

人参皂苷Rb2通过p38 MAPK信号通路 调节皮肤屏障和保湿功能

胡海悦^{1,2}, 袁林丽^{1,2}, 俞佳乐², 牛志强², 周宁³, 尤龙^{2*}, 张迹^{1,2*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052) (2. 淮阴师范学院生命科学院, 江苏淮安 223300)
(3. 江苏食品药品职业技术学院药学院, 江苏淮安 223003)

摘要: 人参皂苷 Rb2 (Ginsenoside-Rb2, Rb2) 具有抗衰老、抗光老化、抗炎、等多种生理功能。为了明确 Rb2 调节皮肤屏障和保湿的作用机制, 本文通过网络药理学结合生物信息学以及蛋白印迹等实验方法进行系统研究。结果显示, Rb2 在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内对细胞无显著毒性, 能有效上调透明质酸合成酶-1 (Hyaluronan Synthase-1, HAS-1)、透明质酸合成酶-2 (Hyaluronan Synthase-2, HAS-2)、密封蛋白 (Claudin)、闭锁蛋白 (Occludin) 的 mRNA 表达水平。基于多个数据库的预测分析, 发现 Rb2 对皮肤保护作用包括血管内皮生长因子 A (Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGFA)、信号转导和转录激活因子 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT3) 等 11 个潜在作用靶点。通路富集分析表明其可能通过磷脂酰肌醇 3 激酶 (Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (Protein Kinase B, AKT)、Janus 激酶 (Janus Kinase, JAK)/STAT、丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK) 等信号通路发挥作用。蛋白印迹结果表明, Rb2 能够促进 p38 MAPK、CREB 等蛋白的磷酸化以及 c-Jun 和 c-Fos 入核。本研究阐明了 Rb2 对皮肤保护的作用机制, 为化妆品的开发及应用提供理论依据。

关键词: 人参皂苷 Rb2; 皮肤保湿; 皮肤屏障; p38 MAPK

文章编号: 1673-9078(2026)06-149-157

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0421

Ginsenoside Rb2 Regulates Skin Barrier and Hydration Functions via the p38 MAPK Signaling Pathway

HU Haiyue^{1,2}, YUAN Linli^{1,2}, YU Jiale², NIU Zhiqiang², ZHOU Ning³, YOU Long^{2*}, ZHANG Ji^{1,2*}

(1.College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)
(2.School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)
(3.Department of Pharmacy, Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, Huaian 223003, China)

Abstract: Ginsenoside Rb2 (Rb2) exerts various physiological effects, including anti-aging, anti-photoaging, and anti-inflammatory effects. To elucidate the mechanisms by which Rb2 regulates skin barrier and hydration functions, a systematic investigation was conducted using network pharmacology, bioinformatics, and experimental methods such as western blotting.

引文格式:

胡海悦,袁林丽,俞佳乐,等.人参皂苷Rb2通过p38 MAPK信号通路调节皮肤屏障和保湿功能[J].现代食品科技,2026,42(6): 149-157.

HU Haiyue, YUAN Linli, YU Jiale, et al. Ginsenoside Rb2 regulates skin barrier and hydration functions via the p38 MAPK signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 149-157.

收稿日期: 2025-03-25; 修回日期: 2025-05-24; 接受日期: 2025-05-27

基金项目: 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究重大项目(23KJA550001); 江苏高校“青蓝工程”资助项目([2023]27)

作者简介: 胡海悦(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养学, E-mail: hhy991108@163.com

通讯作者: 张迹(1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养学, E-mail: zhangji@hytc.edu.cn; 共同通讯作者: 尤龙(1993-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 药理学与皮肤生理学, E-mail: youlonghc@163.com

At concentrations up to $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Rb2 exhibited no significant cytotoxicity and effectively upregulated the mRNA levels of hyaluronan synthases 1 and 2, claudin, and occludin. Predictive analysis using multiple databases identified 11 potential Rb2 targets related to skin protection, including vascular endothelial growth factor A and signal transducer and activator of transcription (STAT)3. Pathway enrichment analysis suggested that Rb2 may exert its effects via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, Janus kinase/STAT, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. Western blotting results demonstrated that Rb2 promotes the phosphorylation of p38 MAPK and CREB, as well as the nuclear translocation of c-Jun and c-Fos. This study elucidates the mechanism underlying the skin-protective effects of Rb2, providing a theoretical foundation for the development and application of cosmetics.

Key words: ginsenoside Rb2; skin hydration; skin barrier; p38 MAPK

皮肤是人体与周围环境之间的接口, 是人体最大的器官, 能够保护肌体防止受伤, 并能通过感觉神经感知周围环境, 还具有为肌体提供免疫保护等多种基本功能^[1]。皮肤由表皮、真皮和皮下层三层组成, 在这三层中, 表皮是最外层的, 直接与外部环境接触^[2]。而角质层又是表皮的最外层, 由死亡的角质细胞和细胞间脂质组成, 提供疏水屏障, 保护人体免受水分流失、病原体、刺激物和过敏原的侵害^[3]。表皮的屏障功能依赖于多种关键蛋白和酶的协同作用, 其中 HAS 通过催化透明质酸的生成, 维持皮肤表层的保水能力和屏障修复能力^[4]。此外, 紧密连接 (Tight Junctions, TJs) 是细胞间粘附的一种形式, 它们由密封链网络构成, 作为阻止溶质通过细胞间隙扩散的主要屏障, 每条密封链由排列成行的跨膜蛋白组成^[5]。其中 Claudin 和 Occludin 是紧密连接中主要的跨膜蛋白类型, 来确保表皮结构的完整性和通透屏障功能^[6]。皮肤屏障机制的建立和维持依赖于严格调控的角质形成细胞分化程序, 分化程序的紊乱常导致皮肤屏障缺陷和炎症性皮肤病^[7]。这些危害不仅影响外观, 还可能损害整体的身体健康和生活质量。

