

丹酚酸 A 对干扰素 γ 和 TRAIL 联合诱导的 HaCaT 细胞的影响及其机制

王 静¹, 邓庆华²

(1. 江苏医药职业学院药学院, 江苏 盐城 224005; 2. 重庆医药高等专科学校药学院, 重庆 401331)

摘要: **目的** 探讨丹酚酸 A 对干扰素 γ (IFN- γ) 和 TRAIL 联合诱导的人皮肤 HaCaT 细胞凋亡及炎症因子分泌的影响及其机制。**方法** 噻唑蓝 (MTT) 检测丹酚酸 A 处理后 HaCaT 细胞的活性, 以确定最佳给药浓度。IFN- γ 和 TRAIL 诱导 HaCaT 细胞损伤后, 以丹酚酸 A 干预, 或用丹酚酸 A 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路激活剂佛波酯处理。MTT、流式细胞术、ELISA 法、Western blot 法分别检测 HaCaT 细胞活性, 凋亡, 炎症因子 IL-6、IL-1 β 分泌, cleaved caspase-3、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达。**结果** 不同浓度丹酚酸 A 分别作用于人皮肤 HaCaT 细胞 24、48、72 h 时, 细胞活性呈先降后升再降的趋势, 以 10 μ mol/L 丹酚酸 A 作用效果最显著。IFN- γ 和 TRAIL 联合诱导的 HaCaT 细胞活性降低, 细胞凋亡率、IL-6 和 IL-1 β 水平及 cleaved caspase-3、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。丹酚酸 A 提高 IFN- γ 和 TRAIL 联合诱导的 HaCaT 细胞活性, 降低细胞凋亡率、IL-6 和 IL-1 β 水平及 cleaved caspase-3、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达 ($P<0.05$)。佛波酯可抑制丹酚酸 A 对 IFN- γ 和 TRAIL 联合损伤的 HaCaT 细胞活性的促进作用, 促进丹酚酸 A 对细胞凋亡、炎症因子分泌的抑制作用。**结论** 丹酚酸 A 通过调控 NF- κ B 信号通路活性来促进 IFN- γ 和 TRAIL 联合诱导的人皮肤 HaCaT 细胞增殖, 抑制其凋亡和炎症因子分泌。

关键词: 丹酚酸 A; 干扰素 γ ; TRAIL; HaCaT 细胞; NF- κ B 信号通路; 凋亡; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3480-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.043

特应性皮炎是一种多功能、异质性的慢性炎症性皮肤病, 因其遗传和化学过敏原等多种环境因素的复杂相互作用, 其临床表现各异^[1]。常用的治疗特应性皮炎的药物是抗炎皮质类固醇。然而, 这类类固醇的长期使用可引起皮肤萎缩和全身不良影响^[2]。因此, 需要开发副作用低的新天然候选物来治疗和缓解该病。丹酚酸 A 是从中药丹参中提取的一种具有生物活性的多酚化合物^[3]。研究表明, 丹酚酸 A 是一种具有多种药理活性的多靶点药物, 如抗氧化、抗炎症、抗纤维化、抗血小板剂和抗血栓^[4-6]。丹酚酸 A 抑制过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤^[7], 其对缺血再灌注急性期脑具有保护作用^[8]。核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路在多种炎症性皮肤病的发病机理中起关键作用^[9]。然而丹酚酸 A 在干扰素 γ (IFN- γ) 和 TRAIL 联合诱导的人皮肤 HaCaT 细胞损伤中的功能, 及其是否通过 NF- κ B 信号通路发挥作用目前仍不清楚。基于此, 本研究构建 IFN- γ 和 TRAIL 联合诱导的人皮肤 HaCaT 细胞损伤模型^[10-11], 考察了丹酚酸 A 对细胞增殖、凋亡和炎症因子分泌的影响, 并评估了丹酚酸 A 在 HaCaT 细胞损伤过程的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物与试剂 人皮肤 HaCaT 细胞购自美国典

型培养物保藏中心 (ATCC)。丹酚酸 A (纯度 $\geq 98\%$) 购自成都曼斯特生物公司。高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; IFN- γ 、TRAIL 购自美国 PeproTech 公司; 佛波酯购自美国 Sigma 公司; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (inter leukin-1 β , IL-1 β) 酶联免疫 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 eBioscience 公司; 异硫氰酸荧光素标记的膜联素 V/碘化丙啉 (Annexin V-FITC/PI) 细胞凋亡检测试剂盒、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, cleaved caspase-3)、I κ B α 、磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、NF- κ B p65 和磷酸化 NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65) 一抗购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养 HaCaT 细胞于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素高糖 DMEM 培养基中培养后, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、湿润环境中继续培养。

