

# 金线莲抑制斑马鱼黑色素形成的活性组分筛选及机理研究

许璟瑾<sup>1</sup>, 张文娟<sup>1</sup>, 王静怡<sup>1</sup>, 姚丽云<sup>1</sup>, 潘裕添<sup>1</sup>, 欧一新<sup>1,2</sup>, 薛钰<sup>1,3</sup>

1. 闽南师范大学, 福建省菌类活性物质工程技术研究中心, 漳州 363000;

2. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240;

3. 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101

**摘要:** 为探索金线莲中对黑色素形成具有抑制效果的活性组分, 本研究对金线莲进行分离、提取, 获得总提组、醇沉组与醇提组, 利用斑马鱼筛选金线莲具有美白作用的活性组分。将受精后 0.75 h 的斑马鱼胚胎分别暴露于不同浓度的金线莲总提组、醇沉组、醇提组, 72 h 时观察结果表明, 金线莲醇提物能有效抑制斑马鱼胚胎黑色素和黄色素沉着, 浓度越高抑制效果越明显, 且不影响胚胎生长发育。进一步采用半定量 PCR 和整胚原位杂交技术定量和定性检测黑色素形成相关基因 mRNA 表达, 结果表明金线莲醇提物可以有效降低 *slv*、*tyr* 和 *tyrp1a* 等黑色素合成相关基因的转录水平, 且具有浓度依赖关系。通过检测酪氨酸酶活性显示, 加入醇提物的实验组其酪氨酸酶活性随着处理浓度升高而逐渐降低。此外, 在黑色素已经大量形成的情况下, 金线莲醇提物仍可通过下调黑色素合成相关基因的 mRNA 表达及酪氨酸酶活性来抑制黑色素的形成, 并且这种抑制效果可在金线莲醇提物撤除后得到恢复。上述实验结果表明, 金线莲醇提物能显著抑制斑马鱼黑色素的形成, 本文为金线莲在美白产品领域的开发和应用方面提供了有力支撑。

**关键词:** 斑马鱼; 金线莲醇提物; 黑色素; 基因表达; 酪氨酸酶

## The active component screening of *Anoectochilus roxburghii* and the functional study on inhibition of melanogenesis in zebrafish

Jingjin Xu<sup>1</sup>, Wenjuan Zhang<sup>1</sup>, Jingyi Wang<sup>1</sup>, Liyun Yao<sup>1</sup>, Yutian Pan<sup>1</sup>, Yixin Ou<sup>1,2</sup>, Yu Xue<sup>1,3</sup>

1. Fujian Engineering Technology Research Center of Mushroom Industry, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China;

2. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

3. State Key Laboratory of Membrane Biology, Beijing 100101, China

**Abstract:** The aim of this study is to explore the active components of *Anoectochilus roxburghii* capable of inhibiting

收稿日期: 2017-05-15; 修回日期: 2017-08-02

基金项目: 福建省自然科学基金项目(编号: 2015J05070), 福建省教育厅科技项目(编号: JK2015028)和闽南师范大学杰出青年科研人才计划(编号: MJ14007)资助[Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province(No. 2015J05070), the Education Scientific Research Project of Fujian Province (No. JK2015028) and Outstanding Youth Research Personnel Training Program of Minnan Normal University (No. MJ14007)]

作者简介: 许璟瑾, 在读硕士研究生, 专业方向: 化学生物学。E-mail: 13123352787@163.com

通讯作者: 薛钰, 博士, 讲师, 研究方向: 细胞与发育生物学。E-mail: xueyu0614@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.17-178

网络出版时间: 2017/11/2 17:02:56

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20171102.1702.006.html>

melanin formation using chemical separation and extraction and functional analysis. *Anoectochilus roxburghii* were extracted with alcohol and separated into three groups: the total extraction group, alcohol extracted group and alcohol precipitated group. Zebrafish embryos at 0.75 h post-fertilization were exposed to various concentrations of the three groups of extracts, and analyzed at 72 h, using semi-quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization. The results showed that the alcohol extracts inhibit melanogenesis most significantly in the zebrafish embryos. The mRNAs of melanin-related genes, such as *silv*, *tyr*, *tyrp1a*, were down-regulated by the alcohol extracts spatially and temporally. The alcohol extracts also inhibited the activity of tyrosinase, a key enzyme in melanogenesis, in a dosage dependent manner. In addition, the alcohol extracts also display a remarkable inhibitory effect on melanin synthesis through down-regulation of mRNAs of melanin-related genes and tyrosinase activity in zebrafish embryos, in which a large amount of melanin has already been synthesized. Such inhibitory effect could be reversed after the withdrawal of the alcohol extracts. Our results showed that the alcohol extracts of *Anoectochilus roxburghii* can significantly inhibit zebrafish melanogenesis, supporting the notion that *Anoectochilus roxburghii* could potentially be used in the development and production of natural whitening products.

