

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.004

补骨脂素对中波紫外线导致人皮肤 HaCaT 细胞光老化的保护作用*

李建民 杨 柳 王业秋 张 宁[△] 陈丽娟[△] 胡中花 徐艳明 李 娜 熊 辉

(黑龙江中医药大学 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的:研究补骨脂素对中波紫外线(UVB)导致人皮肤 HaCaT 细胞光老化的保护作用及其作用机制。**方法:**选择不同浓度的补骨脂素,MTT 法筛选药物的浓度;使用中波紫外线(UVB)照射永生化的 HaCaT 细胞建立 UVB 光老化模型;使用三种不同浓度的补骨脂素处理光老化模型,MTT 法检测细胞的增殖及氧化试剂盒检测细胞中氧化酶的活性。RT-PCR 及 Western Blot 分别检测 JNK 和白介素-8(IL-8) mRNA 及蛋白表达量。**结果:**与空白组相比,10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁵ mol/L 补骨脂素组对 HaCaT 具有无明显的增殖作用 (P>0.05);与模型组相比,10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁵ mol/L 补骨脂素组对 HaCaT 具有无明显的增殖作用 (P>0.05),但是 10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁵ mol/L 补骨脂素组 SOD、GSH、CAT 活性升高 (P<0.01),细胞 JNK、IL-8 mRNA 表达量均降低 (P<0.01),细胞 JNK、IL-8 蛋白表达量均降低 (P<0.05 或 P<0.01)。**结论:**补骨脂素能够显著的保护 HaCaT 细胞的光老化,其机制可能与增强抗氧化酶活性,及抑制 JNK 信号通路,减少炎症因子的分泌有关。

关键词:补骨脂素;UVB;角质形成细胞;光老化;JNK 信号通路

中图分类号:R285.5; Q345; Q63 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)02-214-06

Protective Role of Psoralen Grain of on Light Aging of Human Skin HaCaT Induced by UVB*

LI Jian-min, YANG Liu, WANG Ye-qiu, ZHANG Ning[△], CHEN Li-juan[△], HU Zhong-hua, XU Yan-ming, LI Na, XIONG Hui
(Heilongjiang university of Chinese medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China)

ABSTRACT Objective: To study the protective role of psoralen grain on light aging of human skin HaCaT cells induced by UVB rays (UVB) and its underlying mechanism. **Methods:** The different concentrations of psoralen were selected and the suitable concentration of the drugs was screened by MTT method. Using UVB rays (UVB) radiation, immortalized HaCaT cells UVB light aging model was established, and then treated with three different concentrations of psoralen processing. The cell activity was determined by MTT method and oxidase activity in the cell was detected by kits, and the expression of JNK and interleukin 8 (IL-8) mRNA and protein was respectively detected by RT-PCR and Western Blot. **Results:** Compared with blank group, 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁵ mol/L psoralen grain hadn't obvious effect on the proliferation of HaCaT cells (P>0.05); compared with UVB model group, the cell proliferation in psoralen group had no significant change (P>0.05), but after treatment with 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁵ mol/L psoralen, the activity of SOD and GSH and CAT was increased (P<0.05), and the expression of JNK and IL-8 mRNA was decreased (P<0.01), and the expression of JNK and IL-8 protein was also decreased (P<0.05 or P<0.01). **Conclusions:** The psoralen grain can significantly protect HaCaT cells light aging, and its mechanism may be related with increasing the antioxidase activity, inhibiting JNK signaling pathways, and reducing the secretion of inflammatory cytokines.

Key words: Psoralen; UVB rays; HaCaT; Light aging; JNK signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R285.5; Q345; Q63 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-214-06

前言

角质形成细胞位于皮肤的表皮,分布于表皮的 80 %以上,其作用具有保护人体免受外界物理、化学以及微生物的破坏^[1-3]。近几年有关皮肤光老化的研究越来越受人们的重视,光老化主要是由于紫外线照射皮肤,导致皮肤损伤。光老化主要表

现为皮肤粗糙、皱缩、无光泽等^[4]。根据波长的不同紫外线可分为长波(UVA)、中波(UVB)、短波(UVC)三种^[5],根据相关的文献^[6]报道,中波紫外线引起皮肤的光老化。敏感的表皮角质形成细胞经中波紫外线照射后,分泌一系列的炎症因子,引起皮肤的光老化^[7]。

补骨脂是豆科植物补骨脂的干燥成熟果实,具有补肾壮

* 基金项目:黑龙江省应用技术与开发计划项目(PC13S15);黑龙江中医药大学科研基金项目(201309);国家自然科学基金面上项目(81274035);黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q13162);黑龙江省自然科学基金项目(D201231)

作者简介:李建民,硕士,主任医师,主要从事中药药效物质基础研究,电话:13212980606, E-mail: ljm_1030@126.com

△ 通讯作者:张宁,博士,教授,主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究, E-mail: 929489968@qq.com;

陈丽娟,硕士,教授,主要从事中医药美容研究, E-mail: chljjx@163.com

(收稿日期:2016-06-21 接受日期:2016-07-16)