1.3 MTT 检测 HaCaT 细胞活性 收集对数生长期的 HaCaT 细胞接种于 96 孔板, 接种密度为 1×10^4 /孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 分别加入 2.5、5、10、20、40、80、

160 $\mu\text{mol/L}$ 丹酚酸 A^[8], 同时将不含丹酚酸 A 的细胞作为正常培养组, 继续培养 24、48、72 h。处理结束后, 加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL 反应 4 h, 然后加入 150 μL 二甲亚砜, 摇床振荡 10 min 溶解结晶, 酶标仪检测波长 490 nm 处光密度 (OD) 值。细胞存活率 = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.4 细胞处理与分组 MTT 筛选出最佳丹酚酸 A 给药浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 后, 将细胞 HaCaT 随机分为正常培养组 (正常培养的细胞 HaCaT)、IFN- γ + TRAIL 组 (50 $\mu\text{g/L}$ IFN- γ 和 4 $\mu\text{g/L}$ TRAIL 联合处理 HaCaT 细胞 48 h^[12])、IFN- γ + TRAIL + 丹酚酸 A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 (IFN- γ 、TRAIL、10 $\mu\text{mol/L}$ 丹酚酸 A 处理细胞 HaCaT)、IFN- γ + TRAIL + 丹酚酸 A + 佛波酯组 (IFN- γ 、TRAIL、10 $\mu\text{mol/L}$ 丹酚酸 A、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 佛波酯处理细胞 HaCaT)、IFN- γ + TRAIL + 丹酚酸 A + PBS 组 (IFN- γ 、TRAIL、10 $\mu\text{mol/L}$ 丹酚酸 A、PBS 处理细胞 HaCaT), 给药时先加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 丹酚酸 A 处理 2 h, 再进行 IFN- γ 、TRAIL 联合处理。处理结束后收集细胞, 按“1.3”项下方法检测 HaCaT 细胞的活性。

1.5 流式细胞术检测 HaCaT 细胞凋亡 按“1.4”项下方法收集 HaCaT 细胞, 调整密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 重悬于缓冲液, 依次加入 Annexin V-FITC、PI 各 5 μL 充分混合, 混匀后于室温避光反应, 15 min 后采用流式细胞仪检测 HaCaT 细胞凋亡。

1.6 ELISA 法检测 IL-6、IL-1 β 水平 按“1.4”项下方法收集 HaCaT 细胞, 严格按照相关 ELISA 试剂盒的步骤检测 IL-6、IL-1 β 水平。

1.7 Western blot 检测 cleaved caspase-3、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达 按“1.4”项下方法处理细胞后, 采用 RIPA 裂解液提取蛋白, 通过 BCA 试剂盒定量后取 30 μg 蛋白样品进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 加入 cleaved caspase-3、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、 β 肌动蛋白 (β -actin) 一抗 (1 : 1 000), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜孵育, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记二抗 (1 : 5 000) 孵育 2 h, 使用 ECL 增强发光液显色, 曝光, 以 β -actin 为内参蛋白, 采用 Image J 软件分析各蛋白条带。

1.8 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单

因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞存活率的影响 如表 1 所示, 与正常培养组比较, 不同浓度丹酚酸 A 分别作用于人皮肤 HaCaT 细胞 24、48、72 h, 细胞存活率呈先下降后升高再下降的趋势, 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 丹酚酸 A 效果最显著, 故后续选择该浓度进行实验。

表 1 丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 9)

