

本文引用:刘朝圣,申梦洁,韩晓凤,彭丽丽,刁庆春.红景天苷对 UVB 辐射 HaCat 细胞活性及 Caspase-3/9 蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(8):952-956.

红景天苷对 UVB 辐射 HaCat 细胞活性及 Caspase-3/9 蛋白表达的影响

刘朝圣^{1,2}, 申梦洁³, 韩晓凤², 彭丽丽⁴, 刁庆春^{2*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院皮肤科,湖南长沙 410007;2.重庆市第一人民医院皮肤科,重庆 400011;

3.漳州正兴医院医疗美容科,福建漳州 363000;4.湖南中医药大学护理学院,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 研究红景天苷对中波紫外线(ultraviolet B, UVB)辐射 HaCat 细胞增殖及 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的作用。**方法** 将 HaCat 细胞分为 6 组:即正常对照组(I 组)、红景天苷中剂量组(II 组)、UVB 辐射组(III 组)、UVB+红景天苷低剂量组(IV 组)、UVB+红景天苷中剂量组(V 组)、UVB+红景天苷高剂量组(VI 组),I 组未经任何处理,II 组加入 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的红景天苷,III 组接受 200 mJ/cm^2 剂量紫外线照射,IV、V、VI 组分别加入 10、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红景天苷并进行 200 mJ/cm^2 紫外线照射。HaCat 细胞培养 24 h 后,采用 MTT 法检测细胞活力,流式细胞仪观察细胞周期,Western blotting 法检测 Caspase-3、Caspase-9 表达的蛋白水平。**结果** MTT 结果显示随着红景天苷浓度的增加,HaCat 细胞的生存率逐渐增加;流式细胞仪检测细胞周期显示 HaCat 细胞的 S 峰值随着红景天苷浓度的增加呈现上升趋势,VI 组 S 峰值高于 II 组;Western blotting 显示 VI 组 Caspase-3/9 的蛋白表达量均有下降。**结论** 红景天苷可通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达,减少 UVB 诱导 HaCat 细胞凋亡。

[关键词] 红景天苷;中波紫外线;细胞增殖;Caspase-3;Caspase-9

[中图分类号]R285.5;R818 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.08.005

Effect of Salidroside on Activity of HaCat Cell by UVB Radiation and Expression of Caspase-3/9 Protein

LIU Chaosheng^{1,2}, SHEN Mengjie³, HAN Xiaofeng², PENG Lili⁴, DIAO Qingchun^{2*}

(1. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007,

China; 2. Department of Dermatology, Chongqing First People's Hospital, Chongqing 400010, China; 3. Department of Medical

Cosmetology, The Zhangzhou Zhengxing Hospital, Zhangzhou, Fujian 363000, China; 4. Nursing School, The Hunan University of

Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Salidroside on proliferation and expression of Caspase-3/9 protein in HaCat cells induced by ultraviolet B (UVB) radiation. **Methods** HaCat cells were divided into 6 groups: a normal control group (group I), a medium dose of Salidroside group (group II), a UVB radiation group (group III), a UVB+ low dose of Salidroside group (group IV), a UVB+ medium dose group (group V), a UVB+ high dose of Salidroside group (VI group). Group I was not treated. Group II was added with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Salidroside; Group III was irradiated with ultraviolet radiation at 200 mJ/cm^2 ; Group IV, Group V, Group VI were added with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Salidroside respectively and irradiated with 200 mJ/cm^2 doses of ultraviolet. After 24 hours of HaCat culture, cell viability was detected by MTT assay, and cell cycle was observed by flow cytometry. The protein levels of Caspase-3 and Caspase-9 were detected by western blotting. **Results** The results of MTT

[收稿日期]2018-06-15

[基金项目]湖南省中医药科研计划重点项目(201518);重庆市人社局博士后特别资助基金项目(Xm2015087);湖南省“十二五”重点学科开放基金项目(ZXLCXK201508)。

[作者简介]刘朝圣,男,博士,副教授,研究方向:中医皮肤科临床与实验研究。

[通讯作者]*刁庆春,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:qchdiao@vip.sina.com。

showed that the survival rate of HaCat cells was increased with the increase of Salidroside concentration. Flow cytometry suggested the S peak of HaCat cells increased with the increasing concentration of Salidroside. The S peak of group VI was higher than that of Group II. Western blotting revealed that the protein expression of Caspase-3/9 decreased in the Salidroside group with high concentration. **Conclusion** Salidroside can reduce HaCat cell apoptosis induced by UVB through inhibiting the expression of Caspase-3 and Caspase-9 protein.

