

siRNA 抑制 A375 细胞中黑色素形成

窦克军^{1,2*} 孙春宝¹¹ 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083;² 中国科学院生物物理研究所, 系统生物学研究中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 以小干扰 RNA (siRNA) 技术抑制恶性黑素瘤细胞株 A375 的黑素皮质素受体 1 (melanocortin-1-receptor, MC1R)、小眼球相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 基因表达, 从而抑制细胞黑色素的生成。通过 RT-PCR 检测 MC1R、MITF、酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (tyrosinase related protein-1, TRP-1) 基因 mRNA 水平的变化, 通过测定黑色素含量的变化检测蛋白水平的改变。并用台盼蓝活细胞计数法检测其对细胞增殖的影响。经 RT-PCR 检测, 特异性 siRNA 作用的靶基因显著下调, 黑色素含量明显降低。细胞增殖的变化说明, 脂质体包裹的 siRNA 对 A375 细胞的毒性远小于熊果苷等化学合成药物。结果显示, 利用 siRNA 对 A375 细胞中靶基因的调控, 有效的抑制了黑色素的生成, siRNA 技术与传统的调控黑色素的方法 (化学合成物——褪色素) 比较, 具有用量小、抑制效率高、细胞毒性低等优点。同时, 为进一步研究黑色素形成通路中各基因之间的关系提供了新思路。

关键词 小干扰 RNA; 黑色素; 黑素皮质素受体 1 基因; 小眼球相关转录因子基因; 酪氨酸酶

黑素细胞是皮肤的重要组成部分之一, 起源于胚胎神经嵴, 具有树状突起, 属于腺细胞, 合成的黑素经由树状突起分泌进入角质形成细胞, 随角质形成细胞的脱落而排出体外, 存在于表皮基底层。黑素细胞通过合成黑素形成皮肤颜色, 同时可吸收紫外线, 使机体免遭紫外线的损害。哺乳动物皮肤和毛发的颜色主要是由黑素细胞产生的黑色素的相对数量和分布情况决定的^[1]。黑色素又分为真黑色素 (eumelanin) (棕与黑) 与伪黑色素 (phaeomelanin) (红与黄)^[2]。黑素细胞的发育、分化与黑素的合成调节是一个复杂的过程, 其中有多种信号分子参与该过程的调控, 构成复杂的信号网络。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是将与 mRNA 序列相对应的有义和反义 RNA 组成的双链 RNA 导入细胞, 使 mRNA 降解和基因沉默^[3], 小干扰 RNA (siRNA) 是 RNAi 的效应分子, 由两条互补的 RNA 单链构成, 长 21~23 个核苷酸 (nt)。本研究针对黑色素形成调控中的黑素皮质素受体 1 (melanocortin-1-receptor, MC1R) 基因和小眼球相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 基因设计 siRNA, 通过 RNAi 调节抑制 MC1R、MITF 基因及其调控的下游酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 基因和酪氨酸酶相关蛋白 1 (tyrosinase related protein-1, TRP-1) 基因^[4], 从而调控黑色素的生成, 对黑色素形成过程中, 靶基因间的相互关系及下游相关基因间

的联系进行了探讨, 同时, 通过 siRNA 和退色剂曲酸、熊果苷对黑色素的抑制作用, 从不同机制对色素调控的效果进行了分析比较。

1 材料与方法

1.1 材料

皮肤恶性黑素瘤细胞株 A375 购自中国协和医科大学基础医学院细胞中心, DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, 脂质体 (Lipofectamine™ 2000)、Trizol 购自 Invitrogen 公司, DNA marker、Taq 酶购自 TaKaRa 公司, 逆转录酶、Oligo(dT)15 Primer 购自 Promega 公司, DMSO、黑色素标准品购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的设计与合成 siRNA 双链设计时, 一般在靶 mRNA 起始密码下游 100~200 bp 至翻译终止密码上游 50~100 bp 的范围内搜寻 AA 序列, 并记录每个 AA 3' 端相邻 19 个核苷酸作为候选 siRNA 靶位点。其中 AA (N19) TT 是最理想的序列, 若靶 mRNA 中无此序列, 亦可选用 NA (N21) 或 NAR (N17) YNN (R 表示嘌呤, Y 表示嘧啶), 但在合成时, siRNA