阳、固精缩尿、温脾止泻、纳气平喘的功效^[89]。补骨脂主要含有香豆素类,其主要成分是补骨脂素,其具有光敏化、止血、镇静及解痉的作用^[90],对肿瘤细胞具有明显的抑制作用^[11,12],还对氧化损伤,炎症因子的分泌有明显的抑制作用^[13]。主要用于治疗牛皮癣,斑秃及白癜风等皮肤性的疾病。根据相关的研究报道,MAPK 信号通路炎症因子的分泌有关联^[14]。本实验采用 UVB 照射建立 HaCaT 细胞光老化模型,选择中药植物补骨脂素作用于 HaCaT 细胞,检测细胞内 SOD、GSH、CAT 的活性,以及细胞内的 JNK 及 IL-8 mRNA 及蛋白表达量,探讨补骨脂素对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化的保护作用机制,为临床应用中药植物预防和治疗光老化提供实验依据。

1 实验内容

1.1 实验材料

人皮肤角质形成细胞 HaCaT (中乔新舟),胎牛血清 FBS (Hyclone 公司,批号:NYB0614);DMEM 培养液 (Hyclone 公司,批号:NZM1301);双抗 (Hyclone 公司,批号:20111230);磷酸盐缓冲液 PBS (北京中山金桥有限公司,批号:20150509);胰蛋白酶 (Billab 公司,批号:J120028);四甲基噻唑蓝 MTT (Sigma 公司,批号:021005);二甲基亚砜 DMSO (天津市富宇精细化工有限公司,批号:20130716);SOD 试剂盒 (南京建成生物工程研究所,生产批号:20151215);GSH 试剂盒 (南京建成生物工程研究所,生产批号:20151214);CAT 试剂盒 (南京建成生物工程研究所,生产批号:20151214);第一链 cDNA 合成试剂盒 (北京天恩泽基因科技有限公司,生产批号:60906-10);目的基因及内参引物 (生工生物有限工程);SGExcel UltraSYBR Mixture (生工生物有限工程);RIPA 细胞裂解液及 PMSF 蛋白酶抑制剂 (碧云天生物技术研究所);小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (北京中杉金桥);兔抗人 JNK 多克隆抗体 (Santa);兔抗人 IL-8 多克隆抗体 (abcam);羊抗小鼠二抗 (博士德生物有限公司);羊抗兔二抗 (博士德生物有限公司);补骨脂素标准品 (成都曼思特,批号:MUST-15042110)。

1.2 实验仪器

生物洁净工作台 (BCM-1000A 型),购自苏州安泰空气技术有限公司;Olympus 倒置显微镜 (IX-71-21PH 型) 购自日本 Olympus 株式会社;二氧化碳培养箱 (HF90 型) 购自上海智城分析仪器有限公司;酶标仪 (MK3 型) 购自上海热电仪器有限公司;高速台式冷冻离心机 (TCL6G-C) 购自上海安亭科学仪器厂;PCR 自动扩增仪,购自德国 Biometra 公司;微量分光光度计 (Nano-100 型),购自杭州奥胜仪器有限公司;实时荧光定量 PCR 仪 (Mx3000P 型),购自安捷伦科技有限公司;DYY-10C 型电泳仪,购自北京六一仪器厂;SmartChemi500 型一体式微型化学发光成像仪,购自北京赛智创业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 补骨脂素浓度的筛选 本实验首先选定补骨脂素最大浓度为 1×10^{-3} mol/L,加入 DMEM 培养液逐渐 10 倍的稀释,配置成所需的浓度 1×10^{-4} mol/L、 1×10^{-5} mol/L、 1×10^{-6} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-10} mol/L、 1×10^{-11} mol/L,微孔滤膜滤过除菌。将生长密度达到 80 %~90 % 的细胞接种于 96 孔板,细胞分为空白组和不同浓度的给药组,培

养液培养细胞 24 h,给药组分别加入不同浓度的补骨脂素、空白组加入新的培养液继续培养 24 h,每孔加入 20 μ L MTT,4 h 后加入 150 μ L DMSO 于 37 $^{\circ}$ C 摇床上震荡 10 min 使结晶溶解,最后,使用酶标仪于波长为 492 nm 处检查细胞的活性。

细胞增殖率 = 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times$ 100 %。

1.3.2 补骨脂素处理光老化模型 (1)MTT 法检测补骨脂素处理光老化模型细胞活性的影响:同 2.1 操作方法,将细胞接种于 96 孔板中,参照文献^[15]进行分组:空白组、模型组、补骨脂素高 (1×10^{-5} mol/L)、中 (1×10^{-6} mol/L)、低 (1×10^{-7} mol/L) 三个浓度组。空白组:DMEM 培养液培养细胞 24 h,弃去培养液,加入 200 μ L 的 PBS,然后使用铝箔纸覆盖空白组,照射完成后,将铝箔纸和 PBS 弃去,加入培养液继续培养 24 h。模型组:DMEM 培养液培养细胞 24 h,弃去每孔培养液,每孔加入 200 μ L 的 PBS,经预实验确定,UVB 照射时间为 5 min,照射后弃去 PBS,加入培养液继续培养 24 h。高、中、低三个浓度组:参考 1.3.1 方法,分别加入高、中、低补骨脂素培养 24 h,弃去补骨脂素,每孔加入 200 μ L 的 PBS,UVB 照射 5 min,照射后弃去 PBS,加入培养液继续培养 24 h。每组每孔加入 20 μ L MTT,4 h 后加入 150 μ L DMSO 于 37 $^{\circ}$ C 摇床上震荡 10 min 使结晶溶解,最后,使用酶标仪于波长 492 nm 处检查细胞的活性。

