

· 论 著 ·

木犀草素在细胞共培养体系中对酪氨酸酶及黑素的影响

潘武辉, 宗国勇, 解士海, 黄小雄

摘要 :目的 研究木犀草素对人表皮共培养体系(黑素细胞与角质形成细胞)酪氨酸酶活性及黑素生成的影响。方法 培养人表皮黑素细胞和人表皮黑素细胞与角质形成细胞共培养体系,利用四甲基偶氮唑蓝(MTT)还原法测定细胞活力,490nm 比色法测定酪氨酸酶活性,475nm 比色法测定黑素含量。结果 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素对于黑素细胞及共培养细胞酪氨酸酶活性及黑素生成均有较强的剂量相关性增强作用,0.75 $\mu\text{mol/L}$ 及 1 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 木犀草素对于共培养体系酪氨酸酶活性及黑素生成有较强的剂量相关性增强作用。

关键词 木犀草素;黑素细胞;角质形成细胞;共培养

中图分类号 R758.4⁴¹ **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2013)3-282-03

Effects of Luteolin on the Tyrosinase Activity and Melanogenesis in Co-culture Model of Human melanocytes and keratinocytes. PAN Wu-hui ZONG Guo-yong XIE Shi-hai et al. (Huizhou Institute of Dermatology, Huizhou 516001, Guangdong P. R. China)

Abstract :Objective To study the effects of luteolin on the tyrosinase activity and melanogenesis in co-culture model of human melanocytes and keratinocytes. Methods The model of co-culture of human melanocytes and keratinocytes was cultured and MTT was used to measure the proliferation of melanocytes and the co-cultures. The tyrosinase activity and melanin content were measured. Results The melanin synthesis and tyrosinase activity were clearly enhanced by luteolin in a dose-dependent manner at concentrations of 0.5 μM , 0.75 μM , and 1 μM in both melanocytes and co-cultures. 0.75 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$ of luteolin showed statistically significant suppression ($P < 0.01$) than the control. Conclusions Luteolin exhibits a dose-dependent enhancing effects on melanin synthesis and tyrosinase activity in co-cultures of human melanocytes and keratinocytes.

Key words Luteolin Melanocyte Keratinocyte Co-culture

白癜风是常见的色素紊乱性皮肤病,目前尚无满意治疗。表皮中黑素数量及大小决定人体皮肤颜色。黑素在黑素细胞中产生,黑素生成的过程受到黑素细胞周围角质形成细胞以及其它一些细胞的影响,角质形成细胞与黑素细胞共培养体系相比单独黑素细胞更接近人表皮,在这一体系中研究药物对黑素合成的影响更揭示药物的真实作用。木犀草素是一种重要的黄酮类化合物,已有研究证明其具有抗氧化、抗炎、抗过敏以及清除自由基的作用^[1-2]。本实验研究木犀草素在人表皮黑素细胞及共培养体系对于黑素合成过程的作用,此方面研究未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料 木犀草素:购自南京艾斯替么中药研究所,将木犀草素溶解在 100%二甲基亚砜溶剂中,配成 20mmol/L 的浓缩液;M154 基础培养基、角质形成细胞生长添加物购自 Cascade Biologicals,胎牛血清购

自杭州四季青公司,其它(氢醌、二甲基亚砜(DMSO)、 10^{-8}mol/L α -MSH、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、1% 抗生素/抗真菌溶液、1 $\mu\text{g/mL}$ 转移因子、中性酶、胰酶、1 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 E、5 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素、0.6ng/mL 人碱性成纤维细胞生长因子、 10^{-9}mol/L ET-1)购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 皮肤来源 均来源于中国男性青少年常规包皮环切术后的包皮。

1.2.2 黑素细胞培养 细胞培养参考以前方法进行^[3]。

1.2.3 共培养体系的建立 参见已报道文献^[4],简述如下:首先分别培养原代角质形成细胞和原代黑素细胞,取 2 到 3 代的细胞用于试验,将培养好角质形成细胞和黑素细胞按照 2:1 混和接种,共同培养,其培养基为角质形成细胞培养基和黑素细胞培养基按 2:1 混合而得。