收稿日期: 2006-12-13 接受日期: 2007-04-23

中科院百人计划、国家自然科学基金 (No.30671042) 和国家高技术
研究发展计划 (863 计划) (No.2002BA711A01-22) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 13810654997, E-mail: dkj81@126.com

的有义链 3' 端需用 dTdT 代替^[5]。最后将候选 siRNA 序列在 GenBank 进行 BLAST 检索, 与非同源基因具有 3 个或 3 个以上碱基相异的序列均可选用^[6]。MC1R-siRNA 有义链 5'-CCAAGAACCGGAACCGGATT-3', 反义链 5'-UGCAGGUUCCGGUUCUUGGTT-3'。MITF-siRNA 有义链 5'-GCAGUACCUUUCUACCUGUTT-3', 反义链 5'-TTCGUCAUGGAAAGAUGGUGA-3'。Mock-siRNA 即阴性对照的 siRNA, 与选中的 siRNA 序列有相同碱基组成, 但与靶 mRNA 无明显同源性。将特异性 siRNA 的序列打乱, 即零乱 siRNA(scrambled siRNA), 再对其进行 BLAST 比对, 防止与目的靶细胞中的其他基因有同源性。

化学修饰的 siRNA* 主要是对核苷酸戊糖 2'-羟基(2'-OH)的修饰。2'-OH 是 RNA 与 DNA 的主要区别, RNA 水解时, 在 RNA 酶催化下, 2'-OH 首先进攻磷酸, 在断开磷酸酯键的同时形成环状磷酸二酯, 再在碱的作用下形成水解产物。在核糖的 2' 位置引入甲基, 使 siRNA 具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。siRNA oligo 由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2.2 siRNA 的效应 将 siRNA 转染至 A375 细胞内, 在核酸酶 Dicer 作用下降解成 19~21 bp 的具有 3' 突出 2 bp 的双链 siRNA^[7]。导入的双链 siRNA 与核酸酶结合形成 RNA 介导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 后者在 ATP 参与下被激活, 激活的 RISC 通过碱基配对定向于同源转录产物 mRNA 并将之切割成 12 bp 的核苷酸片段^[8], 从而在 RNA 水平上抑制靶基因的表达。

1.2.3 细胞培养及转染 人恶性黑色素瘤细胞 A375 用含 10% 胎牛血清, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM 培养基, 置于 37 °C, 5 %CO₂ 培养箱中培养, 3~4 天传代一次。将生长良好的 A375 恶性黑色素瘤细胞以 1.5 × 10⁵ 个/ml 的浓度, 以每孔 2 ml 的接种量接种于 6 孔板上, 将 siRNA 转染至 A375 细胞中, 以脂质体为转染介质, 按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染。化学修饰的 siRNA* 则直接转入 A375 细胞内。转染后 6 h 更换含血清培养基继续培养。

1.2.4 RT-PCR 检测 提取总 RNA 按 Promega 公司 RNA 提取试剂盒说明书操作, RT 反应合成 cDNA 和 PCR 扩增方法按照 Promega 公司 RT-PCR 说明书操作。以 β 肌动蛋白为阳性对照(内参), 各组引物序列如下: β 肌动蛋白上游引物: 5'-TGCTGATGGACTCCGGTGAC-3', 下游引物: 5'-CGCCAGACAGCACT-

