

# 山茱萸提取物对黑素瘤细胞与角质形成细胞共培养模型中 TYR 及其相关蛋白 mRNA 表达的影响

李绍民<sup>2</sup>, 王兴焱<sup>1</sup>, 张宁<sup>1</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 陈巧云<sup>1</sup>, 陈景华<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007;

2. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154002)

**[摘要]** **目的:** 研究山茱萸提取物对黑素瘤细胞 A375 与角质形成细胞 HaCaT 共培养模型酪氨酸酶 (TYR), 酪氨酸酶相关蛋白-1 (TRP-1) 和酪氨酸酶相关蛋白-2 (TRP-2) mRNA 表达的影响。**方法:** 以 1:2 的比例构建的 A375 细胞与 HaCaT 细胞共培养模型, 将质量浓度为 1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup> 的山茱萸提取物作用 48 h, RT-PCR 法检测药物对共培养模型中 A375 细胞 TYR, TRP-1 和 TRP-2 mRNA 表达。**结果:** 与阴性对照组相比, 山茱萸提取物 1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup> 组 TYR, TRP-1 及 TRP-2 mRNA 表达量显著下调 ( $P < 0.01$ ), mRNA 下调率分别为 36.07%, 62.34%, 44.69% 和 24.10%, 53.00%, 16.11%。**结论:** 山茱萸提取物可能通过下调 TYR, TRP-1 和 TRP-2 mRNA 的表达而降低人黑素瘤细胞的黑素合成和酪氨酸酶活性。

**[关键词]** 山茱萸; 黑素合成; 酪氨酸酶及其相关蛋白; 基因表达; 黄褐斑

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0283-04

## Effects of Extract of Corni Fructus on Tyrosinase, Tyrosinase Related Protein-1 Tyrosinase Related Protein-2 Expression of Melanoma Cells and Keratinocytes in Co-culture Model

LI Shao-min<sup>2</sup>, WANG Xing-yan<sup>1</sup>, ZHANG Ning<sup>1</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>, CHEN Qiao-yun<sup>1</sup>, CHEN Jing-hua<sup>1\*</sup>

(1. Jiamusi College of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China;

2. The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of the extract of Corni Fructus on the mRNA expression of tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein-1 (TRP-1) and TRP-2 in co-culture model of melanoma cells and keratinocytes. **Method:** Differences concentration of the extract of Corni Fructus (1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup>) were added in co-culture model of A375 melanoma cells and HaCat keratinocytes. RT-PCR assay was used to detect the effects of the extract of Corni Fructus on the TYR, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression in A375 melanoma cells. **Result:** Compared with control group, the extract of Corni Fructus (1.0, 0.5 g·L<sup>-1</sup>) down-regulated mRNA expression of TYR, TRP-1 and TRP-2 in A375 melanoma cells by 36.07%, 62.34%, 44.69% and 24.10%, 53.00%, 16.11% respectively ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The extract of Corni Fructus can decrease the melanogenesis by down-regulating the mRNA expression of tyrosinase and its related protein.

**[Key words]** Corni Fructus; melanogenesis; tyrosinase and its related protein; gene expression; chloasma

山茱萸是中医治疗黄褐斑方剂中常被采用的中药, 中医认为山茱萸通过补肾的功效来治疗黄褐斑。

**[收稿日期]** 20120424(008)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅青年学术骨干教师资助计划(1154G15); 黑龙江省自然科学基金面上项目(D200810)

**[第一作者]** 李绍民, 硕士, 教授, 从事感染疾病治疗研究, Tel: 13945468762, E-mail: lishaomin1966@163.com

**[通讯作者]** \* 陈景华, 硕士, 教授, 从事中医外科学研究, Tel: 0454-6105553, E-mail: cjhua5553@163.com

我们以往的研究<sup>[1]</sup>证实,中药山茱萸提取物能通过抑制黑素合成的关键酶 TYR 活性而抑制黑素的合成。但黑素的代谢除与 TYR 相关外,还间接受 TRP-1 和 TRP-2 的影响。为了进一步在分子水平研究其治疗黄褐斑机制,我们应用 RT-PCR 技术,检测了药物干预后对共培养模型中 TYR,TRP-1 和 TRP-2 mRNA 表达的影响。

