

# 当归提取物对黑素瘤细胞与角质形成细胞 共培养模型黑素合成的影响

陈景华,王兴焱,王雪,陈巧云,张宁\*

(黑龙江中医药大学佳木斯学院,黑龙江 佳木斯 154007)

**[摘要]** **目的:**考察当归水提取物对体外构建的人黑素瘤细胞(A375)与角质形成细胞(HaCaT)共培养模型黑素合成的影响。**方法:**分别培养 A375 细胞与 HaCaT 细胞, A375 细胞与 HaCaT 细胞以 1:2 的比例接种于培养板后加入 MEM 培养基培养 24 h。用 MEM 将当归提取物制备成  $0.1 \sim 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  5 个质量浓度,细胞给药作用 48 h,采用 MTT 法、NaOH 裂解法、多巴氧化法分别测定给各组 A375 细胞与 HaCaT 细胞共培养模型的细胞活力、黑素含量和酪氨酸酶活性。**结果:**与阴性对照组相比,2, 1, 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  当归提取物对共培养细胞的增殖有显著促进作用( $P < 0.01$ ); 2, 1, 0.5, 0.25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  当归提取物对黑素合成有显著的抑制作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 呈现浓度依赖性的抑制作用趋势; 当归提取物各浓度组对酪氨酸酶活性均有显著抑制作用, 2, 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  组的抑制作用弱于熊果苷组( $P < 0.01$ ), 0.5, 0.25, 0.125  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  组与熊果苷组作用相当。**结论:**当归水提取物能够通过抑制酪氨酸酶活性来抑制 A375 细胞和 HaCaT 细胞共培养体系的黑素合成, 为临床使用当归治疗黄褐斑提供了实验依据。

**[关键词]** 当归; 黑素瘤细胞; 角质形成细胞; 共培养; 黑素; 酪氨酸酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0205-04

## Effects of Extract of *Angelica sinensis* on Melanin Synthesis in Co-culture System of Human Melanoma and Keratinocytes

CHEN Jing-hua, WANG Xing-yan, WANG Xue, CHEN Qiao-yun, ZHANG Ning\*

(Jiamusi College of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of the extract of *Angelica sinensis* on the melanin synthesis in co-culture system of human melanoma and keratinocytes cells. **Method:** A375 and HaCaT cell were cultured respectively in MEM and co-cultured in 1:2 ratio for 24 hours. The co-cultured cells were cultured for 48 hours after MEM containing different concentration of *A. sinensis* were added to the dishes. The proliferation, the tyrosinase (TYR) activity and melanin contents of the co-culture cells were measured by MTT, dopa-oxidase and NaON assays respectively. **Result:** Compared with control group, the cells proliferation were markedly increased by the extract of *A. sinensis* in the concentration range of  $0.5\text{-}2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ), the melanin synthesis were markedly suppressed in the concentration range of  $0.25\text{-}2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), TYR activity were significantly suppressed in the concentration range of  $0.125\text{-}2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The water extract of *A. sinensis* can decrease the melanogenesis by decreasing the activity of tyrosinase though it can increase the proliferation of the cells in higher concentration.

**[Key words]** *Angelica sinensis*; melanoma; keratinocytes; co-culture; melanin; tyrosinase

中医认为黄褐斑的病机为肝气郁结、脾失健运、肾虚不足等脏腑功能失常,终至气血不能上荣于面,浊瘀

**[收稿日期]** 20111206(020)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅青年学术骨干教师资助计划(1154G15)

**[第一作者]** 陈景华, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医外科学研究, Tel: 0454-6105553, E-mail: cjhua5553@163.com

**[通讯作者]** \* 张宁, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及体内代谢研究, Tel: 0454-6050350, E-mail: zhang-ning2006@hotmail.com

阻于面部而成黄褐斑<sup>[1]</sup>;也有人认为气滞血瘀等是本病的病机。中药当归具有活血补血作用,是内服和外用治疗黄褐斑的常用中药。但是其治疗黄褐斑的作用机制并不清楚,本研究观察了当归对黑素瘤细胞与角质形成细胞共培养模型中细胞增殖、黑素的合成以及酪氨酸酶活性的影响,为其治疗黄褐斑提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 熊果苷购自 Sigma 公司。当归 *Angelicae Sinensis Radix* 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。

**1.2 仪器** BCM-1000A 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),IX71 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),HF-90 CO<sub>2</sub> 培养箱,DT5-6B 型低速自动平衡离心机(北京时代北利离心机有限公司),MK3 型酶标仪(热电上海仪器有限公司)。

