补肾祛斑颗粒抑制细胞内黑色素合成机制

李 峰[1] 汤 慧[2] 李世梅[2] 程晓峰[2] 陈艳秋[2] 白 雯[2] 马 赞[3]

摘要 **目的** 观察补肾祛斑颗粒抑制细胞内黑色素合成的分子机制。**方法** 20 只 SPF 级雌性 SD 大鼠完全随机分为生理盐水组(对照组)、补肾祛斑颗粒高、中、低剂量组,每组 5 只。高、中、低剂量组分别灌胃补肾祛斑颗粒 4.8、2.4、1.2 g/kg(分别相当于临床剂量 24、12、6 倍),2 次/日,共 3 日。提取含药血清。RT-PCR 检测 G 蛋白偶联黑皮质素 1 受体(melanocortin 1 receptor,MC1R)、小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor,MITF)、酪氨酸酶(tyrosinase,TYP)、酪氨酸酶相关蛋白 1(tyrosinase-related protein 1,TYRP1)及酪氨酸酶相关蛋白 2(tyrosinase-related protein 2,TYRP2)mRNA 水平的表达,Wertern-blot 检测磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2(phosphorylated-extracellular regulated MAP kinase1/2,p-ERK)、TYP、TYRP1 及 TYRP2 蛋白水平的表达,NaOH 溶解法测定细胞内黑色素含量,多巴色素法测定细胞 TYP 活性,MTT 检测细胞活性。**结果** 与对照组比较,各给药组 MC1R、MITF、TYP、TYRP1 及 TYRP2 mRNA 水平表达降低($P<0.05$),TYP、TYRP1、及 TYRP2 蛋白水平表达降低($P<0.05$),细胞内黑色素含量及 TYP 活性降低($P<0.05$),p-ERK 及细胞增殖活力升高($P<0.05$);PD98059 抑制 ERK 后,各给药组 MC1R、MITFmRNA 水平表达差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,高剂量组 TYP、TYRP1 及 TYRP2 mRNA 表达降低($P<0.05$),p-ERK、TYP、TYRP1 及 TYRP2 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),细胞内黑色素含量、TYP 活性及细胞增殖活力差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 补肾祛斑颗粒可能通过上调 p-ERK 来抑制细胞内 TYP 及其相关蛋白表达,抑制细胞内黑色素合成。

关键词 黄褐斑;补肾祛斑颗粒;含药血清;酪氨酸酶及其相关蛋白;黑色素

Mechanisms Involved in the Inhibition of Melanin Synthesis by Bushen Quban Granule

LI Feng[1], TANG Hui[2], LI Shi-mei[2], CHENG Xiao-feng[2], CHEN Yan-qiu[2], BAI Wen[2], and MA Zan[3] *1 Department of Urology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an (710061); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, The Military 323 Hospital, Xi'an (710054); 3 Faculty of Traditional Chinese Medicine, School of Medicine, Weinan Vocational and Technical College, Shaanxi (714000)*

ABSTRACT **Objective** To observe the molecular mechanism of Bushen Quban Granule (BQG) for inhibiting the synthesis of intracellular melanin. **Methods** Twenty SPF grade female SD rats were divided into four groups by completely randomized method, i.e., the control group (fed with normal saline), high, middle, and low dose BQG groups (administered with BQG at 4.8, 2.4, 1.2 g/kg by gastrogavage, equivalent to 24, 12, and 6 times clinical doses, respectively, twice per day for 3 days in total), 5 in each group. Drug containing serum was collected. Expressions of melanocortin 1 receptor (MC1R), microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase (TYP), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), and tyrosinase-related protein 2 (TYRP2) at the mRNA level were detected by RT-PCR. Expressions of phosphorylated-extracellular regulated MAP kinase1/2 (p-ERK), TYP, TYRP1 and TYRP2 at the protein level were detected by Western blot. Intracellular melanin contents were determined by NaOH dissolving method. Activities of tyrosinase were determined by Dopa pigment method, and the cell viability was detected by MTT. **Results** Compared with the control group, expressions of MC1R, MITF, TYP,

基金项目:军区医药卫生科研计划项目(No.CLZ12JB32)

作者单位:1.西安交通大学第一附属医院泌尿外科(西安 710061);2.解放军第 323 医院中医科(西安 710054);3. 渭南职业技术学院医学院中医系(陕西 714000)

通讯作者:李世梅,Tel:13279361397,Email:360173584@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.11.1373

