

羟基积雪草苷对氧化应激条件下黑素细胞的保护作用及其诱导自噬机制的研究

凌雨婷¹, 龚晴丽¹, 熊喜喜¹, 孙利¹, 丁书红¹, 赵文城², 朱文元¹, 鲁严^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院皮肤科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学分析测试中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 积雪草是一种传统中药药物, 具有很多医学作用, 如创伤愈合和抗氧化。中医也发现它可用于白癜风复色和炎症后色素沉着。本研究评估羟基积雪草苷对氧化应激下人黑素细胞作用效果及机制。方法: 正常的人黑素细胞予 0.01 mmol/L 过氧化氢处理, 再予不同浓度的羟基积雪草苷(0、10、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。评估人黑素细胞树突的回缩速率, 流式细胞术及细胞内游离钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]$)检测线粒体膜电位(MMP), 透射电子显微镜(TEM)观察线粒体超微结构, 吖啶橙染色检测自噬, 蛋白质印迹检测自噬体形成的指标 LC3-II/LC3-I 的比值。结果: 在过氧化氢引发的氧化应激条件下, 羟基积雪草苷在一定浓度下抑制了黑素细胞树突的回缩, 提高了膜电位并减少了 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的积累, 减弱了线粒体的损伤, 增强了自噬活动。结论: 人黑素细胞遭受氧化应激损伤时, 羟基积雪草苷可通过自噬激活起到抗氧化作用。因此, 羟基积雪草苷可成为氧化应激引起的白癜风的有效治疗手段。

[关键词] 羟基积雪草苷; 氧化应激; 自噬; 线粒体; 白癜风; 黑素细胞

[中图分类号] R758.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)05-0569-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20170510

Protective effect of madecassoside on H_2O_2 -induced oxidative stress and autophagy activation in human melanocytes

Ling Yuting¹, Gong Qingli¹, Xiong Xixi¹, Sun Li¹, Ding Shuhong¹, Zhao Wene², Zhu Wenyan¹, Lu Yan^{1*}

(¹Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Analysis and Testing Center, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: *Centella asiatica* (L.) Urb. is a traditional Chinese medicine that has many medical applications, including wound healing and anti-oxidation. Some traditional Chinese Medicine doctors have found that it has therapeutic effects for external use in the repigmentation of vitiligo and post-inflammatory hypopigmentation. This study was designed to evaluate the effects of madecassoside, a major bioactive component of *C. asiatica*, on oxidative stress in human melanocytes and its possible mechanism of action.

Methods: Normal human melanocytes were treated with 0.01 mmol/L H_2O_2 and various concentrations of madecassoside (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Subsequently, the retraction velocity of melanocyte dendrites was assessed. Determination of mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\Psi\text{m}$) was performed by flow cytometry and intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]$) levels were measured. Alterations of mitochondrial ultrastructure were observed by transmission electron microscopy (TEM). Acridine orange (AO) staining was used to measure autophagy. The LC3-II/LC3-I ratio, an indicator of autophagosome formation, was analyzed by Western blot. **Results:** Under H_2O_2 -induced oxidative conditions, madecassoside inhibited melanocyte dendrite retraction, improved MMP and reduced the accumulation of $[\text{Ca}^{2+}]$ in a concentration-dependent manner. Observations by TEM showed that madecassoside attenuated the damage of mitochondria in human melanocytes caused by oxidative stress. Furthermore, autophagy activation was demonstrated by AO staining and an increased LC3-II/LC3-I ratio. **Conclusion:** These results demonstrate the antioxidative effect of madecassoside on human melanocytes subjected to oxidative damage is activated by autophagy. Moreover, madecassoside could be a promising treatment for vitiligo mainly caused by oxidative stress.

[Key words] madecassoside; oxidative stress; autophagy; mitochondria; vitiligo; melanocytes

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):569-574, 606]

[基金项目] 国家自然科学基金(81171517); 江苏省“333”工程项目(BRA2013279)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: luyan6289@163.com

白癜风是一类获得性皮肤、黏膜色素减退性疾病,以慢性进行性表皮黑素细胞丢失为特征。现有一些假说解释白癜风,包括神经介质学说、黑素细胞自毁学说和自身免疫学说等^[1]。近期,氧化应激也被提出是黑素细胞退化的初始事件。有证据表明,患者在疾病初期,表皮中存在极高浓度的过氧化氢(H_2O_2 , 1 mmol/L)和过氧硝酸盐,伴有过氧化氢酶浓度和活力的降低^[2]。