(2)氧化试剂盒检测各组细胞中 SOD、GSH、CAT 活性:将细胞培养 2 天,待细胞密度达到 80 %~90 % 时,收集六孔板中的各组细胞,用冷的 PBS 清洗 2~3 次,使用细胞裂解液 (RIPA) 及蛋白酶抑制剂 PMSF,按照每孔 100 μ L 加入细胞裂解液,置于冰上孵育 30 min,4 $^{\circ}$ C,12000 $\times$ g 离心 15 min,吸取各组上清液放于新的 1.5 mL 的 EP 管中,最后严格按照 SOD、GSH 及 CAT 试剂盒操作说明检测各组细胞中的 SOD、GSH 及 CAT 活性。

1.3.3 RT-PCR 法检测细胞 JNK 及 IL-8 mRNA 的表达 将细胞培养 2 天,待细胞密度达到 80 %~90 % 时,收集六孔板中各组细胞,分别使用 Trizol 提取总的 RNA,Nano-100 分光光度计检测各组 RNA 的浓度,根据逆转录体系需要 RNA 1000 ng,计算出各所需的体积数。然后根据 cDNA 逆转录试剂盒操作说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板链,选择 β -action 为内参,20 μ L 反应体系:2 $\times$ SYBR Mixture 10 μ L,上游引物和下游引物各 0.4 μ L,cDNA 0.8 μ L 分别加入八联管中等待检测,反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min,变性 95 $^{\circ}$ C 20 s,退火 / 延伸:60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环,将八联管分别放入实时定量 PCR 仪中进行检测。最后根据相对定量的计算方法: Δ Ct = 目的基因 Ct - 内参基因 Ct; $\Delta\Delta$ Ct = 实验组 Δ Ct - 对照组 Δ Ct;相对定量 = $2^{-\Delta\Delta$ Ct},求出各组的相对值。

1.3.4 Western Blot 检测细胞 JNK 及 IL-8 蛋白表达水平 收集六孔板各组培养 48 h 的细胞,分别使用蛋白裂解液 (PMSF 及 RIPA) 提取总蛋白,BCA 测各组蛋白浓度,计算出每孔上样量不少于 15 μ L,电泳 45 min,转膜 35 min,将蛋白转移到 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 (1:300) 孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日,TBST 洗 3 遍,二抗 (1:10000) 孵育 1 h,TBST 再洗 3 遍,加入发光液,使用发光成像仪拍摄,分析 JNK、IL-8 及 β -actin 蛋白条带的积分光密度 (IOD),最终以 JNK、IL-8 (IOD 值) 与 β -actin

表 1 PCR 引物序列信息

Table 1 PCR primers sequence information

Primer	Upstream primer sequences	Downstream primer sequences	Product length (bp)
β -actin	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	165
JNK	TGGACTTGGAGGAGAGAACC	CATTGACAGACGACGATGATG	118
IL-8	AGCTCTGTGTGAAGGTGCAGT	AATTTCTGTGTTGGCGCAGT	148

(IOD 值)的比值来表示 JNK、IL-8 蛋白表达水平。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 差异性具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 不同浓度补骨脂素对 HaCaT 细胞活性的影响

表 2 补骨脂素对 HaCaT 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Effect of psoralen on HaCaT proliferation($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Concentration/(mol/L)	OD value	Cell increment rate/%
Blank group	-	0.503 $\pm$ 0.016	100.00
Psoralen group	10^{-11}	0.529 $\pm$ 0.023*	105.17*
	10^{-10}	0.528 $\pm$ 0.021*	104.97*
	10^{-9}	0.528 $\pm$ 0.030*	104.97*
	10^{-8}	0.530 $\pm$ 0.020*	105.37*
	10^{-7}	0.505 $\pm$ 0.022	100.39
	10^{-6}	0.499 $\pm$ 0.021	99.20
	10^{-5}	0.500 $\pm$ 0.022	99.40
	10^{-4}	0.468 $\pm$ 0.014**	93.04**
	10^{-3}	0.229 $\pm$ 0.011**	45.53**

Note: compared with blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 补骨脂素处理光老化模型

2.2.1 MTT 法检测补骨脂素处理光老化模型细胞活性的影响

表 3 所示,与空白组相比,模型组对 HaCaT 无显著的增

如表 2 所示,与空白组相比,浓度为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} mol/L 的补骨脂素对 HaCaT 细胞具有显著性的增殖作用($P < 0.05$),而 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L 对 HaCaT 细胞具有极显著的毒副作用($P < 0.01$),浓度为 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 的补骨脂素对 HaCaT 细胞无显著的增殖作用($P > 0.05$),因此本实验选择 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 用于后续试验研究。

殖作用($P > 0.05$)。与模型组比较, 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 补骨脂素对光老化模型无显著性的增殖作用($P > 0.05$)。

