

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)06-0036-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.06.009



紫铆花素对人黑色素瘤细胞 A375 与人永生化角质形成细胞 HaCaT 共培养细胞生物学活性的影响*

高莉, 谭雪, 罗静莺, 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重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 探讨紫铆花素对人黑色素瘤细胞 A375 与人永生化角质形成细胞 HaCaT 共培养细胞生物学活性的影响。方法 建立 A375 细胞与 HaCaT 细胞的共培养细胞体系, 实验分为对照组(等体积培养液), 紫铆花素低、中、高剂量组(以下简称低、中、高剂量组, 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{g/L}$)。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活性; 采用流式细胞仪检测细胞的周期分布和线粒体膜电位; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法检测干细胞因子(SCF)及其受体 c-Kit, 以及小眼畸形相关转录因子(MITF)的 mRNA 表达水平; 采用 Western blot 法检测酪氨酸酶相关蛋白 1, 2(TRP-1, TRP-2)及 SCF, c-Kit, MITF 的蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 中、高剂量组细胞的增殖率均显著升高($P < 0.01$); 与对照组比较, 各剂量组 G_0/G_1 期细胞比例均显著降低, S 期和 G_2/M 期细胞比例均显著升高($P < 0.01$), 高线粒体膜电位细胞比例均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SCF, c-Kit, MITF 的 mRNA 表达水平及 SCF, c-Kit, MITF, TRP-1, TRP-2 的蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 紫铆花素可能通过调节 SCF, c-Kit, MITF 的表达而影响 A375 细胞与 HaCaT 细胞共培养细胞的增殖、细胞周期和线粒体膜电位等细胞生物学活性。

关键词: 紫铆花素; 人黑色素瘤细胞 A375; 人永生化角质形成细胞 HaCaT; 细胞周期; 线粒体膜电位; 干细胞因子; 干细胞因子受体; 小眼畸形相关转录因子

Effect of Butein on the Biological Activity of Co - Cultured Human Melanoma Cells A375 and Human Immortalized Keratinocytes HaCaT

GAO Li, TAN Xue, LUO Jingying, YAN Ming

(Key Laboratory of Traditional Uyghur Medicine Prescription, Institute of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Urumqi, Xinjiang, China 830011)

Abstract: Objective To investigate the effect of butein on the biological activity of co - cultured human melanoma cells A375 and human immortalized keratinocytes HaCaT. **Methods** Co - cultured A375 and HaCaT cells were established and divided into the control group (equal volume of culture medium), the butein low -, medium - and high - dose groups (hereinafter referred to as the low -, medium - and high - dose groups, 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{g/L}$). The cell activity was detected by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The cell cycle and mitochondrial membrane potential were detected by the flow cytometry. The expression levels of stem cell factor (SCF), its receptor c - Kit, microphthalmia - associated transcription factor (MITF) mRNA were detected by the real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The expression levels of tyrosinase - related protein - 1 (TRP - 1), tyrosinase - related protein - 2 (TRP - 2), SCF, c - Kit and MITF proteins in cells were detected by the Western blot. **Results** Compared with that in the control group, the proliferation rate in the medium - and high - dose groups significantly increased ($P < 0.01$). Compared with those in the control group, the proportion of cells at G_0/G_1 phase in the low -, medium - and high - dose groups significantly decreased, while the proportion of cells at S and G_2/M phases significantly increased ($P < 0.01$); the proportion of cells with high mitochondrial membrane potential significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the expression levels of SCF, c - Kit, MITF mRNA and the expression levels of SCF, c - Kit, MITF, TRP - 1 and TRP - 2 proteins significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Butein may affect the proliferation, cell cycle and mitochondrial membrane potential of co - cultured A375 and HaCaT cells by regulating the expression of SCF, c - Kit and MITF.

