(2): 45.
[11] 张瑾钰, 陈一强, 孔晋亮, 等. 绿原酸、异绿原酸对烟曲霉生物膜抑制作用的体外研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(4): 327-333.
[12] Cao Y, Dai B, Wang Y, *et al*. *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32(1): 73-77.
[13] Singh B N, Upreti D K, Singh B R, *et al*. Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(4): 2153-2168.
[14] Shevelev A B, La Porta N, Isakova E P, *et al*. *In vivo* antimicrobial and wound-healing activity of resveratrol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*[J]. *Pathogens*, 2020, 9(4): 296.
[15] Mishra S, Singh S, Misra K. Restraining pathogenicity in *Candida albicans* by taxifolin as an inhibitor of Ras1-pka pathway[J]. *Mycopathologia*, 2017, 182(11-12): 953-965.
[16] da Silva C R, de Andrade Neto J B, de Sousa Campos R, *et al*. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(3): 1468-1478.
[17] Dominguez E, Zarnowski R, Sanchez H, *et al*. Conservation and divergence in the *Candida Species* biofilm matrix mannan-glucan complex structure, function, and genetic control[J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00451-e00418.
[18] Dabiri S, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens[J]. *J Mycol Med*, 2018, 28(3): 437-442.
[19] Pristov K E, Ghannoum M A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(7): 792-798.
[20] Tits J, Cammue B P A, Thevissen K. Combination therapy to treat fungal biofilm-based infections[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8873.

原花青素抗 UVB 诱导皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤的影响

饶美荣, 曾 芬, 钟 咪, 张佳音
(江南大学附属医院皮肤科, 江苏 无锡 214000)

摘要: 目的 研究原花青素对中波紫外线(UVB)诱导皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤的影响。**方法** 分离培养人皮肤成纤维细胞, 分成对照组(不做处理), UVB 组(UVB 照射), 原花青素低、中、高剂量组(20、40、80 μg/mL 原花青素处理, UVB 照射), 原花青素中剂量+XAV939 组(40 μg/mL 原花青素+1 μmol/L XAV939 处理, UVB 照射)。CCK-8 实验检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡能力, 黄嘌呤氧化法检测细胞 SOD 活性, 硫代巴比妥酸法检测 MDA 水平, 比色法检测 GSH-Px 活性, ELISA 法检测培养液上清 MMP-1、MMP-9 水平, Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、Wnt1、β-catenin 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, UVB 组细胞存活率, SOD、GSH-Px 活性, Bcl-2、Wnt1、β-catenin 蛋白表达降低($P<0.05$), 凋亡率, Bax 蛋白表达, MDA、MMP-1、MMP-9 水平升高($P<0.05$); 与 UVB 组比较, 原花青素各剂量组细胞上述指标均有改善($P<0.05$), 并呈剂量依赖性; XAV939 则逆转了原花青素对 UVB 诱导皮肤成纤维细胞的保护作用($P<0.05$)。**结论** 原花青素通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路抑制 UVB 诱导皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤。

关键词: 原花青素; 中波紫外线(UVB); 皮肤成纤维细胞; 凋亡; 氧化损伤; Wnt/β-catenin 信号通路
中图分类号: R285.5 **文献标志码**: B **文章编号**: 1001-1528(2022)12-4044-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.053

皮肤是人体和外界环境直接接触的器官, 经过紫外线照射后皮肤组织会出现光老化现象[1]。中波紫外线(UVB)能够穿过表皮损伤真皮, 是自然界中导致皮肤光损伤以及光老化的重要原因, 皮肤成纤维细胞是其主要的靶细胞[2]。皮肤经过紫外线照射后能够引起氧化损伤, 诱导细胞凋亡, 进而造成皮肤损伤, 促进皮肤光老化[3]。原花青素是一种缩合单宁, 在各类中药的皮、核、种子中存在, 具有抗炎、抗过敏、抗氧化等功效, 对肿瘤和心血管系统疾病有治疗功效[4]。原花青素含有数个酚性羟基, 其在机体内被氧化产生氢离子, 这些氢离子与自由基或氧化物结合, 从而避免脂质发生氧化, 改善氧化损伤[5]。原花青素能够改善长波紫外线诱导的皮肤成纤维细胞降解细胞

收稿日期: 2021-07-10
作者简介: 饶美荣(1982—), 女, 硕士, 从事中西医结合治疗皮肤科疾病的研究。E-mail: kln237@163.com

