

## 人参皂苷 Rb1 对小鼠皮肤光老化氧化应激的改善作用

王倩<sup>1</sup>, 万品文<sup>2</sup>, 曹丽楠<sup>1</sup>, 李雪莉<sup>1</sup>

(1. 南阳市中心医院皮肤科, 河南南阳 473000; 南阳市中心医院普外科, 河南南阳 473000)

**摘要:**【目的】探讨人参皂苷 Rb1 对小鼠皮肤光老化的治疗作用及机制。【方法】将成功构建的 59 只皮肤光老化模型小鼠随机分为模型组, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组各 15 只, 阳性对照组 14 只, 另取 15 只为正常组。建模成功后第 2 天, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组分别灌胃人参皂苷 Rb1 50、100 mg/kg, 阳性对照组灌胃维生素 E 30 mg/kg, 正常组和模型组灌胃等体积生理盐水, 1 次/d, 连续给药 30 d。干预结束, 黄嘌呤氧化酶法测定血浆超氧化物歧化酶(SOD)水平, 硫代巴比妥酸法测定血浆丙二醛(MDA)水平, 酶联免疫吸附分析(ELISA)法测定血浆肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(IL-6)和白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )水平, 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠皮肤组织病理学变化并测量皮肤表皮厚度及纹理评分, 蛋白免疫印迹法检测皮肤组织核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)、血红素氧合酶 1(HO-1)蛋白相对表达水平。【结果】模型组小鼠表皮角质层增厚, 细胞分层不清, 真皮层纤维组织排列紊乱, 分布不均, 有大量炎性细胞浸润, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组皮肤病理学变化得到改善, 但仍可见表皮角质层增厚, 真皮层纤维组织断裂、破碎, 卷曲扭结, 阳性对照组表皮稍有增厚, 真皮层可见较完整的纤维组织, 少见断裂、破碎, 未出现卷曲扭结。与模型组比较, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组和阳性对照组皮肤表皮厚度及纹理评分, MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平降低, SOD 活性及 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白相对表达水平升高( $P < 0.05$ )。【结论】人参皂苷 Rb1 可降低皮肤光老化小鼠体内氧化应激水平, 促进光老化皮肤修复, 可能是通过激活 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路发挥作用。

**关键词:** 人参皂苷 Rb1; 光老化; 氧化应激; Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路; 小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)11-2479-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbcm.2021.11.031

## Ameliorative Effect of Ginsenoside Rb1 on Oxidative Stress in Skin Photoaging Mice

WANG Qian<sup>1</sup>, WAN Pin-Wen<sup>2</sup>, CAO Li-Nan<sup>1</sup>, LI Xue-Li<sup>1</sup>

(1. Dept. of Dermatology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000 Henan, China; 2. Dept. of General Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000 Henan, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the therapeutic effect and mechanism of ginsenoside Rb1 on skin photoaging in mice. **Methods** Fifty-nine successfully established skin photoaging model mice were randomly divided into model group, ginsenoside Rb1 low-dose group (15 cases) and high-dose group (15 cases), positive control group (14 cases) and normal group (15 cases). On the 2nd day after successful modeling, the ginsenoside Rb1 low-dose and high-dose groups were administrated intragastrically with 50 and 100 mg/kg of ginsenoside Rb1, respectively, the positive control group was administrated intragastrically with 30 mg/kg of vitamin E, while the normal group and model group were intragastric administrated with equal volume of normal saline, the intervention treatment placed once a day for 30 consecutive days. After the intervention, the plasma superoxide dismutase (SOD) level was determined by xanthine oxidase method, the plasma malondialdehyde (MDA) level was determined by thiobarbituric acid method, and the plasma tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6(IL-6) and interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of the skin, and skin epidermal thickness and texture score were measured. The relative expression levels of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 (Keap1) and heme oxygenase 1 (HO-1) in skin tissues were

收稿日期: 2020-11-09

作者简介: 王倩(1981-), 女, 硕士研究生, 主治医师; E-mail: wang\_669li@163.com.

