

白桦脂醇通过 ER/MAPK 信号通路对 A375 细胞黑素合成及机制

单孟瑶¹, 崔悦¹, 雷霞², 刘海洋², 董蕊², 李庆伟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:研究植物雌激素成分白桦脂醇及加入受体阻断剂(ICI182780)后对 A375 细胞的黑素合成及机制的影响。方法:将 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白桦脂醇作用于 A375 黑素细胞,实验分为空白组(DMEM 完全培养液),雌二醇组($1 \times 10^{-3} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),白桦脂醇组($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),白桦脂醇 + ICI182780 组($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。用 NaOH 裂解法检测黑素含量、蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)测定雌激素受体/丝裂原激活的蛋白激酶(ER/MAPK)通路中关键蛋白激酶 p38 MAPK, ER β , 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),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)的蛋白及其 mRNA 表达。结果:与空白组比较,白桦脂醇组和白桦脂醇 + ICI182780 组对 A375 细胞黑素合成有显著抑制作用($P < 0.01$); $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白桦脂醇对 A375 细胞中上述蛋白表达有不同程度的抑制作用($P < 0.05, P < 0.01$),对 ERK2, MITF, TRP-1 mRNA 的表达也有不同程度的抑制作用($P < 0.05, P < 0.01$)。与白桦脂醇组比较,ICI182780 可以逆转白桦脂醇对 A375 细胞黑素合成的抑制作用($P < 0.01$);ICI182780 可以逆转白桦脂醇对 A375 细胞中上述蛋白表达的抑制作用及对 ERK2, MITF, TRP-1 mRNA 的表达的抑制作用($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:白桦脂醇能够通过 ER/MAPK 信号通路下调 MITF, TYR, TRP-1 及 TRP-2 蛋白表达量,从而减少黑素合成。

[关键词] 白桦脂醇; 植物雌激素; A375 细胞; 黄褐斑; 雌激素受体; MAPK 信号通路

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0134-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182039

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180726.1728.011.html>

[网络出版时间] 2018-07-27 16:44

Melanin Synthesis and Mechanism of A375 Cells by Betulin via ER/MAPK Signaling Pathway

SHAN Meng-yao¹, CUI Yue¹, LEI Xia², LIU Hai-yang², DONG Rui², LI Qing-wei²,
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 study the effect of phytoestrogenic components of betulin and the addition of receptor blocker (ICI182780) on melanin synthesis and its mechanism on A375 cells. **Method:** $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ betulin was applied to A375 melanocytes and then the experimental cells were divided into blank group (DMEM complete culture fluid), estradiol group ($1 \times 10^{-3} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), betulin group ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and betulin +

[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] 单孟瑶,在读硕士,从事中药药效物质基础及体内代谢研究, E-mail:97024046@qq.com

[通信作者] *张宁,博士,教授,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

ICI182780 group ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Melanin content was determined by NaOH lysis; Western blot, and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to determine the protein content and mRNA expression of key protein kinase mitogen activated protein kinase (MAPK) p38 in estrogen receptor (ER) /mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway, c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) and micrometamorphic-related transcription factor (MITF), dopa oxidation assay for tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). **Result:** As compared with the blank group, betulin group and betulin + ICI182780 group had significant inhibition on melanin synthesis in A375 cells ($P < 0.01$); $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ betulin had different inhibitory effects on expression of the above proteins in A375 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), as well as on ERK2, MITF, and TRP-1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) mRNA expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the betulin group, ICI182780 can reverse the inhibitory effect of betulin on melanin synthesis of A375 cells ($P < 0.01$); ICI182780 can reverse the inhibitory effect of betulin on the above protein expression in A375 cells as well as mRNA expression of ERK2, MITF, and TRP-1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Betulin can down-regulate the expression levels of MITF, TYR, TRP-1 and TRP-2 proteins through ER-MAPK signaling pathway, thus reducing melanin synthesis.