作者单位:惠州市皮肤病防治研究所 广东 惠州 516001

作者简介:潘武辉(1981-)男,本科,主治医师,主要从事皮肤病诊疗工作。

1.2.4 MTT 实验 将共培养细胞及黑素细胞按 1×10^4 孔接种于 96 孔板, 木犀草素设 4 个浓度 (0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$), 每一浓度设 4 个复孔, 对照组直接加共培养培养基 200 μL , 空白孔不加细胞, 只加培养基, 经过一定时间和条件的培养, 具体可参考以前的实验, 在酶标仪 490nm 波长 (参考波长 620nm) 下测量各孔吸光度值, 细胞增殖率 = [(待筛物各浓度平均吸光度值 - 空白组平均吸光度值) / (对照组平均吸光度值 - 空白组平均吸光度值)] $\times 100\%$ 。

1.2.5 酪氨酸酶活性检测^[5] 将培养细胞按 1×10^4 孔接种于 96 孔板, 分别加入含不同浓度药物培养基 100 μL , 对照组只加培养基, 空白组不加细胞, 阳性对照为 5 $\mu\text{mol/L}$ 8-MOP (8 甲氧补骨脂素), 依据对培养细胞无毒性原则选取 3 个浓度 (0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$), 经过一定时间和条件的培养, 具体可参考以前的实验, 在酶标仪 490nm 波长 (参考波长 620nm) 下测量各孔吸光度值, 酪氨酸酶活性影响率 = [(待筛物组平均吸光度 - 空白组平均吸光度) / (对照组平均吸光度 - 空白组平均吸光度)] $\times 100\%$ 。

1.2.6 黑素含量测定实验^[6] 在 60mm 直径的培养皿中接种培养细胞, 加入含不同浓度药物的相应培养基, 对照组只加培养基, 阳性对照同酪氨酸酶活性测定实验, 木犀草素根浓度选取同上 (0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$), 经过一定时间和条件的培养, 具体可参考以前的实验, 分光光度计下测量 475nm (参比波长 620nm) 的吸光度, 黑素含量 = [(待筛物组吸光度 / 细胞数的平均值) / (对照组吸光度 / 细胞数的平均值)] $\times 100\%$, 重复 4 次。

1.2.7 数据处理 采用 SPSS12.0 软件 t 检验分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 木犀草素对细胞活力的影响 木犀草素在 (0.25 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$) 浓度范围内经 MTT 实验验证对所有实验培养细胞增殖都无影响。

2.2 木犀草素对黑素细胞及共培养细胞酪氨酸酶活性的影响 结果见表 1, 木犀草素对于实验细胞酪氨酸酶活性呈剂量依赖性增强作用, 与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)。0.75 $\mu\text{mol/L}$ 及 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的木犀草素具有显著差异 ($P < 0.01$), 木犀草素对于两种实验细胞中酪氨酸酶活性的增强无统计学差别

($P > 0.05$)。

表 1 木犀草素对黑素细胞及共培养细胞中酪氨酸酶活性影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, %)

Table one The effects of luteolin on the tyrosinase activity in co-culture system ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, %)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$) Concentrations	黑素细胞 Melanocyte	共培养细胞 Co-culture system
0.5	128.48 \pm 7.13 [#]	121.33 \pm 9.28 [#]
0.75	163.14 \pm 10.34 ^{##}	150.67 \pm 8.24 ^{##}
1	189.34 \pm 14.38 ^{##}	178.29 \pm 10.39 ^{##}
5 $\mu\text{mol/L}$ 8-MOP	168.43 \pm 8.35 ^{##}	165.23 \pm 12.78 ^{##}
对照组 Control	102.21 \pm 3.24	104.98 \pm 7.48