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 201602206)

detected by Western Blot. **Results** In the model group, the epidermal stratum corneum of mice was thickened, the cell stratification was unclear, and the dermis fibrous tissue was disorganized and unevenly distributed, with a large number of inflammatory cells infiltrating the skin. The ginsenoside Rb1 low-dose and high-dose groups showed improvement in skin pathology, but thickening of the epidermal stratum corneum, fractured, broken, curling and kinking dermis fibrous tissues were still visible, while the positive control group showed slight thickening of the epidermis and more intact dermis fibrous tissues, with few fractured and broken tissues and no curling and kinking. Compared with the model group, the ginsenoside Rb1 low-dose and high-dose groups and the positive control group showed lower skin epidermal thickness and texture scores, lower levels of MDA, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , and higher SOD activity and relative protein expression levels of Nrf2, Keap1 and HO-1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 is effective for reducing the level of oxidative stress in mice with photoaging skin, thus promoting photoaging skin repair, possibly by activating Nrf2/Keap1/HO-1 signaling pathway.

**Keywords:** ginsenoside Rb1; photoaging; oxidative stress; Nrf2/Keap1/HO-1 signaling pathway; mice

皮肤完全覆盖于人体表面, 构成了人类第一道免疫屏障<sup>[1]</sup>。随着生态环境的恶化, 臭氧层被破坏, 人类暴露于严重的紫外线(ultraviolet, UV)辐射下<sup>[2]</sup>。长期慢性的紫外线辐射会造成皮肤细胞脂质过氧化物增多, 胶原蛋白降解, 从而引起皮肤光老化<sup>[3]</sup>。目前, 延缓皮肤衰老的有效方法主要是减少自由基的产生、清除老化代谢产物、提高抗氧化酶活性等<sup>[4]</sup>。在中药中寻找高效、无副作用的天然自由基清除剂已成为研究热点。人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根, 味甘、微苦, 性温, 入脾、肺经, 可补气固脱, 补肺益脾, 生津, 安神, 益智。人参具有抗应激作用, 能提高机体对各种有害刺激(如温度或气压的过高、过低, 各种有毒的化学物质、微生物、放射线或移植癌等)的非特异性抵抗力, 对免疫系统有双向调节的正性作用。人参皂苷 Rb1 是人参有效成分之一, 药理学研究表明, 人参皂苷 Rb1 能够抑制心、脑、肝组织中过氧化脂质形成, 稳定细胞膜结构, 具有延缓神经细胞衰老、抗癌等作用<sup>[5-6]</sup>。为探讨人参皂苷 Rb1 对皮肤光老化的治疗作用, 本研究建立了皮肤光老化小鼠模型, 观察人参皂苷 Rb1 对小鼠皮肤光老化氧化应激的改善作用, 以及核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素氧合酶 1(HO-1) 信号通路在其中发挥的作用, 旨在为皮肤光老化的临床治疗提供理论指导, 现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性昆明种小鼠 85 只, 体质量 16 ~ 20 g, 动物质量合格证号: SCXK(沪)2018-0004, 购自上海杰思捷实验动物有限公司。于清洁通风、温度 18 ~ 22 °C、湿度 50% ~ 60%、明暗周期 12 h/12 h 循环的环境中适应性饲养 7 d。实验在南阳市中心医院检验科实验室完成。

### 1.2 药物、试剂与仪器

人参皂苷 Rb1(批号: 20181125)购自南京广润生物制品有限公司; 维生素 E(批号: 20190512)购自上海源叶生物科技有限公司。肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒, 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 兔抗小鼠 Nrf2、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)、HO-1 单克隆抗体, 山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白(IgG)抗体, 英国 Abcam 公司。

### 1.3 光源

紫外灯管由北京电光源研究所制造, 6 根长波紫外线(UVA)灯管和 1 根中波紫外线(UVB)灯管, 每根 40 W。UVA 和 UVB 剂量用紫外线强度测定仪(北京师范大学光电研究所制造)测定; HBS-1096C 酶标分析仪(南京德铁实验设备有限公司)。

### 1.4 造模与分组

随机选取 70 只小鼠建立皮肤光老化模型<sup>[7]</sup>, 剃去小鼠背部约 5 cm  $\times$  5 cm 面积的毛发, 使皮肤充分暴露。将小鼠置于 40 W 紫外线灯管(UVA+UVB)下照射, 照射距离为 40 cm, 每隔 1 d 照射 1 次, 每次照射 40 min, 连续照射 40 d,

UVB 累计照射剂量 78.4 J, UVA 累计照射剂量 98.4 J。小鼠出现慵懒、倦怠、蜷缩、皮肤粗糙并伴有猪毛征出现, 纹理加粗加深变大, 皮肤颜色开始暗红等表现则视为造模成功。将造模成功的 59 只小鼠随机分为模型组 15 只, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组各 15 只, 阳性对照组 14 只, 剩余 15 只为正常组。

