

- of colon cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5475-5480.
- [19] Liu J, Mayekar M K, Wu W, et al. Long non-coding RNA ESCCAL-1 promotes esophageal squamous cell carcinoma by down regulating the negative regulator of APOBEC3G [J]. *Cancer Lett*, 2020, 493: 217-227.
- [20] Sun C L, Zhang S P, Liu C H, et al. Curcumin promoted miR-34a expression and suppressed proliferation of gastric cancer cells [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34 (10): 634-641.
- [21] Chen L, Zhan C Z, Wang T, et al. Curcumin inhibits the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of diffuse
- large B-cell lymphoma cell line by regulating miR-21/VHL axis [J]. *Yonsei Med J*, 2020, 61(1): 20-29.
- [22] Feng Z Y, Xu X H, Cen D Z, et al. MiR-590-3p promotes colon cancer cell proliferation via Wnt/β-catenin signaling pathway by inhibiting WIF1 and DKK1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(21): 4844-4852.
- [23] Gao J, Yu S R, Yuan Y, et al. MicroRNA-590-5p functions as a tumor suppressor in breast cancer conferring inhibitory effects on cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition by downregulating the Wnt-β-catenin signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1827-1841.

葛根水溶性总蛋白对小鼠黑色素瘤细胞 B16 的影响

王 悅¹, 宋 岩², 陈艳艳¹, 边 帅¹, 王思明^{1*}

(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130117; 2. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117)

摘要: 目的 探讨葛根水溶性总蛋白对小鼠黑色素瘤细胞 B16 的影响。方法 给予葛根水溶性总蛋白 (0.1、0.3、0.5 mg/mL) 处理小鼠黑色素瘤细胞 B16 48 h, 并设置对照组, 采用 MTT 法观察药物对 B16 细胞增殖抑制的影响, 多巴氧化法检测给药后细胞内酪氨酸酶的活性, NaOH 裂解法检测细胞中黑色素的变化, 流式细胞仪检测药物对 B16 细胞线粒体膜电位及细胞凋亡的影响, Western blot 法检测 B16 细胞 Bax、Bcl-2、TRP-1、TYR、MITF 蛋白表达, RT-qPCR 法检测 B16 细胞 TRP-1、TYR、MITF mRNA 表达。结果 与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白干预后, 小鼠黑色素瘤细胞 B16 中酪氨酸酶活性、黑色素水平、线粒体膜电位、Bcl-2、TRP-1、TYR、MITF 蛋白与 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞凋亡率升高、Bax 蛋白与 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 葛根水溶性总蛋白能够抑制小鼠黑色素瘤细胞 B16 增殖, 其作用机制与促进细胞凋亡和抑制黑色素形成有关。

关键词: 葛根水溶性总蛋白; 黑色素瘤细胞 B16; 酪氨酸酶; 黑色素; 线粒体膜电位; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0964-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.048

黑色素是一种高分子生物色素, 不溶于水, 但可溶于碱性溶液, 是一种类似于多酚的蛋白质衍生物^[1-5]。正常情况下黑色素细胞在皮肤下面呈均匀分布, 当受到外界刺激后会过度分裂增殖, 聚集成团, 形成黑色素痣, 继续恶化演变成黑色素瘤, 为恶性肿瘤的一种。有效阻断黑色素的积累和合成过量是研究的关键, 因此, 寻找安全、有效的抑制黑色素形成的产品具有重大意义。酪氨酸酶 (TYR) 又称多酚氧化酶, 是黑色素生物合成途径中的主要限速酶, 黑色素形成的多少取决于其活性。研究者发现可以通过抑制酪氨酸酶的活性, 阻止色素沉积从而达到美白效果^[6]。

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 习称野葛^[7], 其主要化学成分包括异黄酮类、三

萜类、皂苷类和多糖类。葛根中含量最多的成分为异黄酮类物质, 包括大豆苷、大豆苷元与葛根素等, 其中葛根素含量占比最大^[8], 所以对葛根素的药理作用研究也较多^[9-11], 目前其研究主要集中在抗氧化自由基、心血管系统作用、改善胃肠道功能、治疗酒精性肝损伤等方面^[12-17], 已有报道称葛根黄酮和葛根异黄酮具有抑制黑色素形成作用^[18-19], 对葛根水溶性总蛋白抑制黑色素作用尚未有报道。因此, 本研究从细胞水平研究葛根水溶性总蛋白对小鼠黑色素瘤细胞 B16 的影响及其作用机制, 以期为研制抗黑色素瘤药物提供数据支撑。

