

染料木素对 A375 细胞黑素合成 及相关细胞信号通路调控作用的初步探讨

张明磊¹, 徐艳明², 王雪², 耿放^{3*}, 刘国良², 雷双媛², 张宁^{2*}

(1. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 黑龙江中医药大学 佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007;
3. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150025)

[摘要] 目的:研究染料木素对 A375 细胞黑素合成的影响,并探讨 MAPK 信号通路与此作用的相关性。方法:以人黑素瘤细胞 A375 为研究对象,将不同浓度的染料木素作用于 A375 细胞 48 h,另设空白组,采用 MTT 法检测细胞活性;NaOH 裂解法检测黑素量;多巴氧化法检测酪氨酸酶(TYR)活性;RT-PCR 法测定酪氨酸酶(TYR),酪氨酸酶相关蛋白-1(TRP-1)和酪氨酸酶相关蛋白-2(TRP-2)以及 MAPK 信号通路关键胞外信号调节激酶 1(ERK1),ERK2,c-Jun 氨基末端激酶 2(JNK2)mRNA 的表达。结果:与空白组比较,染料木素在安全剂量(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下均可明显抑制 A375 细胞黑素合成及 TYR 活性($P<0.01$), $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染料木素明显下调 A375 细胞 TYR,TRP-2,TRP-1($P<0.05$, $P<0.01$)mRNA 表达,以及 ERK1,ERK2,JNK2($P<0.05$, $P<0.01$)mRNA 表达。结论:染料木素可通过抑制 TYR 活性和/或下调 TYR,TRP-1 及 TRP-2 mRNA 表达,抑制 A375 细胞的黑素合成,此作用与抑制 ERK1,ERK2,JNK2 的表达有关。

[关键词] 染料木素; A375 细胞; 黄褐斑; MAPK 信号通路

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)11-0136-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110136

Effect and Regulating Mechanism of Genistein on A375 Cells Melanogenesis and Its Related Cell Signaling Pathways ZHANG Ming-lei¹, XU Yan-ming², WANG Xue², GENG Fang^{3*}, LIU Guo-liang², LEI Shuang-yuan², ZHANG Ning^{2*} (1. Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi College, Jiamusi 154007, China; 3. Harbin Normal University, Harbin 150025)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of genistein on A375 cells melanogenesis, and to investigate its correlation with mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathways. **Method:** A375 was treated by the different concentrations of genistein for 48 h and the blank group was assigned. The cell activity was assayed by using MTT test. The amount of melanin was detected by using NaOH schizolysis method. The activity of tyrosinase (TYR) was detected by using L-dopa oxidation method. The mRNA expressions of tyrosinase (TYR), tyrosinase related proteins-1 (TRP-1), TRP-2, extracellular signal-reg-ulated kinase 1 (ERK1), ERK2 and c-Jun N terminal kinase 2 (JNK2) RT-PCR were measured by using RT-PCR. **Result:** Compared with control group, genistein at the safe dose (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could significantly suppress the melanin formation and activity of TYR of A375 cells. genistein at $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ could significantly inhibit the mRNA expressions of TYR, TRP-1, TRP-2, ERK1, ERK2 and JNK2 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** It is assumed that genistein could significantly suppress melanogenesis of A375 cells by inhibiting the activity of TYR and down-regulating the expressions of TYR, TRP-1 and TRP-2, the effect may be associated with the expression inhibition of ERK1, ERK2 and JNK2.

