

# 人参皂苷 CK 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人黑素细胞凋亡的保护作用

唐苏为<sup>1</sup>, 陆家晴<sup>1</sup>, 谢韶琼<sup>1</sup>, 姜文成<sup>1</sup>, 赖竞思<sup>2</sup>, 杨伶俐<sup>2</sup>, 片山一郎<sup>2</sup>, 张慧敏<sup>3</sup>

(1. 同济大学附属皮肤病医院, 上海 200443, 2. 大阪市立大学色素病症治疗共同开发部门, 日本 大阪 5450051, 3. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201204)

**摘要:**目的 探讨人参皂苷化合物 K(CK)对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导来自新生儿中度色素沉着性包皮的正常人表皮黑素细胞 (HEMn-MP) 细胞凋亡的保护作用及可能机制。方法 采用磷酸激酶抗体阵列检测 HEMn-MP 细胞各阵列蛋白磷酸化水平; 比色法测定各组 HEMn-MP 细胞半胱天冬酶 (Caspase-3) 活性。结果 CK 减弱 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HEMn-MP 细胞 P53 蛋白磷酸化; CK 降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Caspase-3 活化。结论 人参皂苷 CK 可能通过抑制细胞凋亡对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的黑素细胞损伤有保护作用, 因而可作为治疗白癜风的潜在药物。

**关键词:** 白癜风; 人参皂苷 CK; HEMn-MP 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R758.4+1

文献标识码: A

文章编号: 1672-0709(2022)01-0015-04

## Protective Effects of Ginsenoside Compound K on Human Melanocyte Apoptosis Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tang Suwei<sup>1</sup>, Lu Jiaqing<sup>1</sup>, Xie Shaoqiong<sup>1</sup>, Jiang Wencheng<sup>1</sup>, Lai Jingsi<sup>2</sup>, Yang Lingli<sup>2</sup>, Ichiro Katayama<sup>2</sup>, Zhang Huimin<sup>3</sup>

1. Shanghai Skin Disease Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200443, China; 2. Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka 5450051, Japan; 3. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201204, China

**Abstract: Objective** In order to investigate the protective effects and possible mechanism of ginsenoside Compound K (CK) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis of human melanocyte HEMn-MP cells. **Methods** Phosphorylation levels of each protein array in HEMn-MP cells were detected by phosphor-kinase antibody array. Caspase-3 activity of HEMn-MP cells was determined by colorimetry. **Results** CK reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced phosphorylation of P53 protein in HEMn-MP cells. CK reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HEMn-MP cell death. CK reduced the activation of caspase-3 induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Conclusion** Ginsenoside CK may have protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced melanocyte injury by inhibiting cell apoptosis, so it can be used as a potential drug for the treatment of vitiligo.

**Key words:** Vitiligo; Ginsenoside Compound K; HEMn-MP Melanocytes; Apoptosis

白癜风是一种获得性慢性色素脱失性疾病,表现为局部表皮功能性黑素细胞选择性丧失,全球患病率为 0.5%~2%,本病易对患者造成极大的心理负担,需要及时有效的治疗<sup>[1]</sup>。白癜风的发病机制尚不完全清楚,可能与遗传、免疫、神经、生化和环境内外因素有关。近年来越来越多的研究表明,氧化应激会引起黑素细胞的损伤和凋亡,是白癜风发病和进展的关键因素<sup>[2]</sup>。因此,使用抗氧化剂来减少或逆转表皮中的氧化应激损伤从而恢复黑素细胞功能的治疗策略已引起越来越多学者的研究兴趣。人参皂苷化合物 K (Compound K, CK) 属二醇型人参皂苷,其结构为 20(S) 原人参二醇-20-O-β-D-吡喃

