverse) | TGTACCAGACCGAGATGT | |
| Caspase-9 (Forward) | CCATATGATCGAGGACATCC | 177 |
| Caspase-9 (Reverse) | GCTGCTTGCCTGTTAGTT | |
| Bcl-2 (Forward) | TGTGGATGACTGAGTACCT | 128 |
| Bcl-2 (Reverse) | CAGAGACAGCCAGGAGAA | |
| MMP-1 (Forward) | AGATGTGGAGTGCCTGAT | 190 |
| MMP-1 (Reverse) | CAGAGACCTTGGTGAATGT | |
| MMP-9 (Forward) | AACCAATCTCACCGACAG | 291 |
| MMP-9 (Reverse) | GGCAAGTCTTCCGAGTAG | |
| COX-2 (Forward) | CGAGGTGTATGTATGAGTGT | 280 |
| COX-2 (Reverse) | AGCCATAGTCAGCATTGTAA | |

1.7 Western blotting检测COX-2、基质金属蛋白酶、凋亡相关蛋白、衰老相关蛋白、转录因子NF-E₂相关因子2(Nrf-2)、血红素加氧酶-1(HO-1),以及NF-κB、p-NF-κB的表达 按照1.4方法处理后,收集细胞,PBS洗涤2次,RIPA缓冲液冰上裂解1h,4℃下12000 r/min离心5 min,分离上清液。用BCA试剂盒测定总蛋白浓度,用10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离凝胶分离45 μg蛋白并转移至聚偏氟乙烯(PVDF)中。5%脱脂牛奶25℃下封闭1h,加入COX-2(1:1000)、MMP-1

(1:1000)、MMP-9(1:1000)、caspase-3(1:1000)、aspase-9(1:1000)、Bcl-2(1:1000)、P16(1:1000)、P21(1:500)、Nrf-2(1:500)、HO-1(1:1000)、NF-κB(1:1000)、p-NF-κB(1:500)特异性抗体孵育过夜。用含吐温-80(TBS-T)的Tris缓冲液洗涤,加入抗兔辣根过氧化物酶抗体(1:10000)孵育1h。用增强型ECL显影液显色,全自动凝胶成像系统采集和分析数据。

1.8 统计学处理 采用SPSS 24.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行方差齐性检验,方差齐时多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验;方差不齐时组间比较采用Welch法进行近似方差分析,进一步两两比较采用Bonferroni检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SchC和H₂O₂对HaCaT细胞活力的影响 CCK-8法检测结果显示,SchC浓度 $\leq 100 \mu\text{mol/L}$ 时对HaCaT的增殖没有明显影响($P > 0.05$,图1A),不同浓度(200、400、600、800、1000 $\mu\text{mol/L}$)的H₂O₂对HaCaT细胞活力有一定的影响,且呈浓度依赖性($P < 0.05$,图1B)。当H₂O₂浓度为800 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率降至对照组的(57.0 \pm 3.0)%($P < 0.001$)。因此,选择800 $\mu\text{mol/L}$ 的H₂O₂作用4h建立细胞氧化应激模型。

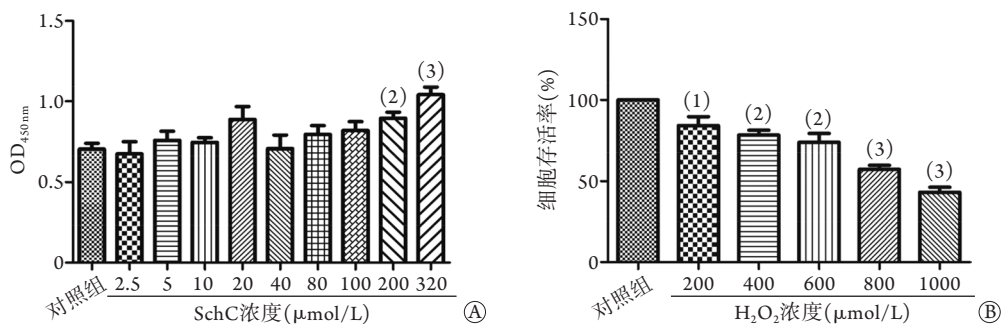


图1 SchC(A)和H₂O₂(B)对HaCaT细胞活力的影响

Fig.1 Effects of SchC (A) and H₂O₂ (B) on the relative viability of HaCaT cells

与对照组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$, (3) $P < 0.001$ 。

2.2 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞生长形态和增殖活性的影响 倒置相差显微镜下观察各组细胞形态变化,结果如图2A所示。对照组细胞生长至24h时,形态规则,大小均匀,透亮度高,边界清楚,细胞排列较紧密。与对照组相比,H₂O₂模型组细胞形态发生明显变化,细胞皱缩,飘浮细胞增多,细胞不规则且连接不紧密,细胞数量减少,培养液中细胞碎片增多。与H₂O₂模型组相比,SchC预处理可一定程度恢复细胞的形态,漂浮细胞减少,培养液中细胞碎片减少,细胞存活率增高[(53.0 \pm 3.0)%

vs. (70.0 \pm 3.0)%, $P < 0.01$,图2B]。

2.3 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞SOD、MDA、GSH、ROS水平的影响 与对照组相比,H₂O₂模型组SOD、GSH水平明显降低($P < 0.01$),MDA水平明显升高($P < 0.001$,图3A)。与对照组相比,H₂O₂模型组荧光效果增强,ROS水平明显增高($P < 0.001$,图3B、C)。与H₂O₂模型组相比,SchC处理组SOD、GSH水平明显升高($P < 0.05$),MDA、ROS水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图3)。