人参 (*Panax ginseng*) 是一种多年生植物, 作为我国传统名贵中草药, 在医药领域已有数千年的使用历史^[8]。人参皂苷是人参的主要活性成分, 主要分为原人参二醇型 (Protopanaxadiol, PPD) 和原人参三醇型 (Panaxotriol, PPT) 两种类型^[9]。PPD 型人参皂苷 (包括 Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、F2、Rg3、Compound K 和 Rh2 等) 主要在抗光老化^[10]、促进伤口愈合^[11]和抗炎^[12]等方面发挥重要作用。而 PPT 型人参皂苷 (包括 F1、Rg1、Rg2 和 Re 等) 主要在抗衰老^[13]、免疫调节^[14]和美白^[15]等方面发挥作用。人参皂苷 Rb2 是一种活性 PPD 型皂苷, 广泛分布在人参的茎、叶和浆果中^[16]。Yang 等^[17]研究发现 Rb2 可以通过 AMPK-mTOR 通路激活自噬并诱导 DRAM2 来逆转细胞衰老。此外, 有研究证明 Rb2 在人真皮成纤维细胞中对 UV-B 诱导的氧化应激起光保护作用^[18]。然而,

Rb2 对皮肤保湿和屏障功能的调节作用及潜在机制仍需进一步深入研究。相较于维生素 C 易氧化失活、透明质酸依赖外源补充, Rb2 通过多靶点调控实现内源性屏障修复, 兼具抗氧化、抗炎及抗光老化协同优势, 突破传统成分单一作用局限。本文基于人皮肤角质形成细胞 HaCaT 实验平台, 通过网络药理学、生物信息学、PCR, 以及蛋白免疫印迹等多种研究方法, 深入探讨了人参皂苷 Rb2 调节皮肤屏障和保湿的潜在作用靶点和信号通路, 为后续开发化妆品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人参皂苷 Rb2 (纯度 >98%, HPLC), 购自成都曼斯特生物科技有限公司; Trizol 和台盼蓝, 购自 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS)、MEM 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS) 等细胞培养相关试剂, 由 Gibco 提供; 青霉素-链霉素 (AB) 和胰蛋白酶, 来自 Cytiva 公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、TEMED、甘氨酸、Tween-20, 购自阿拉丁公司; 甲氮甲唑蓝 (MTT), 购自 BioFRox; 细胞裂解液和超敏 BCA 蛋白定量试剂盒, 购自碧云天公司; 核蛋白提取试剂盒, 购自康为世纪; eCL 化学发光试剂盒, 由 Thermo Fisher 提供; 反转录试剂盒及 SYBR®Realtime PCR 试剂盒, 购自宝日医生物技术有限公司 (Takara); 牛血清白蛋白 (BSA), 购自 AMRESCO; PVDF 膜, Bio-Rad; 免疫印迹用抗体: 如 ERK (4348S)、p-JNK (4671S)、JNK (9252S)、p-p38 (9215S)、p38 (9212S)、p-CREB (9198S)、CREB (4820S)、c-Jun (9165S)、c-Fos (2250S) 等抗体, 均购自 CST; p-ERK (ET1603-22) 抗体, 购自 HUABIO; β -actin (ab3280)、Lamin A/C (ab315838)、Anti-Rabbit IgG (HRP) (ab6721)、Anti-Mouse IgG (HRP) (ab6728) 等抗体, 购自 Abcam; 甲醇、无水乙醇、异丙醇、氯化钠、十二烷基硫酸钠 (SDS)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、过硫酸铵等基础化学试剂均

为分析纯试剂，购自国药集团。

1.2 主要仪器设备

HERACELL I50i 二氧化碳培养箱，赛默飞世尔科技公司；IX71 倒置生物显微镜，日本 Olympus 公司；5810R 台式冷冻高速离心机，德国 Eppendorf 公司；Tanon-5200 Multi 荧光及化学发光成像系统，上海天能科技有限公司；Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪，瑞士 Tecan 公司；实时荧光定量 PCR 仪、Power PacTMHC 电泳槽、Gel XP System 凝胶成像系统，Bio-Rad。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞复苏与继代培养

本研究所用人皮肤角质形成细胞系 HaCaT 由武汉大学中国典型培养物保藏中心（CCTCC）提供，并于液氮中冻存。将冻存于液氮中的 HaCaT 细胞取出，于 37℃ 水浴中快速解冻（时间不超过 1 min），迅速将细胞转移至含 FBS 和青-链霉素的 MEM 培养基中进行复苏与培养。定期显微观察细胞的贴壁程度和生长状态。新复苏的细胞经 2~3 次继代，细胞状态稳定后既可用于后续实验。

1.3.2 细胞毒性试验

本文采用 MTT 法检测人参皂苷 Rb2 的细胞毒性。将 HaCaT 细胞以每孔 8×10^5 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中，过夜培养。分别用终浓度为 5、10、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Rb2 处理细胞 24 h。另设未经 Rb2 处理的对照组和未接种细胞的空白组，各组均设置 5 个复孔。各组细胞给药处理结束后，弃去原有培养基，每孔避光加入 100 μL MTT 工作液，于细胞培养箱中孵育 4 h 后，加入 100 μL MTT 终止液，继续孵育 16~20 h。待紫色结晶充分溶解后，用酶标仪在 570 nm 处测量吸光值，并按以下公式计算其细胞毒性：

$$C=\frac{A_1-B}{A_2-B}\times 100\%$$

(1)

式中：

- C——细胞存活率，%；
- A_1 ——实验组吸光值；
- A_2 ——对照组吸光值；
- B——空白组吸光值。

1.3.3 RT-PCR检测皮肤相关基因mRNA相对表达量

以每孔 5×10^5 个细胞接种 HaCaT 细胞于 6 孔板中，过夜培养。用终浓度为 5、10、15、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Rb2 处理细胞 24 h。弃去培养基，用 PBS 润洗 1~2 次以去除残留培养基，再加入 1 mL Trizol 试剂以收集并

