



紫河车体外对黑素细胞增殖及酪氨酸酶活性的影响

紫河车为临床常用的滋补肝肾中药, 滋补肝肾法为中医治疗某些难治性皮肤病的重要法则。因此, 我们观察了紫河车对体外培养黑素细胞(MC)和酪氨酸酶活性的影响, 旨在为紫河车治疗白癜风等色素病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂 745分光光度计(上海第三分析仪器厂)、MEM培养液(Gibco)、Ham's F-10培养基(Gibco)、TPA(Sigma)、IBMX(Sigma)、霍乱毒素(Gibco)、青霉素、链霉素(北京邦定公司)、L-谷氨酰胺(上海生工公司)、胰蛋白酶、蘑菇酪氨酸酶(Sigma)、L-Dopa(Sigma), 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 药物 中药紫河车来自第一军医大学南方医院中药房(购自广东省药材公司), 经第一军医大学中医系中药教研室鉴定。

1.2 方法

1.2.1 中药液的提取 取紫河车100 g配成100 ml混悬液, 温浸超声1 h后置4 °C冰箱过夜, 以2000 r/min离心20 min, 滤出上清液, 此药液相当于原复方生药1g的中药药液。

1.2.2 MC的制备 参照赵辨等[1][2]有关人正常MC体外纯培养方法, 取环切的包皮制备MC标本。

1.2.3 MC的鉴定 将传代细胞接种于盖玻片上, 贴壁48 h后, 10%甲醛溶液固定2 h, 按DOPA黑素反应法染色[3], 在光镜下可见MC胞质呈灰棕色或黑棕色, 证实为MC。

1.2.4 MC增殖的测定 采用甲基偶氮唑蓝比色法(MTT法)[4][5]测定MC细胞增殖情况, 具体步骤如下: 将配制的细胞悬液调整至细胞浓度为 5×10^4 /ml后加入96孔培养板, 每孔100 μ l, 再分别加入不同浓度的紫河车(终浓度为0.001、0.01、0.1、1g/L), 每一浓度设3个复孔。以MC培养液作为对照组1。将培养板置于CO₂细胞培养箱中培养56~72 h, 于结束前加入MTT液(5 mg/ml)10 μ l/孔, 继续培养4 h, 以0.04 mol/L盐酸异丙醇(100 μ l/孔)溶液终止反应, 震荡10 min, 置酶标仪于波长475 nm处测D1(λ)值。

1.2.5 黑素合成的测定 采用Hunt法[6]测定复方对体外培养的MC黑素合成的影响。取2 ml对数生长期的细胞(将细胞浓度调节至 2×10^5 /ml)加入25 ml的培养瓶中, 共5瓶; 12 h后加入不同浓度的条件培养基, 继续培养72 h; 弃培养基, 以0.25%胰酶消化, 1000 r/min离心10 min, 弃上清; 加入100 ml/mol \times L-1NaOH至37 °C水浴中1 h; 400 ml双蒸水稀释, 置酶标仪于波长475 nm处测D2(λ)值。以不加中药的反应混合物为对照组2(混合物含MC培养基、MC混悬液、胰酶、NaOH等)。

1.2.6 酪氨酸酶活性的测定 以蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法[7]测定酪氨酸酶活性。反应混合物2 ml[0.01 mol/L PBS 1.8 ml (pH6.8)+中药提取物0.1 ml+蘑菇酪氨酸酶0.1 ml (40 U)]37 °C孵育10 min, 加入0.15%左旋多巴反应液1 ml, 2 min后立即于波长475 nm处测定吸光度D3(λ)值。以PBS液为空白对照, 以不加中药的反应混合物作为对照组3(混合物含蘑菇酪氨酸酶、PBS液、左旋多巴液等)。

中药取0.001、0.01、0.1、1g/L 4种浓度进行反应，每一实验重复3次[8]。

按以下公式计算酶激活率：酪氨酸酶激活率(%)=[(C-D)-(A-B)]/[A-B]×100。其中，A：未加中药样品的加酶混合液所测的吸收度；B：未加中药样品也未加酶的混合液所测的吸收度；C：加中药样品和酶的混合液所测的吸光度；D：加中药样品而未加酶的混合液所测的吸光度。

1.3 统计分析

所测数据采用Dunnett分析，使用SPSS10.0作数据处理及分析，以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 紫河车对MC增殖的影响

经MTT法测定，发现紫河车对体外培养的MC增殖显示激活倾向，与对照组相比有显著差异。在紫河车浓度为0.001~1g/L时，促进MC增殖的最佳浓度为0.1g/L(表1)

表 1 在不同浓度紫河车作用下 MC 的吸光度值

Tab.1 Absorbance of the melanocytes treated with *Hominis placenta* at different concentrations

Group		D1(λ)
Control 1		0.207±0.031
Treated(g/L)	0.001	0.277±0.012
	0.01	0.666±0.026**
	0.1	1.022±0.093**
	1	0.924±0.055**

** $P < 0.01$ vs control

2.2 紫河车对黑素合成的影响

加入紫河车后各实验组合成黑素能力明显增强，各浓度组与对照组相比有显著差异。在紫河车浓度为0.001~1g/L时，促进黑素合成的最佳浓度为0.1g/L(表2)。

表 2 在不同浓度复方中药作用下黑素的吸光度值

Tab.2 Absorbance of the melanocytes treated with *Hominis placenta* at different concentrations

Group		D2(λ)
Control 2		0.257±0.035
Treated(g/L)	0.001	0.440±0.130
	0.01	0.613±0.031**
	0.1	0.740±0.053**
	1	0.567±0.042**