GTGTTG-3', 扩增片段长度为 454 bp。MC1R 上游引物: 5'-TGGTGAGCTTGGTGGAGAA-3', 下游引物: 5'-TGGTCGTAGTAGGCGATGAA-3', 扩增片段长度为 406 bp。MITF 上游引物: 5'-CGGGTCTCTGCTCTCCAGA-3', 下游引物: 5'-CCGGCTGCTTGTTTGGAA-3', 扩增片段长度为 311 bp。TYR 上游引物: 5'-TTTGTACTGCCTGCTGTGGA-3', 下游引物: 5'-TGTGCAGTTTGGTCCCCAA-3', 扩增片段长度为 313 bp。TRP-1 上游引物: 5'-GGCGTGATCTTCTTCCCCTT-3', 下游引物: 5'-CAGACCTCCCGATCATCTCT-3', 扩增片段长度 242 bp。PCR 反应共进行 30 个循环。产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 黑色素含量的测定 参照 Ando 等^[9]提出的方法, 经改进后进行黑色素含量测定。A375 恶性黑色素瘤细胞转染 72 h 后, 经 PBS 洗涤两次, 每孔加入 1 ml 0.25% 胰蛋白酶(6 孔板)消化, 再加 1 ml 完全培养基终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 每孔加 1 ml PBS, 将细胞吹散, 血球计数板计数, 再离心 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 样品经空气干燥, 每 10⁶ 个细胞溶于 500 μl 1 mol/L 含 1% DMSO 的 NaOH 溶液。经加热 80 °C 至 1 h 后冷却, 选择 475 nm 波长在分光光度计上读取吸光度值 A。

1.2.6 细胞毒性检测 将生长状态良好的 A375 恶性黑色素瘤细胞的浓度调整至 10⁵ 个/ml, 以每孔 0.5 ml 的接种量接种于 24 孔培养板上。种板 24 h 后进行转染, 共分 6 个实验组, 每组设 3 个复孔, 实验组分别为空白对照(Control)、阴性对照(Mock)-siRNA、MC1R-siRNA、MITF-siRNA、β 熊果苷、α 熊果苷, 每 24 h 转染一次, 连续转染 3 次。每次转染 24 h 后用 0.4% 的台盼蓝染色, 显微镜镜下计数活细胞数, 每孔计数 3 次。

1.2.7 统计学分析 每组实验均重复 3 次, 实验数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$), 各组间指标比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 通过 siRNA 调控 MC1R 和 MITF 的表达

RT-PCR 检测(图 1A 和图 1C)显示, 在 A375 细胞中通过相应的 siRNA 转染 24 h 后靶 mRNA 水平有不同程度的下调, 而阴性对照(Mock)-siRNA 对这些靶 mRNA 没有作用。定量分析(图 1B 和图 1D)也同样显示 siRNA 的转染使得 MC1R 和 MITF 基因相应的 mRNA 在剂量上的减少。RT-PCR 分析显示(图 2A 和