组别	存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
正常培养组	101.82 $\pm$ 4.84	100.93 $\pm$ 4.75	101.43 $\pm$ 3.83
丹酚酸 A 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	100.16 $\pm$ 3.34	103.05 $\pm$ 5.82	98.78 $\pm$ 5.80
丹酚酸 A 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	105.41 $\pm$ 5.15	96.95 $\pm$ 5.59	96.85 $\pm$ 4.17
丹酚酸 A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	112.64 $\pm$ 4.52 [*]	110.66 $\pm$ 7.16 [*]	104.81 $\pm$ 7.34
丹酚酸 A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	102.51 $\pm$ 4.43	99.53 $\pm$ 6.53	95.45 $\pm$ 6.72
丹酚酸 A 40 $\mu\text{mol/L}$ 组	88.17 $\pm$ 6.80 [*]	82.13 $\pm$ 5.27 [*]	75.12 $\pm$ 5.79 [*]
丹酚酸 A 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	72.29 $\pm$ 4.35 [*]	68.34 $\pm$ 5.19 [*]	63.82 $\pm$ 4.23 [*]
丹酚酸 A 160 $\mu\text{mol/L}$ 组	62.78 $\pm$ 3.87 [*]	59.74 $\pm$ 4.65 [*]	59.24 $\pm$ 3.90 [*]

注: 与正常培养组比较, ^{*}*P* < 0.05。

2.2 丹酚酸 A 对 IFN- γ 、TRAIL 联合处理 HaCaT 细胞存活率的影响 如表 2 所示, 与正常培养组比较, IFN- γ + TRAIL 组 24、48、72 h 细胞存活率降低 (*P* < 0.05); 与 IFN- γ + TRAIL 组比较, IFN- γ + TRAIL + 丹酚酸 A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 24、48、72 h 细胞存活率升高 (*P* < 0.05)。

表 2 丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 9)

组别	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
正常培养组	101.52 $\pm$ 4.87	100.58 $\pm$ 3.85	101.68 $\pm$ 4.24
IFN- γ + TRAIL 组	72.27 $\pm$ 5.93 [*]	68.03 $\pm$ 4.26 [*]	69.46 $\pm$ 5.85 [*]
IFN- γ + TRAIL + 丹酚酸 A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	89.42 $\pm$ 5.67 [#]	85.73 $\pm$ 4.84 [#]	87.14 $\pm$ 4.37 [#]

注: 与正常培养组比较, ^{*}*P* < 0.05; 与 IFN- γ + TRAIL 组比较, [#]*P* < 0.05。

2.3 丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞凋亡和炎症因子分泌的影响 如图 1、表 3 所示, 与正常培养组比较, IFN- γ + TRAIL 组细胞凋亡率、cleaved caspase-3 蛋白表达、IL-6 和 IL-1 β 水平均升高 (*P* < 0.05); 与 IFN- γ + TRAIL 组比较, IFN- γ + TRAIL + 丹酚酸 A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 HaCaT 细胞凋亡率、cleaved caspase-3 蛋白表达、IL-6 和 IL-1 β 水平降低 (*P* < 0.05)。

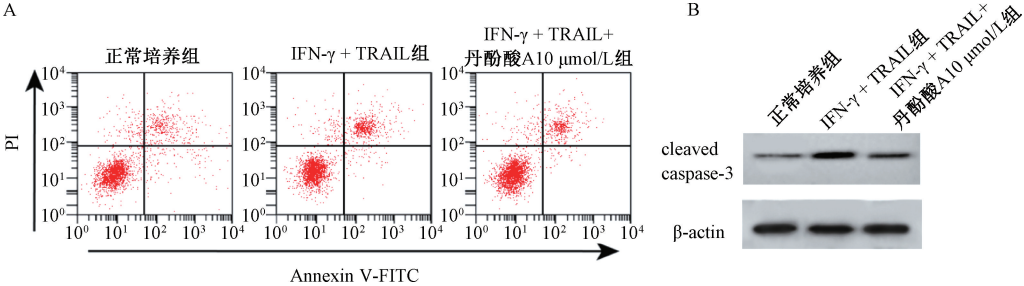


图 1 各组 HaCaT 细胞凋亡 (A)、cleaved caspase-3 蛋白表达 (B)

2.4 丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞 NF- κ B 信号通路的影响 如图 2、表 4 所示, 与正常培养组比较, IFN- γ + TRAIL 组 p-

I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达升高 (*P* < 0.05), I κ B α 、NF- κ B p65 蛋白表达无明显变化 (*P* > 0.05); 与 IFN- γ + TRAIL

表 3 丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞凋亡和炎症因子分泌的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)	cleaved caspase-3	细胞凋亡率/%
正常培养组	25.24±2.34	19.71±1.16	0.17±0.03	2.25±0.29
IFN-γ+TRAIL 组	168.86±22.67 [*]	86.65±9.58 [*]	0.62±0.07 [*]	10.35±1.58 [*]
IFN-γ+TRAIL+丹酚酸 A 10 μmol/L 组	67.45±5.94 [#]	38.53±2.88 [#]	0.35±0.05 [#]	5.36±0.87