[**Key words**] betulin; phytoestrogens; A375 cells; chloasma; estrogen receptor; mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway

黄褐斑是一种色素增生性的皮肤病,其临床表现为面部对称性呈蝴蝶状,局部有淡褐色或褐色的斑点。国内外研究显示,黄褐斑女性发病率高于男性^[1]。通过研究发现,导致黄褐斑生成的直接原因是黑素的增多^[2]。黑素是决定皮肤颜色的关键性色素,皮肤颜色越深说明黑素含量越高^[3]。黄褐斑的出现多少与内分泌有关,尤其体内雌激素水平与黄褐斑的发病关系密切^[4-6]。有研究发现,雌激素也能影响黑素合成,其主要是与雌激素受体(ER)结合使 ER α 和 ER β 发生变化来调节下游信号通路^[7]。有学者发现,雌激素可激活黑素细胞中细胞外信号调节激酶(ERK), C-Jun 氨基末端激酶(JNK), p38 丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路,在促进基质金属蛋白酶家族(MMPs)蛋白和 mRNA 表达的同时还能提高细胞转移能力^[8-10]。植物雌激素成分通过 MAPK 信号通路对细胞黑素合成的影响,需进一步研究探讨。

杜仲具有补肝肾、强筋骨、降血压等诸多功效。《本草纲目》中也有记载^[11-12]。其主要成分有木脂素类、苯丙素类、环烯醚萜类、黄酮类^[13-14]。前期研究发现杜仲有抑制黑素细胞增殖的作用。本实验是研究来源于杜仲萜类化合物白桦脂醇,探讨其对黑素合成作用的分子机制。

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 药物及试剂 白桦脂醇(南京泽朗科技有限

公司,批号 473983121010); β -雌二醇(北京百灵威科技有限公司,批号 L750N46), ICI182780(英国 Tocris 公司,批号 1047);DMEM 培养液和胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH300022.01, SV30087.01);磷酸盐缓冲液(PBS,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9062);二甲基亚砜(DMSO)和噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司,批号分别为 200-664-3, PB11058);Annexin V-FITC 试剂盒(碧云天生物技术研究,批号 C1026);BCA 试剂盒(微奥基因科技常州有限公司,批号 CHEM001);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G, HRP 标记羊抗兔 IgG, 小鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin), 兔抗 ERK2, 兔抗 p38 MAPK 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BA1050, BA1054, BM0627, BM3951, BM4142);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);兔抗人 ER β 单克隆抗体(博研生物科技有限公司,批号 BYK-0116R);小鼠抗人 JNK, 酪氨酸酶(TYR), 酪氨酸酶相关蛋白 1(TRP-1), TRP-2 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-7345, sc-73244, sc-136388, sc-271356)。

1.3 仪器 HF90 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);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 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (美国 Agilent Stratagene 公司); miniPROTEANTetra Cell 型电泳仪, Trans-Blot SD Cell 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); WD9405B 型水平摇床 (北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 药液的配制 将 DMEM 基础培养基, 胎牛血清 FBS, 双抗按 89:10:1 的比例配置成 DMEM 完全培养液。分别称取雌二醇 0.55 mg, 白桦脂醇 8.80 mg, ICI182780 3.00 mg, 用 9.2 μg 的 DMSO 溶液溶解, 用 DMEM 完全培养液配制成终浓度为 20 μmol·L⁻¹ 的雌二醇储备液, 1 μmol·L⁻¹ 的白桦脂醇药液, 20 μmol·L⁻¹ 的 ICI182780 药液, 雌二醇临用前稀释成所需的 1 × 10⁻³ μmol·L⁻¹ 使用浓度, 过滤除菌, 于 -20 °C 冰箱保存。