外基质程度，延缓皮肤光老化，从而保护皮肤组织[6]。Wnt/β-catenin 信号通路是目前发现的与皮肤损伤有关的信号转导通路，其在 UVB 处理的皮肤成纤维细胞中被抑制，而激活 Wnt/β-catenin 能改善皮肤损伤[7-8]。本实验探讨原花青素对 UVB 引起的皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤的作用机制，以期为其治疗皮肤光老化的临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞 人皮肤成纤维细胞的获取源自江南附属医院 2019 年 9 月青少年男子行环切术得到的包皮组织，研究经医院伦理委员会审核批准（LS2019055）。

1.2 试剂与药物 原花青素（货号 Y-033，纯度>98%）购自成都瑞芬思生物科技有限公司。谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）检测试剂盒（货号 A005-1-2）、β-连环蛋白（β-catenin）抗体（货号 KF682）购自南京建成生物工程研究所；辣根过氧化物酶标记的二抗（货号 7074）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax）抗体（货号 14796）购自美国 Cell Signaling Technology 公司；基质金属蛋白酶-1（MMP-1）检测试剂盒（货号 JL10180-48T）购自北京百奥莱博科技有限公司；超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（货号 S0086）、丙二醛（MDA）检测试剂盒（货号 S0131S）、B 细胞淋巴瘤/白血病-2（Bcl-2）抗体（货号 AB112）购自上海碧云天生物技术有限公司；Wnt1 抗体（货号 A-AO1303a）购自美国 Abgent 公司；基质金属蛋白酶-9（MMP-9）检测试剂盒（货号 USCN00694）购自上海北诺生物科技有限公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体（货号 ab263962）购自英国 Abcam 公司；Wnt/β-catenin 信号抑制剂 XAV939（货号 S1180）购自美国 Sigma 公司。

2 方法

2.1 人皮肤成纤维细胞分离培养 参考文献［9］报道，取包皮组织剪碎，浸泡于碘伏中 5 min，用含有青链霉素的生理盐水洗涤 3 次，加入 0.5% Dispase 酶，37 ℃消化 4 h，分离真皮、表皮组织。将真皮组织用磷酸缓冲盐溶液（PBS）洗涤 2 次，加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养过夜，更换细胞培养液后继续培养，细胞融合成片后进行传代（0.25% 胰蛋白酶），期间每隔 3 d 更换新鲜细胞培养液，收集第 3~6 代细胞用于后续实验。分离培养的细胞经免疫组化染色 Vimentin 阳性，鉴定为皮肤成纤维细胞。

2.2 CCK-8 实验检测细胞活力 将人皮肤成纤维细胞以 2×10^4/mL的密度接种到 96 孔板中，每孔 100 μL，细胞贴壁后分别加入含有 0、20、40、80、160、320 μg/mL 原花青素细胞培养液，培养 24 h，PBS 洗涤细胞，加入 100 μL 细胞培养液和 10 μL CCK-8 溶液，继续培养 4 h，于 450 nm 波长处检测光密度（*OD*）值，计算细胞存活率。

2.3 分组与给药 将人皮肤成纤维细胞分为对照组，UVB 组，原花青素低、中、高剂量组，对照组细胞不做任何处理；UVB 组细胞经 UVB 照射；原花青素各剂量组细胞分别在 UVB 照射前 24 h 用 20、40、80 μg/mL 原花青素预处理，照射结束后再用 20、40、80 μg/mL 原花青素处理 24 h。各组细胞处理 24 h 后，按“2.2”项下方法检测细胞存活率变化。UVB 照射方法为发射峰值 313 nm，照射剂量30 mJ/cm^2。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 各组细胞处理 24 h 后，弃掉培养液上清，PBS 洗涤 3 次，加入 300 μL Binding Buffer 悬浮细胞，加入 5 μL 膜联蛋白 V-FITC 溶液于室温下避光结合 15 min，加入 5 μL 碘化丙啶于室温下结合 15 min，再加入 200 μL Binding Buffer 混匀，用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况，计算总凋亡率，公式为总凋亡率=晚期凋亡率（右上象限）+早期凋亡率（右下象限）。

2.5 检测细胞 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平 收集各组细胞，严格按照相关试剂盒说明书检测细胞 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平。