注:与正常培养组比较,^{*} $P<0.05$;与 IFN-γ+TRAIL 组比较,[#] $P<0.05$ 。

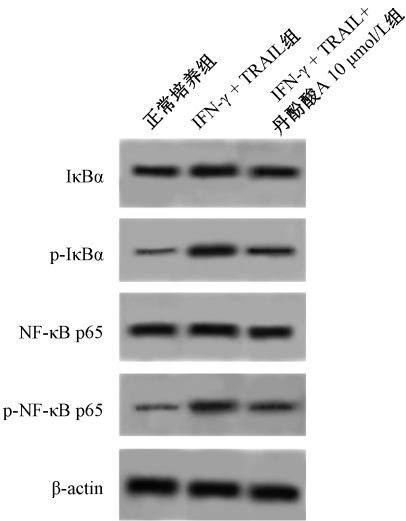


图 2 各组 HaCaT 细胞 IκBα、p-IκBα、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达

表 4 丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞 NF-κB 信号通路的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	IκBα	p-IκBα	NF-κB p65	p-NF-κB p65
正常培养组	0.56±0.08	0.16±0.03	0.64±0.08	0.22±0.03
IFN-γ+TRAIL 组	0.60±0.09	0.51±0.08 [*]	0.65±0.07	0.62±0.07 [*]
IFN-γ+TRAIL+丹酚酸 A 10 μmol/L 组	0.57±0.08	0.35±0.04 [#]	0.68±0.05	0.41±0.04 [#]

注:与正常培养组比较,^{*} $P<0.05$;与 IFN-γ+TRAIL 组比较,[#] $P<0.05$ 。

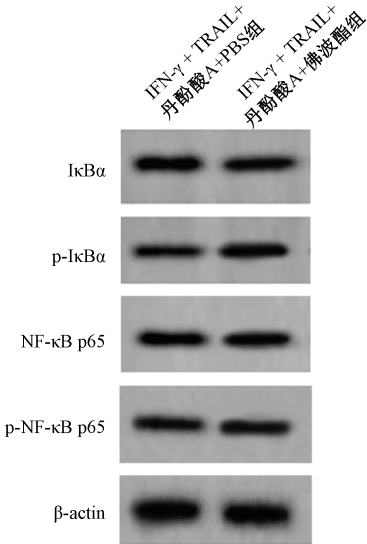


图 3 各组细胞 IκBα、p-IκBα、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达

3 讨论

表皮的主要功能是提供屏障,保护人体免受环境因素的影响。角质形成细胞是角蛋白产生的表皮细胞,约占表

组比较,IFN-γ+TRAIL+丹酚酸 A 10 μmol/L 组 p-IκBα、p-NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$), IκBα、NF-κB p65 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)。

2.5 佛波酯抑制丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞的保护作用 如图 3、表 5 所示,与 IFN-γ+TRAIL+丹酚酸 A+PBS 组比较,IFN-γ+TRAIL+丹酚酸 A+佛波酯组 24、48、72 h 细胞存活率降低 ($P<0.05$), IκBα、NF-κB p65 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$), p-IκBα 蛋白表达增加 ($P<0.05$)。

2.6 佛波酯促进丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞凋亡和抑制炎症因子分泌 图 4、表 6 显示,与 IFN-γ+TRAIL+丹酚酸 A+PBS 组比较,IFN-γ+TRAIL+丹酚酸 A+佛波酯组细胞凋亡率、cleaved caspase-3 蛋白表达及 IL-6、IL-1β 水平升高 ($P<0.05$)。

皮细胞的 90%^[13]。角质形成细胞除了维持皮肤的生化和物理状态,也参与各种炎症性皮肤病的发展,其释放炎症介质,例如促炎细胞因子和趋化因子,以响应包括紫外线,过敏原和化学制剂在内的免疫触发^[14]。在本研究中,以体外培养的人皮肤 HaCaT 细胞为对象,采用 IFN-γ 和 TRAIL 联合诱导损伤 HaCaT 细胞,发现丹酚酸 A 对细胞损伤具有一定的保护作用,并且这种保护作用与调控 NF-κB 途径有关,为特异性皮炎的药物开发提供了新的启示。