TYRP1 and TYRP2 at the mRNA level were down-regulated ($P<0.05$), and those of TYP, TYRP1 and TYRP2 at the protein level were also down-regulated ($P<0.05$), intracellular contents of melanin and the activity of tyrosinase decreased ($P<0.05$), but the level of p-ERK and the proliferation of cells increased in each medicated group ($P<0.05$). When ERK was inhibited by its inhibitor PD98059, there was no statistical difference in expressions of MC1R or MITF at the mRNA level among all medicated groups ($P>0.05$). Compared with the control group, mRNA expressions of TYP, TYRP1 and TYRP2 decreased in the high dose BQG group ($P<0.05$), but with no significant difference in protein expressions of p-ERK, TYP, TYRP1 and TYRP2 ($P>0.05$). There was no statistical difference in the content of melanin, the activity of TYP, or the proliferation of cells between the control group and the high dose BQG group ($P>0.05$). Conclusion　BQG could inhibit the synthesis of intracellular melanin through up-regulating p-ERK to inhibit the expression of tyrosinase and its related proteins.

KEYWORDS　chloasma; Bushen Quban Granule; drug containing serum; tyrosinase and its related proteins; melanin

黄褐斑多发于成年女性,常见表现为颜面部对称性蝴蝶状色素沉着,影响患者身心健康。目前对于黄褐斑的治疗,主要采用激光治疗,以氨甲环酸、维生素 C 和维生素 E 为主的系统治疗,以皮肤剥脱剂为主的外用治疗以及中医中药治疗[1]。补肾祛斑颗粒是解放军第三二三医院中医科李世梅主任治疗肾虚血瘀型黄褐斑多年经验方,其疗效突出[2]。血清药理学研究发现其能通过抑制细胞内酪氨酸酶(tyrosinase,TYP)活性抑制细胞内黑色素合成[3],其潜在分子机制目前还不清楚。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)通路在黑色素生成中起到了非常重要的作用,特别是细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated MAP kinase1/2,ERK 1/2),其磷酸化后可促进多种细胞生物行为如增殖、新陈代谢等[4]。ERK 在黑色素生成中也起着至关重要的作用,其磷酸化水平的升高能抑制小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor,MITF)、G 蛋白偶联黑皮质素 1 受体(melanocortin 1 receptor,MC1R)、TYP、酪氨酸酶相关蛋白 1(tyrosinase-related protein 1,TYRP1)和酪氨酸酶相关蛋白 2(tyrosinase-related protein 2,TYRP2)的表达[5,6]。本研究拟观察补肾祛斑颗粒抑制细胞内黑色素合成分子机制。

材料与方法

1　动物　SPF 级成年雌性 SD 大鼠 20 只,体重 200~280 g,动物合格证号:SCXK2007-001。购于西安交通大学医学院实验动物中心并饲养于该中心 SPF 级动物房。

2　细胞及培养　A375 人黑素瘤细胞(西安交通大学医学院中心实验室馈赠)。培养于含 10% 胎牛血清的无酚红 DMEM 培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 孵育箱中。待细胞状态良好,呈对数生长时,PBS 清洗 3 次,0.25% 胰酶消化,PBS 中和后离心,按实验要求种板[7]。培养基中均含有青霉素和链霉素。

3　药物　补肾祛斑颗粒组成:菟丝子、枸杞子、当归、白芍各 9 g,覆盆子、补骨脂、川芎、蒲黄各 6 g,䗪虫 3 g,放军第 323 医院药厂生产,科研用药,每剂含 15 g 生药。

4　主要试剂及仪器　胰蛋白酶(批号:T2600000)、MTT(批号:M2128)、酪氨酸(批号:T2900000)、TYP(T0206)、左旋多巴(批号:333786)购自美国 Sigma 公司,PD98059(批号:S1177)购自美国 selleckchem 公司。无酚红 DMEM 培养基(批号:21063-029)、胎牛血清(批号:10099-141)、青霉素和链霉素母液(批号:15240-062)购自美国 Gibco 公司,Cocktail(批号:05892971001)和 PMSF(批号:10837091001)购自美国 Roche 公司。RNA 提取试剂盒(批号:220010)购自上海飞捷,cDNA 反转试剂盒(批号:RR047Q)购自日本 TaKaRa 公司,PVDF 膜(批号:1620177)购自美国 Bio-Rad 公司,三氯乙酸、乙醇、氢氧化钠、碳酸氢钠、二甲基亚砜(DMSO)、氯化钠、氯化钾、氟化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水合氯醛、Tris-base、精氨酸、SDS 等均购于西安交通大学试剂科。TYP(批号:9319)一抗购自美国 CST 公司,TYRP1(批号:sc-10443)、TYRP2(批号:sc-10451)及 β-actin(批号:sc-130300)一抗购自美国 Santa Cruz 公司,荧光二抗(批号:CW0114、CW0145)购自西安壮志生物有限公司。上海力申 CO_2 培养箱(型号:NAPCO-5410)、日本 OLYMPUS 倒置显微镜(型号:

