

不同质量分数高良姜素对人黑色素瘤 A375 细胞黑素合成及相关基因表达的影响

霍仕霞, 彭晓明, 高莉, 赵萍萍, 闫明*

新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所 新疆维吾尔医方剂学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: 目的 研究不同质量分数高良姜素对人黑色素瘤 A375 细胞黑素合成及酪氨酸酶基因 (TYR)、酪氨酸酶相关蛋白-1 (TRP-1)、酪氨酸酶相关蛋白-2 (TRP-2) mRNA 和蛋白表达的影响。方法 采用 MTT 法测定细胞增殖, 左旋多巴氧化法测定酪氨酸酶活性, NaOH 裂解法测定黑素合成, 采用 RT-PCR 法、Western-blotting 法检测 A375 细胞中 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 和蛋白表达。结果 90%高良姜素浓度为 1.0~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 对 A375 细胞具有显著的促增殖作用 ($P < 0.01$), 而在浓度为 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 无促 A375 细胞增殖作用 ($P > 0.05$), 浓度为 0.5~20.0 $\mu\text{mol/L}$ 均能促进酪氨酸酶活性的升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 浓度为 1.0~20 $\mu\text{mol/L}$ 具有显著促进黑素升高的作用 ($P < 0.05$ 、0.01), 且随着浓度的增加呈增强趋势; 99%高良姜素浓度在 0.5~20.0 $\mu\text{mol/L}$ 具有显著促进 A375 细胞增殖和酪氨酸酶活性升高作用 ($P < 0.01$), 而对黑素合成无促进作用 ($P > 0.05$)。90%高良姜素对 TYR、TRP-1 mRNA 表达基本无影响, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时上调 TRP-2 mRNA 表达 ($P < 0.05$); 99%高良姜素能上调 TYR、TRP-1 及 TRP-2 mRNA 表达; 二者均促进 TYR 蛋白表达, 但对 TRP-1 及 TRP-2 蛋白表达基本无影响。结论 99%高良姜素能够促进 A375 细胞增殖及酪氨酸酶活性升高, 可能是通过上调 TYR、TRP-1、TRP-2 的 mRNA 表达和 TYR 蛋白表达实现的; 而 90%高良姜素能够显著促进细胞增殖、酪氨酸酶活性升高及黑素增加, 表明 90%高良姜素能够促进黑素的合成, 但不是通过调节 TYR、TRP-1、TRP-2 的 mRNA 表达, 可能是通过促进 TYR 蛋白表达实现的。

关键词: 高良姜素; 黑素合成; 酪氨酸酶; 酪氨酸酶相关蛋白-1; 酪氨酸酶相关蛋白-2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)02-0244-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.017

Effects of galangin with different purity on melanin synthesis and related gene expression in human melanoma A375 cells

HUO Shi-xia, PENG Xiao-ming, GAO Li, ZHAO Ping-ping, YAN Ming

Xinjiang Laboratory of Uighur Medical Prescription, Xinjiang Institute of Traditional Uighur Medicine, Urumqi 830049, China

Abstract: Objective To study the effects of galangin with different purity on the synthesis of melanin and the expression of mRNA and protein of tyrosine (TYR), TRP-1, and TRP-2 in human melanoma A375 cells. **Methods** The cell proliferation, tyrosinase activity, and melanin synthesis were measured by MTT assay, L-dopa oxidation method, and NaOH assay, respectively. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blotting were used to analyze the mRNA and protein expression of TYR, TRP-1, and TRP-2 in A375 cells. **Results** The cell proliferation was promoted by 90% galangin (0.5—10.0 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$) but was not changed by galangin (20 $\mu\text{mol/L}$, $P > 0.05$); The tyrosinase activity was promoted by galangin (0.5—20.0 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$, 0.01), and the synthesis of melanin was significantly promoted by galangin (1.0—20 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$, 0.01), with concentration increasing an increasing tendency was shown. The cell proliferation and tyrosinase activity in A375 cells were significantly promoted after the treatment with 99% galangin (0.5—20 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), but no influence was observed on the synthesis of melanin ($P > 0.05$). Galangin (90%) had no influence on the mRNA expression of TYR and TRP-1, but the mRNA expression of TRP-2 was upregulated by 90% galangin (1.0 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). The mRNA expression of TYR, TRP-1, and TRP-2 was significantly upregulated after the treatment with 99% galangin; They (90% and 99% galangin) all promoted the expression of protein for TYR, but no influence for TRP-1 and TRP-2. **Conclusion** The 99% galangin could promote the cell proliferation and tyrosinase activity in A375 cells,