**1.5 干预方法** 建模成功后第 2 天, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组小鼠分别给予灌胃 50、100 mg/kg 人参皂苷 Rb1<sup>[7]</sup>, 阳性对照组小鼠给予维生素 E 30 mg/kg 灌胃, 正常组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水, 每天 1 次, 共 30 d<sup>[8]</sup>。末次灌胃结束后, 所有大鼠背部皮肤拍照, 根据图片采用皮肤皱纹等级量表进行评分, 见表 1。

表 1 皮肤皱纹等级量表  
Table 1 Skin wrinkle rating scale

等级 <sup>a</sup>	皮肤外观
0	皮肤表面肉眼可见正常细小皮纹, 伴随运动出现或消失, 无皱纹
1	细小皮纹消失, 代之出现少量横向浅皱纹, 随运动出现或消失
2	细小皮纹全消失不见, 部分横向粗糙皱纹仍存在
3	细小皮纹全消失不见, 皮肤表面出现大量横向粗糙深皱纹, 并持续存在

a: 等级评分, 可包括 0.5 分

## 1.6 观察指标与方法

**1.6.1 组织取材** 拍照结束后, 各组小鼠采用 30 g/L 戊巴比妥钠按照 30 mg/kg 腹腔注射麻醉, 眼球取血 4 mL, 置于抗凝管中, 以 3 000 r/min, 离心半径 8 cm, 离心 10 min。取血浆保存于 -20 ℃。所有小鼠剥取暴露在外的皮肤, 一部分置于 40 g/L 多聚甲醛中固定, 另一部分液氮速冻后置于 -80 ℃冰箱中保存。

**1.6.2 测定 SOD 活性和 MDA 水平** 取 -20 ℃ 的血浆, 按照 SOD 试剂盒说明书加样, 用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 水平, 全自动酶标仪测出 550 nm 波长处的吸光度 (OD) 值。根据说明书上的公式: SOD 样品比活力 (U/mL) = (对照管 OD 值 - 测定管 OD 值) / 对照管 OD 值 ÷ 50% ÷ 加样量 × 透析液体积。

取保存在 -20 ℃ 冰箱中的血浆, 按照 MDA 试剂盒说明书加样, 用硫代巴比妥酸法测定 MDA 水平, 全自动酶标仪测出 450、532、600 nm 波长处的 OD 值。根据说明书上的公式:  $MDA(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}) =$

$6.452 \times [\text{OD}(532 \text{ nm}) - \text{OD}(600 \text{ nm})] - 0.56 \times \text{OD}(450 \text{ nm})$ 。

**1.6.3 ELISA 法测定血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平** 取保存在 -20 ℃ 冰箱中的血浆, 测定 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平, 按照 ELISA 试剂盒说明书加样, 采用全自动酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值, 通过绘制标准曲线得出 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的浓度。

**1.6.4 测量小鼠表皮厚度** 在光学显微镜下, 选取小鼠皮肤组织切片标本 3 ~ 5 个视野, 用显微镜配套微尺测量表皮厚度, 以 mm 为计数单位, 取均值。

**1.6.5 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察小鼠皮肤组织病理学变化** 取 40 g/L 多聚甲醛固定的皮肤组织, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚度 2  $\mu\text{m}$ ), HE 染色, 光学显微镜下观察小鼠皮肤组织病理学变化。

**1.6.6 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 法检测皮肤组织 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白表达水平** 取 -80 ℃ 保存的皮肤组织 80 mg, 液氮速冻研磨, 加入蛋白提取裂解液, 冰上裂解, 离心, 取上清, 用二喹啉甲酸 (BCA) 法进行蛋白定量。加入十二烷基硫酸钠 (SDS) 上样缓冲液, 95 ℃ 水浴使蛋白变性, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 电转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜。50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 2 h。洗膜后分别加入 1:1 000 稀释的 Nrf2、Keap1、HO-1 一抗, 4 ℃ 孵育过夜。洗膜后加入 1:4 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h。洗膜后加入电化学发光液 (ECL) 显影。采用 ImageJ 软件分析图像, 以  $\beta$ -actin 为内参, Nrf2、Keap1、HO-1 相对表达量用其蛋白条带灰度值与  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值的比值表示。

