

妇科再造丸含药血清对体外培养人黑色素细胞的抑制作用

张 晴, 罗 俊*, 黄能慧

(贵阳医学院 药理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

摘 要:目的 研究妇科再造丸对黑色素细胞增殖及细胞酪氨酸酶活性的影响。方法 体外培养人黑色素细胞, 进行细胞鉴定后测定妇科再造丸的大鼠含药血清对黑色素细胞的增殖抑制率及对细胞酪氨酸酶活性的抑制率。结果 妇科再造丸3个剂量组对黑色素细胞增殖及细胞酪氨酸酶活性均有不同程度的抑制作用, 其中以高剂量组抑制作用最强。结论 妇科再造丸对人黑色素细胞增殖及酪氨酸酶活性均有不同程度的抑制作用, 提示妇科再造丸对皮肤色素沉着可能有一定的治疗效果, 其作用机制可能与抑制酪氨酸酶活性有关。

关键词:妇科再造丸; 黑色素细胞; 酪氨酸酶

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0577-03

皮肤色素沉着是临床常见疾病之一, 患者皮肤中黑色素细胞增多、合成黑色素能力增强^[1], 而酪氨酸酶是黑色素合成过程中的限速酶。妇科再造丸组方中的当归、熟地、黄芪、白芍、川芎、益母草、茯苓及山药等多味中药均有抑制酪氨酸酶活性的作用^[2]。本实验目的在于研究妇科再造丸对黑色素细胞增殖及细胞酪氨酸酶活性的影响, 为妇科再造丸的进一步开发利用提供科学的理论依据。

1 材料

1.1 动物: SD大鼠, 雌性, 体重(280±20)g, 合格证号: SCXK(黔)2002-0001, 由贵阳医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器: 妇科再造丸丸剂(2.6g/10丸, 贵阳德昌祥制药有限公司生产, 批号050306), 维生素C(50mg/片, 重庆天圣药业有限公司, 批号050711), 维生素E胶囊(100mg/个, 广州白云山制药厂, 批号050223)。黑色素细胞培养基(北京清源昊生物科技有限公司), Dispase I 酶(第三军医大学), 噻唑蓝(MTT, 华美生物工程公司), 左旋多巴、TritonX-100、胰酶均购自Sigma公司。CO₂培养箱(Thermoforma公司), 5810R低温离心机(Eppendorf公司), CK40倒置显微镜(Olympus), Elx800酶标仪(美国Bio-tek公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备^[3]: 取雌性SD大鼠30只, 按体重随机分为5组, 每组6只。设妇科再造丸高、中、低(3.4、1.7、0.8g/kg)3个剂量组, 阳性对照组(维生素C 0.3g/kg+维生素E 0.1g/kg)及对照组

(生理盐水 8mL/kg)。各组ig给药, 每日两次, 连续3d, 于末次给药后1h股动脉取血。静置2h后56℃灭活30min, 离心取血清, 滤过除菌, 4℃保存备用。

2.2 正常人黑色素细胞的培养^[4]: 取15~25岁正常男性包皮环切标本, 反复多次冲洗, 去除皮下组织, 切成1mm×2mm的小条, Dispase I 酶4℃消化15h。分离表皮和真皮, 取表皮剪碎, 0.25%胰酶37℃消化20min, 吹打成单细胞悬液, 筛网滤过, 以5×10⁶/mL接种于含黑色素细胞培养液的培养瓶中。置入CO₂孵箱中37℃培养, 24h后首次换液以去除未贴壁细胞。8~10d后传代培养备用。实验选用的是2~4代的细胞。

