

小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞黑素合成相关基因表达的影响

陈军, 周密思*, 彭圆, 林连美, 刘晶, 刘颖, 梁倩婷
(湖北中医药大学, 武汉 430061)

[摘要] **目的:**研究不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞黑素合成相关酶酪氨酸酶(tyrosinase, TYR), 酪氨酸酶相关蛋白-1(tyrosinase related protein-1, TRP-1), 酪氨酸酶相关蛋白-2(tyrosinase related protein-2, TRP-2) mRNA 表达的影响。**方法:**采用 CCK8 检测细胞活力, 选取小柴胡汤低、中、高质量浓度分别为 0.1, 1, 2.5 g·L⁻¹用于实验, 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测 B16 细胞中 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 的表达。**结果:**与正常组比较, 随着浓度的增加, 小柴胡汤水煎液能够显著下调细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**小柴胡汤对黑素合成的抑制作用除了通过直接抑制 TYR 活性外, 还可通过下调酪氨酸酶家族其他成员 TRP-1, TRP-2 的基因表达、蛋白合成 3 方面实现其抑制黑素生成的作用, 提示小柴胡汤对黑素生成的抑制可通过对酶蛋白转录后调节途径来实现。

[关键词] 小柴胡汤; 黑素合成; 酪氨酸酶; 酪氨酸酶相关蛋白-1; 酪氨酸酶相关蛋白-2

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0139-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070139

Effect of Xiaochaihu Tang on Melanogenesis Related Gene Expression in B16 Melanoma Cells

CHEN Jun, ZHOU Mi-si*, PENG Yuan, LIN Lian-mei, LIU Jing, LIU Ying, LIANG Qian-ting
(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Xiaochaihu Tang on the mRNA expression levels of melanogenesis related genes, including tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase related protein-2 (TRP-2) in B16 melanoma cells. **Method:** CCK8 assay was used to test the cell activity, and low dose, middle dose and high dose Xiaochaihu Tang (0.1, 1, 2.5 g·L⁻¹) were used in the test. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to measure the mRNA expression levels of TYR, TRP-1 and TRP-2. **Result:** Compared with the blank group, Xiaochaihu Tang can significantly down-regulate the mRNA expression levels of TYR, TRP-1 and TRP-2 with the increase of concentrations ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Xiaochaihu Tang could significantly suppress melanogenesis not only by inhibiting TYR activity, but also by down-regulating the gene expression of TRP-1 and TRP-2 as well as protein synthesis, indicating that Xiaochaihu Tang could inhibit melanogenesis by regulating pathways after enzyme protein transcription.

[Key words] Xiaochaihu Tang; melanogenesis; tyrosinase; tyrosinase related protein-1; tyrosinase related protein-2

美白皮肤、减轻色素沉着已经成为一个被全世界广泛关注的问题。近年来, 出于对化学美白产品安全性的担忧, 越来越多的科学研究者倾向于从天然植物中寻找高效安全的美白活性成分^[1]。我国中药资源丰富, 天然植物制药历史悠久, 文献也记载了大量的天然药物具有美白、减轻色素沉着的作用,

然植物中寻找高效安全的美白活性成分^[1]。我国中药资源丰富, 天然植物制药历史悠久, 文献也记载了大量的天然药物具有美白、减轻色素沉着的作用,

[收稿日期] 20151020(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81574037); 湖北省教育厅科学技术研究计划项目(Q20112010; Q20132005)

[第一作者] 陈军, 硕士, 讲师, 从事针灸美容及经方抗衰老研究, Tel: 13349959594, E-mail: cj027@126.com

[通讯作者] * 周密思, 博士, 副教授, 从事皮肤美白的临床与实验研究, Tel: 13707174866, E-mail: zms0164@126.com

为理想皮肤脱色剂原料的探寻提供了有利的条件,具有很强的优势和广阔的应用前景,是目前的研究热点。

小柴胡汤为著名的和解少阳剂,被誉为“和方之祖”。原方本为“和解少阳”而设,但由于其组方合理,疗效卓著,后世医家在临证时均从不同角度对其主治功效、适应证进一步做了拓展,目前其广泛地应用于临床各科与其病机相合的病证,均取得了较好的疗效。但是关于小柴胡汤在皮肤美容领域的应用与研究,对其延缓皮肤衰老、美白等功效的理论与实验研究,目前尚未见有其他相关报道。