[Key words] genistein; A375 cells; melanin; MAPK signal pathway

[收稿日期] 20140902(007)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541756)

[第一作者] 张明磊,在读硕士,从事药理研究,Tel:0454-6050350,E-mail:zz759908684@163.com

[通讯作者] *张宁,博士,副教授,从事中药学研究,Tel:0454-6050350,E-mail:zhangning0454@163.com

*耿放,博士,副教授,从事中药学研究,Tel:0451-82475863,E-mail:gengfang1980@163.com

黑素能防御阳光和紫外线辐射等伤害,其含量的
高低体现肤色的不同^[1]。黑素是由黑素细胞产
生,酪氨酸酶及黑素小体上的相关蛋白酶调控其合
成与分泌^[2-3]。慢性炎症、激素水平变化、遗传、紫
外线等因素使黑素合成增多,易引发色素沉着性皮
肤病,如黄褐斑、雀斑等。雌激素通过 MAPK 信号
通路对黄褐斑、白癜风等诸多皮肤疾病防治效果明
显,但雌激素不良反应及副作用亦较强。染料木素
是来源于豆科植物补骨脂根茎的一种大豆异黄酮类
植物雌激素。染料木素作为一种典型的植物雌激素
成分,可通过 MAPK 信号通路调控 A375 细胞黑素
合成分泌^[4]。而应用染料木素抑制人表皮黑素细
胞黑素合成分泌的作用机制未有报道。本实验以雌
二醇为阳性对照,检测染料木素对 A375 细胞生物
学特性的影响及对 MAPK 信号通路的调控作用,探
讨染料木素对黄褐斑的潜在治疗作用及作用机制。

1 材料

1.1 细胞 人黑素瘤细胞 A375,由中国科学院细
胞中心提供。

1.2 药物及试剂 逆转录试剂盒(生工生物工程
股份有限公司,批号 13112609W),PCR 试剂盒(上
海生工生物工程技术有限公司,批号
A814KA4166),染料木素(含量 98%,南京泽朗科技
有限公司,批号 446720121106),雌二醇(中国食品
药品检定研究院,批号 150-28-21)。

1.3 仪器 TGL-16G-C 型高速台式冷冻离心机
(上海安亭科学仪器厂),TProfessional 型 PCR 扩增
仪(德国 Biometra 公司),MK3 型酶标仪(上海热电
仪器有限公司)。

2 方法

2.1 药液的制备 精密称取雌二醇 5.5 mg,用
4 mL 无水乙醇溶解,再用 DMEM 完全培养液稀释至
 $10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。精密称取染料木素 5.4 mg,用
DMEM 完全培养液配制成 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的原液,将
其逐步稀释成 100,10,1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3}
 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 种浓度药液。以上药液均调节 pH 至
6.8,过 0.22 μm 滤膜除菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 细胞分组与处理 取对数生长期的 A375 细
胞,经消化、离心、重悬后,接种于 96 孔板(每孔
200 μL 培养基约 3 000 个细胞)或 6 孔板(每孔 2 mL
培养基约 9×10^4 个)中,于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h
后,弃掉培养基,然后分组加入等体积药液。空白
组:加不含药培养基,雌二醇组:加浓度为 10^{-3}

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雌二醇药液,受试组:加相应浓度的染
料木素药液。96 孔板实验每组设 6 个复孔,6 孔板
实验每组设 4 个复孔,继续培养 48 h。

2.3 指标测定

2.3.1 细胞活性 向 96 孔板中每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
的 MTT 20 μL ,继续培养 4 h 后,去培养基,加入
DMSO 150 μL /孔,将 96 板于微孔板荡器中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振
荡 10 min,使紫色结晶完全溶解,在 490 nm 检测波
长下用酶标仪测吸光度(A)。

2.3.2 黑素含量 去掉 6 孔板培养液,用 PBS 洗涤
2 次,每孔加入 1 mL 0.25% 胰酶消化 10 min 后,再
加入 1 mL DMEM 完全培养液终止消化,收集各组
细胞悬液至 15 mL 离心管中,1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心
3 min,弃上清,加入 100 μL 浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的
NaOH 溶液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,加入 400 μL 双蒸
水,混匀,从每支离心管中取出 100 μL 溶液加至 96
孔板中,酶标仪 490 nm 波长处测定 A。