表 3 补骨脂素对光老化模型细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Effect of psoralen on cell activity of rats in light aging model($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Irradiation time/(min)	Concentration/(mol/L)	OD value	Cell increment rate/%
Blank group	-	-	0.531 $\pm$ 0.047	100.00
UVB	5	-	0.509 $\pm$ 0.061	95.86
	5	10^{-7}	0.512 $\pm$ 0.012	96.42
	5	10^{-6}	0.523 $\pm$ 0.070	98.49
	5	10^{-5}	0.526 $\pm$ 0.068	99.06
	5	10^{-4}	0.468 $\pm$ 0.014**	93.04**

2.2.2 氧化试剂盒检测细胞中 SOD、GSH、CAT 活性 如表 4 所示,与空白组比较,模型组 SOD、GSH、CAT 活性显著性降低($P < 0.01$)。与模型组相比, 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 补骨脂素组 SOD、GSH、CAT 活性显著性升高($P < 0.01$),随着浓度增大, SOD、

GSH、CAT 活性逐渐升高。因此, 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 的补骨脂素对 HaCaT 细胞具有较好的保护作用,随着浓度增大保护作用逐渐增强。

表 4 各组细胞中 SOD、GSH、CAT 活性($\bar{x} \pm s$, n=3)
Table 4 Each cell in the activity of SOD, GSH and CAT($\bar{x} \pm s$, n=3)

Groups	Irradiation time/(min)	Concentration/(mol/L)	SOD activity/ (U/mgpro)	GSH activity/ (U/mgprot)	CAT activity/ (U/mgprot)
Blank group	-	-	58.84	42.52	5.70
UVB	5	-	35.37 ^{##}	27.21 ^{##}	3.36 ^{##}
	5	10 ⁻⁷	46.69**	31.06**	3.77**
Psoralen?group+UVB	5	10 ⁻⁶	49.56**	35.65**	4.59**
	5	10 ⁻⁵	50.12**	37.09**	4.92**

Note: compared with blank group, ^{##} P < 0.01; compared with UVB model group, ** P < 0.01.

2.3 检测各组细胞 JNK、IL-8 mRNA 表达水平

2.3.1 各组细胞 JNK、IL-8 mRNA 和β-actin 基因的扩增曲线和融解曲线
实时荧光定量 PCR 法扩增目的基因 JNK、IL-8,内参基因为 β-actin。对目的基因进行扩增、溶解曲线测定以明确

