

甘草酸苷通过 MAPK p38/NF- κ B 通路对炎症后色素沉着的抑制作用

周凌, 郭亮*, 王敏, 周伟(武汉大学中南医院整形美容科, 武汉 430071)

摘要: 目的 探讨甘草酸苷对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后角质形成细胞分泌 COX-2/PGE₂ 和对共培养黑素细胞合成黑素的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法 以人表皮角质形成细胞为对象, 分为对照组、LPS 组、甘草酸苷组(2, 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。采用 ELISA 法检测 PGE₂ 的含量, Western blot 检测细胞 COX-2、NF- κ B p-p65、p-IKK α / β 和 MAPK p-p38 蛋白的表达, 比色法检测共培养黑素细胞的黑色素含量。结果 与对照组比较, LPS 显著增加角质形成细胞 COX-2、NF- κ B p-p65、p-IKK α / β 、MAPK p-p38 蛋白表达($P<0.01$)和 PGE₂ 的分泌($P<0.01$), 增加共培养黑素细胞黑色素生成($P<0.01$)。与 LPS 组比较, 甘草酸苷呈剂量依赖性抑制 COX-2、NF- κ B p-p65、p-IKK α / β 、MAPK p-p38 蛋白表达($P<0.05$)和 PGE₂ 的分泌($P<0.05$), 减少共培养黑素细胞黑色素生成($P<0.05$)。结论 甘草酸苷通过抑制角质形成细胞 MAPK p38/NF- κ B 通路, 从而降低 COX-2/PGE₂ 的表达, 减少共培养黑素细胞合成黑素。

关键词: 甘草酸苷; 角质形成细胞; 炎症后色素沉着; COX-2; NF- κ B; 脂多糖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)08-0930-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.08.007

引用本文: 周凌, 郭亮, 王敏, 等. 甘草酸苷通过 MAPK p38/NF- κ B 通路对炎症后色素沉着的抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(8): 930-934.

Glycyrrhizic Acid Suppress Post-inflammatory Hyperpigmentation via MAPK p38/NF- κ B Signaling Pathway

ZHOU Ling, GUO Liang*, WANG Min, ZHOU Wei(Plastic and Cosmetic Department of Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibitory effect of glycyrrhizic acid(GA) on LPS-induced expression of COX-2/PGE₂ in keratinocytes and the melanin production in co-cultured melanocytes explore its possible mechanism.

METHODS Human cutaneous keratinocytes were treated with GA of different concentration(0, 2, 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and LPS. The level of cytokine PGE₂ in the culture medium was determined using ELISA kit. The expression of COX-2, NF- κ B p-p65, p-IKK α / β and MAPK p-p38 were studied by Western blotting. The melanin content in co-cultured melanocytes was measured by colorimetric method. **RESULTS** The expression of COX-2, NF- κ B p-p65, p-IKK α / β and MAPK p-p38 in LPS-treated keratinocytes were significantly raised compared to that in control group. LPS also elevated PGE₂ levels in the culture medium. The melanin content in co-cultured melanocytes increased after LPS stimulation. GA decreased COX-2, NF- κ B p-p65, p-IKK α / β and MAPK p-p38 expression in LPS-treated keratinocytes in a dose-dependent manner($P<0.05$). GA decreased PGE₂ levels in the culture medium of keratinocytes dose-dependently ($P<0.05$). GA also decreased melanin production in co-cultured melanocytes dose-dependently($P<0.05$). **CONCLUSION** GA decreases LPS-induced expression of COX-2/PGE₂ in keratinocytes and melanin production in co-cultured melanocytes through suppressing MAPK p38/NF- κ B signal pathway.

KEYWORDS: glycyrrhizic acid; keratinocyte; post-inflammatory hyperpigmentation; COX-2; NF- κ B; lipopolysaccharide(LPS)

炎症后色素沉着(post-inflammatory hyperpigmentation, PIH)是一种常见的炎症引起的皮肤色素改变, 多继发于炎症性皮肤病、机械损伤、创伤和光电治疗后。角质形成细胞(keratinocyte, KC)是表皮的最主要细胞, 在外界各种刺激下, 激活细胞内复杂的信号通路, 分泌合成多种炎性因子, 刺激黑素细胞(melanocyte, MC)合成和黑色素分泌增加, 诱发色素沉着。甘草酸苷是从甘草根中提取的主要活性成分, 具有抗病毒、抗寄生虫、抗肿