裂解细胞，随后按 Trizol 法流程提取细胞总 RNA。以细胞总 RNA 为模版，使用反转录试剂盒合成 cDNA。以 GAPDH 为内参基因，对 HAS-1、HAS-2、Claudin、Occludin 等皮肤保湿和屏障功能相关基因 mRNA 的转录水平进行 RT-PCR 检测分析。该实验所用引物由上海生工合成，其序列见表 1。

表 1 本研究所用 RT-PCR 引物
Table 1 Primers used in the present study

基因名称		引物序列（5' to 3'）
HAS-1	F	CCACCCAGTACAGCGTCAAC
	R	CATGGTGCTTCTGTCGCTCT
HAS-2	F	TTCTTTATGTGACTCATCTGTCTCACCGG
	R	ATTGTTGGCTACCAGTTTATCCAAACG
Claudin	F	AGGAACACATTTATGATGAGCAG
	R	GAAGTCATCCACAGGCGAA
Occludin	F	GAAGATGAGGATGGCTGTCA
	R	AAATTCGTACCTGGCATTGA
GAPDH	F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	R	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT

1.3.4 生物信息学分析

1.3.4.1 人参皂苷Rb2相关靶点预测

在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 以及本草组鉴数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 中检索 ginsenoside Rb2 结构信息，将获得的结构信息在小分子-蛋白靶点数据库 (Swiss Target Prediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中进行检索，获得人参皂苷 Rb2 的靶点信息。

1.3.4.2 皮肤相关靶点预测及核心靶点筛选

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中以 skin 为检索词查找皮肤相关靶点信息，选取相关分数 Relevance score > 5 作为分析靶点。将 Rb2 的靶点信息与皮肤相关靶点信息进行比对，取交集，即获得 Rb2 调节皮肤健康的潜在作用靶点。

1.3.4.3 GO及KEGG通路富集分析

利用 OmicShare 云平台 (<https://www.omicshare.com/>) 的在线工具对 Rb2 潜在作用靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。先将潜在作用靶点的 Gene Symbol 转换为 Ensembl Gene ID，再上传至 OmicShare 云平台中相应的在线工具，分别进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.3.4.4 PPI网络建立

将 Rb2 调节皮肤健康的潜在作用靶点信息导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>)，选择 Multiple Proteins 选项，Organism 选择为 Homo Sapiens，点击

Exports 选择 download 获取 PPI 网络节点文件。然后将文件导入 Cytoscape version3.10.1 软件 (Cytoscape Consortium, California, USA), 绘制靶点蛋白互作的 PPI 网络关系图。

1.3.5 免疫印迹检测PI3K/Akt/p38信号通路关键蛋白

以每孔 8×10^5 个细胞接种 HaCaT 细胞于 60 mm 培养皿中, 过夜培养后使用终浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Rb2 处理 24 h。弃去培养基, PBS 润洗后, 使用细胞刮板收集细胞至离心管中。用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白; 使用核蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白。所有蛋白样品经 BCA 蛋白定量试剂盒定量后, 进行 SDS-PAGE 电泳分离。电泳结束后, 通过转膜将蛋白转移至 PVDF 膜。室温封闭 1 h, 经 TBST 洗膜后, 加入按照 1:1 000 比例稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。再经 TBST 洗膜后, 加入按照 1:2 500 比例稀释的二抗, 室温孵育 1.5 h。TBST 洗膜三次后, 加入发光液, 使用化学发光系统进行曝光成像。

1.3.6 数据处理及统计分析

使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析, 所有数据采用单因素 ANOVA 方差分析, 每组数据至少重复 3 次, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 人参皂苷Rb2对HaCaT细胞活力的影响

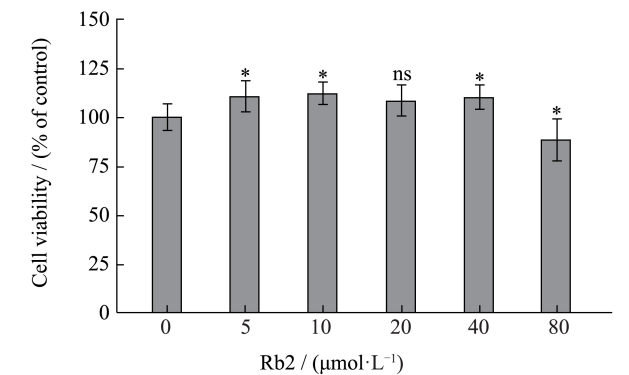


图 1 Rb2 对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig.1 Effect of Rb2 on cell vitality of HaCaT cell

注: 与对照组比较, *表示 $P<0.05$, ns 表示无显著差异。下同。

为了研究人参皂苷 Rb2 对 HaCaT 细胞活力的影响, 为后续研究探索安全的给药浓度, 本文采用 MTT 法检测了不同浓度 Rb2 处理下的 HaCaT 细胞相对活力。结果如图 1 所示, 在 $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内的测试浓度下, 经 24 h 处理后, Rb2 在 $5\sim40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内均未对 HaCaT 的细胞活性造成显著抑制, 表明

Rb2 在 $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内对 HaCaT 细胞没有明显的细胞毒作用。因此, $5\sim40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是 Rb2 处理 HaCaT 细胞的安全给药浓度范围, 后续研究均在该范围内设置 Rb2 给药剂量。