黑素细胞树突在粘着、迁移和黑色素传递中具有重要作用。在人体皮肤中,黑素细胞利用树突与数个角质细胞连接。最新理论“黑素细胞经表皮脱失”提出,黑素细胞的慢性分离和随后的经表皮丢失是白斑褪色的原因,这可能与已增长的机械应力和其他类型的应激反应(如氧化应激)有关^[5]。Schallreuter 等^[4]证明了正常人体黑素细胞中过氧化氢的增加可能诱发树突的减少,还可能造成黑素细胞分离。在树突外生连接时需要细胞外的 Ca^{2+} ,过氧化氢诱导了黑素细胞对 Ca^{2+} 的摄取和流出的损伤,阻碍了树突生长和延长。

线粒体是活性氧(ROS)的主要来源。活性氧会导致线粒体结构和功能的改变,包括 Ca^{2+} 平衡、细胞氧化状态改变等^[6]。Picardo 团队已证明了活动期白癜风患者体内外周血细胞中抗氧化剂不平衡,可能由线粒体损伤引起的^[7]。就这一点而言,线粒体很有可能扮演白癜风发病机制中的关键角色。

积雪草是一种多年生草本伞形科匍匐植物,生长于亚洲、大洋洲、非洲和美洲的热带地区。它含有三萜,也就是积雪草酸、羟基积雪草酸、积雪草皂苷或羟基积雪草苷。积雪草有抗炎^[8]、提高记忆力^[9]、抗癌、抗肝癌^[10]和抗氧化的作用^[11]。积雪草也可用于皮肤病变方面的治疗,如表皮脱落、增生性瘢痕、湿疹、伤口愈合、银屑病和硬皮病^[12]。羟基积雪草苷是这种中草药的主要活性成分,比其他三萜系化合物成分的比例都高,而且它的抗氧化能力已得到证实^[13]。从积雪草中提取的羟基积雪草苷纯度高达 99%。一些中医也发现它在白癜风复色和炎症后色素沉着方面的外用效果,但是这种机制未得到论证。本研究评估羟基积雪草苷在治疗人体黑素细胞氧化应激中的效果,特别是将线粒体和树突形态作为重点,进一步探索其作用机制。

1 对象和方法

1.1 对象

标本来自年轻健康男性(Ⅲ或Ⅳ皮肤)包皮环切

术后,根据 Swope 等方法得到黑素细胞。研究对象均签署书面知情同意书,所有病例均通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

包皮经 70%酒精消毒,并剪成约 4 mm×4 mm 皮片,加入浓度为 5 mg/mL Dispase II 酶过夜消化,再用含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶在 37℃下消化表皮 30 min,经过离心获得单细胞悬液,接种在预先加入了黑素细胞培养基 M254 的培养瓶中,放置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中孵育。原代培养,予 200 mg/mL G418 抑制成纤维细胞生长,培养基隔天更换 1 次直至细胞融合。所有实验均取 2~5 代细胞。细胞鉴定分别采用 HMB45 以及 Masson-Fontana 染色法检测黑素瘤标志物 PMEL17 及黑色素。

1.2.2 黑素细胞树突的观察

为了选择最佳 H_2O_2 浓度,观察体外在不同浓度 H_2O_2 (0.010、0.005、0.001 mmol/L)下黑素细胞树突的变化情况,处理前和处理后每 5 min 拍照,用图像分析软件测量树突的长度,随即每组选择 20 个黑素细胞按照公式计算其树突变化速率。树突变化速率($\mu\text{m}/\text{min}$)=(起始长度-最终长度)/经历的时间。

随后,用 0.01 mmol/L H_2O_2 和不同浓度羟基积雪草苷(10、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)一同处理细胞,并且利用上述方法评估黑素细胞树突变化速率。没有羟基积雪草苷或 H_2O_2 组为空白对照组,羟基积雪草苷为上海现代制药公司资助。

1.2.3 膜电位测定

JC-1 是可将荧光绿转变为红色的可在线粒体积聚的荧光探针,因此线粒体去极化表现为红/绿比值的下调。将人黑素细胞置于 6 孔板中培养,90%铺满底部时,利用 0.01 mmol/L H_2O_2 和(或)羟基积雪草苷(10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 5 h。收集各组细胞,制备细胞悬浮液 0.5 mL,后加入 0.5 mL 的 JC-1 溶液,在 37℃下孵育 15 min,以 600 r/min 的速度离心 5 min,弃上清。后置于 JC-1 溶液中,流式细胞仪检测,FACScan 和 Cell Quest 软件分析。可得到平均荧光强度值 FL1(绿色荧光)和 FL2(红色荧光),红/绿荧光强度值的比率可评估线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)。