瘤以及免疫调节等多种生物学功能^[1]。本研究拟观察甘草酸苷对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后 KC 分泌环氧合酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)/前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)和对共培养的 MC 合成黑素的影响, 并探讨可能的作用机制, 为甘草酸苷治疗 PIH 的临床应用提供依据。

1 材料和仪器

1.1 试剂与材料

兔抗 COX-2(批号: SC-376861)、核因子 κ B

作者简介: 周凌, 女, 博士, 主治医师 Tel: (027)67812641 E-mail: pfxtzl@163.com
(027)67812641 E-mail: myglistner@163.com

*通信作者: 郭亮, 男, 博士, 副主任医师 Tel:

(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, NF- κ B)p-p65(批号: SC-166748)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)p-p38(批号: SC-166182)均购自 Santa Cruz 公司;p-I κ B 激酶 α/β (I-kappa-B kinase α/β , IKK α/β)(美国 CST 公司,批号: 2697S);甘草酸苷(批号: PHR1516)、LPS(批号: L2880)均购自美国 Sigma 公司, PGE₂ ELISA 试剂盒(批号: EIA-1112)、鼠抗 GAPDH 抗体(批号: TA309157)购自中杉金桥生物公司;羊抗鼠及羊抗兔荧光二抗 IR Dye 800 CW(LI-COR Biosciences 公司,批号: C21207-01);Transwell 板(美国 Corning 公司,批号: 3452);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号: IPVH00010),其余试剂均购自武汉博士德公司。

1.2 仪器

Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell-1658001 SDS 凝胶电泳及转印装置(美国 BioRad 公司);Odyssey Imager CLx 凝胶图像处理系统(美国 Gene 公司);5424R 小型台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);X71 型荧光倒置显微镜(德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 正常人 KC 培养 取健康男性包皮环切术后的皮肤,消毒、剪碎后用 0.25% 胰酶消化 4 ℃ 消化 24 h,分离出表皮,0.25% 胰酶 37 ℃ 消化、过滤,获得单细胞悬液,接种于培养皿中,培养 4 h 后,换液去除未贴壁细胞,置于 KSM 培养基中培养,每 3 d 换液。

2.1.2 正常人 MC 培养 标本处理同 KC 培养,差别胰酶消化法和提纯 MC,0.25% 胰酶消化、过滤获得单细胞悬液,置于完全 MCDB 153 培养基中培养,每 3 d 换液。实验用 2~3 代细胞。

2.2 乳酸脱氢酶释放试验确定甘草酸苷作用浓度

取对数生长期的 KC,按 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 24 孔 transwell 板的下室;取对数生长期的 MC 按每孔 2×10^4 细胞接种于 24 孔 transwell 板的上室。分为对照组和甘草酸苷组(2, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。作用 24 h 后,每孔取 200 μL 培养液,4 ℃ $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;取上清加入 96 孔板,每孔 20 μL ;再先后加入 65 μL 丙酮磷酸钾缓冲液和 65 μL NADH 溶液,震动混匀后置入

酶标仪中,340 nm 处测量吸光度(A)值,计算乳酸脱氢酶释放率,确定实验所用甘草酸苷浓度。

2.3 LPS 及甘草酸苷干预

取对数生长期的 KC,按每孔 1×10^6 细胞接种于 6 孔 transwell 板的下室;取对数生长期的 MC 按每孔 2×10^5 细胞接种于另一 6 孔 transwell 板的上室。分为对照组、LPS 组、甘草酸苷干预组(分为 2, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每组 3 复孔。细胞接种 24 h 后,下室 KC 更换为含 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的新鲜培养基处理 24 h。然后 KC 与 MC 均移去原有培养基,并置于同一培养板中共培养。甘草酸苷干预组分别加用含 2, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草酸苷的培养基,对照组和 LPS 组更换为不含甘草酸苷的培养基,继续培养 24 h。

2.4 ELISA 试验检测 PGE₂ 含量

取共培养 24 h 后的培养基入 1.5 mL EP 管中,2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清置于新的 1.5 mL EP 管中,按 ELISA 说明书步骤倍比稀释标准品、加样、孵育及显色。每孔加入终止液 100 μL ,混匀后立即在 450 nm 处测定 A 值。

