IL-8 释放和分泌亢进，进而激活炎症瀑布反应而导致关节滑膜组织严重血管充血、大量炎性细胞浸润、明显肿胀、坏死($P < 0.01$)。经金苓痛风舒微丸治疗后，各剂量组大鼠 TNF-α、IFN-γ、IL-8 均有不同程度的降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；病理改变也得到明显改善（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。提示金苓痛风舒微丸抗炎机制可能是抑制 TNF-α 表达，减少 IL-8 释放和分泌，并通过抑制 IFN-γ 激活中性粒细胞，减少对关节滑膜中 T 细胞、单核 / 巨噬细胞的刺激降低其对单核细胞、淋巴细胞的趋化作用，破坏炎症反应循环链，而实现其临床疗效。

综上所述，金苓痛风舒微丸具有显著的抗炎作用，且其对痛风性关节炎的抗炎机制可能是抑制前炎症因子 TNF-α、IFN-γ、IL-8 的表达，阻断或破坏其炎症发生、发展的链条进而发挥抗炎作用。

参考文献：

[1] Parineeta S，ZG Badade，Sandeep R. Effect of Hyperuricemia on serum nitric oxide levels in diabetic patients with hyperlipidemia [J]. International Journal of Biological & Medical Research，2012，3(1)：1338-1341.

[2] 于泓，袁良东，姚观平，等. 抗痛风胶囊对急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(6)：283-286.

[3] Lee EG，Lee SL，Chae HJ，et al. Ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata inhibits IL-1β induced rheumatoid synovial fibmblast prolifbration and MMPs，C0X-2 and PGE2 production [J]. Biol R，2010，43(2)：225.

[4] Merkle M，Ribeiro A，Koppel S. TNF-α enhances TLR3 dependent effects on MMP-9 expression in human mesangial cells[J]. Cell Biology International，2012，36(12)：1155-1160.

[5] Conway N，Schwartz S. Diagnosis and management of acute gout [J]. Med Health RI，2009，92(11)：356-358.

[6] Nakagawa T，Hu H，Zharikov S，et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome [J]. Am J Physiol Real Physiol，2006，290(3)：F625-F631.

[7] 中国医师协会心血管内科医师分会. 无症状高尿酸血症血症合并心血管疾病诊治建议中国专家共识[J]. 中国当代医药，2009，24(16)：5.

[8] 王跃旗，王义军，王磊，等. 急性痛风性关节炎的中医研究进展[J]. 环球中医药，2012，5(11)：873-876.

[9] 汪洋，温成平，谢志军. 急性痛风性关节炎的中医药治疗研究进展[J]. 中国中医急症，2011，20(11)：1809-1810.

[10] 刘齐林，何欢，赵士彦，等. 痛风灵抗炎、镇痛、抗痛风作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2009，15(2)：74-75.

[11] 曹燕亚，郭瑞新. 尿酸盐致大鼠痛风模型的制备[J]. 现代中药研究与实践，2011，25(1)：32-33.

[12] 姚丽，霍红，韩月，等. 痛风性关节炎的生物标志物[J]. 中国药理学通报，2012，28(10)：1432-1435.

[13] Zhao J，Xie Y，Qiao C，et al. Imbalance of Th1 and Th2 cells in cardiac injury induced by ambient fine particles[J]. Toxicology Letters，2012，5(2)：225-231.

[14] 王晓璐，徐静，李慧，等. 五藤痛风饮对大鼠急性痛风性关节炎模型 IL-8 和 TNF-α 的影响[J]. 中国现代药物应用，2013,7(13)：6-7.

[15] Martinon F，Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes：master switches of inflammation[J]. Cell Death Differ，2007，14(1)：10-22.

（编辑：宋威）

补骨脂素对 A375 细胞黑素合成及相关细胞信号通路调控的研究

王　帅[1]，耿　放[2]，张明磊[1]，陈　晨[1]，王兴焱[1]，王加志[1]，张　宁[1]（1. 黑龙江中医药大学，黑龙江 哈尔滨 150040；2. 哈尔滨师范大学，黑龙江 哈尔滨 150025）