2.3.3 TYR 活性 吸弃 96 孔板中培养液,PBS 洗
2 次,加 1% TritonX-100 μL /孔,迅速置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻
存 30 min。加入含 0.2% L-dopa 的 PBS 溶液(pH
6.8)50 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h,在 490 nm 检测波长
下用酶标仪测 A。

2.3.4 RT-PCR 法检测细胞酪氨酸酶(TYR),酪氨
酸酶相关蛋白-1(TRP-1),酪氨酸酶相关蛋白-2
(TRP-2),胞外信号调节激酶 1(ERK1),ERK2,
c-Jun 氨基末端激酶 2(JNK2) mRNA 的表达 收集
给药后的 6 孔板中各组细胞,按照 Trizol 说明书提
取总 RNA,各组以 RNA 3 μg 进行反转录。反应条
件:25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 反应
10 min 终止反应,得到 cDNA。引物序列由上海生工
生物工程技术有限公司来完成引物的设计与合成,以 β -actin 为内参照,引物序列信息见表 1。扩增
条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性时间 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s(TYR
54 $^{\circ}\text{C}$, TYRP-1 57 $^{\circ}\text{C}$, TYRP-2 55 $^{\circ}\text{C}$, ERK1 57 $^{\circ}\text{C}$,
ERK2 54 $^{\circ}\text{C}$, JNK2 54 $^{\circ}\text{C}$, β -action 54 $^{\circ}\text{C}$)退火 40 s,
72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终止延伸 10 min。
PCR 扩增产物 5 μL 与 6 $\times$ DNA Loading Buffer 1 μL
混匀,加入 1.5% 琼脂糖凝胶中,80 V 恒压电泳 30
min 后,凝胶成像系统观察电泳结果,应用 gel-pro 凝
胶分析软件对电泳谱带进行分析,用校正值(TYR/
 β -actin, TYRP-1/ β -actin, TYRP-2/ β -actin, ERK1/
 β -actin, ERK2/ β -actin, JNK2/ β -actin)表示各组 mRNA
水平。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences of PCR

引物名称	上游引物	下游引物	扩增片段/bp
TYR	5'-TCACGGCTCTGTTGAATGTCT-3'	5'-CTGAAGTTGGCGCAGATGAT-3'	143
TYRP-1	5'-ACATCATTC CCTCACCAAAGAC-3'	5'-AGAAGTCCGAAAGCCAAGTAAA-3'	223
TYRP-2	5'-GTTCTCTTCTTCCTCCAGTG-3'	5'-TTCCTTTATTGTGCAGCGTCAGA-3'	223
ERK1	5'-GGGAGGTGGAGATGGTGAAG-3'	5'-AGCAGGTTGGAGGGCTTTAGAT-3'	302
ERK2	5'-ACCCACACAAGAGGATTGAAGT-3'	5'-AAAAGCCACAAC TACCAGAAAC-3'	353
JNK2	5'-CCTTCTTTACCAGATGCTTTGTG-3'	5'-ATACGGTCAGTGCCTTGGAAATA-3'	303
β-actin	5'-CGTGGACATCCGCAAAGAC-3'	5'-AAGAAAGG GTGTAACGCAACTA-3'	302

2.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析,LSD 法对数据进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 染料木素对细胞活性的影响 与空白组比较,100,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 染料木素对细胞的增殖有极显著的抑制作用($P < 0.01$),1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 染料木素对细胞的增殖有显著抑制作用($P < 0.05$),说明这 3 个浓度的染料木素对细胞有毒性作用影响细胞生长,不适于进一步研究; 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染料木素不影响细胞活性。雌二醇组与空白组相比无显著性差异。见表 2。