2.5 黑素含量测定

消化获得 5×10^6 个黑素细胞,0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤 5 $\text{min} \times 2$,加入含 10% DMSO 的 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 1 mL,冻融 2 次,加入双蒸水 4 mL 稀释,离心后取上清液加入 96 孔板,每孔加入 100 μL ,每个样本液 6 个检测复孔,酶标仪 490 nm 波长处测量 A 值。黑素含量 = $[(A_{\text{试验组}}/\text{细胞数})/(A_{\text{对照组}}/\text{细胞数})] \times 100\%$ 。

2.6 Western blot 试验

细胞收集、裂解,提取蛋白并标定。蛋白上样量每孔 30 μg ,电泳、转膜后,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;一抗(抗体 1:1 000 稀释;抗 GAPDH 抗体 1:10 000 稀释)4 ℃ 孵育过夜;1 \times TBST 液洗涤 5 $\text{min} \times 3$;荧光二抗(羊抗兔 1:10 000,兔抗鼠 1:10 000)室温摇床孵育 1 h;1 \times TBST 液洗涤 10 $\text{min} \times 3$;PVDF 膜置于凝胶图像处理系统显影。

2.7 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行分析。LPS 干预组和对照组间用 *t* 检验分析,甘草酸苷干预多组间比较采用方差分析,检验后采用 Tukey 法进行组间多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草酸苷浓度对共培养 KC 和 MC 损伤的影响

2~20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草酸苷共培养 KC 和 MC 的乳酸脱氢酶释放率与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 结果见图 1。试验选用甘草酸苷浓度为 2, 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

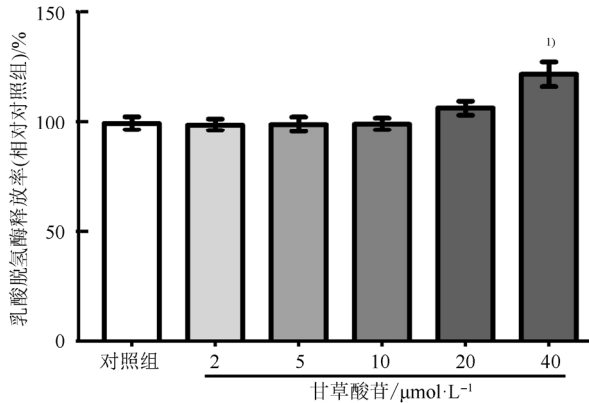


图 1 甘草酸苷浓度对共培养 KC 和 MC 损伤的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effect of glycyrrhizic acid concentration on injury of co-cultured KC and MC ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

3.2 甘草酸苷减少 LPS 刺激后 KC 培养基 PGE₂ 的含量

与对照组比较, LPS 组 KC 培养基中 PGE₂ 含量显著增加($P<0.01$); 而甘草酸苷干预能显著减少 PGE₂ 生成, 与 LPS 组比较具有显著性差异($P<0.01$), 结果见图 2。

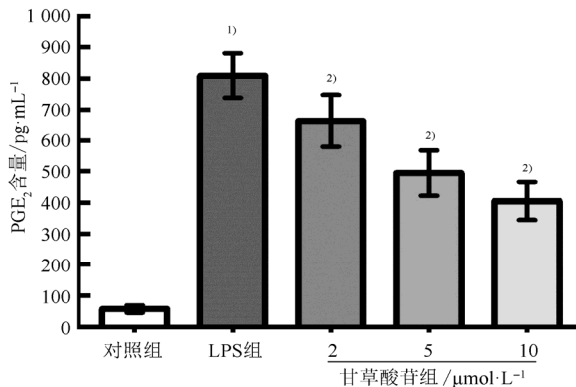


图 2 甘草酸苷对 LPS 刺激后 KC 分泌 PGE₂ 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of glycyrrhizic acid on PGE₂ secretion of LPS-treated KC ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$.