### 1 材料

**1.1 药物** 山茱萸 Corni Fructus 购自北京同仁堂制药集团哈尔滨药店,经黑龙江中医药大学佳木斯学院陈孝忠副教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸的干燥成熟果肉。

**1.2 仪器** BCM-1000A 生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);IX71 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);TCL-16G-C 高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Tprofessional Standard 96 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司);Heliosy 可见紫外分光光度计(美国热电公司);HF-90 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);DYY-10C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);DYCP-31D 型水平电泳槽(北京六一仪器厂);ChamIgel5000 凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司)。

**1.3 细胞株** A375 由中国科学院细胞中心提供;HaCat 细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

**1.4 材料与试剂** 细胞培养瓶、培养板、滤膜(corning 公司);MEM 培养基,Gibco 公司,批号 110601;TRIZOL 细胞裂解液,Gibco 公司,批号 1279327;胰蛋白酶,BiLLab 公司,批号 20100901;逆转录试剂盒,BIO BASIC INC,批号 2522010001;DNA 多聚酶链式反应(PCR)试剂盒,上海生工生物工程技术服务有限公司,批号 24921005;DNA Marker D2000,北京 TIANGEN 公司,批号 20110105;引物核苷酸片段,大连宝生物工程有限公司,批号 110225;6 × DNA Loading Buffer,5 × RNA Loading Buffer 北京 Solarbio 公司,批号 110307;其他试剂均为分析纯。

### 2 方法

**2.1 山茱萸的提取与药液制备** 称取山茱萸药材 100 g,分别用 10 倍量的蒸馏水回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,浓缩,向浓缩后提取液中加 95% 乙醇至总体积的 70%,醇沉除杂质,过滤,滤液冷冻干燥成固体粉末。临用前精密称取各中药提取物固体粉末 30.0 mg,用 15 mL MEM 培养液溶解,得到基础浓度 2 g·L<sup>-1</sup>,0.22 μm 滤膜过滤, MEM 培养液逐级稀释,最终得到提取物质量浓度为 1,0.5 g·L<sup>-1</sup>(以生药浓度折算:6,3 g·L<sup>-1</sup>)。

**2.2 分组** 实验分阴性对照组和给药组,阴性对照组共培养细胞只加培养液,给药组共培养细胞加含不同浓度山茱萸提取物的培养液。

**2.3 细胞共培养及给药** 取对数生长期的 A375 细胞和 HaCat 细胞,分别经 0.25% 胰蛋白酶消化,1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min、MEM 培养液重悬。细胞计数,以 A375 细胞:HaCat 细胞比例为 1:2 将两种细胞悬液混合,调整细胞密度为 4.5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 接种在 6 孔板中,每孔 2 mL。5% CO<sub>2</sub>,37 °C 培养 24 h,弃掉培养液,给药组分别加入含 1,0.5 g·L<sup>-1</sup> 山茱萸提取物的 MEM 培养液,阴性对照组只加培养液,每孔 2 mL,每组设 4 个复孔,继续培养 48 h。

**2.4 总 RNA 提取** 各组共培养细胞培养 48 h 后,吸弃培养液。参照试剂说明,每组样本加入 Trizol 裂解液,经氯仿、异丙醇、75% 乙醇提取总 RNA,提取的 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 5,18,28 s 三条 RAN 电泳带;紫外分光光度法测得 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.6 ~ 1.8,并由 260 nm 吸光度值计算出 RNA 浓度。

**2.5 引物设计合成** 引物设计及合成由大连宝生物工程有限公司完成,以 β-actin 为内参照,引物具体序列信息见表 1。

**2.6 逆转录合成 cDNA** 参照逆转录试剂盒操作说明冰浴上进行操作,在 0.2 mL 薄壁 PCR 管中分别加入 4 μg 总 RNA 样品、引物六聚体 1 μL,DEPC 水补至 11 μL,混匀,微离心 3 ~ 5 s。70 °C 加热 5 min,冰浴 30 s。再置冰浴上加入 5 × 反应缓冲液 4 μL,RNase 抑制剂(20 U·μL<sup>-1</sup>)1 μL, dNTP 混合