1.2.4 流式细胞术计算细胞内钙离子浓度

通过 Fluo-3 AM 检测氧化压力下细胞内钙离子的水平变化,Fluo-3/AM 能穿透细胞膜。利用 0.01 mmol/L H_2O_2 和(或)羟基积雪草苷(10、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 5 h。收集各组细胞,将 Fluo-3AM 溶液(0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)

和细胞一起在 37℃ 孵育 35 min 进行荧光探针装载,然后用 PBS 冲洗 2 遍,上流式细胞仪进行荧光检测。

1.2.5 透射电镜

利用 0.01 mmol/L H₂O₂ 和 (或) 羟基积雪草苷 (10、50、100 μg/mL) 刺激 5 h, 收集各组细胞,用 PBS 洗 2 遍,3%戊二醛 4℃ 固定过夜。1%锇酸固定液固定,70%~100%乙醇脱水,然后包埋、切片、醋酸铀-枸橼酸铅双染色。置于显微镜下观察并摄片。观察黑素细胞和线粒体的形态和数目。测定了平均长轴、短轴、周长和视野下随机 10 个黑素细胞。数密度(N_v)、表面积密度(S_v)和体积密度(V_v)按下列公式计算。

$$N_v = \pi \cdot N_x / (A_c \cdot 4\sqrt{ab})$$

$$S_v = 4B_x / (\pi \cdot A_c)$$

$$V_v = V / V_c$$

N_x 为细胞质内线粒体个数, A_c 为细胞质的面积, a 为线粒体截面长轴, b 为线粒体截面短轴, B_x 为线粒体的周长, V 为线粒体的体积, V_c 为细胞质的体积。

1.2.6 吖啶橙染色

以 1×10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板中, 用 0.01 mmol/L H₂O₂ 和/或羟基积雪草苷 (10、50、100 μg/mL) 刺激 5 h, 在避光条件下, 用 1 μg/mL 吖啶橙孵育 15 min, 然后用 PBS 洗 2 遍, 在荧光显微镜下检测酸性小泡, 其特点是红色荧光。

1.2.7 免疫印迹分析

以 2×10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板中, 用 0.01 mmol/L H₂O₂ 和 (或) 羟基积雪草苷 (10、50、100 μg/mL) 刺激 5 h, 收集各组黑素细胞, 预冷的 PBS 洗 2 遍, 加入含酶抑制剂的裂解液中, 离心后收集蛋白, 置于 Bradford 试剂盒 (加拿大 Bio-Rad 实验室) 中, 等量的蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 电转至硝酸纤维膜, 兔抗人 LC3 抗体 (Sigma 公司, 美国)、鼠抗人 GAPDH 抗体 (Sigma 公司, 美国) 按 1:1 000 稀释, 4℃ 摇床孵育过夜, 洗膜后与辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗鼠抗体 (美国 Jackson 免疫研究实验室) 按 1:1 000 室温孵育 1~2 h, ECL 试剂 (Pierce 公司, 美国) 作为反应物, Bio-Rad 凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司, 美国) 分析 LC3 表达情况。

1.3 统计学方法

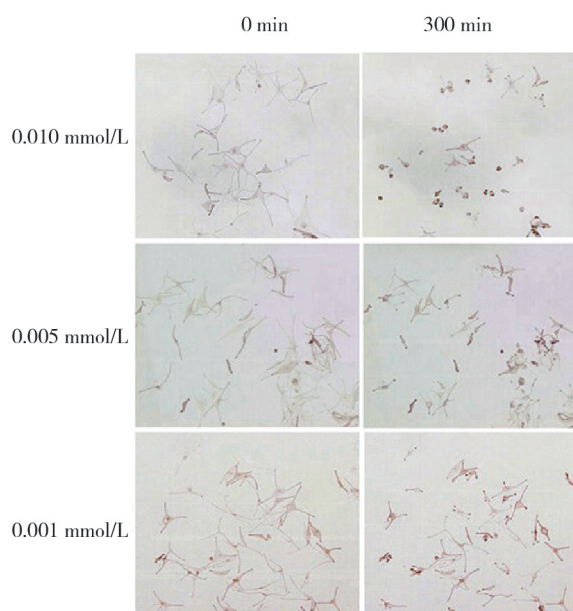
实验数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较各组间差异, LSD-*t* 检验用于组间