收稿日期: 2013-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160556)

作者简介: 霍仕霞, 女, 助理研究员, 主要从事药物分析及中药药理学研究。Tel: 13565889322 E-mail: huoshixia1983@163.com

*通信作者 闫明, 男, 硕士, 研究员, 主要从事药物分析与新药研发。Tel: (0991)2574309 E-mail: yanming21cn@sohu.com

maybe related with the upregulation of mRNA expression of TYR, TRP-1, and TRP-2 and downregulation of TYR protein expression; The 90% galangin could promote the cell proliferation, tyrosinase activity, and melanin synthesis, maybe related with promoting the protein expression of TYR, but without regulation of the mRNA expression of TYR, TRP-1 and TRP-2.

Key words: galangin; melanin synthesis; tyrosine; TRP-1; TRP-2

高良姜是姜科山姜属植物,为常用中药材,具有重要药用价值,也是维吾尔医治疗白癜风的常用药材,本课题组前期进行了高良姜提取物治疗C57BL/6小鼠实验性白癜风模型的研究,结果高良姜提取物能够促进模型动物皮肤中酪氨酸酶活性及黑色素毛囊数的增加,同时进行体外药效观察,结果高良姜提取物能够促进人黑素瘤A375细胞黑素的合成,表明高良姜具有治疗白癜风的作用^[1]。在进行高良姜治疗白癜风作用物质基础^[2-3]研究时发现,高良姜素可能是高良姜的有效作用物质之一,为进一步验证其作用,本研究从黑素合成角度,考察了不同质量分数高良姜素对人黑素瘤A375细胞黑素合成的影响,并针对黑素合成的相关基因——酪氨酸酶基因(tyrosine, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白-1(TRP-1)、酪氨酸酶相关蛋白-2(TRP-2)mRNA和蛋白表达进行研究,以深入探讨高良姜素治疗白癜风的可能分子机制。

1 材料

1.1 细胞株

人黑素瘤A375细胞由上海中国科学院细胞库提供。

1.2 试剂

质量分数为90%、99%高良姜素,均为自制^[4];8-甲氧基补骨脂素(8-MOP,东京化成工业株式会社);DMEM干粉培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);台盼蓝、胰酶、曲拉通(TritonX-100)均购于Scientific Research Special公司;噻唑蓝、链霉素(美国Amresco公司);Trizol Reagent试剂(Invitrogen Corporation Lot);cDNA合成试剂盒(Invitrogen);2×Taq PCR MsaterMix反应液(TIANGEN);PCR反应试剂盒(Invitrogen);100 bp DNA Lander (Fermentas);2K DNA Marker (TIANGEN);Tris-base(美国陶氏);丙烯酰胺(Acrylamide, Acr)(Ultra pure Grade);双丙烯酰胺(Bis, Ultra pure Grade);十二烷基硫酸钠(SDS)(BioSHARPEXP: 2013/04);TEMED(N,N,N,N-四甲基乙二胺,上海蓝季科技发展公司);过硫酸铵(APS,天津市盛奥化学试剂有限公司),Western及