本课题组前期对小柴胡汤美容功效做了较为充分的理论研究^[2-5],并将其古方新用,功效发挥,对其抗氧化、对黑素瘤细胞黑素合成影响进行了实验研究,结果表明小柴胡汤对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH), $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 3 种自由基具有直接清除作用,且清除率呈明显的量效相关性,提示其具有较强的抗氧化性。研究结果还显示小柴胡汤抑制酪氨酸酶活性作用强于其抑制黑素合成作用,表明小柴胡汤可能主要通过抑制酪氨酸酶活性而达到减少黑素合成目的^[6-7],初步揭示了小柴胡汤抑制黑素合成的机制与其抗氧化、抑制酪氨酸酶活性有关。然而其作用的确切机制,是否还有其他作用途径尚不明确,故本次研究在以往研究基础上,从影响黑素合成的关键酶——酪氨酸酶家族成员入手,进一步研究其抑制黑素合成作用的分子机制,为研发高效安全的皮肤脱色剂提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 B16 小鼠黑色素瘤细胞株(批号 CL-0029)由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。

1.2 药物与试剂 实验用柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜、大枣由湖北中医药大学附属门诊部提供,所有中药均经湖北中医药大学中药教研室胡爱萍教授鉴定属合格药材。

cDNA 第一链合成试剂盒,SYBR Green/Flourescein qPCR Master Mix(2×)(Fermentas,批号分别为 K1622, K0242); Ex Taq™, DL2000 DNA Marker(TAKARA,批号分别为 DRR100A, D502A); Trizol(Invitrogen,批号 15596-018); 丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺(Amresco,批号分别为 0341, 0712); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,批 P0010); 蛋白 Marker(北京全式金生物技术公司,批号 DM111); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BM0627);酪氨酸酶相关蛋

白-1(TRP-1,Santa cruz,批号 sc-166857);酪氨酸酶(TYR),TRP-2(Elabscience,批号分别为 ENT4750, ENT4792);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1051),HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1054);增强型化学发光(ECL)底物液(Thermo,批号 NCI5079);其他为国产市售试剂。

1.3 仪器 7900/Vii7 型逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(ABI7900/illumina eco),TCS0803 型荧光定量 PCR 管(EXTRAGEN/illumina),752 型分光光度计(上海舜宇恒科学仪器有限公司),DYCP-31CN 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂),JY300 型水平电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),DYCZ-24DN 型垂直电泳槽(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 药物的制备 上述各中药加水浸泡 0.5 h,之后大火煎煮沸腾,转小火 30 min,药液倒出;再加水,大火煎沸,小火 30 min,2 次药液混合后,浓缩至 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 细胞培养 细胞复苏:将 B16 细胞从液氮中取出,快速放入 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中,轻摇冻存管,使冻存液溶解。溶解后细胞转移至含有培养基的离心管中,使冻存液中的 DMSO 稀释,室温 $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,收集细胞。用含 10% 胎牛血清(FBS)的完全培养基,悬浮细胞,轻轻吹打混匀,接种至培养皿中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

细胞传代:细胞密度达 80% 时,进行细胞传代。吸弃培养基,PBS 清洗后,胰酶消化,待消化后,加培养基吹打均匀后,按适当比例进行传代。

2.3 CCK8 法筛选合适的药物浓度 细胞正常传代,计数,将细胞密度调整到 2×10^4 个/ $100\ \mu\text{L}$,接入 96 孔板,每孔 $100\ \mu\text{L}$ 细胞悬液,同时设空白组, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养过夜(在细胞孔周围孔内加入 $100\ \mu\text{L}$ 无菌 PBS)。根据不同分组和细胞处理设置分别处理细胞,每组 3 个复孔, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h。每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ CCK8, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 4 h(按 CCK8 试剂盒操作步骤测定各浓度组细胞活力)。酶标仪测定各孔吸光值 A_{450} 。

2.4 细胞分组 综合以往实验结果^[6-7],本次研究分为正常组(仅含有细胞,不加入药物),小柴胡汤低、中、高剂量组。

2.5 q-PCR 检测 mRNA 的表达 首先,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,严格按照说明书进行操作,取