3.3 甘草酸苷减少 LPS 刺激后与 KC 共培养的 MC 黑素生成

与对照组比较, LPS 组共培养的 MC 黑素含量显著增加($P<0.01$), 而甘草酸苷干预能显著减少 LPS 诱导的 MC 黑素生成($P<0.01$), 结果见图 3。

3.4 甘草酸苷对 LPS 刺激后 KC 表达 MAPK p-p38、p-IKK α/β 、NF- κ B p-p65 和 COX-2 的影响

Western blot 结果显示, 与对照组比较, LPS 组 KC 的 COX-2($P<0.01$)、NF- κ B p-p65($P<0.01$)、p-IKK α/β ($P<0.01$)和 MAPK p-p38($P<0.01$)蛋白表达显著增加。甘草酸苷干预能显著减少 COX-2 ($P<0.01$)、NF- κ B p-p65($P<0.01$)、p-IKK α/β ($P<0.01$)和 MAPK p-p38($P<0.01$)的蛋白表达, 结果见图 4。

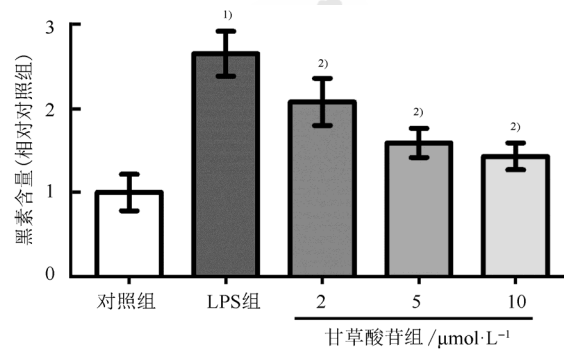


图 3 甘草酸苷对 LPS 刺激后共培养 MC 产生黑素的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of glycyrrhizic acid on melanin production of MC co-cultured with LPS-treated keratinocytes ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$.

4 讨论

PIH 是常见的皮肤科疾病, 亚洲人群尤为多见。特别是面部等暴露部位的 PIH, 往往对容貌有较大影响, 给患者造成沉重的心理负担。PIH 目前还缺乏特效治疗方法, 因此针对 PIH 的治疗探索也是皮肤科临床关注的问题。甘草酸苷是从中药甘草中提取的单体成分, 具有显著的抗炎活性^[2], 并被广泛应用于慢性活动性肝炎、肿瘤及多种过敏性疾病的治疗^[3-4]。有研究显示甘草酸苷等甘草提取物对色素增加性疾病有脱色素作用^[5], 但甘草酸苷对炎症后色素生成的具体作用机制目前还不明确。

有研究显示, 甘草酸苷能抑制寄生虫感染时 COX-2 介导的炎症反应^[6]。COX 主要有 COX-1 和 COX-2 异构体, COX-1 在生理状态下稳定表达于