IX83)、美国 Bio-Teck 多功能酶标仪(型号:ELX800)、美国 Bio-Rad 垂直电泳仪(型号:1658005)、转膜仪(型号:1658005)、PCR 仪(型号:1852148)、CF96 QPCR 系统(型号:1855196)、美国 LI-COR 荧光成像系统(型号:Odesey-CLX)、高压灭菌锅、冰箱、水浴锅、超净台、Millipore 一次性滤器、电热恒温干燥箱、普通离心机、水平离心机、培养皿、96 孔板、48 孔板、6 孔板、离心管、吸管、加样枪及其枪头、微量振荡器均由西安交通大学医学院中心实验室提供。

5 动物分组、干预方法及含药血清制备 动物按完全随机法分为生理盐水组(对照组)、补肾祛斑高、中、低剂量组,每组 5 只。高、中、低剂量组分别灌胃补肾祛斑颗粒 4.8、2.4、1.2 g/kg(分别相当于临床剂量 24、12、6 倍),2 次/日,共 3 日。末次给药前 8 h 禁食不禁水。末次给药 1 h 后腹腔注射 1% 水合氯醛麻醉,下腔静脉采血,每组血样分空白组和 ERK 抑制剂 PD98059 组(抑制组),分装于离心管中。水平离心机 3 000 r/min离心 20 min,吸取上层血清于无菌离心管中,再次离心。取上清于离心管中,经 56 ℃恒温水浴 30 min 处理灭活补体后分装,置 -20 ℃冻存备用,所有操作尽可能无菌[8]。

6 检测指标及方法

6.1 总 RNA 提取与反转 细胞处理 24 h 后提取总 RNA,其中抑制组在 PD98059(20 μmol/L)预处理 4 h 后,弃去培养基,然后加入对应的含 PD98059 的含药血清,继续处理 24 h 后再提取。根据飞捷 2000 快速 RNA 提取试剂盒操作说明进行,细胞用 4 ℃预冷 PBS 洗 3 次后加入裂解液,静置 2 min 后移入分离柱。15 000 r/min 离心 30 s 后弃去收集管中液体,分离柱中加入 500 mL 清洗液,15 000 r/min离心 30 s 后弃去收集管中液体,重复一次后分离柱中不加清洗液 15 000 r/min 离心 30 s。将分离柱移入无酶 EP 管中,加入 50 μL 洗脱液,静置 1 min,15 000 r/min离心 1 min。分光光度计定量。反转 20 μL体系:200 EP 中加入 4 μL 5 × TaKaRa 反转 MIX,加入 1 000 ng RNA,无酶水刚体系补充至 20 μL。Bio-Rad PCR 仪反转录成 cDNA。

6.2 RT-PCR 25 μL 体系:12.5 μL SYB-GREEN,8.5 μL 双蒸水,上下游引物各 1 μL,2 μL cDNA。于 RT-PCR 仪中 40 个循环。以 GAPDH 作为内部对照。引物序列见表 1。

6.3 Western blot 细胞处理 48 h 后用 4 ℃预冷 PBS 洗 3 次后采用含有蛋白酶抑制剂(cocktail 及 PMSF)和 NaF 的 RIPA 裂解液裂解,15 000 r/min 离心 15 min 后取上清,BCA 法定量,加入 Loading buffer 煮 5 min。空白组细胞处理同前,而抑制组在 PD98059(20 μmol/L)预处理 4 h 后,弃培养基后加入对应含 PD98059 的含药血清,继续处理 48 h 后提取蛋白。12% SDS-PHAGE 胶每孔上样 30 μg,转膜到 PVDF 膜后 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。一抗(1∶1 000)孵育过夜后荧光二抗(1∶3 000)孵育 2 h,Odesey 荧光成像系统显影。