葡萄糖苷,见图 1,是人参皂苷在人肠道内的主要代谢产物,并经吸收入血成为人参皂苷在体内的主要成分,也是人参发挥生物活性的主要成分,可从人参、三七等富含人参皂苷的中药材中转化获得其单体化合物<sup>[3]</sup>。CK 的药理作用主要包括抗炎、抗动脉粥样硬化、抗癌和神经保护<sup>[4-7]</sup>等。在皮肤科领域,有研究证实 CK 可用于对抗皮肤衰老、改善皮肤的整体状况<sup>[8-9]</sup>。然而,对于 CK 在黑素细胞中的作用,医者们知之甚少。本研究通过使用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的来自新生儿中度色素沉着性包皮的正常人表皮黑素细胞 (HEMn-MP) 氧化应激作为体外模型,探索 CK 对经氧化应激损伤后的人黑素细胞的保护作用并阐明其潜在的分子机制,为探讨 CK 对白癜风的治疗

通信作者: 张慧敏, E-mail: zhanghm@shutcm.edu.cn

作用提供理论依据。

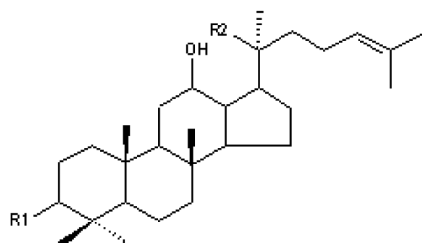


图1 CK化学结构式

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 细胞** HEMn-MP细胞购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

**1.1.2 试剂** 人参皂苷 CK(纯度:>98.0%,四川维科奇生物科技有限公司),M254 细胞培养基、人类黑色素细胞生长补充剂、溴化乙锭(EB)、Hoechst 33342(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),过氧化氢  $H_2O_2$ (日本 WAKO 公司),二甲基亚砜(DMSO)、半胱天冬酶-3(Caspase-3)比色试剂盒(美国 Sigma 公司),磷酸激酶抗体阵列检测试剂盒(R&D system 公司),胰蛋白酶(日本 Nacalai Tesque 公司)、PBS 缓冲液(日本 Fujifilm Wako 公司)。

**1.1.3 仪器** ImageQuant TL 图像分析软件(GE Healthcare 公司),自动酶标仪(550 型,美国 Bio-Rad Laboratories 公司),共聚焦荧光显微镜(Keyence 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 复苏 HEMn-MP 细胞,加入含 1% 人黑色素细胞生长补充剂的 M254 培养基,于 37℃、5% $CO_2$  孵箱内培养。0.25%胰蛋白酶消化传代,取第 8~11 代细胞用于做本次实验。实验前将细胞以  $5 \times 10^5$  个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中继续培养 12 h 后加药刺激。

**1.2.2 分组** 共分 3 组,空白对照组、0.4 mmol/L  $H_2O_2$  组、0.4 mmol/L  $H_2O_2$ +0.625  $\mu$ g/mL CK 组。

**1.2.3 磷酸激酶抗体阵列检测** 使用磷酸激酶抗体阵列检测(ARY003B,R & D Systems)分析磷酸化激酶,根据试剂盒说明检测 HEMn-MP 细胞各阵列蛋白磷酸化水平,每个阵列加入 300  $\mu$ g 蛋白质裂解物,使用图像分析软件(ImageQuant TL,GE Healthcare)量化斑点的像素灰度值。

**1.2.4 Caspase 3 活性检测** 使用比色试剂盒

(CASP3C-1KT)测定 Caspase-3 活性,根据试剂盒说明检测 Caspase-3 活性。该试剂盒基于 Caspase-3 对 Ac-DEVD-pNA 的水解,从而产生对硝基苯胺(pNA)部分。在 405 nm( $\epsilon$ mM=10.5)处检测到 pNA。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行 *t* 检验或多因素方差分析用来比较各组之间的差异。实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CK 减弱  $H_2O_2$  诱导的 HEMn-MP 细胞 p53 蛋白磷酸化** 磷酸激酶抗体阵列检测结果显示,在黑色素细胞中使用  $H_2O_2$  刺激 3 h 后,Ser15 和 Ser46 处的 p53 磷酸化显著增加,并且其他 p53 相关磷酸化位点没有变化,而 CK 预处理后减弱了  $H_2O_2$  诱导的 Ser15 和 Ser46 处 p53 磷酸化,见图 2。