2.4 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞COX-2、MMP-1、

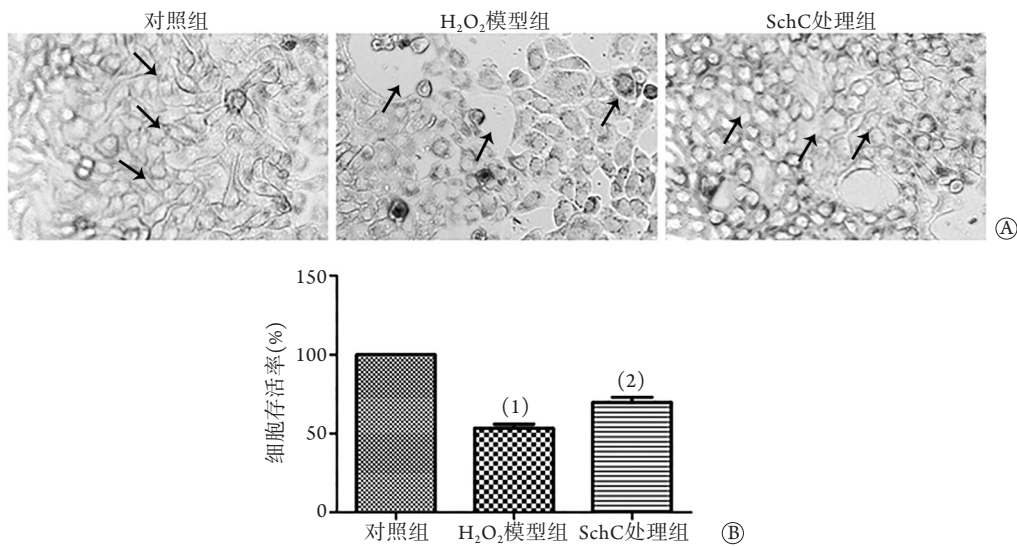


图2 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞生长状态和增殖活性的影响

Fig.2 Effects of SchC on the growth status and cell viability of H₂O₂-induced HaCaT cells

A. 各组HaCaT细胞生长状态(倒置显微镜, ×200); B. 各组细胞存活率的比较; 与对照组比较, (1) $P<0.001$; 与H₂O₂模型组比较, (2) $P<0.01$ 。

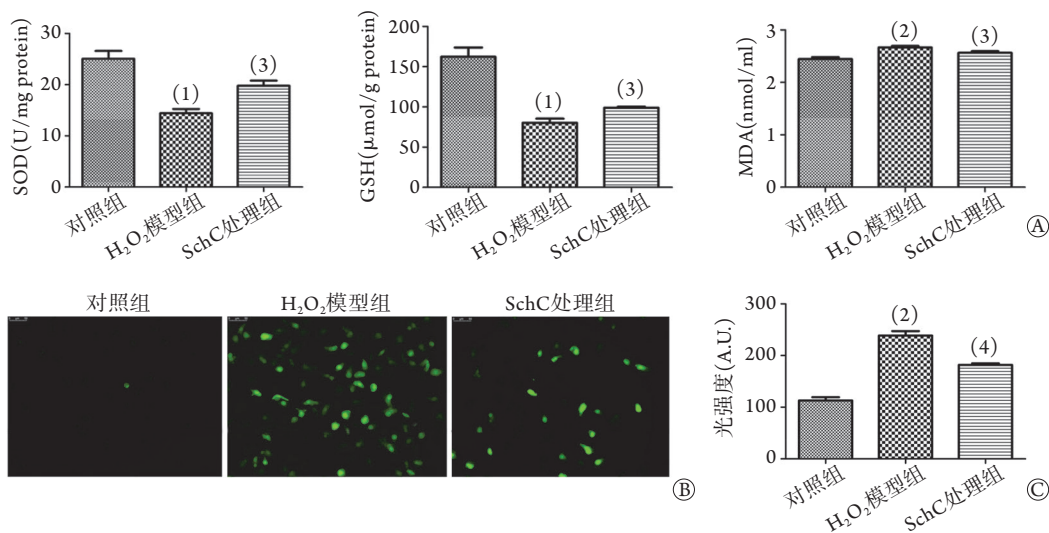


图3 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞SOD、MDA、GSH、ROS水平的影响

Fig.3 Effects of SchC on the contents of SOD, MDA, GSH, and ROS of H₂O₂-induced HaCaT cells

A. SOD、MDA、GSH水平; B. ROS荧光检测图; C. ImageJ软件定量分析ROS水平; 与对照组比较, (1) $P<0.01$, (2) $P<0.001$; 与H₂O₂模型组比较, (3) $P<0.05$, (4) $P<0.01$ 。

MMP-9表达的影响 qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, 与对照组相比, H₂O₂模型组COX-2、MMP-1、MMP-9 mRNA及蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与H₂O₂模型组相比, SchC处理组COX-2、MMP-1、MMP-9 mRNA及蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图4)。

2.5 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞caspase-3、caspase-9、Bcl-2表达的影响 如图5所示, 与对照组相比, H₂O₂模型组caspase-3、caspase-9 mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$)。与H₂O₂模型组相比, SchC处理组caspase-3、caspase-9

mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.6 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞衰老相关蛋白P16、P21表达的影响 如图6所示, 与对照组相比, H₂O₂模型组衰老相关蛋白P16、P21的表达上调($P<0.01$); 与H₂O₂模型组相比, SchC处理组衰老相关蛋白P16、P21的表达下调($P<0.01$)。