2.2 人参皂苷Rb2对皮肤屏障和保湿基因 mRNA表达水平的影响

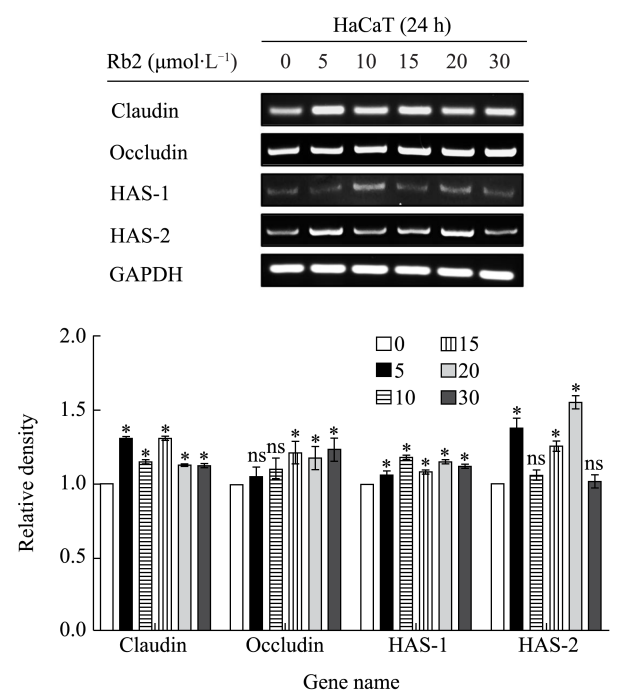


图 2 RT-PCR 检测 Rb2 对皮肤屏障和保湿基因 mRNA 表达量的影响

Fig.2 Effect of Rb2 on mRNA expression levels of skin barrier and hydration genes detected by RT-PCR

在表皮颗粒层中, TJs 作为防止水分流失的首道物理防线, 是由跨膜蛋白 (Claudin、Occludin、黏连蛋白等) 与胞质锚定蛋白共同构成的动态连接复合体^[19]。其中, Claudin 与 Occludin 作为 TJ 的核心结构蛋白, 其表达异常可导致表皮通透性增加、细胞间黏附力减弱^[20], 并与多种皮肤疾病的发生发展密切相关。在皮肤保湿机制中, 透明质酸 (Hyaluronic Acid, HA) 发挥着核心作用。人体约 50% 以上的 HA 分布于表皮与真皮层, 其含量与皮肤含水量呈显著正相关^[21]。HA 是一种非硫酸化糖胺聚糖 (Glycosaminoglycan, GAG), 通过强大的亲水性可结合自身重量千倍的水分子, 赋予皮肤弹性与湿润度。不同于其他通过高尔基体合成的蛋白聚糖型 GAG, HA 由 HAS 直接催化生成^[2]。HAS 表达的降低会诱发皮肤老化, 包括保湿屏障缺陷、表皮萎缩、皱纹形成、皮肤水分减少和弹性降低。此外研究表明, HAS 与角质形成细胞增殖分化能力及表皮厚度呈正相关^[22]。皮肤老化过程中 HA

含量下降及聚合度改变，会引发皮肤保湿能力衰退与屏障功能损伤，两者互为因果形成恶性循环^[23]，加速皮肤生理功能退化。因此，维持 HA 稳态是延缓皮肤衰老、修复屏障缺陷及防治相关皮肤病的重要靶点。本研究通过 PCR 技术在 HaCaT 细胞中检测屏障相关蛋白 (*Claudin*、*Occludin*) 及保湿关键酶 (*HAS-1*、*HAS-2*) mRNA 表达水平的影响，旨在为开发新型皮肤保护策略提供理论依据。如图 2 所示，经 24 h 给药处理后，Rb2 对 HaCaT 细胞内的 *Claudin*、*Occludin*、*HAS-1* 和 *HAS-2* 的 mRNA 表达水平均有明显的促进作用。

进一步通过 RT-qPCR 检测 *Claudin*、*Occludin*、*HAS-1* 和 *HAS-2* 的 mRNA 表达情况，如图 3 所示，Rb2 处理后显著增强了上述皮肤屏障和保湿基因的 mRNA 表达水平。该结果表明，人参皂苷 Rb2 可以调节皮肤屏障和保湿相关基因的表达水平，具有皮肤保护作用。

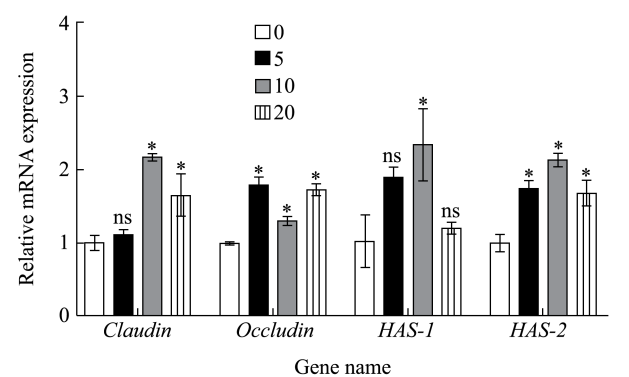


图 3 RT-qPCR 检测 Rb2 对皮肤相关基因 mRNA 表达量的影响

Fig.3 Effect of Rb2 on mRNA expression levels of skin barrier and hydration genes detected by RT-qPCR

2.3 人参皂苷Rb2皮肤保护作用的靶点分析

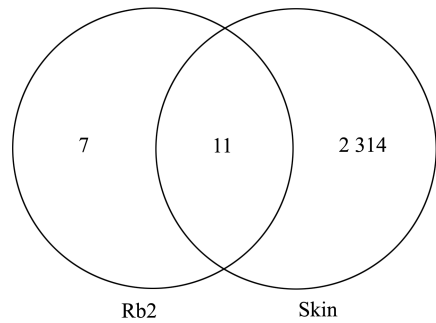


图 4 Rb2-皮肤交集靶点

Fig.4 Rb2-skin intersection targets

为深入探究人参皂苷 Rb2 发挥其皮肤保护作用的潜在机制，本研究通过对 Swiss Target Prediction 数据

库和 GeneCards 数据库的检索分析，分别检索获得 18 个 Rb2 相关靶点信息 (Probability>0) 和 2 325 个皮肤相关靶点 (Relevance score≥5)，并将两者进行比对取交集 (图 4)，从而获得 11 个 Rb2 发挥皮肤保护作用的潜在靶点 (表 2)。