2.2 分组及给药

2.2.1 分组 分为空白组、雌二醇组、白桦脂醇组、白桦脂醇 + ICI182780 组。

2.2.2 给药 通过前期实验可知, 1, 1 × 10⁻¹, 1 × 10⁻², 1 × 10⁻³ μmol·L⁻¹ 白桦脂醇对 A375 细胞增殖无显著抑制作用, 其中浓度为 1 μmol·L⁻¹ 时, 作用最为显著, 可以用于后续实验研究。取对数生长期细胞, 以 4 × 10⁵ 个的细胞浓度接种于 25 cm² 的培养瓶中, 加入 DMEM 完全培养液 4 mL, 使细胞均匀铺在培养瓶的底部, 培养 24 h。待细胞贴壁后进行以下操作。空白组加入 DMEM 完全培养液 4 mL, 培养 48 h; 雌二醇组加入 1 × 10⁻³ μmol·L⁻¹ 雌二醇药液 4 mL, 培养 48 h; 白桦脂醇组加入 1 μmol·L⁻¹ 的白桦脂醇药液 4 mL, 培养 48 h; 白桦脂醇 + ICI182780 组先加入 1 μmol·L⁻¹ 的 ICI182780 药液 4 mL, 培养 2 h 后, 再换为相应浓度的白桦脂醇药液, 培养 46 h。

2.3 指标检测

2.3.1 NaOH 裂解法黑素含量测定 取对数生长期的 A375 细胞, 以 2 × 10⁵ 个/孔细胞数接种于 6 孔板中, 细胞培养 24 h 后, 每组设 4 个复孔, 按照分组给药培养。取出 6 孔板并弃去培养液, 加入胰蛋白

酶消化, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清后, 加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 100 μL 进行细胞裂解, 37 °C 水浴 1 h 后, 每管加入灭菌水 400 μL, 每管取混合溶液 100 μL 移到 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, 其计算公式如下。

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

2.3.2 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定 ERβ, p38 MAPK, ERK, JNK, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白的表达 用细胞裂解液裂解 A375 细胞, 4 °C 条件下 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清液。根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 每孔上样量 15 μL, 将蛋白转移到 PVDF 膜上进行封闭, 摇床上封闭 2 h, 加入 β-actin (1:1 000), ERβ (1:500), p38 MAPK (1:1 000), ERK (1:1 000), JNK (1:1 000), MITF (1:400), TYR (1:1 000), TRP-1 (1:1 000), TRP-2 (1:1 000) 一抗孵育 4 °C 过夜, 洗膜, 之后加二抗 (1:1 万) 孵育 2 h, 洗膜后加入发光液, 将发光样板放入凝胶成像仪器中, 显影拍照。每个样品进行 3 次重复试验, 得到各组蛋白条带的灰度值, 利用 Lane ID 凝胶软件分析数据。

2.3.3 Real-time PCR 测定 ERK2, MITF, TRP-1 mRNA 的表达 将 A375 细胞加入 trizol 1 mL 充分裂解后加入三氯甲烷 200 μL, 用力摇晃 15 s, 室温下孵育并 4 °C 条件下 13 200 r·min⁻¹ 离心 15 min。离心后取上清液, 每管加入异丙醇 500 μL, 上下颠倒使混匀, 室温下孵育 10 min, -20 °C 过夜, 离心后有少许白色物质, 向白色物质中加入预冷的 75% 乙醇, 用无酶水溶解 RNA。用 Nano-100 微量分光光度计测总 RNA 的纯度及浓度。用 AMV 第一链 cDNA 试剂盒测总 RNA 逆转录。之后进行预变性 95 °C 3 min, 接着扩增反应 40~45 个循环, 95 °C 变性, 60 °C 退火, 72 °C 延伸, 最后是溶解阶段。在扩增程序中读取不同组的 C_t 值, 设 3 个平行实验。按照 2^{-ΔΔC_t} 值计算目的基因与内参 mRNA 的相对表达。引物见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')	片段长度/bp
GAPDH	CCTGCACCACCAACTGCTTAG	CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA	111
ERK2	TTTGCTTTCTCTCCACACA	AGCCTGTTCTACTTCAATCCTCT	133
MITF	GAAATCTTGGGCTTGATGGA	AGGAGTTGCTGATGGTGAGG	124
TRP-1	ACCAACAGTTGAAGAGAAGGCA	TGTCTGAGATTTTGAGCTTCCTG	154