[**Keywords**] Salidroside; ultraviolet B; cell proliferation; Caspase-3; Caspase-9

多数天然产物含有抑制细胞凋亡作用的成分,红景天作为一种常用的高原中药材,其主要有效成分包括红景天苷、酪醇及红景天多糖等,其中红景天苷是从大株红景天的干燥根及根茎或干燥全草中提取的主要有效成分,现代药理学研究证实,红景天在皮肤科的应用中具有抗衰老^[1]、防光老化^[2]、抗菌^[3]、抗辐射等多种活性作用,且副作用较小^[4]。本文研究了不同浓度红景天苷对中波紫外线(ultraviolet B, UVB)辐射 HaCat 细胞的增殖活性及对内源性凋亡途径中的凋亡因子 Caspase-3、Caspase-9 蛋白水平的影响,探讨其抗辐射机制,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 DMEM 培养基(Gibco 公司),二甲基亚砜(Sigma 公司),MTT 溶液(Amresco 公司),碘化乙锭(PI)染液、RNA 酶、胎牛血清(均来自永捷实验室),青霉素、链霉素、0.25%胰蛋白酶、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒(均来自碧云天生物技术研究),兔抗人 Caspase-3 一抗、兔抗人 Caspase-9 一抗、鼠抗人 β -actin 一抗(均来自 Abcam 公司),HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗鼠 IgG 二抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(均来自 Sant Cruz 公司),ECL 发光试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)。人类永生化角质形成细胞株(HaCat 细胞)由重庆市第一人民医院皮肤科实验室保存并提供;红景天苷(每支 20 mg,批号:H-040-141103)购自中国四川成都瑞芬思生物科技有限公司,实验中用灭菌蒸馏水按所需浓度溶解配制。

1.1.2 主要仪器 311 窄谱 UVB 治疗仪(深圳半岛医有限公司),DNM-9602G 酶标仪分析仪(北京普朗公司),流式细胞仪(美国 Bio-Rad 公司),Model Universal Hood II 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),电泳仪、电转槽、摇床(上海一恒)等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HaCat 细胞采用细胞生长液(高糖 DMEM、10%FBS、青霉素 100 U/mL 以及链霉素 100 μ g/mL),于 5% CO₂、37 °C 细胞孵育箱中孵育。培养过程中,维持细胞密度在 70%~90% 的状态,依细胞生长状态 3~4 d 传代 1 次。经过 2 次传代后,择其生长旺盛、状态良好的细胞进行分组实验。

1.2.2 细胞分组及处理 调整 HaCat 细胞悬液浓度为 $(8\sim 10)\times 10^4$ /mL,每孔 1 mL 接种在 6 孔板中,90% 融合后进行药物干预处理及紫外线照射。分成 6 个组进行实验。正常对照组(下称 I 组):普通培养基培养,不进行紫外线照射;红景天苷中剂量组(40 μ g/mL,下称 II 组)无紫外线照射;UVB 辐射组(下称 III 组):无任何试剂,紫外线照射;UVB+红景天苷低剂量组(10 μ g/mL,下称 IV 组)进行紫外线照射;UVB+红景天苷中剂量组(40 μ g/mL,下称 V 组)进行紫外线照射;UVB+红景天苷高剂量组(80 μ g/mL,下称 VI 组)进行紫外线照射。