**2.2 CK 降低  $H_2O_2$  诱导的 Caspase-3 活化** 使用比色法测定 HEMn-MP 细胞中的 Caspase-3 活化,观察到 Caspase-3 在经  $H_2O_2$  刺激后被激活、活性显著增加,而在 CK 预处理后 Caspase-3 的活性则显著降低,见图 3。

## 3 讨论

氧化应激是细胞过度产生或不充分清除活性氧分子的结果,其特点是自由基形成与身体抗氧化能力之间的不平衡,可能导致蛋白质、脂质及核酸等不同分子的非特异性损伤<sup>[10]</sup>。皮肤是人体身体最大的屏障器官,每天受紫外线辐射、空气污染、病原体、化学物质等侵袭,很容易引起皮肤中各类细胞的损伤<sup>[11]</sup>。皮肤在受到外源性刺激时可产生大量的氧自由基,当自由基的产生超出机体清除能力时,就会产生氧化应激,同时,细胞有氧代谢也会产生少量  $H_2O_2$ 、HO $\cdot$ 等活性氧自由基,越来越多的学者认为白癜风的发生与氧化应激损伤密切相关,已有研究证实,在进展期白癜风患者表皮中可检测到过量蓄积的  $H_2O_2$ <sup>[12]</sup>。由于黑色素合成过程中产生的促氧化状态<sup>[13]</sup>,此外,氧化应激可诱导 CD8 $^+$ T 细胞趋化攻击黑色素细胞<sup>[14]</sup>,故皮肤中的黑色素细胞特别容易受到氧化应激的影响,寻找适合的抗氧化剂,通过针对性的抗氧化治疗阻断自身免疫攻击、保护黑色素细胞为白癜风的治疗提供了新的思路。中药等是天然抗氧化剂的主要来源,实验证明多种中药提取物可发挥抗氧化作用,安全性较高,在白癜风的治疗中有较好的应用前景,此外,药物化学提取技术的日趋

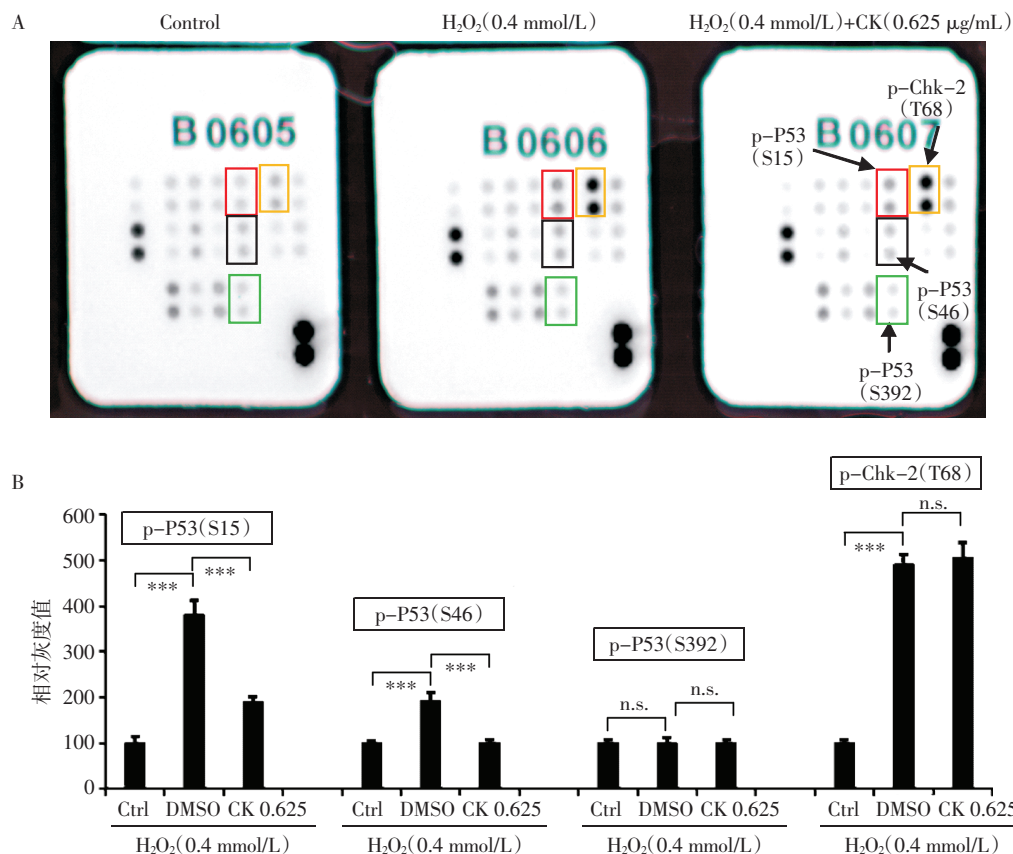
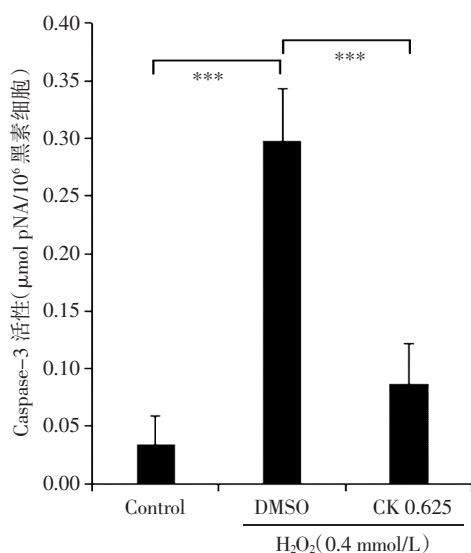