** $P < 0.01$ vs control

2.3 紫河车对酪氨酸酶活性的影响

结果显示紫河车对酪氨酸酶活性呈激活倾向，与对照组相比有显著差异。随紫河车浓度的增加，酪氨酸酶活性逐渐增加。在复方浓度为0.001~1g/L时，激活酪氨酸酶活性的最佳浓度为1g/L(表3)。

表 3 不同浓度紫河车作用下酪氨酸酶的激活率

Tab.3 Activation rate of tyrosinase in the melanocytes treated with *Hominis placenta* at different concentrations

Group		Activation rate of tyrosinase(%)
Control 3		24.303±0.892
Treated (g/L)	0.001	36.517±8.627**
	0.01	64.710±5.677**
	0.1	55.843±3.276**
	1	70.473±6.711**

** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

正常皮肤的颜色主要靠皮肤内各种色素的含量、皮肤的厚度及光线在皮肤表面散射现象等因素决定。其中黑素起主要作用。黑素是由MC产生的，是引起皮肤颜色改变的主要因素。黑素的生成是一个有酪氨酸酶催化体内酪氨酸羟化而启动的一系列生化反应过程。酪氨酸酶是皮肤黑素生物合成的主要限速酶[9]，其表达和活性决定着黑素生成的速度和产量，还是MC分化成熟的特征性标志之一[10]。虽然白癜风、黄褐斑等色素病的发病机制尚不明确，但观察药物或其他因素对MC生长、酪氨酸酶合成的影响，将有助于阐述药物治疗色素病的机制。

本实验证实，滋补肝肾中药紫河车不仅能激活MC的增殖和黑素的生成，而且使酪氨酸酶活性呈剂量依赖性增加，提示紫河车治疗色素病的机制是通过上调酪氨酸酶活性和MC合成而实现。从而也可证明滋补肝肾法

作为中医治疗某些难治性皮肤病的重要法则。

(责任编辑: 段咏慧)

参考文献:

- [1] Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin[J]. Proc Natl Acad. Sci USA, 1982, 79: 2018
- [2] 赵 辨, 黄秋玲, 毕志刚, 等. 人正常黑素细胞体外纯培养及其细胞生物学鉴定[J]. 临床及实验研究(Chin Lab Res), 1991, (5): 226-8.
- [3] 龚志锦, 詹荣渊, 主编. 病理组织制作和染色技术[M]. 上海科学技术出版社, 1994. 183-5.
- [4] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.
- [5] 邓 燕, 杨 柳. 当归对体外黑素细胞和酪氨酸酶的激活作用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 239-41.
- Deng Y, Yang L. Effect of Angelica sinensis (Oliv.) on melanocytic proliferation, melanin synthesis and tyrosinase activity in vitro[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 239- 41.
- [6] Hunt G , Todd C , Cresswell JE. α -melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4 Ophe7 α -MSH affect morphology , tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes[J]. J Cell Sci ,1997, 107 :205-211
- [7] Matsuda H, Higashino M, Nakai Y. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV . Inhibitory effects of Arctostaphylos plants on melanin biosynthesis[J]. Bio Pharm Bull, 1996, 19(1): 153-6.
- [8] 邓 燕, 杨 柳, 安胜利. 不同浓度刺蒺藜对黑素细胞和酪氨酸酶的作用[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22 (11): 1017-9.
- Deng Y, Yang L, An SL. Effect of Tribulus terrestris L decoction of different concentrations on tyrosinase activity and the proliferation of melanocytes[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22 (11): 1017- 9.
- [9] Kubo I. Yokokawa Y, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants[J]. J Nat Prod, 1995, 58(5): 739-43.
- [10] Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction[J]. Lancet, 1991, 338(8777): 1227-9.

参考文献:

- [1] Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin[J]. Proc Natl Acad. Sci USA, 1982, 79: 2018
- [2] 赵 辨, 黄秋玲, 毕志刚, 等. 人正常黑素细胞体外纯培养及其细胞生物学鉴定[J]. 临床及实验研究(Chin Lab Res), 1991, (5): 226-8.
- [3] 龚志锦, 詹荣渊, 主编. 病理组织制作和染色技术[M]. 上海科学技术出版社, 1994. 183-5.
- [4] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.
- [5] 邓 燕, 杨 柳. 当归对体外黑素细胞和酪氨酸酶的激活作用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 239-41.

Deng Y, Yang L. Effect of *Angelica sinensis* (Oliv.) on melanocytic proliferation, melanin synthesis and tyrosinase activity in vitro[J]. J Fisrt Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 239- 41.

[6] Hunt G , Todd C , Cresswell JE. α -melanocyte stimulating hormone and its analogue Nie4 Ophe7 α -MSH affect morphology , tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes[J]. J Cell Sci ,1997, 107 :205-211

[7] Matsuda H, Higashino M, Nakai Y. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV . Inhibitory effects of Arctostaphylos plants on melanin biosynthesis[J]. Bio Pharm Bull, 1996, 19(1): 153-6.

[8] 邓 燕, 杨 柳, 安胜利. 不同浓度刺蒺藜对黑素细胞和酪氨酸酶的作用[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22 (11): 1017-9.

Deng Y, Yang L, An SL. Effect of *Tribulus terrestris* L decoction of different concentrations on tyrosinase activity and the proliferation of melanocytes[J]. J Fisrt Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22 (11): 1017- 9.

[9] Kubo I. Yolokawa Y, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from Boli-vian medicinal plants[J]. J Nat Prod, 1995, 58(5): 739-43.

[10] Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by mesns of reverse transcriptase and polymerase chain reaction[J]. Lancet, 1991, 338(8777): 1227-9.