**1.3 试剂** MEM 培养基(Gibco 公司,批号 1280330),胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT, Billab 公司),磷酸盐缓冲液(PBS,北京中杉金桥有限公司),胎牛血清(Sigma 公司,批号 20091101),左旋多巴(L-dopa)、曲拉通 X-100(TritonX-100)、二甲基亚砷(DMSO)(均购于 Sigma 公司)。

**1.4 细胞株** 人黑素瘤细胞(A375)和角质形成细胞(HaCaT)(均购于中国科学院细胞中心)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** A375 细胞与 HaCaT 细胞各自在培养瓶中用 MEM 培养液培养,生长至对数期时,用胰蛋白酶消化、离心、计数,A375 细胞与 HaCaT 细胞按 1:2 的比例制成细胞悬液,接种至所需规格的培养板中继续培养。

**2.2 当归的提取与药液制备** 称取当归药材 100 g,用 10 倍量的水回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,回收溶剂,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,滤液浓缩至浸膏。精密称取浸膏,用 MEM 培养液稀释至 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 g·L<sup>-1</sup>(折算成生药质量浓度分别为 12, 6, 3, 1.5, 0.75 g·L<sup>-1</sup>)。

**2.3 熊果苷阳性对照药物的制备** 精密称取熊果苷对照品 10.0 mg,溶于 10 mL MEM 培养液中,0.22 μm 滤膜过滤,-20℃ 保存备用。

**2.4 细胞增殖活力的测定** 将 A375 细胞与 HaCaT 细胞以 1:2 的比例制成细胞悬液,调整细胞密度为 1.5 × 10<sup>7</sup> 个/L,接种在 96 孔板中,每孔 200 μL。5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,去掉培养液,阴性对照组只

加培养液,阳性对照组加入 1 g·L<sup>-1</sup>熊果苷,给药组加入当归提取物各浓度含药培养液,每孔 200 μL,每组设 6 个复孔,继续培养 48 h,在培养结束前 4 h,每孔加 20 μL 5 g·L<sup>-1</sup> MTT,继续培养 4 h,去掉培养液,每孔加 DMSO 150 μL,振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测吸光度(A),以 A 代表细胞增殖活力。测定 3 次,取平均值。

**2.5 黑素含量** 将 A375 细胞与 HaCaT 细胞以 1:2 的比例制成细胞悬液,调整细胞悬液中的细胞密度为 4.5 × 10<sup>7</sup>/L,接种在 6 孔板中,每孔 2 mL,5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,去掉培养液,加入各浓度当归水提取物含药培养液(阴性对照组只加培养液,阳性对照组加入 1 g·L<sup>-1</sup>熊果苷,每组设 4 个复孔,每孔 2 mL,继续培养 48 h,去掉培养液,用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS 清洗 1 次,每孔再分别用 0.25% 胰酶消化收获细胞,1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min,去上清,沉淀加入 100 μL 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH,于 37℃ 下 1 h,加入 400 μL 双蒸水将 NaOH 稀释成 0.2 mol·L<sup>-1</sup>,混匀后分别取 100 μL 置 96 孔板中,用酶标仪在 490 nm 处测 A,以 A 代表黑素含量。每组测定 3 次,取平均值。

**2.6 酪氨酸酶(TYR)活性** 将 A375 细胞与 HaCaT 细胞以 1:2 的比例制成细胞悬液,调整细胞悬液中的细胞密度为 1.5 × 10<sup>4</sup> 个/mL,接种在 96 孔板中,每孔 200 μL。5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,去掉培养液,按 2.5 设组及加入各浓度药物,每组设 6 个复孔,每孔 200 μL,继续培养 48 h,每孔加入 1% Triton X-100 溶液 100 μL,于 -80℃ 下 30 min,室温溶解,每孔加入 0.2% 左旋多巴溶液 50 μL,于 37℃ 3 h,用酶标仪在 490 nm 处测 A,以 A 代表 TYR 活性。测定 3 次,取平均值。

**2.7 统计学处理** 全部数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析检验, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对细胞增殖活力的影响** 与阴性对照组相比,2.0 ~ 0.5 g·L<sup>-1</sup>当归提取物对共培养细胞的增殖有显著促进作用( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 对黑素含量及 TYR 活性的影响** 与阴性对照组相比,2 ~ 0.25 g·L<sup>-1</sup>当归提取物对黑素合成有显著的抑制作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),呈现浓度依赖性的抑制作用趋势。当归提取物各浓度组对 TYR 活性均有显著抑制作用,2, 1 g·L<sup>-1</sup>组的抑制作用弱于熊果苷组( $P < 0.01$ ),0.5, 0.25, 0.125 g·L<sup>-1</sup>与熊果苷组相当。见表 1。