摘要：目的　研究补骨脂素对 A375 细胞黑素合成的影响以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的作用。**方法**　将补骨脂素作用于 A375 细胞，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 TYR、酪氨酸酶相关蛋白 -1 和酪氨酸酶相关蛋白 -2(TRP-1、TRP-2)以及 ERK1、ERK2、JNK2 这 3 个 MAPK 信号通路关键蛋白激酶的 mRNA 表达。**结果**　补骨脂素在安全剂量下可显著抑制 A375 细胞黑素合成及 TYR 活性，1 μmol·L^{-1} 补骨脂素能明显下调 A375 细胞 TYR、TRP-1、TRP-2 以及 ERK1、ERK2、JNK2 mRNA 表达。**结论**　推测补骨脂素通过抑制 ERK1、ERK2、JNK2

收稿日期：2014-08-11

作者简介：王帅，女，硕士研究生，研究方向：药理学研究。Email：2459842170@qq.com。通讯作者：张宁，男，副教授，研究方向：药理学研究。Email：zhangning0454@163.com。

基金项目：国家自然科学基金面上项目(81274035)；黑龙江省自然科学基金面上项目(D201234)；黑龙江省博士后科研启动金(LBH-Q13162)；黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划资助。

的表达来抑制 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。

关键词：补骨脂素；A375 细胞；MAPK 信号通路；黑素
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1003-9783(2014)06-0704-05
doi：10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.014

Regulatory Effect of Psoralen on A375 Cells Melanogenesis and Its Related Cell Signaling Pathways

WANG Shuai[1], GENG Fang[2], ZHANG Minglei[1], CHEN Chen[1], WANG Xingyan[1], WANG Jiazhi[1], ZHANG Ning[1]
(1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040 Heilongjiang, China; 2. Harbin Normal University, Harbin 150025 Heilongjiang, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of psoralen on A375 cells of melanogenesis and MAPK signal pathway. **Methods** MTT test was used to test the cell activity, NaOH schizolysis method was applied for the detection of melanin amount, and L-dopa oxidation method was used to detect the activity of tyrosinase(TYR). RT-PCR was applied to measure the mRNA expression levels of TYR and tyrosinase related proteins TRP-1, TRP-2, and the mRNA expression levels of MAPK signal pathway protein kinase of ERK1, ERK2 and JNK2. **Results** Psoralen in safe dose could significantly suppress melanin formation and TYR activity in A375 cells. Psoralen(1 μmol·L^{-1}) could significantly down-regulate mRNA expression levels of TYR, TRP-1, TRP-2, ERK1, ERK2 and JNK2. **Conclusion** Psoralen can significantly suppress melanogenesis of A375 cells, and the mechanism is probably associated with the inhibition of the expression of ERK1, ERK2 and JNK2, and with the down-regulation of TYR, TRP-1 and TRP-2 mRNA.

Keywords: Psoralen; A375 cells; MAPK signal pathway; Melanin

补骨脂素是豆科植物补骨脂中的一种具有重要生物活性的组分，属于呋喃香豆素类化合物[1]，而香豆素类化合物属于典型的植物雌激素类成分。植物雌激素是一类从天然植物中提取的结构与内源性雌激素相似的杂环多酚类化合物，对雌激素受体具有双向调节作用，是一种理想替代雌激素的药物[2]。研究发现[3]，补骨脂素可促进 MCF-7 细胞增殖，表明补骨脂素具有雌激素样活性。生理浓度的雌二醇能使人黑素细胞 TYR 活性增强，并促进黑素合成[4]。雌激素对黑素细胞的作用可能与雌激素受体(ER)介导的细胞信号通路的转导有关，近年来研究发现，丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路参与了雌激素对黑素细胞中黑素生成的调控，对黑素细胞的生理活动及功能起到了调控的作用[5]。推测植物雌激素成分补骨脂素也可能通过 MAPK 信号通路影响黑素细胞的黑素合成。

1 材料

1.1 细胞及试剂　人黑素瘤细胞 A375，中国科学院细胞中心提供；DMEM 培养液，美国 Hyclone 生物公司；Trizol 细胞裂解液，美国 Gibco 生物公司；胎牛血清，Hyclone 公司；逆转录试剂盒，BIO BASIC INC；PCR 试剂盒，上海生工生物工程技术服务有限公司；引物，上海生工生物工程技术服务有限公司；MTT，Sigma 公司。

1.2 仪器　PCR 扩增仪，德国 Biometra 公司；酶标仪，上海热电仪器有限公司；Olympus 倒置显微镜，日本 Olympus 株式会社；Cham1Ge15000 凝胶成像系统，北京赛智创业科技有限公司。