溶解后的 RNA 1 μL 用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水稀释 200 倍后,经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳计算 RNA 的浓度和纯度。将总 RNA 放于 -80 °C 冰箱内保存以备用。然后,根据逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,各样品取相同量的 RNA 做逆转录,其反应条件:70 °C 5 min,短暂离心后置于冰上;42 °C 60 min,95 °C 5 min。合成的 cDNA 置于 -20 °C 冰箱中储存备用。再进行半定量 RT-PCR 检测,其反应条件:94 °C 4 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 25 s,30 cycles,72 °C 4 min,4 °C 4 min。最后 PCR 检测,其反应条件:50 °C 2 min,95 °C 10 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,40 cycles。50 °C 2 min,95 °C 10 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,40 cycles。行溶解曲线,最终数据以 2^{-ΔΔC_t} 进行分析。

TYR, TRP-1, TRP-2 与内参基因 β-actin 引物由巴菲尔生物公司设计合成,具体序列与扩增长度见表 1。

表 1 引物序列与扩增长度

Table 1 Primer sequences and amplification length

引物名称	序列	扩增片段 /bp
β-actin	上游 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3'	240
	下游 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	
TYR	上游 5'-AACACCTGAGGGACCACT-3'	141
	下游 5'-AACACCTGAGGGACCACT-3'	
TRP-1	上游 5'-CTGTGGATTATTGGGATGA-3'	147
	下游 5'-GTGAGCCACCACTTTGAG-3'	
TRP-2	上游 5'-GCTGATTAGTCGGAACCTCGA-3'	151
	下游 5'-GGTTGGCAGTTTCTCATTATT-3'	

2.6 数据处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析检验 (ANOVA), $P < 0.05$ 有统计学意义, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

3 结果

3.1 CCK8 检测结果 CCK8 实验检测细胞增殖情况,根据该预实验结果确定合适的药物浓度用以后续实验。设定 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0 g·L⁻¹ 6 个质量浓度梯度,处理 24 h 后,增殖率分别为 97%, 93%, 90%, 82%, 67%, 41%, 依据 CCK8 细胞增殖结果,最后选取小柴胡汤低、中、高质量分数分别为 0.1, 1, 2.5 g·L⁻¹ 用于实验。见表 2。

3.2 小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 表达的影响 电泳图谱可知,内参条

带, TYR, TRP-1, TRP-2 基因目的条带均清晰可见。实时荧光定量结果显示,与正常组比较,低、中、高浓度小柴胡汤水煎液能够显著下调 B16 黑素瘤细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 基因 mRNA 表达水平,各组均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 3, 图 1~4。

表 2 不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞增殖率的影响

Table 2 Effect of different concentrations of Xiaochaihu Tang on B16 cells proliferation rate

组别	剂量 /g·L ⁻¹	测定值			增殖率 /%
		1	2	3	
空白	-	0.34	0.34	0.34	-
正常	-	1.57	1.53	1.55	100
小柴胡	0.1	1.49	1.51	1.52	97
	0.25	1.48	1.45	1.47	93
	0.5	1.42	1.42	1.46	90
	1	1.36	1.33	1.31	82
	2.5	1.12	1.16	1.16	67
	5	0.84	0.81	0.86	41

注:与正常组比较,小柴胡质量浓度在 1 g·L⁻¹ 以上时对细胞的增殖有一定抑制作用。

表 3 不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of different concentrations of Xiaochaihu Tang on mRNA expression levels of TYR, TRP-1 and TRP-2 in B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	TYR	TRP-1	TRP-2
正常	-	1.09 ± 0.09	1.06 ± 0.07	1.05 ± 0.06
小柴胡	0.1	0.95 ± 0.06	0.82 ± 0.05 ²⁾	0.86 ± 0.07 ¹⁾
	1	0.71 ± 0.03 ²⁾	0.58 ± 0.06 ²⁾	0.51 ± 0.06 ²⁾
	2.5	0.44 ± 0.06 ²⁾	0.27 ± 0.03 ²⁾	0.35 ± 0.04 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 1~3 同)。

4 讨论

人体皮肤色素沉着的过程非常重要,它不仅决定皮肤、眼睛和头发的颜色,还可以保护皮肤免受紫外线的过度照射。尽管黄褐斑、雀斑等色素障碍性皮肤病的病因不全相同,但均存在不同程度的黑素代谢障碍。了解黑素的合成、转运及降解有助于理解皮肤色素沉着的复杂过程,采取有针对性的治疗措施以解决皮肤色素沉着问题。