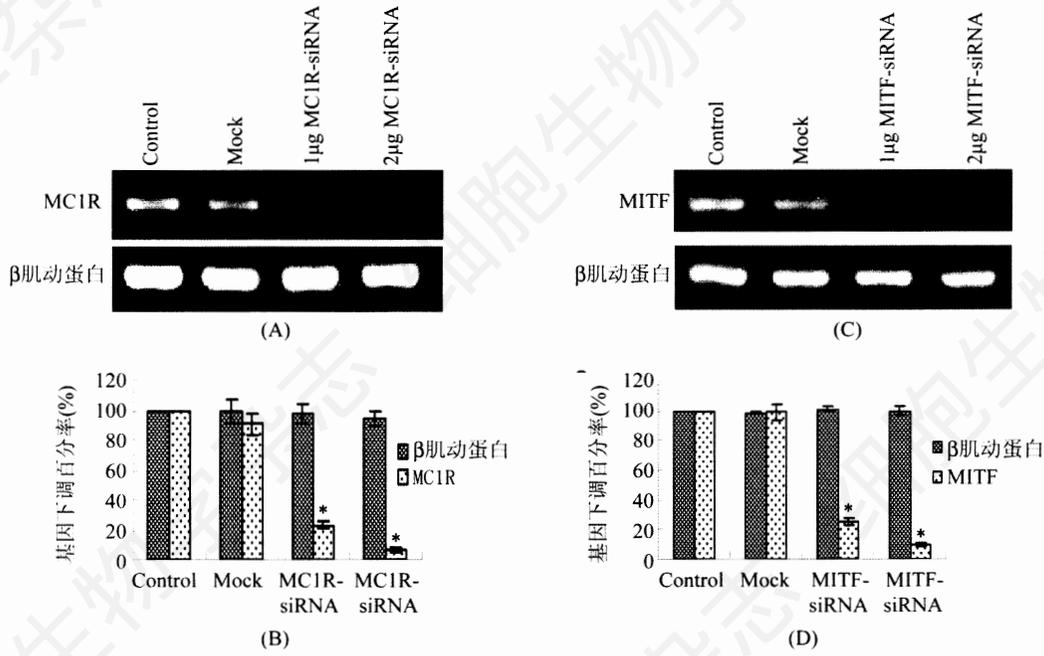


图1 不同剂量 siRNA 转染 A375 细胞对靶基因的影响

(A)从起4组依次为空白对照(Control)、2 μg/孔(6孔板)阴性对照(Mock)-siRNA、1 μg/孔和2 μg/孔 MC1R-siRNA 转染至 A375 细胞内,再经过 RT-PCR 后,对 MC1R 基因表达的比较,图1(B)是与图1(A)对应的定量分析;图1(C)从左起4组依次为空白对照、2 μg/孔阴性对照-siRNA、1 μg/孔和2 μg/孔 MITF-siRNA 转染至 A375 细胞内,再经过 RT-PCR 后,对 MITF 基因表达的比较,图1(D)是与图1(C)对应的定量分析。(B)、(D)中的横坐标为实验对照组,纵坐标为 siRNA 各自靶基因相对内参的下调百分率。与空白对照相比, *P<0.05。

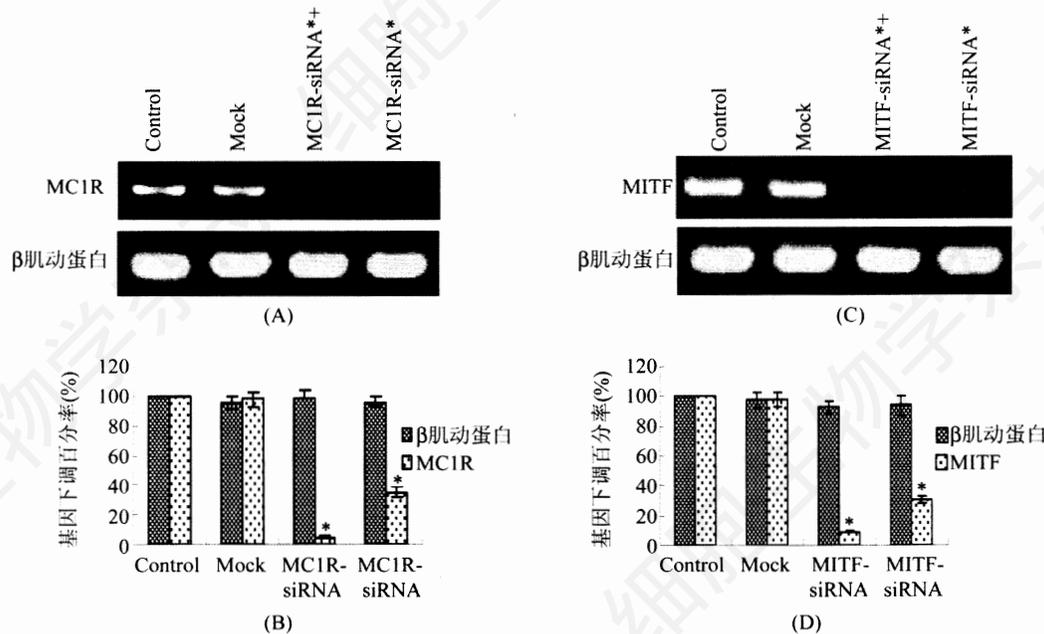


图2 siRNA* 通过不同转染方式对靶基因表达的影响

(A)、(C)中,“MC1R(MITF)-siRNA*”表示经化学修饰的 siRNA,“+”表示通过脂质体转染。(A)从左起4组依次为空白对照(Control)、2 μg/孔(6孔板)阴性对照(Mock)-siRNA、2 μg/孔 MC1R-siRNA* 通过脂质体转染至 A375 细胞和 2 μg/孔 MC1R-siRNA* 直接转染至 A375 细胞内,再经过 RT-PCR 后,对 MC1R 基因表达效果的比较,(B)是与(A)对应的定量分析;(C)从左起依次为空白对照、2 μg/孔阴性对照-siRNA、2 μg/孔 MITF-siRNA* 通过脂质体转染至 A375 细胞和 2 μg/孔 MITF-siRNA* 直接转染至 A375 细胞内,再经过 RT-PCR 后,对 MITF 基因表达效果的比较,(D)是与(C)对应的定量分析。(B)、(D)中的横坐标为实验对照组,纵坐标为 siRNA* 各自靶基因相对内参的下调百分率。与空白对照相比, *P<0.05。