两两比较。P≤0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过氧化氢对正常人类黑素细胞树突的影响

不同浓度 (0.010、0.005、0.001 mmol/L) 过氧化氢可引起黑素细胞树突缩短, 更换培养基时细胞可随之脱落 (图 1), 特别是在 0.01 mmol/L 浓度下, 树突回缩速率 [(0.310±0.021) μm/min] 快于其他两组 [(0.199±0.034)、(0.189±0.017) μm/min, P<0.05], 同时观察了刺激 5 min 后树突变化, 考虑到浓度过低可能增加观察树突回缩的难度, 因此选择 0.01 mmol/L H₂O₂ 作为实验浓度。



不同浓度 (0.010、0.005、0.001 mmol/L) H₂O₂ 刺激前和刺激后 300 min, H₂O₂ 可引起树突回缩, 当更换培养基时, 细胞随之冲脱, 0.01 mmol/L H₂O₂ 可引起较明显树突回缩 (×100)。

图 1 过氧化氢对正常的人黑素细胞树突影响

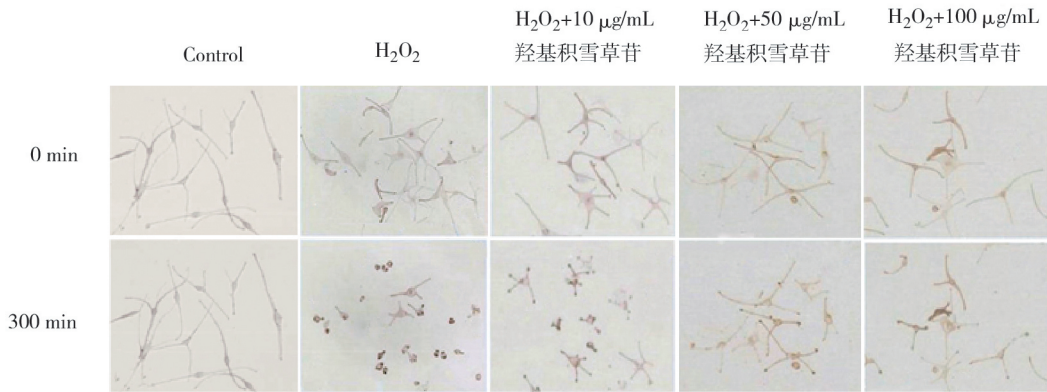
Figure 1 Effects of H₂O₂ on normal human melanocytes

2.2 羟基积雪草苷可阻滞氧化压力下黑素细胞树突的短缩

黑素细胞树突在仅有过氧化氢的刺激下, 研究发现 300 min 后数量会明显减少甚至消失, 而在 10、50、100 μg/mL 浓度积雪草苷保护下, 树突仅发生轻微的收缩, 回缩速率明显减缓 (图 2, 表 1)。结果表明, 羟基积雪草苷可降低氧化压力下黑素细胞树突的变化速率, 阻滞树突的短缩。

2.3 氧化应激下羟基积雪草苷对线粒体膜电位影响

氧化应激下, 线粒体膜电位下降。而在 10、50、



过氧化氢刺激 5 h 下,黑素细胞树突回缩明显,不同浓度羟基积雪草苷可阻滞氧化压力下黑素细胞树突的短缩,50 μg/mL 浓度下,阻滞作用最强(×200)。

图 2 羟基积雪草苷对氧化压力下人黑素细胞影响

Figure 2 Effect of madecassoside on H₂O₂-treated human melanocytes

100 μg/mL 浓度羟基积雪草苷下,膜电位虽有降低但明显高于 H₂O₂ 组,并呈浓度依赖性,提示羟基积雪草苷可减少因氧化应激而导致的线粒体膜电位下降(表 1)。

2.4 羟基积雪草苷对细胞内钙离子浓度变化的影响
线粒体可以调控细胞内钙离子平衡,在一定程

度上,紊乱的钙离子稳态可以反映线粒体功能障碍。氧化应激下,细胞内钙离子浓度会上调。而在 10、50、100 μg/mL 的羟基积雪草苷的作用下,可减少线粒体内钙离子的积聚(表 1)。因此羟基积雪草苷可减少钙离子积聚和调节氧化压力下钙离子稳态。

表 1 黑素细胞的树突变化速率、线粒体膜电位和钙离子浓度变化情况

Table 1 Retraction velocity, MMP, and the level of free [Ca²⁺]_i of melanocytes following different treatment

