

# 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

闫姝<sup>1</sup>, 牛春影<sup>1</sup>, 徐红丹<sup>1</sup>, 熊辉<sup>1</sup>, 陈巧云<sup>1</sup>, 耿放<sup>2\*</sup>, 张宁<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150025)

**[摘要]** **目的:**探讨白桦脂醇治疗黄褐斑的内在作用机制。**方法:**选择对数生长期的 A375 细胞,培养 24 h,弃掉液体,然后分组并加入不同浓度药液 200  $\mu\text{L}$ ,组别设定为空白组、雌二醇组( $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的雌二醇)和白桦脂醇组(设定浓度的白桦脂醇),每组均设置 6 个复孔。用白桦脂醇干预 A375 细胞,噻唑蓝(MTT)法检测细胞活性;NaOH 裂解法检测黑素量;多巴氧化法检测酪氨酸酶(TYR)活性;逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测 TYR,酪氨酸酶相关蛋白-1(TRP-1)和酪氨酸酶相关蛋白-2(TRP-2)的表达,及丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路中关键蛋白激酶 ERK1,ERK2,JNK2 的 mRNA 表达。**结果:**与空白组比较,白桦脂醇在  $1, 1 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量下可明显抑制 A375 细胞黑素合成及 TYR 活性, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  白桦脂醇可明显下调 A375 细胞 TYR,TRP-1,TRP-2 mRNA 表达,以及 ERK1,ERK2,JNK2 mRNA 表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**白桦脂醇可能是通过抑制 TYR 活性和/或下调 TYR,TRP-1 及 TRP-2 mRNA 表达,抑制了 A375 细胞中黑素的合成,并且这种作用与抑制 ERK1,ERK2,JNK2 的基因表达有关。

**[关键词]** 黄褐斑;白桦脂醇;A375 细胞;黑素;MAPK 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0092-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016100092

## Effect of Betulin on A375 Cells Melanogenesis and Mechanism of Regulating Related Cell Signaling Pathways

YAN Shu<sup>1</sup>, NIU Chun-ying<sup>1</sup>, XU Hong-dan<sup>1</sup>, XIONG Hui<sup>1</sup>,  
CHEN Qiao-yun<sup>1</sup>, GENG Fang<sup>2\*</sup>, ZHANG Ning<sup>1\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the potential mechanism of betulin in treatment of chloasma. **Method:** The A375 cell lines in logarithmic phase were cultured for 24 hours, and then the liquid was discarded. The cultured cells were divided and added with different concentrations of 200  $\mu\text{L}$  drug liquid, and then divided into blank group, estradiol group ( $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  estradiol), betulin group (at set concentration), with 6 wells in each group. A375 cells were treated with betulin and then methyl thiazdyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect cells activity; NaOH schizolysis method and L-dopa oxidation method were respectively used to detect amount of melanin and the activity of tyrosinase (TYR). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to measure the expression levels of tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase related protein-2 (TRP-2), as well as the mRNA expression levels of the key protein kinases

**[收稿日期]** 20150413(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上基金项目(81274035);教育部春晖计划合作科研项目(Z2010018);高校博士点专项基金项目(20112327120009);黑龙江省博士后科研启动金项目(LBH-Q13162);黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划项目(2012)

**[第一作者]** 闫姝,在读硕士,从事中药药理研究, Tel:18845496960, E-mail:1259185488@qq.com

**[通讯作者]** \*耿放,博士,副教授,从事天然药物活性成分研究, Tel:0451-82475863, E-mail:genfang1980@163.com;

\*张宁,博士,副教授,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

ERK1, ERK2 and JNK2 in MAPK signal pathways. **Result:** As compared with the blank group, betulin of  $1, 1 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  can significantly inhibit melanin formation of A375 cells and activity of tyrosinase (TYR); betulin of  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  can significantly down-regulate mRNA expression levels of TYR, TRP-1, TRP-2 as well as ERK1, ERK2 and JNK2 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Betulin can inhibit the melanogenesis of A375 cells probably by inhibiting TYR activity and/or down-regulating TYR, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression levels, and this effect may be associated with inhibition of the expression of ERK1, ERK2 and JNK2 levels.