黑素在黑素细胞中特化的细胞器黑素小体中合成,皮肤的颜色主要受黑素合成、转运和降解等过程影响。目前国内外对黑素代谢的研究还是集中在其

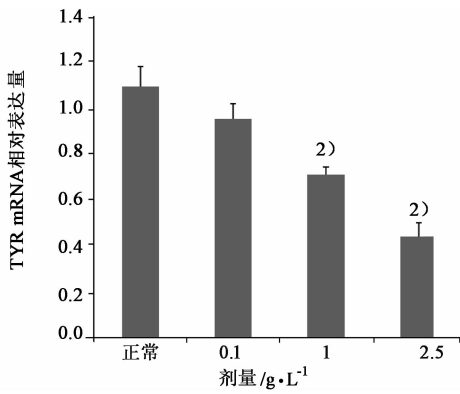


图 1 不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞 TYR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of Xiaochaihu Tang on mRNA expression level of TYR in B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

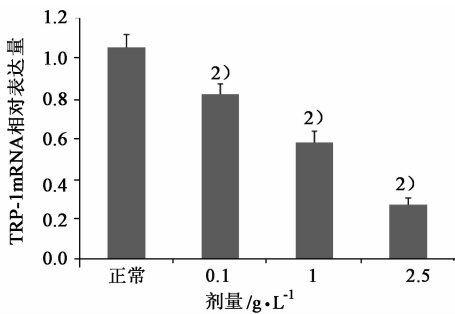


图 2 不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞 TRP-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of Xiaochaihu Tang on mRNA expression level of TRP-1 in B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

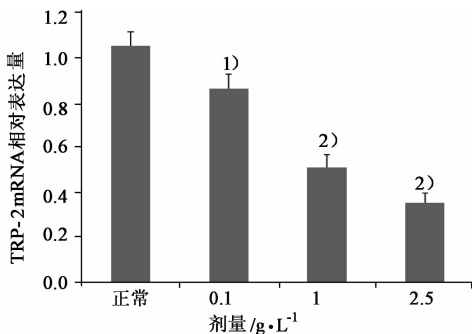
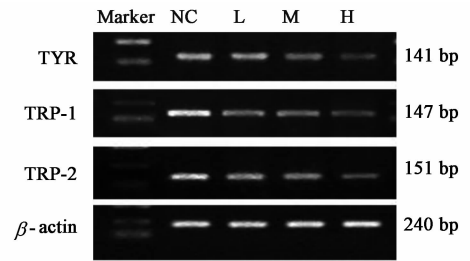


图 3 不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞 TRP-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of different concentrations of Xiaochaihu Tang on mRNA expression level of TRP-2 in B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

生成调控环节^[8-9], 这是一个受到精密调控的复杂级联反应过程, 每一阶段都受到许多信号分子的调节和限制^[10]。

酪氨酸酶家族是目前公认的黑素合成关键酶系统, 分别 TYR, TRP-1, TRP-2 (又称 DCT) 构成^[11-12]。酪氨酸酶基因控制着黑素合成的关键步骤, 它经转录翻译生成酪氨酸酶后, 再通过催化酪氨酸到多巴



Marker: DL2 000 marker; NC: 正常组; L: 低浓度组; M: 中浓度组; H: 高浓度组

图 4 不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 表达水平的影响 (电泳谱)

Fig. 4 Effect of different concentrations of Xiaochaihu Tang on mRNA expression levels of TYR, TRP-1 and TRP-2 in B16 cells (electrophoretogram)

胺的羟化反应和多巴胺到多巴醌的氧化反应这两个关键步骤来调控黑素合成, 是公认的黑素合成过程中的限速酶, 可决定黑素合成的速率^[13]。

酪氨酸酶家族成员中以酪氨酸酶在黑素合成过程中的作用被研究的最为广泛, 目前大多数皮肤脱色剂的作用机制就是通过抑制酪氨酸酶活性或者阻断酪氨酸生成黑色素的氧化途径, 来减少黑色素的生成^[14-15]。

其他两个家族成员 TRP-1 在黑素合成的下游途径中起重要作用, 可以提高真黑素/褐黑素的比值, 增加皮肤或毛发的黑素合成。TRP-1 突变可引起肤色变浅, 它与酪氨酸酶组成的复合体在酪氨酸酶的活化和稳定中起重要作用, 抑制 TRP-1 的表达会引起黑素体的结构异常^[16-17]。而 TRP-2 也可能与 TYR, TRP-1 共同组成复合体, 在黑素合成的后期发挥作用。此外, TRP-2 除了特异性的催化活性外, 也可起到稳定 TYR 的作用^[18-20]。

