

# 黄芪复方对成纤维细胞胶原蛋白和 MMP 的影响

王凤楼<sup>1</sup>, 邓文娟<sup>2</sup>, 贺改英<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>莱博药妆技术(上海)股份有限公司, 上海 201203; <sup>2</sup>无限极有限公司, 广州 510000

**摘要:** 通过以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导成纤维细胞造成衰老模型, 观察黄芪复方对 I 型和 III 型胶原蛋白和细胞外基质金属蛋白酶(MMP-1 和 MMP-3) 的影响, 实验表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显著降低了 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 的表达, 明显升高了 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 的表达, 黄芪复方增加了衰老成纤维细胞 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 的表达, 同时降低了衰老成纤维细胞 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 的表达, 研究发现黄芪复方便具有延缓皮肤衰老的作用。

**关键词:** 黄芪复方; 成纤维细胞; I 型胶原蛋白; III 型胶原蛋白; 细胞外基质金属蛋白酶-1; 细胞外基质金属蛋白酶-3

中图分类号:

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0084-04

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.013

## The effect of Huangqi compound on collagen and MMP in fibroblasts

WANG Feng-lou<sup>1</sup>, DENG Wen-juan<sup>2</sup>, HE Gai-ying<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>LB Cosmeceutical Technology Co., Ltd, Shanghai 200233, China;

<sup>2</sup>Infinitus Company Ltd., Guangzhou 510663, China

**Abstract:** The effect of Huangqi compound on collagen type I, III, extracellular matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -3 in aging fibroblasts induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The experimental results showed that collagen type I and III mRNA were significantly decreased, and MMP-1 and MMP-3 mRNA was significantly increased in model group. Collagen type I and III mRNA were significantly increased by Huangqi compound in aging fibroblasts, at the same time, MMP-1 and MMP-3 mRNA were reduced. The study showed that Huangqi compound had the effect of anti-aging.

**Key words:** Huangqi compound; fibroblast; collagen type I; collagen type III; extracellular matrix; metalloproteinase-1; extracellular matrix metalloproteinase-3

皮肤衰老是一个复杂的过程, 它包括了表皮细胞更新能力改变, 真皮成纤维细胞以及细胞外基质变化, 皮肤免疫能力低下等一系列结构和功能的变化<sup>[1]</sup>。其中成纤维细胞是真皮结缔组织中最主要的细胞成分, 既合成和分泌胶原蛋白, 弹性蛋白, 生成胶原纤维、网状纤维和弹性纤维, 也合成和分泌糖胺多糖和糖蛋白等基质成分, 在皮肤的衰老中发挥了重要的作用。在成纤维细胞衰老过程中,  $\beta$ -半乳糖苷酶含量、不同类型胶原蛋白<sup>[2]</sup>、细胞外基质金属蛋白酶<sup>[3]</sup>均发生了改变, 目前也经常作为抗皮肤衰老研究的重要靶点。

黄芪复方是由黄芪、灵芝、石斛、人参、红花等组成, 在中医方面具有益气活血等延衰功效。黄芪为

豆科多年生草本植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根, 具有补气升阳、益卫固表、利水消肿、托疮生肌之功效<sup>[4]</sup>, 现代研究发现黄芪可以明显增加成纤维细胞的增殖<sup>[5]</sup>, 减低成纤维细胞衰老相关的半乳糖苷酶的含量<sup>[6]</sup>。灵芝具有补中益气、滋补强壮等功效, 在皮肤方面, 可以促进角质形成细胞的增殖, 提高其存活率和角质形成细胞超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性, 降低丙二醛(MDA)的含量, 减轻角质形成细胞氧化应激损伤, 延缓表皮细胞衰老作用<sup>[7]</sup>。石斛具有清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的作用, 可显著提高小鼠血清和肝组织中 SOD、GSH-Px 活力, 降低 MDA 含量<sup>[8]</sup>。人参是五加科人参属植物, 研究发现人参皂苷 Rb1<sup>[9]</sup>、Rb2<sup>[10]</sup>、Rb3<sup>[11]</sup>和 Rg3<sup>[12]</sup>, 具有明显降低 UVB 诱导的角化形成细胞 ROS, 前基质金属蛋白酶-2, 前基质金属蛋白酶-9 和降低基质金属蛋白酶 2 表达, 增加谷胱甘肽和 SOD 的活性。红花具

收稿日期: 2018-11-13 接受日期: 2018-12-24

\* 通信作者 Tel: 86-21-51086802-6575; E-mail: gaiyinghe2012@163.com

com

有活血通经、散瘀止痛的功效,研究发现红花主要活性成分可明显改善 UV 诱导的皮肤损伤,而其作用可能与其抗氧化的特性以及促进胶原蛋白合成来实现<sup>[13,14]</sup>。