IP细胞裂解液(Beyotime);苯甲基磺酰氟(PMSF,上海源生叶生物科技有限公司);PVDF膜(Scientific Research Speciac);甘氨酸(Solarbio);甲醇(天津市致远化学试剂有限公司);溴酚蓝(BPB)(上海试剂三厂);甘油(天津市福晨化学试剂厂);Western Mar(TransGen Biotech);兔抗人TYR抗体、兔抗人TRP-1抗体、兔抗人TRP-2抗体、 β -tubulin抗体(Santa cruz biotechnology, INC);Western breeze一步法反应试剂盒(Invitrogen, 美国);其他为国产市售试剂。

1.3 仪器

XD-101倒置显微镜(中国江南光电有限公司);BIO-RAD550型酶标仪(美国伯乐公司);BECKMAN高速低温离心机(美国PE公司);BS224S精密电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];DYCP-31CN琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂);Gene Amp PCR仪(美国PE公司);RNA/DNA检测仪(Pharmacia Biotech);Tannon 3500R凝胶成像系统(上海天能公司)。DYY-6D型垂直电泳仪(北京六一仪器厂);ST-I型半干式转移电泳槽(大连竞迈生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 MTT法测定细胞增殖

取对数生长期A375单细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^4 个,100 μ L/孔,铺96孔板,培养24 h,依次加入浓度0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 μ mol/L的含90%、99%高良姜素和8-MOP的培养液,200 μ L/孔,每一浓度设8个复孔,培养48 h。于结束前4 h加5 mg/mL MTT溶液20 μ L,继续培养4 h,加DMSO 200 μ L/孔,酶标仪于490 nm处测定吸光度(A)值。

2.2 酶学方法测定酪氨酸酶活性

将加入不同浓度含药培养液的A375细胞培养48 h后,弃去培养液。用PBS冲洗2次,每孔加入1 mol/L TritonX-100溶液50 μ L,迅速置-70 $^{\circ}$ C冻存30 min,随后室温融化使细胞完全裂解,37 $^{\circ}$ C预温后加入0.25%左旋多巴溶液10 μ L,置37 $^{\circ}$ C电热恒温水槽中反应2 h,用酶标仪于490 nm处测定A值。计算激活率。

$$\text{激活率} = A_{\text{加药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.3 NaOH 裂解法测定黑素水平

将加入不同浓度含药培养液的 A375 细胞培养 48 h 后, 弃去上清液, 用 PBS 冲洗 2 次, 加入 1 mol/L NaOH 溶液 150 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 作用 48 h, 充分碱裂解细胞、溶解黑素颗粒; 用酶标仪于 490 nm 处测定 A 值。计算黑素水平。

$$\text{黑素} = A_{\text{加药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.4 半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

2.4.1 提取细胞总 RNA 弃去培养液, 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗 2 次, 倒置于无菌滤纸上, 使瓶内液体流尽。加入试剂 Trizol 1.0 mL, 反复吹打使细胞完全裂解, 室温静置 5 min 后将细胞 Trizol 液全部转移至无 RNase 1.5 mL 的 EP 管中, 室温放置 5 min。每管加入氯仿 0.2 mL, 盖板盖振摇 15 s, 室温静置 3 min。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min。

移取上层水相至新的无 RNase 1.5 mL 的 EP 管中。每管加入异丙醇 0.5 mL, 轻摇混匀, 室温静置 10 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min。离心后, 吸弃上清, 管底沉淀即为 RNA, 加入 1.0 mL 75% 乙醇洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C, 7 500 r/min 离心 5 min。小心吸弃上清, 室温放置 15 min, 干燥沉淀 (超净台内操作)。加入 0.1% DEPC 水 30~40 μ L, 吹打溶解 (55~60 $^{\circ}$ C 促溶 10~15 min), -70 $^{\circ}$ C 短暂保存备用。