2.4 统计学处理 实验数据分析用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), Tamhane's 法进行方差齐检验, LSD 法对数据进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白桦脂醇、白桦脂醇 + ICI182780 抑制 A375 细胞黑素分泌的影响 与空白组比较, 雌二醇组对 A375 细胞黑素合成无显著影响; 白桦脂醇组和白桦脂醇 + ICI182780 组对 A375 细胞黑素合成有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 分别为 59.71%, 92.57%; 与白桦脂醇组比较, ICI182780 可以逆转白桦脂醇对 A375 细胞黑素合成的抑制作用 ($P < 0.01$)。结果显示, 白桦脂醇对 A375 细胞黑素合成有较强抑制作用, 阻断 ER 可以逆转白桦脂醇的这种抑制作用。见表 2。

表 2 白桦脂醇、白桦脂醇 + ICI182780 对 A375 细胞中黑素含量的影响

Table 2 Effect of betulin, betulin + ICI182780 on melanin content in A375 cells

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A(\bar{x} \pm s, n=4)$	抑制率 / %
空白	-	0.229 ± 0.003	100.00
雌二醇	1×10^{-3}	0.232 ± 0.003	101.41
白桦脂醇	1	0.136 ± 0.002 ²⁾	59.39 ²⁾
白桦脂醇 + ICI182780	1 + 1	0.212 ± 0.002 ^{2,4)}	92.57 ^{2,4)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与白桦脂醇组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

表 3 白桦脂醇组、白桦脂醇 + ICI182780 对 A375 细胞 ER-MAPK 信号通路中相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effect of betulin, betulin + ICI182780 on related proteins in ER-MAPK signaling pathways 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 MAPK/ β -actin	ERK/ β -actin	JNK/ β -actin
空白	-	0.088 ± 0.005	0.447 ± 0.023	0.691 ± 0.028	0.448 ± 0.023
雌二醇	1×10^{-3}	0.095 ± 0.002	0.516 ± 0.005 ¹⁾	0.919 ± 0.034 ²⁾	0.432 ± 0.028
白桦脂醇	1	0.030 ± 0.002 ²⁾	0.210 ± 0.011 ²⁾	0.296 ± 0.040 ²⁾	0.276 ± 0.014 ²⁾
白桦脂醇 + ICI182780	1 + 1	0.045 ± 0.003 ^{2,3)}	0.381 ± 0.017 ^{1,4)}	0.617 ± 0.230 ⁴⁾	0.359 ± 0.029 ^{1,3)}

MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 的蛋白表达 ($P < 0.01$); 与白桦脂醇组比较, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 的蛋白表达有极显著的效果 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

3.4 白桦脂醇、白桦脂醇 + ICI182780 对 A375 细胞 ERK2, MAPK p38, MITF 及 TRP-1 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 雌二醇组 MAPK p38 mRNA 的表达明显增加 ($P < 0.05$), TYR-1 mRNA 的表达有显著提高 ($P < 0.01$), 白桦脂醇组的 ERK2, p38

3.2 白桦脂醇、白桦脂醇 + ICI182780 对 A375 细胞中 ER β , p38 MAPK, ERK, JNK 蛋白表达的影响 与空白组比较, 雌二醇对 A375 细胞中 p38 MAPK 的蛋白表达有明显促进作用 ($P < 0.05$), ERK 的蛋白表达有极显著促进作用 ($P < 0.01$), 白桦脂醇组对 A375 细胞中 ER β , p38 MAPK, ERK, JNK 的蛋白表达有显著抑制作用 ($P < 0.01$); 与白桦脂醇组比较, 阻断 ER 能逆转白桦脂醇对 JNK 蛋白表达的抑制作用 ($P < 0.05$), 对 p38 MAPK 和 ERK 的蛋白表达有显著的效果 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 3。

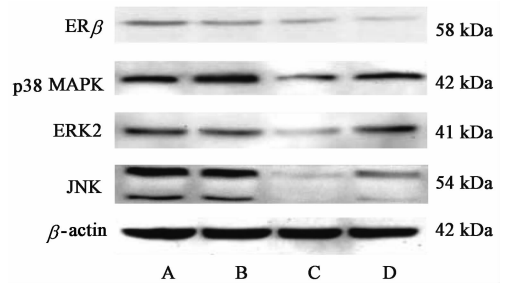


图 1 白桦脂醇、白桦脂醇 + ICI182780 对 A375 细胞 ER β , p38 MAPK, ERK, JNK 蛋白表达电泳

Fig. 1 Expression of ER β , p38 MAPK, ERK, JNK proteins in A375 cells of each group by electrophoresis

