

补骨脂素对 A375 细胞黑素合成及 ER/MAPK 信号通路调控机制探讨

崔悦¹, 单孟瑶¹, 张丽宏², 刘国良², 董蕊², 赵旭², 张宁^{2*}, 耿放^{3*}

(1. 佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040;
3. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150025)

[摘要] 目的:探讨补骨脂素对 A375 细胞黑素含量、酪氨酸酶活性的影响及作用机制。方法:以密度 2×10^5 个/孔的细胞数接种于 6 孔板中,将细胞分为空白组、雌二醇组、补骨脂素组、补骨脂素 + 雌激素受体(ER)阻断剂组(IC1182780)(浓度分别为 1×10^{-3} , 1, 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。采用 NaOH 裂解法、多巴醌氧化法检测黑素含量及酪氨酸酶活性;蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法测定 ER/丝裂原激活的蛋白激酶(ER/MAPK)通路中关键蛋白激酶 p38, c-Jun 氨基末端激酶(JNK), 细胞外信号调节激酶 2(ERK2)和小眼畸形相关转录因子(MITF), 多巴氧化法检测酪氨酸酶(TYR), 酪氨酸酶相关蛋白-1(TRP-1), 酪氨酸酶相关蛋白-2(TRP-2)的蛋白含量及相应 mRNA 表达。结果:与空白组比较,补骨脂素组对 A375 细胞中的黑素合成及 TYR 活性具有显著抑制作用($P < 0.01$),对 A375 细胞中雌激素受体 β (ER β)蛋白的表达具有明显的抑制作用($P < 0.05$),对 p38 MAPK, ERK2, JNK 的蛋白表达极显著的抑制作用($P < 0.01$),对 MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 的蛋白表达极显著的抑制作用($P < 0.01$),对 ERK2, p38 MAPK, MITF, TRP-1 mRNA 表达显著被抑制($P < 0.01$);与补骨脂素组比较,IC1182780 能够逆转 ER β , ERK, MITF, TYR, TRP-1 的蛋白表达($P < 0.01$)及 p38MAPK, JNK, TRP-2 的蛋白表达($P < 0.05$),同时能显著阻断补骨脂素对 ERK2, p38MAPK, MITF, TRP-1 mRNA 表达作用($P < 0.01$)。结论:补骨脂素通过 ER/MAPK 信号通路下调 MITF 和 TYR, TRP-1, TRP-2 的表达量,从而减少黑素合成。

[关键词] A375 细胞; 补骨脂素; 丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路; 黑素; 雌激素受体(ER)受体阻断剂; 植物雌激素

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0153-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181932

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.0945.012.html>

[网络出版时间] 2018-07-12 10:55

Mechanism of Psoralen on Melanin Synthesis and ER/MAPK Signaling Pathway in A375 Cells

CUI Yue¹, SHAN Meng-yao¹, ZHANG Li-hong², LIU Guo-liang², DONG Rui²,
ZHAO Xu², ZHANG Ning^{2*}, GENG Fang^{3*}

(1. School of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;
2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
3. Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of psoralen on melanin content and tyrosinase activity in A375 cells. **Method:** Cells were inoculated in 6-well plates at a cell density of 2×10^5 cells

[收稿日期] 20180410(020)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274035,81673621)

[第一作者] 崔悦,在读硕士,从事中药药效物质基础及体内代谢研究,E-mail:826841440@qq.com

[通信作者] *张宁,博士,教授,主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究,Tel:0454-6050350,E-mail:zhangning0454@163.com;