[**Key words**] chloasma; betulin; A375 cells; melanin; MAPK signal pathway

黄褐斑是临床诊疗中常见的一种获得性色素性疾病。人体内雌激素的变化是影响黄褐斑产生的重要因素之一<sup>[1]</sup>。近年来研究具有雌激素活性而无雌激素副作用的中草药逐渐成为焦点。本研究中的白桦脂醇就是一种源于杜仲的植物雌激素类成分。植物雌激素(PE)可作为选择性雌激素受体调节剂(SERM),依据组织的不同表现出雌激素受体调节剂或拮抗剂作用,少数具有潜在的抗皮肤衰老作用。SERM可与雌激素受体(ER)结合,对不同的组织发挥雌激素样或抗雌激素样作用<sup>[2]</sup>。黄褐斑患者的主要致病机制是黑素代谢障碍。黑素的合成受体内金属离子、激素、酪氨酸酶等各种因素调节,其中酪氨酸酶的活性是影响黑素合成的关键性因素<sup>[3]</sup>。本实验通过研究白桦脂醇对 A375 细胞的生物学特性及丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)细胞信号通路的影响,探讨白桦脂醇对黄褐斑的潜在治疗作用及作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人黑素瘤细胞 A375(中国科学院细胞中心)。

**1.2 药物及试剂** 白桦脂醇(纯度 98%,南京泽朗科技有限公司,批号 473983121010),雌二醇(纯度 98%,中国食品药品鉴定研究院,批号 150-28-21)。DMEM 培养液和 Trizol 细胞裂解液(美国 Gibco 公司,批号分别为 12491013,15596-026),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),聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司,批号 1392503Z)。

**1.3 仪器** MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司),TProfessional 型 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司),H4-200 型倒置显微镜(日本 Olympus 株式会社),Cham1Ge15000 型凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药液配制** 精密称取雌二醇 5.5 mg,用无水乙醇 4 mL 使其溶解,再用 DMEM 完全培养液稀释至浓度为  $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $-20^\circ\text{C}$  保存待用。精密称取白桦脂醇 8.8 mg,用 DMEM 完全培养液溶解,梯度稀释成 100, 10, 1,  $1 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  6 种浓度药液,调节 pH 至 6.8,  $-20^\circ\text{C}$  保存待用。

**2.2 细胞分组与处理** 选择对数生长期的 A375 细胞,胰酶消化,计数,把细胞  $3 \times 10^3$  个/孔接种到 96 孔培养板上,每孔培养液 200  $\mu\text{L}$ ,培养 24 h,弃掉液体,然后分组并加入各浓度药液 200  $\mu\text{L}$ 。组别设定为空白组、雌二醇组( $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  雌二醇)和白桦脂醇组(设定浓度的白桦脂醇)每组均设置 6 个复孔。将另一部分细胞  $9 \times 10^4$  个/孔接种到 6 孔培养板中,每孔 2 mL 培养液,分组情况同前,每组设置 4 个复孔。培养 48 h 后进行 MTT 实验,黑素含量实验,酪氨酸酶(TYR),活性实验,逆转录-PCR(RT-PCR)实验。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 细胞活性** 向 96 孔板各孔加  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 20  $\mu\text{L}$ ,相同环境中培养 4 h,弃上层液体,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$  恒温荡 10 min,酶标仪选择 490 nm 波长处测定各孔吸光度 A。

**2.3.2 黑素含量** 弃掉 6 孔板培养液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 0.25% 胰酶 1 mL 消化 10 min 后,加入 DMEM 培养液 1 mL 终止消化,收集各组细胞悬液至 15 mL 离心管中, $1\ 300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min,弃上清,加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,混合均匀, $37^\circ\text{C}$  水浴 1 h,再加入双蒸水 400  $\mu\text{L}$ ,混匀,每支离心管中取溶液 100  $\mu\text{L}$  至 96 孔板中,酶标仪 490 nm 处测定各孔 A。