分组	黑素细胞树突变化速率 (μm/min)	线粒体膜电位 (%)	钙离子浓度变化
空白组	0.019±0.008	98.68 ± 3.28	39.95±2.77
H ₂ O ₂ 组	0.310±0.021 [#]	41.57 ± 3.91 [#]	79.56±2.38 [#]
H ₂ O ₂ + 10 μg/mL 羟基积雪草苷	0.256±0.021 ^{#*}	58.28 ± 5.07 ^{#*}	69.80±2.05 ^{#*}
H ₂ O ₂ +50 μg/mL 羟基积雪草苷	0.167±0.024 ^{#*Δ}	91.87 ± 4.52 ^{#*Δ}	55.33±3.31 ^{#*Δ}
H ₂ O ₂ +100 μg/mL 羟基积雪草苷	0.215±0.017 ^{#*Δ▲}	76.42 ± 4.06 ^{#*Δ▲}	42.71±2.07 ^{#*Δ▲}

与空白组相比,[#]*P*<0.05;与 H₂O₂ 组相比,^{*}*P*<0.05;与 H₂O₂ 组+10 μg/mL 羟基积雪草苷相比,^Δ*P*<0.05;与 H₂O₂ 组+50 μg/mL 羟基积雪草苷相比,[▲]*P*<0.05。

2.5 羟基积雪草苷对氧化压力下线粒体超微结构的影响

与正常组相比,氧化压力下黑素细胞受损,可出现细胞膜破裂,空泡化及嵴数量的减少(图 3)。然而,羟基积雪草苷作用下,相较 H₂O₂ 组线粒体损伤程度较轻,甚至仍可见正常的线粒体及自噬小体。表 2 为线粒体体视学分析结果,过氧化氢组线粒体 V_v 和 S_v 明显高于正常组,而 N_v 却显著降低,提示线粒体发生肿胀。羟基积雪草苷作用下,V_v 和 S_v 降低,N_v 却上升。羟基积雪草苷组的 V_v、S_v 和 N_v 较过

氧化氢组有明显差异。

2.6 羟基积雪草苷对氧化压力下黑素细胞自噬活动的影响

吖啶橙是一种荧光染料,可观察细胞自噬现象,羟基积雪草苷组相较过氧化氢组细胞胞浆中出现较多点状红色斑点(图 4),且浓度越高,红色荧光强度越高,50 μg/mL 羟基积雪草苷组红色荧光强度最高。

2.7 羟基积雪草苷可上调氧化压力下 LC3-II/LC3-I 的比值

LC3-II 是经典的自噬相关蛋白^[17]。Western blott

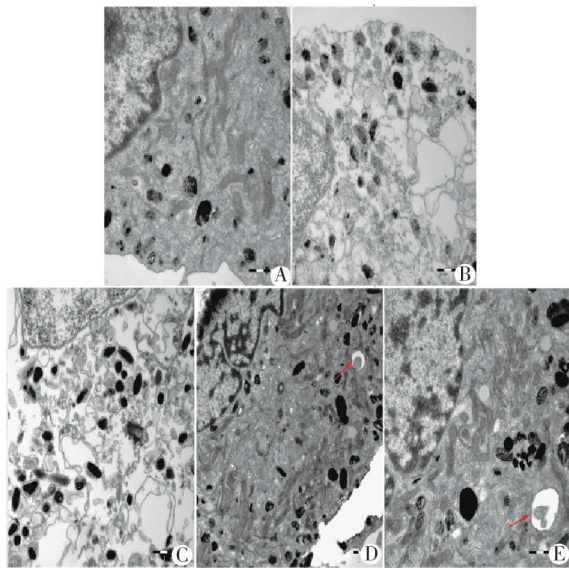


图 3 人黑素细胞中线粒体超微结构($\times 30\ 000$)
A: 空白对照组中线粒体的结构和数量正常; B: H_2O_2 处理的黑素细胞膜完整性被破坏, 线粒体嵴数量减少和出现空泡化; C-E: 在 10、50、100 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷+ H_2O_2 下, 减弱了线粒体的损害, 亦可观察到自噬体。

Figure 3 Ultrastructural alterations of mitochondria in melanocytes ($\times 30\ 000$)

表 2 线粒体体视学定量分析结果

Table 2 Stereology analysis of mitochondria after different treatments ($\bar{x} \pm s, n=50$)