*耿放,博士,副教授,从事天然药物活性成分研究,Tel:0451-82475863,E-mail:gengfang1980@163.com

and then divided into blank group, estradiol group, psoralen group, psoralen + estrogen receptor (ER) receptor blocker group (ICI182780), with the concentrations of 1×10^{-3} , 1, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The melanin content and tyrosinase activity were detected by NaOH lysis method and dopaquinone oxidation method; Western blot and real-time fluorescent quantitative PCR assays were used to determine key protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) and ocular hypotrophy-associated transcription factors (MITF) in the ER/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. The protein contents and corresponding mRNA expressions of tyrosinase (TYR), tyrosinase-associated protein-1 (TRP-1), and tyrosinase-associated protein-2 (TRP-2) were measured by dopa oxidation. **Result:** Compared with the blank group, the psoralen group had a significant inhibitory effect on melanin synthesis and TYR activity in A375 cells ($P < 0.01$), with a significant inhibitory effect on the expression of estrogen receptor β (ER β) protein in A375 cells ($P < 0.05$), p38 MAPK, ERK and JNK protein expressions ($P < 0.01$), protein expressions of MITF, TYR, TRP-1, and TRP-2 ($P < 0.01$), and ERK2, p38 MAPK, MITF and TRP-1 mRNA expressions ($P < 0.01$); compared with psoralen group, ICI182780 reversed the protein expressions of ER β , ERK, MITF, TYR, TRP-1 ($P < 0.01$) and the protein expressions of p38, JNK, and TRP-2 ($P < 0.05$); at the same time, it can significantly block psoralen on ERK2, p38, MITF, TRP-1 mRNA expressions ($P < 0.01$). **Conclusion:** Psoralen down-regulates the expressions of MITF and TYR, TRP-1, and TRP-2 through ER/MAPK signaling pathway, so as to reduce melanin synthesis.

[**Key words**] A375 cells; psoralen; mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway; melanin; estrogen receptor (ER) receptor blockers; phytoestrogen

皮肤黑素增多沉积于面部是导致黄褐斑主要原因之一^[1-2]。在人皮肤黑素合成过程中,酪氨酸酶家族可有效调控黑素合成,因此通过抑制酪氨酸酶活性,可减少黑素生成。雌激素受体/丝裂原激活的蛋白激酶(ER/MAPK)信号通路参与了黑素合成过程,可降低黑素的合成,从而减缓色素的沉积。有研究表明雌激素与黑素合成、皮肤老化等生理过程有密切联系^[3],时悦等^[4]表明雌激素通过与黑素细胞内 ER 结合,合成多巴氧化法检测酪氨酸酶(TYR),酪氨酸酶相关蛋白-1 (TRP-1) 及 TRP2 等黑素合成限速酶,该酶协同作用催化底物多巴合成黑素。然而,天然的植物雌激素具有雌激素和/或抗雌激素作用的活性成分,低剂量的植物雌激素可以和内源性雌激素竞争性的与 ER 结合,形成 ER 复合物,占据受体结合位点,阻止内源性雌激素与受体结合,因而有效地降低靶细胞对雌激素的应答,起到了抗雌激素样作用,对雌激素样疾病有一定应用,并且,张明磊^[5]研究发现补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂异黄酮能够抑制 A375 细胞的黑素合成,以及通过 ER/MAPK 信号通路来调节黑素的合成。因此植物雌激素被人们广泛关注。

补骨脂具有补肾助阳等功效,且含有的植物雌激素成分能够使皮肤成纤维细胞胶原的合成减少,从而通过促进黑素细胞的黑素转运来抑制黑素瘤细

胞的黑素生成^[6]。裴元元等^[7]研究发现,补骨脂异黄酮对黑素细胞酪氨酸酶蛋白表达具有抑制作用。补骨脂素来源于补骨脂,是香豆素中的呋喃香豆素,是一种植物雌激素,具有雌激素样或抗雌激素作用。本实验选用补骨脂素作用于 A375 细胞通过 NaOH 裂解法,多巴醌氧化法,蛋白质免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)来阐明补骨脂素对黑素合成, TYR 活性的影响及其作用机制研究。

1 材料

1.1 细胞 A375 细胞(上海中乔新舟生物科技有限公司,批号 ZQ0042)。

1.2 药物与试剂 补骨脂素(南京泽朗科技有限公司,批号 66977121216); β -雌二醇(北京百灵威科技有限公司,批号 L750N46);DMEM,胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号 SH300022.01,SV30087.01);DMSO,噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 20130716,021005);RIPA 细胞裂解液、蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究,批号 P0013B, P0015L);兔抗人小眼畸形相关转录因子(MITF)单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号 12590);小鼠抗人 TYR, TRP-1, TRP-2, JNK 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-73244, sc-136388, sc-271356, sc-7345);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊

抗兔免疫球蛋白(Ig)G, HRP 标记羊抗小鼠 IgG, 小鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体, 兔抗 p38 单克隆抗体, 兔抗细胞外信号调节激酶 2(ERK2)单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 BA1054, BA1050, BM0627, BM4142, BM3951)。

1.3 仪器 HF240 型 CO₂ 培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司); MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司); DT5-6B 型低速自动平衡离心机(北京时代北利离心机公司); miniPROTEANTetra Cell 型电泳仪, Trans-Blot SD Cell 型半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); Smart chemi II 型一体式微型化学发光成像仪(北京赛智创业科技公司); Tprofessional Standard 96 型 PCR 自动扩增仪(德国 Biometra 公司); M × 3000P 型 Real-time PCR 仪(美国 Agilent Stratagene 公司)。

2 方法

2.1 药液的配制 将 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS), 双抗按 89:10:1 比例配置成 10% 胎牛血清完全培养液; 称取雌二醇 0.55 mg, 补骨脂素 8.80 mg 用 9.35 μ g 的二甲基亚砷(DMSO)溶液溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 雌二醇临用前稀释成所需的 1×10^{-3} μ mol·L⁻¹ 浓度, 补骨脂素用 DMEM 完全培养液稀释成 1 μ mol·L⁻¹ 浓度; 称取 ICI182780 粉末 3.00 mg, 用 DMEM 完全培养液配制成 20 μ mol·L⁻¹ 的溶液, 0.22 μ m 滤膜过滤, -20 °C 保存备用, 临用前将 ICI182780 稀释成所需要的 1 μ mol·L⁻¹ 浓度, 37 °C 预热。

2.2 分组及给药 根据前期实验, $1, 1 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3}$ μ mol·L⁻¹ 浓度的补骨脂素对 A375 细胞增殖没有显著影响, 但对 A375 细胞黑素含量及酪氨酸酶活性有不同程度的抑制作用, 浓度为 1 μ mol·L⁻¹ 时, 作用最为显著^[8]。所以分为空白组, 雌二醇组(1×10^{-3} μ mol·L⁻¹ 雌二醇的药物溶液), 补骨脂素组(1 μ mol·L⁻¹), 补骨脂素(1 μ mol·L⁻¹) + ICI182780 组。将对数生长期的细胞按 4×10^5 个细胞密度接种在培养瓶中, 24 h 后细胞长到 70% 时按照细胞分组给予以下处理。空白组加入 DMEM 4 mL, 培养 48 h; 雌二醇组加入雌二醇药液 4 mL, 培养 48 h; 补骨脂素 + ICI182780 组先给予浓度为 1 μ mol·L⁻¹ 的 ICI182780 药液 4 mL, 培养 2 h 后, 更换成 1 μ mol·L⁻¹ 的补骨脂素药液, 培养 46 h。

2.3 NaOH 裂解法黑素含量测定 取对数生长期的 A375 细胞, 以密度 2×10^5 个/孔细胞数接种到 6 孔板中, 培养 24 h 后, 按照分组进行给药及培养, 每

组均设置 4 个复孔。取出 6 孔板, 弃去培养液, 加胰蛋白酶消化, 离心, 弃上清, 加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 100 μ L, 裂解细胞, 37 °C 水浴 1 h, 每管加入灭菌水 400 μ L, 每管取混合溶液 100 μ L 加到 96 孔板中, 用酶标仪 490 nm 波长处测定其吸光度 A。其黑素含量用 A₄₉₀ 表示。

$$\text{黑素含量} = A_{490\text{给药组}} / A_{490\text{空白组}} \times 100\%$$

2.4 多巴醌氧化法 TYR 活性测定 取对数生长期的 A375 细胞, 以密度 8 000 个/孔细胞数接种在 96 孔板中, 培养 24 h 后, 按分组进行给药及培养, 每组均设置 6 个复孔。取出 96 孔板, 弃去培养液, 每孔加 1% TritonX-100 溶液 100 μ L, 将板子放入 -80 °C 冰箱, 30 min 后取出在室温下融化, 每孔中加入 0.2% L-dopa 溶液 50 μ L, 37 °C 水浴 3 h, 用酶标仪 490 nm 波长处测定其 A。其 TYR 活性用 A₄₉₀ 表示。