2.6 ELISA 法检测细胞 MMP-1、MMP-9 水平 收集细胞培养液上清，严格按照相关试剂盒说明书检测上清中 MMP-1、MMP-9 水平。

2.7 Western blot 法检测细胞 Bax、Bcl-2、Wnt1、β-catenin 蛋白表达 收集各组细胞，加入含有 PMSF 的 RIPA 溶液提取细胞总蛋白，BCA 法检测蛋白总浓度，加入等体积 2× Loading Buffer 后于 100 ℃煮沸 5 min，蛋白样品放入-80 ℃保存备用。取 30 μg 蛋白样品上样电泳，再将蛋白转移到 NC 膜上，NC 膜放入 5% 脱脂奶粉溶液中室温结合 2 h，加入 Bax（1∶1 000）、Bcl-2（1∶1 000）、Wnt1（1∶800）、β-catenin（1∶800）抗体溶液，4 ℃孵育过夜，加入二抗溶液（1∶2 000），室温孵育 2 h，采用 ECL 法显色，通过 Image J 软件分析条带灰度值，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白的相对表达。

2.8 检测 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂对原花青素调控 UVB 诱导皮肤成纤维细胞凋亡、氧化损伤的作用 将人皮肤成纤维细胞在 UVB 照射前 24 h 用 40 μg/mL 原花青素和 1 μmol/L Wnt/β-catenin 信号抑制剂 XAV939 处理，经 UVB 照射后，继续用两药处理 24 h，记为原花青素中剂量+XAV939 组，按“2.2”项下方法检测细胞活力，“2.4”项下方法检测细胞凋亡率，“2.5”项下方法检测细胞 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平，“2.6”项下方法检测细胞培养液上清 MMP-1、MMP-9 水平，“2.7”项下方法检测 Bax、Bcl-2、Wnt1、β-catenin 蛋白表达。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 原花青素对人皮肤成纤维细胞增殖的影响 与 0 μg/mL 原花青素组比较，20、40、80 μg/mL 原花青素组人皮肤成纤维细胞存活率没有明显变化（$P>0.05$），160、320 μg/mL原花青素组人皮肤成纤维细胞存活率降低（$P<0.05$），见表 1。因此，选择 20、40、80 μg/mL 原花青素进行后续实验。

表 1 原花青素对人皮肤成纤维细胞存活率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

原花青素/(μg·mL^{-1})	存活率/%
0	100.00±10.36
20	97.34±10.17
40	95.25±8.49
80	93.81±11.72
160	83.22±7.12*
320	62.34±4.78*

注：与 0 μg/mL 原花青素组比较，* $P<0.05$。

3.2 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞增殖及凋亡的影响 与对照组比较，UVB 组人皮肤成纤维细胞存活率、Bcl-2 蛋白表达降低（$P<0.05$），细胞凋亡率、Bax 蛋白表达升高（$P<0.05$）；与 UVB 组比较，原花青素各剂量组人皮肤成纤维细胞存活率、Bcl-2 蛋白表达升高（$P<0.05$），细胞凋亡率、Bax 蛋白表达降低（$P<0.05$），并呈剂量依赖性，见图 1～2、表 2。提示原花青素可抑制 UVB 诱导皮肤成纤维细胞凋亡。