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.3 木犀草素对黑素细胞及共培养细胞黑素含量的影响 结果见表 2, 木犀草素对于实验细胞中黑素合成呈剂量依赖性增强作用, 与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)。0.75 $\mu\text{mol/L}$ 及 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的木犀草素差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 木犀草素对于实验中两种细胞的黑素合成增强无统计学差别 ($P > 0.05$)。

表 2 木犀草素对黑素细胞及共培养细胞中黑素合成影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, %)

Table 2 The effects of luteolin on melanogenesis in co-culture system ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, %)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$) Concentrations	黑素细胞 Melanocyte	共培养细胞 Co-culture system
0.5	121.46 \pm 10.43 [#]	123.27 \pm 8.28 [#]
0.75	162.11 \pm 10.28 ^{##}	164.67 \pm 9.27 ^{##}
1	189.12 \pm 11.64 ^{##}	190.11 \pm 11.88 ^{##}
5 $\mu\text{mol/L}$ 8-MOP	170.18 \pm 7.84 ^{##}	179.12 \pm 10.58 ^{##}
对照组 Control	102.87 \pm 2.19	103.89 \pm 6.61

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

3 讨论

近年来, 国内外对于黑素细胞与角质形成细胞共培养技术的研究趋于成熟, 这就为体外研究一些色素紊乱性皮肤病如白癜风等提供了一定的基础, 同样也为筛选治疗这些疾病的药物提供了优良的平台。白癜风一直很难治疗, 我国中草药自然资源丰富, 许多中药方剂临床实践已经可以有效治疗白癜风, 因此, 在共培养体系中筛选可能有效的中药单体将为未来开发治疗白癜风的有效药物提供重要依据。

本研究利用国内外公认的体外黑素细胞与角质形成细胞共培养体系研究了木犀草素对于黑素生成以及酪氨酸酶活性的影响, 发现在不损伤细胞的安全浓度内, 木犀草素可以剂量依赖的显著增强酪氨酸酶活性以及黑素的合成, 研究结果进一步显示, 木犀草素对黑素细胞及共培养细胞酪氨酸酶活性及黑素合成影响结果比较无统计学差异, 这首先 (下转第 299 页)

- [2] Zhang JS, Gao XZ. Clinical Laboratory Parasitology [M]. 1st ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009, 541–548, 658–669. (In Chinese)
(张进顺, 高兴政. 临床寄生虫检验学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009, 541–548, 658–669.)
- [3] Zhang QM, Zhang XC, Deng ZH et al. Surveillance situations and analysis of soil-borne nematodiasis surveillance sites of Guangdong province in 2008 [J]. J Trop Med 2011, 11 (6): 703–705. (In Chinese)
(张启明, 张贤昌, 邓卓晖, 等. 广东省土源性线虫病监测点 2008 年监测结果分析[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(6): 703–705.)
- [4] Liang BF, Zhong YF, Cai YT et al. Survey of infection status of clonorchis sinensis in freshwater fish in Dongguan City of Guangdong Province [J]. China tropical Medicine 2009, 9 (3): 521–522. (In Chinese)
(梁宝芳, 钟月飞, 蔡玉婷, 等. 东莞市淡水鱼华支睾吸虫感染情况调查[J]. 中国热带医学, 2009, 9(3): 521–522.)
- [5] Shen HX, Xie JZ, Chen DX et al. Final host mice of the first dead case district of angiostrongyliasis in mainland China [J]. Chinese Journal of Zoonoses 2004, 20(2): 126–127. (In Chinese)
(沈浩贤, 谢瑾灼, 陈代雄, 等. 中国大陆广州管圆线虫病死亡病区终宿主鼠类的调查研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20 (2): 126–127.)
- [6] Tian XY, Lu QS, Zhou LF et al. Killing effects of different temperature on infective larvae of angiostrongylus cantonensis [J]. J Trop Med 2010, 10(2): 163–166. (In Chinese)
(田旭岩, 卢勤声, 周丽芬, 等. 不同温度对广州管圆线虫感染期幼虫的杀灭作用[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(2): 163–166.)
- [7] Lin T, Shi WZ, Nie ZY et al. Survey of angiostrongylus cantonensis infection in rats from Siqian town of Xinhui District in Jiangmen City [J]. China tropical Medicine 2011, 11(7): 834–835. (In Chinese)
(林焘, 石伟哲, 聂钊源, 等. 江门市新会区司前镇鼠类广州管圆线虫感染调查[J]. 中国热带医学, 2011, 11(7): 834–835.)
- [8] Lu YY, Kuang HC, Shen HX et al. First report of the ultra infections focus of Paragonimus westermani in northern suburban area of guangzhou [J]. Chinese Journal of Zoonoses 2009, 25(6): 602–605. (In Chinese)
(陆予云, 邝浩成, 沈浩贤, 等. 广州北郊卫氏并殖吸虫超高疫源地首报[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 602–605.)
- [9] Lu YY, Shen HX, Kuang HC et al. Epidemic distribution of Paragonimus in northern suburban of guangzhou [J]. Chinese Journal of Zoonoses 2011, 27(7): 605–609. (In Chinese)
(陆予云, 沈浩贤, 邝浩成, 等. 广州北部山区并殖吸虫流行分布现状初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(7): 605–609.)

