

· 论 著 ·

安五脂素对 α -黑色素细胞刺激素诱导的小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞中黑色素生成的影响及机制

庄文越¹, 苏小明², 赵鸣瑶¹, 李贺³, 王春梅³, 陈建光³, 李正祎⁴, 邱旭东⁵, 杜兴旭⁵

(北华大学 1. 医学技术学院, 3. 药学院, 5. 附属医院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林省肿瘤医院检验科, 吉林 长春 130000; 4. 吉林医药学院检验学院, 吉林 吉林 132013)

摘要:目的 研究安五脂素对小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞黑色素生成的影响及机制。方法 体外培养 B16F10 细胞, 用 MTT 法检测 B16F10 细胞存活率。随后实验分为细胞对照组、 α -黑色素细胞刺激素 (α -MSH) 诱导模型组和模型+安五脂素 5, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 培养 48 h。NaOH 裂解法和多巴氧化速率法检测细胞内黑色素含量和酪氨酸酶活性, WST-1 法检测细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平, 化学荧光法检测活性氧 (ROS) 水平, 实时-定量 PCR 检测血红素加氧酶 1 (HO-1) mRNA 表达水平, Western 印迹法检测核因子 E2 相关因子 2 (Nrf-2) 和 HO-1 蛋白表达水平。结果 安五脂素 5, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 B16F10 细胞存活无影响。与细胞对照组相比, 模型组黑色素含量和酪氨酸酶活性显著升高 ($P<0.01$); SOD 活性降低 ($P<0.01$), MDA 和 ROS 水平升高 ($P<0.01$); Nrf-2 蛋白及下游 HO-1 mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, 模型+安五脂素 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 B16F10 细胞黑色素含量和酪氨酸酶活性降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); SOD 活性升高 ($P<0.01$), MDA 和 ROS 含量明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); Nrf-2 蛋白及下游 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($P<0.01$)。结论 安五脂素可能通过抑制 B16F10 细胞氧化应激反应而抑制其黑色素合成, 且可能与抑制 Nrf-2/HO-1 信号通路有关。

关键词: 安五脂素; 黑色素; 核因子-E2 相关因子 2; 血红素加氧酶 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002-(2022)05-0364-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.05.006

黑色素存在于皮肤、头发和眼睛中, 决定皮肤颜色并保护机体免受紫外线损害, 但若过度产生则可导致雀斑、黄褐斑和老年斑等^[1]。近年来, 中药提取物因具有高效、低成本和不良反应小等优点, 越来越多地应用于美白化妆品之中^[2-3]。

安五脂素 (anwulignan) 是五味子木脂素类成分中具有代表性的单体活性成分, 具有抗细胞凋亡^[4]、抗氧化^[4-5]、抗疲劳^[5-6]、抑制血小板聚集^[7]和保肝^[8]等作用, 可通过调节核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor-2, Nrf-2) 和 P38 丝裂原活化蛋白激酶等信号通路参与抗氧化和抗炎等过程^[8]。而黑色素的合成与氧化应激反应密切相关^[9-10], 目前尚未见安五脂素影响黑色素生成的报道。因此, 本研究以 α -黑色素细胞刺激素 (α -me-

lanocyte-stimulating hormone, α -MSH) 诱导的小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞为模型, 研究其对黑色素生成的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、主要试剂和仪器

B16F10 细胞, 中国科学院细胞库。安五脂素 (纯度 99.2%, 批号: 19073005), 四川省维克奇生物科技有限公司。MTT, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 左旋多巴 (levodopa, L-DOPA)、NaOH 和 Triton X-100, 上海生物工程有限公司; α -MSH, 美国 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 兔抗小鼠 Nrf-2、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和 β 肌动蛋白单抗 (一抗) 及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 多抗 (二抗), 武汉

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20200404053YY); 吉林省科技发展计划项目 (20160101176JC)