本研究以  $H_2O_2$  诱导成纤维细胞作为衰老模型,观察黄芪复方对衰老成纤维细胞 I 型、III 型胶原蛋白、MMP-1 和 MMP-3 的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

DMEM 高糖培养基, Thermo Fisherscientific 公司;成纤维细胞,中国科学院上海细胞库;胎牛血清, Thermo Fisher scientific 公司;胰酶-EDTA, Thermo Fisher scientific 公司;  $H_2O_2$ , Sigma-Aldrich 公司; DM-SO, Sigma-Aldrich 公司;黄芪复方, 莱博药妆技术(上海)股份有限公司研发部门提供; HEPA Class 100  $CO_2$  培养箱, Thermo Fisher scientific 公司; Heraeus Pico21 冷冻离心机, Thermo Fisher scientific 公司; Format Class II A2 生物安全柜, Thermo Fisher scientific 公司; PrestoBlue 试剂盒, Thermo Fisher scientific 公司; SYNERGY 4 酶标仪, Gene 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 黄芪复方对成纤维细胞增殖的影响

浓度为  $2 \sim 3 \times 10^4$  cells/mL 成纤维单细胞悬液 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板,贴壁培养 24 h 后对细胞进行不同浓度药物处理。除对照组外,各实验组中加入用 PBS 稀释过的黄芪复方,终浓度依次是 10、20、30 g/L,每个浓度设置 6 个平行,生长 24 h 后利用 Presto Blue 法检测荧光吸光值,计算细胞存活率。

#### 1.2.2 黄芪复方对 $H_2O_2$ 诱导成纤维衰老细胞 I 型和 III 型胶原蛋白的影响

待成纤维单细胞在培养皿中生长 2~4 天融合至 80% 左右时,分别加终浓度为 10、20、30 g/L 的黄芪复方,其中对照组和模型组仅添加相应溶剂,24 h 后,除对照组外,其它组均加终浓度为 300  $\mu$ mol/L 的  $H_2O_2$ ,2 h 后提取各组细胞总 RNA,通过实时定量 PCR 技术对 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 的相对含量进行检测。

#### 1.2.3 黄芪复方对 $H_2O_2$ 诱导成纤维衰老细胞细胞外基质金属蛋白酶-1 和-3 的影响

待成纤维单细胞在培养皿中生长 2~4 天融合至 80% 左右时,分别加终浓度为 10、20、30 g/L 的黄芪复方,其中对照组和模型组仅添加相应溶剂,24 h 后,除对照组外,其它组均加终浓度为 300  $\mu$ mol/L

的  $H_2O_2$ ,2 h 后提取各组细胞总 RNA,通过实时定量 PCR 技术对 MMP-1 和 MMP-3 的相对含量进行检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄芪复方对成纤维细胞增殖的影响

通过观察黄芪复方对成纤维细胞存活率的影响;结果发现 10、20、30 g/L 的黄芪复方对成纤维细胞的存活率与对照组一样,没有明显变化( $P > 0.05$ ),说明以上黄芪复方的浓度是安全浓度,结果见图 1。

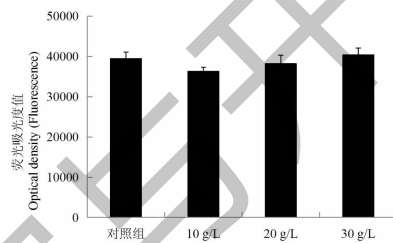


图 1 黄芪复方对成纤维细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 1 The effect of Huangqi compound on the survival rate of fibroblasts ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 2.2 黄芪复方对 $H_2O_2$ 诱导成纤维衰老细胞 I 型和 III 型胶原蛋白的影响

胶原蛋白占皮肤干重的 70%~80%,是真皮中主要的结构蛋白。在真皮基质中主要分布的是 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白,婴儿及青年人皮肤 I 型胶原蛋白约占 70%,III 型胶原蛋白约占 30%,I 型和 III 型胶原蛋白在维持皮肤拉伸强度和真皮组织和血管的稳定性方面起着重要的作用<sup>[15]</sup>。

通过对各组成纤维衰老细胞 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 检测;结果发现,与对照组比较,模型组 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达量显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ),与模型组比较,10、20、30 g/L 黄芪复方均显著增加了 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ),结果见图 2 和图 3。

### 2.3 黄芪复方对 $H_2O_2$ 诱导成纤维衰老细胞细胞外基质金属蛋白酶-1 和-3 的影响

MMP 是一组含锌蛋白酶家族,会降解不同的真皮基质蛋白,从而引起皮肤的衰老:它由 25 名成员组成,分为胶原酶类、明胶酶类、基质溶素和膜型 MMPs,不同类型的 MMP 降解不同的真皮基质蛋白,其中与皮肤密切关系的有 MMP-1 和 MMP-3;MMP-1 主要降解 I、II 和 III 型胶原蛋白,MMP-3 会降解大量细胞外基质,如 IV、V、IX 和 X 型胶原,明胶,纤维