以往的研究已经证实小柴胡汤能通过抑制酪氨酸酶活性而减少黑素合成, 本研究采用 RT-PCR 法测定不同浓度小柴胡汤对 B16 黑素瘤细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 基因 mRNA 表达水平的影响, 结果表明与对照组相比, 随着浓度的增加, 小柴胡汤水煎液能够显著下调细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 的表达, 综合笔者前期研究结果^[6-7], 表明小柴胡汤对黑素合成的抑制作用除了通过直接抑制 TYR 活性外, 还可通过下调酪氨酸酶家族其他成员 TRP-1, TRP-2 的基因表达、蛋白合成三方面实现其抑制黑素生成的作用(目前大多数脱色剂对 TRP-2 无作用), 提示小柴胡汤对黑素生成的抑制可通过对酶蛋白转录后调节途径来实现。综上所述, 将小柴胡汤研制成新的外用皮肤美白剂与临床治疗色素过度沉着、美白

皮肤等具有一定开发应用前景。同时对其作用机制的后续深入研究也有重要意义。

[参考文献]

[1] Jin K S, Oh Y N, Hyun S K, et al. Betulinic acid isolated from vitis amurensis root inhibits 3-isobutyl-1-methylxanthine induced melanogenesis via the regulation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in B16F10 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 68(27):38-43.

[2] 周密思, 赵映前, 梅国强, 等. 小柴胡汤延缓皮肤衰老功效的理论探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):277-280.

[3] 周密思, 陈军, 赵映前. 调肝延缓皮肤衰老的理论探讨[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(2):51-52.

[4] 周密思, 陈军, 赵映前. 试论三焦气化与皮肤衰老的关系[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(10):90-91.

[5] 周密思, 陈军, 赵映前. 试论在延缓皮肤衰老过程中益气调血、疏利三焦与抗氧化的相关性[J]. 中医药学报, 2011, 39(6):54-57.

[6] 周密思, 陈军, 黄海, 等. 小柴胡汤对黑素瘤细胞酪氨酸酶活性及黑素合成的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(21):402-403.

[7] 陈军, 周密思, 黄海, 等. 小柴胡汤抗氧化延缓皮肤衰老功效的体外实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(22):2889-2891.

[8] Ubeid A A, Hantash B M. Minireview: peptide analogs and short sequence oligopeptides as modulators of skin pigmentation[J]. Curr Top Med Chem, 2014, 14(12):1418-1424.

[9] Gillbro J M, Olsson M J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents existing and new approaches [J]. Int J Cosmet Sci, 2011, 33(3):210-211.

[10] Yamaguchi Y, Hearing V J. Physiological factors that regulate skin pigmentation [J]. Biofactors, 2009, 35(2):193-199.

[11] Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing V J. The regulation of skin pigmentation [J]. J Biol Chem, 2007, 282(38):27557-27561.

[12] Lin J Y, Fisher D E. Melanocyte biology and skin pigmentation [J]. Nature, 2007, 445(7130):843-850.

[13] Costin G E, Hearing V J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress [J]. FASEB J, 2007, 21(4):976-994.

[14] Casanola-Martin G M, Le-Thi-Thu H, Marrero-Ponce Y, et al. Tyrosinase enzyme: an overview on a pharmacological target [J]. Curr Top Med Chem, 2014, 14(12):1494-1501.

[15] Wu B. Tyrosinase inhibitors from terrestrial and marine resources [J]. Curr Top Med Chem, 2014, 14(12):1425-1449.

[16] Cheung F W, Leung A W, Liu W K, et al. Tyrosinase inhibitory activity of a glucosylated hydroxystilbene in mouse melana melanocytes [J]. J Nat Prod, 2014, 77(6):1270-1274.

[17] Olivares C, Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2009, 22(6):750-760.

[18] Yuji Y, Vincent J. Hearing physiological factors that regulate skin pigmentation [J]. Biofactors, 2009, 35(2):193-199.

[19] Ko H H, Chiang Y C, Tsai M H, et al. Eupafolin, a skin whitening flavonoid isolated from *Phyla nodiflora*, downregulated melanogenesis: role of MAPK and Akt pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1):386-393.

[20] Jun H J, Lee J H, Cho B R, et al. Dual inhibition of γ -oryzanol on cellular melanogenesis: inhibition of tyrosinase activity and reduction of melanogenic gene expression by a protein kinase A-dependent mechanism [J]. J Nat Prod, 2012, 75(10):1706-1711.

[责任编辑 邹晓翠]