作者简介: 庄文越, 博士研究生, 副教授, 主要从事五味子药理作用及机制研究, E-mail: wenyuezhuang@163.com

通讯作者: 杜兴旭, E-mail: 664149936@qq.com

ABclonal 公司;RNA 提取试剂盒、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 和 2 x ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 美国 Vazyme 公司。全自动凝胶成像系统和 Image J 分析软件, 上海天能科技有限公司。

1.2 MTT 法检测 B16F10 细胞存活率

B16F10 细胞生长至对数生长期时, 消化重悬, 按照每孔 5000 细胞 (200 μL) 加入 96 孔板中。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养, 待细胞贴壁后, 弃培养基, 加入安五脂素 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。孵育 48 h 后, 加入 MTT 溶液 20 μL , 4 h 后弃上清, 加入 DMSO 150 μL , 室温摇动 10 min, 490 nm 处测定吸光度值 ($A_{490\text{nm}}$)。每组设 3 复孔, 实验重复 3 次。细胞存活率 (%) = 给药组 $A_{490\text{nm}}$ / 细胞对照组 $A_{490\text{nm}} \times 100\%$ 。

1.3 细胞培养、分组和处理

取 B16F10 细胞于 25 cm^2 细胞培养瓶中, 接种密度为 $1 \times 10^9 \text{L}^{-1}$ 。加 5 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养。待细胞生长至约 80%, 用 PBS 洗 1 次, 加入 0.25% EDTA-胰蛋白酶 1 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中消化 2 min, 按 1:2 比例传代。实验分为细胞对照组、 α -MSH 模型组和模型+安五脂素 5, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。细胞对照组加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 模型组加入 α -MSH 300 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [11], 模型+安五脂素组同时加 α -MSH 300 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和不同浓度安五脂素。每组设 3 复孔, 培养 48 h。

1.4 NaOH 裂解法检测 B16F10 细胞黑色素含量

将细胞以 $1 \times 10^8 \text{L}^{-1}$ 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL 培养 24 h。按 1.3 分组处理并收集细胞, 加入含 10% DMSO 的 NaOH 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液 1 mL, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。取溶液 200 μL 加入 96 孔板中, 测定 $A_{405\text{nm}}$ 。实验重复 3 次。

1.5 L-DOPA 氧化速率法测定 B16F10 细胞酪氨酸酶活性

按 1.3 处理细胞, 用预冷的 PBS 洗涤后加入 1 mL 1% Triton X-100 裂解, 快速置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 30 min, 室温下解冻约 20 min。混匀后取 100 μL 于 96 孔板中, 加入 100 μL L-DOPA 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 测定 $A_{475\text{nm}}$ 。实验重复 3 次。

1.6 WST-1 法检测 B16F10 细胞 SOD 活性和 MDA 水平及化学荧光法检测 ROS 水平

按 1.3 用安五脂素处理细胞, 按试剂盒说明书操作, 检测细胞 SOD 活性及 MDA 和 ROS 水平。

1.7 RT-qPCR 检测 B16F10 细胞 HO-1 基因 mRNA 表达水平

按 1.3 处理细胞 48 h, 据 RNA 提取试剂盒说明

书提取细胞总 RNA。测定 $A_{260\text{nm}}$ 和 $A_{280\text{nm}}$ 评价 RNA 质量。以 RNA 为模板, 按逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA。按 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行实时定量逆转录 PCR (real time-quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)。反应总体积 20 μL , 包括 SYBR qPCR 混合液 10 μL , 引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , cDNA 1 μg , 无 RNA 酶水补充至 20 μL 。HO-1 基因序列在 NCBI 查找, 用 Primer premier 6.0 软件进行引物设计。 β 肌动蛋白引物序列为上游: GGCTG-TATTCCCCTCCATCG, 下游: CCAGTTGGTAA-CAATGCCATGT; HO-1 引物序列为上游: TGACAC-CAAGGACCAGAG, 下游: AAGGACCCATCGGA-GAAG。条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (40 个循环), 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。制备熔解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta\alpha}$ 表示 HO-1 mRNA 相对表达水平。