图2 CK对培养的人表皮黑素细胞p53蛋白磷酸化的影响

A. HEMn-MPs细胞经给药干预3h后的磷酸激酶阵列;B. 磷酸激酶阵列指示点的像素灰度值

图3 CK对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caspase-3活化的影响

进步也为研究天然抗氧化化合物以改善氧化应激相关的皮肤病铺平了道路。

CK作为人参和三七的主要成分人参皂苷的肠道代谢产物,被证实多种氧化应激相关条件下均能起到保护作用:CK通过增加超氧化物歧化酶水平和谷胱甘肽过氧化物酶活性来改善肝脏抗氧化

活性<sup>[15]</sup>;CK通过显著减少氧化应激来预防肾病<sup>[16]</sup>;CK通过对神经系统激活抗氧化应激增强记忆力<sup>[17]</sup>。然而,CK是否可以保护黑素细胞免受氧化应激尚未见他人报道。基于此,笔者进行了前期研究,并且发现CK可以保护人类黑色素细胞免受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞损伤<sup>[18]</sup>,为了探究其可能的分子机制,在查阅相关文献后,笔者采用HEMn-MP细胞作为研究对象,以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为诱发氧化应激损伤的因素,建立体外模拟氧化应激的黑素细胞模型,研究了CK对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化应激引起的黑素细胞凋亡的影响。

黑素细胞的过度氧化应激会触发内在凋亡途径并最终介导细胞死亡<sup>[19]</sup>,p53蛋白则被称为细胞凋亡的关键调节因子,p53以“分子警察”的身份监控细胞的生长过程,一旦细胞受损,p53蛋白表达水平会很快升高,并抑制DNA复制、刺激DNA切除修复,p53含有一系列丝氨酸(S)/苏氨酸(T)磷酸化位点,p53的磷酸化在调节其激活以诱导细胞凋亡方面起着关键作用<sup>[20]</sup>。根据本次研究磷酸激酶阵列检测结果显示,在黑素细胞中用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激3h后,Ser15和Ser46点位处的p53磷酸化显著增加,

而其他 p53 相关磷酸化位点则没有变化,CK 预处理后则减弱了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的黑素细胞 Ser15 和 Ser46 处的 p53 磷酸化。与此同时,笔者结合溴化乙锭(EB)和 Hoechst 33342 染色来分析 CK 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞死亡的影响,结果显示用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后死亡细胞的比例增加,而在 CK 预处理后则死细胞比例有所减少。由于 Caspase-3 是内切蛋白酶家族的成员,被称为细胞凋亡中的刽子手,并在细胞凋亡中发挥核心作用<sup>[21]</sup>,因此,笔者测定了黑素细胞中的 Caspase-3 活化的程度,观察到 Caspase-3 活性在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导下被极大地触发,而 CK 预处理后则能使其活性降低。