**2.3.3 TYR 活性** 弃掉 96 孔板内的培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,每孔均加入 1% TritonX-100 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,并迅速将其置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中,30 min 后取出,室温条件融化。每孔加入提前预热

好的 0.2% L-dopa 溶液 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  下放置反应 3 h, 酶标仪 490 nm 处测定各孔 A。

**2.3.4 RT-PCR 法检测细胞 TYR, 酪氨酸酶相关蛋白 1 (TRP-1), TRP-2, 细胞外调节蛋白激酶 1 (ERK1), ERK2, C-JunN 末端蛋白激酶 2 (JNK2)**

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences of PCR

引物名称	上游引物	下游引物	片段长度/bp
TYR	5'-TCACGGCTCTGTTGAATGTCT-3'	5'-CTGAAGTTGGGGCAGATGAT-3'	143
TRP-1	5'-ACATCATTCCCTCACCAAAGAC-3'	5'-AGAAGTCCGAAAGCCAAGTAAA-3'	223
TRP-2	5'-GTTCTTTTCTTCCCTCCAGTG-3'	5'-TTCCTTTATTGTCAGCGTCAGA-3'	223
ERK1	5'-GGGAGGTGGAGATGGTGAAG-3'	5'-AGCAGGTTGGAGGGCTTTAGAT-3'	302
ERK2	5'-ACCCACACAAGAGATTGAAAGT-3'	5'-AAAAGCCACAACCTACCAGAAAC-3'	353
JNK2	5'-CCTTCTTTACCAGATGCTTTGTG-3'	5'-ATACGGTCAGTGCCTTGAATA-3'	303
$\beta$ -actin	5'-CGTGGACATCCGCAAAGAC-3'	5'-AAGAAAGGGTGTAAACGCAACTA-3'	302

扩增条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  下预变性 2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 退火 40 s (TYR 54  $^{\circ}\text{C}$ , TRP-1 57  $^{\circ}\text{C}$ , TRP-2 55  $^{\circ}\text{C}$ , ERK1 57  $^{\circ}\text{C}$ , ERK2 54  $^{\circ}\text{C}$ , JNK2 54  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\beta$ -actin 54  $^{\circ}\text{C}$ ), 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  终止延伸 10 min。PCR 扩增产物与 6  $\times$  DNA Loading Buffer 按 5 比 1 混合均匀, 上样到 1.5% 琼脂糖凝胶中, 80 V 恒压电泳 30 min 后, 凝胶成像系统观察电泳结果, 应用 gel-pro 凝胶分析软件分析电泳谱带, 用校正值 (TYR/ $\beta$ -actin, TRP-1/ $\beta$ -actin, TRP-2/ $\beta$ -actin, ERK1/ $\beta$ -actin, ERK2/ $\beta$ -actin, JNK2/ $\beta$ -actin) 表示 mRNA 水平。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 计量资料均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 用 LSD 法对各组数据进行两两比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对细胞活性的影响** 与空白组比较, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  白桦脂醇对细胞的增殖有显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  白桦脂醇对细胞的增殖有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 证明上述浓度的药物对细胞有毒性作用, 不适合进行下一步药效学的研究; 1, 1  $\times 10^{-1}$ , 1  $\times 10^{-2}$ , 1  $\times 10^{-3}$   $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的白桦脂醇不影响细胞活性。见表 2。

**3.2 对黑素合成的影响** 与空白组比较, 白桦脂醇给药浓度为 1, 1  $\times 10^{-1}$ , 1  $\times 10^{-2}$ , 1  $\times 10^{-3}$   $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 对黑素合成有显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 雌二醇组对黑素的合成有显著的促进作用 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**mRNA 表达** 收集 6 孔板中各组细胞并提取总 RNA, 各组以 RNA 3  $\mu\text{g}$  进行反转录。反应条件为 25  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  60 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  10 min 后终止, 得到 cDNA。以  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 为内参, 引物序列由上海生物工程技术有限公司设计与合成, 见表 1。