细胞凋亡是角质形成细胞在正常和病理状态下的另一个重要生理因素^[15]。细胞凋亡是细胞死亡的一种程序化形式,它是一种严格调控的生化过程,通过多种与蛋白酶(如降解蛋白质的 caspases)激活相关的不同机制发生。caspase-3 被认为是最重要的执行因子,可被任何一种启动子 caspase (caspase-8、-9 或-10) 激活^[16]。炎症因子 IL-1β 和 IL-6 等过度表达与特异性皮炎相关,并参与病理反应的诱导,被认为是皮肤炎症发病的关键因素^[17]。本实验中,丹酚酸 A 提高 IFN-γ 和 TRAIL 联合诱导的 HaCaT 细胞存活率,降低细胞的凋亡率和 cleaved caspase-3 蛋白表达,提示丹酚酸 A 通过可以促进 IFN-γ 和 TRAIL 联合损伤的 HaCaT 细胞增殖,并减少细胞凋亡。同时,丹酚酸 A 降低了 IFN-γ 和 TRAIL 联合诱导的人皮肤 HaCaT 细胞中炎症因子 IL-6

表 5 佛波酯抑制丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞存活率的保护作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	细胞存活率/%			IkB α	p-IkB α	NF- κ B p65	p-NF- κ B p65
	24 h	48 h	72 h				
IFN- γ +TRAIL+丹酚酸 A+PBS 组	100.37 $\pm$ 3.72	100.76 $\pm$ 4.07	101.21 $\pm$ 5.62	0.52 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.08	0.42 $\pm$ 0.04
IFN- γ +TRAIL+丹酚酸 A+佛波酯组	89.38 $\pm$ 4.24 *	84.73 $\pm$ 5.38 *	76.26 $\pm$ 6.11 *	0.53 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.05 *	0.56 $\pm$ 0.07	0.54 $\pm$ 0.05 *

注:与 IFN- γ +TRAIL+丹酚酸 A+PBS 组比较, * $P<0.05$ 。

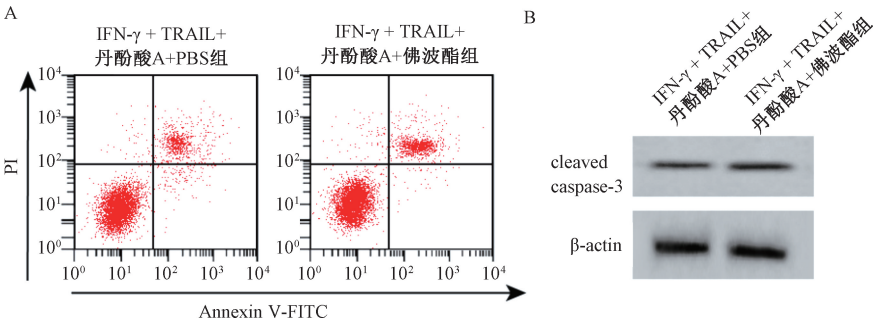


图 4 各组细胞凋亡 (A)、cleaved caspase-3 蛋白表达 (B)

表 6 佛波酯促进丹酚酸 A 对 HaCaT 细胞凋亡和抑制炎症因子分泌 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	cleaved caspase-3	细胞凋亡率/%
IFN- γ +TRAIL+丹酚酸 A+PBS 组	64.28 $\pm$ 4.28	34.25 $\pm$ 2.83	0.26 $\pm$ 0.03	5.25 $\pm$ 0.54
IFN- γ +TRAIL+丹酚酸 A+佛波酯组	102.67 $\pm$ 8.68 *	48.86 $\pm$ 3.74 *	0.37 $\pm$ 0.05 *	7.47 $\pm$ 0.88 *

注:与 IFN- γ +TRAIL+丹酚酸 A+PBS 组比较, * $P<0.05$ 。

和 IL-1 β 的分泌,说明丹酚酸 A 可以减轻人皮肤 HaCaT 细胞损伤后的炎症反应。由此可见,在 IFN- γ 和 TRAIL 联合损伤的 HaCaT 细胞中,丹酚酸 A 一方面促进细胞的增殖能力和抑制凋亡,另一方面抑制细胞中炎症因子的分泌,从而发挥保护作用,与丹酚酸 A 在其他模型损伤中^[7-8]的功能相符。