1.8 Western 印迹法检测 Nrf-2 和 HO-1 蛋白表达水平

取 1.3 处理细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 用含 1% 苯甲磺酰氟和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液在冰浴条件裂解细胞 60 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 9419 $\times g$ 离心 5 min, 分离上清液获得总蛋白。用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 并转移至聚偏氟乙烯膜。室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 并与一抗 (抗 HO-1 单抗: 1:1000; 抗 β 肌动蛋白单抗: 1:2000) 孵育过夜。用含吐温-80 的 Tris 缓冲液 (TBS-T) 洗涤, 再与二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h; TBS-T 洗涤, 最后用增强型 ECL 显影液显色, 用全自动凝胶成像系统采集蛋白条带, Image J 分析其积分吸光度值。用目标蛋白与内参蛋白条带积分吸光度比值表示目标蛋白相对表达水平。

1.9 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 24.0 软件分析进行方差齐性检验。若方差齐性, 多组间比较行单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 若方差不齐, 组间比较采用 Welch 法进行近似方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 安五脂素对 B16F10 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 与细胞对照组相比, 安五脂素浓度 < 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 B16F10 细胞存活率无显著影响。因此选择安五脂素 5, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行后续实验。

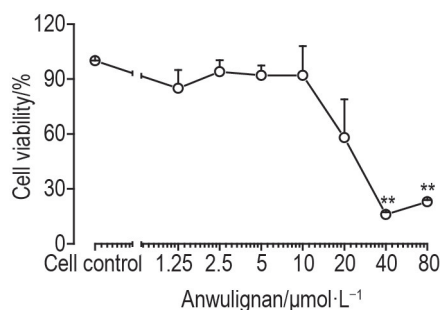


Fig. 1 Effect of anwulignan on cell viability in B16F10 cells by MTT assay. B16F10 cells were treated with anwulignan 0 (cell control), 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group.

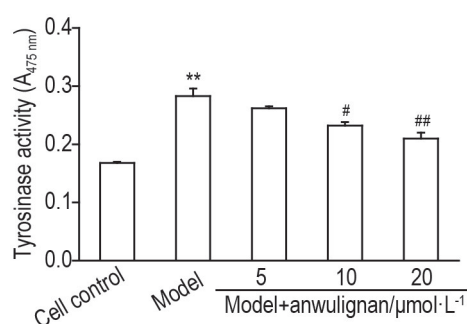


Fig. 3 Effect of anwulignan on tyrosinase activity in B16F10 cells stimulated by α -MSH. See Fig. 2 for the cell treatment. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with model group.

2.2 安五脂素对 α -MSH 诱导的 B16F10 细胞黑色素含量的影响

如图 2 所示,与细胞对照组相比,模型组 B16F10 细胞黑色素含量显著升高 ($P<0.01$)。与模型组相比,模型+安五脂素 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞黑色素含量无明显变化,10 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

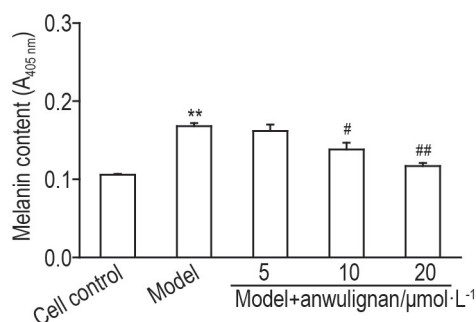


Fig. 2 Effect of anwulignan on melanin content in B16F10 cells stimulated by α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). B16F10 cells were treated with α -MSH $300\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and anwulignan 5 , 10 or $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h, respectively. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with model group.