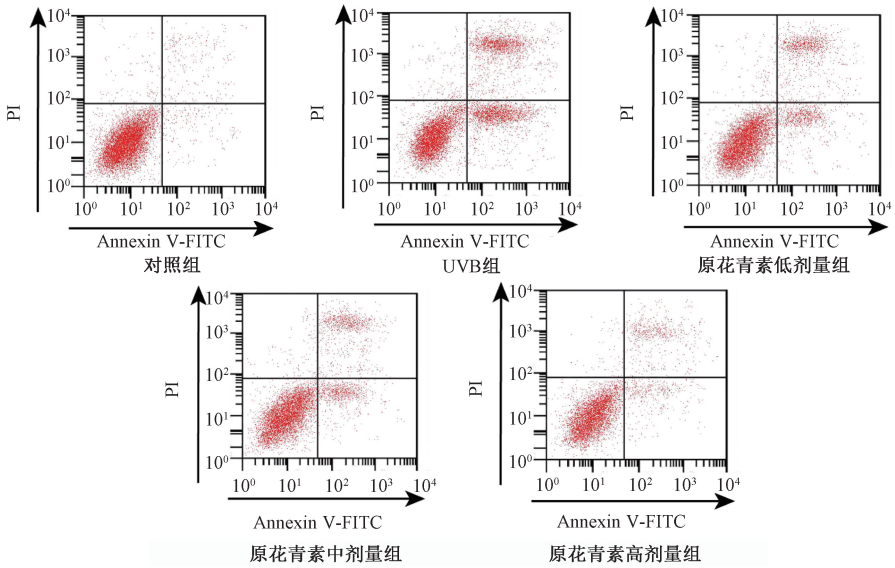

图 1 各组细胞凋亡情况

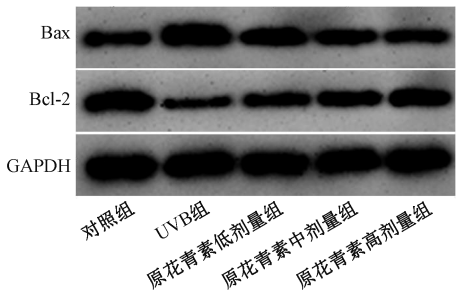

图 2 各组细胞 Bax、Bcl-2 蛋白条带图

3.3 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞氧化损伤的影响 与对照组比较，UVB 组人皮肤成纤维细胞 SOD、GSH-Px 活性降低（$P<0.05$），MDA 水平升高（$P<0.05$）；与 UVB 组比较，原花青素各剂量组人皮肤成纤维细胞中 SOD、GSH-Px 活性升高（$P<0.05$），MDA 水平降低（$P<0.05$），并呈剂量依赖性，见表 3。提示原花青素可抑制 UVB 诱导的皮肤成纤维细胞氧化损伤。

3.4 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞 MMP-1、MMP-9 水平的影响 与对照组比较，UVB 组人皮肤成纤维细胞 MMP-1、MMP-9 水平升高（$P<0.05$）；与 UVB 组比较，原花青素各剂量组人皮肤成纤维细胞 MMP-1、MMP-9 水平降低（$P<0.05$），见表 4。提示原花青素可抑制 UVB 诱导的皮肤成纤维细胞分泌 MMP-1、MMP-9。

表 2 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞增殖及凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

组别	存活率/%	总凋亡率/%	Bax	Bcl-2
对照组	100.00±8.62	7.45±0.63	0.43±0.06	0.85±0.08
UVB 组	63.20±6.33*	28.26±2.15*	0.98±0.09*	0.26±0.03*
原花青素低剂量组	73.25±3.26$^{\&}$	20.11±2.08$^{\&}$	0.77±0.06$^{\&}$	0.38±0.04$^{\&}$
原花青素中剂量组	86.90±5.54$^{\&\#}$	15.02±1.21$^{\&\#}$	0.63±0.06$^{\&\#}$	0.56±0.05$^{\&\#}$
原花青素高剂量组	95.27±4.17$^{\&\#\triangle}$	10.65±1.16$^{\&\#\triangle}$	0.51±0.04$^{\&\#\triangle}$	0.67±0.04$^{\&\#\triangle}$

注：与对照组比较，* $P<0.05$；与 UVB 组比较，$^{\&}P<0.05$；与原花青素低剂量组比较，$^{\#}P<0.05$；与原花青素中剂量组比较，$^{\triangle}P<0.05$。

3.5 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白表达的影响 与对照组比较，UVB 组人皮肤成纤维细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白表达降低（$P<0.05$）；与 UVB 组比较，原花青素各剂量组人皮肤成纤维细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白表达升高（$P<0.05$），见图 3、表 5。提示原花青素能促进 UVB 诱导的皮肤成纤维细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路激活。

表 3 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞氧化损伤的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

组别	SOD/（U·mL^{-1}）	MDA/（μmol·L^{-1}）	GSH-Px/（U·mL^{-1}）
对照组	23.45±1.25	2.90±0.25	5.56±0.47
UVB 组	7.49±0.46*	8.79±0.41*	1.20±0.11*
原花青素低剂量组	12.32±1.42$^{\&}$	7.15±0.52$^{\&}$	2.86±0.14$^{\&}$
原花青素中剂量组	17.91±1.89$^{\&\#}$	5.26±0.43$^{\&\#}$	3.55±0.35$^{\&\#}$
原花青素高剂量组	21.05±2.01$^{\&\#\triangle}$	3.20±0.21$^{\&\#\triangle}$	4.68±0.44$^{\&\#\triangle}$