表 2 Rb2-皮肤靶点			
Table 2 Rb2-skin targets			
序号	蛋白名称	基因符号	蛋白数据库 ID
1	Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	P40763
2	Platelet activating factor receptor	PTAFR	P25105
3	Interleukin-2	IL2	P60568
4	Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	P15692
5	Acidic fibroblast growth factor	FGF1	P05230
6	Basic fibroblast growth factor	FGF2	P09038
7	Nuclear receptor ROR-gamma	RORC	P51449
8	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	P07900
9	Galectin-3	LGALS3	P17931
10	Apoptosis regulator Bcl-X	BCL2L1	Q07817
11	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1	HSD11B1	P28845

2.4 人参皂苷Rb2皮肤保护潜在作用靶点GO富集分析

基于 OmicShare 平台对 Rb2-皮肤作用靶点的 GO 富集分析，结果如图 5 所示，Rb2 对皮肤的潜在保护机制涉及多维度生物学调控。在生物过程 (Biological Process) 层面，Rb2 相关靶点显著富集于代谢过程、细胞进程、正向调控生物进程及信号传导。其中，Sun 等^[24]的研究表明 Rb2 可通过激活 AMPK 信号通路，显著改善 LPS 诱导的内皮细胞 (HUVECs) 和单核细胞 (THP-1) 的炎症反应及内质网应激 (ER stress)，提示其通过能量代谢参与炎症调控，进一步佐证了代谢调控的重要性。在分子功能 (Molecular Function) 方面，靶点主要富集于结合活性、催化活性、分子功能调节及信号转导活性。Oh 等^[18]发现 Rb2 可特异性抑制基质金属蛋白酶 (MMPs) 的催化活性，减少紫外线诱导的胶原降解，从而延缓皮肤光老化进程。细胞组分 (Cellular Component) 分析表明，靶点主要定位在细胞结构体和蛋白质复合物，提示 Rb2 可能通过调控细胞结构完整性及蛋白质互作网络发挥保护效应。综上，Rb2 的皮肤保护作用可能通过多靶点协同实现。

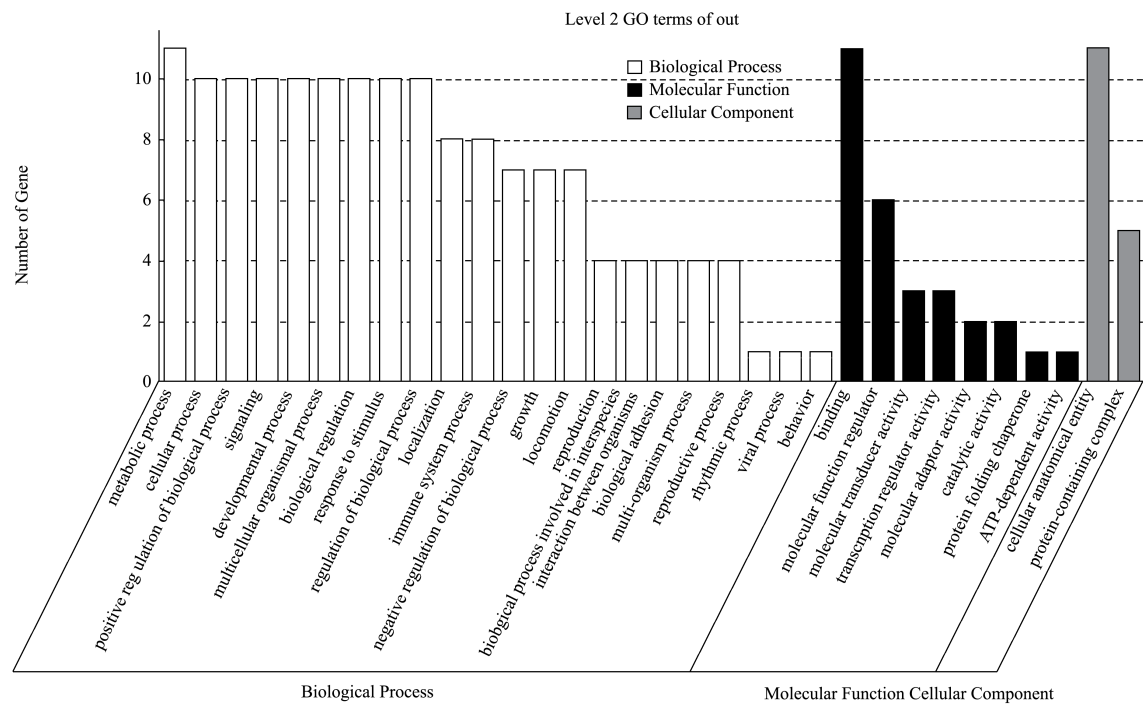


图 5 Rb2- 皮肤潜在靶标 GO 富集分析

Fig.5 GO enrichment analysis of potential Rb2-skin targets

2.5 人参皂苷Rb2皮肤保护潜在作用靶点 KEGG通路富集分析

为深入阐明 Rb2 在皮肤保护作用中调控的潜在信号通路，本研究进一步将 11 个潜在靶点进行了 KEGG 通路富集分析。如图 6a 所示，这些作用靶点主要富集于人类疾病、环境信息过程、有机系统、细胞过程、代谢、遗传信息过程等六大模块中的癌症、传染性疾病、抗药性、免疫性疾病、心血管疾病、内分泌代谢性疾病等疾病相关信号通路；信号转导、信号分子和相互作用等环境信息相关信号通路；以及免疫、内分泌、环境适应等有机系统相关信号通路。