表1 当归提取物对共培养细胞的增殖、酪氨酸酶活性及黑素含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

A

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖活力	黑素含量	TYR 活性
阴性对照	-	$0.483 \pm 0.008$	$0.100 \pm 0.003$	$0.080 \pm 0.005$
当归提取物	2	$0.675 \pm 0.054^{2,4)}$	$0.048 \pm 0.006^{2)}$	$0.070 \pm 0.003^{2,4)}$
	1	$0.594 \pm 0.026^{2,4)}$	$0.053 \pm 0.004^{2)}$	$0.068 \pm 0.002^{2,4)}$
	0.5	$0.537 \pm 0.015^{2,4)}$	$0.066 \pm 0.003^{2,4)}$	$0.064 \pm 0.002^{2)}$
	0.25	$0.503 \pm 0.011$	$0.090 \pm 0.004^{1,4)}$	$0.064 \pm 0.003^{2)}$
	0.125	$0.498 \pm 0.018$	$0.100 \pm 0.009^{4)}$	$0.063 \pm 0.003^{2)}$
熊果苷	1.0	$0.481 \pm 0.006$	$0.053 \pm 0.002^{2)}$	$0.060 \pm 0.005^{2)}$

注:与阴性对照组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与熊果苷组相比<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

黑素细胞(MC)合成黑素主要发生于黑素小体,以酪氨酸为底物,在TYR的作用下合成黑素<sup>[2]</sup>。影响黑素合成的途径有多种。可能通过影响MC增殖、TYR活性或TYR生成量而影响黑素合成。

生理情况下一个黑素细胞与周围约36个角质形成细胞相接触,构成表皮黑素单位<sup>[3]</sup>,黑素代谢是一个发生于黑素细胞(MC)与角质形成细胞(KC)之间并主要由KC及其分泌的细胞因子调控的完整的过程。1988年Halaban<sup>[4]</sup>首次成功地建立了体外模拟“表皮黑素单元”的MC和KC共培养模型,使研究者得以使用更接近皮肤生理学特点的模型来开展一系列研究。有研究结果<sup>[5-7]</sup>表明KC-MC共培养体系下针对影响黑素代谢药物筛选的结果不同于单独培养MC基础上的筛选结果。李杰等<sup>[8]</sup>利用A375与HaCaT细胞共培养模型研究了中药方“白消一号”治疗白癜风的机制,发现白消一号能促进黑素瘤细胞增殖、酪氨酸酶活性及黑素合成。作者<sup>[9]</sup>曾利用本模型验证了公认的脱色药熊果苷可剂量依赖性抑制酪氨酸酶活性和黑素合成。本模型中所用细胞能无限传代,较原代培养的正常人KC和MC容易获得和培养。

治疗黄褐斑可通过抑制MC的增殖,或抑制TYR活性等途径实现。但破坏或过度抑制MC增殖的脱色药(如氢醌)长期高浓度使用可致不均匀色素脱失。因而Curto等<sup>[10]</sup>提出理想的脱色药物应具备的标准是,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。

中医理论认为当归通过活血补血作用治疗黄褐斑,本研究显示,当归提取物浓度 $\geq 0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对黑素合成有显著的抑制作用,且呈现浓度依赖性抑制的趋势;在 $0.125 \sim 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对TYR活性有显著抑制作用,但未显示有浓度依赖性抑制的趋势,说

明其抑制黑素合成还存在其他的机制。令人感兴趣的是,本实验的当归提取物对黑素合成和TYR活性有显著抑制作用的同时,却对细胞的增殖有显著的促进作用。当归在中医临床上既用于治疗色素减退性皮肤病白癜风,同时也用于色素沉着性皮肤病黄褐斑的治疗,可能与其既能促进MC的增殖,又能抑制酪氨酸酶的活性有关。本组实验中, $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的当归提取物对黑素合成的抑制作用与熊果苷组比无显著差别,但对TYR活性的抑制作用却弱于熊果苷组,可能与这两个浓度组同时对细胞增殖有显著促进作用有关,说明当归提取物对黑素合成量的最终影响结果可能取决于其促MC的增殖与抑制酪氨酸酶的综合作用。本研究结果提示我们,为使治疗黄褐斑的针对性更强,疗效更好,应掌握当归的合理用药量。亓玉青<sup>[11]</sup>的研究表明维甲酸在高浓度时( $5000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )下调TYR活性和黑素含量,同时有促进MC增殖的作用,与本实验中的当归提取物对MC的作用相似。邓燕<sup>[12]</sup>的研究结果显示当归提取物对正常人MC的增殖和TYR活性有促进作用,而李艳莉<sup>[13]</sup>的研究显示当归50%乙醇水提取物对马铃薯酪氨酸酶有抑制作用。结合本实验的研究结果,推测造成这些实验结果不同的原因可能与药提取方法不同使其中的有效成分及其含量不同有关,也可能与实验选择的模型不同有关。