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与 UVB 组比较，$^{\&}P<0.05$；与原花青素低剂量组比较，$^{\#}P<0.05$；与原花青素中剂量组比较，$^{\triangle}P<0.05$。

表 4 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞 MMP-1、MMP-9 水平的影响（ng/mL，$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

组别	MMP-1	MMP-9
对照组	14.26±1.42	9.58±0.74
UVB 组	68.53±4.36*	43.28±4.16*
原花青素低剂量组	52.01±4.17$^{\&}$	35.26±2.17$^{\&}$
原花青素中剂量组	30.66±2.89$^{\&\#}$	22.85±1.69$^{\&\#}$
原花青素高剂量组	20.17±2.15$^{\&\#\triangle}$	14.56±1.18$^{\&\#\triangle}$

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与 UVB 组比较，$^{\&}P<0.05$；与原花青素低剂量组比较，$^{\#}P<0.05$；与原花青素中剂量组比较，$^{\triangle}P<0.05$。

3.6 XAV939 对原花青素调控 UVB 诱导皮肤成纤维细胞增殖、凋亡、氧化损伤的影响 与原花青素中剂量组比较，原花青素中剂量+XAV939 组人皮肤成纤维细胞存活率，Bcl-2、Wnt1、β-catenin 蛋白表达，SOD、GSH-Px 活性降低（$P<0.05$），细胞凋亡率，Bax 蛋白表达，MDA、MMP-1、MMP-9 水平升高（$P<0.05$），见图 4、表 6~7。

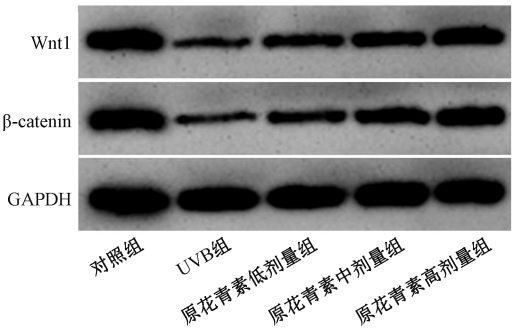

图 3 各组细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白条带图

表 5 原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

组别	Wnt1	β-catenin
对照组	0.67±0.08	0.65±0.04
UVB 组	0.20±0.03*	0.18±0.02*
原花青素低剂量组	0.34±0.05$^{\&}$	0.32±0.02$^{\&}$
原花青素中剂量组	0.43±0.04$^{\&\#}$	0.45±0.06$^{\&\#}$
原花青素高剂量组	0.56±0.05$^{\&\#\triangle}$	0.57±0.04$^{\&\#\triangle}$

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与 UVB 组比较，$^{\&}P<0.05$；与原花青素低剂量组比较，$^{\#}P<0.05$；与原花青素中剂量组比较，$^{\triangle}P<0.05$。

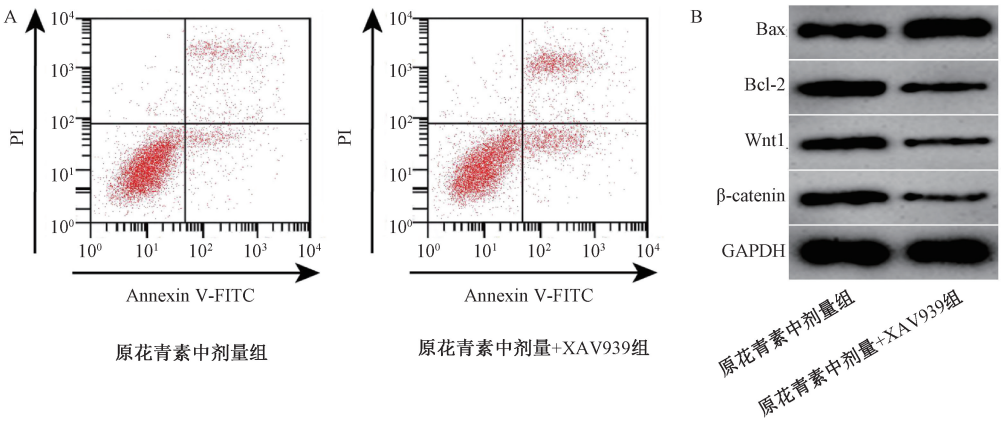

图 4 各组细胞凋亡（A）和 Bax、Bcl-2、Wnt1、β-catenin 蛋白表达（B）情况

表 6 XAV939 和原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞增殖、凋亡、氧化损伤的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