图 6b 为 Rb2 发挥皮肤保护作用潜在靶点富集的前 20 条信号通路。如图 6b 所示，这 20 条信号通路中包括 PI3K/Akt 信号通路、JAK/STAT 信号通路、MAPK 信号通路等。经典的 PI3K/Akt 通路与多种生理活动的调节有关，包括细胞增殖、分化、凋亡、血管生成、代谢和蛋白质合成^[25]。Choi 等^[26]发现 Rb2 联合 Rg3 可以通过 CXCR1/2 和 CXCL8 介导的 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路，显著促进血管生成。在皮肤中，PI3K/Akt 通路的激活主要负责维持皮肤稳态，它参与表皮屏障功能维持、伤口愈合及紫外线损伤修复^[27]。JAK/STAT 通路介导细胞因子信号传导，与炎症和自身免疫性疾病的发病机制有关^[28]。Ma 等^[29]研究表明 Rb2 通过 NF- κ B/MAPK 信号通路抑制睾丸切除术小鼠的破骨细胞生成并减轻骨质流失。此外，MAPK 家族在皮肤应激反应中起重要作用。ERK 促进伤口愈

合^[30]，而 p38 和 JNK 响应 UV 或炎症刺激^[31]。因此综上所述，人参皂苷 Rb2 可能通过调节这些信号通路来发挥对皮肤健康的调节作用。

靶点 - 通路网络图能够反应靶点与信号通路之间的富集关系，靶点以及通路节点的大小根据富集的 degree 值大小排序，即节点越大富集的靶点或通路越多。如图 6c 所示，人参皂苷 Rb2 皮肤保护的潜在靶点在信号通路富集中节点富集度靠前的主要包括 STAT3、VEGFA、FGF2、BCL2L1、FGF1、IL2 等靶点。该结果表明 Rb2 是主要通过作用于这些靶点调节上述信号通路，从而发挥其皮肤保护作用。

2.6 靶点蛋白互作PPI网络

为进一步筛选 Rb2 发挥皮肤保护作用的关键作用靶点，本研究绘制了 Rb2- 皮肤靶点蛋白互作图（图 7）。PPI 网络图显示了靶点间直接或间接调控作用，如图 7 所示，VEGFA 和 STAT3 与各靶点间的相互作用最多。据此判断其为 Rb2 皮肤保护作用的关键靶点。VEGFA 作为血管生成的核心调控因子，通过结合 VEGFR 受体激活内皮细胞增殖、迁移及血管通透性。在皮肤中具有多生物生物学功能，除驱动血管新生外，还可通过调控表皮修复、屏障稳态及免疫微环境参与皮肤保护^[32,33]。STAT3 作为 JAK/STAT 通路的核心转录因子，可被 IL-6、IL-22 等细胞因子激活，通过协调细胞增殖、存活及免疫反应维持皮肤动态平衡^[34]。两者可能存在协同调控作用，协同促进血管新生和表皮再生维持皮肤健康。



图 6 Rb2-皮肤潜在靶点 KEGG 通路富集分析

Fig.6 KEGG pathway enrichment analysis of potential Rb2-skin targets

注: (a) 通路注释直方图; (b) 前 20 通路富集气泡图; (c) 通路-靶点网络图。

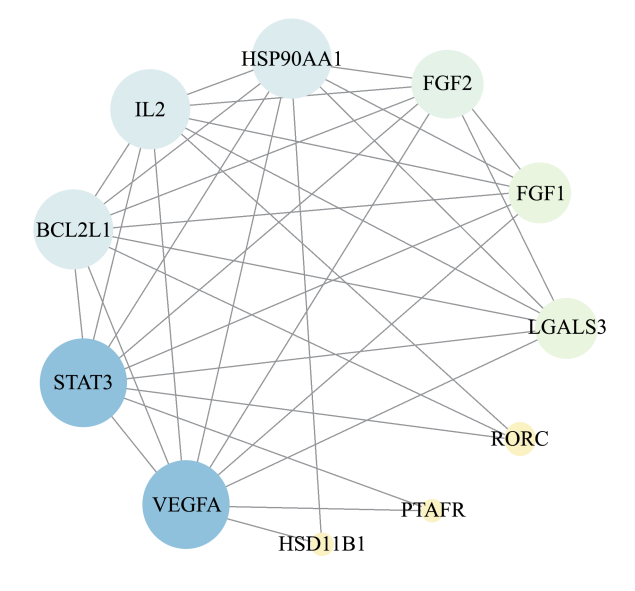


图 7 Rb2 皮肤潜在靶点 PPI 网络

Fig.7 PPI network of potential Rb2-skin targets

2.7 人参皂苷Rb2对p38 MAPK/AP-1信号通路的影响

本研究通过系统分析皮肤保护相关蛋白的表达水平，以进一步验证 Rb2 皮肤保护的分子机制。本研究初步结果表明，Rb2 皮肤保护作用聚焦在 MAPK 核心通路。MAPK 途径主要包含 3 类主要成员，包括 ERK、JNK 和 p38 MAPK，主要参与细胞增殖、分化和应激反应^[35]。MAPK 信号通路下游的目标基因为转录激活蛋白 AP-1（Activator Protein-1），AP-1 转录因子主要由原癌基因编码的 Jun 家族和 Fos 家族蛋白质组成^[36]，它们形成异质性或同源二聚体复合物，受 MAPK 调控^[37]。因此，首先检测 MAPK 通路下游 AP-1 蛋白表达情况，如图 8 所示，Rb2 显著上调了 c-Jun 和 c-Fos 的表达，说明 Rb2 处理后激活了 AP-1 信号传导。随后为了进一步评估 MAPK 信号通路的参与，对 ERK、JNK 和 p38 的蛋白表达水平进行检测。

由图 9 可见,经过 5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Rb2 处理后，p38 磷酸化的表达水平显著升高。而 ERK 和 JNK 活性未发生显著改变，提示 Rb2 可能通过特异性激活 p38 来增强表皮细胞的应激保护能力，表明 p38 MAPK/AP-1 是其调控皮肤稳态的核心路径。此外，Rb2 处理后 CREB 磷酸化水平显著增强，表明 Rb2 通过翻译后修饰调控该转录因子的活性。由此说明 Rb2 能够激活 p38 MAPK 信号通路，促使核内转录因子 c-Fos 磷酸化并激活 CREB，驱动保湿基因和修复因子表达，共同解释 HAS-1、HAS-2、Claudin 和 Occludin 等保湿与屏障相关基因的上调现象。

