

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110420. 0931. 008

## 山茱萸水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

王兴焱, 王天晔, 陈巧云, 张宁, 刘慧, 王盈盈, 陈景华\*  
(黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**[摘要]** 目的:考察山茱萸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)单层混合共培养模型黑素合成的影响。方法:将山茱萸水提取物制备成含生药 0.75 ~ 12 g·L<sup>-1</sup> 5 个质量浓度,细胞给药,通过 MTT 法、NaOH 裂解法、多巴氧化法分别测定给药前后 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:与空白对照组相比,6,3,1.5,0.75 g·L<sup>-1</sup> 山茱萸水提取物对共培养体系的细胞增殖率影响不大,对共培养体系黑素生成均有显著差异( $P < 0.01$ ),对共培养体系酪氨酸酶活性有差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与阳性对照药物熊果苷相比,6,3 g·L<sup>-1</sup> 山茱萸水提取物对共培养体系黑素生成有显著差异( $P < 0.01$ ),作用强于熊果苷,1.5,0.75 g·L<sup>-1</sup> 山茱萸水提取物对共培养体系黑素生成无差异;与阳性对照药物熊果苷相比,6,3,1.5,0.75 g·L<sup>-1</sup> 山茱萸水提取物对共培养体系酪氨酸酶活性无差异。结论:山茱萸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,为临床使用山茱萸治疗黄褐斑提供了实验依据。

**[关键词]** 山茱萸;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(2011)12-0141-03

## Effects of Water Extract of Corni Fructus on Melanin Synthesis in Co-culture System of Human Melanocytes and Keratinocytes

WANG Xing-yan, WANG Tian-ye, CHEN Qiao-yun, ZHANG Ning,  
LIU Hui, WANG Ying-ying, CHEN Jing-hua\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the effects of water extract of Corni Fructus on the melanin synthesis in the co-culture system of human melanocytes and keratinocytes. **Method:** The proliferation, the tyrosinase activity and melanin contents of A375 and Hacat co-culture cells were measured by MTT, dopaoxidase and NaOH methods, respectively. **Result:** The tyrosinase activity and melanin content were decreased significantly ( $P < 0.05$ ) by the water extract of Corni Fructus. Dose dependence of the water extract was observed from 0.75 -12 g·L<sup>-1</sup>. But the cell proliferation was not inhibited markedly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The melanin synthesis of A375 and Hacat co-culture cell system was decreased significantly by water extract of Corni Fructus. And tyrosinase activity inhibition was proved to be the mechanism of melanin decrease.

**[Key words]** Corni Fructus; melanocytes; keratinocytes; co-culture; melanin; tyrosinase

**[收稿日期]** 20110110(006)

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金面上项目(D200810);黑龙江省科技厅青年科学基金(QC08C11);黑龙江省教育厅青年学术骨干教师资助计划(1154G15)

**[第一作者]** 王兴焱,博士研究生,副教授,主要从事西医外科疾病教学及研究,Tel:0454-6102308,E-mail:wangxingyan3865@yahoo.com.cn

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

**[网络出版时间]** 2011-04-20 09:31

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110420.0931.008.html>

中医认为黄褐斑为气滞血瘀、肝肾不足、脾胃虚弱等致面生色斑,山茱萸具有补益肝肾、收敛固涩的功效,是治疗黄褐斑的常用药物。但是有关山茱萸治疗黄褐斑的实验研究较少,且作用机制尚不明确。黄褐斑是一种色素沉着性皮肤病,与黑素的过度合成有关,酪氨酸酶是参与黑素合成的关键酶,其活性决定了黑素合成的速率<sup>[1-2]</sup>。鉴于山茱萸治疗黄褐斑的潜力,李洪武<sup>[3]</sup>、范慧英、朱文元<sup>[4]</sup>等通过蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定了山茱萸提取物对酪氨酸酶活性的影响,发现山茱萸的水提取物和醇提取物均能使酪氨酸酶活性降低,这种方法中测定的蘑菇酪氨酸酶的作用与体内酪氨酸酶作用类似。但是,人体内黑素合成是一个极为复杂的过程,人体内一个黑素细胞约与周围 36 个角质形成细胞相接,黑素细胞的生存、增殖、分化,都依赖于其所处组织环境中的生长因子,而几乎所有的这些因子均已证实来源于角质形成细胞或成纤维细胞,以往实验没有考虑到这些因素。所以,本实验用 A375 细胞和 HacaT 细胞共培养体系来进一步考察山茱萸对黑素合成的作用及机制,更深入地为山茱萸治疗黄褐斑的理论研究提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 山茱萸购自北京同仁堂制药集团哈尔滨药店。

**1.2 仪器** BCM-10004 型超净工作台(苏净集团安泰公司制造),OLYMPUS IX71 倒置显微镜,HF-90 CO<sub>2</sub> 培养箱,8-5K 台式低速离心机(上海安亭科学仪器厂),MK3 型酶标仪(热电上海仪器有限公司)。

**1.3 试剂** MEM 培养基(购于 Gibco 公司,批号 I280330);胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)(购于 Billab 公司);磷酸盐缓冲液(PBS)(购于北京中杉金桥有限公司);胎牛血清(Sigma 公司,批号 20091101)阳性对照药物熊果苷、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)购于中科院上海细胞所。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 购买来的 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,以 A375 细胞与 HacaT 细胞 1:2 的比例制成细胞悬液,放入所需规格