1 材料

1.1 细胞 小鼠恶性黑色素瘤细胞 B16 细胞株 (货号 CL-

收稿日期: 2021-07-28

基金项目: 吉林省中药生物大分子重点实验室项目 (20140622003JC)

作者简介: 王 悅 (1995—), 女 (满族), 硕士生, 从事中医药传统功效研究。Tel: 18804313283, E-mail: 1332370901@qq.com

* 通信作者: 王思明 (1987—), 男, 实验师, 从事中药大健康产品开发及生物学机制研究。E-mail: lwsml26030@126.com

0029) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 试剂与药物 葛根水溶性总蛋白冻干品由长春中医药大学中医药大健康创新中心提供, 蛋白含量 59.64%。MTT(货号 M8180) 购自北京索莱宝科技有限公司; 青霉素-链霉素溶液(双抗)(货号 SV30010)、胰酶(货号 SV30031)、胎牛血清(货号 SH30088)、RPMI1640 培养基(货号 SH30027) 购自美国 HyClone 公司; 罗丹明 123 染色液(货号 C2008S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 反转录试剂盒(RR047A) 购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 仪器 全自动酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 多维全景流式细胞仪(美国 Amnis 公司); Mini Protean 蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 小鼠黑色素瘤细胞 B16 在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度环境下培养。当细胞生长至 70%~80% 时进行细胞传代, 每 2~3 d 传代 1 次。当细胞生长至对数期, 去除培养基, 加 1 mL PBS 清洗细胞, 加 1 mL 0.25% 胰蛋白酶进行消化, 在显微镜下观察细胞全部变圆后终止消化, 加入 3 mL 培养基轻轻吹打, 制备成细胞悬液, 取 1/4 细胞进行传代, 剩余细胞计数后, 用培养基将其调整至适当密度, 铺板进行后续实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖率 将 B16 细胞密度调整为 3×10⁴/mL, 接种到 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 置于培养箱中培养 24 h 后, 将葛根水溶性总蛋白配制成质量浓度为 0.1、0.3、0.5 mg/mL 的溶液, 加入到完全培养基中, 不加药物的为对照组, 每组 6 个复孔, 分别培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃去培养基, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 使用多功能酶标仪振荡 180 s 后, 于 490 nm 波长处检测各孔光密度(OD) 值^[20], 并计算细胞存活率。

2.3 细胞酪氨酸酶活性检测 在 6 孔培养板中加入 2 mL 密度为 3×10⁴/mL 的 B16 细胞, 培养箱中培养 24 h, 弃上清, 分别加入 2 mL 0.1、0.3、0.5 mg/mL 葛根水溶性总蛋白溶液, 于培养箱中培养 48 h 后, 用胰蛋白酶消化 30 s, 1 100 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗 3 次, 加入 1% TritonX-100, -80 °C 冷冻保存 30 min。室温下溶解细胞, 使细胞完全破裂后, 37 °C 恒温水浴中加热 5 min, 与 200 μL 0.1% 左旋多巴溶液混合, 37 °C 孵育 2 h, 于 490 nm 波长处检测吸光度(A) 值^[21], 计算酪氨酸酶活性。

2.4 细胞黑色素水平检测 按“2.3”项下方法处理细胞, 吸弃上清液, 胰蛋白酶消化 30 s, 1 100 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗 2 次, 让细胞在含 10% DMSO 的 1 mol/L NaOH 溶液中, 60 °C 孵育 1 h, 使细胞充分裂解后于 475 nm 波长处检测 A 值^[22], 并计算黑色素水平。

2.5 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位变化 按“2.3”项下方法处理细胞, 将消化离心后的细胞用 PBS 清洗 1 次, 加入 2 μmol/L 罗丹明 123 染色液, 37 °C 避光染色 30 min,