表 1 PCR 引物序列

引物名称	上游引物	下游引物	预扩增片段长度/bp
TYR	5'-TCTGCCTTGGCATAGACT-3'	5'-GACCTCCCATGTACTCATC-3'	143
TRP-1	5'-GTATGACCCTGCTGTTTCG 3'	5'-TGGCACCATGTTGTATTG-3'	223
TRP-2	5'-GGGTTTCTGCTCAGTTGC 3'	5'-TCACGGTCATCCTGGTTT-3'	233
β-actin	5'-GTGGACATCCGCAAAGAC 3'	5'-AAAGGGTGTAAACGCAACTAA-3'	302

物( $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $2\text{ }\mu\text{L}$ ,混匀,短暂离心收集。 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 $5\text{ min}$ 。继续加入 AMV 反转录酶( $10\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) $2\text{ }\mu\text{L}$ , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 $10\text{ min}$ 后, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 $60\text{ min}$ ,最后 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 $10\text{ min}$ 终止反应,得到 cDNA, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用或直接用于 PCR 扩增。

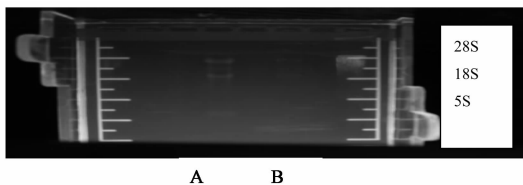
**2.7 PCR 扩增** 将 PCR 管置于冰浴上,加入山茱萸提取物组和阴性对照组 cDNA 样品,每管 $2\text{ }\mu\text{L}$ ,每组加 $4$ 管,再向所有管中加入 $10\times$ 反应缓冲液 $5\text{ }\mu\text{L}$ ,dNTP $5\text{ }\mu\text{L}$ ,Taq 酶( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) $0.2\text{ }\mu\text{L}$ , $\text{MgCl}_2$  $3\text{ }\mu\text{L}$ 。向每组的不同管中分别加入 TYR, TRP-1, TPR-2 和  $\beta$ -actin 的上下游引物,上下游引物分别加入 $1\text{ }\mu\text{L}$ ,最后每支 PCR 管用 $0.1\%$  DEPC 水定容至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。然后进行 $35$ 个周期的 PCR 扩增反应,反应条件:每个周期为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 $30\text{ s}$ , $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TYR), $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TRP-1), $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TPR-2), $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ( $\beta$ -actin)退火 $40\text{ s}$ , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $40\text{ s}$ ,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $10\text{ min}$ 。最后得到 $1,0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 山茱萸提取物和阴性对照组 PCR 扩增产物。

**2.8 PCR 扩增产物电泳结果分析** ChamlGel5000 凝胶成像系统 Quantity one1-D 分析软件读取扩增产物条带吸光度。以靶条带吸光度占内参照吸光度的百分比反映目的基因相对表达量; mRNA 下调率 =  $(1 - \text{山茱萸各浓度组吸光度} / \text{阴性对照组吸光度}) \times 100\%$ 。

**2.9 统计处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  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。

### 3 结果

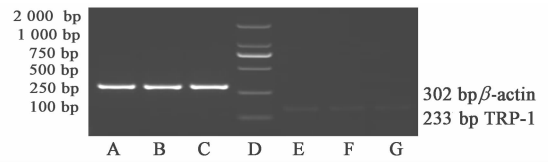
**3.1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳** 图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图见 18S 和 28S rRNA 显示清晰, RNA 保持了良好的完整性。



A. 阴性对照组; B.  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  
图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