$$\text{TYR 活性} = A_{490\text{给药组}} / A_{490\text{空白组}} \times 100\%$$

2.5 Western blot 检测细胞中 ER β , p38 MAPK, ERK, JNK, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白的表达 用细胞裂解液充分裂解收集的 A375 细胞, 4 °C 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清。BCA 法检测总蛋白的浓度, 等量上样进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)凝胶电泳, 通过半干转膜法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上, 用 5% 封闭液封闭 2 h 后, 加入 β -actin(1:1 000 稀释), ER β (1:500 稀释), p38(1:1 000 稀释), ERK2(1:1 000 稀释), JNK(1:1 000 稀释), MITF(1:400 稀释), TYR(1:1 000 稀释), TRP-1(1:1 000 稀释), TRP-2(1:1 000 稀释)一抗孵育 4 °C 过夜, 洗膜, 加二抗(1:1 万稀释)孵育 2 h, 洗膜后加 ECL 化学发光液, 在凝胶成像系统中进行检测分析。每组样品进行 3 次重复实验, 将最后结果用 Lane ID 凝胶分析系统分析各条带灰度值, 用目的条带的灰度值与内参条带的灰度值的比值来反映目的蛋白的表达量。

2.6 Real-time PCR 检测细胞中 ERK2, p38 MAPK, MITF, TRP-1, mRNA 表达 向消化离心的 A375 细胞中加 trizol 裂解液 1 mL, 静置后充分吹打使细胞完全裂解, 加三氯甲烷 200 μ L, 用力晃动后静置, 离心取上清液, 加入异丙醇 500 μ L, 室温下孵育 10 min, -20 °C 过夜后离心得白色沉淀, 加入 75% 预冷乙醇清洗白色沉淀, 最后用无 RNA 酶, 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解 RNA 沉淀。利用 Nano-100 微量分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度。用 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行总 RNA 逆转录。

具体引物序列见表 1。

将获得逆转录产物置于 Real-time PCR 仪中进行扩增,预变性 95 °C 3 min,扩增反应 40 ~ 45 个循环,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 60 s。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	片段长度/bp
GAPDH	CCTGCACCACCAACTGCTTAG	CAGTCTTCTGGTGGCAGTGA	111
ERK2	TTTGCTTTCTCTCCACACA	AGCCTGTTCTACTTCAATGCTCT	133
p38 MAPK	TCCAGACCATTTCAGTCCATC	CGTCCAACAGACCAATCACA	100
MITF	GAAATCTTGGGCTTGATGGA	AGGAGTTGCTGATGGTGAGG	124
TRP-1	ACCAACAGTTGAAGAGAAGGCA	TGTCTGAGATTTTGGAGCTTCTCTG	154

2.7 统计学分析 实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析,Tamhane's 法进行方差齐检验,L-S-D 法对数据进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 A375 细胞黑素含量的影响 与空白组比较,雌二醇对黑素合成没有显著影响,补骨脂素组和补骨脂素 + ICI182780 组对 A375 细胞中的黑素合成具有显著抑制作用($P < 0.01$);与补骨脂素组比较,ICI182780 可以逆转补骨脂素对黑素合成的抑制作用($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 补骨脂素对 A375 细胞中黑素含量的影响

Table 2 Effect of psoralen on melanin content in A375 cells

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A ($\bar{x} \pm s, n = 4$)	黑素含量 /%
空白	-	0.213 ± 0.002	100.00
雌二醇	1×10^{-3}	0.220 ± 0.004	103.39
补骨脂素	1	0.161 ± 0.003 ²⁾	75.40 ²⁾
补骨脂素 + ICI182780	1	0.192 ± 0.004 ^{2,4)}	90.04 ^{2,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与补骨脂素组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 6 同)。