**Keywords:** zebrafish; *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts; melanin; gene expression; tyrosinase

金线莲(*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) 又名金线兰、花叶开唇兰, 是兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoectochilus*)多年生珍稀药用植物<sup>[1]</sup>。金线莲的主要产地集中在福建和台湾, 享有“药王”、“金草”等美称。在民间, 金线莲对于肝炎、肾炎、肺炎、糖尿病、风湿病、小儿惊厥、毒蛇咬伤等病症有很好的治疗效果<sup>[2]</sup>。本研究在实验过程中发现, 金线莲水提物能使斑马鱼胚胎黑色素合成减少, 暗示其可能在黑色素形成过程中具有抑制作用。鉴于金线莲在美白功效方面的研究较少且作用方式尚不明确, 本研究以斑马鱼(*Danio rerio*)为模型筛选金线莲具有美白效果的活性组分并进行初步的机理研究。

目前, 对于美白活性物质的研究大多是以豚鼠(*Cavia porcellus*)皮肤或者小鼠(*Mus musculus*)黑色素瘤细胞作为模型, 但这些模型存在耗时长、成本高、操作复杂等缺点<sup>[3]</sup>。斑马鱼与人类基因相似度高达 87%, 并且胚胎具有光学通透性, 可以清楚地观察到体内黑色素沉着, 是研究黑色素化合物活性的优良模型<sup>[4-6]</sup>。

斑马鱼在发育初期全身透明, 胚胎发育至 24 h 时黑色素开始从视网膜上皮生长<sup>[7]</sup>。色素细胞起源于背部外胚层分化的一群细胞——神经嵴细胞, 然后增殖、迁徙、分化成色素母细胞<sup>[8]</sup>。整个黑色素的合成过程主要涉及小眼畸形转录因子(microphthalmia transcription factor, *Mitfa*)、酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)、多巴色素互变酶(dopachrome tautomerase, Dct)、酪氨酸酶相关蛋白 1(tyrosinase-related protein 1, *Tyrp1*)、银色毛发(premelanosome protein, *Silv*)和

眼皮肤白化病 II 型(oculocutaneous albinism II, *Oca2*)等多个关键因子<sup>[9,10]</sup>。*Mitfa* 调控酪氨酸基因家族的表达, 其编码的碱性螺旋环螺旋亮氨酸拉链转录因子对黑色素细胞的发育、分化具有核心的调控作用<sup>[11-14]</sup>。*tyr* 基因编码的 TYR 是黑色素形成过程中的主要限速酶, 催化黑色素合成途径中两个起始步骤, 即酪氨酸羟基化成 3,4-二羟基苯丙氨酸(3,4-Dihydroxyphenyl L-Alanine, DOPA)和 DOPA 氧化成多巴醌(dopaquinone, DQ)。多巴醌经过多聚化反应生成无色多巴色素<sup>[15,16]</sup>, 无色多巴色素极不稳定, 迅速氧化成多巴色素。多巴色素既可以在多巴色素互变酶(Dct)作用下羟化为 5,6-二羟基吲哚酸(5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHICA), 也可以脱羧为 5,6-二羟基吲哚(5,6-Dihydroxyindole, DHI)。DHICA 在酪氨酸酶相关蛋白 1 (TYRP1)及 TYR 作用下生成 5,6-吲哚羧酸, 然后在银色毛发(*Silv*)作用下生成黑色素。而 DHI 则经由 TYR 催化氧化成 5,6-吲哚醌, 最后生成黑色素。*Oca2* 在黑色素常染色体的转运中具有重要作用<sup>[17]</sup>。

随着环境污染越来越严重, 导致臭氧层遭到破坏, 紫外线到达地面的量增多, 使得体表黑色素过多地沉积。虽然黑色素能降低紫外线对皮肤的伤害<sup>[18]</sup>, 但是过多的色素沉积不仅影响美观, 而且会引起雀斑、黑斑病, 严重影响人们的生活质量。目前市面上的许多化妆品由于添加化学成分及重金属, 虽美白效果显著, 但却存在潜在的不可逆的损伤风险, 危害到人体健康。人们更青睐于健康的、对人体无害的纯天然植物活性成分。中草药因其药效温和、

不良反应小而得到大家的一致认可,而金线莲是福建地区著名的药用植物,因此,本研究通过筛选对黑色素形成具有抑制作用的金线莲活性组分以及初步的机理研究,可为金线莲在开发新型、天然美白护肤产品方面提供实验思路和证据,具有重要的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