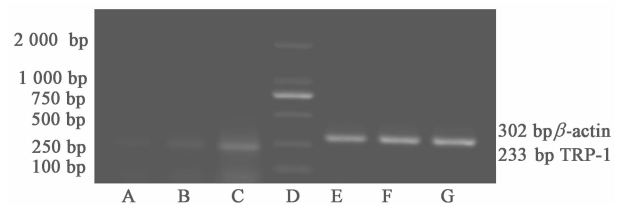
**3.2 对 TYR, TRP-1, TRP-2 基因 mRNA 表达的影响** 结果见图 2 ~ 图 4 和表 2。与阴性对照组相比, $1,0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 山茱萸提取物组对共培养模型 TYR、TRP-1 和 TRP-2 mRNA 的表达有显著抑制作用( $P < 0.01$ ),使共培养模型黑素细胞 TYR 基因 mRNA 的表达分别

下调 $36.07\%$ , $24.10\%$ ,使 TRP-1 基因 mRNA 的表达分别下调 $62.34\%$ , $53.0\%$ ,使 TRP-2 基因 mRNA 的表达分别下调 $44.69\%$ , $16.11\%$ ,见图 5。



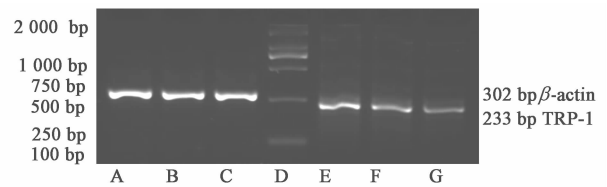
A. 阴性对照组  $\beta$ -actin; B.  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  $\beta$ -actin;  
C.  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  $\beta$ -actin; D. Marker; E. 阴性对照组 TYR;  
F.  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TYR; G.  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TYR

图 2 山茱萸提取物对共培养模型黑素瘤细胞 TYR mRNA 表达的影响 (凝胶图)



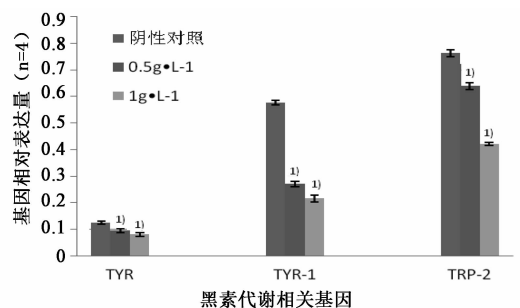
A.  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TRP-1; B.  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TRP-1;  
C. 阴性对照组 TRP-1; D. Marker; E.  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  $\beta$ -actin;  
F.  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  $\beta$ -actin; G. 阴性对照组  $\beta$ -actin

图 3 山茱萸提取物对共培养模型黑素瘤细胞 TRP-1 mRNA 表达的影响 (凝胶图)



A. 阴性对照组  $\beta$ -actin; B.  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  $\beta$ -actin;  
C.  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  $\beta$ -actin; D. Marker; E. 阴性对照组 TRP-2;  
F.  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TRP-2; G.  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TRP-2

图 4 山茱萸提取物对共培养模型黑素瘤细胞 TRP-2 mRNA 表达的影响 (凝胶图)



与阴性对照组相比<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

图 5 山茱萸提取物对共培养模型黑素瘤细胞 TYR, TYR-1 和 TRP-2 mRNA 表达影响的定量分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

表 2 山茱萸提取物对共培养模型黑色素瘤细胞 TYR、TYR-1 和 TRP-2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	终质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	TYR 表达量	下调值 /%	TYR-1 量	下调值 /%	TRP-2 表达量	下调值 /%
阴性对照组	-	0.125 ± 0.006		0.575 ± 0.009		0.761 ± 0.014	
山茱萸提取物	0.5	0.095 ± 0.006 <sup>1)</sup>	24.10	0.270 ± 0.010 <sup>1)</sup>	53.00	0.638 ± 0.013 <sup>1)</sup>	44.69
	1	0.080 ± 0.007 <sup>1)</sup>	36.07	0.216 ± 0.013 <sup>1)</sup>	62.34	0.421 ± 0.006 <sup>1)</sup>	16.11