3.2 对 A375 细胞中 TYR 活性的影响 与空白组比较,雌二醇对 TYR 活性没有显著作用,补骨脂素对细胞中 TYR 活性具有显著的抑制作用($P < 0.01$),补骨脂素 + ICI182780 组对 TYR 活性具有抑制明显作用($P < 0.05$);与补骨脂素组比较,ICI182780 可阻断补骨脂素对 TYR 活性的抑制作用($P < 0.01$)。见表 3。

每组设 3 个平行实验,采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,读取不同浓度样品内参和目的基因的循环阈值即 C_t 值。按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法分析细胞内目的与内参 mRNA 的相对表达。

表 3 补骨脂素对 A375 细胞中 TYR 活性的影响

Table 3 Effect of psoralen on TYR activity in A375 cells

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A ($\bar{x} \pm s, n = 4$)	TYR 活性 /%
空白	-	0.086 ± 0.001	100.00
雌二醇	1×10^{-3}	0.087 ± 0.001	100.46
补骨脂素	1	0.060 ± 0.002 ²⁾	70.05 ²⁾
补骨脂素 + ICI182780	1	0.076 ± 0.003 ^{1,4)}	88.14 ^{1,4)}

3.3 对 A375 细胞中 ER β , p38 MAPK, ERK, JNK 蛋白的影响 与空白组比较,雌二醇对相关蛋白表达没有显著影响,补骨脂素组对 A375 细胞中 ER β 蛋白的表达具有明显的抑制明显作用($P < 0.05$),对 p38 MAPK, ERK2, JNK 的蛋白表达显著的抑制作用($P < 0.01$);与补骨脂素组比较,ICI182780 能够逆转补骨脂素对 p38 MAPK, JNK 蛋白表达的抑制明显作用($P < 0.05$),对 ER β , ERK2 的蛋白表达具有显著的效果($P < 0.01$)。见表 4 和图 1。

3.4 对 A375 细胞中 MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白的影响 与空白组比较,雌二醇对相关蛋白表达没有显著影响,补骨脂素组 MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 的蛋白表达显著的抑制作用($P < 0.01$);与补骨脂素组比较,ICI182780 能够逆转补骨脂素对 TRP-2 蛋白表达的抑制作用($P < 0.05$),对 MITF, TYR, TRP-1 的蛋白表达具有显著的效果($P < 0.01$)。见图 2 和表 5。

3.5 对 A375 细胞 ERK2, p38 MAPK, MITF 及 TRP-1 mRNA 的影响 与空白组比较,雌二醇组 ERK2, p38 MAPK, MITF mRNA 的表达有显著的提高($P < 0.01$),补骨脂素组的被抑制($P < 0.01$);

表 4 补骨脂素对 A375 细胞 ER1MAPK 信号通路中相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effect of psoralen on related proteins in ER1MAPK signaling pathway of A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ER β / β -actin	P38/ β -actin	ERK2/ β -actin	JNK/ β -actin
空白	-	0.139 \pm 0.017	0.500 \pm 0.005	0.552 \pm 0.011	0.669 \pm 0.034
雌二醇	1×10^{-3}	0.207 \pm 0.014	0.508 \pm 0.017	0.678 \pm 0.017	0.688 \pm 0.046
补骨脂素	1	0.039 \pm 0.001 ²⁾	0.325 \pm 0.011 ²⁾	0.383 \pm 0.017 ²⁾	0.414 \pm 0.008 ²⁾
补骨脂素 + ICI182780	1	0.099 \pm 0.010 ^{1,4)}	0.411 \pm 0.046 ^{1,3)}	0.531 \pm 0.005 ⁴⁾	0.515 \pm 0.005 ^{2,3)}

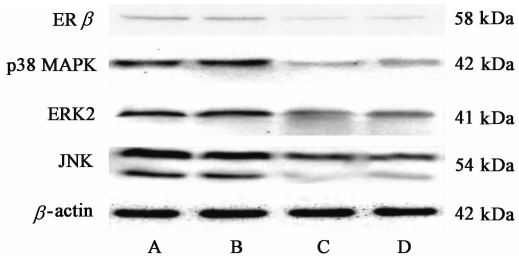


图 1 各组 A375 细胞 ER/MAPK 信号通路中相关蛋白的表达电泳
Fig. 1 Expression of related proteins in ER/MAPK signaling pathway in A375 cells