2.3 安五脂素对 α -MSH 诱导的 B16F10 细胞酪氨酸酶活性的影响

如图 3 所示,与细胞对照组相比,模型组酪氨酸酶活性显著升高 ($P<0.01$)。与模型组相比,模型+安五脂素 10 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组酪氨酸酶活性显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.4 安五脂素对 α -MSH 诱导的 B16F10 细胞 SOD 活性及 MDA 和 ROS 水平的影响

如图 4 和图 5 所示,与细胞对照组相比,模型组 B16F10 细胞 SOD 活性降低 ($P<0.01$),MDA 和 ROS 水平升高 ($P<0.01$)。与模型组相比,模型+安五脂素

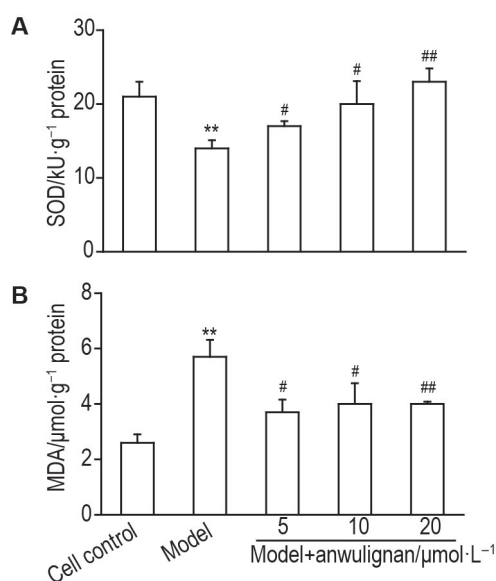


Fig. 4 Effect of anwulignan on superoxide dismutase (SOD) activity (A) and malondialdehyde (MDA) content (B) in B16F10 cells stimulated by α -MSH detected with WST-1 assay. See Fig. 2 for the cell treatment. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with model group.

3 个浓度组 SOD 活性均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), MDA 和 ROS 水平明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.5 安五脂素对 α -MSH 诱导的 B16F10 细胞 Nrf-2 蛋白及下游 HO-1 mRNA 和蛋白表达的影响

如图 6A 所示,与细胞对照组相比,模型组 HO-1 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$);与模型组相比,模型+安五脂素 5 , 10 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 HO-1 mRNA 表达水平均增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。如图 6B 所示,与细胞对照组相比,模型组 HO-1 和 Nrf-2 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$);与模型组相比,模型+安五脂素 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 HO-1 蛋白表达水平明显增加 ($P<0.01$),模型+安五脂素 5 , 10 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Nrf-2 蛋白表达均明显增加 ($P<0.01$)。

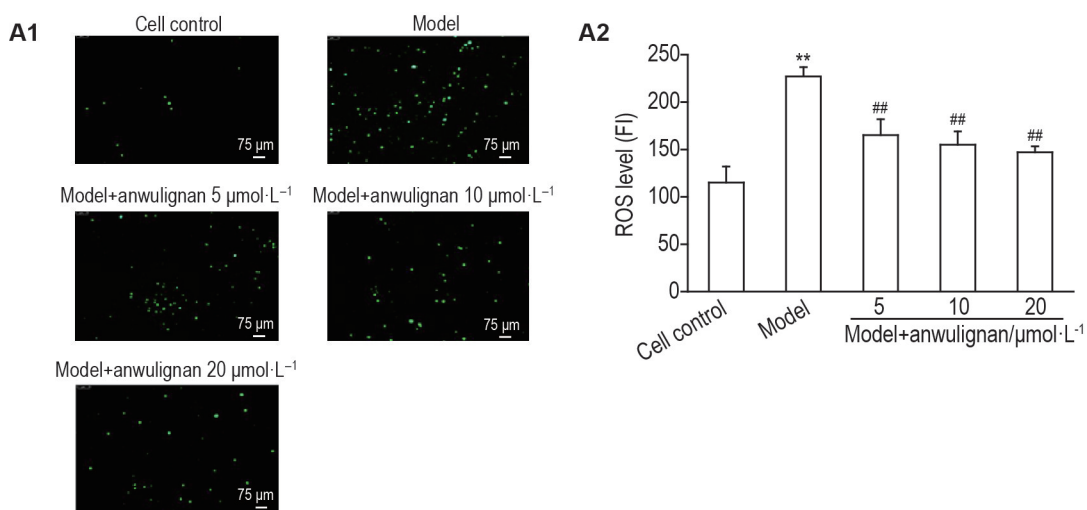


Fig.5 Effect of anwulignan on reactive oxygen species (ROS) level in B16F10 cells stimulated by α -MSH detected by chemical fluorescence assay. See Fig.2 for the cell treatment. A2 was the semi-quantitative result of A1. FI: fluorescence intensity. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; ## $P<0.01$, compared with model group.