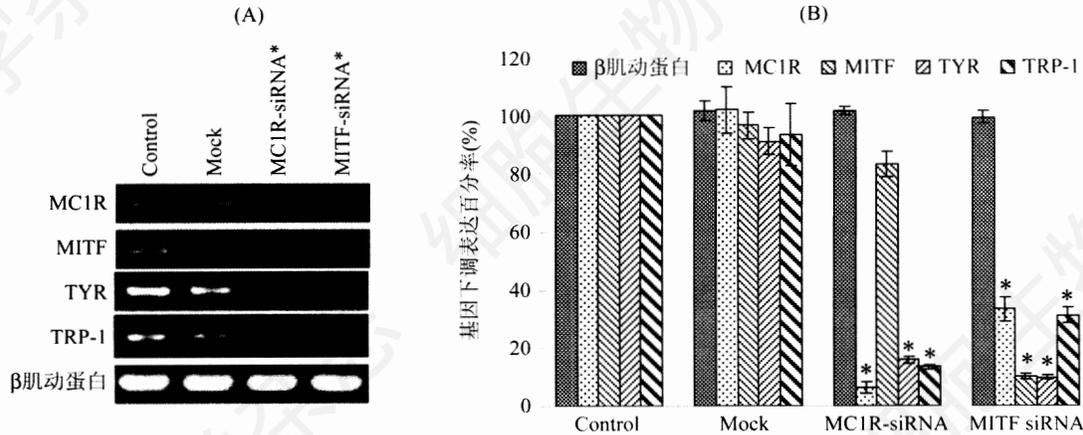


图3 siRNA对靶基因及下游基因的作用

(A) siRNA对靶基因及下游基因的mRNA水平调控; (B) 5组基因mRNA表达量定量分析对照。图3(A)5组扩增基因分别为MC1R、MITF、TYR、TRP-1和β肌动蛋白。每组从左往右分别为空白对照(Control)、阴性对照(Mock)、MC1R-siRNA*和MITF-siRNA*共4个实验组。图3(B)为5组基因mRNA表达量在4个实验组中的定量分析对照。与空白对照相比, * $P < 0.05$ 。

表1 褪色剂下调黑色素浓度数据

分组	A_{475}	浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	下调百分率(%)
空白对照	0.251±0.024	18.19±1.43	0
阴性对照-siRNA	0.249±0.030	18.04±2.19	0.82
MC1R-siRNA	0.177±0.018	12.81±1.07*	29.6
MITF-siRNA	0.185±0.032	13.94±2.32*	23.4
MC1R-siRNA*	0.139±0.038	10.04±2.76*	44.8
MITF-siRNA*	0.144±0.042	10.40±3.04*	42.6
曲酸	0.236±0.026	17.12±1.89	5.9
β熊果苷	0.221±0.025	16.57±1.81*	18.9
α熊果苷	0.176±0.040	12.74±2.92*	30.0
MC1R-siRNA*+	0.204±0.037	14.83±2.70*	18.5
MITF-siRNA*			
MITF-siRNA+曲酸	0.184±0.021	13.32±1.39*	26.8
MITF-siRNA+β熊果苷	0.177±0.031	12.89±2.28*	29.1

与空白对照比较, * $P < 0.05$ 。

图2C), 化学修饰的MC1R-siR*和MITF-siR*, 分别在脂质体Lipofectamine 2000包裹和没有脂质体包裹两种条件下, 以2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 转染至A375细胞, 能够有效抑制相应的mRNA的表达。实验数据显示MITF-siR与mock-siRNA转染相比, MITF mRNA的表达降至12% ($P < 0.05$)(图3B)。另外, 与空白对照和阴性对照相比, 通过MITF-siR转染同样使MC1R、TYR和TRP-1的表达量减少(图3A和图3B)。但是内参β肌动蛋白的表达没有变化。