福建金线莲由闽南师范大学菌物产业工程技术中心提供。

斑马鱼为 TU 品系,28℃淡水中饲养,采用 14 h 光照/10 h 黑暗的光照周期,水循环系统的 pH 值保持在 6.9~7.5,每日喂 3 次丰年虾。

实验前一日,挑选发育正常,达到性成熟的斑马鱼放置于配鱼缸中,将雌雄鱼用隔板分开,于次日上午 8:30 抽离中间隔板,30 min 后收集受精卵于含有 Holfreter 水(0.05 g/L KCl、0.1 g/L CaCl<sub>2</sub>、0.025 g/L NaHCO<sub>3</sub>、3.5 g/L NaCl)的培养皿中,28℃恒温培养。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 金线莲组分的分离与提取

准确称量 1 kg 新鲜的金线莲全草,按料液比 1:4 加入蒸馏水,粉碎,80℃水浴搅拌提取。离心收集上清,沉淀物重复提取一次,把两次上清合并后用旋转蒸发器蒸发浓缩至一定体积,一部分用真空冻干机冻干,获得组分一——金线莲总提物。另一部分加入 4 倍于浓缩体积的无水乙醇,于 4℃冰箱沉淀过夜。醇溶物蒸发浓缩至一定体积用真空冻干机冻干,获得组分二——金线莲醇提物。醇沉物加入蒸馏水溶解,旋转蒸发器蒸发浓缩至一定体积后用真空冻干机冻干,获得组分三——金线莲醇沉物。

#### 1.2.2 金线莲在斑马鱼中具有抑制黑色素功效的活性组分筛选

药物浓度的确定:为了探索金线莲各组分(金线莲总提物、金线莲醇沉物、金线莲醇提物)对斑马鱼胚胎作用的最佳浓度,以 6 孔板为实验容器,每个组分设置 5 个浓度梯度,分别为 0 μg/mL (Holfreter

水)、250 μg/mL、500 μg/mL、750 μg/mL、1000 μg/mL(所有药剂均溶于 Holfreter 水)。每孔加入 30 枚胚胎,每 12 h 挑走死亡胚胎并做好记录,更换药物,放置于 28℃恒温培养箱培养。待胚胎发育至 72 h 时统计胚胎死亡数同时观察发育状况。

胚胎暴露实验:收集受精后 0.75 h 的胚胎分到 6 孔板,每孔 30 枚。每个组分按照探究好的最佳浓度梯度加药,每 12 h 换药。Holfreter 水设为空白对照组,总提物组分和醇沉物组分最佳浓度梯度均为 100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL;醇提物组分最佳浓度梯度为 100 μg/mL、300 μg/mL、500 μg/mL。因熊果苷(Arbutin, Ar)是氢醌的重要衍生物,具有安全性高、美白效果明显等特点,以 200 μg/mL 熊果苷溶液作为标准阳性对照<sup>[19]</sup>。待胚胎发育至 72 h 时,在体视显微镜下观察其体表黑色素沉着情况,拍照并记录分析。选择对黑色素形成抑制效果最佳的组分进行后续的实验。

#### 1.2.3 黑色素合成基因的表达

##### 1.2.3.1 引物设计

与黑色素相关的基因序列从 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 网站下载,引物通过软件 Primer Premier 6.0 设计。引物序列如表 1 所示。

表 1 黑色素相关基因的引物序列信息

Table 1 Primer sequences information of melanin-related genes

基因名称	引物序列(5' 3')
<i>dct</i>	F: CTGTGACCAATGAGGAGATT R: CATAGGATTGGGACTGTGT
<i>oca2</i>	F: CAGTCAAGATGCCGATGT R: TCCAGTGAAGTCCGATGT
<i>silv</i>	F: GCAGAAGACACAGTTATCG R: CAGCATCACCACATTATTCA
<i>tyrp1a</i>	F: CTCATCATCGTCGCCATC R: GAACCTCCTGAAGAACACA
<i>tyrp1b</i>	F: CAGTGGTGTGTTGTAG R: TGGCTGTATTCTCAATGTCT
<i>tyr</i>	F: TCCTCTGTGTTCTCATCCT R: TGAAGTATCCGTCGTTGTG
<i>mitfa</i>	F: GGACAACCACAACCTCAT R: CCACTAACTCAGCGGAATA
<i>β-actin</i>	F: ACGAACGACCAACCTAAACTCT R: TTAGACAACCTCCCTTTGC

### 1.2.3.2 半定量 PCR 检测黑色素合成基因的表达

将受精后 0.75 h 的胚胎加入不同浓度梯度的金线莲醇提物处理, 以熊果苷为阳性对照, 待胚胎发育至 72 h, 每个处理组各收集 50 枚, 提取总 RNA, 将 RNA 反转录成 cDNA, 具体操作方法参考文献<sup>[20]</sup>。之后采用降落(touch down)PCR 扩增目的基因条带, 扩增条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 65℃ 30 s, 之后每个循环降低 3℃, 72℃ 30 s, 共 6 个循环; 然后再 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 27 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 16℃ 保存 1 h。