1.3 药品　98 %补骨脂素，南京泽朗科技有限公司，批号：66977121216；98 %雌二醇，中国药品生物制品检定所，批号：150-28-21。

1.4 药液配制　精密称量雌二醇 5.5 mg，4 mL 无水乙醇将其溶解，再用 DMEM 完全培养液稀释至浓度为 10^{-3} μmol·L^{-1}。精密称取补骨脂素 3.7 mg，DMEM 完全培养液溶解，梯度稀释成 100，10，1，10^{-1}，10^{-2}，10^{-3} μmol·L^{-1} 共 6 种浓度药液。各药液调节 pH 至 6.8，过 0.22 μm 滤膜除菌，-20 ℃保存待用。

1.5 细胞分组及处理　将 A375 细胞培养于 37 ℃，5 % CO_2 的细胞培养箱中。选取对数生长的细胞，以 0.25 %胰酶和 0.02 % EDTA 消化，用含 10 %小牛血清的 DMEM 完全培养液重悬细胞，将细胞悬液以每孔 3000 个接种于 96 孔培养板，每孔 200 μL 培养基，培养 24 h 后，把培养液弃掉，然后分组并加入

各药液 200 μL。空白对照组加不含药物培养液；雌二醇组加 10^{-3} μmol·L^{-1} 浓度的雌二醇；补骨脂素组加补骨脂素 100，10，1，10^{-1}，10^{-2}，10^{-3} μmol·L^{-1} 共 6 种浓度药液，各组细胞均设 6 个复孔。将另一部分细胞以每孔 9×10^4 个接种于 6 孔培养板中，每孔 2 mL 培养基，分组处理同前，加各药液 2 mL，每组设 4 个复孔。各组细胞继续培养 48 h 后，分别进行 MTT 实验、黑素含量实验、TYR 活性实验和 RT-PCR 实验。

1.6 检测指标

1.6.1 细胞活性　向 96 孔板的各孔中加入 20 μL MTT（5 mg·mL^{-1}），继续培养 4 h，弃上清，加入 150 μL DMSO 溶解，置恒温培养振荡器内震荡 10 min，在酶标仪上于 490 nm 波长下测定吸光度值。

1.6.2 黑素含量　去掉 6 孔板培养液，用 PBS 洗涤两次，每孔加入 0.25 %胰酶 1 mL 消化 1 min 后，再加入 DMEM 完全培养液 1 mL 终止消化，收集各组细胞悬液至 15 mL 离心管中，1500 r·min^{-1} 离心 3 min，弃上清，加入 100 μL 浓度为 1 mol·L^{-1} 的 NaOH 溶液，混匀，37 ℃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 波长处测定吸光度。

1.6.3 TYR 活性　去掉 96 孔板培养液，用 PBS 洗涤两次，每孔加入 100 μL 1 % TritonX-100 溶液，迅速将其置于 -80 ℃冰箱中 30 min，取出室温融化，使细胞充分裂解。每孔加入 50 μL 预热的 0.2 % L-dopa 溶液，37 ℃下反应 3 h，酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度。

1.6.4 RT-PCR 法检测细胞中 TYR、TRP-1、TRP-2、ERK1、ERK2、JNK2 mRNA 的表达　收集 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 ℃反应 10 min，42 ℃反应 60 min，70 ℃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服务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 ℃预变性 2 min；94 ℃变性 30 s、（TYR 54 ℃、TRP-1 57 ℃、TRP-2 55 ℃、ERK1 57 ℃、ERK2 54 ℃、JNK2 54 ℃、β-actin 54 ℃）退火 40 s、72 ℃延伸 40 s，35 个循环；72 ℃终止延伸 10 min。PCR 扩增产物 5 μL 与 6×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、TRP-1/β-actin、TRP-2/β-actin、ERK1/β-actin、ERK2/β-actin、JNK2/β-actin）表示 mRNA 水平。