2.4.2 总 RNA 质量的检测 取 1 μ L 总 RNA, 加入 99 μ L 无 RNA 酶水, 充分混匀 (稀释 100 倍), 置比色杯中, 紫外分光光度计测定 A_{260} 、 A_{280} 数值, 计算两者比值。量取总 RNA 2.5 μ L, 加 6 \times 上样液 10 μ L, 混合均匀, 在 1% 琼脂糖凝胶、100 V、100 mA 条件下电泳 20~30 min, 检测 RNA 的完整性。各组提取的 RNA 样品经 RNA/DNA 检测仪测定, A_{260}/A_{280} 在 1.5~1.8, 说明样品中蛋白的量相对较高, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 结果显示 18 S、28 S、5 S 条带, 且 28 S 量是 18 S 的 2 倍左右, 提示总 RNA 质量良好, 满足后续实验的要求。

2.4.3 mRNA 逆转录合成 cDNA 按 cDNA 合成试剂盒操作, 逆转录合成 cDNA。

2.4.4 RT-PCR 引物设计 GAPDH (458 bp) 上游引物: 5'-GACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游引物: 5'-TGAGGTCCACCACCCTGTTGC-3'; TYR (239 bp) 上游引物: 5'-GTGCTCTGGCAACTTCAT-3' 下游引物: 5'-TGTCGTTAAACATGGGTGT-3'; TYP-1 (532 bp) 上游引物: 5'-TTATTTGTCATTGC-CACCAG-3' 下游引物: 5'-GAGCGACATCCTGT-

GGTTCA-3'; TYP-2 (286 bp) 上游引物: 5'-GTAACCTCTGTGATTCTTGTGG-3', 下游引物: 5'-ACTCCTTGTTCACTAGGCTGTC-3'。引物均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

2.4.5 PCR 产物电泳 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 凝胶分析软件进行条带灰度值分析。

2.5 Western-blotting 实验

2.5.1 总蛋白提取 弃尽培养液, 加 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS, 3 mL/瓶, 洗涤 3 次。将 PBS 弃去, 按 1 mL 裂解液加 10 mL PMSF (100 mmol/L), 摇匀; 加含 PEMS 的裂解液 0.5 mL/瓶, 摇匀裂解 30 min; 裂解完后, 将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL 离心管中; 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心 15 min, 将离心后的上清液分装置 200 μ L EP 管中, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.5.2 蛋白浓度的测定 按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒操作。

2.5.3 SDS-PAGE 电泳 取样品至 0.2 mL EP 管中, 加 5 \times SDS 上样缓冲液。上样前要将样品于沸水中煮沸 5 min 使蛋白变性; 迅速转移至冰上 2 min。电泳: 浓缩胶: 90 V, 40 min; 分离胶: 110 V, 130 min。

2.5.4 转膜 9 V 恒压, 转膜 30~45 min。转膜结束后, 取出凝胶用考马斯亮蓝染色, PVDF 膜用 1 \times 丽春红染液染色 30 min (置脱色摇床上摇), 检测蛋白是否转移完全。然后用水冲洗掉没染上的染液就可看到膜上的蛋白。将膜晾干备用。

2.5.5 Western-blotting 反应 按 Western breeze 一步法反应试剂盒说明书操作。

2.6 统计学处理

采用 PEMS 3.1 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异用 t 检验分析。

3 结果

3.1 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞增殖的影响

与对照组比较, 两种质量分数的高良姜素均具有促增殖作用, 99% 高良姜素在浓度为 0.5~20.0 μ mol/L 具有显著的促增殖作用 ($P < 0.01$), 但无量效关系; 90% 高良姜素在浓度为 1.0~10.0 μ mol/L 具有显著的促增殖作用 ($P < 0.01$), 而在浓度为 20.0 μ mol/L 时, 无促增殖作用 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.2 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞酪氨酸酶活性的影响

与对照组相比, 两种质量分数高良姜素在浓度 0.5~20.0 μ mol/L 内均能促进酪氨酸酶活性的升高, 并且有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 1。