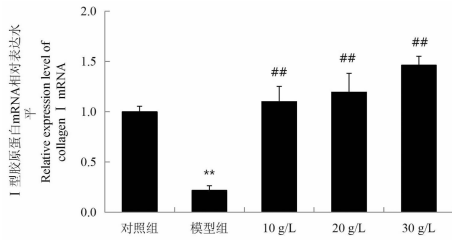


图2 复方对  $H_2O_2$  诱导成纤维衰老细胞 I 型胶原蛋白 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 The effect of Huangqi compound on collagen type I mRNA expression in aging fibroblasts induced by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: \*  $P < 0.01$ , 与对照组比较; ##  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

Note: \*  $P < 0.01$ , vs control group; ##  $P < 0.01$ , vs model group.

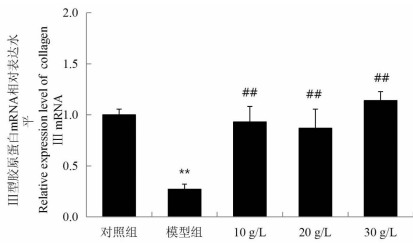


图3 黄芪复方对  $H_2O_2$  诱导成纤维衰老细胞 III 型胶原蛋白 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 The effect of Huangqi compound on collagen type III mRNA expression in aging fibroblasts induced by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: \*  $P < 0.01$ , 与对照组比较; ##  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

Note: \*  $P < 0.01$ , vs control group; ##  $P < 0.01$ , vs model group.

蛋白-1, 纤连蛋白, 层粘连蛋白和蛋白聚糖, 除此以外, 它还会激活 MMP 前体, 促进其它 MMP 的产生<sup>[16]</sup>, 研究发现在衰老的过程中, MMP-1<sup>[17]</sup> 和 MMP-3 表达含量增加, 引起不同类型的胶原和其它蛋白的降解, 从而造成皱纹加深, 皮肤松弛等衰老现象。

通过检测不同浓度的黄芪复方对各组 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 的作用, 结果发现: 与对照组比较, 模型组的 MMP-1 mRNA 显著升高 ( $P < 0.01$ ), 10 g/L 黄芪复方明显降低了 MMP-1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 20 和 30 g/L 的黄芪复方显著降低了 MMP-1 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 4。与对照组比较, 模型组的 MMP-3 mRNA 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 10、20、30 g/L 的黄芪复方显著降低了 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 5。

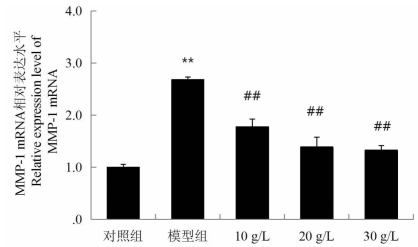


图4 黄芪复方对  $H_2O_2$  诱导成纤维衰老细胞 MMP-1 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 The effect of Huangqi compound on MMP-1 mRNA expression in aging fibroblasts induced by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: \*  $P < 0.01$ , 与对照组比较; ##  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

Note: \*  $P < 0.01$ , vs control group; ##  $P < 0.01$ , vs model group.

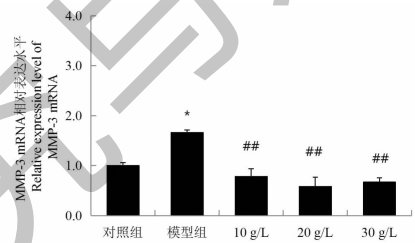


图5 黄芪复方对  $H_2O_2$  诱导成纤维衰老细胞 MMP-3 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 The effect of Huangqi compound on MMP-3 mRNA expression in aging fibroblasts induced by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: \*  $P < 0.01$ , 与对照组比较; ##  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

Note: \*  $P < 0.01$ , vs control group; ##  $P < 0.01$ , vs model group.