紫外线照射方法:将培养细胞置于距离紫外光源垂直距离为 2 cm 的地方(每孔加入 2 mL PBS),照射功率为 200 mJ/cm²,照射时间为 30 s。UVB 照射后再常规培养 24 h,取培养细胞进行相关指标检测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 四唑盐(MTT)比色法检测各组细胞生存率 将细胞以 1×10^4 /mL 接种到 96 孔板中,每孔 100 μ L,待细胞贴壁后,去除原培养液,进行实验分组并增设空白组,每组 3 个复孔。96 孔板中细胞经 UVB 辐射后 24 h,各孔中加入 5 mg/mL MTT 10 μ L 至 MTT 的终浓度为 0.5 mg/mL,孵育箱中培养 4 h,弃上清,每孔加入 100 μ L 二甲基亚砜(DMSO)进行溶解,室温下摇床震荡 5 min,使甲瓚结晶完全溶解,用自动酶标仪测定 490 nm 处吸光度 A 值,计算存活率。每组取各复孔的平均值,以空白组吸光度值调零。实验重

复3次。

存活率=(A 值_{处理组}-A 值_{阴性对照组})/(A 值_{阳性对照组}-A 值_{阴性对照组}) \times 100%

1.3.2 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期 收集各组实验细胞,PBS清洗2次。用提前预冷的75%乙醇4℃过夜固定细胞,离心(3 000 r/min,5 min),弃上清,PBS清洗2次,并离心(3 000 r/min,5 min)弃上清,每个样本加入80 μ L的50 μ g/mL RNA酶,37℃孵育30 min后,加入100 μ L的50 μ g/mL的碘化乙锭(PI)染液,混匀,室温避光孵育10 min后,液体经100 μ m滤网膜过滤后上机检测细胞周期,经仪器自带软件处理直接得出细胞增殖活性。

1.3.3 Western Blotting方法测定Casepase-3/9蛋白表达 使用PIPA细胞裂后按产品试剂盒说明用BCA法检测蛋白浓度,取等量的蛋白样品(40 μ g)经10% SDS-PAGE分离胶和80 V恒压电泳分离后,转印至PVDF膜上,5%脱脂奶粉加PBST配置成封闭液室温封闭2 h,加入鼠抗人 β -actin一抗按1:5 000 BSA稀释,兔抗人Caspase3/9一抗按1:1 000 BSA稀释,4℃摇床摇动孵育封闭过夜;TBST(H₂O+TBS+Tween20)洗涤3次(每次10 min)后,加入1:2 000稀释的HRP标记羊抗鼠或羊抗兔二抗,在室温下孵育1 h,TBST再次洗膜3次(每次10 min),小心吸净洗膜液后加入ECL发光底物,关闭电源,在凝胶成像系统中成像、摄图。重复3次。应用Quantity One软件对红景天苷蛋白的相对表达量进行分析,测定图片上每个特异条带的灰度值,用目的蛋白的灰度值/内参 β -Actin的灰度值,所得结果为目的蛋白相对含量。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,定量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组数据比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);以 $P<0.05$ 差异具有统计学意义, $P<0.01$ 差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 MTT法检测细胞的生存率

如表1所示:与I组比较,UVB照射对HaCat细胞的存活率有统计学意义($P<0.05$),相同剂量的UVB照射条件下随着红景天苷的浓度增加HaCat细

胞的OD值呈逐渐上升趋势,10、40、80 μ g/mL红景天苷组的生存率分别为(75.37 \pm 13.45)%、(80.87 \pm 11.12)%、(84.65 \pm 9.22)%,与II组、III组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表1 红景天苷对UVB诱导的细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	OD值	生存率/%
I组	3	0.51 \pm 0.18	99.36 \pm 0.39
II组	3	0.46 \pm 0.11	91.04 \pm 12.34
III组	3	0.03 \pm 0.01*	63.75 \pm 10.91*
IV组	3	0.37 \pm 0.10 [#] Δ	75.37 \pm 13.45 [#] Δ
V组	3	0.41 \pm 0.02 [#] Δ	80.87 \pm 11.12 [#] Δ
VI组	3	0.44 \pm 0.02 [#] Δ	84.65 \pm 9.22 [#] Δ