表 2 白桦脂醇对 A375 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effects of botulin on A375 cell activity ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	细胞增殖率%
空白	-	0.332 $\pm$ 0.037	100
雌二醇	1 $\times 10^{-3}$	0.410 $\pm$ 0.044 <sup>2)</sup>	101
白桦脂醇	100	0.137 $\pm$ 0.020 <sup>2)</sup>	37 <sup>2)</sup>
	10	0.275 $\pm$ 0.029 <sup>1)</sup>	83 <sup>1)</sup>
	1	0.356 $\pm$ 0.034	94
	1 $\times 10^{-1}$	0.317 $\pm$ 0.053	98
	1 $\times 10^{-2}$	0.325 $\pm$ 0.023	95
	1 $\times 10^{-3}$	0.356 $\pm$ 0.021	97

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 ~ 6 同)。

表 3 白桦脂醇对 A375 细胞黑素合成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Effects of botulin on melanin synthesis in A375 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	与空白组 A 比值/%
空白	-	0.079 $\pm$ 0.003	100
雌二醇	1 $\times 10^{-3}$	0.099 $\pm$ 0.003 <sup>2)</sup>	125 <sup>2)</sup>
白桦脂醇	1	0.060 $\pm$ 0.004 <sup>2)</sup>	76 <sup>2)</sup>
	1 $\times 10^{-1}$	0.062 $\pm$ 0.003 <sup>2)</sup>	78 <sup>2)</sup>
	1 $\times 10^{-2}$	0.064 $\pm$ 0.002 <sup>2)</sup>	81 <sup>2)</sup>
	1 $\times 10^{-3}$	0.070 $\pm$ 0.001 <sup>2)</sup>	89 <sup>2)</sup>

**3.3 对 TYR 活性的影响** 与空白组比较, 白桦脂醇给药浓度为 1, 1  $\times 10^{-1}$   $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 药物对 TYR 活性有极显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 白桦脂醇给药浓度为 1  $\times 10^{-2}$ , 1  $\times 10^{-3}$   $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 药物对

TYR 活性有显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ ); 雌二醇组对 TYR 活性具有极显著的促进作用 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 白桦脂醇对 A375 细胞 TYR 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effects of botulin on TYR activity in A375 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	与空白组 A 比值/%
空白	-	0.075 ± 0.001	100
雌二醇	$1 \times 10^{-3}$	0.092 ± 0.004 <sup>2)</sup>	121 <sup>2)</sup>
白桦脂醇	1	0.066 ± 0.001 <sup>2)</sup>	88 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-1}$	0.067 ± 0.003 <sup>2)</sup>	89 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-2}$	0.068 ± 0.004 <sup>1)</sup>	91 <sup>1)</sup>
	$1 \times 10^{-3}$	0.069 ± 0.002 <sup>1)</sup>	92 <sup>1)</sup>

**3.4 对 A375 细胞中 TYR, TRP-1 及 TRP-2 mRNA 表达的影响** 白桦脂醇对 A375 细胞 TYR 活性的影响呈剂量依赖性, 这里选用对细胞活性无影响且对 TYR 活性有较大影响的  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  白桦脂醇组作为研究对象。与空白组比较, 雌二醇组 TYR, TRP-1, TRP-2 的 mRNA 表达均明显增强 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 白桦脂醇组 TYR, TRP-1, TRP-2 的 mRNA 的表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5, 图 1。

表 5 白桦脂醇对 A375 细胞中 TYR, TRP-1 及 TRP-2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