PBS 洗涤, 加入 200 μL PBS 重悬。通过流式细胞术检测细胞线粒体膜电位, 激发波长 507 nm, 最大发射波长 529 nm。

2.6 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡率 按“2.3”项下方法处理细胞, 吸去上清液, 用胰蛋白酶消化 30 s 后, 1 100 r/min 离心 5 min, PBS 清洗 2 次, 将细胞重悬在 200 μL AnnexinV 结合缓冲液中, 加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 PI 染色液, 室温下避光孵育 15 min。流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 计算总凋亡率(早期细胞凋亡率+晚期细胞凋亡率)。

2.7 Western blot 法检测细胞 Bax、Bcl-2、TRP-1、TYR、MITF 蛋白表达 按“2.3”项下方法处理细胞, 收集细胞后加 RIPA 缓冲液于冰上裂解, 提取总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。取等量蛋白质, 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移到硝化纤维素膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加一抗在 4 °C 孵育过夜, PBST 缓冲液洗涤 3 次, 加二抗(HRP-山羊抗兔 IgG) 室温孵育 1 h。以 GAPDH 为内参, 采用凝胶图像处理系统测量灰度值, 使用 Image Pro Plus 软件进行分析, 计算蛋白相对表达。

2.8 RT-qPCR 法检测细胞 TRP-1、TYR、MITF mRNA 表达 用 TRIzol 试剂从细胞中分离出总 RNA, 通过反转录试剂盒将 RNA 反向转录成 cDNA, 引物序列见表 1。采用 CFX 连接实时系统进行 RT-qPCR 反应, 条件为 95 °C 30 s, 1 次循环; 95 °C 5 s, 54 °C 15 s, 72 °C 30 s, 共 40 次循环。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT} 法进行相对定量分析。

表 1 引物序列

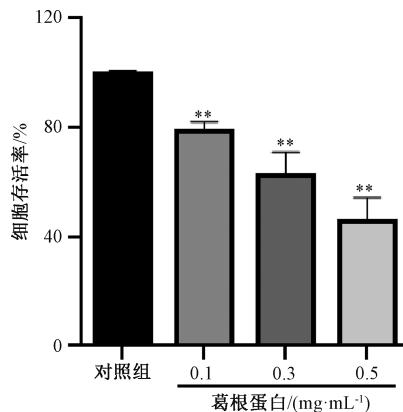
基因	序列
GAPDH	正向 5'-TGCCCCAGAACATCATCCCT-3' 反向 5'-TGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'
Bax	正向 5'-GGAGATGAAGTGGATAGCAATATGG-3' 反向 5'-GTTTGCTAGCAAAGTACAAGAGGGCG-3'
Bcl-2	正向 5'-CTGGCATCTTCTCCTCCAG-3' 反向 5'-GACCGTAGCGACCGAGAGAAG-3'
MITF	正向 5'-GACATAACAGGCAATACAACA-3' 反向 5'-GTAACAACGCGAGCCACTA-3'
TYR	正向 5'-GAACACCTGAGGGACCAC-3' 反向 5'-CATGGCTCTGGGTAAA-3'
TRP-1	正向 5'-CATAACAGGCAATACAACAT-3' 反向 5'-GTAACAACGCGAGCCACTA-3'

2.9 统计学分析 通过 GraphPad Prism6 软件进行处理, 数据以($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

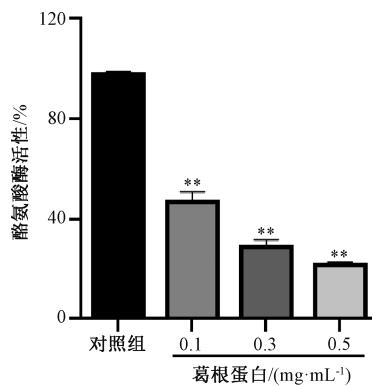
3.1 葛根水溶性总蛋白对 B16 细胞增殖的影响 与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白干预 48 h 后均对 B16 细胞增殖有抑制作用($P<0.01$), 并呈剂量依赖性, 见图 1。

3.2 葛根水溶性总蛋白对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响 与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白均对 B16 细胞中酪氨酸酶活性有抑制作用($P<0.01$), 并呈剂量依赖性, 见图 2。