注:与I组比较,* $P<0.05$;与II组比较,# $P<0.05$;与III组比较, $\Delta P<0.05$

2.2 流式细胞仪检测细胞周期比较增殖活性

利用PI染色法结合流式细胞仪观察对HaCat细胞周期的影响,根据ModFit软件分析得到实验数据,如图1、表2所示:在G0/G1期,与I组比较,III组的细胞含量(56.68 \pm 0.011)%为最高,差异有统计学意义($P<0.05$);与II组比较,IV、V、VI组差异有统计学意义($P<0.05$),且随着红景天苷的浓度增加,IV、V、VI组的细胞分裂数量逐渐下降;与III组相比较,IV、V、VI组差异有统计学意义($P<0.05$),且在相同条件下UVB照射后,随着红景天苷的浓度增加,IV、V、VI组细胞的活跃度呈上升趋势。在S期,I组细胞活性明显高于III组,差异有统计学意义($P<0.05$);与III组比较,在相同条件下UVB照射后,IV、V、VI组细胞活性明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),且随着红景天苷的浓度增加细胞的活跃度呈上升趋势,VI组HaCat细胞活性值最高。在G2/M期,与III组比较,IV、V、VI组的凋亡细胞数量呈现逐渐下降趋势,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表2 各实验组对HaCat细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$,n=4,t/h)

组别	G0/G1期	S期	G2/M期
I组	45.33 \pm 0.016	60.26 \pm 0.045	0.01 \pm 0.000
II组	43.55 \pm 0.009	50.47 \pm 0.040	3.81 \pm 0.001
III组	56.68 \pm 0.011*	35.68 \pm 0.021*	17.73 \pm 0.002*
IV组	44.39 \pm 0.020 [#] Δ	39.84 \pm 0.013 [#] Δ	1.95 \pm 0.002 [#] Δ
V组	43.89 \pm 0.010 [#] Δ	49.8 \pm 0.023 [#] Δ	1.19 \pm 0.001 [#] Δ
VI组	42.53 \pm 0.008 [#] Δ	54.35 \pm 0.020 [#] Δ	0.5 \pm 0.001 [#] Δ

注:与I组比较,* $P<0.05$;与II组比较,# $P<0.05$;与III组比较, $\Delta P<0.05$

2.3 Western Blotting方法测定Casepase-3、Casepase-9蛋白表达

从Caspase-3、Casepase-9的蛋白表达来看,与

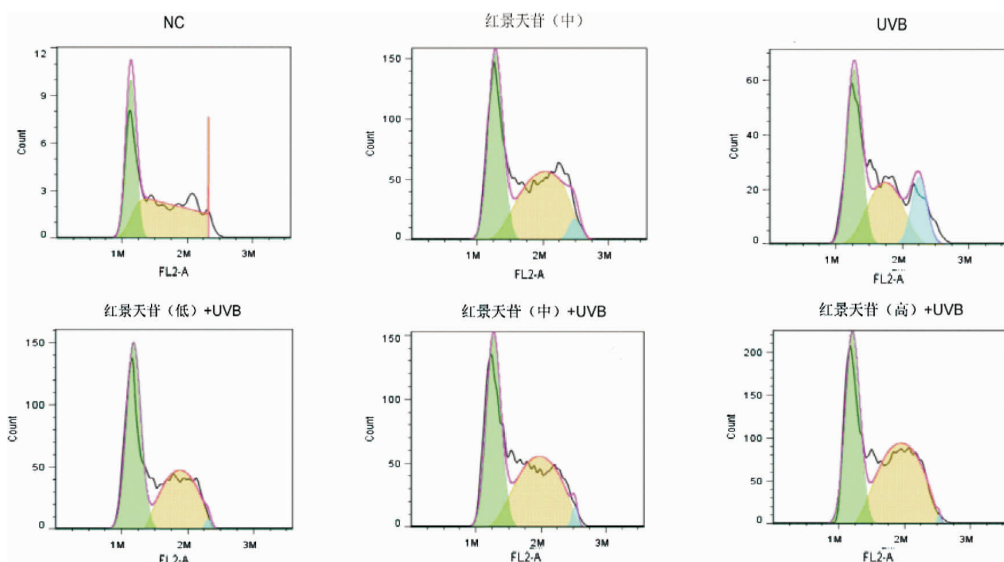
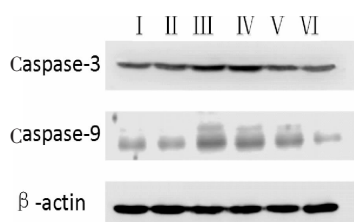