3.3 白桦脂醇、白桦脂醇 + ICI182780 对 A375 细胞中 MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白表达的影响 与空白组比较, 雌二醇明显升高 A375 细胞中 MAPK p38 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 显著升高 ERK 的蛋白表达 ($P < 0.01$), 白桦脂醇组显著降低 A375 细胞中

MAPK, MITF, TRP-1 mRNA 表达显著被抑制 ($P < 0.01$); 与白桦脂醇组比较, 阻断 ER 后, 能显著阻断白桦脂醇对 A375 细胞中 ERK2, p38 MAPK, MITF, TRP-1 mRNA 表达作用 ($P < 0.01$)。见表 5。

4 讨论

黑素细胞位于表皮基底层, 能产生黑素小体来保护皮肤免受损害, 黑素是黑素细胞分泌的生物素, 故防止措施主要有抑制黑素细胞生长、阻断黑素颗

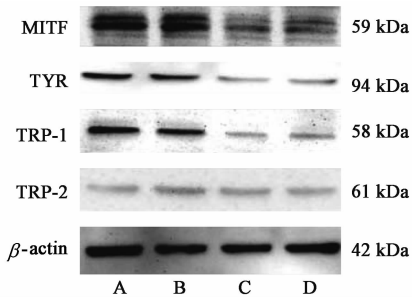


图 2 各组 A375 细胞对 MITF 及 TYR 蛋白表达电泳
Fig.2 Expression of MITF and TYR protein in A375 cells of each group by electrophoresis

粒形成、加速黑色降解以及降低黑素细胞的活性等

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

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

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MITF/ β -actin	TYR/ β -actin	TRP-1/ β -actin	TRP-2/ β -actin
空白	-	0.400 \pm 0.011	0.193 \pm 0.003	0.199 \pm 0.005	0.094 \pm 0.002
雌二醇	1×10^{-3}	0.470 \pm 0.011	0.179 \pm 0.005	0.189 \pm 0.005	0.104 \pm 0.005
白桦脂醇	1	0.243 \pm 0.017 ²⁾	0.143 \pm 0.001 ²⁾	0.107 \pm 0.005 ²⁾	0.047 \pm 0.005 ²⁾
白桦脂醇 + ICI182780	1 + 1	0.330 \pm 0.017 ^{1,4)}	0.170 \pm 0.005 ^{2,4)}	0.164 \pm 0.006 ^{2,4)}	0.077 \pm 0.005 ^{1,4)}

表 5 白桦脂醇、白桦脂醇 + ICI182780 对 A375 细胞 ERK2, p38 MAPK, MITF 及 TRP-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effect of betulin, betulin + ICI182780 on ERK2, p38 MAPK, MITF and TRP-1 mRNA expression in A375 Cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ERK2	p38 MAPK	MITF	TRP-1
空白	-	1.000	1.000	1.000	1.000
雌二醇	1×10^{-3}	1.002 \pm 0.025	1.107 \pm 0.048 ¹⁾	0.968 \pm 0.043	1.478 \pm 0.078 ²⁾
白桦脂醇	1	0.207 \pm 0.015 ²⁾	0.305 \pm 0.029 ²⁾	0.245 \pm 0.014 ²⁾	0.347 \pm 0.031 ²⁾
白桦脂醇 + ICI182780	1 + 1	0.508 \pm 0.023 ⁴⁾	0.622 \pm 0.018 ⁴⁾	0.513 \pm 0.028 ⁴⁾	0.493 \pm 0.029 ⁴⁾