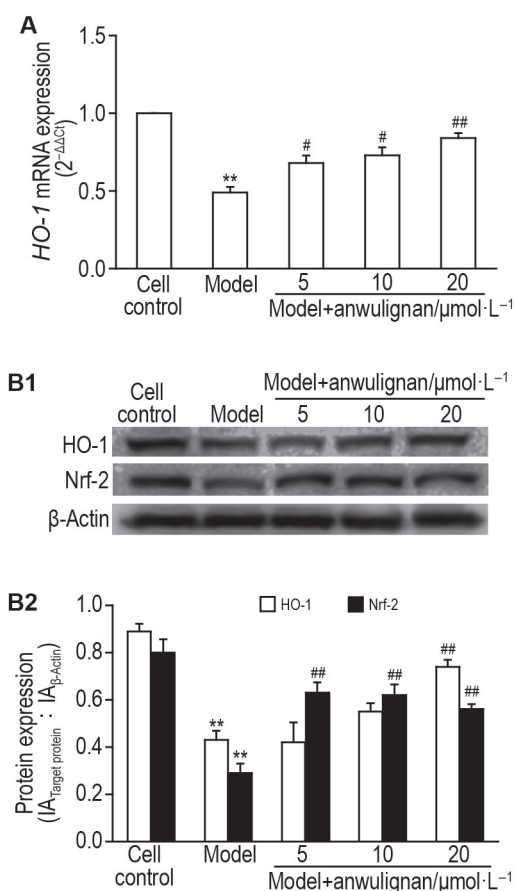


Fig.6 Effect of anwulignan on mRNA and protein expressions of heme oxygenase-1 (HO-1) and protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf-2) in B16F10 cells stimulated by α -MSH. See Fig.2 for the cell treatment. A: the mRNA expression of HO-1 detected by RT-qPCR; B1: the protein expressions of Nrf-2 and HO-1 detected by Western blotting, and B2 was the semi-quantitative result of B1. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with model group.

3 讨论

α -MSH 作为促黑色素生产激素,可使 B16F10 细胞酪氨酸酶活性增强,黑色素生成增多。因此,选择合适浓度的 α -MSH 可作为诱导剂刺激黑色素分泌,建立色素沉着模型以研究药物的美白作用^[11-13]。本研究结果显示,安五脂素在浓度 $<20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对细胞无明显毒性作用,故采用安五脂素 5, 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行后续实验。

酪氨酸酶是黑色素合成的限速酶,因此阻断或抑制黑色素形成过程中酪氨酸酶活性即可有效抑制黑色素生成。本研究结果显示, B16F10 细胞经 α -MSH 诱导后,细胞黑色素含量和酪氨酸酶活性明显增加,表明 α -MSH 诱导的黑色素高表达细胞模型制备成功。安五脂素 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著抑制 α -MSH 诱导的 B16F10 酪氨酸酶活性,减少黑色素生成。

黑色素的生成过程受多方面调控,包括黑色素小体转运^[14]、自噬^[15]和氧化应激^[12]等。据报道,在 α -MSH 促进黑色素合成的同时,大量自由基可在 L-3, 4-二羟苯丙氨酸的氧化还原反应过程中生成^[16],且 α -MSH 诱导黑色素生成与 ROS 的产生有关^[17]。SOD 不仅能有效清除体内氧自由基,还可抑制酪氨酸酶的活性,通过清除超氧阴离子维持细胞氧化还原稳态,从而减少活性氧对细胞的损伤,具有减轻色素沉着的作用^[18-19]。许多研究报道了多种抗氧化剂,如没食子酸^[20]、姜黄素^[21]和抗坏血酸^[22]等具有抗黑色素生成的作用。本研究结果表明,安五脂素可抑制 α -MSH 诱导的 B16F10 细胞 ROS 生成,降低 MDA 水平,提高关键抗氧化酶