表 1 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞增殖、酪氨酸酶活性、黑素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of galangin with different purity on proliferation, tyrosinase activity, and melanin levels of A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	A 值	激活率 / %	黑素 / %
对照	-	0.274 4 ± 0.033 0	100.000 ± 0.004	100.000 ± 0.014
8-MOP	0.5	0.327 4 ± 0.026 0*	66.990 ± 0.006	96.960 ± 0.015
	1.0	0.359 2 ± 0.031 0**	128.620 ± 0.009	71.740 ± 0.010
	5.0	0.353 3 ± 0.025 0**	161.840 ± 0.003**	113.040 ± 0.019
	10.0	0.341 3 ± 0.022 0**	183.330 ± 0.010**	71.380 ± 0.007
	20.0	0.318 8 ± 0.041 0	137.080 ± 0.017**	84.780 ± 0.007
90%高良姜素	0.5	0.303 0 ± 0.027 2	207.130 ± 0.009**	106.870 ± 0.008
	1.0	0.396 6 ± 0.054 4**	220.410 ± 0.015**	136.720 ± 0.006*
	5.0	0.402 5 ± 0.023 3**	178.740 ± 0.008**	146.770 ± 0.009*
	10.0	0.386 5 ± 0.041 5**	168.120 ± 0.010**	168.160 ± 0.008**
	20.0	0.334 6 ± 0.050 1	144.320 ± 0.007**	160.700 ± 0.009**
99%高良姜素	0.5	0.362 2 ± 0.016 0**	144.100 ± 0.013**	103.260 ± 0.009
	1.0	0.357 4 ± 0.020 0**	162.110 ± 0.007**	96.740 ± 0.006
	5.0	0.387 2 ± 0.025 0**	173.910 ± 0.006**	108.330 ± 0.006
	10.0	0.387 5 ± 0.038 0**	164.600 ± 0.004**	123.910 ± 0.004
	20.0	0.422 8 ± 0.045 0**	116.680 ± 0.015*	118.480 ± 0.007

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

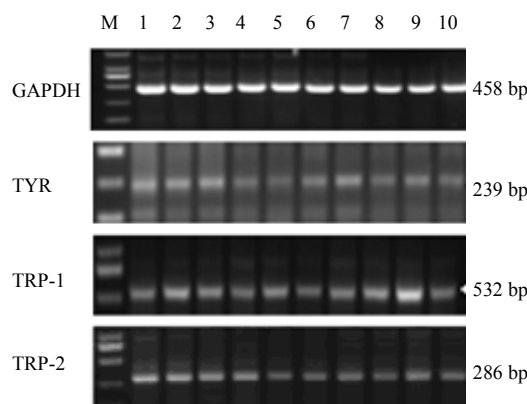
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

3.3 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞黑素水平的影响

与对照组比较, 90%高良姜素在浓度 1.0~20.0 $\mu\text{mol/L}$ 内具有显著促进黑素升高的作用 ($P < 0.05, 0.01$), 且随着浓度的增加呈增强趋势。而 99%高良姜素促进作用不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.4 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 表达的影响

电泳图谱 (图 1) 可知, 内参条带均清晰可见, 说明样品 cDNA 合成成功, TYR、TRP-1、TRP-2 基因目的条带清晰, TYR、TRP-1 均存在非特异性条带, 可能是由于 TYR 和 TRP-1 基因引物设计不严谨, 造成非特异性条带产生, 但目的条带清晰可见, 并不影响目的条带的检测。灰度值分析 (表 2), 与对照组相比, 99%高良姜素浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 能显著上调 TYR、TRP-2 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 浓度为 5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著上调 TRP-1、TRP-2 mRNA 表达 ($P < 0.05, 0.01$), 8-MOP 在浓度为 5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著上调 TRP-1 mRNA 表达 ($P < 0.05, 0.01$), 而 90%高良姜素浓度为 1.0~10.0 $\mu\text{mol/L}$, 对这 3 个基因的 mRNA 表达无调节作用。



M-Marker 1~3-90%高良姜素 (1.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4~6-99%高良姜素 (1.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 7~9-8-MOP (1.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 10-对照
M-Marker 1—3-90% galangin (1, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4—6-99% galangin (1.0, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 7—9-8-MOP (1.0, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 10-control