2.3 黑色素细胞鉴定、检测指标及方法

2.3.1 黑色素细胞鉴定^[5]: 将培养的细胞进行HE染色及脱色素HE染色, 并用S-100蛋白免疫组化染色法进行细胞鉴定。

2.3.2 MTT法测定黑色素细胞增殖抑制率^[6~8]: 取对数生长期的细胞, 0.25%胰酶消化, 台盼蓝计数, 调整细胞为1×10⁴/mL, 每孔取180μL接入96孔板, 24h后添加待测含药血清: 对照组加细胞和对照组血清; 空白组不接种细胞, 只加黑色素细胞培养液和对照组血清。每1组设置6个复孔, 37℃孵育。药物作用72h后, 每孔加入5g/L MTT溶液20μL, 继续孵育4h。弃去上清液, 每孔加二甲基亚砜150μL, 震荡10min。选择570nm波长, 以空白孔调零, 在酶标仪上测各孔吸光度(A)值, 计算细胞增殖抑制率。

收稿日期: 2007-07-27

基金项目: 贵州省科技厅中药现代化专项资金[黔科合中药专字(2003)10号]

作者简介: 张 晴(1979—), 女, 广东开平人, 讲师, 硕士, 研究方向为中药药理。Tel: (0851) 6908628 E-mail: zq0115@gmc.edu.cn

*通讯作者 罗 俊 Tel: (0851) 6908048 E-mail: luojun@gmc.edu.cn

细胞增殖抑制率 = (1 - 给药组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%

2.3.3 测定细胞酪氨酸酶活性抑制率^[9,10]: 取对数生长期的黑色素细胞接入 96 孔板, 24 h 后添加待测含药血清, 同 2.3.2, 37 °C 孵育。药物作用 72 h 后, 弃去上清液, 用 pH 7.4 的 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 10 mL/L TritonX-100 溶液 90 μL, 震荡 5 min 溶解细胞, 经 37 °C 预温后每孔加入 0.1% 的左旋多巴 10 μL, 37 °C 孵育 30 min。于 570 nm 波长处测 A 值, 以空白孔调零, 在酶标仪上测各孔 A 值, 计算酪氨酸酶活性抑制率。

酪氨酸酶活性抑制率 = (1 - 给药组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%

3 结果

3.1 黑色素细胞鉴定

3.1.1 HE 染色及脱色素 HE 染色: 原代细胞培养 48 h 后, 光镜下可见细胞贴壁生长, 呈梭形, 有 2~3 个树突; 第 5~7 天可见 4~5 个树突。传代培养 1 周后, 进行 HE 染色, 镜下可见细胞大量增多, 细胞核为蓝紫色, 胞浆呈粉红色(图 1)。进行脱色素 HE 染色后, 细胞核仍为蓝紫色, 而细胞浆呈淡蓝色, 细胞内色素颗粒全部脱去(图 2)。说明所培养的细胞确为色素性细胞。