与补骨脂素组比较,阻断 ER 后,能显著阻断补骨

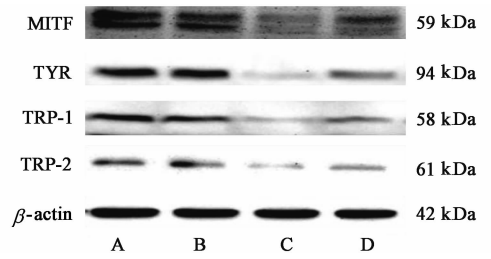


图 2 各组 A375 细胞对 MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白的表达电泳
Fig. 2 Expression of MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 protein in A375 cells

脂素对 A375 细胞中 ERK2, p38 MAPK, MITF, TRP-1 mRNA 表达作用 ($P < 0.01$)。见表 6。

表 5 补骨脂素、补骨脂素 + ICI182780 对 A375 细胞对 MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effect of psoralen, psoralen + ICI182780 on MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 protein in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MITF/ β -actin	TYR/ β -actin	TRP-1/ β -actin	TRP-2/ β -actin
空白	-	0.655 \pm 0.011	0.655 \pm 0.028	0.601 \pm 0.005	0.341 \pm 0.023
雌二醇	1×10^{-3}	0.621 \pm 0.011	0.616 \pm 0.005	0.516 \pm 0.009	0.399 \pm 0.005
补骨脂素	1	0.421 \pm 0.011 ²⁾	0.328 \pm 0.011 ²⁾	0.256 \pm 0.014 ²⁾	0.221 \pm 0.011 ²⁾
补骨脂素 + ICI182780	1	0.588 \pm 0.017 ^{2,4)}	0.602 \pm 0.017 ⁴⁾	0.461 \pm 0.017 ^{2,4)}	0.286 \pm 0.017 ^{1,3)}

表 6 补骨脂素、补骨脂素 + ICI182780 对 A375 细胞 ERK2, p38 MAPK, MITF 及 TRP-1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 6 Effect of psoralen, psoralen + ICI182780 on ERK2, p38 MAPK, MITF and TRP-1 mRNA in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ERK2	P38	MITF	TRP-1
空白	-	1.000	1.000	1.000	1.000
雌二醇	1×10^{-3}	1.148 \pm 0.022 ²⁾	1.042 \pm 0.024 ²⁾	1.111 \pm 0.042 ²⁾	1.062 \pm 0.055
补骨脂素	1	0.637 \pm 0.023 ²⁾	0.468 \pm 0.023 ²⁾	0.376 \pm 0.037 ²⁾	0.265 \pm 0.048 ²⁾
补骨脂素 + ICI182780	1	0.867 \pm 0.017 ⁴⁾	0.699 \pm 0.032 ⁴⁾	0.622 \pm 0.045 ⁴⁾	0.627 \pm 0.025 ⁴⁾

4 讨论

黑素增多是导致黄褐斑产生的主要原因。黑素以酪氨酸为底物,在酪氨酸酶的作用下经过氢化变成多巴,多巴氧化后形成多巴酮,之后形成色素。酪氨酸酶家族是调控黑素合成的特异性蛋白,其主要包括 TYR,酪 TRP-1 和 TRP-2^[9-10],是黑素合成过程中的关键限速酶,与黑素合成量成正相关^[11-13],

TRP-1 和 TRP-2 在黑素合成途径中的下游参与反应。MITF 可以增加 TYR, TRP-1 和 TRP-2 表达,最终导致黑色素合成,三者共同调节黑素合成^[14-15]。MAPK 是细胞内重要的转导系统,在细胞、增殖、分化、转化及凋亡的过程中起到重要作用。MAPK 主要包括 p38 MAPK, JNK 及 ERK2。MAPK 信号通路在黑素合成过程中起到调控作用。有研究发现,

ERK 信号通路能够抑制 MITF 基因的表达,从而抑制 TYR 的表达,降低黑素含量^[16],表明了黑素合成过程 MITF 具有关键性作用^[17]。从而通过激活细胞增殖及分化的信号调控因子 ERK2,使 MITF 磷酸化降解,TYR 活性降低,导致黑素合成减少^[18-19]。