表 1 引物序列

基因名称	序列	长度(bp)
MC1	上游 5′CATCGCCAAGAACCGGAAC3′	19
	下游 5′GTAGCGCAGTGCGTAGAAGA3′	20
MITF	上游 5′TGCCCAGGCATGAACACAC3′	19
	下游 5′TGGGAAAAATACACGCTGTGAG3′	22
TYP	上游 5′GGCCTCAATTTCCCTTCACA3′	20
	下游 5′CAGAGCACTGGCAGGTCCTAT3′	21
TYRP1	上游 5′TCTCTGGGCTGTATCTTCTTCC3′	22
	下游 5′GTCTGGGCAACACATACCACT3′	21
TYRP2	上游 5′CGACTCTGATTAGTCGGAACTCA3′	23
	下游 5′GGTGGTTGTAGTCATCCAAGC3′	21
GAPDH	上游 5′AGCCACATCGCTCAGACAC3′	19
	下游 5′GCCCAATACGACCAAATCC3′	19

6.4 NaOH 溶解法测定细胞内黑色素含量 参照参考文献[9],细胞处理同上,取 12 万个细胞于 EP 管中,超声破碎,1 200 r/min 离心 5 min,沉淀用 10% 三氯乙酸和乙醇洗涤,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL 含 10% DMSO 的 1 mol/L NaOH 溶液,80 ℃水浴 2 h 后按每孔 150 μL 种于 96 孔板,490 nm测 OD 值,即表黑色素含量。

6.5 多巴色素法测定细胞 TYP 活性 参照参考文献[3],细胞悬于无血清培养基,按 15 万个/孔种于 6 孔板,每孔 1 mL。过夜后弃去旧培养基,每孔加入含 10% 不同血清组血清的培养基 2 mL。达到处理时间后,弃去培养基,PBS 洗 3 次,胰酶消化后离心,PBS 重悬、计数,按每孔 2 万个细胞种于 96 孔板,每孔 50 μL,每组设 6 个副孔。每孔加 2% TritonX-100 溶液 50 μL,混匀后迅速置 -80 ℃冻存 30 min,随后室温融化使细胞完全破裂,37 ℃预温后加入 1% 左旋多巴溶液 20 μL,37 ℃反应 2 h,测定 490 nm 处 OD 值,即酪氨酸酶活性。

6.6 MTT 法测定细胞增殖 参照参考文献[10],细胞悬于无血清培养基,按 4 500 个/孔种于 96 孔板,每孔 100 μL,每组设立 6 个副孔。过夜后弃去旧培养基,每孔加入 200 μL 含 10% 不同血清组血清的培养基。达到处理时间后,每孔加入 MTT 母液 20

μL，混匀后放回细胞培养箱。4 h 后弃上清液，加入 DMSO（150 μL/孔），振荡 5 min 左右，置于酶标仪，波长为 490 nm 测定 OD 值。

7　统计学方法　使用 Graphpad prism 5 及 photoshop 7.0 对实验数据进行整理并作图。SPSS 17.0 统计软件进行分析，表示为 $\bar{x} \pm s$，采用单因素方差分析对组间数据进行统计分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验均重复 3 次。

结　果

1　各组 MCR1、MITF、TYP、TYRP1、TYRP2 蛋白及 mRNA 表达比较（图 1A、B）　与对照组比较，各给药组 MC1R、MITF、TYP、TYRP1 及 TYRP2 mRNA 表达降低（$P<0.05$），且呈现明显剂量梯度依赖下降趋势；各给药组 p-ERK 表达升高，TYP、TYRP1 及 TYRP2 蛋白表达降低（$P<0.05$）。