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

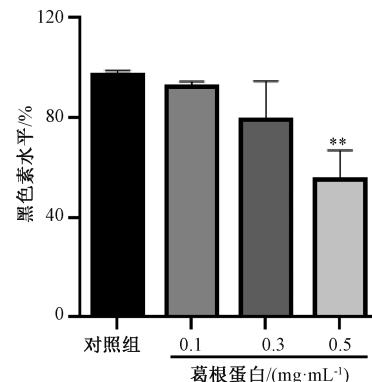
图1 葛根水溶性总蛋白对B16细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图2 葛根水溶性总蛋白对B16细胞酪氨酸酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.3 葛根水溶性总蛋白对B16细胞黑色素水平的影响 与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白对B16细胞中黑色素水平均有抑制趋势, 且剂量为0.5 mg/mL时差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图3。

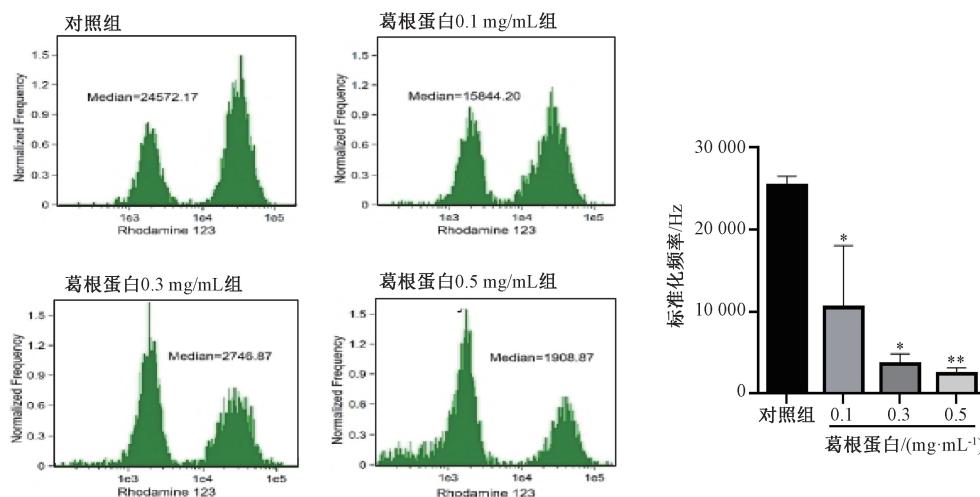


注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图3 葛根水溶性总蛋白对B16细胞黑色素水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 葛根水溶性总蛋白对B16细胞线粒体膜电位的影响 与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白均能降低B16细胞线粒体膜电位 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 见图4。

3.5 葛根水溶性总蛋白对B16细胞凋亡的影响 对照组B16细胞凋亡率为 $(8.08 \pm 1.79)\%$, 0.1、0.3、0.5 mg/mL葛根水溶性总蛋白作用48 h后B16细胞凋亡率分别为 $(21.18 \pm 6.29)\%$ 、 $(36.65 \pm 13.73)\%$ 、 $(52.57 \pm 7.92)\%$ 。与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白均能促进B16细胞凋亡 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 见图5。



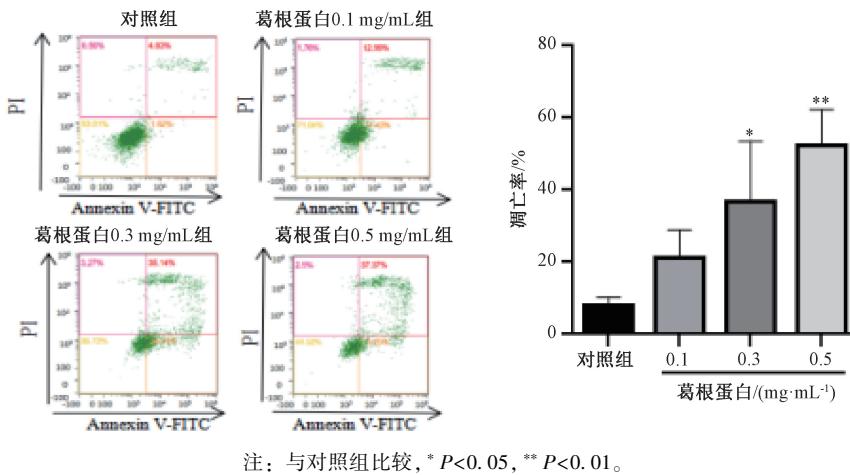
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 葛根水溶性总蛋白对B16细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 葛根水溶性总蛋白对B16细胞Bax、Bcl-2蛋白与mRNA表达的影响 与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白能升高B16细胞Bax蛋白与mRNA表达 ($P < 0.01$), 降低Bcl-2蛋白与mRNA表达 ($P < 0.01$), 见图6~7。