3.1.2 S-100 蛋白免疫组化染色鉴定黑色素细胞:

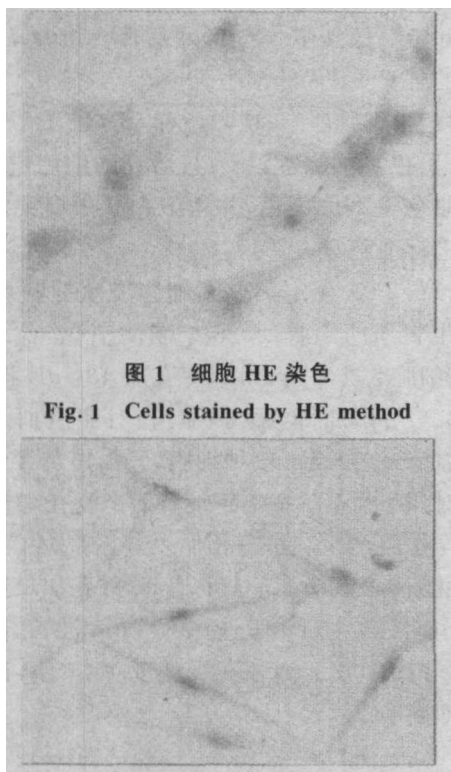


图 1 细胞 HE 染色

Fig. 1 Cells stained by HE method



图 2 细胞脱色素 HE 染色

Fig. 2 Cells stained by depigmented HE method

用 S-100 为抗体标记的细胞, 其细胞浆及树突均呈棕褐色, 反应为阳性(图 3)。证实所培养的确为黑色素细胞。

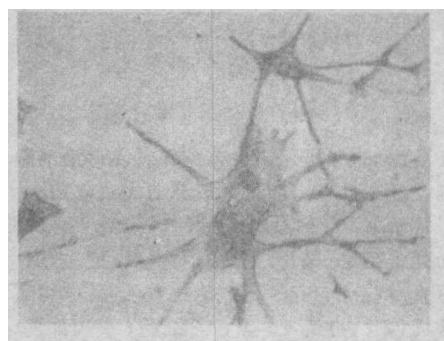


图 3 细胞 S-100 蛋白免疫组化染色

Fig. 3 Cells stained by S-100 protein immunohistochemistry method

3.2 妇科再造丸对黑色素细胞增殖的抑制作用: 实验结果显示, 妇科再造丸 3 个剂量组对黑色素细胞的生长均有不同程度的抑制作用, 其中妇科再造丸高剂量组对细胞增殖的抑制率达到 58%, 作用比阳性对照组 (V_C+V_E) 强, 其差异有统计学意义 (P < 0.05), 见表 1。

表 1 妇科再造丸对黑色素细胞增殖和酪氨酸酶活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 1 Inhibition of Fukezaizao Pill on proliferation and activity of tyrosinase of melanocytes ($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	增殖抑制率/%	酪氨酸酶活性抑制率/%
妇科再造丸	0.80	52.63 ± 2.19	19.30 ± 1.15
	1.70	57.89 ± 1.18	29.82 ± 1.19
	3.40	58.53 ± 2.33*	33.34 ± 0.33**
V _C +V _E	0.30+0.10	56.65 ± 2.56	28.65 ± 1.95

与 V_C+V_E组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs V_C+V_E group

3.3 对黑色素细胞酪氨酸酶活性的抑制作用: 结果表明, 妇科再造丸 3 个剂量组对黑色素细胞酪氨酸酶活性均有不同程度的抑制作用, 其中妇科再造丸高剂量组对酪氨酸酶活性的抑制作用比阳性对照组强, 两者有显著性差异 (P < 0.01), 见表 1。

4 讨论

色素沉着部位主要在表皮基底层, 其发病机制主要与皮肤中黑色素细胞增多、合成黑色素能力增强有关。黑色素的生成是以酪氨酸为基质, 在酪氨酸酶、多巴色素互变酶和 5,6-二羟基吲哚羧酸 (DHI-CA) 氧化酶作用下形成的^[11]。酪氨酸酶在这一系列反应中起着至关重要的作用, 它是黑色素合成过程中的限速酶, 催化酪氨酸羟化为多巴、多巴氧化为多

巴醌以及5,6-二羟基吲哚(DHI)氧化为5,6-吲哚醌3个步骤。其表达和活性决定着黑色素生成的量和速度。因此如果酪氨酸酶的活性受到抑制,就能使黑色素的合成减少,就能在一定程度上预防和治疗色素沉着。