图 1 细胞周期检测结果图

I 组比较, III 组的表达量均明显高于 I 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 II 组比较, IV、V、VI 组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 各实验组 Caspase-3、Caspase-9 随着红景天苷浓度的增加, 蛋白表达量逐渐下降, 尤以高浓度红景天苷组 (VI 组) 下降最为明显, 与 III 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明低浓度 ($10 \mu\text{g/mL}$) 的红景天苷对 HaCat 细胞的保护作用最差, 而高浓度的红景天苷组对 HaCat 细胞有一定的抑制凋亡的作用。见图 2、表 3。



注: I. 空白对照组; II. 红景天苷中剂量组; III. UVB 辐射组; IV. UVB+红景天苷低剂量组; V. UVB+红景天苷中剂量组; VI. UVB+红景天苷高剂量组

图 2 Caspase3/9 蛋白凋亡相关蛋白电泳条带

表 3 不同组别凋亡相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase-3/Beta-Actin	Caspase-9/Beta-Actin
I 组	3	0.21±0.001	0.16±0.001
II 组	3	0.33±0.001	0.26±0.001
III 组	3	0.67±0.001*	0.26±0.001*
IV 组	3	0.74±0.002 ^{#Δ}	0.42±0.013 ^{#Δ}
V 组	3	0.41±0.011 ^{#Δ}	0.34±0.001 ^{#Δ}
VI 组	3	0.29±0.001 ^{#Δ}	0.18±0.003 ^{#Δ}

注: 与 I 组比较, * $P < 0.05$; 与 II 组比较, # $P < 0.05$; 与 III 组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

日常生活中的 UVB 照射可诱使皮肤出现光老化、免疫抑制改变及发生皮肤癌变等。这些变化与 UVB 照射后细胞内产生数量较多的氧自由基 (reactive oxygen specie, ROS) 有关, 它可以引起皮肤表皮及真皮细胞内的 DNA 损伤, 从而导致皮肤癌的发生, 因此如何防护其损伤显得尤为重要。从天然植物和传统药物中开发新型抗辐射药具有高效和低毒副作用等优点。

红景天是景天科红景天属多年生草本或亚灌木植物, 《四部医典》中记载它具有扶正固本, 理气养血, 滋补强身之功效, 藏族人民称之为“雪域仙草”。红景天多生长在海拔 4 000 多米的雪域高原上, 其高原地属紫外线辐射强烈地带, 故在雪域高原上生长的植物大部分都具有抗紫外线的特性。近几十年来, 国内已经研发含有红景天成份的各类护肤产品, 但其美白、抗氧化、防辐射等作用机制研究仍不够明确, 因此值得大家深入研究。

Caspase 家族属于介导细胞凋亡的一大类调节基因, 是细胞凋亡的启动和执行者, 是凋亡信号传导的共同通路。其中 Caspase-9 位于 Caspase 级联反应的最上游, 能在其它细胞因子的参与下发生自我活化并激活下游执行型 Caspase, 如 Caspase-3, 后者可特异性地裂解底物使细胞发生生化及形态学改变, 最终导致细胞凋亡^[5-7]。有相关药理学研究表明红景

天苷可通过调节 Bax/Bcl-xl 通路^[8]、纹状体中 DA、DOPAC 和 HVA 的水平^[9],或者抑制慢性缺氧诱导的 PSMCs 增殖^[10]、增加 Bax/Bcl-2 比例^[11],或者抑制 Caspase-3、Caspase-8、caspase-9 活化等多种不同路径,从而诱导细胞进行凋亡^[12]。有研究证明红景天苷可发挥抗多系统细胞氧化及细胞衰老的作用^[13],抗炎抗肿瘤,保护血管等^[14-17]。本实验在临床观察基础上,从细胞凋亡角度探讨红景天抗辐射作理机制。