图 1 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞 TYR、TRP-1 和 TRP-2 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of galangin with different purity on mRNA expression of TYR, TRP-1, and TRP-2 in A375 cells

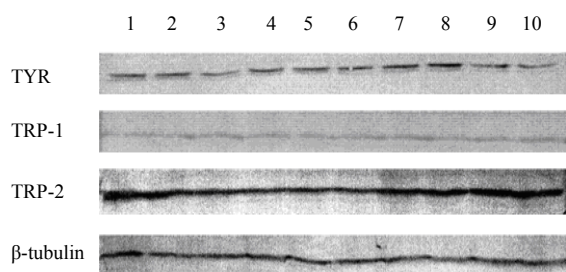
表 2 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of galangin with different purity on mRNA expression of TYR, TRP-1, and TRP-2 in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TYR	TRP-1	TRP-2
对照	-	0.475 7±0.107 0	0.436 2±0.192 3	0.431 1±0.083 4
99%高良姜素	1.0	0.646 9±0.084 0*	0.481 4±0.195 1	0.720 7±0.292 7*
	5.0	0.607 4±0.066 3	0.610 2±0.206 8**	0.663 2±0.288 3*
	10.0	0.573 4±0.148 7	0.507 3±0.254 3*	0.763 2±0.180 7**
90%高良姜素	1.0	0.425 9±0.092 1	0.411 9±0.222 3	0.624 4±0.268 8
	5.0	0.415 2±0.115 5	0.433 3±0.208 9	0.405 4±0.110 6
	10.0	0.282 2±0.066 6	0.338 7±0.132 3	0.449 5±0.145 9
8-MOP	1.0	0.533 8±0.103 1	0.528 6±0.224 6	0.530 3±0.083 4
	5.0	0.575 6±0.106 5	0.616 1±0.246 2*	0.361 2±0.088 5
	10.0	0.639 4±0.126 2	0.932 9±0.187 4**	0.532 2±0.227 8

3.5 不同质量分数高良姜素 A375 细胞 TYR、TRP-1、TRP-2 蛋白表达的影响

由 Western-blotting 实验结果 (图 2) 可知, 药物作用 A375 细胞后, 浓度分别为 1.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 与对照组相比, 两种质量分数的高良姜素不同程度促进 TYR 蛋白的表达, 90%高良姜素无浓度依赖性; 99%高良姜素在 1.0~5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时与对照组相比促进表达作用显著。



1~3-8-MOP (1.0, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4~6-90%高良姜素 (1.0, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 7~9-99%高良姜素 (1.0, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 10-对照
1—3-8-MOP (1.0, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4—6-90% galangin (1.0, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 7—9-99% galangin (1.0, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 10-control

图 2 不同质量分数高良姜素对 A375 细胞 TYR、TRP-1、TRP-2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of galangin with different purity on protein expression of TYR, TRP-1, and TRP-2 in A375 cells