**1.7 统计方法** 采用 SPSS 24.0 统计学软件分析数据, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两样本比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠血浆 SOD 活性和 MDA 水平比较** 表 2 结果显示: 与正常组比较, 模型组, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组和阳性对照组血浆 SOD 活性降低, MDA 水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rb1 低、高剂量组和阳性对照组血浆 SOD 活性升高, MDA 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 但人参皂苷 Rb1



低、高剂量组血浆SOD活性低于阳性对照组( $P < 0.05$ ), MDA水平高于阳性对照组( $P < 0.05$ )。

表2 各组小鼠血浆SOD活性和MDA水平比较

组别	鼠数(只)	SOD(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
正常组	15	156.37 ± 11.62	6.84 ± 1.45
模型组	15	38.47 ± 6.68 <sup>①</sup>	38.58 ± 3.58 <sup>①</sup>
人参皂苷Rb1低剂量组	15	66.33 ± 7.11 <sup>①②③</sup>	26.64 ± 2.87 <sup>①②③</sup>
人参皂苷Rb1高剂量组	15	87.53 ± 8.31 <sup>①②③</sup>	17.41 ± 2.17 <sup>①②③</sup>
阳性对照组	14	110.48 ± 10.28 <sup>①②</sup>	10.26 ± 1.89 <sup>①②</sup>

① $P < 0.05$ , 与正常组比较; ② $P < 0.05$ , 与模型组比较; ③ $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较

2.2 各组小鼠血浆TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平比较 表3结果显示: 与正常组比较, 模型组, 人参皂苷Rb1低、高剂量组和阳性对照组血浆TNF-

表3 各组小鼠血浆TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平比较

组别	鼠数(只)	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
正常组	15	108.62 ± 18.52	68.25 ± 10.78	98.58 ± 16.45
模型组	15	259.52 ± 25.53 <sup>①</sup>	174.63 ± 17.68 <sup>①</sup>	264.38 ± 26.14 <sup>①</sup>
人参皂苷Rb1低剂量组	15	223.17 ± 23.43 <sup>①②③</sup>	132.67 ± 14.53 <sup>①②③</sup>	187.43 ± 19.37 <sup>①②③</sup>
人参皂苷Rb1高剂量组	15	180.67 ± 19.71 <sup>①②③</sup>	112.19 ± 12.48 <sup>①②③</sup>	143.58 ± 15.46 <sup>①②③</sup>
阳性对照组	14	153.73 ± 19.56 <sup>①②</sup>	81.37 ± 11.49 <sup>①②</sup>	123.63 ± 17.45 <sup>①②</sup>

① $P < 0.05$ , 与正常组比较; ② $P < 0.05$ , 与模型组比较; ③ $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较

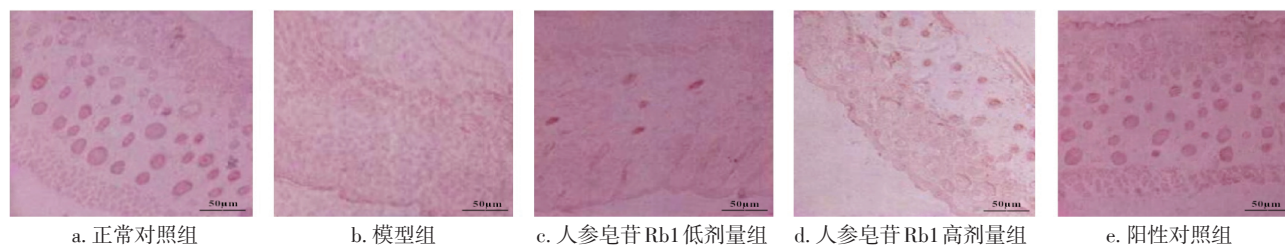


图1 各组小鼠皮肤组织病理学变化比较(HE染色法, ×100)

Figure 1 Comparison of skin pathological changes of mice in various groups (by HE staining, ×100)

2.4 各组小鼠皮肤表皮厚度及皱纹形成比较 表4结果显示: 与正常组比较, 模型组、人参皂苷Rb1低、高剂量组和阳性对照组皮肤表皮厚度升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷Rb1低、高剂量组和阳性对照组皮肤表皮厚度及纹理评分降低( $P < 0.05$ ), 但人参皂苷Rb1低、高剂量组皮肤表皮厚度及纹理评分高于阳性对照组( $P < 0.05$ )。