### 3 结论

本实验通过  $H_2O_2$  刺激成纤维细胞建立衰老细胞模型, 发现 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达降低, MMP-1 和 MMP-3 mRNA 表达升高, 黄芪复方作用于衰老成纤维细胞, 结果发现黄芪复方上调了 I 型和 III 型胶原蛋白细胞 mRNA 的表达, 降低了 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 的表达。黄芪复具有延衰功效, 可望成为一种全新的中草药活性添加剂应用到延衰护肤产品中。

### 参考文献

- Rittié L, Fisher G J. Natural and sun-induced aging of human skin[J]. CSH Perspect Med, 2015, 5: 15370.
- Kim J, Kim MB, Yun JG, et al. Protective effects of standardized *Siegesbeckia glabrescens* extract and its active compound kirenol against UVB-induced photoaging through inhibition of

- MAPK/NF- $\kappa$ B pathways [J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27:242-250.
- 3 Hwang E, Ngo HTT, Park B, et al. Myrcene, An aromatic volatile compound, ameliorates human skin extrinsic aging via regulation of MMPs production [J]. Am J Chin Med, 2017, 45(5):1-12.
  - 4 Chen CY, Lu Y, Lu Z. Survey of studies on *Astragalus membranaceus* var. *mongolicus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2001, 32:567-569.
  - 5 Hsu MF, Chiang BH. Stimulating effects of *Bacillus subtilis* natto-fermented radix astragali on hyaluronic acid production in human skin cells [J]. Ethnopharmacol, 2009, 125:474-481.
  - 6 Wang P, Zhang Z, Ma X, et al. HDTIC-1 and HDTIC-2, two compounds extracted from Astragali Radix, delay replicative senescence of human diploid fibroblasts [J]. Mech Ageing Dev, 2003, 124:1025-1034.
  - 7 Xie SQ. Study of *Ganoderma lucide* polysaccharide against skin aging and related gene expression [D]. Shanghai: Second Military Medical University (第二军医大学), 2007.
  - 8 Wang Sh, Gong JH, Zhang HJ, et al. Study on the internal antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrobium* [J]. Chin Practical Med (中国实用医药), 2009, 30(4):15-16.
  - 9 Oh SJ, Kim K, Lim CJ. Protective properties of ginsenoside Rb1 against UV-B radiation-induced oxidative stress in human dermal keratinocytes [J]. Pharmazie, 2015, 70:381-387.
  - 10 Oh SJ, Kim K, Lim CJ. Suppressive properties of ginsenoside Rb2, a protopanaxadiol-type ginseng saponin, on reactive oxygen species and matrix metalloproteinase-2 in UV-B-irradiated human dermal keratinocytes [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2015, 79:1075-1081.
  - 11 Oh SJ, Oh Y, Ryu IW, et al. Protective properties of ginsenoside Rb3 against UV-B radiation-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2015, 80:95-103.
  - 12 Lim CJ, Choi WY, Jung HJ. Stereoselective skin anti-photoaging properties of ginsenoside Rg3 in UV-B-irradiated keratinocytes [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37:1583-1590.
  - 13 Kong SZ. Anti-aging effects of hydroxysafflor yellow A [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (广州中医药大学), 2014.
  - 14 Tian J, Li G, Liu Z, et al. Hydroxysafflor yellow A inhibits rat brain mitochondrial permeability transition pores by a free radical scavenging action [J]. Pharmacology, 2008, 82:121-126.
  - 15 Holick, M. F., MacLaughlin, J. A., Clark, M. B., et al. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences [J]. Science, 1980, 210:203-205.
  - 16 Pittayapruerk P, Meephansan J, Prapapan O, et al. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17:868.
  - 17 Quan T, Fisher GJ. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review [J]. Gerontology, 2015, 61:427-434.
- 
- (上接第 148 页)
- 40 Bao LJ, et al. Inhibitory effects of water extracts from four species of *Dendrobiums* on HeLa S3 cells and HepG2 cells [J]. J Anhui Agr Sci (安徽农业科学), 2008, 36:1596-1597.
  - 41 Wang, J, et al. Study on the mechanism of extracts from fresh *Dendrobium candidum* against lewis lung cancer [J]. Chin J Modern Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2014, 31:953-957.
  - 42 Sun J, et al. *Dendrobium candidum* inhibits MCF-7 cells proliferation by inducing cell cycle arrest at G2/M phase and regulating key biomarkers [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9:21-30.
  - 43 Wu HS, et al. Studies on anti-hyperglycemic effect and its mechanism of *Dendrobium candidum* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2011, 29:160-163.
  - 44 Chen YL, et al. Hypoglycemic effect of the polysaccharide from *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. J Zhejiang Univ (Sci Ed) (浙江大学学报(理学版)), 2003, 30:693-696.
  - 45 Zhen HD. Summary of hypoglycemic effect and therapeutic mechanism of *Dendrobium* and its compound preparation [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2011, 23:24-25.
  - 46 Zhang ZY, et al. Study on the value of polysaccharide in *Dendrobium candidum* in antibacterial action. Guide China Med (中国医药指南), 2012, 10:439-440.
  - 47 Tang XH, et al. Effects of *Dendrobium candidum* on SOD, MDA and gsh-px in mice with acute alcoholic liver injury [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med (浙江中医杂志), 2010, 45:369-370.
  - 48 Hou SZ, et al. Study on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Dendrobium officinale* [J]. Prog Vet Med (动物医学进展), 2012, 33:49-52.