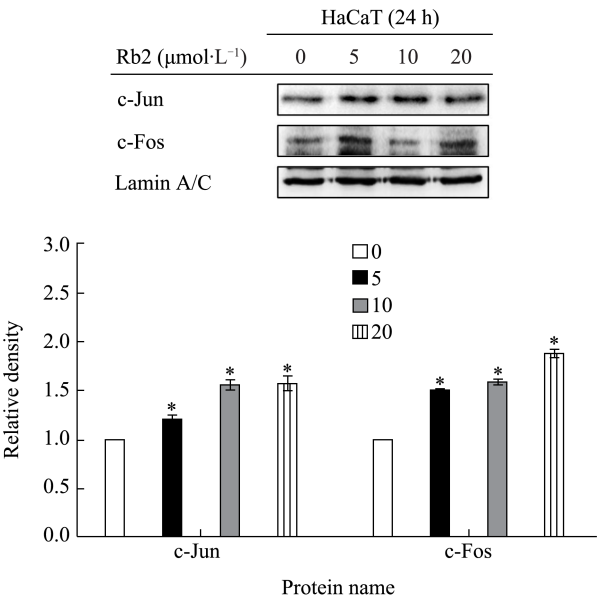


图 8 Rb2 对 AP-1 信号通路的影响

Fig.8 Effects of Rb2 on AP-1 signaling pathways

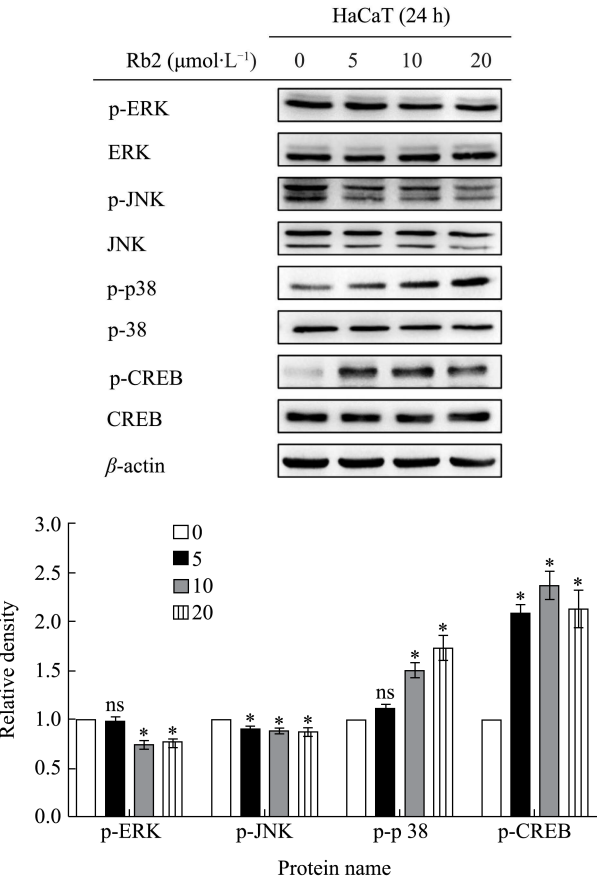


图 9 Rb2 对 MAPK 信号通路的影响

Fig.9 Effects of Rb2 on MAPK signaling pathways

3 结论

本文基于 RT-PCR 检测分析了人参皂苷 Rb2 增加 HaCaT 细胞 HAS-1、HAS-2、Claudin 和 Occludin 等

基因的 mRNA 表达水平，进一步明确了其改善皮肤屏障和保湿功能。并基于网络药理学和生物信息学分析，揭示了人参皂苷 Rb2 皮肤保护作用包括 VEGFA、STAT3 等在内的 11 个潜在作用靶点，及其可能调控 P13K-Akt、JAK-STAT、MAPK 等潜在的信号通路。Western blot 分析结果显示，Rb2 促进 MAPK 信号通路中 p38 MAPK 的磷酸化，从而调节皮肤屏障和保湿功能。本文研究结果表明，人参皂苷 Rb2 具有明确的皮肤保护作用，并从关键基因表达水平，潜在作用靶点和调控的潜在信号通路等方面深入探究了 Rb2 皮肤保护的作用机制，为其开发护肤产品提供了科学依据和数据支撑。

参考文献

[1] DYRING-ANDERSEN B, LØVENDORF M, COSCIA F, et al. Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5587.

[2] LEE J, HWANG S, SHEN T, et al. Enhancement of skin barrier and hydration-related molecules by protopanaxatriol in human keratinocytes [J]. Journal of Ginseng Research, 2021, 45(2): 354-360.

[3] CHU V, ONG P. Constant vigilance! Managing threats to the skin barrier [J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2024, 6(132): 678-685.

[4] 郑雪凌,王凤山,凌沛学.透明质酸合成酶的研究进展[J].药物生物技术,2004,6:413-416.

[5] MORITA K, MIYACHI Y. Tight junctions in the skin [J]. Journal of Dermatological Science, 2003, 31(2): 81-89.

[6] YUKI T, KOMIYA A, KUSAKA A, et al. Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing [J]. Journal of Dermatological Science, 2013, 69(2): 148-158.

[7] WANG J, EMING S A, DING X. Role of mTOR signaling cascade in epidermal morphogenesis and skin barrier formation [J]. Biology, 2022, 11(6): 931.

[8] 黎阳,张铁军,刘素香,等.人参化学成分和药理研究进展[J].中草药,2009,40(1):164-166.

[9] YOU L, CHA S, KIM M, et al. Ginsenosides are active ingredients in Panax ginseng with immunomodulatory properties from cellular to organismal levels [J]. Journal of Ginseng Research, 2022, 46(6): 711-721.