2.7 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞NF- κ B、Nrf-2/HO-1信号通路的影响 Western blotting检测结果显示, 与对照组相比, H₂O₂模型组细胞Nrf-2、HO-1表达下调($P<0.01$ 、 $P<0.05$), p-NF- κ B表达上

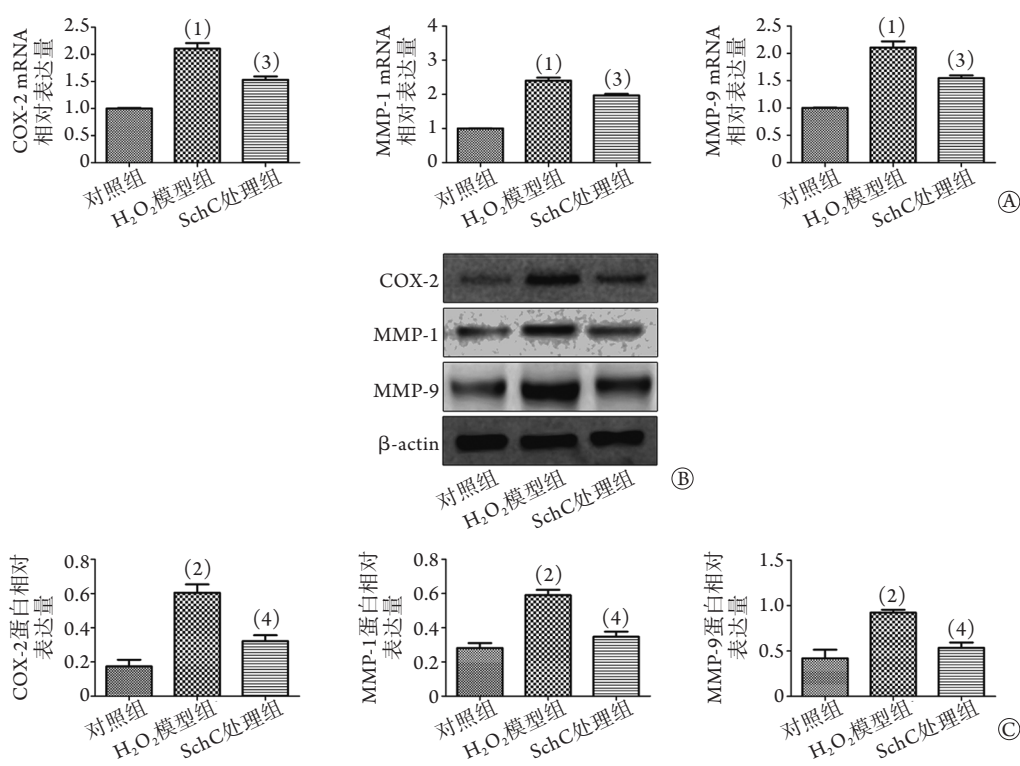


图4 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞COX-2、MMP-1、MMP-9 mRNA和蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of SchC on the mRNA and protein expressions of COX-2, MMP-1 and MMP-9 of H₂O₂-induced HaCaT cells

A. qRT-PCR检测COX-2、MMP-1、MMP-9 mRNA表达水平; B. Western blotting检测COX-2、MMP-1、MMP-9蛋白表达水平; C. ImageJ软件定量分析COX-2、MMP-1、MMP-9蛋白相对表达量; 与对照组比较, (1)*P*<0.05, (2)*P*<0.01; 与H₂O₂模型组比较, (3)*P*<0.05, (4)*P*<0.01。