4 讨论

黑素细胞生物合成黑素主要发生于黑素小体, 以酪氨酸为底物, 在酪氨酸酶的作用下合成黑素。黑素是吲哚和醌与蛋白质结合的高分子聚合物。黑

素的合成必须有 3 种基本物质: 酪氨酸、酪氨酸酶和氧。酪氨酸为制造黑素的主要原料, 是蛋白质代谢的产物, 为一种稳定的氨基酸; 酪氨酸酶是酪氨酸转变为黑素的催化剂, 为铜及蛋白质的复合物, 是在黑素细胞的粗面内质网中合成, 后转移到高尔基空泡中, 在此参与合成黑素。人类所有细胞中只有黑素细胞能合成酪氨酸酶。酪氨酸在酪氨酸酶的作用下产生黑素, 此种作用为一氧化过程, 必须与氧结合才能转变为黑素。很显然, 酪氨酸酶在黑素合成过程中起到非常关键的限速酶作用^[5]。因此, 本实验所设 3 个指标分别检验不同质量分数高良姜素对 A375 细胞的增殖、酪氨酸酶活性和黑素合成的影响, 相互之间关联又彼此独立, 结果显示 90%高良姜素作用明显, 且各指标具有显著性差异, 99%高良姜素对细胞增殖和酪氨酸酶活性有显著的促进作用, 而对黑素合成无明显影响。本课题组前期进行了不同质量分数高良姜素的药动学研究, 发现不同质量分数高良姜素的药动学参数差异较大^[6], 99%高良姜素与 90%高良姜素相比, 达峰时间长, 吸收少, 消除速率快。理化性质观察表明 99%高良姜素呈浅黄色针状结晶, 难溶于水, 属于脂溶性物质, 90%高良姜素呈浅黄色粉末状, 较易溶解; 此外, 90%高良姜素中含有近 10%的杂质, 对其药效可能有一定的影响, 本课题组将在今后的工作中进行深入研究。

黑素的产生过程是一个复杂的生物化学过程, 而黑素的前体多巴来源于酪氨酸, 经酪氨酸酶作用下氧化而成, 因此酪氨酸酶的活性改变与白癜风发病有密切的关系。酪氨酸酶基因家族包括 TYR、

TRP-1、TRP-2 基因, TRP-1、TRP-2 的编码基因与酪氨酸酶虽同属一个家族, 其结构和性质相似, 但催化能力不同。酪氨酸酶转化成黑素过程开始的两步, 即羟化左旋酪氨酸成左旋多巴和氧化后者成为多巴醌; TRP-2 作为多巴色素互变异构酶, 维持黑素中酚的成分; 而 TRP-1 则能氧化 TRP-2 产生的 5, 6-二羟基吲哚羧酸。TRP-1、TRP-2 二者对维持酪氨酸酶在黑色素小体膜上稳定具有重要性, 也参与黑色素生成的酶过程^[7]。本研究采用 RT-PCR 法测定 TYR、TRP-1 和 TRP-2 基因 mRNA 表达水平, 初步探讨高良姜素治疗白癜风的可能机制, 结果 99%高良姜素能够上调 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 表达水平, 表明 99%高良姜素通过增加酪氨酸酶的合成来促进黑素的生成; 而 90%高良姜素无上调作用; 进一步又进行了 Western-blotting 实验考察了这 3 种基因的蛋白表达水平, 结果两种质量分数的高良姜素均能促进 TYR 蛋白表达, 但对 TRP-1 和 TRP-2 的蛋白表达无作用, 表明 90%高良姜素在翻译水平上调控黑素的合成, 而 99%高良姜素能够在转录和翻译水平上共同调节黑素的合成, 初步阐明了不同

质量分数高良姜素促黑素合成的分子机制。

参考文献

- [1] 霍仕霞, 康雨彤, 彭晓明, 等. 高良姜总黄酮对 B16 细胞增殖和酪氨酸酶活性及黑素合成的影响 [J]. 医药导报, 2013, 32(7): 855-858.
- [2] 霍仕霞, 高 莉, 彭晓明, 等. 高良姜血清药物化学研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3): 146-148.
- [3] 霍仕霞, 康雨彤, 彭晓明, 等. 高良姜提取物指纹图谱与其促进黑素生成的谱效关系分析 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 995-1002.
- [4] 康爱荣, 闫 明, 彭 英, 等. 高良姜中高良姜素的醇提和纯化工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 5(18): 44-46.
- [5] 邓瑞春. 驱虫斑鸠菊对人黑素瘤细胞增殖酪氨酸酶及黑素生成影响的研究 [J]. 生物通讯技术, 2002, 13(2): 135-137.
- [6] 李建梅, 霍仕霞, 高 莉, 等. 不同质量分数高良姜素的药代动力学比较研究 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1307-1310.
- [7] Quentin M, Stephance C, Jean-Philippe B, *et al.* THP decreases WM35 cell sensitivity to oxidative stress [J]. *Free Radio Biol Med*, 2008, 44(6): 1023-1031.