NF- κ B 家族包括被各种刺激激活的关键转录因子,如 TNF- α 、IFN- γ 和脂多糖等^[18]。刺激后,细胞质中的 NF- κ B 复合物易位至细胞核,并参与众多促炎基因的表达^[19]。NF- κ B 信号通路已被证明与 HaCaT 细胞炎症有关^[20],IFN- γ 和 TNF- α 可以激活角质形成细胞中的 NF- κ B 途径^[21]。本研究中,IFN- γ 和 TRAIL 联合诱导使 HaCaT 细胞内 p-IkB α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达升高,使用丹酚酸 A 处理则抑制了此作用,提示丹酚酸 A 对 IFN- γ 和 TRAIL 联合诱导的 HaCaT 细胞损伤的保护作用可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路活性而实现的。另外,NF- κ B 信号通路激活剂佛波酯能够抑制丹酚酸 A 对 IFN- γ 和 TRAIL 联合损伤的 HaCaT 细胞存活率的促进作用,并能促进丹酚酸 A 对细胞凋亡、炎症因子分泌的抑制作用。这些结果证实,抑制 NF- κ B 信号通路是丹酚酸 A 在 IFN- γ 和 TRAIL 联合损伤的 HaCaT 细胞中发挥药效的重要途径。

总之,丹酚酸 A 对 IFN- γ 和 TRAIL 联合诱导的 HaCaT 细胞损伤具有一定的保护效果,可以促进细胞的增殖,并抑制凋亡和细胞炎症因子的分泌,这种保护作用可能与调控 NF- κ B 信号通路有关。

参考文献:

[1] Lee K S, Chun S Y, Lee M G, *et al.* The prevention of TNF- α /IFN- γ mixture-induced inflammation in human keratinocyte and

atopic dermatitis-like skin lesions in Nc/Nga mice by mineral-balanced deep sea water[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1331-1340.

[2] Jin S E, Ha H K, Shin H K, *et al.* Anti-allergic and anti-inflammatory effects of kuwanon G and morusin on MC/9 mast cells and HaCaT keratinocytes [J]. *Molecules*, 2019, 24 (2): 265.

[3] Song J, Zhang W, Wang J H, *et al.* Inhibition of FOXO3a/BIM signaling pathway contributes to the protective effect of salvianolic acid A against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(3): 505-515.

[4] Qin T, Rasul A, Sarfraz A, *et al.* Salvianolic acid A & B: potential cytotoxic polyphenols in battle against cancer *via* targeting multiple signaling pathways[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10): 2256-2264.

[5] Zhang H F, Wang J H, Wang Y L, *et al.* Salvianolic acid A protects the kidney against oxidative stress by activating the Akt/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway and inhibiting the NF- κ B signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2853534.

[6] Yang L, Jiang L, Jiang D D, *et al.* The protective effects of salvianolic acid A against hepatic ischemia-reperfusion injury *via* inhibiting expression of toll-like receptor 4 in rats[J]. *Arch Med Sci*, 2019, 15(6): 1599-1607.

[7] 马 林, 颜 巍, 陈 娟, 等. 丹酚酸 A 对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. *西北药学杂志*, 2014, 29(3): 272-276.

[8] 姜 民, 郭利平, 周王怡, 等. 丹酚酸 A 对缺氧/复氧损伤条件下脑微血管内皮细胞 ICAM-1 表达的影响[J]. *天津中医药*, 2008, 25(5): 406-407.

[9]

Basu C, Chatterjee A, Bhattacharya S, *et al.* S-allyl cysteine inhibits TNF- α -induced inflammation in HaCaT keratinocytes by inhibition of NF- κ B-dependent gene expression *via* sustained ERK activation[J]. *Exp Dermatol*, 2019, 28(11): 1328-1335.

[10]

李桂双, 卜洁琼, 龙剑文. 蒺藜皂苷抑制肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 诱导 HaCaT 细胞的炎症反应[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(2): 131-137.

[11]

胡 华. 熊果酸对干扰素 γ 刺激 HaCaT 细胞产生白细胞介素 33 的影响[D]. 新乡: 新乡医学院, 2016.

[12]

寿艳红, 张 臻, 骆肖群, 等. 干扰素 γ 和 TRAIL 联合对 HaCaT 细胞程序性坏死的影响及机制研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52(5): 302-309.

[13]

Metral E, Bechetoille N, Demarne F, *et al.* Keratinocyte stem cells are more resistant to UVA radiation than their direct progeny[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203863.