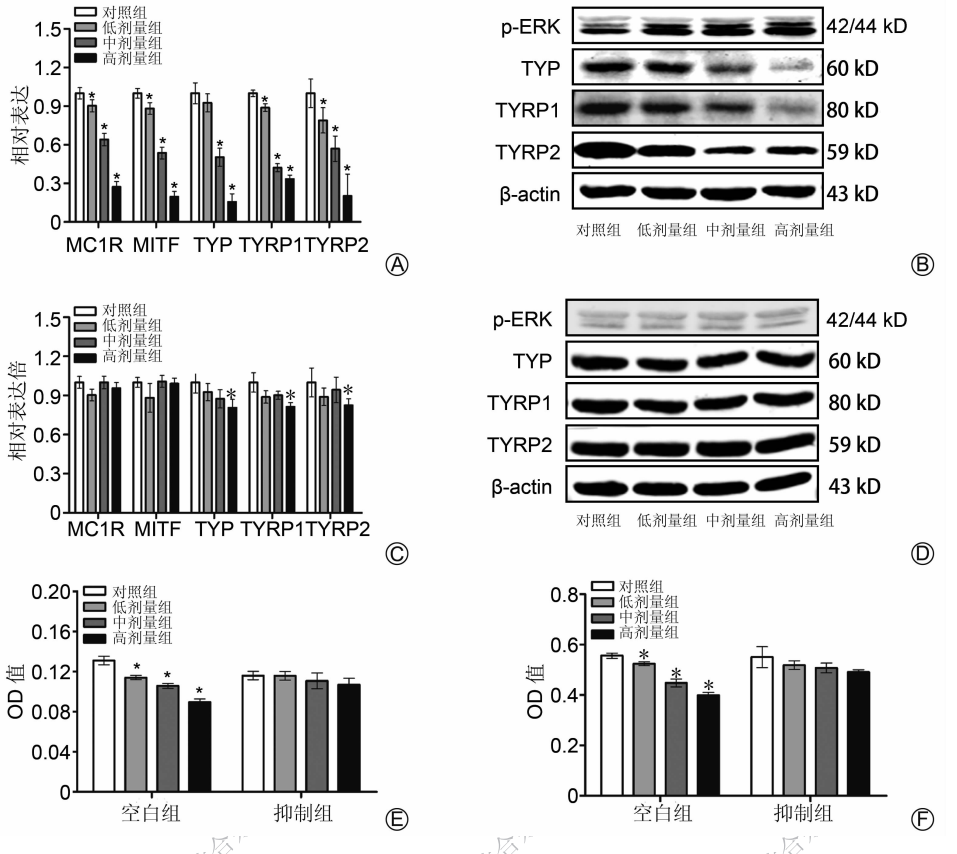
2　各组抑制 ERK 后 MCR1、MITF、TYP、TYRP1、TYRP2 蛋白及 mRNA 表达比较（图 1C、D）　抑制ERK 后与对照组比较，高剂量组 TYP、TYRP1 及 TYRP2 蛋白及 mRNA 表达降低（$P<0.05$）。

3　各组黑色素含量及 TYP 活性比较（图 1E、F）　与对照组比较，各给药组细胞内黑色素含量及 TYP 的活性降低（$P<0.05$）。而抑制 ERK 活性后，与对照组比较，各给药组细胞内黑色素含量及抑制 TYP 活性差异无统计学意义（$P>0.05$）。

4　各组细胞增殖活力比较（图 2）　与对照组比较，中、高剂量组细胞增殖活力升高（$P<0.05$）。但抑制 ERK 后，与对照组比较，各处理组细胞增殖活力差异无统计学意义（$P>0.05$）。

讨　论

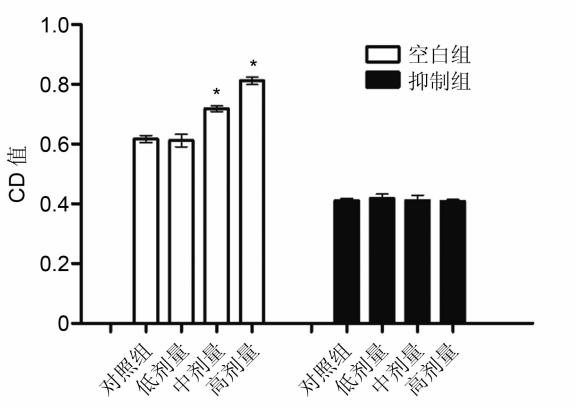
在黑色素的合成中，TYP 是其限速酶，它先将酪氨酸羟基化为多巴，然后将多巴氧化为多巴醌[11]，多巴醌能自发转变成多巴色素。TYRP2 催化多巴色素为黑色素前驱体，而 TYRP1 在黑色素前体氧化为 5,6－醌式二氢吲哚－2－羧酸中起到催化作用[12]。酪氨酸酶家族受 MITF 的调节，而 MC1R 是 MITF 的上游[13]。所以 MC1R、MITF、TYP、TYRP1 及 TYRP2 是黑色素合成中重要的调节因子。含药血清处理后，细胞内 MC1R、MITF、TYP、TYRP1 及 TYRP2 的表达