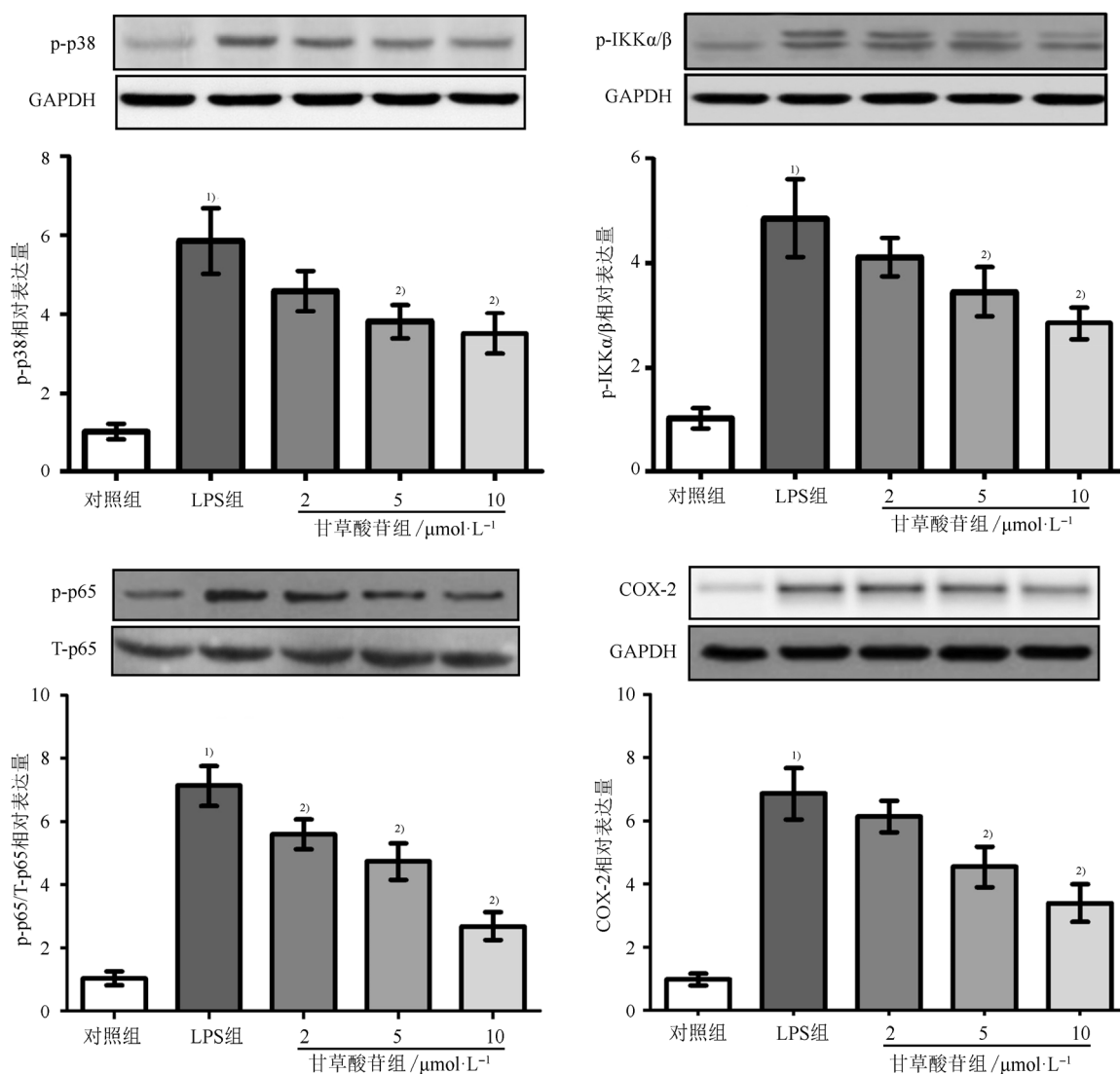


图4 甘草酸苷对LPS刺激后KC表达MAPK p-p38、p-IKKα/β、NF-κB p-p65和COX-2的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与LPS组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of glycyrrhizic acid on expression of MAPK p-p38, p-IKKα/β, NF-κB p-p65 and COX-2 in LPS-treated KC ($\bar{x} \pm s$, $n=6$) Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$.

所有细胞, 而COX-2则在细胞受到应激时大量表达。现有研究显示, KC与MC在人皮肤组织内形成表皮黑素单位; KC是在皮肤色素沉着过程中发挥重要作用的细胞, 它能分泌多种细胞因子, 并通过旁分泌方式作用于MC, 调节MC的生长和黑素的生成。皮肤受到炎性刺激等应激反应后可观察到KC中COX-2表达增高^[7]。COX-2促进花生四烯酸合成PGE₂, 进而COX-2及其下游产物PGE₂促进MC的黑素合成^[8]。相关临床研究也发现局部应用PGE₂可治疗白癜风^[9]。因此, 甘草酸苷可能是通过抑制LPS刺激后KC细胞COX-2表达, 进而减少PEG₂合成, 从而减少MC黑素生成。本研究结果也证实了这一假设。KC在LPS刺激后,

COX-2表达增高, PGE₂分泌增多; 而加用甘草酸苷干预后, KC细胞COX-2表达降低, PGE₂的分泌也随之减少, 其影响呈剂量依赖性。LPS刺激KC后, 与KC共培养的MC的黑素含量明显增高, 而用甘草酸苷干预后, 共培养的MC黑素含量呈剂量依赖性降低。提示甘草酸苷抑制KC细胞COX-2表达, 是其减少MC黑素生成的重要机制。

针对甘草酸苷调控LPS刺激KC细胞COX-2表达的机制, 笔者进行了更进一步研究。目前已知, p38是MAPK家族控制炎症反应最重要的成员, 它可由LPS、渗透性应激和紫外线照射而激活^[10]。活化的MAPK p38可磷酸化IκB, 导致IκB降解, 进而激活NF-κB。有研究显示, 肿瘤细胞