SOD 活性。

Nrf-2/HO-1 信号通路是主要抗氧化应激的通路之一,在抗 ROS 生成和氧化应激中发挥重要作用。Nrf2 与其负性调节因子 Keap1 解离后进入细胞核,上调其下游抗氧化基因 HO-1 的转录表达,维持体内氧化还原稳态^[23]。已有研究报道,安五脂素具有抗炎和抗氧化作用,可有效激活 Nrf-2 信号通路发挥抗氧化作用^[5-6]。本研究结果表明,安五脂素能上调 α -MSH 诱导的 B16F10 细胞 Nrf2 表达,且增加其下游 HO-1 表达。

上述结果表明,安五脂素可能通过抗氧化作用抑制黑色素合成,其机制亦可能与其抑制 Nrf-2 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Yang ZB, Zeng BY, Pan Y, *et al.* Autophagy participates in isoliquirigenin-induced melanin degradation in human epidermal keratinocytes through PI3K/Akt/mTOR signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 248-254.
- [2] Cordell GA, Colvard MD. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(3): 514-525.
- [3] Kim K. Effect of ginseng and ginsenosides on melanogenesis and their mechanism of action[J]. *J Ginseng Res*, 2015, 39(1): 1-6.
- [4] Li X, Gao J, Yu Z, *et al.* Regulatory effect of anwulignan on the immune function through its antioxidation and anti-apoptosis in *D*-galactose-induced aging mice[J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 15: 97-110.
- [5] Zhang XY, Jing S, Lin HJ, *et al.* Anti-fatigue effect of anwulignan via the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathway in mice[J]. *Food Function*, 2019, 10(12): 7755-7766.
- [6] 刘嘉玮, 张馨芸, 林慧娇, 等. 安五脂素对衰老小鼠抗疲劳作用研究[J]. *食品工业科技(Science and Technology of Food Industry)*, 2020, 41(18): 319-323.
- [7] 蒋仕丽, 章蕴毅, 陈道峰. 异型南五味子丁素, 五味子酚和(+)-安五脂素对血小板聚集的影响[J]. *复旦学报(医学版)(Fudan University Journal of Medical Sciences)*, 2005, 32(4): 467-470, 478.
- [8] Gao JQ, Yu ZP, Jing S, *et al.* Protective effect of anwulignan against *D*-galactose-induced hepatic injury through activating p38 MAPK-Nrf2-HO-1 pathway in mice[J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 1859-1869.
- [9] Chae JK, Subedi L, Jeong M, *et al.* Gomisin N inhibits melanogenesis through regulating the PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways in melanocytes[J]. *Intern J Mol Sci*, 2017, 18(2): 471-484.
- [10] Lee J, Ryu HS, Kim JM, *et al.* Anti-melanogenic effect of gomisin N from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon (Schisandraceae) in melanoma cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(7): 807-817.
- [11] Zhao N, Su XM, Li H, *et al.* Schisandrin B inhibits α -melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis in B16F10 cells via downregulation of MAPK and CREB signaling pathways[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85(4): 834-841.
- [12] Jiang R, Xu XH, Wang K, *et al.* Ethyl acetate extract from *Panax ginseng* C.A. Meyer and its main constituents inhibit α -melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis by suppressing oxidative stress in B16 mouse melanoma cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 208: 149-156.
- [13] Kim MJ, Kim DS, Yoon HS, *et al.* Melanogenesis inhibitory activity of Korean *Undaria pinnatifida* in mouse B16 melanoma cells[J]. *Interdiscipl Toxicol*, 2014, 7(2): 89-92.
- [14] Chang H, Choi H, Joo KM, *et al.* Manassantin B inhibits melanosome transport in melanocytes by disrupting the melanophilin-myosin Va interaction[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012, 25(6): 765-772.
- [15] Katsuyama Y, Taira N, Yoshioka M, *et al.* 3-O-Glycerol-2-O-hexyl ascorbate suppresses melanogenesis through activation of the autophagy system[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(5): 824-827.
- [16] Munoz-Munoz JL, García-Molina F, Varón R, *et al.* Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway[J]. *Bioch Biophys Acta*, 2009, 1794(7): 1017-1029.
- [17] Liu GS, Peshavariya H, Higuchi M, *et al.* Microphthalmia-associated transcription factor modulates expression of NADPH oxidase type 4: a negative regulator of melanogenesis[J]. *Free Radical Biol Med*, 2012, 52(9): 1835-1843.
- [18] 王雪梅, 沈雪梅, 吴文琴, 等. 19 种中草药美白及抗氧化活性的比较[J]. *安徽大学学报(自然科学版)(Journal of Anhui University (Natural Science Edition))* 2017, 41(1): 86-94.
- [19] 黄立森, 张瞳昕, 庞海月, 等. 芦荟、白芷提取物联合应用的抗氧化和美白活性评估[J]. *化学与生物工程(Chemistry & Bioengineering)*, 2016, 33(7): 58-60.
- [20] Kim YJ. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(6): 1052-1055.
- [21] Tu CX, Lin M, Lu SS, *et al.* Curcumin inhibits melanogenesis in human melanocytes[J]. *Phytother Res*,