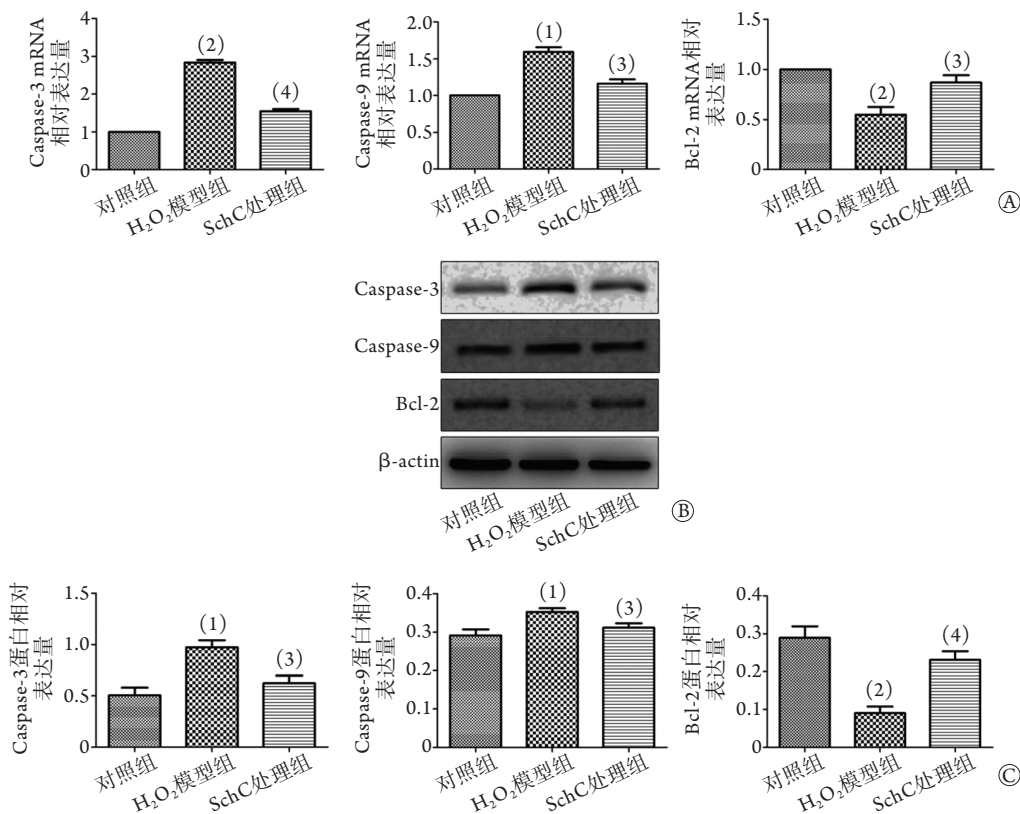


图5 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞caspase-3、caspase-9、Bcl-2表达的影响

Fig.5 Effects of SchC on the mRNA and protein expressions of caspase 3, caspase 9 and Bcl-2 of H₂O₂-induced HaCaT cells

A. qRT-PCR检测caspase-3、caspase-9、Bcl-2 mRNA表达水平; B. Western blotting检测caspase-3、caspase-9、Bcl-2蛋白表达水平; C. ImageJ软件定量分析caspase-3、caspase-9、Bcl-2蛋白相对表达量; 与对照组比较, (1)*P*<0.05, (2)*P*<0.01; 与H₂O₂模型组比较, (3)*P*<0.05, (4)*P*<0.01。

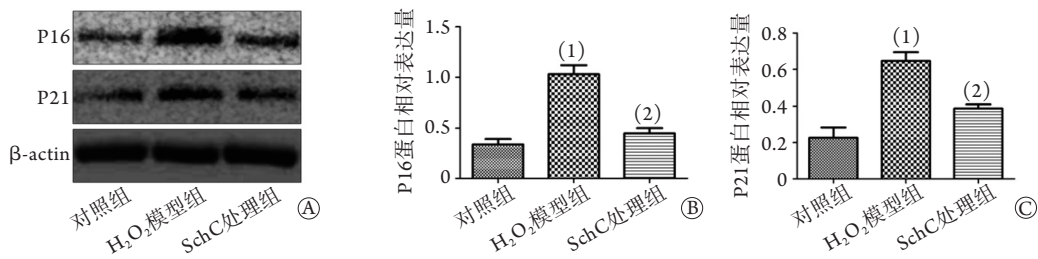


图6 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞衰老相关蛋白P16、P21表达的影响

Fig.6 Effects of SchC on the expressions of aging-related proteins of P16 and P21 of H₂O₂-induced HaCaT cells

A. Western blotting检测P16、P21蛋白表达；B、C. ImageJ软件定量分析P16、P21蛋白相对表达量；与对照组比较，(1) $P<0.05$ ；与H₂O₂模型组比较，(2) $P<0.05$ 。

调($P<0.05$)；与H₂O₂模型组相比，SchC处理组Nrf-2及HO-1表达上调，p-NF- κ B表达下调($P<0.05$ ，图7A)。加入Nrf-2抑制剂ML385(1.25 μ mol/L)后，HO-1的表达被明显抑制($P<0.05$)；加入SchC后，HO-1的表达上调($P<0.01$ ，图7B)。加入NF- κ B抑制

剂SN50(20 μ mol/L)后，COX-2、MMP-1、MMP-9的表达被明显抑制($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，促凋亡蛋白caspase-3、caspase-9的表达下调($P<0.05$)，抗凋亡蛋白Bcl-2的表达上调($P<0.01$ ，图7C、D)。