Key words: butein; human melanoma cells A375; human immortalized keratinocytes HaCaT; cell cycle; mitochondrial membrane potential; stem cell factor; receptor of stem cell factor; microphthalmia - associated transcription factor

小眼畸形相关转录因子(MITF)是黑色素细胞生长的主要调节器, 调控黑色素生成的3个关键酶[酪氨酸酶(TYR), 以及其相关蛋白1, 2(TRP-1, 2)]^[1-2]。角质形成

细胞来源的干细胞因子(SCF)及其受体 c-Kit 可激活 MITF 双重磷酸化, 调节双重激活和降解, 进而影响黑色素细胞的生长和分化^[3-4]。中药驱虫斑鸠菊具有激活 TYR

*基金项目: 国家自然科学基金[81260689]; 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目[2022D01D25]。

第一作者: 高莉, 女, 博士, 研究员, 研究方向为中药药理学和新药研发, (电子信箱)gaoli_535@163.com。

[△]通信作者: 闫明, 男, 硕士, 研究员, 研究方向为新药研发, (电子信箱)yanming21cn@sohu.com。

活性、提高黑色素合成能力、调节免疫等功能^[4],临床主要用于治疗白癜风^[5]。前期研究发现,驱虫斑鸠菊的活性成分紫铆花素能激活黑色素细胞TYR活性和增强黑色素合成能力^[6],促进角质形成细胞分泌促黑色素细胞激素(MSH)、SCF等因子^[7],表明紫铆花素可能通过调控黑色素细胞和角质形成细胞的相互作用促进黑色素合成。基于此,本研究中拟进一步考察紫铆花素对人黑色素瘤细胞A375与人永生化角质形成细胞HaCaT共培养细胞生物学活性的影响,并探讨其相关机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:SQP型电子分析天平(德国Sartorius公司,精度为0.1 mg);YJ-875型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);MCO-18AIC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);SPX-150B-Z型生化培养箱(上海博远实业有限公司);Multiskan Go 1510型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);FC500型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);CFX96型荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);OMKS001型电泳仪、20150168型凝胶成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司)。

试剂:紫铆花素(新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所自制,批号为20151208,含量≥95%);DMEM干粉培养基(美国Gibco公司,批号为1645780);胎牛血清(美国HyClone公司,批号为NZJ1221);四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国Amresco公司,批号为YY11351);二甲基亚砜(DMSO,天津市光复化工研究所,批号为D5879);左旋多巴(美国Sigma公司,批号为LC0922B5011J);JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(批号为3242985),碘化丙啶(PI)细胞周期检测试剂盒(批号为6051571),均购自美国BD公司;TRP-1,TRP-2,MITF,SCF,c-Kit抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab235447,ab221144,ab303530,ab64677,ab283653);水为纯化水。

细胞:人黑色素瘤细胞A375(中国科学院上海生科院细胞资源中心);人永生化角质形成细胞HaCaT(武汉大学中国典型培养物保藏中心)。

1.2 方法

共培养细胞的建立:取对数生长期的HaCaT细胞适量,加0.25%胰酶消化,以 5×10^5 个/mL接种于6孔板中,5% CO₂、37℃条件下培养6 h使细胞充分贴壁;取对数生长期的A375细胞适量,同上处理并接种于同一6孔板中(2种细胞的接种比例为2:1),置5% CO₂、37℃条件下过夜培养,得共培养细胞。

分组及给药:取共培养细胞适量,用3.0 mL 0.25%胰酶消化,以 5×10^4 个/mL接种于96孔板中,每孔100 μL,置37℃、5% CO₂条件下培养过夜,弃去培养基,设对照组(等体积培养液),紫铆花素(以DMSO溶解制成质量浓

度为100 g/L的贮备液)低、中、高剂量组(以下简称低、中、高剂量组,0.5,1.0,5.0 μg/L),各组细胞进行相应处理(每孔200 μL),继续培养48 h。