扩增产物的特异性。由图 1 所示 JNK、IL-8 和β-actin 基因都具有较好的扩增信号，而其融解曲线只有一个单一的峰，说明 PCR 扩增特异性良好。

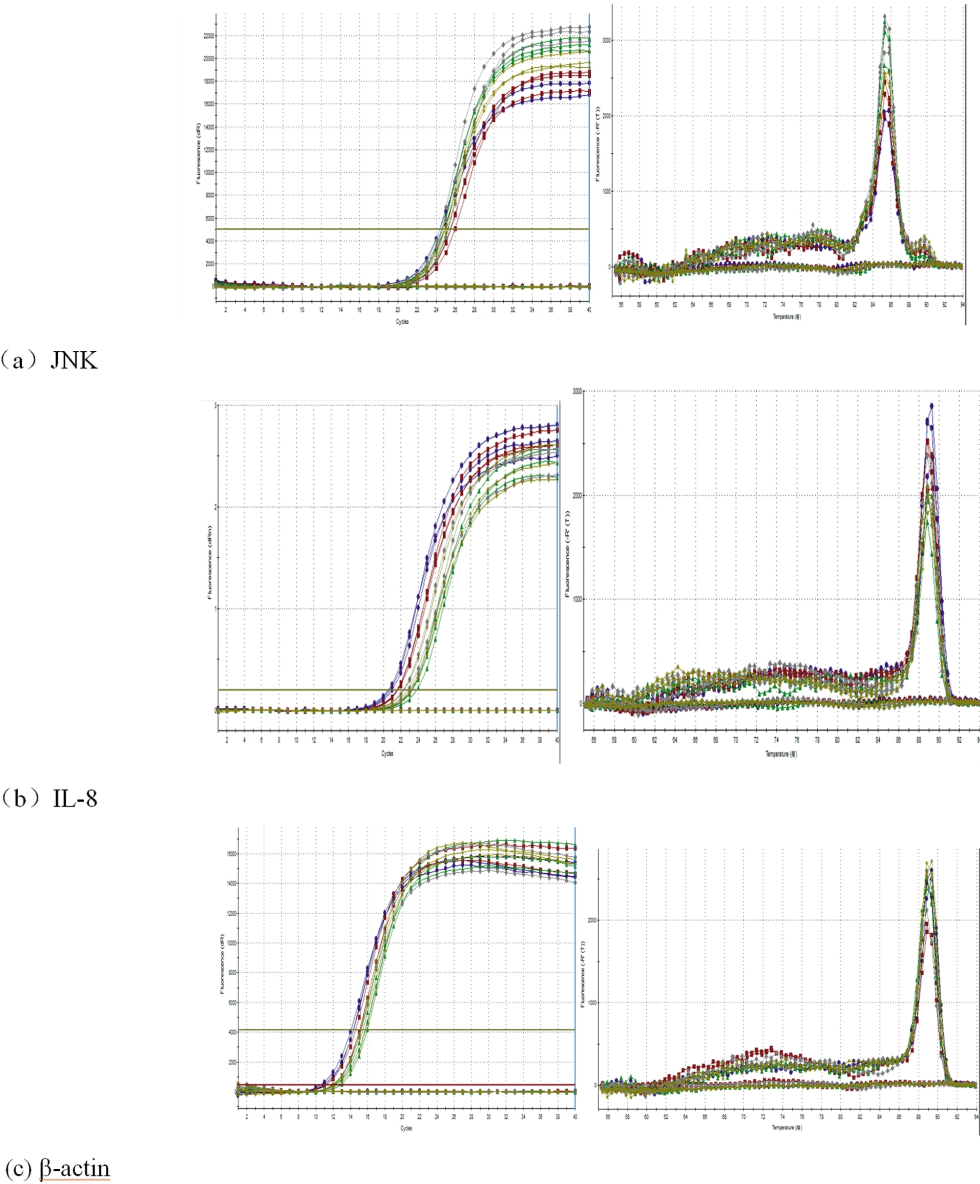


图 1 JNK、IL-8 mRNA 和β-actin 基因的扩增曲线和融解曲线

Fig.1 JNK, IL - 8 mRNA and beta actin gene amplification curve and melting curve

Note: a: JNK amplification curve and dissolve curve;B: IL - 8 amplification curve and dissolve curve;C: beta actin amplification curve and dissolve curve

表 5 各组细胞 JNK、IL-8 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Each cell JNK, IL - 8 mRNA expression level($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	Irradiation time/(min)	Concentration/(mol/L)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ value	
			JNK	IL-8
Blank group	-	-	1.000 $\pm$ 0	1.000 $\pm$ 0
UVB	-	-	2.621 $\pm$ 0.084 ^{##}	4.595 $\pm$ 0.071 ^{##}
Psoralen group+UVB	5	10 ⁻⁷	2.056 $\pm$ 0.056 ^{**}	3.160 $\pm$ 0.054 ^{**}
		10 ⁻⁶	1.972 $\pm$ 0.098 ^{**}	2.028 $\pm$ 0.035 ^{**}
		10 ⁻⁵	1.693 $\pm$ 0.073 ^{**}	1.613 $\pm$ 0.057 ^{**}

Note: compared with blank group, ^{##}P < 0.01; as compared with UVB model group, ^{**}P < 0.01.

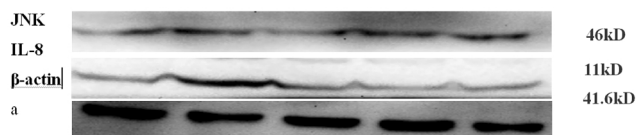


图 2 各组细胞 JNK、IL-8 蛋白表达水平
Fig.2 JNK, IL - 8 protein expression levels

Note: a: blank; b: UVB; c: UVB+10⁻⁷ mol·L⁻¹; d: UVB+10⁻⁶ mol·L⁻¹; e: UVB+10⁻⁵ mol·L⁻¹

2.3.2 检测各组细胞 JNK、IL-8 mRNA 表达水平 如表 5 所示,与空白组比较,模型组 JNK、IL-8 mRNA 的表达量显著升高(P<0.01)。与模型组相比,10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 补骨脂素 JNK、IL-8 mRNA 的表达量明显降低(P<0.01),且 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 补骨脂素 JNK、IL-8 mRNA 的表达量呈浓度依赖性,随着浓度的升高,JNK、IL-8 mRNA 的表达量降低越明显。因此,10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 的补骨脂素对 HaCaT 细胞具有显著的保护作用。

2.4 检测各组细胞 JNK、IL-8 蛋白表达水平

如表 6 所示,与空白组比较,模型组 JNK、IL-8 蛋白表达量显著升高(P<0.01)。与模型组相比,10⁻⁷ 补骨脂素组 JNK、IL-8 蛋白表达量显著降低(P<0.05),10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 补骨脂素组 JNK、IL-8 蛋白表达量显著降低(P<0.01),且 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 补骨脂素 JNK、IL-8 蛋白表达量呈浓度依赖性,随着浓度的升高,JNK、IL-8 蛋白表达量降低越明显。因此,10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 的补骨脂素对 HaCaT 细胞具有显著的保护作用。

3 讨论

近年来实验研究表明,光老化的发生机制可能与紫外线照

射诱导的氧化酶破坏及炎症因子的分泌密切相关。皮肤本身就含有一系列防止衰老的物质,如抗氧化酶(SOD、GSH、CAT)等,它们可以清除自由基。IL-8 是趋化性细胞因子,可以促进炎症细胞趋化和诱导细胞增殖^[16]。UVB 可以通过调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导的进程,加速光老化的进度。MAPK 是在研究细胞生长因子受体磷酸化产物时被人们所发现的^[17,18]。MAPK 是细胞增殖、分化、凋亡等各种细胞通路的交汇点以及共同的通路,当紫外线照射角质形成细胞时,通过细胞内各种信号的传导,最终交汇于 MAPK 激酶产生作用^[19,20]。丝裂原活化蛋白激酶家族包括 ERK、JNK、P38MAPK,其为一类丝/苏蛋白激酶。其中 JNK 路径与细胞因子激活和紫外线照射引起的细胞应激反应最为密切^[21]。