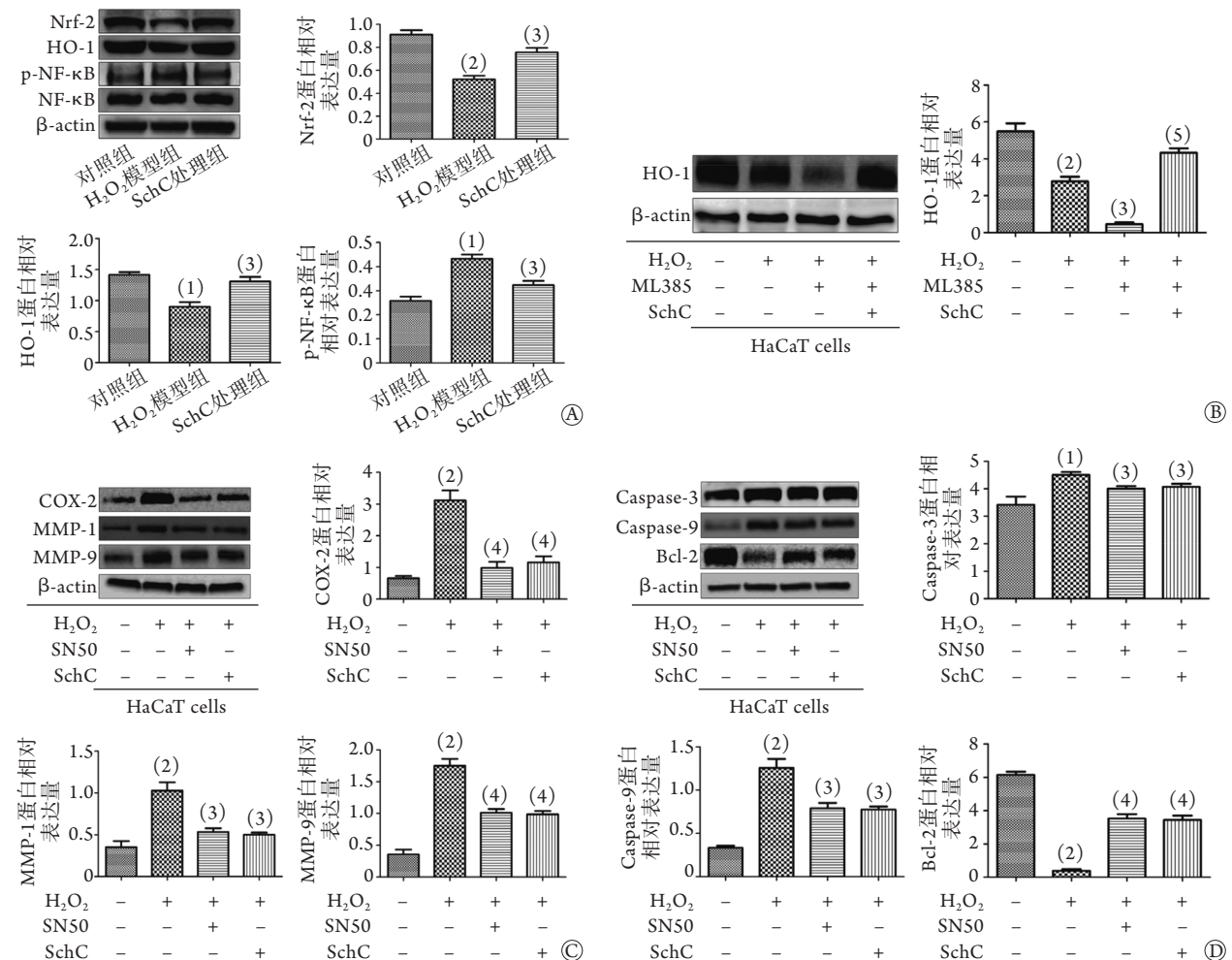


图7 SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞NF- κ B、Nrf-2/HO-1信号通路的影响(Western blotting)

Fig.7 Effects of SchC on the signaling pathway of NF- κ B and Nrf-2/HO-1 of H₂O₂-induced HaCaT cells (Western blotting)

A. Nrf-2、HO-1、NF- κ B、p-NF- κ B蛋白相对表达量；B. 加入Nrf-2抑制剂ML385后HO-1蛋白相对表达量；C—D. 加入NF- κ B抑制剂SN50后COX-2、MMP-1、MMP-9、caspase-3、caspase-9、Bcl-2蛋白相对表达量；与对照组比较，(1) $P<0.05$ ，(2) $P<0.01$ ；与H₂O₂模型组比较，(3) $P<0.05$ ，(4) $P<0.01$ ；与H₂O₂+ML385比较，(5) $P<0.05$ 。

3 讨 论

衰老是生命过程中的一种自然现象,涉及多种生物学过程。目前,有关衰老的学说主要有自由基学说、免疫学说、炎性学说等,其中以自由基学说最受重视^[1]。皮肤易受外界环境中各种因素的刺激而导致氧化应激。有研究发现,氧化应激能够诱发细胞衰老^[8]。ROS是氧化应激反应中最重要的介质,可引起机体蛋白质、核酸变性以及脂质过氧化,对皮肤细胞造成氧化损伤,从而导致或促进衰老的发生^[9]。H₂O₂是一种常用的细胞氧化应激诱导剂,可诱导细胞产生ROS,从而导致皮肤发生一系列氧化应激反应,如衰老、皱纹及色斑等^[10]。近年来,中草药被广泛应用于抗衰老的研究。与其他化学合成添加剂不同,中草药具有成分天然、绿色、安全、不良反应少等优点,被国内外学者大力推崇。五味子为木兰科植物五味子的成熟干燥果实,主要活性成分为木脂素类化合物,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、保肝等多种药理作用^[11-12]。有研究发现,作为主要木脂素类成分之一,SchC具有抗炎和抗氧化的双重作用,可通过调节NF- κ B和Nrf-2/HO-1信号转导途径,抑制MAPK信号通路,发挥抗氧化应激活性^[13]。五味子甲素、乙素及丙素对细胞均具有一定的保护作用,其中以SchC的效果最好,可以明显提高细胞存活率,但其作用机制尚不明确^[5]。本研究通过分析NF- κ B和Nrf-2/HO-1信号通路的变化,探讨了SchC对H₂O₂诱导的HaCaT细胞氧化应激损伤的保护作用及其可能分子机制。