的培养板中继续培养。

**2.2 山茱萸的提取与药液制备** 称取山茱萸药材 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,剩余提取液加乙醇至 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 12,6,3,1.5,0.75 g·L<sup>-1</sup>(以生药浓度折算,以下同)。

**2.3 阳性对照药物熊果苷的制备** 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 细胞增殖率** 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>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,空白组不加细胞,只加培养液,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,实验组加入山茱萸水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),计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验组}} / A_{\text{阴性对照组}}) \times 100\%$$

**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>4</sup> 个/mL,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,加入各浓度山茱萸水提取物含药培养液(根据 MTT 实验结果选取 4 个质量浓度 6,3,1.5,0.75 g·L<sup>-1</sup>),空白组不加细胞,只加培养液,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。

$$\text{黑素含量} = [(A_{\text{实验组}} / \text{细胞数的平均值}) / (A_{\text{阴性对照组}} / \text{细胞数的平均值})] \times 100\%$$

**2.6 酪氨酸酶活性** 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数为 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  $\mu\text{L}$ ,于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  下 30 min,室温溶解,每孔加入 0.2% 左旋多巴溶液 50  $\mu\text{L}$ ,于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下 3 h,用酶标仪在 490 nm 处测 A。

**2.7 统计学处理** 全部数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行两因素方差分析检验。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用  $t$  检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 山茱萸水提取物对细胞增殖率的影响** 结果见表 1,与空白对照组相比,12  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  组对细胞生长的抑制率超过 30%,细胞毒作用较强,不适于进行药理学研究;其他各组对细胞生长的抑制率在 10% 以内,对细胞正常生长无明显影响,均适于进行药理学研究。

表 1 山茱萸水提取物对共培养体系细胞增殖率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	终质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A	与阴性对照组 A 比值/%
阴性对照	-	1.017 $\pm$ 0.071	100
山茱萸	12	0.703 $\pm$ 0.025	69.07
	6	0.981 $\pm$ 0.067	96.41
	3	0.987 $\pm$ 0.062	96.93
	1.5	1.009 $\pm$ 0.036	99.17
	0.75	1.099 $\pm$ 0.051	99.22
熊果苷	1	0.970 $\pm$ 0.043	95.34

**3.2 山茱萸水提取物对黑素含量的影响** 结果见表 2,与阴性对照组相比,各浓度组对黑素合成的抑制作用均有统计学差异( $P < 0.05$ );与阳性对照药熊果苷组相比,1.5,0.75  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  对黑素合成的抑制作用无差异,抑制作用与熊果苷类似,而 6,3  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  有显著差异( $P < 0.01$ ),抑制作用强于熊果苷。

**3.3 山茱萸水提取物对酪氨酸酶活性的影响** 结果见表 2,与阴性对照组相比,各浓度组对酪氨酸酶活性的抑制作用均有统计学差异( $P < 0.05$ );与阳性对照药熊果苷组相比,各浓度组对酪氨酸酶活性的抑制作用无差异,抑制作用与熊果苷类似。

### 4 讨论

本研究表明山茱萸水提取物对 A375 细胞与 Hacat 细胞共培养体系中黑素合成和酪氨酸酶活性

表 2 山茱萸水提取物对共培养体系酪氨酸酶活性及黑素含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	终质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	黑素含量/%	酪氨酸酶活性/%
阴性对照	-	100	100
山茱萸	6	65.76 $\pm$ 0.03 <sup>2,4)</sup>	91.53 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>
	3	73.20 $\pm$ 0.03 <sup>2,4)</sup>	91.94 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>
	1.5	92.06 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	92.98 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
	0.75	93.55 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	93.18 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
熊果苷	1	88.59 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	95.04 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>

注:酪氨酸酶活性和黑素含量以占阴性对照组吸光度值的百分率表示,阴性对照组设定为 100%。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> $P < 0.01$ 。

均有抑制作用,且药物对黑素合成的抑制作用与对酪氨酸酶活性的抑制作用成正相关,推测药物是通过抑制酪氨酸酶活性来抑制黑素合成的;而药物对细胞增殖率无明显抑制作用,说明药物毒性较小,不会对其他指标测定结果的准确性造成影响。

本实验中用于筛选山茱萸祛斑有效部位的共培养模型,现在已广泛被研究者接受、运用,通过以上实验可以看出山茱萸水提取物确有阻碍黑素合成的作用,作用效果与蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法基本一致,一方面验证了实验的准确性,另一方面开启了筛选药物有效部位方法的新思路,为山茱萸独立治疗黄褐斑等色素沉着性疾病奠定了基础。山茱萸治疗黄褐斑等色素沉着性皮肤病具有一定的应用开发前景,值得做进一步研究。

### [参考文献]

[1] Kubo I, Yokokawa Y, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from bolivian medicinal plants[J]. J Nat Prod, 1995, 58(5):739.  
 [2] 王芳. 桑叶中酪氨酸酶抑制成分的研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2008.  
 [3] 李洪武,朱文元. 治疗黄褐斑的中药复方对酪氨酸酶活性的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 33(2).  
 [4] 范慧英,李洪武. 六味地黄丸及其组方中药对酪氨酸酶活性影响的实验研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 1999, 15(4):149.

[责任编辑 聂淑琴]