本实验结果显示,与空白组相比,UVB 照射组中 SOD、GSH 及 CAT 活性明显降低(P<0.01);与模型组相比,不同浓度补骨脂素组中 SOD、GSH 及 CAT 活性显著升高(P<0.01),并且随着浓度的升高,SOD、GSH 及 CAT 活性提高的越明显。分析原因可能是 UVB 照射 HaCaT 增加活性氧的产生,活性氧可以引发脂质过氧化反应,产生多种活泼的脂质自由基,破坏与衰老相关的酶^[22]。结果说明 UVB 照射后,抗氧化酶被破坏。与空白组相比,UVB 照射组中 JNK、IL-8 mRNA 及蛋白表达量明显升高(P<0.01);与模型组相比,不同浓度补骨脂素组中 JNK、IL-8 mRNA 及蛋白表达量明显降低(P<0.05 或 P<0.01),并且随着浓度的升高,JNK、IL-8 mRNA 及蛋白表达量降低越明显。可知,补骨脂素对 UVB 诱导光老化细胞中 JNK、IL-8 mRNA 及蛋白表达量具有明显降低作用,故认为补骨脂素可能通过阻止 JNK 信号通路,减少炎症因子的表达及分泌来保护角质细胞,对 UVB 诱导 HaCaT 光老化具有保护作用。

表 6 各组细胞 JNK、IL-8 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 The expressions of JNK and IL-8 protein($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	Irradiation time/(min)	Concentration/(mol/L)	JNK/ β -actin	IL-8/ β -actin
Blank group	-	-	0.401 $\pm$ 0.023	0.357 $\pm$ 0.034
UVB	5	-	0.559 $\pm$ 0.018 ^{##}	0.501 $\pm$ 0.019 ^{##}
Psoralen group+UVB	5	10 ⁻⁷	0.527 $\pm$ 0.053 [*]	0.469 $\pm$ 0.026 [*]
	5	10 ⁻⁶	0.466 $\pm$ 0.024 ^{**}	0.436 $\pm$ 0.023 ^{**}
	5	10 ⁻⁵	0.458 $\pm$ 0.020 ^{**}	0.423 $\pm$ 0.054 ^{**}

Note: compared with blank group, ^{##}P < 0.01; compared with UVB model group, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01.

综上所述,应用补骨脂素抑制 UVB 诱导 HaCaT 细胞抗氧化酶的破坏,抑制 JNK 信号通路,减少炎症因子的分泌,从而达到减轻紫外线引起皮肤光老化的目的。

参考文献(References)