H₂O₂可诱导HaCaT细胞产生过多的ROS,当ROS在细胞内大量聚集超过机体的清除能力时,会导致氧化与抗氧化系统失衡,细胞内氧化应激标志物水平升高以及蛋白和核酸的氧化损伤,机体表现出衰老趋势^[14]。本研究发现,在H₂O₂诱导的细胞氧化损伤模型中,SchC可提高细胞活力,与侯微等^[5]的研究结果一致。本研究还发现,SchC可以改善HaCaT细胞的生长状态,对H₂O₂诱导的HaCaT细胞氧化应激损伤表现出保护作用。SOD与GSH是内源性抗氧化系统中重要的抗氧化酶,可分解机体产生的自由基;MDA作为脂质过氧化的最终产物,可反映自由基攻击细胞的损伤程度^[15]。本研究中,SchC预处理HaCaT细胞,可以提高细胞中的SOD、GSH水平,降低MDA、ROS水平,从而减轻H₂O₂对细胞造成的氧化应激损伤。MMPs的主要作用是水解细胞外基质^[16],而细胞外基质的主要成分是胶原蛋白^[17]。多项研究发现,过多的ROS可以促使MMPs(如MMP-1、MMP-9等)表达增加,使细胞外基质中的胶原蛋白降解,从而降低皮肤弹性,导致

皱纹产生^[16,18]。COX-2又称环氧合酶-2(属于诱导性酶),是机体重要的炎性因子,可被过多的ROS诱导产生,与氧化应激、炎症反应及肿瘤发生密切相关^[19-20]。研究发现,过多的炎性因子可促使皮肤各种细胞内部结构相互作用,从而导致皮肤细胞和组织的损伤^[21]。本研究中,SchC可以通过减少MMP-1、MMP-9的表达而抑制胶原蛋白的降解,减少炎性因子COX-2的产生,从而抑制皱纹的产生,最终对H₂O₂造成的氧化应激衰老模型起到保护作用。细胞凋亡是细胞自发的程序性死亡,是机体为适应生存环境而主动采取的一种死亡过程^[22]。ROS堆积于体内可导致细胞氧化损伤及核酸变性,从而引发炎症反应、诱导凋亡相关因子的表达^[23]。研究发现,在众多调控细胞凋亡的基因家族中,caspase家族和Bcl-2家族起着重要作用^[24]。本研究中,SchC可抑制凋亡相关基因的表达,表明SchC可通过抑制H₂O₂诱导的细胞凋亡保护HaCaT细胞,从而发挥抗衰老作用。Nrf-2/HO-1信号通路是机体主要的抗氧化应激通路之一,其主要功能是调节抗氧化酶的表达、清除自由基,以减轻炎症反应以及氧化应激对细胞造成的损伤^[25-27]。当机体受到ROS刺激后,Nrf-2激活并转移至细胞核,与各种抗氧化元件结合,诱导下游靶基因HO-1及ROS清除酶(如SOD、MDA和GSH等)的表达,在抗ROS生成和氧化应激中发挥重要作用^[28-32]。NF- κ B是重要的转录因子家族,参与多种细胞功能如细胞凋亡、细胞黏附、增殖、炎症反应、细胞应激反应等的调节^[33-35]。作为第二信使,ROS可通过激活NF- κ B导致各种炎性因子如COX-2、MMP-1、MMP-2和MMP-9等的产生,从而造成氧化损伤和炎症反应^[36-41]。研究发现,NF- κ B是调节MMPs、COX-2、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的重要转录因子^[42-43]。NF- κ B通路与凋亡相关基因的表达密切相关,可通过调节Bcl-2和caspase途径抑制炎症和细胞凋亡^[44]。本研究中,H₂O₂诱导的ROS在体内过度累积,刺激NF- κ B和Nrf-2信号通路及下游因子的表达,从而造成细胞氧化损伤和炎症反应,诱发细胞衰老。而SchC预处理可明显抑制ROS的产生,降低衰老相关蛋白P16、P21的表达,激活Nrf-2信号通路,增加下游靶基因HO-1的表达并发挥抗氧化作用;还可抑制NF- κ B信号通路,降低MMP-1、MMP-9、COX-2及凋亡相关基因mRNA和蛋白的表达,抑制胶原降解、凋亡和炎症反应,从而减轻H₂O₂对细胞造成的氧化应激损伤,发挥抗衰老作用(图8)。