细胞活性:采用MTT法。在“分组及给药”项下分组的基础上,加设空白对照组(无细胞,等体积培养液),每组设8个复孔,培养44 h时加入5 g/L MTT 20 μL,继续培养4 h,弃去上清液,加入DMSO 200 μL,振荡10 min,采用酶标仪于490 nm波长处测定吸光度(A),并计算细胞增殖率。细胞增殖率(%) = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

细胞周期:取共培养细胞适量,置25 cm²细胞培养瓶中培养,同“分组及给药”项下操作,每组设3个复孔。培养48 h,吸出原培养基,以1 mL胰酶消化,用原培养液缓慢吹下所有细胞,移入4 mL离心管,1 000 r/min离心10 min(下同)后弃去培养液,加入1 mL磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞后离心,重复清洗3次。以1 mL 75%乙醇重悬细胞,4℃固定过夜后,离心,弃去固定液,加入1 mL预冷PBS重悬细胞后离心,重复清洗3次,加入500 μL PI/核糖核酸酶(Rnase)染液,37℃避光染色15 min,200目尼龙滤网滤过,采用PI细胞周期检测试剂盒,以流式细胞仪检测。

细胞线粒体膜电位:取共培养细胞适量,按“细胞周期”项下分组、给药及处理,得到细胞(至“重复清洗3次”时止)。各管加入500 μL JC-1工作液,37℃孵育15 min,加入1 mL Assay Buffer混匀,1 000 r/min离心10 min;弃去上清液(重复1次),再加入500 μL Assay Buffer重悬细胞,200目尼龙滤网滤过,采用JC-1线粒体膜电位检测试剂盒,以流式细胞仪检测。

mRNA表达:采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法。取共培养细胞适量,同“细胞周期”项下分组、给药、处理(至用原培养液缓慢吹下所有细胞止)。用Trizol法提取细胞的总RNA;取5 μL进行1%琼脂糖凝胶电泳,检测RNA的完整性,使用反转录酶进行反转录PCR合成cDNA并纯化,进行RNA电泳并检测浓度,最后以qPCR法检测SCF,c-Kit,MITF的mRNA表达水平。

蛋白表达:采用Western blot法。取共培养细胞适量,同“细胞周期”项下分组、给药、处理(至用原培养液缓慢吹下所有细胞止),以裂解法提取总蛋白,检测蛋白含量;取变性后蛋白50 μg,进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜、封闭、洗膜,分别加入β-actin,TRP-1,TRP-2,SCF,c-Kit,MITF的抗体(1:1 000,V/V),4℃孵育过夜;洗膜5 min,加入二抗(1:2 000,V/V),室温孵育2 h,进行化学发光反应后成像,采用Image J 1.5.1软件分析,检测目标蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表

示,组间比较行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活性

与对照组 $[(100 \pm 2.89)\%]$ 比较,中、高剂量组细胞增殖率 $[(110.47 \pm 5.71)\%、(117.74 \pm 4.32)\%]$ 均显著升高($P < 0.01$);低剂量组细胞的增殖率为 $[(90.70 \pm 5.71)\%]$ 。

2.2 细胞周期

与对照组比较,各剂量组细胞 G_0/G_1 期细胞比例显著降低($P < 0.01$),S期和 G_2/M 期细胞比例均显著升高($P < 0.01$)。详见表1和图1。