3.7 葛根水溶性总蛋白对B16细胞TRP-1、TYR、MITF蛋白与mRNA表达的影响 与对照组比较, 各剂量葛根水溶性总蛋白均能降低B16细胞TRP-1、TYR、MITF蛋白与mRNA表达 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 见图8~9。

4 讨论 酪氨酸酶是黑色素合成的关键限速酶, 在黑色素合成



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 葛根水溶性总蛋白对B16细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

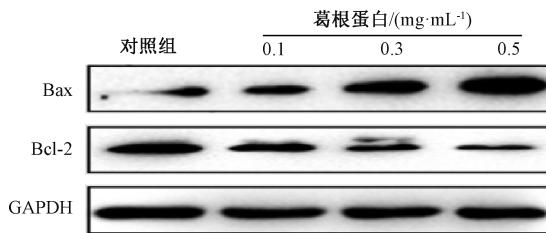
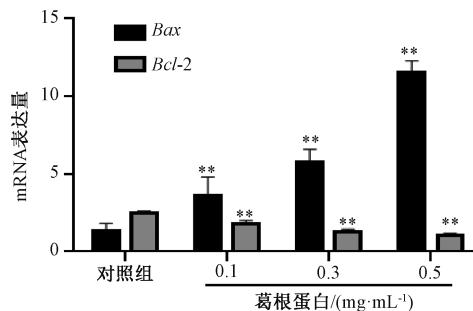


图6 各组B16细胞Bax、Bcl-2蛋白条带图



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图7 葛根水溶性总蛋白对B16细胞Bax、Bcl-2 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

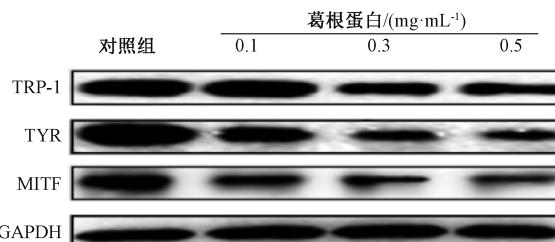
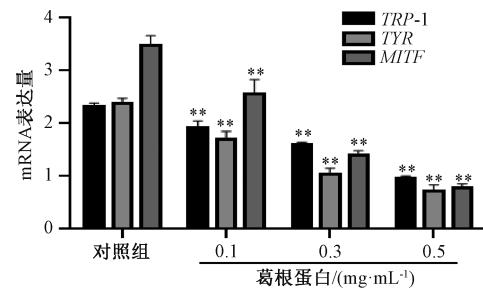


图8 各组B16细胞TRP-1、TYR、MITF蛋白条带图

过程的多步反应中均需要酪氨酸酶参与调控^[23-24]。本研究考察葛根水溶性总蛋白对小鼠黑色素瘤B16细胞的影响及其作用机制。葛根水溶性总蛋白可以抑制酪氨酸酶活性, 减少黑色素的生成, 并通过线粒体途径促进促凋亡因子Bax表达, 抑制抑凋亡因子Bcl-2表达, 从而使小鼠黑色素瘤细胞B16发生凋亡; 它还可以降低MITF、酪氨酸酶(TYR)



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图9 葛根水溶性总蛋白对B16细胞TRP-1、TYR、MITF mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

和酪氨酸相关蛋白酶(TRP-1)基因及其蛋白的表达。其中, 降低MITF表达能够促进B16细胞的凋亡, 抑制细胞增殖, 降低TYR、TRP-1的表达, 且TRP-1参与了TYR反向的黑色素合成。因此, TRP-1表达的减少降低了TYR的表达, 从而减少黑色素的合成。