综上所述,本研究结果表明,SchC可增加细胞的抗氧化能力,抑制衰老相关蛋白的表达,抑制胶原降解,减少细胞凋亡,减轻炎症反应,从而对

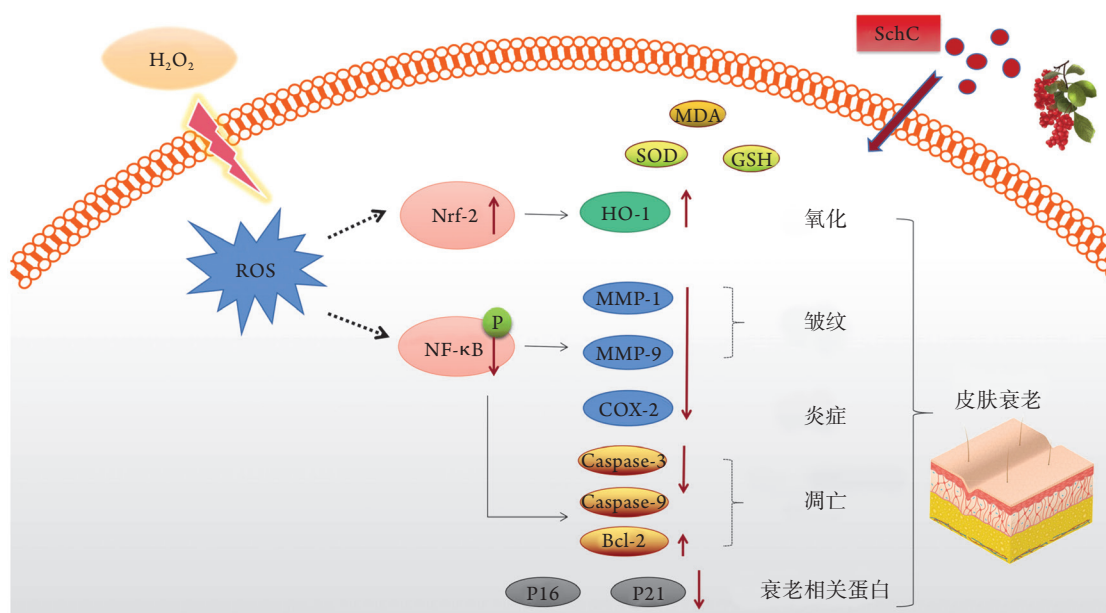


图8 SchC保护H₂O₂诱导的HaCaT细胞损伤的机制

Fig.8 Proposed mechanism of SchC for the protection of H₂O₂-induced HaCaT cells

红色箭头示SchC的活性; SchC. 五味子丙素; ROS. 活性氧; SOD. 超氧化物歧化酶; MDA. 丙二醛; GSH. 还原型谷胱甘肽; Nrf-2. 转录因子NF-E₂相关因子2; HO-1. 血红素加氧酶-1; MMP. 基质金属蛋白酶; COX-2. 环氧合酶-2; Caspase. 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; Bcl-2. B淋巴细胞瘤-2; NF-κB. 核因子-κB

H₂O₂造成的氧化应激损伤衰老模型起到保护作用。这为五味子抗皮肤衰老产品的开发提供了一定的理论基础。

【参考文献】

[1] Kowald A, Passos J, Kirkwood T. On the evolution of cellular senescence[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(12): e13270.

[2] Xu MR, Wang JQ, Gao JW, et al. Protective effect of Bupleurum chinense polysaccharide on aging model mice induced by D-galactose and its mechanism[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2020, 46(6): 1215-1220, 1350. [许梦然, 王迦琦, 高婧雯, 等. 北柴胡多糖对D-半乳糖致衰老模型小鼠的保护作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(6): 1215-1220, 1350.]

[3] Zhou MQ, Kuang J, Hu HL, et al. Effect and mechanism of Inula britannica flower total flavonoids on the expression of lncRNA TERRA in the senescent skin fibroblasts[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(11): 1117-1124. [周茂强, 况杰, 胡翰林, 等. 欧亚旋覆花总黄酮对衰老皮肤成纤维细胞lncRNA TERRA的影响及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(11): 1117-1124.]

[4] Liu LH. Effect and mechanism of Schisandrin C on lipopolysaccharide-induced myocardial inflammatory response and pyroptosis[J]. *Jiangsu Pharm Clin Res*, 2020, 28(2): 81-85. [刘力亨. 五味子丙素抑制脂多糖诱导心肌细胞的炎症反应与细胞焦亡的作用及机制研究[J]. *药学与临床研究*, 2020, 28(2): 81-85.]

[5] Hou W, Wei ZB, Gao W, et al. Protective effects of schisandrin A, B and C on the oxidative damage of HaCat cells[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(3): 1047-1049. [侯薇, 魏忠宝, 高薇, 等. 五味子甲素、乙素及丙素对HaCat细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(3): 1047-1049.]

[6] Dang ZN, Wang CB, Han YT. Protective effect of PCF on H₂O₂-

induced HaCaT cell injury[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2014, 42(20): 6618-6620. [党转宁, 王春波, 韩彦歆. 扇贝多肽对H₂O₂损伤HaCaT细胞的保护作用[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(20): 6618-6620.]

[7] Liang P, Liu XM, Yang P, et al. Protective effect of Tilapia skin peptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress injury in HaCaT cells[J]. *J Guangdong Ocean Univ*, 2018, 38(4): 43-49. [梁鹏, 刘雪梅, 杨萍, 等. 罗非鱼鱼皮多肽对H₂O₂诱导的HaCaT细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *广东海洋大学学报*, 2018, 38(4): 43-49.]

[8] Jiao S, Meng F, Zhang J, et al. STAT1 mediates cellular senescence induced by angiotensin II and H₂O₂ in human glomerular mesangial cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 365(1-2): 9-17.

[9] Ademowo OS, Dias HKI, Burton DGA, et al. Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process?[J]. *Biogerontology*, 2017, 18(6): 859-879.

[10] Zhou J, Chen F, Yan A, et al. Madecassoside protects retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptosis through the activation of Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(10): BSR20194347.

[11] Yim SY, Lee YJ, Lee YK, et al. Gomisins N isolated from *Schisandra chinensis* significantly induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in hepatic carcinoma[J]. *Mol Med Report*, 2009, 2(5): 725-732.

[12] Chun JN, Cho M, So I, et al. The protective effects of *Schisandra chinensis* fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: a review of the molecular mechanisms[J]. *Fitoterapia*, 2014, 97: 224-233.