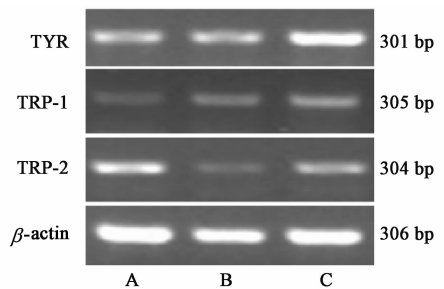
Table 5 Effects of botulin on expression of TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA in A375 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TYR / $\beta\text{-actin}$	TRP-1 / $\beta\text{-actin}$	TRP-2 / $\beta\text{-actin}$
空白	-	0.577 ± 0.095	0.504 ± 0.030	0.467 ± 0.023
雌二醇	$1 \times 10^{-3}$	0.843 ± 0.023 <sup>2)</sup>	0.628 ± 0.022 <sup>2)</sup>	0.517 ± 0.014 <sup>1)</sup>
白桦脂醇	1	0.460 ± 0.020 <sup>1)</sup>	0.326 ± 0.060 <sup>2)</sup>	0.356 ± 0.031 <sup>2)</sup>

**3.5 对 A375 细胞 ERK1, ERK2, JNK2 mRNA 表达的影响** 与空白组比较, 雌二醇组 ERK1, ERK2, JNK2 的 mRNA 表达均明显增强 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 白桦脂醇组 ERK1, ERK2, JNK2 的 mRNA 表达均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 6, 图 2。

#### 4 讨论

黄褐斑被认为是一种与雌激素相关的疾病, 因此一些有雌激素样作用的 PE 成分被用来治疗黄褐斑。Oerter 等<sup>[4]</sup> 证明当归具有较强的雌激素活性作用, 且能抑制酪氨酸活性。杨兰英<sup>[5]</sup> 发现六味地黄丸有雌激素样作用, 能够调节下丘脑-垂体-卵巢轴



A. 雌二醇组; B. 白桦脂醇组; C. 空白组 (图 2 同)

图 1 白桦脂醇对 A375 细胞 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of botulin on expression of TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA in A375 cell

表 6 白桦脂醇对 A375 细胞 ERK1, ERK2, JNK2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 6 Effects of botulin on expression of ERK1, ERK2, JNK2 mRNA in A375 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ERK1 / $\beta\text{-actin}$	ERK2 / $\beta\text{-actin}$	JNK2 / $\beta\text{-actin}$
空白	-	0.324 ± 0.014	0.511 ± 0.041	0.482 ± 0.032
雌二醇	$1 \times 10^{-3}$	0.481 ± 0.001 <sup>2)</sup>	0.849 ± 0.076 <sup>2)</sup>	0.555 ± 0.021 <sup>1)</sup>
白桦脂醇	1	0.379 ± 0.002 <sup>1)</sup>	0.366 ± 0.066 <sup>1)</sup>	0.232 ± 0.024 <sup>2)</sup>

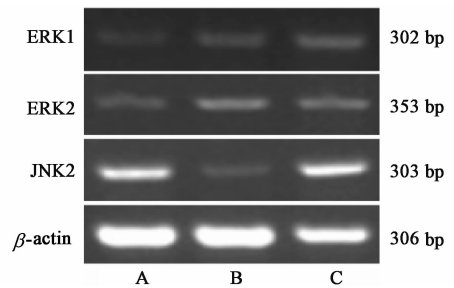


图 2 白桦脂醇对 A375 细胞 ERK1, ERK2, JNK2 mRNA 表达水平的影响

Fig. 2 Effects of botulin on expression of ERK1, ERK2, JNK2 mRNA in A375 cell

的功能从而使使早衰卵巢功能得到恢复。有学者通过免疫细胞化学技术证明正常人黑素细胞中存在 ER<sup>[6]</sup>。雌激素是一种细胞外信号, 其发挥作用的途径一般是与 ER 结合。植物雌激素与体内的雌激素受体结合而发挥作用的同时还可与雌二醇竞争性结合 ER 产生雌激素拮抗作用, 它的双向性可能主要取决于其剂量及机体的内源性雌激素状态及雌激素受体的数量和类型, 所以植物雌激素在临床上既可作为雌激素, 又能作为抗雌激素<sup>[7]</sup>。MAPK 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶, 广泛存在于大多数哺乳动物细胞中, 并参与细胞生物学反应, 调节细胞的发育、增殖、凋亡及分化。Cohen<sup>[8]</sup> 研究证明 MAPK 家族中