实验结果表明,补骨脂素抑制 ER β 蛋白表达,同时其下游的 p38 MAPK, ERK2, JNK, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白表达随之降低, p38 MAPK, ERK2, MITF, TRP-1 的 mRNA 表达下调,加入 ICI182780 后, p38 MAPK, ERK, JNK, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白表达上调,减弱了对 p38 MAPK, ERK2, MITF, TRP-1 mRNA 表达的抑制作用。从而表明补骨脂素是通过 ER/MAPK 信号转导通路来实现 TYR 的下调过程。

本课题从分子水平阐述了中药补骨脂中的补骨脂素对人体 A375 黑素细胞中黑素的影响,探讨了对黑素合成的调控机制,实验结果表明 ER 及其下游的 ERK2 激酶信号通路均参与了补骨脂素抑制黑素合成的过程。本实验从细胞信号通路的调节角度出发,为中药植物雌激素治疗黄褐斑等皮肤色素沉着性疾病提供了理论基础及实验依据。

[参考文献]

[1] 王帅. 三种植物雌激素成分 A375 细胞黑素合成的作用机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.
[2] 张大维,李利. 黄褐斑治疗的研究进展[J]. 现代临床医学,2008,34(5):391-396.
[3] 周颖丽,宋秀祖,洪为松,等. 雌二醇及中波紫外线在豚鼠皮肤色素沉着形成中的作用及其机制[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(1):49-53.
[4] 时悦,谭城. 黄褐斑发病机制研究进展[J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志,2016,15(1):55-58.
[5] 张明磊. 两种植物雌激素成分对 A375 细胞黑素合成作用的机制研究[D]. 佳木斯:佳木斯大学,2015.
[6] 邱荣丽,李璘,乐巍. 补骨脂的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材,2010,33(10):1656.
[7] 裴元元,刘国良,曾蜀,等. 补骨脂异黄酮对 A375 细胞黑素合成的影响[J]. 国际中医中药杂志,2017,

39(5):430-434.

[8] 王帅,耿放,张明磊,等. 补骨脂素对 A375 细胞黑素合成及相关细胞信号通路调控的研究[J]. 中药新药与临床药理,2014,25(6):704-708.
[9] 柯莉娜,郑静,张瑞娟,等. 2 种咖啡酰吗啉胺的合成及其对酪氨酸酶的激活和对黑色素合成的调控[J]. 厦门大学学报,2018,57(1):50-57.
[10] 谭文英. 高良姜素对人黑素瘤 A375 细胞黑素合成及 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 表达的影响[J]. 中国皮肤性病杂志,2017,31(10):1077-1080,1087.
[11] Hashimoto Y, Ito Y, Kato T, et al. Expression profiles of melanogenesis-related genes and proteins in acquired melanocytic nevus [J]. J Cutan Pathol, 2006, 33(3): 207-215.
[12] LU F, YAN D, ZHOU X, et al. Expression of melanin-related genes in cultured adult human retinal pigment epithelium and uveal melanoma cells [J]. Mol Vis, 2007, 13(3):2066-2072.
[13] FANG D, Kute T, Setaluri V. Regulation of tyrosinase-related protein-2 (TYRP-2) in human melanocytes: relationship to growth and morphology [J]. Pigment Cell Res, 2001, 14(2):132-139.
[14] Tsatmali M, Ancans J, Thody A J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides [J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(2):125-134.
[15] Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders [J]. Pigment Cell Res, 2004, 17(2):96-100.
[16] 简丹. 己烯雌酚对黑素合成的影响及机制研究[D]. 长沙:中南大学,2011.
[17] 姜泽群. 几种中药有效成分促黑色素生成的机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2009.
[18] 陈军,周密思,彭圆,等. 小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞黑素合成相关基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(7):139-143.
[19] 闫姝,牛春影,徐红丹,等. 白桦脂醇对 A375 细胞黑素合成及相关细胞信号通路调控机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(10):92-96.

[责任编辑 周冰冰]