中 NF- κ B 的活化可导致 COX-2 过表达^[11-12]。NF- κ B 是一组具有特殊 DNA 结合序列的转录因子,参与细胞增殖与凋亡、炎症反应、免疫反应、肿瘤发生和发展等多种生理和病理过程。NF- κ B 在静止期与其抑制蛋白 I κ B 结合,组成一个三聚体 p50-p65-I κ B,以非活性形式存在于细胞浆中。当细胞受到 LPS 等因素刺激时,NF- κ B 诱导激酶被激活,刺激 IKK,使 I κ B 磷酸化,从三聚体中解离出来,NF- κ B 活化,p65 从细胞质中易位到细胞核中,与 DNA 接触,调控下游基因转录。上述研究结果提示,甘草酸苷可能通过影响 MAPK p38/NF- κ B 通路,从而调控 KC 细胞 COX-2 的表达。为验证这一假设,笔者检测了 LPS 刺激后 KC 细胞 p-p38、p-IKK α/β 、p-p65 和 COX-2 蛋白的表达,以及甘草酸苷干预后上述蛋白表达的变化。结果显示,LPS 刺激后,KC 的 p-p38、p-IKK α/β 、p-p65 和 COX-2 蛋白表达明显增加。而甘草酸苷干预后,呈剂量依赖式降低 KC 表达 p-p38、p-IKK α/β 、p-p65 和 COX-2 蛋白。证实甘草酸苷能通过浓度依赖的方式抑制 MAPK p38/NF- κ B 的活化,并进而减少 COX-2 表达。

综上所述,甘草酸苷作为中药甘草的提取物,在临床上已被用来治疗多种疾病,具有良好的药物安全性。研究证实,甘草酸苷可通过抑制 MAPK p38/NF- κ B 通路,降低 LPS 刺激 KC 诱导的 COX-2/PGE₂ 表达,减少 MC 黑素合成。研究结果有助于加深对药物治疗机制的认识和理解,为甘草酸苷用于 PIH 的临床治疗提供实验依据。但炎症后黑素生成是一个复杂的过程,在甘草酸苷减少黑素生成过程中是否还通过其他通路影响 KC 和 MC 的相互作用,以及 COX-2/PGE₂ 进一步作用于 MC 的机制,还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] MING L J, YIN A C. Therapeutic effects of glycyrrhizic acid [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(3): 415-418.
- [2] YANG R H, ZHANG Y M, YIN X. Treatment of herpes zoster by compound glycyrrhizin combined with acyclovir: a meta-analysis of randomized controlled trial [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(11): 1605-1610.
- [3] SU X, WU L, HU M, et al. Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(95): 670-678.
- [4] LI J Y, CAO H Y, LIU P, et al. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review [J]. *Biomed Res Int*, 2014(2014): 872139. Doi: 10.1155/2014/872139.
- [5] CALLENDER V D, ST SURIN-LORD S, DAVIS E C, et al. Postinflammatory hyperpigmentation: etiologic and therapeutic considerations [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2011, 12(2): 87-99.
- [6] BHATTACHARJEE S, BHATTACHARJEE A, MAJUMDER S, et al. Glycyrrhizic acid suppresses Cox-2-mediated anti-inflammatory responses during *Leishmania donovani* infection [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(8): 1905-1914.
- [7] 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.
- [8] CHUNG B Y, KIM S Y, JUNG J M, et al. The antimycotic agent clotrimazole inhibits melanogenesis by accelerating ERK and PI3K-/Akt-mediated tyrosinase degradation [J]. *Exp Dermatol*, 2015, 24(5): 386-388.
- [9] KAPOOR R, PHISKE M M, JERAJANI H R. Evaluation of safety and efficacy of topical prostaglandin E2 in treatment of vitiligo [J]. *Br J Dermatol*, 2009, 160(4): 861-863.
- [10] AKANDA M R, KIM I S, AHN D, et al. Anti-inflammatory and gastroprotective roles of *Rabdosia inflata* through downregulation of pro-inflammatory cytokines and MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): E584. Doi: 10.3390/ijms19020584.
- [11] HUANG C Y, LEE C H, TU C C, et al. Glucose-regulated protein 94 mediates progression and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via mitochondrial function and the NF- κ B/COX-2/VEGF axis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(10): 9425-9441.
- [12] ZHAO J, ZHU J, LV X, et al. Curcumin potentiates the potent antitumor activity of ACNU against glioblastoma by suppressing the Pi3K/AKT and NF- κ B/Cox-2 signaling pathways [J]. *Onco Targets Ther*, 2017(10): 5471-5482.

收稿日期: 2018-07-18

(本文责编: 蔡珊珊)