综上所述, 葛根水溶性总蛋白能够抑制B16细胞增殖, 其作用机制与促进细胞凋亡和抑制黑色素形成有关。

参考文献:

- 何微, 王建芬, 杜玉菲, 等. 基于酪氨酸酶抑制活性的八白散组方研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(9): 1009-1011.
- 杨安全, 王菁, 沈明琦, 等. 珍珠提取物对黑色素细胞酪氨酸酶活性和黑色素合成的影响[J]. 药物生物技术, 2018, 25(4): 312-315.
- 冯冬茹, 杨水军, 谢衡, 等. 马尾松树皮提取物对小鼠B16黑色素瘤细胞中黑色素生成抑制效果及其机制的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 148-151.
- 张亚利, 韩凤波, 张薇, 等. 中药美白祛斑霜的研制[J]. 产业与科技论坛, 2018, 17(21): 43-44.
- 王蔚, 陈琳, 王伟伟, 等. 茶叶有效成分对黑色素形成的抑制作用[J]. 茶叶科学, 2021, 41(1): 7-18.
- 秦亚东, 周娟娟, 汪荣斌. 白芍多糖抑制酪氨酸酶活性成分的筛选[J]. 中成药, 2018, 40(12): 2755-2758.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部

- [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 347.
- [8] 李树欣. 葛根的化学成分及药理作用的研究进展[J]. 辽宁化工, 2020, 49(11): 1412-1413; 1417.
- [9] 李智颖, 范红艳. 葛根素药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(5): 375-377.
- [10] 任正肖, 车萍, 李紫薇, 等. 葛根素药理作用的研究进展[J]. 山东化工, 2019, 48(19): 74-75.
- [11] 吴绍刚. 葛根素的药理作用解析及临床合理应用[J]. 基层医学论坛, 2017, 21(25): 3462.
- [12] Wei L S, Yuan R, Chen X, et al. Puerarin reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats by targeting eNOS [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(1): 19-38.
- [13] Zhou T T, Wang Z W, Guo M T, et al. Puerarin induces mouse mesenteric vasodilation and ameliorates hypertension involving endothelial TRPV4 channels[J]. *Food Funct*, 2020, 11(11): 10137-10148.
- [14] Rao Y F, Wen Q, Liu R H, et al. PL-S2, a homogeneous polysaccharide from *Radix Puerariae lobatae*, attenuates hyperlipidemia via farnesoid X receptor (FXR) pathway-modulated bile acid metabolism [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt B): 1694-1705.
- [15] Li J J, Zhang L, Li Y F, et al. Puerarin improves intestinal barrier function through enhancing goblet cells and mucus barrier [J]. *J Funct Foods*, 2020, 75: 104246.
- [16] Choi Y, Bose S, Shin N R, et al. Lactate-fortified *Puerariae* Radix fermented by *bifidobacterium breve* improved diet-induced metabolic dysregulation via alteration of gut microbial communities[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 276.
- [17] Liu Y S, Yuan M H, Zhang C Y, et al. *Puerariae Lobatae* radix flavonoids and puerarin alleviate alcoholic liver injury in zebrafish by regulating alcohol and lipid metabolism[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111121.
- [18] 瞿利民. 葛根异黄酮的提取及其对酪氨酸酶活性影响的研究[D]. 吉首: 吉首大学, 2020.
- [19] 桂卉, 唐婷, 严航, 等. 葛根黄酮类物质美白作用的研究[J]. 日用化学工业, 2013, 43(4): 290-293; 312.
- [20] 杨静. 连翘抑制酪氨酸酶活性有效物质基础研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2013.
- [21] 吴永祥, 毕淑峰, 姜薇, 等. 桑白皮多酚对B16细胞内黑色素生成的影响及其机制[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(9): 1296-1301.
- [22] 何微, 王建芬, 杜玉菲, 等. 基于酪氨酸酶抑制活性的八白散组方研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(9): 1009-1011.
- [23] 程杏安, 张淑明, 周晓武, 等. 两种天然产物对B16F10细胞增殖及黑色素合成抑制机理研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(8): 199-205.
- [24] 郭跃跃, 杜站宇, 宋兴超, 等. 酪氨酸酶转运对黑色素生成影响研究进展[J]. 动物医学进展, 2017, 38(3): 110-114.