组别	存活率/%	总凋亡率/%	SOD/（U·mL^{-1}）	MDA/（μmol·L^{-1}）	GSH-Px/（U·mL^{-1}）	MMP-1/（ng·mL^{-1}）	MMP-9/（ng·mL^{-1}）
原花青素中剂量组	100.00±11.25	14.26±1.15	18.52±1.66	5.18±0.44	3.51±0.29	31.84±3.62	21.45±1.69
原花青素中剂量+XAV939 组	73.26±5.17*	20.47±1.63*	9.23±0.58*	7.46±0.52*	1.87±0.14*	57.48±5.29*	38.76±2.27*

注：与原花青素中剂量组比较，$^{*}P<0.05$。

表 7 XAV939 和原花青素对 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞 Bax、Bcl-2、Wnt1、β-catenin 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

组别	Bax	Bcl-2	Wnt1	β-catenin
原花青素中剂量组	0.60±0.05	0.58±0.06	0.44±0.05	0.46±0.04
原花青素中剂量+XAV939 组	0.85±0.08*	0.32±0.04*	0.21±0.04*	0.16±0.02*

注：与原花青素中剂量组比较，$^{*}P<0.05$。

4 讨论

紫外线有 3 个波段，其中 UVB 能够穿过皮肤表皮，而皮肤成纤维细胞是真皮的主要组成部分，也是紫外线辐射造成光老化的靶细胞[10]。紫外线照射后，皮肤成纤维细胞中抗氧化酶活性降低，导致细胞中的氧自由基积累，不仅造成细胞氧化损伤，还可以刺激细胞内凋亡相关蛋白，激活细胞凋亡途径[11]。MDA 是脂质过氧化产物，其水平升高标志着细胞氧化损伤程度增加[12]。SOD、GSH-Px 是重要的抗氧化酶，其活性降低则加快了氧化损伤进程[13]。Bcl-2 蛋白家族是与细胞凋亡密切相关的调控因子，其中 Bax 属于促凋亡蛋白，Bcl-2 属于抗凋亡蛋白[14]。人体真皮组织是由多种胶原酶、基质溶解素、明胶酶等组成的，而在皮肤光老化过程中，皮肤成纤维细胞能够分泌大量外基质降解酶如 MMP-1、MMP-9 将细胞外基质降解，造成皮肤组织破坏，引起皱纹和皮肤松弛[15]。本实验结果发现，UVB 刺激后的人皮肤成纤维细胞活性，SOD、GSH-Px 活性，Bcl-2 蛋白表达降低，细胞凋亡率，Bax 蛋白表达，MDA、MMP-1、MMP-9 水平升高，提示 UVB 诱导皮肤成纤维细胞氧化损伤和细胞凋亡，促进细胞外基质降解，造成光老化，UVB 诱导皮肤成纤维细胞损伤模型构建成功。

原花青素对肿瘤、高血压、关节炎等有治疗作用[16]。研究发现，原花青素能够改善皮肤损伤，其治疗后小鼠光老化皮肤组织细胞凋亡水平降低，抗氧化酶活性升高[17]；还可以改善紫外线诱导的人角质形成细胞增殖活性，发挥皮肤保护作用[18]；亦可抑制长波紫外线诱导的人皮肤成纤维细胞外基质降解，延缓皮肤光老化[6]。本实验结果表明，原花青素能抑制 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞凋亡、氧化损伤和分泌细胞外基质降解酶，具有改善皮肤成纤维细胞光老化的作用。

Wnt/β-catenin 是一个与细胞衰老有关的信号转导通路，Wnt1、β-catenin 是 Wnt/β-catenin 信号通路的关键蛋白，两者表达改变与该信号通路的激活水平有关[19-21]，衰老的细胞中 β-catenin 表达降低[22-23]。在 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞光老化模型中 Wnt/β-catenin 信号被抑制，而激活 Wnt/β-catenin 信号能够改善皮肤老化[7-8]。本实验结果表明，原花青素能促进 UVB 诱导人皮肤成纤维细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白表达。当以 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂和原花青素处理 UVB 诱导的人皮肤成纤维细胞时，发现 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂可以逆转原花青素对 UVB 诱导的人皮肤成纤维细胞增殖、凋亡、氧化损伤作用，说明原花青素通过激活 Wnt/β-catenin 信号调控 UVB 诱导的人皮肤成纤维细胞凋亡、氧化应激和分泌细胞外基质降解酶。

综上所述，原花青素对 UVB 诱导的皮肤光老化具有保护作用，能抑制 UVB 诱导的人皮肤成纤维细胞凋亡和氧化损伤，其机制与激活 Wnt/β-catenin 信号通路有关，这为原花青素治疗皮肤光老化的临床应用提供理论支撑。

参考文献：

[1] Huang J, Tu T, Wang W B, *et al*. Asiatic acid glucosamine salt alleviates ultraviolet B-induced photoaging of human dermal fibroblasts and nude mouse skin[J]. *Photochem Photobiol*, 2020, 96(1): 124-138.