综上所述,CK 在减弱 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HEMn-MPs 细胞凋亡方面有一定的潜力,CK 可以作为一种抗氧化剂为预防和治疗白癜风提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Picardo M, Dell'Anna ML, Ezzedine K, et al. Vitiligo[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15 011.
- [2] Abdel-Malek ZA, Jordan C, Ho T, et al. The enigma and challenges of vitiligo pathophysiology and treatment[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2020, 33: 778-787.
- [3] Kim EH, Kim W. An insight into ginsenoside metabolite compound K as a potential tool for skin disorder[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 8 075 870.
- [4] Lee JO, Choi E, Shin KK, et al. Compound K, a ginsenoside metabolite, plays an antiinflammatory role in macrophages by targeting the AKT1-mediated signaling pathway[J]. J Ginseng Res, 2019, 43: 154-160.
- [5] Zhou L, Zheng Y, Li Z, et al. Compound K attenuates the development of atherosclerosis in ApoE(-/-) mice via LXRα activation[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: 1 054.
- [6] Chen HF, Wu LX, Li XF, et al. Ginsenoside compound K inhibits growth of lung cancer cells via HIF-1α-mediated glucose metabolism[J]. Cell Mol Biol(Noisy-le-grand), 2019, 65: 48-52.
- [7] Seo JY, Ju SH, Oh J, et al. Neuroprotective and cognition-enhancing effects of compound K isolated from red ginseng[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64: 2 855-2 864.
- [8] Kim E, Kim D, Yoo S, et al. The skin protective effects of compound K, a metabolite of ginsenoside Rb1 from Panax ginseng[J]. J Ginseng Res, 2018, 42: 218-224.
- [9] Park NJ, Bong SK, Lee S, et al. Compound K improves skin barrier function by increasing SPINK5 expression[J]. J Ginseng Res, 2020, 44: 799-807.
- [10] Gems D, Partridge L. Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger"[J]. Cell Metab, 2008, 7: 200-203.
- [11] Li YF, Ouyang SH, Tu LF, et al. Caffeine protects skin from oxidative stress-induced senescence through the activation of Autophagy[J]. Theranostics, 2018, 8: 5 713-5 730.
- [12] Kostović K, Pastar Z, Pasić A, et al. Treatment of vitiligo with narrow-band UVB and topical gel containing catalase and superoxide dismutase[J]. Acta Dermatovenol Croat, 2007, 15: 10-14.
- [13] Denat L, Kadekaro AL, Marrot L, et al. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134: 1 512-1 518.
- [14] Li S, Zhu G, Yang Y, et al. Oxidative stress drives CD8<sup>+</sup> T-cell skin trafficking in patients with vitiligo through CXCL16 upregulation by activating the unfolded protein response in keratinocytes[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 140: 177-189.
- [15] Xia W, Sun C, Zhao Y, et al. Hypolipidemic and antioxidant activities of sanchi (radix notoginseng) in rats fed with a highfat diet[J]. Phytomedicine, 2011, 18: 516-520.
- [16] Song W, Wei L, Du Y, et al. Protective effect of ginsenoside metabolite compound K against diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and NF-κB/p38 signaling pathway in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 63: 227-238.
- [17] Yang Q, Lin J, Zhang H, et al. Ginsenoside Compound K Regulates Amyloid β via the Nrf2/Keap1 signaling pathway in mice with scopolamine hydrobromide-induced memory impairments[J]. J Mol Neurosci, 2019, 67: 62-71.
- [18] Tang S, Yang L, Kuroda Y, et al. Herb Sanqi-derived compound K alleviates oxidative stress in cultured human melanocytes and improves oxidative-stress-related leukoderma in guinea pigs[J]. Cells, 2021, 10: 2 057.
- [19] Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 617 207.
- [20] Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53[J]. Oncogene, 2003, 22: 9 030-9 040.
- [21] Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6: 99-104.

(收稿日期:2021-01-30)

欢迎订阅 欢迎投稿