表 1　PCR 引物序列

Table 1　PCR primers sequences

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	预扩增片段长度 /bp
TYR	TCACGGCTCTGTTGAATGTCT	CTGAAGTTGGGCGAGATGAT	143
TRP-1	ACATCATTCCCTCACCAAAGAC	AGAAGTCCGAAAGCCAAGTAAA	223
TRP-2	GTTCCTTTCTTCCCTCCAGTG	TTCCTTTATTGTCAGCGTCAGA	223
ERK1	GGGAGGTGGAGATGGTGAAG	AGCAGGTTGGAGGGCTTTAGAT	302
ERK2	ACCCACACAAGAGGATTGAAGT	AAAAGCCACAACTACCAGAAAC	353
JNK2	CCTTCTTTACCAGATGCTTTGTG	ATACGGTCAGTGCCTTGGAATA	303
β-actin	CGTGGACATCCGCAAAGAC	AAGAAAGGGTGTAACGCAACTA	302

1.7 统计学处理方法　数据用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析（ANOVA），用 LSD 法对各组数据进行两两比较。

2 结果

2.1 对细胞活性的影响　与空白对照组比较，100 μmol·L^{-1} 和 10 μmol·L^{-1} 补骨脂素对细胞的增殖有显著的抑制作用（$P<0.01$），说明上述浓度的药物对细胞有毒性，不适合进行下一步的药效学研究；1，10^{-1}，10^{-2}，10^{-3} μmol·L^{-1} 的补骨脂素不影响细胞的活性，见表 2。

表 2　各组对A375 细胞活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 2　Effect of each group on the A375 cell activity

组别	浓度 /μmol·L^{-1}	吸光度值	细胞增殖率 /%
空白对照组	-	0.334 ± 0.022	100
雌二醇组	10^{-3}	0.341 ± 0.018	102
补骨脂素组	100	0.101 ± 0.010**	30
	10	0.226 ± 0.036**	68
	1	0.309 ± 0.037	92
	10^{-1}	0.319 ± 0.031	95
	10^{-2}	0.329 ± 0.032	98
	10^{-3}	0.330 ± 0.017	99

注：与空白对照组比较，**P<0.01。

2.2 对黑素合成的影响　与空白对照组比较，补骨脂素组浓度为 1，10^{-1}，10^{-2} μ mol·L^{-1} 时，黑素合成分别为 72 %、81 %、87 %，对黑素合成有显著的抑制作用（$P<0.01$）；补骨脂素组浓度为 10^{-3} μmol·L^{-1} 时，黑素合成为 92 %，对黑素合成有显著的抑制作用（$P<0.05$）；雌二醇组黑素合成为 125 %，对黑素合成有显著的促进作用（$P<0.01$），见表 3。

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

Table 3 Effect of each group on the A375 cell melanogenesis

组别	浓度 /μmol·L^{-1}	吸光度值	与空白对照组 A 比值 /%
空白对照组	–	0.075 ± 0.003	100
雌二醇组	10^{-3}	0.094 ± 0.002**	125**
补骨脂素组	1	0.054 ± 0.003**	72**
	10^{-1}	0.061 ± 0.002**	81**
	10^{-2}	0.065 ± 0.001**	87**
	10^{-3}	0.069 ± 0.003*	92*

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

2.3 对 TYR 活性的影响 与空白对照组比较，补骨脂素组浓度为 1 μmol·L^{-1} 时，细胞 TYR 活性为 84 %，对 TYR 活性有显著抑制作用($P < 0.01$)；补骨脂素组浓度为 10^{-1}，10^{-2}，10^{-3} μmol·L^{-1} 时，细胞 TYR 活性分别为 87 %、88 %、90 %，对 TYR 活性有显著的抑制作用 ($P < 0.05$)；雌二醇组细胞 TYR 活性为 122 %，对 TYR 活性有显著的促进作用 ($P < 0.01$)，见表 4。

表 4 各组对 A375 细胞 TYR 活性的影响($\bar{x}\pm s$，n=6)

Table 4 Effect of each group on the A375 cell activity of TYR

组别	浓度 /μmol·L^{-1}	吸光度值	与空白对照组 A 比值 /%
空白对照组	–	0.077 ± 0.005	100
雌二醇组	10^{-3}	0.094 ± 0.006**	122**
补骨脂素组	1	0.065 ± 0.006**	84**
	10^{-1}	0.067 ± 0.003*	87*
	10^{-2}	0.068 ± 0.002*	88*
	10^{-3}	0.069 ± 0.002*	90*

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

2.4 对细胞 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 表达的影响 与空白对照组比较，雌二醇组 TYR、TRP-1、TRP-2 的 mRNA 表达均明显增强，差异有显著性意义($P<0.05$，$P<0.01$)；补骨脂素组 TYR、TRP-1、TRP-2 的 mRNA 表达均明显降低，差异有显著性意义($P<0.05$，$P<0.01$)，见表 5 和图 1。