[10] OH Y, LIM H, PARK K, et al. Ginsenoside Rc protects against UVB-induced photooxidative damage in epidermal keratinocytes [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(3): 2907-2914.

[11] HOU J, KIM S. Possible role of ginsenoside Rb1 in skin wound healing via regulating senescent skin dermal fibroblast [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 499(2): 381-388.

[12] PARK S, SEO W, EUN H, et al. Protective effects of ginsenoside

- F2 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation in mice [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 478(4): 1713-1719.
- [13] TANG Y, ZHOU Y, WANG Y, et al. Ginsenoside Rg1 protects against Sca-1+ HSC/HPC cell aging by regulating the SIRT1-FOXO3 and SIRT3-SOD2 signaling pathways in a γ -ray irradiation-induced aging mice model [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 20(2): 1245-1252.
- [14] LOU J, CHEN X, ZHANG Y, et al. Photoprotective and immunoregulatory capacity of ginsenoside Rg1 in chronic ultraviolet B-irradiated BALB/c mouse skin [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 6(4): 1022-1028.
- [15] LEE C, NAM G, BAE I, et al. Whitening efficacy of ginsenoside F1 through inhibition of melanin transfer in cocultured human melanocytes-keratinocytes and three-dimensional human skin equivalent [J]. Journal of Ginseng Research, 2019, 43(2): 300-304.
- [16] LEE J, CHOI B, KIM Y, et al. Comprehensive profiling and quantification of ginsenosides in the root, stem, leaf, and berry of *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS [J]. Molecules, 2017, 22(12): 2147.
- [17] YANG K, NAM S, JANG M, et al. Ginsenoside Rb2 suppresses cellular senescence of human dermal fibroblasts by inducing autophagy [J]. Journal of Ginseng Research, 2023, 47(2): 337-346.
- [18] OH S, KIM K, LIM C. Ginsenoside Rb2 attenuates UV-B radiation-induced reactive oxygen species and matrix metalloproteinase-2 through upregulation of antioxidant components in human dermal fibroblasts [J]. Pharmacology, 2015, 96(1-2): 32-40.
- [19] YOSHIDA T, BECK L, DE B. Skin barrier defects in atopic dermatitis: From old idea to new opportunity [J]. Allergology International, 2022, 71(1): 3-13.
- [20] 金玉梅, 吴文娟, 杨春艳, 等. 紧密连接蛋白Claudins与皮肤病发生相关性的研究进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2021, 35(3): 329-332.
- [21] 潘红梅. 透明质酸的研究现状综述 [J]. 四川食品与发酵, 2003, 1: 5-9.
- [22] KAVASI R M, BERDI AKI A, SPYRIDAKI I, et al. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 101: 128-138.
- [23] 何黎. 皮肤屏障与保湿 [J]. 实用医院临床杂志, 2009, 6(2): 25-27.
- [24] SUN J, EL-ATY A, JEONG J, et al. Ginsenoside Rb2 ameliorates LPS-induced inflammation and ER stress in HUVECs and THP-1 cells via the AMPK-mediated pathway [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2020, 48(4): 1-19.
- [25] CHAMCHEU J, ROY T, UDDIN M, et al. Role and therapeutic targeting of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in skin cancer: a review of current status and future trends on natural and synthetic agents therapy [J]. Cells, 2019, 8(8): 803.
- [26] CHOI R J, MOHAMAD ZOBIR S Z, ALEXANDER-DANN B, et al. Combination of ginsenosides Rb2 and Rg3 promotes angiogenic phenotype of human endothelial cells via PI3K/akt and MAPK/ERK pathways [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 618773.
- [27] TENG Y, FAN Y, MA J, et al. The PI3K/Akt pathway: emerging roles in skin homeostasis and a group of non-malignant skin disorders [J]. Cells, 2021, 10(5): 1219.
- [28] BANERJEE S, BIEHL A, GADINA M, et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects [J]. Drugs, 2017, 77: 521-546.
- [29] MA Y, LI J, MAI J, et al. Ginsenoside Rb2 exhibits therapeutic value for male osteoporosis in orchietomy mice by suppressing osteoclastogenesis and modulating NF- κ B/MAPK signaling pathways [J]. Food & Function, 2024, 15(3): 1583-1597.
- [30] MORINO-KOGA S, UCHI H, MITOMA C, et al. 6-Formylindolo [3,2-b] carbazole accelerates skin wound healing via activation of ERK, but not aryl hydrocarbon receptor [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2017, 137(10): 2217-2226.
- [31] DICKINSON S, OLSON E, ZHANG J, et al. p38 MAP kinase plays a functional role in UVB-Induced mouse skin carcinogenesis [J]. Molecular Carcinogenesis, 2011, 50(6): 469-478.
- [32] YANG K, WANG X, SUN Y, et al. MiR-590-3p affects the function of adipose-derived stem cells (ADSCs) on the survival of skin flaps by targeting VEGFA [J]. Regenerative Therapy, 2022, 21: 322-330.
- [33] LAN H, ZOU M, ZHU F, et al. Pro-angiogenic role of ZEB1 in skin wound healing by upregulating VEGFA via microRNA-206 suppression [J]. Experimental Dermatology, 2022, 31(9): 1392-1401.
- [34] WANG Z, ZHENG Y, XU F, et al. Epidermal keratinocyte-specific STAT3 deficiency aggravated atopic dermatitis-like skin inflammation in mice through TSLP upregulation [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1273182.
- [35] 姜勇, 龚小卫. MAPK信号转导通路对炎症反应的调控 [J]. 生理学报, 2000, 4: 267-271.
- [36] 韩畅畅, 万福生. AP-1的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(10): 1357-1362.
- [37] WHITMARSH A, DAVIS R. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways [J]. Journal of Molecular Medicine, 1996, 74: 589-607.