表 2 染料木素对 A375 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Genistein on A375 cells of cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	增殖率/%
空白	—	0.34 $\pm$ 0.02	100
染料木素	100	0.17 $\pm$ 0.01 ²⁾	49 ²⁾
	10	0.25 $\pm$ 0.05 ²⁾	74 ²⁾
	1	0.29 $\pm$ 0.03 ¹⁾	86 ¹⁾
	1×10^{-1}	0.31 $\pm$ 0.05	91
	1×10^{-2}	0.33 $\pm$ 0.03	96
	1×10^{-3}	0.33 $\pm$ 0.07	98
雌二醇	1×10^{-3}	0.34 $\pm$ 0.02	99

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 6 同)。

3.2 染料木素对黑素合成的影响 与空白组比较,染料木素给药浓度为 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对黑素合成有极显著的抑制作用($P < 0.01$)。 10^{-3} $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雌二醇对黑素合成有极显著的促进作用($P < 0.01$)。见表 3。

3.3 染料木素对 TYR 活性的影响 与空白组比较,染料木素给药浓度为 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3}

表 3 染料木素对 A375 细胞黑素合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effects Genistein on A375 cells of melanogenesis ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	与空白组 A 比值/%
空白	—	0.07 $\pm$ 0.00	100
染料木素	1×10^{-1}	0.05 $\pm$ 0.00 ²⁾	70 ²⁾
	1×10^{-2}	0.07 $\pm$ 0.00 ²⁾	89 ²⁾
	1×10^{-3}	0.07 $\pm$ 0.00 ²⁾	90 ²⁾
雌二醇	1×10^{-3}	0.09 $\pm$ 0.00 ²⁾	125 ²⁾

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 TYR 活性有极显著的抑制作用($P < 0.01$); 1×10^{-3} $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雌二醇对 TYR 活性有极显著的促进作用($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 染料木素对 A375 细胞 TYR 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects Genistein on A375 cells of TYR activity ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	与空白组 A 比值/%
空白	—	0.08 $\pm$ 0.00	100
染料木素	1×10^{-1}	0.07 $\pm$ 0.00 ²⁾	86 ²⁾
	1×10^{-2}	0.07 $\pm$ 0.00 ²⁾	87 ²⁾
	1×10^{-3}	0.07 $\pm$ 0.00 ²⁾	89 ²⁾
雌二醇	1×10^{-3}	0.10 $\pm$ 0.01 ²⁾	121 ²⁾

3.4 对 A375 细胞中 TYR,TYRP-1,TYRP-2 mRNA 表达的影响 与空白组比较,雌二醇组 TYR,TYRP-1,TYRP-2($P < 0.05$, $P < 0.01$)的 mRNA 表达明显增强;染料木素组 TYR,TYRP-1,TYRP-2($P < 0.05$, $P < 0.01$)的 mRNA 的表达显著降低。见表 5,图 1。

3.5 对 A375 细胞中 ERK1,ERK2,JNK2 mRNA 表达的影响 与空白组比较,雌二醇组 ERK1,ERK2,JNK2 的 mRNA 表达均明显增强($P < 0.01$);染料木素组 ERK1($P < 0.05$),ERK2($P < 0.05$),JNK2($P < 0.01$) mRNA 表达均明显降低。见表 6,图 2。

表 5 染料木素对 A375 细胞中 TYR,TYRP-1,TYRP-2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effects Genistein on A375 cells of mRNA expression levels of TYR and tyrosinase related proteins ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TYR/ β -action	TYRP-1/ β -action	TYRP-2/ β -action
空白	—	0.58 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.467 ± 0.022
染料木素	1	0.45 ± 0.03 ²⁾	0.50 ± 0.03 ¹⁾	0.29 ± 0.03 ²⁾
雌二醇	1 × 10 ⁻³	0.85 ± 0.01 ²⁾	0.86 ± 0.06 ²⁾	0.52 ± 0.02 ¹⁾