分组	Nv (μm^{-2})	Sv (%)	Vv (%)
空白组	8.25 \pm 0.98	3.66 \pm 0.76	5.34 \pm 0.95
H_2O_2 组	3.84 \pm 1.03 [#]	6.93 \pm 0.84 [#]	9.13 \pm 1.06 [#]
H_2O_2 +10 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷	5.73 \pm 0.94 ^{#*}	5.81 \pm 1.01 ^{#*}	7.99 \pm 0.88 ^{#*}
H_2O_2 +50 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷	7.22 \pm 0.95 ^{#Δ}	4.03 \pm 0.75 ^{#Δ}	6.27 \pm 0.92 ^{#Δ}
H_2O_2 +100 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷	6.49 \pm 0.87 ^{#*Δ}	4.68 \pm 0.96 ^{#*Δ}	6.85 \pm 0.78 ^{#*Δ}

与空白组相比, [#] $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组相比, ^{*} $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组+10 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷相比, ^{Δ} $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组+50 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷相比, ^{Δ} $P < 0.05$ 。

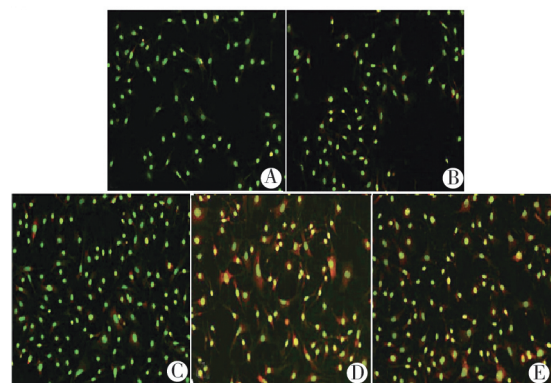
结果显示 (10、50、100 $\mu g/mL$) 羟基积雪草苷组 LC3-II 和 LC3-I 的蛋白表达明显高于过氧化氢组。且 LC3-II/LC3-I 比值明显高于过氧化氢组 ($P < 0.05$, 图 5), 10、50 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷组高于空白对照组, 可以促使 LC3-I 向 LC3-II 的转化。

3 讨论

白癜风是一种发病机制复杂的多基因疾病。近期, 有学者阐述细胞黏附能力降低引起黑素细胞脱落的假说, 非节段型白癜风可能是一种由黑素细胞的慢性脱失和经表皮丢失引起的疾病^[14]。Kanwar 等^[15]证明了, 与正常人或稳定期白癜风黑素细胞相比, 活动期非节段型白癜风患者的黑素细胞树突短小

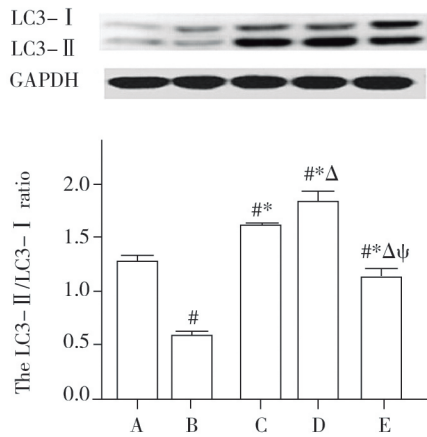
呈棒状, 与 IV 型胶原黏附力显著降低。这些观察研究支持了黑素细胞经表皮丢失理论。树突不仅是黑色素传递的重要媒介, 还可增加表皮基底层中黑素细胞的粘着性。培养黑素细胞过程中发现, 树突首先出现收缩, 接着细胞会脱落并最终死亡。进一步证据表明, 由过氧化氢引起的氧化应激是白癜风发生和发展的关键因素^[1]。更重要的是, 研究表明白癜风中黑素细胞的丢失可能由氧化应激和黑素细胞经表皮丢失联合作用结果。ROS 可能诱发黑素细胞树突的损伤, 这不仅会影响黑色素的传递, 还会增加基因上黏着缺陷的黑素细胞外伤性的经表皮丢失^[3]。另外, 细胞外的 Ca^{2+} 对于树突生长和黏着十分重要。线粒体在维系细胞钙稳态方面有重要作用, 它们是 ROS 的主要来源, 也是 ROS 的作用目标。因此, 线粒体结构和功能的状态可能与白癜风的发生有紧密关联。

本研究 0.01 mmol/L 的过氧化氢是人体黑素细胞中氧化应激的诱导物, 发现了氧化应激条件下, 黑素细胞内树突的明显收缩、线粒体结构破坏和功



一定浓度下, 浓度越高, 胞浆内红色荧光强度越强。A: 对照组; B: H_2O_2 组; C-E: 10、50、100 $\mu g/mL$ 羟基积雪草苷组 ($\times 100$)。