2.2 在黑色素合成中褪色剂的作用效果

MITF-siRNA、MC1R-siRNA、MITF-siRNA*和MC1R-siRNA*在2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ (6孔板)的浓度下连续作用3天。定量分析结果显示(表1), 4种siRNA能够有效的抑制黑色素的生成。A375细胞分别在含有2

mg/孔曲酸、2 mg/孔β熊果苷和2 mg/孔α熊果苷的DMEM中培养3天。通过曲酸、β熊果苷和α熊果苷作用黑色素的合成也受到一定的抑制, 其中α熊果苷作用的实验组比未经处理的细胞的黑色素含量有明显减少。此外, 将siRNA和曲酸、熊果苷依次组合作用于A375细胞, 分别为2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ MC1R-siRNA和2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ MITF-siRNA, 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ MITF-siRNA和2 mg/孔曲酸, 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ MITF-siRNA和2 mg/孔β熊果苷组合连续作用3天。结果发现, 在3组混合实验组中没有产生组合的相互协同作用。由表1数据可以看出, α-熊果苷、MITF-siRNA和MC1R-siRNA的抑制效果比曲酸和β熊果苷的好。

2.3 褪色剂作用时间的变化对黑色素下调效果的影响

图4结果显示, 随着siRNA和熊果苷转染时间和转染次数的增加, A375细胞中 10^6 个细胞, 空白对照和阴性对照中黑色素浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)基本没有变化。对照组与转染组相比, 转染组的黑色素浓度随着转染天数和转染次数的增加, 逐渐降低。其中, MC1R-siRNA转染组的黑色素浓度下降最为显著($P < 0.05$), 其次是MITF-siRNA组的黑色素浓度的下降也较为明显, β熊果苷、α熊果苷两组黑色素浓度下调均不如前两组效果显著, β熊果苷组黑色素浓度下调不明显。

2.4 细胞毒性比较

用台盼蓝法测定A375细胞的活细胞数, 连续转染3次, 随着连续转染A375细胞的生长变化如表2所示。由表2可以看出, MC1R-siRNA转染组与对照

表 2 siRNA 和褪色剂作用对 A375 细胞生长变化比较($\times 10^4$ 细胞/天)

接种时间(天)	Control	Mock	MC1R-siRNA	MITF-siRNA	β 熊果苷	α 熊果苷
0	5	5	5	5	5	5
1	8.1 \pm 0.79	8 \pm 0.88	8 \pm 0.61	7.7 \pm 0.66	7.8 \pm 0.76	7.6 \pm 0.6
2	15.5 \pm 1.5	15.8 \pm 0.94	15.2 \pm 0.95	15.2 \pm 1.17	10.8 \pm 1.06*	14.6 \pm 0.91
3	45.2 \pm 1.65	44.6 \pm 1.63	43.8 \pm 1.04	37.6 \pm 0.53*	9.6 \pm 1.31**	13.3 \pm 0.85**
4	53.9 \pm 1.1	53.5 \pm 1.41	52.7 \pm 1.04	34.3 \pm 2.31*	2.4 \pm 0.81**	5.9 \pm 0.9**

siRNA 和熊果苷从转染前到完成连续 3 次转染后, 每天 A375 细胞的活细胞数的生长变化。第一行数据表示接种的活细胞数, 第二行数据表示转染前的活细胞数, 第三行数据表示第一次转染 24 h 后的活细胞数, 以此类推。按照接种时间, 同行间与空白对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