收稿日期: 2012-10-08 编辑: 谢永慧

(上接第 283 页)

说明木犀草素增强黑素生成的作用是肯定的, 同时也说明单独黑素细胞对于黑素生成的药物筛选也是有一定意义的, 在共培养体系建立后, 研究者在共培养体系中对于很多以前在黑素细胞体系中筛选完成的药物重新进行筛选, 并将结果进行比较, 发现一部分药物筛选的结果是相同的, 如熊果苷等, 这与木犀草素的结果类似, 也有一部分药物结果有差异, 如烟酰胺等, 这可能说明不同药物影响黑素生成的主要机制不同, 影响机制主要发生在黑素细胞内的药物, 其筛选结果可能类似, 反之则有差异, 这些都说明了共培养体系由于传统单独黑素细胞的筛选体系, 本实验结果显示木犀草素影响黑素生成的主要机制可能在黑素细胞内部。这样的结果为进一步开发研究木犀草素治疗白癜风提供了重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Brown J E. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions implications for their antioxidant properties [J]. Biochem J, 1998, 330(3): 1173.
- [2] Galati G. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation [J]. Free Radio Bio Med 2001, 30(4): 370.
- [3] Zhang H, Mo LJ, Li WZ et al. Effects of Lonicera japonica Thunb on Cell Proliferation and Melanin Synthesis of Cultured Human Melanoma Cells [J]. China Tropical Medicine 2008, 8(8): 1319–1320 (In Chinese)
(张弘, 莫令君, 黎伟珍. 双花对人黑素细胞增殖及黑素合成的影响[J]. 中国热带医学, 2008, 8(8): 1319–1320)
- [4] Xie SH, Huang ZF, Yang GZ et al. Effects of Oxymatrine on the Tyrosinase Activity and Melanogenesis in Co-culture Model of Human Melanocytes and Keratinocytes [J]. China Tropical Medicine 2008, 8(8): 1291–1292 (In Chinese)
(解士海, 黄壮峰, 杨观招, 等. 氧化苦参碱对细胞共培养体系中酪氨酸酶及黑素的影响[J]. 中国热带医学, 2008, 8(8): 1291–1292)
- [5] Kazuhisa S, Takahisa N, Koji S et al. Inhibitory Effects of α -Arbutin on Melanin Synthesis in Cultured Human Melanoma Cells and a Three-Dimensional Human Model [J]. Biol. Pharm. Bul 2004, 27 (4): 510–514
- [6] Mun YJ, Lee SW, Jeong HW et al. Inhibitory effect of miconazole on melanogenesis [J]. Biol. Pharm. Bul 2004, 27(6): 806–809.

收稿日期: 2012-08-21 编辑: 谢永慧