Figure 4 Madecassoside induced autophagy activation in H_2O_2 -treated melanocytes



A: 空白组; B: H_2O_2 组; C~E: 10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 羟基积雪草苷组。与空白组相比, $^{\#}P < 0.05$; 与 H_2O_2 组相比, $^{*}P < 0.05$; 与 H_2O_2 组+10 $\mu\text{g/mL}$ 羟基积雪草苷相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 H_2O_2 +50 $\mu\text{g/mL}$ 羟基积雪草苷相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图 5 LC3 的灰度值测量

Figure 5 Western blot analysis of LC3

能紊乱, 包括嵴数量下降、线粒体膨胀和空泡化、膜电位的减少和细胞内钙的积累。据报道, 线粒体 Ca^{2+} 传递的主要机制是通过线粒体 Ca^{2+} 单向传递体, Ca^{2+} 摄取由膜电位驱使^[16]。因此推测, ROS 可能引起线粒体通透性转换孔 (MPTP) 的打开和膜电位的去极化, 接着就是 Ca^{2+} 体内平衡的损坏。树突收缩可能与细胞内钙的大量堆积有关。

然而, 一定浓度过氧化氢对黑素细胞的损伤作用可以用羟基积雪草苷缓解。本研究表明, 羟基积雪草苷显著逆转了膜电位的减少并抑制了氧化应激引发的细胞内钙的积累。另外, 羟基积雪草苷保护线粒体结构免受氧化应激的侵蚀。线粒体膨胀或空泡化几乎没有发现, 透射电子显微镜下可发现大量的正常线粒体。体视学数据显示, 给予过氧化氢的线粒体的 V_v 和 S_v 比空白对照组更高, 随着羟基积雪草苷的浓度增加而数量减少, N_v 的变化与 V_v 和 S_v 的变化正相反。考虑到羟基积雪草苷对黑素细胞树突的保护效果包含的潜在机制可能是它的抗氧化效果, 包括对线粒体膜电位的保护和 Ca^{2+} 体内平衡的恢复。

自噬是一种细胞降解途径, 对细胞生存而言至关重要。作为一种保护机制, 它保护了有机体免受正常和病理学老化, 矫正了机能失调的细胞和蛋白质的代谢。人们认为, 受损或过量的线粒体可能会被自噬所消除, 透射电子显微镜显示, 用羟基积雪草苷治疗的黑素细胞形成了自噬泡。因此预测, 羟基

积雪草苷在抗氧化防御中诱导自噬保护了黑素细胞。为了进一步调查这种可能性, 用荧光显微镜观察, 羟基积雪草苷对于黑素细胞中, AVO 形成的治疗作用。在图 4 中所示, 由羟基积雪草苷治疗的黑素细胞细胞质主要呈现红色荧光, 带有少许绿色荧光, 提示了丰富的 AVO。另外, LC3-II/LC3-I 比值也用蛋白质印迹分析。在自噬期间, LC3(LC3-I) 的胞质形式裂开, 以形成磷脂酰乙醇胺共轭的形式 (LC3-II), 被细胞自噬膜吸收^[17]。自噬体形成的程度可以用 LC3-II/LC3-I 比值或 LC3-II 表达量来测定。免疫印迹结果证实, 与经过过氧化氢处理的黑素细胞相比, 在 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度羟基积雪草苷处理的黑素细胞 LC3-II 的表达量更高, 且 LC3-I 至 LC3-II 的转换更多, 表现出更高的细胞自噬活性。 H_2O_2 组低于空白对照组, 可能与氧化应激导致细胞受损, 自噬活力下降有关。这证明, 自噬存在于羟基积雪草苷处理的氧化应激下的黑素细胞中, 可帮助黑素细胞的修复。

[参考文献]

- [1] Namazi MR. Neurogenic dysregulation, oxidative stress, autoimmunity, and melanocytorrhagy in vitiligo: can they be interconnected[J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(5): 360-363
- [2] Schallreuter KU, Gibbons NC, Zothner C, et al. Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress disrupts calcium binding on calmodulin: more evidence for oxidative stress in vitiligo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 70-75
- [3] Gauthier Y, Cario AM, Taieb A. A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? [J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16(4): 322-332
- [4] Prakash A, Kumar A. Mitoprotective effect of *Centella asiatica* against aluminum-induced neurotoxicity in rats: possible relevance to its anti-oxidant and anti-apoptosis mechanism[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(8): 1403-1409
- [5] Dell'Anna ML, Maresca V, Briganti S, et al. Mitochondrial impairment in peripheral blood mononuclear cells during the active phase of vitiligo[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(4): 908-913
- [6] Guo JS, Cheng CL, Koo MW. Inhibitory effects of *Centella asiatica* water extract and asiaticoside on inducible nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in rats [J]. *Planta Med*, 2004, 70(12): 1150-1154
- [7] Veerendra KM, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative (下转第 606 页)