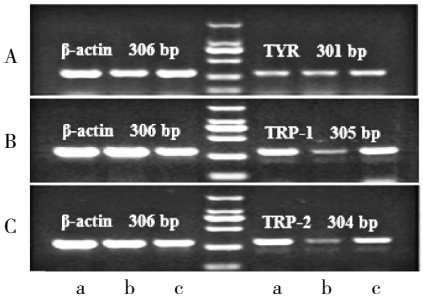
表 5 各组 TYR、TRP-1、TRP-2mRNA 的 PCR 产物凝胶电泳定量分析结果($\bar{x}\pm s$，n=4)

Table 5 Gel electrophoresis quantitative analysis of the PCR products of TYR, TRP-1 and TRP-2 mRNA

组别	浓度 /μmol·L^{-1}	TYR/β-actin	TRP-1/β-actin	TRP-2/β-actin
空白对照组	–	0.574 ± 0.089	0.477 ± 0.024	0.465 ± 0.022
雌二醇组	10^{-3}	0.845 ± 0.046**	0.547 ± 0.021*	0.515 ± 0.029*
补骨脂素组	1	0.437 ± 0.035*	0.209 ± 0.031**	0.251 ± 0.016**

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

2.5 对细胞 ERK1、ERK2、JNK2 mRNA 表达的影响 与空白对照组比较，雌二醇组 ERK1、ERK2、JNK2 的 mRNA 表达均明显增强，差异有显著性($P<0.01$)；补骨脂素组 ERK1、ERK2、JNK2 的 mRNA 表达均明显降低，差异有显著性意义($P<0.05$，$P<0.01$)，见表 6 和图 2。



A .TYR 的 PCR 结果；B. TRP-1 的 PCR 结果；C. TRP-2 的 PCR 结果

a. 空白对照组；b. 补骨脂素组；c. 雌二醇组

图 1 各组对 A375 细胞 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 表达水平的影响

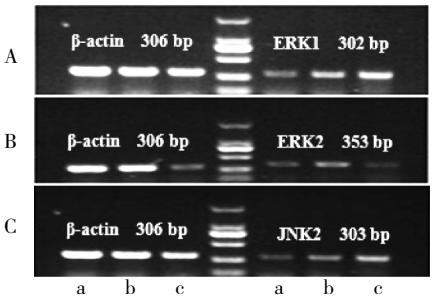
Figure 1 Psoralen's influence on the A375 cell of TYR, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression levels

表 6 各组 ERK1、ERK2、JNK2 mRNA 的 PCR 产物凝胶电泳定量分析结果($\bar{x}\pm s$，n=4)

Table 6 ERK1, ERK2, JNK2 mRNA gel electrophoresis quantitative analysis of the results of PCR products

组别	浓度 /μmol·L^{-1}	ERK1/β-actin	ERK2/β-actin	JNK2/β-actin
空白对照组	–	0.325 ± 0.030	0.516 ± 0.021	0.326 ± 0.035
雌二醇组	10^{-3}	0.482 ± 0.031**	0.859 ± 0.045**	0.485 ± 0.006**
补骨脂素组	1	0.254 ± 0.025*	0.383 ± 0.039**	0.272 ± 0.014*

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。



A. ERK1；B. ERK2；C. JNK2

a. 补骨脂素组；b. 空白对照组；c. 雌二醇组

图 2 各组对 A375 细胞 ERK1、ERK2、JNK2 mRNA 表达水平的影响

Figure 2 Effect of each group on the ERK1, ERK2 and JNK2 mRNA expression levels in A375 cell