本实验结果表明,不同浓度的红景天苷的均能提高 HaCat 细胞存活率,增加细胞分裂活性,且呈浓度依赖性趋势。在相对蛋白表达中,细胞因子 Caspase-3、Caspase-9 中 UVB 组(Ⅲ组)蛋白含量明显高于其他各实验组,而不同浓度的红景天苷组 Caspase-3、Caspase-9 相对蛋白表达均下调,尤以高浓度的下降最明显,结果与张伟等^[18]、史飞等^[19]、饶燕等^[20]相关研究报道基本一致。这表明红景天抗紫外线辐射的作用机制可能是通过下调凋亡级联因子从而减少细胞的凋亡水平而实现,本研究为红景天在临床应用和产品研发提供了一定实验依据。

参考文献

- [1] 叶刚,杨锐,杨怀铭.云南红景天对衰老模型大鼠的抗衰老作用[J].中国老年学,2014,34(14):3960-3962.
- [2] 袁小英,马慧敏,邵丽芳.红景天苷对紫外线照射损伤 HaCat 细胞 Nrf2 核转位的影响[J].空军医学杂志,2014,30(2):90-92.
- [3] 马慧敏,赵琦,刘玮.UVB 对成纤维细胞中 IFI16 表达的影响[J].中国麻风皮肤病杂志,2018,34(1):25-28.
- [4] 杨卓,龙旭,兰泽伦.圣地红景天研究进展[J].现代临床医学,2011,37(4):243-244.
- [5] CHO B B, TOLEDO-PEREYRA L H. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke [J]. Journal of Investigative Surgery,2008,21(3):141-147.
- [6] JENS M W, HANS J S. A microscopic technique to study kinetics and concentration response of drug-induced Caspase-3 activation on a single cell level[J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,2008,57(2):131-137.
- [7] 周舟,王小华,朱光旭,等.Caspase-3、-9 表达上调参与缺氧诱导心肌细胞凋亡[J].第三军医大学学报,2005,27(3):185-188.
- [8] LAI W, ZHENG Z, ZHANG X, et al. Salidroside-mediated neuroprotection is associated with induction of early growth response genes (Egrs) across a wide therapeutic window[J]. Neurotoxicity Research, 2015,28(2):1-14.
- [9] ZHANG W, HE H, SONG H, et al. Neuroprotective effects of salidroside in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: involvement of the PI3K/Akt/GSK3 β pathway[J]. Parkinson's Disease,2016,2016(2):1-9.
- [10] CHEN M, CAI H, YU C, et al. Salidroside exerts protective effects against chronic hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension via AMPK α 1-dependent pathways [J]. American Journal of Translational Research,2016,8(1):12-27.
- [11] YAN Z Q, CHEN J, XING G X, et al. Salidroside prevents cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. Journal of International Medical Research,2015,43(3):402-411.
- [12] 赵敏,边芳,田卓华,等.甘草、红景天及黄芪粗提取物对 UVB 诱导小鼠皮肤慢性光损伤的保护作用[J].世界科技研究与发展,2015,37(3):295-299.
- [13] 李慧,孙乐栋.红景天苷抗衰老和抗氧化药理机制研究新进展[J].中国医药导报,2018,15(7):51-54,81.
- [14] 蒲位凌,李文华,白茹玉,等.红景天及其抗炎和抗肿瘤活性成分药理作用研究进展[J].天津中医药,2017,34(12):856-859.
- [15] 龚舒,甘淋.红景天苷药理作用的分子机制研究进展[J].现代医药卫生,2015,31(5):696-699.
- [16] 姜爱玲,张岩,JIANGAi-ling,等.红景天苷药理作用的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(10):1161-1164.
- [17] 张明发,沈雅琴.红景天苷的血管药理作用研究进展[J].药物评价研究,2017,40(5):717-724.
- [18] 张伟,赵俊杰,李涛,等.红景天苷对神经退行性疾病作用的研究进展[J].湖南中医药大学学报,2016,36(7):86-90.
- [19] 史飞,李铀,李建标,等.红景天苷对 UVA/UVB 辐射的成纤维细胞中 caspase-3 和 caspase-8 活性的影响[J].中国麻风皮肤病杂志,2011,27(12):832-834.
- [20] 饶燕,韩晓凤,陶春蓉.红景天苷对中波紫外线诱导 HaCat 细胞凋亡的影响[J].解剖学杂志,2018,41(1):9-12.

(本文编辑 杨 璞)