#### [参考文献]

- [1] 刘丽娜,罗小军,张峻. 黄褐斑从“调理气血”论治探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):234.
- [2] Slominski A, Tobin D J, Shibahara S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and Its hormonal regulation[J]. Physiol Rev,2004,84(4):1155.
- [3] Yoon T J, Hearing V J. Coculture of mouse epidermal cells for studies of pigmentation[J]. Pigment Cell Res, 2003(16):159.

# 复方人参健脑液对大鼠缺血再灌注脑细胞损伤的作用

路雪雅\*, 胡京红

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:观察复方人参健脑液对脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法:大鼠随机分为正常对照组,脑缺血再灌注模型组,复方人参健脑液高剂量组(10 g·kg<sup>-1</sup>),复方人参健脑液低剂量(5 g·kg<sup>-1</sup>),维生素 E 组(1 g·kg<sup>-1</sup>)。采用颈动脉结扎法构建大鼠脑缺血再灌注损伤模型,硫代巴比妥酸法测定脑细胞脂质过氧化物含量,比色法测定还原型谷胱甘肽含量,氧电极法测定脑细胞耗氧量。结果:模型组大鼠脑脂质过氧化物含量明显增加( $P < 0.001$ ),还原型谷胱甘肽含量减少( $P < 0.001$ ),脑细胞耗氧量增加( $P < 0.01$ )。复方人参健脑液高剂量、低剂量组与模型组比较,脑脂质过氧化物水平降低( $P < 0.001$ ),还原型谷胱甘肽含量增加( $P < 0.001$ ),脑细胞耗氧量减少( $P < 0.001$ )。结论:复方人参健脑液对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

**[关键词]** 复方人参健脑液; 脑缺血再灌注; 脂质过氧化物; 还原型谷胱甘肽; 脑细胞耗氧

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0208-04

## Compound Ginseng Brain Tonic Liquid on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

LU Xue-ya\*, HU Jing-hong

(Basic Medical College, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Compound Ginseng Brain Tonic Liquid (CGBTL) on

**[收稿日期]** 20120212(009)

**[通讯作者]** \*路雪雅,副研究员,从事生物化学研究,Tel:010-64286995,15201328572,E-mail:gaojian1663@126.com

- [4] Halaban R, Langdon R, Brichall N, et al. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes [J]. Cell Biol, 1988, 107:1611.
- [5] 解士海,陈志强,卜今,等.丹皮酚在体外对人黑素细胞酪氨酸酶活性及黑素生成的影响[J].中华皮肤科杂志,2006,39(11):641.
- [6] Duval C, Regnier M, Schmidt R, et al. Distinct melanogenic response of human melanocytes in monoculture in co-culture with keratinocytes and in reconstructed Epidermis, to UV exposure [J]. Pigment Cell Res, 2001, 14:348.
- [7] Hunt G, Todd C, Cresswell J E.  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone and its analogue N1e4DPhe7 $\alpha$ -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes [J]. J Cell Science, 1994, 107:205.
- [8] 李杰,顾军,毕新岭,等.白消一号方对黑素瘤细胞与角质形成细胞混合培养模型中黑素合成的影响[J].中国中西医结合皮肤性病学期刊,2009,8(3):139.
- [9] 王兴焱,王天叶,陈巧云,等.熊果苷对 A375 细胞与 HaCaT 共培养模型中黑素合成的影响[J].中国美容医学,2010,19(9):1321.
- [10] 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.
- [11] 亓玉青. MC 激活基因的调控与治疗白发与黄褐斑的研究[D].天津:天津医科大学,2007:5.
- [12] 邓燕,杨柳.当归对体外 MC 和酪氨酸酶的激活作用[J].第一军医大学学报,2003, 23(3): 239.
- [13] 李艳莉,钟里. 6 种中药抑制酪氨酸酶活性的实验研究[J].时珍国医国药, 2002, 13(3): 129.

[责任编辑 聂淑琴]