2.5 各组皮肤组织Nrf2、Keap1、HO-1蛋白相对表达水平 图2、表5结果显示: 与正常组比较,

$\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷Rb1低、高剂量组和阳性对照组血浆TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平降低( $P < 0.05$ ), 但人参皂苷Rb1低、高剂量组血浆TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平均高于阳性对照组( $P < 0.05$ )。

2.3 各组小鼠皮肤组织病理学变化比较 图1结果显示: 正常组小鼠皮肤表皮层结构完整, 细胞分层清晰, 真皮层纤维组织成波浪形, 排列有序, 分布均匀; 模型组小鼠表皮层角质层增厚, 细胞分层不清, 真皮层纤维组织排列紊乱, 分布不均, 有大量炎性细胞浸润; 人参皂苷Rb1低、高剂量组皮肤病理学变化得到改善, 但仍可见表皮角质层增厚, 真皮层纤维组织断裂、破碎, 卷曲扭结; 阳性对照组表皮稍有增厚, 真皮层可见较完整的纤维组织, 少见断裂、破碎, 未出现卷曲扭结。

模型组, 人参皂苷Rb1低、高剂量组和阳性对照组皮肤组织Nrf2、Keap1、HO-1蛋白相对表达水平降低( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷Rb1低、高剂量组和阳性对照组皮肤组织Nrf2、Keap1、HO-1蛋白相对表达水平升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷Rb1低、高剂量组和阳性对照组皮肤组织Nrf2、Keap1、HO-1蛋白相对表达水平升高( $P < 0.05$ ), 但人参皂苷Rb1低、高剂量组皮肤组织Nrf2、Keap1、HO-1蛋白相对表

表 4 各组小鼠表皮厚度及皱纹形成比较  
Table 4 Comparison of skin thickness and wrinkle formation in various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	表皮厚度(mm)	皮肤纹理评分(分)
正常组	15	0.46 ± 0.06	—
模型组	15	1.78 ± 0.17 <sup>①</sup>	2.67 ± 0.51
人参皂苷 Rb1 低剂量组	15	1.42 ± 0.14 <sup>①②③</sup>	2.25 ± 0.43 <sup>②③</sup>
人参皂苷 Rb1 高剂量组	15	1.10 ± 0.11 <sup>①②③</sup>	1.73 ± 0.37 <sup>②③</sup>
阳性对照组	14	0.78 ± 0.08 <sup>①②</sup>	1.06 ± 0.35 <sup>②</sup>

① $P < 0.05$ , 与正常组比较; ② $P < 0.05$ , 与模型组比较; ③ $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较

表 5 各组小鼠皮肤组织 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白相对表达水平比较

Table 5 Comparison of the relative protein expression levels of Nrf2, Keap1, HO-1 in skin tissues of various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	Nrf2	Keap1	HO-1
正常组	15	1.21 ± 0.12	1.01 ± 0.10	1.19 ± 0.12
模型组	15	0.43 ± 0.07 <sup>①</sup>	0.31 ± 0.06 <sup>①</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>①</sup>
人参皂苷 Rb1 低剂量组	15	0.61 ± 0.08 <sup>①②③</sup>	0.45 ± 0.08 <sup>①②③</sup>	0.62 ± 0.07 <sup>①②③</sup>
人参皂苷 Rb1 高剂量组	15	0.79 ± 0.08 <sup>①②③</sup>	0.63 ± 0.08 <sup>①②③</sup>	0.78 ± 0.09 <sup>①②③</sup>
阳性对照组	14	1.02 ± 0.11 <sup>①②</sup>	0.80 ± 0.09 <sup>①②</sup>	0.99 ± 0.10 <sup>①②</sup>

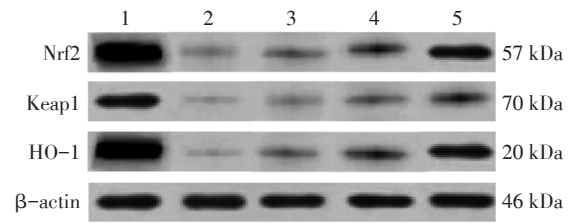
① $P < 0.05$ , 与正常组比较; ② $P < 0.05$ , 与模型组比较; ③ $P < 0.05$ , 与阳性对照组比较