[14]

Yang J H, Lee E, Lee B H, *et al.* Ethanolic extracts of *Artemisia apiacea* Hance improved atopic dermatitis-like skin lesions *in vivo* and suppressed TNF- α /IFN- γ -induced proinflammatory chemokine production *in vitro* [J]. *Nutrients*, 2018, 10(7): 806.

[15]

Song Y L, Chen L M, Li Y Y, *et al.* Knockdown of TRAF3IP2 suppresses the expression of VEGFA and the proliferation of keratinocytes and vascular endothelial cells[J]. *Heliyon*, 2019, 5(5): e01642.

[16]

Suh S S, Yang E J, Lee S G, *et al.* Bioactivities of ethanol extract from the Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas* sp [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(6): 560-569.

[17]

Cho K H, Parveen A, Kang M C, *et al.* *Pyrus ussuriensis* Maxim. leaves extract ameliorates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice [J]. *Phytomedicine*, 2018, 48: 76-83.

[18]

Lee H S, Park J W, Kwon O K, *et al.* Anti-inflammatory effects of ethanol extract from the leaves and shoots of *Cedrela odorata* L. in cytokine-stimulated keratinocytes [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 833-840.

[19]

Park J W, Kwon O K, Yuniato P, *et al.* Amelioration of an LPS-induced inflammatory response using a methanolic extract of *Lagerstroemia ovalifolia* to suppress the activation of NF- κ B in RAW264.7 macrophages [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 482-490.

[20]

Otkur W, Liu W W, Wang J D, *et al.* Sub-lethal ultraviolet B irradiation and Poly I: C treatment synergistically induced apoptosis of HaCaT cells through NF- κ B pathway [J]. *Mol Immunol*, 2018, 99: 19-29.

[21]

Hou D D, Di Z H, Qi R Q, *et al.* Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) oil improves atopic dermatitis-like skin lesions *via* inhibition of NF- κ B and STAT1 activation [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2017, 30(5): 268-276.

吴茱萸酒制前后对痛经小鼠镇痛活性的比较及药效物质基础

刘叶倩, 李 弘, 龚 姗, 欧阳荣, 任卫琼*, 龙红萍*
(湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

摘要: **目的** 探讨吴茱萸酒制前后对痛经小鼠的作用及其物质基础。**方法** 采用苯甲酸雌二醇联合缩宫素诱导痛经模型, 随机分为正常组, 模型组, 吴茱萸生品高、低剂量组, 吴茱萸酒制品高、低剂量组, 罗通定组。给药干预后, 观察各组小鼠的扭体次数及扭体潜伏期, ELISA 法检测小鼠血清 PGE2、ET-1、NO 水平。采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱仪 (UPLC-Q-TOF-MS) 对吴茱萸的生品和酒制品的化学成分进行定性定量分析。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠扭体次数增多 ($P<0.01$), 扭体潜伏期缩短 ($P<0.01$), 血清 ET-1 水平升高 ($P<0.01$), PEG2、NO 水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 吴茱萸酒制品高剂量组小鼠的扭体次数减少 ($P<0.01$), 吴茱萸生品、酒制品低、高剂量组小鼠的扭体潜伏期均延长 ($P<0.01$), 吴茱萸酒制品低、高剂量组小鼠血清 ET-1 水平降低, PGE2、NO 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。UPLC-Q-TOF-MS 鉴定结果显示, 酒制后芦丁、Evollionines A、山柰酚-3-鼠李糖基葡萄糖苷-7-葡萄糖苷、吴茱萸酰胺 4 种成分增加; 主要镇痛成分芦丁、去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量明显增加。**结论** 吴茱萸酒制后其镇痛活性发生了显著变化, 其有效成分含量在酒制前后也发生一定程度的改变, 为吴茱萸酒制前后药效和物质基础研究提供实验依据。

关键词: 吴茱萸; 酒制; 镇痛作用; 化学成分; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3484-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.044

收稿日期: 2020-07-10
基金项目: 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室开放基金 (20160210)
作者简介: 刘叶倩 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药药理研究。E-mail: 1058011454@qq.com
* 通信作者: 任卫琼 (1975—), 女, 博士, 副主任药师, 从事中药药理研究。E-mail: 1164096993@qq.com
龙红萍 (1984—), 女, 博士, 副研究员, 从事天然产物活性成分与新药开发研究。E-mail: longhongping84@163.com