2.3 细胞线粒体膜电位

与对照组比较,各剂量组细胞高线粒体膜电位细

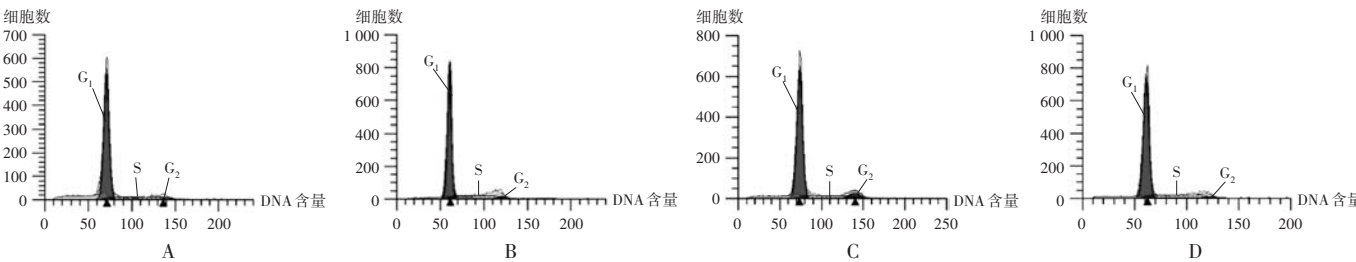
表1 各组细胞的周期分布及高线粒体膜电位比例比较($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

Tab.1 Comparison of cell cycle and proportion of cells with high mitochondrial membrane potential in each group ($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

组别	剂量	细胞周期			高线粒体膜电位细胞比例
		G_0/G_1 期	S期	G_2/M 期	
对照组		82.47 ± 0.39	15.60 ± 0.37	1.93 ± 0.19	30.00 ± 2.46
低剂量组	$0.5 \mu\text{g/mL}$	$73.45 \pm 0.46^{**}$	$23.19 \pm 0.32^{**}$	$3.36 \pm 0.41^{**}$	$39.87 \pm 2.60^*$
中剂量组	$1.0 \mu\text{g/mL}$	$71.23 \pm 0.45^{**}$	$24.48 \pm 0.23^{**}$	$4.29 \pm 0.32^{**}$	$48.13 \pm 3.59^{**}$
高剂量组	$5.0 \mu\text{g/mL}$	$72.04 \pm 0.52^{**}$	$25.27 \pm 0.31^{**}$	$2.69 \pm 0.54^{**}$	$47.30 \pm 2.67^{**}$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。图3、图4同。

Note: Compared with those in the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (for Tab. 1 and Fig. 3 - 4).

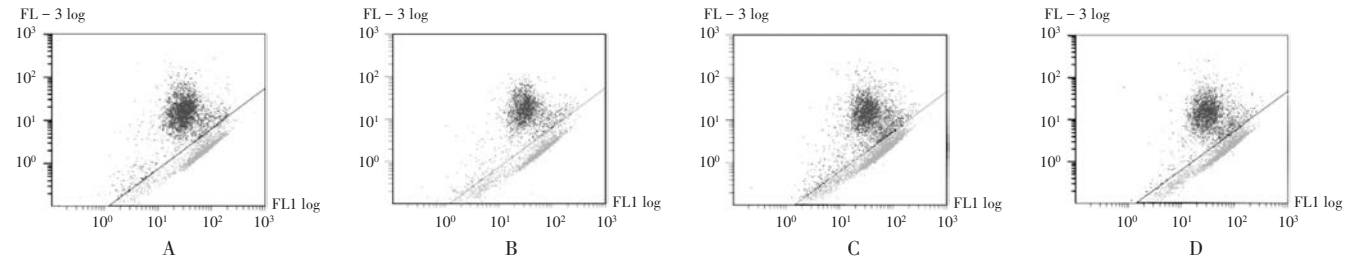


A. 对照组 B. 低剂量组 C. 中剂量组 D. 高剂量组

图1 细胞周期图($\bar{X} \pm s, n = 3$)

A. Control group B. Low - dose group C. Medium - dose group D. High - dose group

Fig.1 Cell cycle ($\bar{X} \pm s, n = 3$)



A. 对照组 B. 低剂量组 C. 中剂量组 D. 高剂量组

图2 细胞线粒体膜电位图($\bar{X} \pm s, n = 3$)

A. Control group B. Low - dose group C. Medium - dose group D. High - dose group

Fig.2 Mitochondrial membrane potential of cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

胞比例均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表1和图2。

2.4 SCF,c-Kit,MITF mRNA 及蛋白表达水平

与对照组比较,各剂量组细胞SCF,c-Kit,MITF的mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见图3。