达水平低于阳性对照组( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

皮肤光老化是指长期受到日光紫外线照射而发生的皮肤松弛干燥, 色素沉着异常及皱纹增多等一系列皮肤衰老的症状。紫外线是造成皮肤光老化的主要原因。寻找和开发能有效防治皮肤光老化的天然产物已受到广泛关注。

由于伦理学限制, 对于光老化的研究目前仅限于实验动物光老化模型, 尤其是以大鼠或小鼠建立的光老化模型在皮肤组织形态学的变化与人类相似。因此, 本研究以小鼠为研究对象, 采用 UVA 和 UVB 混合紫外线照射建立光老化模型。UVA 是引起色素沉着异常的主要因素, 而 UVB 是引起红斑、皱纹粗糙加深的主要原因。本研究中模型组小鼠皮肤表皮厚度增加且纹理评分升高, 说明皮肤光老化小鼠模型制备成功。正常的皮肤组织需要胶原纤维及弹力蛋白维持正常的强度和弹性, 紫外线照射则会引起胶原降解、胶原蛋白合成减少等改变, 导致异常变性的胶原蛋白沉



1: 正常组; 2: 模型组; 3: 人参皂苷 Rb1 低剂量组; 4: 人参皂苷 Rb1 高剂量组; 5: 阳性对照组

图 2 各组小鼠皮肤组织 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白的 Western Blot 电泳条带

Figure 2 Western blotting strips of Nrf2, Keap1 and HO-1 proteins in skin tissues of various groups

积, 皮肤则出现老化外观<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, 模型组小鼠皮肤表皮层角质层增厚, 细胞分层不清, 真皮层纤维组织排列紊乱, 分布不均, 有大量炎性细胞浸润。

长期紫外线照射会引起氧化应激和炎症反应, 导致真皮细胞外基质降解和表皮增生, 最终发生光老化。活性氧生成过多或代谢障碍, 造成活性氧含量超出了机体抗氧化系统清除能力, 直接导致氧化应激, 从而引起细胞病理性损伤。为维持机体活性氧动态平衡, 机体则会激活抗氧化相关蛋白, 其中, SOD 是重要的抗氧化金属酶, 可清除机体氧自由基, 维持氧化和抗氧化系统的平衡, 其活性反映机体氧化应激的严重程度。MDA 是发生氧化应激时的重要指标, 与氧化应激的严重程度直接相关<sup>[10]</sup>。目前, 关于紫外线所导致的皮肤光老化相关机制的理论有 3 种: (1) 紫外线照射造成皮肤细胞释放自由基和炎症因子, 造成皮肤各种细胞内部结构相互作用, 导致细胞和组织损伤。(2) 紫外线照射损伤 DNA, 引起细胞凋亡和癌变等不良后果。(3) 紫外线照射还可使皮肤蛋

白质,如胶原蛋白,发生交联反应;诱导反式尿苷酸向顺式转化,从而释放肿瘤坏死因子。其中,炎症反应被认为是造成紫外线照射光损伤的重要因素。 $\text{TNF-}\alpha$ 是炎症反应中最早出现的炎性因子,通过激活中性粒细胞和淋巴细胞,促进血管内皮细胞通透性,可促使其他细胞因子合成和释放。 $\text{IL-6}$ 可诱导B细胞分化并产生抗体,还可诱导T细胞增殖活化,参与机体免疫应答,在炎症反应中起到促发剂的作用。 $\text{IL-1}\beta$ 通过激活核因子 $\text{kappaB}$ ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ )炎性信号通路促进炎症反应。本研究应用人参皂苷Rb1对皮肤光老化小鼠进行治疗后,结果显示:与模型组比较,人参皂苷Rb1组小鼠皮肤表皮厚度和纹理评分降低,皮肤损伤改善,但仍可见表皮角质层轻度增厚,真皮层纤维组织不同程度断裂、破碎,卷曲扭结, $\text{SOD}$ 活性升高, $\text{MDA}$ 含量降低, $\text{IL-6}$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 含量降低,且具有剂量依赖性。表明人参皂苷Rb1对皮肤光老化小鼠具有改善作用,但是,人参皂苷Rb1治疗的效果不如阳性对照药物。