[2] Gao W, Wang Y S, Qu Z Y, *et al*. *Orobanche cernua* loefling attenuates ultraviolet B-mediated photoaging in human dermal fibroblasts [J]. *Photochem Photobiol*, 2018, 94(4): 733-743.

[3] Liu X Y, Hwang E, Park B, *et al*. Ginsenoside C-Mx isolated from notoginseng stem-leaf ginsenosides attenuates ultraviolet B-mediated photoaging in human dermal fibroblasts [J]. *Photochem Photobiol*, 2018, 94(5): 1040-1048.

[4] 扶晓菲，鄢明辉，游春苹. 原花青素生理功能及其与肠道微生物相互作用的研究进展[J]. 食品工业科技，2020，41(10)：350-357.

[5] 步文磊，王 茵. 原花青素的生物活性及作用机制研究进展[J]. 国外医学（卫生学分册），2007，34(5)：311-315.

[6] 康 元，张峻岭，史先花，等. 葡萄籽提取物原花青素对长波紫外线诱导皮肤成纤维细胞表达 TGF-βRⅡ与 Smad7 的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志，2015，14(6)：341-343.

[7] 熊正国，彭慧巧，张长城，等. WNT/β-catenin 信号通路在皮肤衰老中作用的研究进展[J]. 山东医药，2016，56(29)：105-107.

[8] 张 杰，甘 华，刘 瑾. UVB 诱导人皮肤成纤维细胞改变后 β-catenin 基因表达水平的研究[J]. 西部医学，2019，31(1)：47-50.

[9] Pan C W, Lang H X, Zhang T, *et al*. Conditioned medium derived from human amniotic stem cells delays H_2O_2-induced premature senescence in human dermal fibroblasts[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(5): 1629-1640.

[10] Lee S E, Kwon T R, Kim J H, *et al*. Anti-photoaging and anti-oxidative activities of natural killer cell conditioned medium following UV-B irradiation of human dermal fibroblasts and a reconstructed skin model[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(5): 1641-1652.

[11] Liu Y, Hwang E, Ngo H T T, *et al*. Protective effects of *Euphrasia officinalis* extract against ultraviolet B-induced photoaging in normal human dermal fibroblasts[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3327-3335.

[12] Ata N, Kulhan N G, Kulhan M, *et al*. The effect of resveratrol on oxidative ovary-damage induced by methotrexate in rats (resveratrol oxidative ovary-damage) [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2019, 38(6): 519-524.

[13] Li W, Zhao S, Cheng F, *et al*. Oxidative damage and mitochondrial injuries differ following pneumoperitoneum pressure in rabbit models of varying degrees of hydronephrosis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6819-6827.

[14] Li Y Y, Lin Y K, Huang X X, *et al*. SCM-198 protects endometrial stromal cells from oxidative damage through Bax/Bcl-2 and ERK signaling pathways[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2019, 51(6): 580-587.

[15] Kumar J P, Mandal B B. Inhibitory role of silk cocoon extract

against elastase, hyaluronidase and UV radiation-induced matrix metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts and keratinocytes[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2019, 18(5): 1259-1274.

[16] 高晨曦, 黄 艳, 孙威江. 茶叶中原花青素研究进展[J]. 茶叶科学, 2020, 40(4): 441-453.

[17] 马嘉艺, 郭 砚, 冶 娟, 等. 黑果枸杞原花青素对小鼠皮肤衰老模型的保护作用研究[J]. 中国全科医学, 2019, 22(15): 1851-1854.

[18] 史先花, 张峻岭, 康 元. 葡萄籽原花青素及 UVA 照射对 HaCaT 细胞增殖活性的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2016, 15(3): 136-138.