2.5 TRP-1和TRP-2蛋白表达水平

与对照组比较,各剂量组细胞的TRP-1和TRP-2蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见图4。

3 讨论

在机体毛囊中,黑色素细胞能生成黑色素,然后通过树突递送至表皮角质形成细胞进行表皮色素沉着,其分化和色素沉着依赖于SCF/c-Kit信号通路^[8]。SCF/c-Kit信号激活可增强MITF的磷酸化和转录活性^[9]。MITF参与黑色素合成和色素沉着信号传导,是黑色素细胞色素沉积的主要调节因子,参与黑色素细胞的生长、分化和存活,其通过调节TYR蛋白家族(包括TYR,TRP-1,TRP-2)参与黑色素生成^[10-11]。

本研究中构建了能更好地模拟黑色素细胞体内生存环境^[12]的A375细胞和HaCaT细胞共培养细胞体系,结果发现,中、高剂量组细胞的增殖率显著升高,各剂量组 G_0/G_1 期细胞比例均显著降低,S期和 G_2/M 期细胞比例均显著升高, $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的紫铆花素不能显著升高细胞的增殖率,但能显著缩短细胞周期,提示 $0.5 \mu\text{g/mL}$

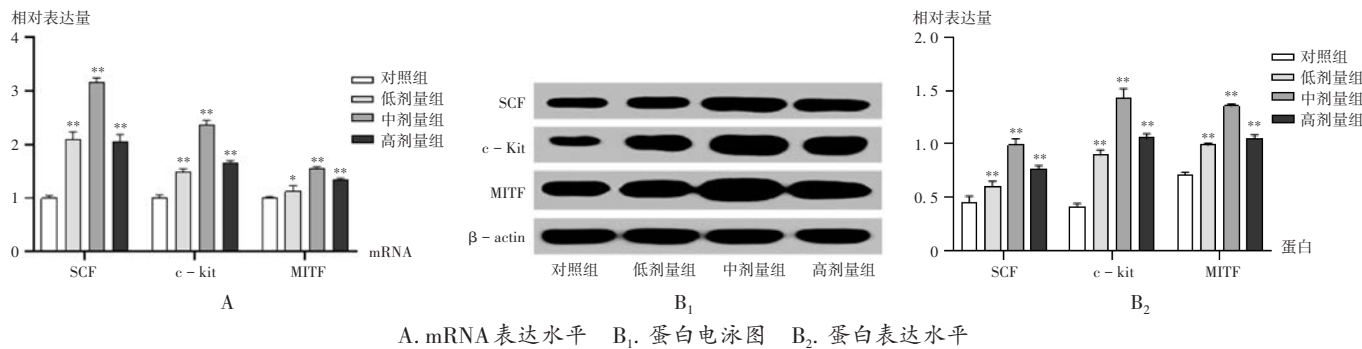


图3 SCF, c-Kit, MITF mRNA和蛋白表达水平($\bar{X} \pm s, n = 3$)

A. Expression level of mRNA B₁. Electropherogram of proteins B₂. Expression level of proteins
Fig. 3 Expression level of SCF, c-Kit and MITF mRNA and proteins ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

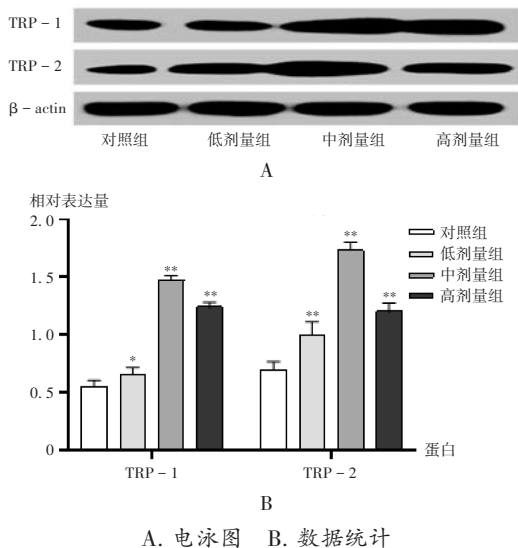


图4 TRP-1和TRP-2蛋白表达水平($\bar{X} \pm s, n = 3$)