- [1] 范饶千, 陈宏泉. 芍药苷对 UVB 诱导 HaCaT 细胞 P53 基因表达的影响[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2013, 29(5): 314-316
Fan Rao-qian, Chen Hong-quan. Paeoniflorin P53 gene expression of UVB induced HaCaT cells [J]. The influence of Chinese journal of leprosy dermatosis, 2013, 29(5): 314-316
- [2] 王小勇. UVB 辐射表皮角质形成细胞和 UVA 辐射真皮成纤维细胞在皮肤光老化中的作用机理研究[D]. 南京医科大学, 2006
Wang Xiao-yong. UVB radiation formed epidermis cutin cell and dermal fibroblasts in light skin aging UVA radiation mechanism of research[D]. Nanjing medical university, 2006
- [3] 李立, 白雪涛, 张宏伟, 等. 长波紫外线照射对细胞氧化损伤作用的研究[J]. 环境与健康杂志, 2010, 21(3): 203-205
Li Li, Bai Xue-tao, Zhang Hong-wei, et al. Wei Lan long-wave ultraviolet irradiation effect on cell oxidative damage research [J]. Environmental and Health Magazine, 2010, 21(3): 203-205
- [4] 陶冶. 绞股蓝总皂苷含药血清对光老化人皮肤角质细胞 p38MAPK 信号通路的影响[D]. 辽宁中医药大学, 2013
Tao Zhi. Pentaphyllum total saponins medicated serum light aging human skin keratinocytes p38MAPK signaling pathway [D]. The influence of liaoning university of traditional Chinese medicine, 2013
- [5] Myungsuk Kim, Young Gyun Park, Hee-Ju Lee. Youngiasides A and C Isolated from Youngia denticulatum Inhibit UVB-Induced MMP Expression and Promote Type I Procollagen Production via Repression of MAPK/AP-1/NF- κ B and Activation of AMPK/Nrf2 in HaCaT Cells and Human Dermal Fibroblasts [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(5): 5428-5438
- [6] 陈宏泉. Tempol 抗中波紫外线照射所致皮肤光老化的作用机制及影响因素的探讨[D]. 山东大学, 2008
Chen Hong-quan. Tempol medium-wave skin caused by ultraviolet irradiation light aging resistance of the mechanism and influencing factors of study[D]. Shandong university, 2008
- [7] 张秉新, 邢卫斌, 付国俊, 等. 富氢液通过自噬途径下调中波紫外线诱导的 HaCaT 细胞炎症因子的表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2016, 49(2): 123-127
Zhang Bing-xin, Xing Wei-bin, Fu Guo-jun, et al. Rich liquid hydrogen autophagy cut by uvb rays induced the expression of inflammatory markers in the HaCaT cells [J]. Chinese dermatologist magazine, 2016, 49(2): 123-127
- [8] 翟远坤, 潘亚磊, 牛银波, 等. 补骨脂素与异补骨脂素对乳鼠颅骨成骨细胞分化成熟影响的比较研究 (J). 中国药理学通报, 2012, 28(3): 355-361
Zhai Yuan-kun, Pan Ya-lei, Niu Yin-bo, et al. Scurfpea fruit element with different scurfpea fruit grain effects on the rats skull osteoblast differentiation of mature [J]. A comparative study of Chinese pharmacological bulletin, 2012, 28(3): 355-361
- [9] 刘自力, 施静. 补骨脂临床进展 [J]. 中国民族民间医药, 2009, (5): 101-102
Liu Zi-li, Shi Jing. Fructus psoraleae clinical research progress [J]. Journal of China national folk medicine, 2009, (5): 101-102
- [10] 白鸽, 曹学丽, 谭莉, 等. 补骨脂素和异补骨脂素的分离纯化研究 [J]. 北京工商大学学报, 2009, 27(5): 1-4
Bai Ge, Cao Xue-li, Tan Li, et al. Psoralen and the separation and purification of different psoralen research [J]. Journal of Beijing industry and commerce university, 2009, 27(5): 1-4
- [11] 余少蕾, 白莉, 蔡宇. 补骨脂素对肿瘤血管内皮细胞抑制作用的实验研究[J]. 数理医药学杂志, 2013, 26(4): 458-460
Yu Shao-lei, Bai Li, Cai Yu. Psoralen, the experimental study of inhibitory effect on tumor vascular endothelial cells [J]. Journal of mathematical medicine journal, 2013, 26(4): 458-460
- [12] 赵丕文, 牛建昭, 王继峰, 等. 异补骨脂素和蜕皮甾酮对人乳腺癌 T47D 细胞增殖及 ER 亚型表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(4): 242-245
Zhao Pi-wen, Niu Jian-zhao, Wang Ji-feng, et al. Different Psoralen and molting sterone on T47D breast cancer cell proliferation and expression of ER subtype [J]. Journal of Beijing university of Chinese medicine, 2007, 30(4): 242-245
- [13] 管宇航, 海舰. 补骨脂素对 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞损伤的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 342-347
Guan Yu-hang, Hai Jian. Psoralen grain of H₂O₂ induced PC - 12 cell injury protection [J]. Journal of modern medicine and clinical, 2016, 31(5): 342-347
- [14] 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK 信号通路研究进展 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(8): 32-34
Chen Jian-yong, Wang Cong, Wang Juan, et al. MAPK signaling pathway research progress [J]. Journal of Chinese medicine science, 2011, 1(8): 32-34
- [15] Chen Q Y, Wang YQ, Zhang N, et al. Investigation on anti-photoaging of Keratinocyte of Yupingfeng San [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(4): 847-849
- [16] 苗雪. 官杰. IL-8 的研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(22): 337-339
Miao Xue. Guan Jie. The research progress of IL-8 [J]. Journal of qiqihar medical college, 2011, 32(22): 337-339
- [17] Wang Y Q, Chen Q Y, Zhang N, et al. Protective effects of yuzhu on Haca cells damaged by ultraviolet B [J]. Chin J Aesthetic Med, 2012, 21(4): 599-601
- [18] 杨波. 中波紫外线辐射成纤维细胞致皮肤光老化, 反式玉米素的干预作用及机制研究 [D]. 南京医科大学, 2009
Yang Bo. UVB rays radiation fibroblasts skin photoaging, trans zeatin intervention effect and mechanism of research [D]. Nanjing Medical University, 2009
- [19] 徐倩倩, 陈旭, 李莉, 等. 中波紫外线对体外培养 HaCaT 细胞 MAPK 信号通路的影响 [J]. 中华皮肤科杂志, 2015, 48(6): 391-394
Xu Qian-qian, Chen Xu, Li Li, et al. UVB rays effect on MAPK signaling pathways in vitro cultivation of HaCaT cells [J]. Chinese dermatology journal, 2015, 13(6): 391-394
- [20] 张秀娟, 李亚伟, 王娟, 等. TATp38AF 融合肽的构建及其对紫外线诱导的 p38 MAPK 通路激活的抑制作用 [J]. 山东医药, 2010, 50(9): 19-21
Zhang Xiu-Juan, Li Ya-wei, Wang Juan, et al. The building TATp38AF fusion peptide and the UV induced p38 lightning MAPK pathways activated inhibitory effect [J]. Journal of shandong medicine, 2010, 50(9): 19-21

(下转第 294 页)