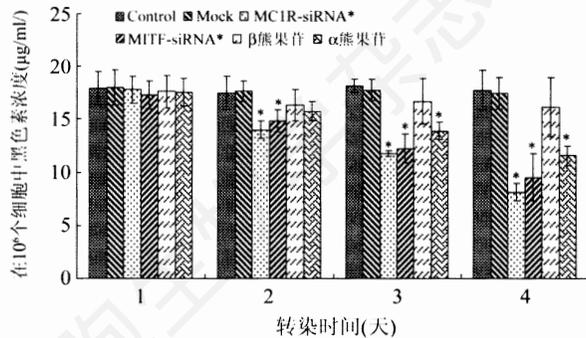


图 4 转染 siRNA 和熊果苷后, A375 细胞的黑色素浓度变化
阴性对照 -siRNA、MC1R-siRNA 和 MITF-siRNA 分别以 2 μ g/孔 (6 孔板) 转染至 A375 细胞, β 熊果苷和 α 熊果苷分别以 2 mg/孔转染至 A375 细胞, 每 24 h 转染 1 次, 连续转染 3 次。每次转染 24 h 后测量黑色素浓度。横坐标为 1 的上方的六个柱形图表示转染前第一天, 各实验组的 A375 细胞中的黑色素浓度, 横坐标为 2 的上方的 6 个柱形图表示第一次转染 24 h 后, 即转染第二天各实验组的黑色素浓度变化。以此类推, 表示从转染前到连续 3 次转染后, A375 细胞中的黑色素浓度每天的变化情况。与每天的空白对照比较, * $P < 0.05$ 。

组比较, 活细胞数几乎没有变化, MITF-siRNA 作用至第三天, 活细胞数开始明显减少($P < 0.05$)。 β 熊果苷、 α 熊果苷两组与对照组相比, 活细胞数明显减少($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究以调控黑色素形成过程中的关键基因 MC1R^[10]和 MITF^[11]为靶基因, 利用特异性的 siRNA 抑制 MC1R 和 MITF 基因的表达及其调控的下游基因 TYR 和 TRP-1 的表达, 从而调控黑色素的生成, 明确上述几个与黑色素形成密切相关的基因间的相互关系。

研究结果显示, 经 RT-PCR、黑色素含量测定及细胞毒性检测等方法验证, MC1R、MITF、TYR 和 TRP-1 的 mRNA 表达水平在 MC1R 和 MITF 特异性 siRNA 转染组细胞内均显著降低, 而在无关载体对照组内仍正常表达。说明 MITF-siRNA 是针对

MITF mRNA 的特异性序列, MC1R、TYR 和 TRP1 都是 MITF 的靶基因, 因而这些靶基因的转录水平受 MITF 的调控。以上结果同 MITF 基因的相关报道是一致的, 但 MITF 不仅与黑色素合成酶的转录有关, 可能对于黑素细胞功能有关的 MC1R 的启动子有关。

据多种研究表明, MC1R 的表达是可诱导的。分析人的 MC1R 启动子的核苷酸序列发现 Ebox (CANNTG) 直接出现在转录起始位点的上游。GATGTG 序列说明 MC1R 基因的表达可以通过 bHLH-LZ 型转录因子调控。MITF 则是 bHLH-LZ 型家族中的一员, 调控与黑素生成密切相关的 TYR 和 TRP-1 基因。我们的研究结果确认, MITF 同样可以调节在黑色素功能方面起重要作用的 MC1R 基因的表达, 而 MC1R 基因对 MITF 基因几乎没有作用, 由此推测这两个基因间可能存在一种相互作用或协作机制, 为进一步探索细胞黑色素的形成机制提出新的研究方向。同时, 本研究通过转染不同剂量的 siRNA 和按不同方式转染化学修饰的 siRNA*, 证明经过化学修饰的 siRNA 经脂质体转染至 A375 细胞的转染效率和转染效果是最佳的。用化学方法修饰的 siRNA 对黑色素合成的抑制作用比未修饰的 siRNA 的作用更为有效, 可能是由于这种化学修饰的 siRNA 具有更高的稳定性并能保持较长时间活性。

我们又通过 siRNA 和化学药物(熊果苷)对黑色素的抑制作用, 从不同机制对色素调控的效果进行了比较分析。

熊果苷^[12]通过抑制黑素细胞中 TYR 活性, 或通过目前尚不了解的途径抑制黑素的合成, 从而达到美白的目的。目前国内尚缺少有关美白化学物对皮肤黑素细胞功效进行全面评价的研究报道, 但是在美白化妆品消费者中已有发生副作用的报道^[13]。为此我们对常用皮肤美白化学物熊果苷, 以与正常皮肤黑素细胞生理功能近似的 A375 黑素瘤细胞株作为受试细胞, 进行细胞增殖和黑素合成的研究。实验结果显