- 2012, 26(2): 174-179.
- [22] Panich U, Tangsupa-a-nan V, Onkoksoong T, *et al.* Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(5): 811-820.
- [23] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress[J]. *Free Radical Biol Med*, 2009, 47(9): 1304-1309.

Effect and mechanism of anwulignan on melanocyte-stimulating hormone-induced melanin production in B16F10 melanoma cells

ZHUANG Wen-yue¹, SU Xiao-ming², ZHAO Ming-yao¹, LI He³, WANG Chun-mei³,
CHEN Jian-guang³, LI Zheng-yi⁴, QIU Xu-dong⁵, DU Xing-xu⁵

(1. College of Medical Technology, 3. College of Pharmacy, 5. Affiliated Hospital, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. Clinical Lab, Jilin Provincial Cancer Hospital, Changchun 130000, China; 4. Laboratory Academy, Jilin Medical University, Jilin 132013, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect and mechanism of anwulignan on melanin production in melanoma cells. **METHODS** B16F10 cells were cultured *in vitro* and MTT was performed to assess cell viability. The experiment was divided into the control group, α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) model group and model+anwulignan 5, 10 and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups. Melanin content was detected using the NaOH decomposition method. Tyrosinase activity was determined by measuring the rate of dopachrome formation of levodopa. The activity of superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA) were determined by WST-1 assay. Chemical fluorescence assay was used to detect the content of reactive oxygen species (ROS). The mRNA expression of heme oxygenase-1 (HO-1) was measured by real time-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The protein expressions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) and HO-1 were measured by Western blotting. **RESULTS** Anwulignan 5, 10 and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ had no significant effect on the viability of B16F10 cells. Compared with the cell control group, the melanin content and tyrosinase activity were significantly enhanced ($P < 0.01$), the intracellular SOD activity was decreased ($P < 0.01$), the MDA and ROS contents were increased ($P < 0.01$), the expressions of Nrf-2 protein and its downstream target HO-1 mRNA and protein were significantly reduced ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the melanin content was reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the activity of tyrosinase was inhibited ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the intracellular SOD activity was increased ($P < 0.01$), the MDA and ROS contents were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expressions of Nrf-2 protein and its downstream target HO-1 mRNA and protein were enhanced ($P < 0.01$) in model+anwulignan 10 and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups. **CONCLUSION** Anwulignan may inhibit melanin production by suppressing oxidative stress. The mechanism may be related to its inhibition of Nrf-2/HO-1 signal pathway.

Key words: anwulignan; melanin; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1

Foundation item: Jilin Province Scientific Technology Development Project (20200404053YY); and Jilin Province Scientific Technology Development Project (20160101176JC)

Corresponding author: DU Xing-xu, E-mail: 664149936@qq.com

(收稿日期: 2021-04-22 接受日期: 2021-11-11)

(本文编辑: 魏 霞)