研究发现,白桦脂醇在高浓度时抑制细胞增殖对细胞有毒性作用,在安全浓度下其对黑素有显著抑制作用,其在安全浓度下抑制 ER β 蛋白表达,同时其下游 p38 MAPK, ERK, JNK, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白表达随之降低, p38 MAPK, ERK, MITF, TRP-1 的 mRNA 表达下调,加入 ER 受体阻断剂 ICI182780 后, p38 MAPK, ERK, JNK, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2 蛋白表达上调,减弱了对 p38 MAPK, ERK, MITF, TRP-1 mRNA 表达的抑制作用。由此可见, TYR 的下调与 ER β /MAPK 信号通路有关。

综上所述,实验结果表明 ER 及其下游的 ERK 激酶信号通路均参与了白桦脂醇抑制 A375 细胞黑素合成的过程。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以及实验依据。

方法降低黑素合成^[15]。黑色素的合成始于 L-酪氨酸的羟基化二羟基苯丙氨酸(L-DOPA),多巴醌的氧化^[16], TRP-1 和 TRP-2 (也被称为多巴色素异构酶, DCT)在黑素合成途径中的下游参与反应。 α -黑素细胞刺激素(MSH)^[17],生理配体结合 G 蛋白偶联黑素素 1 受体(MC1R)的行为,有效的激活 MITF 增加酪氨酸酶的表达和 TRP-1 和 TRP-2 表达,从而影响黑色素合成^[18]。皮肤色素沉着的主要过程包括:黑素细胞内黑素小体的装配和黑素合成、黑素小体由核周向树突转移、黑素小体转移至邻近的角质形成细胞、黑素小体在角质形成细胞内的再分布和降解。导致黄褐斑生成的主要因素是黑素的增多。

[参考文献]

[1] 杨玮华. 黄褐斑西医研究进展[J]. 中医临床研究, 2016, 8(12): 68-74.
 [2] 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.
 [3] 王银娟. 黄褐斑相关发病机制的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2014.
 [4] 李志鸿, 金娟. 杨智荣教授祛斑养颜汤治疗女性黄褐斑临床疗效及对血清性激素水平影响的观察[J]. 中医药信息, 2015, 32(2): 95-97.
 [5] 柏亚萍, 薛至军. 蔡瑞康教授治疗黄褐斑经验[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(11): 78-81.
 [6] 侯慧先, 赵起. 刺络放血拔罐疗法治疗黄褐斑(肝郁气滞型)的临床观察[J]. 中医药信息, 2014, 31(2): 93-94.
 [7] 魏娜, 贺海波, 张长城, 等. JNK 信号通路及细胞凋亡关系的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,

- 2013,18(7):807-812.
- [8] Razandi M, Pedram A, Greene G L, et al. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 13(2): 307-319.
- [9] Matsuoka H, Tsubaki M, Yamazoe Y, et al. Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(12): 2022-2032.
- [10] 唐建兵. 雌激素在黄褐斑发病中的作用及黄褐斑的治疗研究[D]. 广州:南方医科大学,2011.
- [11] 李铁柱. 杜仲果实和叶片转录组数据集及基因功能注释[J]. *中南林业科技大学学报*, 2012, 32(11): 122-130.
- [12] 袁天翔,方莲花,吕杨,等. 杜仲叶的药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(6): 781-785.
- [13] 王志宏,彭胜,雷明盛,等. 杜仲主要生物活性研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25: 1302-1309.
- [14] 严颖,赵慧,邹立思,等. 基于 LC-QTOF MS/MS 技术分析不同产地杜仲的差异化学成分[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(14): 2730-2737.
- [15] 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.
- [16] 王玉林,何锦凤,王维民,等. 皮肤黑色素的产生及美白浅析[J]. *日用化学品科学*, 2013, 36(2): 33-36.
- [17] Seong Z K, Lee S Y, Poudel A, et al. Constituents of cryptotaenia japonica inhibit melanogenesis via CREB- and MAPK-associated signaling pathways in murine B16 melanoma cells[J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1296.
- [18] Ng L T, LIN L T, CHEN C L, et al. Anti-melanogenic effects of δ -tocotrienol are associated with tyrosinase-related proteins and MAPK signaling pathway in B16 melanoma cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(7): 978-983.

[责任编辑 周冰冰]