注:与阴性对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

Curto 等<sup>[1]</sup> 提出理想的脱色素药物应具备的标准是细胞毒作用浓度 IC<sub>50</sub> > 0.1 g·L<sup>-1</sup> (细胞存活率 > 75%) 的药物才有进一步的研究价值,即在抑制 TYR 活性和黑素生成的浓度下,对细胞活力和增殖力影响很小。我们以往的研究显示山茱萸提取物的细胞毒作用浓度 IC<sub>50</sub> 为 2.5 g·L<sup>-1</sup>,且 2,1,0.5 g·L<sup>-1</sup> 山茱萸提取物对黑素合成的抑制效果优于熊果苷组<sup>[2]</sup>,提示本药在治疗色素沉着性疾病方面有很好的进一步开发的价值。但 2 g·L<sup>-1</sup> 山茱萸提取物对共培养细胞的增殖力呈现显著的抑制作用(细胞存活率为 69%),即具有较强的细胞毒作用,故本次研究只选用无细胞毒作用的 1,0.5 g·L<sup>-1</sup> 2 个质量浓度。

黑素的生成是 MC 的 1 个复杂的生化过程,至少有 3 种相关的酶参与其中:TYR,TRP-1 和 TRP-2,它们同属于 TYR 基因家族成员,其中 TYR 是黑素合成的关键酶。它们的表达量和活性的改变可影响黑素的生成。TYR 具有酪氨酸羟化酶和 Dopa 氧化酶的活性,羟化作用是将酪氨酸羟化为多巴,氧化作用则将多巴氧化为多巴醌。多巴醌的化学性质不稳定,它继续沿着黑素合成的路线发生自动氧化反应,一条路线是先生成性质不稳定的多巴色素,然后多巴色素在 TRP-1 和 TRP-2 的参与下经多个步骤后自动氧化生成优黑素(黑/棕色);另一条路线是在半胱氨酸或谷胱甘肽的参与下合成褐黑素(红/黄色);TRP-1 具有 5,6-二羟吲哚酸(DHICA)氧化酶活性,在黑素合成的下游途径中起重要作用;TRP-2 为多巴醌互变异构酶,可催化多巴醌变成 DHICA,催化黑素合成的后续步骤,具有加速黑素生成作用。Winder 提出 TYR,TRP-1,TRP-2 和 stablin 等家族成员在体内位于黑素小体同一多酶复合体中,其

中 TRP-1,TRP-2 对维持 TYR 在黑色素小体膜上的稳定具有重要作用,通过彼此相互作用共同调节着黑素生成<sup>[3]</sup>。TYR 及 TRP-1,TRP-2 使黑素合成增加主要是优先刺激优黑素合成,而褐黑素合成量很少,优黑素在黑素总量中占很大比例,从而使皮肤的色素沉着明显<sup>[4-5]</sup>。TYR,TRP-1 和 TRP-2 使黑素合成增加的同时还促使黑素小体扩散。

本实验将山茱萸提取物作用于 A375 与 HaCat 构建的共培养模型上,发现在无细胞毒作用的安全浓度下(1,0.5 g·L<sup>-1</sup>),与阴性对照组相比,山茱萸提取物能够显著下调共培养模型中 TYR,TRP-1,TRP-2 mRNA 的表达,结合其对黑素含量及 TYR 活性的抑制作用结果<sup>[1]</sup>,说明山茱萸对黑素合成的抑制作用是通过抑制 TYR 活性和(或)下调 TYR,TRP-1 及 TRP-2 mRNA 的表达而实现的。

#### [参考文献]

- [1] Curto E V, Kwong C, Hermersdorfer H, et al. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase; *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57(6):663.
- [2] 王兴焱,王天晔,陈巧云,等. 山茱萸水提物对黑色素瘤细胞与角质形成细胞共培养模型黑素合成的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12):141.
- [3] 雷铁池,朱文元. 酪氨酸酶基因家族与皮肤黑素生成 [J]. *国外医学:皮肤性病学分册*, 1998, 24(2):81.
- [4] Schaffer J V, Bolognia J L. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond [J]. *Arch Dermatol*, 2001, 137(11):1477.
- [5] Tzamalaki M, Ancans J, Thody A J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides [J]. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50(2):125.

[责任编辑 李玉洁]