主要包括3个亚家族 ERK1/2, JNK1/2 以及 p38 MAPK。ERK 主要调节细胞生长和分化, JNK 和 p38 主要介导细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。本实验主要通过检测蛋白激酶 ERK1, ERK2, JNK2 的 mRNA 表达来研究 MAPK 信号通路是否参与黑素细胞中黑素生成的调控。黑素在皮肤内的增多是导致黄褐斑产生的主要原因, 黑素细胞的增多和黑素生成的增多则是引起黑色素增多的2个主要因素。黑素的合成受 TYR, TRP-1, TRP-2 调控, TYR 在黑素合成过程中的限速酶, TRP-1 和 TRP-2 在黑素生物合成途径下游起作用<sup>[11-13]</sup>, 由此笔者得知研究 TYR, TRP-1 以及 TRP-2 在黑素细胞中的表达是研究黄褐斑的治疗及治疗机制的关键。白桦脂醇是源于杜仲的植物雌激素类成分, 本实验用白桦脂醇作用于 A375 细胞来研究其治疗黄褐斑的作用机制。

研究发现白桦脂醇安全剂量作用于 A375 细胞后, 能显著抑制细胞黑素合成, 抑制 A375 细胞中 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 表达, 提示白桦脂醇可能通过抑制 TYR 活性和/或抑制 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 表达抑制黑素合成, 并且白桦脂醇能显著抑制 MAPK 信号通路蛋白激酶 ERK1, ERK2, JNK2 的 mRNA 表达, 推测 MAPK 信号通路可能参与了黑素细胞中黑素生成的调控。笔者从分子水平探讨了植物雌激素治疗黄褐斑的可能作用机制, 这对合理利用中药植物雌激素治疗黄褐斑等皮肤色素沉着疾病提供理论基础。植物雌激素与黄褐斑关系的研究还处于初期阶段, 仍需进行深入的研究和大量的临床验证。中药植物雌激素的探索也将为笔者提供新药源。

[参考文献]

[1] 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.  
[2] Stevenson S, Thornton J. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs[J]. Clin Interv Aging, 2007, 2(3): 283-97.

[3] 刘栋, 朱文元, 谭城. 皮质类固醇对培养 Cloudman S91 黑素瘤细胞株黑素合成的影响[J]. 临床皮肤科杂志, 2003, 32(1): 3-5.  
[4] Oerter Klein K, Janfaza M, Wong J A, et al. Estrogen bioactivity in fo-ti and other herbs used their estrogen cell bioassay[J]. Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(9): 4075-4079.  
[5] 杨兰英. 六味地黄丸治疗卵巢早衰的实验研究[J]. 山西中医学院学报, 2002, 3(1): 21-23.  
[6] Ohata C, Tadokoro T, Itami S. Expression of estrogen receptor  $\beta$  in normal skin, melanocytic nevi and malignant melanomas[J]. J Dermatol, 2008, 35(4): 215-221.  
[7] 郭娜, 黄秀榕, 祁明信, 等. 中药雌激素样作用的研究进展[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(4): 67-68.  
[8] Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells[J]. Trends Cell Biol, 1997, 7(9): 353-361.  
[9] Sundaramurthy P, Gakkhar S, Sowdhamini R. Computational prediction and analysis of impact of the cross-talks between JNK and P38 kinase cascades[J]. Bioinformatics, 2009, 3(6): 250-254.  
[10] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(22): 3525-3544.  
[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: 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.

[责任编辑 周冰冰]