- during energy deficit[J]. *Obes Rev.* 2012, 13(3): 234–257
- [15] Bremner AP, Feddema P, Leedman PJ, et al. Age-related changes in thyroid function: a longitudinal study of a community-based cohort[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2012, 97(5): 1554–1562
- [16] Surks MI, Boucai L. Age-and race-based serum thyrotropin reference limits[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010, 95(2): 496–502
- [17] Kitahara C M, Platz E A, Ladenson PW, et al. Body fatness and markers of thyroid Function among U.S. men and Women[J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e34979
- [18] Chachamovitz DS, Vigario PS, Silva SO, et al. Does low-normal serum TSH level adversely impact cognition in elderly adults and might methimazole therapy improve outcomes[J]. *Endocr J*, 2016, 63(5): 495–505
- [19] Casas F, Pessemesse L, Grandemange S, et al. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor induces skeletal muscle atrophy during aging[J]. *PLoS One.* 2009, 4(5): e5631
- [20] 董燕, 乔莉, 龚晨, 等. 年龄与老年人低 T3 综合征的相关性[J]. *中国老年学*, 2016, 36(20): 5011–5013
- [21] Liu J, Wu X, Lu F, et al. Low T3 syndrome is a strong predictor of poor outcomes in patients with community-acquired pneumonia[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22271
- [22] Bunevicius A, Iervasi G, Bunevicius R. Neuroprotective actions of thyroid hormones and low-T3 syndrome as a biomarker in acute cerebrovascular disorders [J]. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2015, 15(3): 1–12
- [23] 胡圆圆. 低 T3 综合征研究进展[J]. *临床与病理杂志*. 2015, 35(12): 2160–2164
- [24] Meng Z, Liu M, Zhang Q, et al. Gender and age impacts on the association between thyroid function and metabolic syndrome in Chinese [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(50): e2193
- [25] Leader A, Ayzefeldt RH, Lishner M, et al. Thyrotropin levels within the lower normal range are associated with an increased risk of hip fractures in euthyroid women, but not men, over the age of 65 years[J]. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014, 99(8): 2665–2673
- [26] 孙敏讷, 段宇, Sunminne, 等. 老年亚临床甲状腺功能减退症的诊治特点[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2014, 34(6): 411–414
- [收稿日期] 2017-02-03

(上接第 574 页)

- stress in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79(2): 253–260
- [8] Lin LT, Liu LT, Chiang LC, et al. *In vitro* anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada [J]. *Phytother Res.* 2002, 16(5): 440–444
- [9] Gupta R, Flora SJ. Effect of *Centella asiatica* on arsenic induced oxidative stress and metal distribution in rats[J]. *J Appl Toxicol*, 2006, 26(3): 213–222
- [10] Bylka W, Znajdek-Awizen P, Studzinska-Sroka E, et al. *Centella asiatica* in dermatology: an overview[J]. *Phytother Res.* 2014, 28(8): 1117–1124
- [11] Leng DD, Han WJ, Rui Y, et al. *In vivo* disposition and metabolism of madecassoside, a major bioactive constituent in *Centella asiatica* (L.) Urb[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(2): 601–608
- [12] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720–5728
- [13] Gauthier Y, Cario-Andre M, Lepreux S, et al. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo[J]. *Br J Dermatol*, 2003, 148(1): 95–101
- [14] Kumar R, Parsad D, Kanwar AJ. Role of apoptosis and melanocytorrhagy: a comparative study of melanocyte adhesion in stable and unstable vitiligo[J]. *Br J Dermatol*, 2011, 164(1): 187–191
- [15] Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4): C817–833
- [16] Lopez DFP, Lotz MK, Blanco FJ, et al. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(4): 966–976
- [17] Miracco C, Cevenini G, Franchi A, et al. Beclin 1 and LC3 autophagic gene expression in cutaneous melanocytic lesions[J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(4): 503–512
- [收稿日期] 2017-01-17