$\text{Nrf2}$ 是调节抗氧化应激的重要转录因子,正常生理状况下 $\text{Nrf2}$ 在细胞内被快速降解,发生氧化应激时,与 $\text{Keap1}$ 偶联结合,稳定状态下的 $\text{Nrf2}$ 转位入细胞核结合抗氧化反应原件如 $\text{HO-1}$ ,促进抗氧化蛋白基因的转录和表达,增强细胞抗氧化能力,降低活性氧及炎症反应,从而发挥保护细胞正常功能的作用<sup>[11]</sup>。研究表明,衰老过程中 $\text{Nrf2}$ 及其靶基因的表达均下调,而 $\text{Nrf2/HO-1}$ 通路的激活可以上调许多抗氧化基因的表达,减轻组织氧化损伤<sup>[12]</sup>。尤旭等<sup>[13]</sup>研究发现,衰老大鼠睾丸组织中 $\text{Nrf2}$ 及其下游靶蛋白 $\text{HO-1}$ 和 $\text{NQO1}$ 的表达降低,提示 $\text{Nrf2/HO-1}$ 信号通路参与细胞衰老过程。王斌等<sup>[14]</sup>研究发现, $\text{Nrf2/HO-1}$ 信号通路参与梗阻性肾病大鼠肾脏氧化应激损伤。本研究结果显示,模型组小鼠皮肤组织中 $\text{Nrf2}$ 、 $\text{Keap1}$ 和 $\text{HO-1}$ 蛋白表达较正常组降低,不同剂量人参皂苷Rb1治疗后 $\text{Nrf2}$ 、 $\text{Keap1}$ 和 $\text{HO-1}$ 蛋白表达升高,表明人参皂苷Rb1可能是通过激活 $\text{Nrf2/HO-1}$ 信号通路发挥抗氧化作用。

综上所述,人参皂苷Rb1可在一定程度上减轻皮肤光老化小鼠体内氧化应激水平,促进光老化皮肤修复,其机制可能与激活 $\text{Nrf2/HO-1}$ 信号通路有关。

## 参考文献:

- [1] JIA Y, GAN Y, HE C, et al. The mechanism of skin lipids influencing skin status[J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 89(2): 112-119.
- [2] GODIN-BEEKMANN S. Impact of climate change and ozone layer evolution on surface ultraviolet radiation[J]. *Ann Dermatol Venereol*, 2018, 145(12S): S7-S8.
- [3] KOSTYUK V, POTAPOVICH A, ALBUHAYDAR A R, et al. Natural substances for prevention of skin photoaging: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics[J]. *Rejuvenation Res*, 2018, 21(2): 91-101.
- [4] ZDUŃSKA K, DANA A, KOŁODZIEJCZAK A, et al. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application[J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2018, 31(6): 332-336.
- [5] KEE J Y, HONG S H. Ginsenoside Rg3 suppresses mast cell-mediated allergic inflammation via mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(2): 282-290.
- [6] 鹿祺,邱智东,王蕾,等.人参皂苷对皮肤细胞的修复作用机制研究[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(4): 518-521.
- [7] 齐双辉,肖锋,魏兵,等.人参皂苷Rb1对川崎病小鼠冠状动脉损伤的作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(9): 1034-1040.
- [8] 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.
- [9] LEE H, PARK H Y, JEONG T S. Pheophorbide a derivatives exert antiwrinkle effects on UVB-induced skin aging in human fibroblasts[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(2): 147.
- [10] SHI W Z, LI W, CHENG Y, et al. The cytoprotective role of omentin against oxidative stress-induced PC12 apoptosis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2021, 49(1): 483-492.
- [11] REZIWAN K, SUN D, ZHANG B, et al. MicroRNA-1225 activates Keap1-Nrf2-HO-1 signalling to inhibit  $\text{TNF}\alpha$ -induced osteoclastogenesis by mediating ROS generation[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(4): 256-265.
- [12] 王甜甜,陈淳媛,杨雷,等. $\text{Nrf2/HO-1}$ 信号轴在氧化应激性疾病中的机制[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2019, 44(1): 74-80.
- [13] 尤旭,赵海霞,杨思琪,等.淫羊藿苷激活 $\text{Nrf2/HO-1}$ 信号通路减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞DNA损伤研究[J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2915-2921.
- [14] 王斌,赵明,陈志勇,等.芦丁对梗阻性肾病大鼠肾脏氧化应激损伤及 $\text{Nrf2/HO-1}$ 通路的影响[J]. *重庆医学*, 2019, 48(2): 38-42.

【责任编辑:侯丽颖】