[13] Kim JS, Yi HK. Schisandrin C enhances mitochondrial biogenesis and autophagy in C2C12 skeletal muscle cells: potential involvement of anti-oxidative mechanisms[J]. *Naunyn*

- Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018, 391(2): 197-206.
- [14] Choi YH. Activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway contributes to the protective effects of coptisine against oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis in HaCaT keratinocytes[J]. Gen Physiol Biophys, 2019, 38(4): 281-294.
- [15] Abdel-Daim MM, Eissa IAM, Abdeen A, *et al.* Lycopene and resveratrol ameliorate zinc oxide nanoparticles-induced oxidative stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2019, 69: 44-50.
- [16] Chae S, Piao MJ, Kang KA, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase-1 induced by oxidative stress in human keratinocytes by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(12): 2321-2325.
- [17] Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2016, 31(sup1): 177-183.
- [18] Lorz LR, Yoo BC, Kim MY, *et al.* Anti-wrinkling and anti-melanogenic effect of *Pradosia mutisii* methanol extract[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5): 1043.
- [19] Liu L, Liu D, Xiang C, *et al.* Sesquiterpene lactones *Artemisia austroyunnanensis* from suppresses ROS production and reduces cytokines, iNOS and COX-2 levels NF- κ B pathway *in vitro*[J]. Nat Prod Res, 2020, 34(11): 1563-1566.
- [20] Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, *et al.* UV-induced squamous cell carcinoma--a role for antiapoptotic signalling pathways[J]. Br J Dermatol, 2009, 161(sup3): 107-115.
- [21] Lin RF. Protective effects of patchouli oil on UVB induced photoaging in mice[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015. [林荣锋. 广藿香油对UV所致小鼠皮肤光老化模型保护作用的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.]
- [22] Li Z. Mechanism study on bitter apricot oil induced HaCaT cell apoptosis and NF- κ B pathway inhibition[D]. Xianyang: North West Agriculture and Forestry University, 2016. [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]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.]
- [23] Li JM, Yang L, Wang YQ, *et al.* Effect of baicalein on ERK signaling pathways of HaCaT cell with light aging[J]. Chin Tradit Herb Drug, 2017, 48(20): 4289-4295. [李建民, 杨柳, 王业秋, 等. 黄芩素对HaCaT细胞光老化模型ERK信号通路的影响[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4289-4295.]
- [24] Aiello P, Sharghi M, Mansourkhani SM, *et al.* Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 2075614.
- [25] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(9): 1304-1309.
- [26] Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(10): 1199-1207.
- [27] Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray[J]. Cancer Res, 2002, 62(18): 5196-5203.
- [28] Nguyen T, Nioui P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2009, 284(20): 13291-13295.
- [29] Hong C, Cao J, Wu CF, *et al.* The Chinese herbal formula Free and Easy Wanderer ameliorates oxidative stress through KEAP1-NRF2/HO-1 pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11551.
- [30] Du JN, Dai QX, Xu X, *et al.* Protective effect of dexmedetomidine on oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes by regulating Nrf2/HO-1 pathway[J]. Chin Pharm, 2020, 23(9): 1691-1695. [杜佳楠, 戴勤学, 徐夏, 等. 右美托咪定调控Nrf2/HO-1通路对H₂O₂诱导心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国药师, 2020, 23(9): 1691-1695.]
- [31] Waza AA, Hamid Z, Bhat SA, *et al.* Relaxin protects cardiomyocytes against hypoxia-induced damage in *in-vitro* conditions: Involvement of Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Life Sci, 2018, 213: 25-31.
- [32] Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(1): 558-567.
- [33] Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(5): 861-872.
- [34] Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(5): 759-772.
- [35] Wen DX, Svensson EC, Paulson JC. Tissue-specific alternative splicing of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene[J]. J Biol Chem, 1992, 267(4): 2512-2518.
- [36] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappaB transcription factor and HIV-1[J]. EMBO J, 1991, 10(8): 2247-2258.
- [37] Yang H, Song Z, Hong D. CRBN knockdown mitigates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by suppression of oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress associated NF- κ B signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 123: 109761.
- [38] Kabe Y, Ando K, Hirao S, *et al.* Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(3-4): 395-403.
- [39] Wu M, Bian Q, Liu Y, *et al.* Sustained oxidative stress inhibits NF-kappaB activation partially *via* inactivating the proteasome[J]. Free Radical Biol Med, 2009, 46(1): 62-69.
- [40] Wang J, Liu YT, Xiao L, *et al.* Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF- κ B pathway[J]. Inflammation, 2014, 37(6): 2085-2090.
- [41] Cheng FX, Sun XL, Yang YP, *et al.* IL-17 activates NF- κ B in patients with periodontitis and oral lichen planus and promotes MMPs secretion of hPDLFs[J]. J Pract Stomatol, 2019, 35(6): 805-809. [程凤峡, 孙喜龙, 杨玉鹏, 等. 牙周炎伴口腔扁平苔藓中IL-17激活NF- κ B调控hPDLFs促进MMPs的分泌[J]. 实用口腔医学杂志, 2019, 35(6): 805-809.]
- [42] Stratz C, Anakwue J, Bhatia H, *et al.* Anti-inflammatory effects of 5-HT3 receptor antagonists in interleukin-1beta stimulated primary human chondrocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(1): 160-166.
- [43] Toegel S, Wu SQ, Otero M, *et al.* Caesalpinia sappan extract inhibits IL1 β -mediated overexpression of matrix metalloproteinases in human chondrocytes[J]. Genes Nutr,

2012, 7(2): 307-318.
[44] Aslan A, Gok O, Erman O, *et al.* Ellagic acid impedes carbontetrachloride-induced liver damage in rats through

suppression of NF- κ B, Bcl-2 and regulating Nrf-2 and caspase pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 662-669.

(收稿日期: 2020-11-20; 修回日期: 2021-01-30)
(责任编辑: 纪方方)