A. Electropherogram B. Data statistics

Fig. 4 Expression level of TRP-1 and TRP-2 proteins
($\bar{X} \pm s, n = 3$)

的紫柳花素可能通过调节细胞周期提高细胞增殖率,但由于质量浓度较低可能效果较弱,在48 h的作用周期内,其促细胞增殖成效还未显现。各剂量组细胞的高线粒体膜电位细胞比例均显著升高,TRP-1,TRP-2蛋白表达水平及SCF,c-Kit,MITF的mRNA和蛋白表达水平均显著升高,表明紫柳花素可促进细胞增殖,调节细胞周期,调节细胞线粒体膜电位,保护线粒体功能,抑制细胞早期凋亡的发生,与前期研究^[6-7,13-14]的结果一致,也表明紫柳花素能调节SCF/c-Kit/MITF信号通路,进而影响共培养细胞的生物学活性。

综上所述,紫柳花素可能通过调节SCF和c-Kit的表达而影响A375细胞与HaCaT细胞共培养细胞的增殖、细胞周期和线粒体膜电位等细胞生物学活性。

参考文献

[1] MARIUSZ LH, MALGORZATA C. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(7): 1249 - 1260.

[2] ZHOU S, ZENG H, HUANG J, et al. Epigenetic regulation of melanogenesis[J]. Ageing Res Rev, 2021, 69: 101349.

[3] 董 懿,康馨月,王春生,等. 哺乳动物黑色素生物合成及其调控机制研究进展[J]. 生命科学, 2022, 34(8): 990 - 1000.

[4] 李 伟,王加志,曲 岩,等. 阿魏酸调节 C-KIT / MITF 蛋白表达影响黑色素生成的实验研究[J]. 中国医药导报, 2017, 14(6): 28 - 31.

[5] 王加利,潘纪红,袁 将,等. 驱虫斑鸠菊化学成分及酪氨酸酶抑制活性研究[J]. 中药材, 2017, 40(8): 1833 - 1837.

[6] 高 莉,霍仕霞,谭 雪,等. 紫柳花素上调人黑色素瘤细胞 A375 酪氨酸酶活性及其相关蛋白表达[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2022, 36(4): 391 - 395.

[7] 高 莉,霍仕霞,谭 雪,等. 紫柳花素对黑色素瘤细胞与角质形成细胞共培养体系中黑色素合成的影响[J]. 医药导报, 2019, 38(3): 313 - 316.

[8] 王志杰,高 莉,霍仕霞,等. 驱虫斑鸠菊中紫柳素对人永生角质形成细胞株 HaCaT 增殖及细胞分泌因子的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(28): 3904 - 3906.

[9] ZOCCO M, BLANPAIN C. Identifying the niche controlling melanocyte differentiation[J]. Genes Dev, 2017, 31(8): 721 - 723.

[10] JIANG S, YU X, DONG CS. MiR - 137 affects melanin synthesis in mouse melanocyte by repressing the expression of c-Kit and Tyrp2 in SCF / c-Kit signaling pathway [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(11): 2115 - 2121.

[11] 赵美娟,卢晶晶,倪 辉,等. 黑色素生成信号通路研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1633 - 1642.

[12] 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.

[13] 王 鹰,李海东,孙仁美,等. 补骨脂对 SCF / c-Kit / MITF 信号通路的调控作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(9): 657 - 663.

[14] 刘珂娣,段佳林,苏 晶,等. 紫柳花素对 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用及对线粒体功能的影响研究[J]. 中国药房, 2020, 31(24): 2974 - 2981.

(收稿日期: 2023 - 03 - 15; 修回日期: 2023 - 09 - 20)