[19] Dzobo K, Thomford N E, Senthebane D A. Targeting the versatile Wnt/β-catenin pathway in cancer biology and therapeutics: from concept to actionable strategy[J]. *OMICS*, 2019, 23(11): 517-538.

[20] Kasoha M, Dernektsi C, Seibold A, *et al*. Crosstalk of estrogen receptors and Wnt/β-catenin signaling in endometrial cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(2): 315-327.

[21] Tomar V S, Patil V, Somasundaram K. Temozolomide induces activation of Wnt/β-catenin signaling in glioma cells *via* PI3K/Akt pathway: implications in glioma therapy[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36(3): 273-278.

[22] Dong F F, Dong S H, Liang Y, *et al*. miR-20b inhibits the senescence of human umbilical vein endothelial cells through regulating the Wnt/β-catenin pathway *via* the TXNIP/NLRP3 axis[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(3): 847-857.

[23] Li Z L, Chen S F, Chen S, *et al*. Moderate activation of Wnt/β-catenin signaling promotes the survival of rat nucleus pulposus cells *via* regulating apoptosis, autophagy, and senescence[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12519-12533.

基于 ROS/TXNIP/NLRP3 通路探讨槲皮素对 Pg-LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子表达的影响

刘兰宁, 唐焕珍, 李晓媛
(南方医科大学中西医结合医院口腔科, 广东 广州 510315)

摘要: 目的 探讨槲皮素调控活性氧(ROS)/硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)/NOD 样受体相关蛋白 3(NLRP3)信号通路对牙龈卟啉单胞菌脂多糖(Pg-LPS)诱导 RAW264.7 细胞炎症因子的影响。**方法** 采用 1 mg/L Pg-LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞构建细胞炎症模型, 分为对照组、模型组及槲皮素低、中、高剂量组(5、25、50 μmol/L), MTT 法检测细胞活力, 倒置显微镜观察各组细胞形态变化, RT-qPCR 法检测炎症因子白细胞介素(*IL*)-6、*IL*-1β、*TNF*-α、诱导型 NO 合酶(*iNOS*)、环氧合酶(*COX*-2)mRNA 表达, 荧光分光光度计检测细胞中 ROS 水平, Western blot 法检测 TXNIP、NLRP3 蛋白表达。**结果** 0~50 μmol/L 槲皮素对 RAW264.7 细胞活力无明显影响($P>0.05$)。与对照组比较, 模型组细胞形成伪足所占比例升高($P<0.05$), *IL*-6、*IL*-1β、*TNF*-α、*iNOS*、*COX*-2 mRNA 及 TXNIP、NLRP3 蛋白表达上调($P<0.05$), ROS 水平增加($P<0.05$); 与模型组比较, 槲皮素各剂量组细胞形成伪足所占比例降低($P<0.05$), *IL*-6、*IL*-1β、*TNF*-α、*iNOS*、*COX*-2 mRNA 及 TXNIP、NLRP3 蛋白表达下调($P<0.05$), ROS 水平减少($P<0.05$), 并呈剂量依赖性。**结论** 槲皮素可抑制 Pg-LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子表达, 其机制可能与抑制 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路活性有关。

关键词: 槲皮素; 牙龈卟啉单胞菌脂多糖(Pg-LPS); ROS/TXNIP/NLRP3 通路; 炎症因子
中图分类号: R285.5 **文献标志码**: B **文章编号**: 1001-1528(2022)12-4049-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.054

牙周炎是一种慢性、多因素的炎症性疾病, 可能会导致牙齿脱落, 并最终引发全身炎症反应[1]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)定植在龈下部位并分泌毒力因子脂多糖(LPS), 随后宿主产生炎症和免疫反应, 这是牙周炎产生的主要病因之一[2]。RAW264.7 是小鼠单核巨噬细胞白血病细胞, 是许多炎症因子的主要来源, 在牙周炎的发展中起着重要作用[3]。近年来, 基于炎症信号通路中关键分子筛选抗炎药物受到广泛关注, 其中活性氧(ROS)/硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)/NOD 样受体相关蛋白 3(NLRP3)信号通路作为炎症反应的重要信号通路之一[4], 已被报道在调节脊髓损伤神经炎症中发挥着重要的促进作用[5]。提示 ROS/TXNIP/NLRP3 通路与牙周炎

收稿日期: 2021-09-22
作者简介: 刘兰宁(1975—), 男, 硕士, 主治医师, 从事口腔全科研究。Tel: 13538756796, E-mail: njyy441@163.com