3 讨论

黑素细胞是人体表皮中产生黑色素的特异细胞，黑色素在其特有的器官黑素小体中合成。黑色素的合

成主要受包括 TYR、TRP-1、TRP-2 在内的酪氨酸酶基因家族的调控[6-8]。TYR 是黑素形成过程中的关键限速酶，TRP-1 在黑素小体的生物合成中，可提高真黑素与褐黑素的比值，增加黑素的合成[9-10]。TRP-2 作为多巴色素互变异构酶可以维持黑色素中酚的成分[11-12]。与此同时，TRP-1 和 TRP-2 还可与 TYR 结合形成复合物稳定酪氨酸酶从而调节其活性[13]。此外，人黑素细胞中存在着雌激素受体(estrogen receptor，ER)，雌激素通常与 ER 结合后直接或间接地激活细胞外信号转导通路，丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路是细胞外信号引起细胞生理反应的共同途径，其信号的转导与 ER 调控关系密切。MAPK 家族主要包括细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)、c-JunN 末端蛋白激酶(JNK1/2)和 P38 蛋白激酶 3 个亚家族。近年来很多研究发现 MAPKs 信号通路参与了黑素细胞中黑素生成的调控，激活的 ERK 作为细胞增殖及分化的信号调控因子，能够引起小眼相关转录因子(MITF)磷酸化降解，从而导致酪氨酸酶活性下降和黑素生成的减少。JNK 通路则被发现可以通过降低 cAMP 应答原件结合蛋白(CREB)的磷酸化水平，抑制 MITF 和酪氨酸酶的表达，实现抑制黑素生成的作用[14-17]。

有研究表明，补骨脂素能够促 ER 阳性细胞 T47D 细胞增殖且使其孕激素受体 mRNA 表达水平增加，并且对子宫内膜癌细胞也有显著地促细胞增殖作用，这些效应可被雌激素受体拮抗剂 ICI182780 所拮抗，表明补骨脂素具有植物雌激素作用，且其作用可能通过 ER 途径介导[18]。本实验研究表明，补骨脂素安全剂量作用于 A375 细胞后，能显著抑制细胞黑素合成及 TYR 活性，并能抑制 A375 细胞中 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 的表达，表明补骨脂素可能通过抑制 TYR 活性和 / 或抑制 TYR、TRP-1、TRP-2 mRNA 的表达来抑制黑素合成，并且补骨脂素能显著抑制 MAPK 信号通路蛋白激酶 ERK1、ERK2、JNK2 的 mRNA 表达，推测 MAPK 信号通路可能参与了补骨脂素对黑素细胞中黑素生成的调控。

参考文献：

[1] USUIT. Pharmaceutical prospects of phytoextrogens [J]. Endocr J，2006，53(1)：7-20.

[2] 王德生. 老年性痴呆[M]. 北京：人民卫生出版社，2001：15-397.

[3] 沈丽霞，董晓华，李炜，等. 槲皮素、补骨脂素对乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖的影响[J]. 中国药理学通报，2009，25(5)：601-60.

[4] Mcleod SD，Ranson M，Mason RS. Effects of estrogens on human melanocytes in vitro[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology，1994，49(1)：9-14.

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

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

[7] 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.

[8] Fang D，Kute T，Setaluri V. Regulation of tyrosinase related protein 2 (TYRP2) in human melanocytes：Relationship to Growth and Morphology[J]. Pigment Cell Research，2001，14(2)：132-139.

[9]Del Marmol V，Ito S，Jackson I，et al. TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture[J]. Febs Lett，1993，327(3)：307.

[10] Kuzumaki T，Matsuda A，Wakamatsu K，et al. Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes[J]. Experimental cell research，1993，207(1)：33-40.

[11] Vance KW，Goding CR. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma [J]. Pigment cell research，2004，17(4)：318-325.

[12] Mallick S，Singh SK，Sarkar C，et al. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro[J]. Pigment cell research，2005，18(1)：25-33.

[13] Nishioka E，Funasaka Y，Kondoh H，et al. Expression of tyrosinase，TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes：TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis[J]. Melanoma research，1999，9(5)：433-444.

[14] Hemesath TJ，Price ER，Takemoto C，et al. MAP kinase links the trascription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes[J]. Nature，1998，391(6664)：298-301.

[15] Wu M，Hemesath TJ，Takemoto CM，et al. c-Kit triggers dual phosphorylations，which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi[J]. Genes Dev，2000，14 (3)：301-312.

[16] Kim DS，Hwang ES，Lee JE，et al. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation[J]. J Cell Sci，2003，116(9)：1699-1706.

[17] Bu J，Ma PC，Chen ZQ，et al. Inhibition of MITF and tyrosinase by paeonol-stimulated JNK/SAPK to reduction of phosphorylated CREB [J]. Am J Chin Med，2008，36(2)：245-263.

[18] 赵丕文，牛见昭，王继峰，等. 补骨脂素的植物雌激素作用及其机制探讨[J]. 中国中药杂志，2008，33(1)：59-62.

(编辑：宋成)