一种抗 MRSA 抗生素可用于手术预防^[7]。

此外,念珠菌纵膈炎所占比例目前已达 7.5%,尤其见于接受机械通气的患者^[18]。念珠菌纵膈炎死亡率高达 40%-60%,并且确诊困难^[19]。最近的流行病学研究显示念珠菌纵膈炎中白色念珠菌感染占大部分,但非白念比例较前有所增加^[19,20],这应引起我们的重视,尤其对于病原学难以明确的患者,应怀疑念珠菌感染的可能。

总之,DSWI 是心脏外科术后一种严重的并发症,目前已证实多种危险因素和病原体参与其发病过程,探讨 DSWI 患者危险因素与特定病原学之间的关系,可能会为将来制定 DSWI 的预防和治疗策略提供帮助,但这仍需进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Floros P, Sawhney R, Vrtik M, et al. Risk factors and management approach for deep sternal wound infection after cardiac surgery at a tertiary medical centre[J]. *Heart Lung Circ*, 2011, 20(11): 712-717
- [2] Kirmani BH, Mazhar K, Saleh HZ, et al. External validity of the Society of Thoracic Surgeons risk stratification tool for deep sternal wound infection after cardiac surgery in a UK population [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2013, 17(3): 479-484
- [3] Schimmer C, Sommer SP, Bensch M, et al. Management of poststernotomy mediastinitis: experience and results of different therapy modalities[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 56(4): 200-204
- [4] Keib CN, Pelham JC. Mediastinitis following coronary artery bypass graft surgery: pathogenesis, clinical presentation, risks, and management[J]. *Cardiovasc Nurs*, 2006, 21(6): 493-499
- [5] Sjogren J, Nilsson J, Gustafsson R, et al. The impact of vacuum-assisted closure on long-term survival after post-sternotomy mediastinitis[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80(4): 1270-1275
- [6] Singh K, Anderson E, Harper JG. Overview and management of sternal wound infection[J]. *Semin Plast Surg*, 2011, 25(1): 25-33
- [7] Chen LF, Arduino JM, Sheng S, et al. Epidemiology and outcome of major postoperative infections following cardiac surgery: risk factors and impact of pathogen type [J]. *Am J Infect Control*, 2012, 40(10): 963-968
- [8] Gårdlund B, Bitkover CY, Vaage J. Postoperative mediastinitis in cardiac surgery-microbiology and pathogenesis[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, 21(5): 825-830
- [9] Lepelletier D, Bourigault C, Roussel JC, et al. Epidemiology and prevention of surgical site infections after cardiac surgery [J]. *Med Mal Infect*, 2013, 43(10): 403-409
- [10] Charbonneau H, Maillet JM, Faron M, et al. Mediastinitis due to Gram-negative bacteria is associated with increased mortality[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(3): 197-202
- [11] Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, et al. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee[J]. *Am J Infect Control*, 1999, 27(2): 97-132
- [12] Mauermann WJ, Sampathkumar P, Thompson RL. Sternal wound infections[J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2008, 22(3): 423-436
- [13] Sá MP, Silva DO, Lima EN, et al. Postoperative mediastinitis in cardiovascular surgery postoperation. Analysis of 1038 consecutive surgeries[J]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2010, 25(1): 19-24
- [14] Sjogren J, Malmjö M, Gustafsson R, et al. Poststernotomy mediastinitis: a review of conventional surgical treatments, vacuum-assisted closure therapy and presentation of the Lund University Hospital mediastinitis algorithm [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 30(6): 898-905
- [15] Muñoz P, Menasalvas A, Bernaldo de Quirós JC, et al. Postsurgical mediastinitis: a case-control study [J]. *Clin Infect Dis*, 1997, 25(5): 1060-1064
- [16] Bor DH, Rose RM, Modlin JF, et al. Mediastinitis after cardiovascular surgery[J]. *Rev Infect Dis*, 1983, 5(5): 885-897
- [17] Reddy SL, Grayson AD, Smith G, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections following cardiac surgery: incidence, impact and identifying adverse outcome traits [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007, 32(1): 113-117
- [18] Modrau IS, Ejlersen T, Rasmussen BS. Emerging role of *Candida* in deep sternal wound infection [J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 88(6): 1905-1909
- [19] Massou S, Ahid S, Azendour H, et al. Systemic candidiasis in medical intensive care unit: analysis of risk factors and the contribution of colonization index[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2013, 61(3): 108-112
- [20] Jajoo M, Kumar V, Goyal VK, et al. *Candida tropicalis* infection in a term neonate with gall bladder masses and infective endocarditis[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 5(5): 410-412
- [21] 朱光旭, 王小华. JNK / SAPK 信号传递途径与细胞应激反应[J]. *国外医学分子生物学*, 2000, 22(6): 371-375
Zhu Guang-xu, Wang Xiao-hua. JNK/SAPK signal transmission and cellular stress response [J]. *Foreign medical molecular biology*, 2000, 22(6): 371-375
- [22] 李红光. 枸杞多糖在 UVB 辐射入角质形成细胞氧化损伤中的保护作用[D]. 山西医科大学, 2014
Li Hong-guang. LBP in the formation of UVB radiation HaCaT oxidative damage protection [D]. *journal of shan xi medical university*, 2014

(上接第 219 页)