示, α 熊果苷抑制黑色素的效果要优于 β 熊果苷和曲酸, 但这些化学合成的褪色剂对细胞毒性很高, 作为美白剂使用, 安全性有待进一步提高。

特异性 siRNA 通过对 MC1R 和 MITF 基因的抑制, 使 TYR 的表达下调, 减少了多巴胺的合成, 从而使黑色素的生成下降。熊果苷主要通过抑制皮肤中的 TYR 活性, 阻断黑色素的生成。本实验通过对特异性 siRNA 和 β 熊果苷、 α 熊果苷抑制 A375 细胞黑色素的抑制效果的比较, 分别从抑制 TYR 的表达量和抑制 TYR 的活性两个途径来下调黑色素, 进一步证明 siRNA 对 A375 细胞黑色素的下调最为显著, 且对细胞的毒性影响不明显。而熊果苷对 A375 细胞黑色素的下调没有 RNAi 作用明显, 它可使培养细胞数量明显减少, 细胞增殖抑制率明显升高, 并呈现时

间 - 剂量 - 效应关系, 表明熊果苷可破坏黑素细胞的增殖功能, 抑制细胞的生长, 而且熊果苷具有显著的细胞毒性。

参考文献(References)

- [1] Sturm RA *et al. Bioessays*, 1998, **20**: 712
- [2] Newton JM *et al. Mamma Genome*, 2000, **11**: 24
- [3] Kasschau KD *et al. Cell*, 1998, **95**: 461
- [4] Buscà B *et al. J Cell Biol*, 2005, 49
- [5] Elbashir SM *et al. Methods*, 2002, **26**: 199
- [6] Semizarov D *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6347
- [7] Bernstein E *et al. Nature*, 2001, **409**: 363
- [8] Nykanen A *et al. Cell*, 2001, **107**: 309
- [9] Ando H *et al. J Cell Physiol*, 1995, **163**: 608
- [10] Aoki H *et al. Life Sci*, 2002, **71**: 2171
- [11] Goding CR. *Genes Dev*, 2000, **14**: 1712
- [12] Chakraborty AK *et al. Pigment Cell Res*, 1998, **11**: 206
- [13] al-Saleh I *et al. J Toxicol Environ Health*, 1997, **51**: 123

Suppression of Melanin Formation of A375 Cells by Small Interfering RNA

Ke-Jun Dou^{1,2*}, Chun-Bao Sun¹

¹Civil & Environment Engineering School, University of Science & Technology Beijing, Beijing 100083, China;

²Systems Biology Research Center, State Key Laboratory of Biological Macromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract RNA interference technique to the study of melanocortin-1-receptor gene (MC1R) and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression in human malignant melanoma cell line A375, there by inhibiting the production of melanin. The change in MC1R, MITF, tyrosinase (TYR) and tyrosinase related protein-1 (TRP-1) mRNA level is detected by RT-PCR. The change of protein level is detected by measuring melanin content. The effect for cell proliferation is detected by using trypanblue exclusion. RT-PCR detects target genes that observably decrease with the effect by specificity small interfering RNA (siRNA) and with the obviously decrease in Melanin content, which informs us that the cytotoxicity of siRNA encapsulated by liposome toward A375 is far less than arbutin and other synthetic drugs. The control in melanoma cells by using siRNA inhibits effectively the production of melanin. Compared with the traditional method (chemical compounds—fading agent) of control melanin, it has the advantage in small amount, high inhibition efficiency, low cytotoxicity, and so forth. Meanwhile, the pathway for further study of melanin formation of the inter-relationship between the key gene has opened up a new path.

Key words small interfering RNA; melanin; melanocortin-1-receptor; microphthalmia-associated transcription factor; tyrosinase

Received: December 13, 2006 Accepted: April 23, 2007

This work was supported by the Foundation of "Bairen Jihua" of Chinese Academy of Sciences, the National Natural Science Foundation of China (No.30671042) and the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002BA711A01-22)

*Corresponding author. Tel: 13810654997, E-mail: dkj81@126.com