注：A、C 为各指标 mRNA 表达；B、D 为各指标蛋白表达；与对照组比较，*$P<0.05$；C、D 为抑制组；E 为黑色素含量；F 为 TYP 活性

图 1　各组 MC1R、MITF、TYP、TYRP1、TYRP2 蛋白及 mRNA 表达比较

中国中西医结合杂志



注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$

图 2　各组细胞增殖活力比较

水平均被下调，说明其可能是补肾祛斑颗粒抑制黑色素合成的潜在机制。

同时发现 p-ERK 被上调，文献报导 ERK 的激活能够上调 TYP 及其相关蛋白表达来抑制黑色素的合成[14]，提示补肾祛斑颗粒可能是通过激活 ERK 来发挥作用的。PD98059 是特异性 ERK 抑制剂，通过其抑制 ERK 后，含药血清对细胞内 TYP 及其相关蛋白的抑制作用被剥夺了，同时也能发现其对细胞内黑色素含量及 TYP 活性的抑制效应被剥夺。说明补肾祛斑颗粒可能通过激活 ERK 来抑制细胞内黑色素的合成。ERK 在细胞的增殖中也起到了至关重要的作用，其活性常与细胞增殖呈正相关[15]。含药血清能够促进细胞的增殖，但是当 ERK 被抑制后，其促增殖效应被逆转，说明其也可能是通过激活 ERK 来实现的。

综上，补肾祛斑颗粒可能通过上调 p-ERK 来抑制细胞内 TYP 及其相关蛋白的表达，从而抑制细胞内黑色素的合成。但补肾祛斑颗粒是如何上调 p-ERK，其潜在的机制目前还不清楚。本研究仅对补肾祛斑颗粒对细胞内黑色素生成的影响进行了探讨，其对黑色素的降解及清除是何影响，还有待后续研究。

参 考 文 献

[1] 解萌，曹莫. 黄褐斑治疗研究进展[J]. 中华整形外科杂志，2013，29(4)：313 -317.

[2] 李世梅，程小红，房屋宁，等. 补肾祛斑颗粒治疗黄褐斑 98 例疗效观察[J]. 新中医，2008，40(7)：21 -22.

[3] 汤慧，李峰，程晓峰，等. 补肾祛斑颗粒治疗黄褐斑的血清药理学研究[J]. 现代中西医结合杂志，2015(8)：802 -804.

[4] Nishimoto S, Nishida E. MAPK signaling: ERK5 *versus* ERK1/2[J]. EMBO Rep, 2006, 7(8): 782 -786.

[5] Huang YH, Lee TH, Chan KJ, et al. Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes[J]. J Dermatol Sci, 2008, 49(2): 115 -123.

[6] Ng LT, Lin LT, Chen CL, et al. Anti-melanogenic effects of δ-tocotrienol are associated with tyrosinase-related proteins and MAPK signaling pathway in B16 melanoma cells[J]. Phytomedicine, 2014, 21(7): 978 -983.

[7] Li F, Ma ZK, Guan ZF, et al. Autophagy induction by silibinin positively contributes to its anti-metastatic capacity via AMPK/mTOR pathway in renal cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(4): 8415 -8429.

[8] 张军平，张伯礼，山本清高. 中药药物血清的制作方法探讨[J]. 天津中医药，2004，21(4)：274 -276.

[9] 陈龙，郑义，高进，等. 养颜青娥丸对小鼠 B-16 黑素瘤细胞株黑素合成和酪氨酸酶的影响[J]. 中国医院药学杂志，2002，3(3)：23 -25.

[10] Li F, Zeng J, Gao Y, et al. G9a Inhibition induces autophagic cell death via AMPK/mTOR pathway in bladder transitional cell carcinoma[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e138390.

[11] Tripathi RK, Hearing VJ, Urabe K, et al. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase[J]. J Biol Chem, 1992, 267(33): 23707 -23712.

[12] Mallick S, Singh SK, Sarkar C, et al. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins *in vitro*[J]. Pigment Cell Res, 2005, 18(1): 25 -33.

[13] Fang D, Tsuji Y, Setaluri V. Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(14): 3096 -3106.

[14] Huang HC, Chang SJ, Wu CY, et al. [6]-Shogaol inhibits-MSH-induced melanogenesis through the acceleration of ERK and PI3K/Akt-mediated MITF degradation[J]. Biomed Res Int, 2014: 842569.

[15] Cao AL, Tang QF, Zhou WC, et al. Ras/ERK signaling pathway is involved in curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells[J]. J Asian Nat Prod Res, 2015, 17(1): 56 -63.

（收稿：2015 -01 -08　修回：2016 -06 -03）