表 6 染料木素对 A375 细胞中 ERK1,ERK2,JNK2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 6 Effects Genistein on A375 cells of mRNA expression levels of ERK1,ERK2 and JNK2 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ERK1/ β -action	ERK2/ β -action	JNK2/ β -action
空白	—	0.32 ± 0.01	0.52 ± 0.03	0.52 ± 0.02
染料木素	1	0.27 ± 0.01 ¹⁾	0.45 ± 0.02 ¹⁾	0.38 ± 0.04 ²⁾
雌二醇	1 × 10 ⁻³	0.48 ± 0.04 ²⁾	0.86 ± 0.05 ²⁾	0.86 ± 0.05 ²⁾

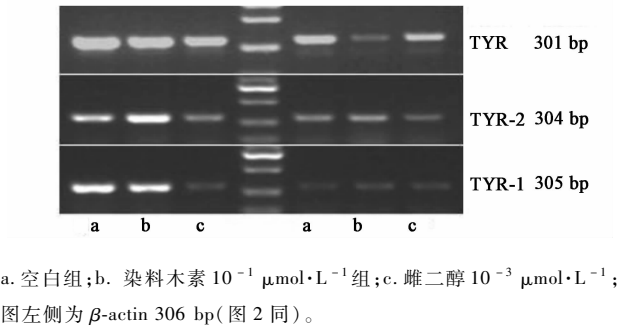


图 1 染料木素对 A375 TYR, TRP-1, TRP-2 mRNA 表达水平的影响

Fig.1 Effects Genistein on A375 cells of mRNA expression levels of tyrosinase(TYR) and tyrosinase related proteins

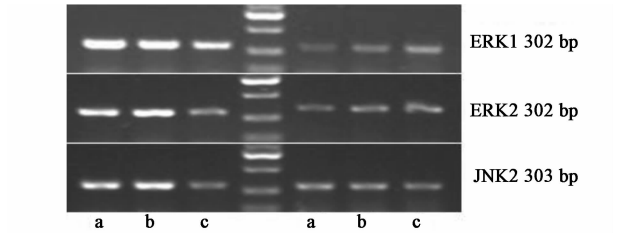


图 2 染料木素对 A375 ERK1,ERK2,JNK2 mRNA 表达水平的影响

Fig.2 Effects Genistein on A375 cells of mRNA expression levels of ERK1,ERK2 and JNK2

4 讨论

黑素在黑素细胞中黑素小体内合成,黑素合成受 TYR,TYRP-1 和 TYRP-2 的调控。TYR 是黑素合成过程中的关键限速酶^[6-10],TYRP-1 和 TYRP-2 在黑色素生物合成途径下游起维持 TYR 在黑色素小体膜上的稳定性^[11-13]。MAPK 信号传导通路是细胞外信号引起细胞生理反应的共同途径之一,在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用。近年来研究发现,MAPK 信号通路参与调控黑素细胞中黑素的生成,主要信号通路 ERK1/2,

JNK1/2 和 p38 MAPK 调控黑素细胞生理活动及功能上起到重要作用,小眼畸形相关转录因子(MITF)在黑素细胞发育分化中也起到重要作用,并参与黑素生成调控^[14-16]。Ji Yeon Jang 等^[17]研究在甘松提取物(PPNC)抑制黑素机制中发现,PPNC 能显著下调小鼠 B16 细胞黑素,TYR 及 TYRP-1,TYRP-2 的表达,加入 ERK 通路抑制剂 PD98059 则明显降低 PPNC 的这种作用,推测 PPNC 抑制黑素作用可能通过调节 ERK 信号通路来实现的。Lean-Teik Ng 等^[18]研究雌激素生育酚三烯(T3)对 B16 细胞黑素分泌的影响,发现 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ T3 能显著下调 B16 细胞黑素、TYR 及其相关蛋白酶(TYRP-1,TYRP-2)的表达,而 T3 的这种作用能够被 ERK 通路抑制剂 PD98059 完全阻止,因此推测 T3 可能通过调节 ERK 信号通路来发挥其作用。