本实验结果显示,妇科再造丸3个剂量组对黑色素细胞的增殖与细胞酪氨酸酶活性均有不同程度的抑制作用,且抑制率随剂量增加而增加。说明妇科再造丸能减少黑色素细胞增殖,其作用机制与抑制酪氨酸酶活性有关。提示妇科再造丸对于治疗皮肤色素沉着可能有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] Halaban R, Tyrrell L, Longley J, et al. Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte stimulating hormone and ultraviolet B light [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1993, 680: 290.
- [2] 雷铁池, 朱文元, 夏明玉, 等. 中药对黑色素生物合成影响研究 I. 82 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用 [J]. *中草药*, 1999, 30(5): 336-339.
- [3] 刘建文. 药理实验方法学-新技术与新方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [4] 王大光, 朱文元. 淫羊藿苷抑制正常黑色素细胞黑色素合成的研究 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2004, 33(8): 460-462.
- [5] 赵 辨, 黄秋玲. 人正常黑色素细胞体外培养及其细胞生物学鉴定 [J]. *临床皮肤科杂志*, 1991, (5): 226-228.
- [6] Hunt G, Todd C, Cresswell J E, et al. α -melanocyte stimulating hormone and its analogue α -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes [J]. *Cell Sci*, 1997, 167: 204-211.
- [7] 胡大海, Hughes M A, 陈 璧, 等. 应用 MTT 法观察人皮肤培养细胞的形态学观察 [J]. *第四军医大学学报*, 1999, 20(11): 1009-1012.
- [8] Boyd M R, Bacon T H, Sutton D. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL-39123) in animals [J]. *Antimicro Agents Chemother*, 1988, 32: 358-363.
- [9] Takahashi H, Parsons P G. Rapid and reversible inhibitor of tyrosinase activity by glycosidase inhibitor in human melanoma cell [J]. *Invest Dermatol*, 1992, 98: 481-487.
- [10] Nakazawa K, Sahuc F, Damour O, et al. Melanocyte responses to UVB and heat [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 110: 972-977.
- [11] 江志洁, 朱育新, 吴奇英, 等. 黑色素形成机理的新概念及复合美白剂的应用 [J]. *日用化学品科学*, 1998(4): 3-5.

氧化苦参碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究

吕文伟¹, 张晓璐¹, 刘 芬², 韩丹丹¹, 陈 霞^{1*}

(1. 吉林大学白求恩医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学白求恩医学院 机能科学实验中心, 吉林 长春 130021)

摘 要:目的 探讨氧化苦参碱(OMT)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用及其初步机制。方法 采用结扎大脑中动脉的方法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型。实验大鼠随机分为假手术组、脑缺血再灌注模型组、路路通(31.25 mg/kg)组及 OMT (35、70、105 mg/kg)组,以神经学评分及脑梗死面积作为观察指标,同时检测 OMT 对大鼠脑组织髓过氧化物酶(MPO)活性及环氧酶 2(COX-2)水平的影响。结果 与脑缺血再灌注模型组相比,OMT 105 mg/kg 组可降低神经学评分($P < 0.05$),缩小脑梗死面积($P < 0.05$);与脑缺血再灌注模型组比较,OMT 105 mg/kg 组大鼠脑组织中 MPO 活性降低($P < 0.05$),COX-2 表达减少($P < 0.01$)。结论 OMT 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,OMT 抑制脑缺血再灌注所致炎症反应可能为其保护作用的机制之一。

关键词:氧化苦参碱; 脑缺血再灌注损伤; 髓过氧化物酶(MPO); 环氧酶 2(COX-2)

中图分类号:R286.10

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0579-04

氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是苦豆子、苦参、广豆根等植物中生物碱的主要成分。近年来大量药理和临床研究发现,其具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、镇静、镇痛、解热、降温以及强心、降压、抗心律失常等多种药理作用^[1,2]。应用膜片钳技术研究显示,OMT 可剂量依赖性地抑制心肌细胞的 Na^+ 通道

电流^[3]。文献报道, Na^+ 通道阻滞药具有神经保护作用^[4],但目前关于 OMT 对脑缺血再灌注损伤的保护作用尚未见报道。本实验旨在观察 OMT 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响,探讨 OMT 对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

收稿日期:2007-07-18

基金项目:吉林省科技厅资助项目(20050144)

作者简介:吕文伟(1961—),男,吉林省长春市人,主要从事药理学研究与新药开发工作。

* 通讯作者 陈 霞 Tel: (0431) 85619799 E-mail: xiachen616@yahoo.com.cn