本实验结果显示,安全剂量下的染料木素能显著抑制 A375 细胞黑素合成及 TYR 活性,呈浓度依赖性,并抑制 A375 细胞中 TYR,TYRP-1,TYRP-2 mRNA 表达,提示染料木素可能通过抑制 TYR 活性和/或抑制 TYR,TYRP-1,TYRP-2 mRNA 表达抑制黑素合成,并且染料木素显著抑制 MAPK 信号通路蛋白激酶 ERK1,ERK2,JNK2 的 mRNA 表达,推测植物雌激素可能通过调控 MAPK 信号通路上的 JNK,ERK 等蛋白激酶来影响黑素细胞 TYR 酶活性来影响黑素的合成与分泌。

[参考文献]

[1] Cheng E, Story C D, Yoder L, et al. Estrogenic activity of isoflavone derivatives extracted and prepared from soybean oil meal [J]. Science, 1953, 118 (3058) :

164-165.

[2] 徐漫远. 抗白灵霜组分对小鼠 B16 黑素瘤细胞 TYR, MITF 的 mRNA 及相应蛋白表达的影响[D]. 南京:南京中医药大学,2013.

[3] 李绍民,王兴焱,张宁,等. 山茱萸提取物对黑素瘤细胞与角质形成细胞共培养模型中 TYR 及其相关蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(22):283.

[4] 余立华,刘康,刘保林. 染料木素的药理作用[J]. 药学与临床研究,2010,18(3):299-302.

[5] Yan Yea, Jian-Hong Chua, Hui Wanga, et al. Involvement of p38 MAPK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of San-bai-tang, a Chinese herbal formula, in B16 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2010 (132):533-535.

[6] 黄艳红,辛晓燕,陈亚琼. 染料木素与 17 β 雌二醇对去势大鼠生殖系统的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004,25(6):551-553.

[7] Cayce Kimberly A, McMichael Amy J, Feldman Steven R. Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions[J]. Dermatology Nursing, 2004, 16(5): 401-406, 413-417.

[8] 王兴焱,王天晔,陈巧云,等. 山茱萸水提取物对黑素瘤细胞与角质形成细胞共培养模型黑素合成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):141-143.

[9] 王天晔. 山茱萸提取物对 A375 细胞与 Hacat 细胞共培养体系黑素合成及相关基因表达的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2011:18-19.

[10] J V Schaffer, J L Bolognia. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond[J]. Arch Dermatol, 2001, 137(11):1477-1485.

[11] 李海东,王鹰. 正常人角质形成细胞和黑素细胞体外共培养体系的建立[J]. 重庆医学,2012,41(8):769-771,724,833.

[12] Hashimoto Y, Ito Y, Kato T, et al. Expression profiles of melanogenesis-related genes and proteins in acquired melanocytic nevus[J]. J Cutane Pathol, 2006, 33(3): 207-215.

[13] Lu F, Yan D, Zhou X, et al. Expression of melanin-related genes in cultured adult human retinal pigment epithelium and uveal melanoma cells[J]. Mol Vis, 2007,13:2066-2072.

[14] Fang D, Kute T, Setaluri V. Regulation of tyrosinase-related protein-2 (TYRP 2) in human melanocytes: relationship to growth and morphology[J]. Pigment Cell Research, 2001,14(2):132-139.

[15] 姜泽群. 几种中药有效成分促黑色素生成的机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2009.

[16] 张宁,刘慧,张明磊,等. 逍遥散有效部位对 A375 与 HacaT 细胞共培养模型的 TYR 及其相关蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 中药材,2014,37(6):1039-1043.

[17] Ji Yeon Jang, Ha Neui Kim, Yu Ri Kim, et al. Partially purified components of Nardostachys chinensis suppress melanin synthesis through ERK and Akt signaling pathway with cAMP down-regulation in B16F10 Cells[J]. Lancet, 2011,137(3):1207-1214.

[18] Lean-Teik Nga, Liang-Tzung Linb, Chiu-Lan Chenc, 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(3):978-983.

[责任编辑 周冰冰]