### 1.2.3.3 整胚原位杂交

原位杂交所用探针的制备方法、试剂的配制方法和具体操作步骤参照文献<sup>[20]</sup>。

### 1.2.4 斑马鱼酪氨酸酶酶活性检测

将受精后 0.75 h 的胚胎分别加入 0 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL、500 μg/mL 金线莲醇提物和 200 μg/mL 熊果苷, 待胚胎发育至 72 h 时, 每个浓度收集 50 条斑马鱼幼鱼, 置于 1.5 mL 离心管中, 先用 Hofreter 水洗两遍, 再用 PBS 洗两遍, 5000 r/min 离心 3 min, 将液体吸干。向离心管中加入 200 μL PBS 缓冲液, 在冰浴条件下, 用高速研磨棒将组分研磨均匀, 直至看不见组织团块。12 000 r/min、4℃ 离心 5 min, 所得到的上清液即为酪氨酸酶酶液。

使用考马斯亮蓝法制作蛋白标曲, 绘制成标准曲线<sup>[21]</sup>, 根据标准蛋白方程  $y=0.0142x+0.3059$  ( $R^2=0.9903$ )。此方程将用于蛋白含量的计算。测得样品蛋白质的  $OD_{595\text{ nm}}$  值代入标准曲线中计算出样品蛋白含量,  $\Delta OD$  值代入酶活力公式:

$$\text{酶活力}(U/g) = \frac{\Delta OD \times V \times N \times 1000}{6.22 \times t \times 0.5 \times M}$$

得到不同组分的酪氨酸酶酶活力值。式中:  $\Delta OD$  表示吸光变化值, 6.22 为毫摩尔消光系数,  $V$  表示反应总体积(mL),  $t$  表示反应时间(min),  $N$  表示酶液稀释倍数, 0.5 为比色光径(cm),  $M$  表示样品蛋白含量(mg/mL)。

### 1.2.5 金线莲醇提物在斑马鱼黑色素大量形成的情况下对其抑制作用的研究

斑马鱼黑色素在胚胎发育至 24 h 时开始形成, 72 h 黑色素已经大量形成<sup>[22]</sup>。为了探究金线莲

醇提物在斑马鱼黑色素已经大量形成的情况下是否仍然具有抑制黑色素效果, 在胚胎发育至 72 h 时加入金线莲醇提物处理, 待斑马鱼幼鱼发育至 5 d 时, 用体式显微镜观察斑马鱼体表的黑色素和黄色素沉着情况, 按照 1.2.3 和 1.2.4 的方法检测幼鱼体内黑色素合成相关基因的表达和酪氨酸酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 金线莲抑制斑马鱼黑色素形成的活性组分筛选

#### 2.1.1 药物浓度的确定

收集受精后 0.75 h 的胚胎, 分别暴露于 3 个组分的金线莲提取物, 每组分别设置 0 μg/mL、250 μg/mL、500 μg/mL、750 μg/mL、1000 μg/mL 5 个浓度梯度。待胚胎发育至 72 h 观察并记录胚胎发育及死亡情况, 结果如图 1 所示。总提物组分浓度在 750 μg/mL 以上时, 胚胎死亡率达到 100%, 在 500 μg/mL 浓度时, 有一半的胚胎死亡, 并且胚胎有明显的发育延缓现象, 在 250 μg/mL 浓度时胚胎发育正常, 胚胎死亡率较低, 因此最终确定总提物组分浓度梯度为 100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL。在任一相同浓度下, 斑马鱼胚胎在醇沉组较其他两种组分死亡率均是最高, 醇沉组浓度梯度设置与总提组相同: 100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL。醇提组的致死率在 3 组中最低, 在高浓度(1000 μg/mL)时, 胚胎死亡率为 80%, 中浓度下(500 μg/mL)死亡率为 30%, 并且胚胎发育状况良好, 故醇提组浓度

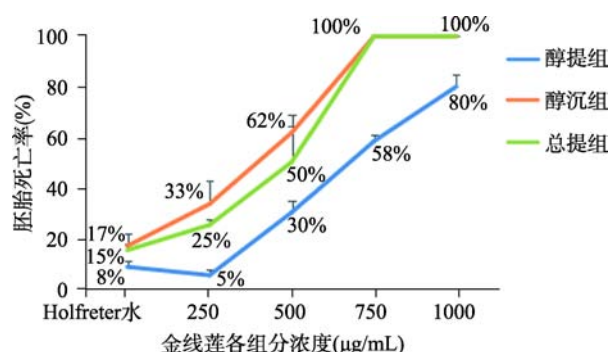


图 1 不同浓度的金线莲提取物对斑马鱼胚胎死亡率的影响

Fig. 1 Embryonic mortality in different concentrations of *Anoectochilus roxburghii* extracts



梯度设置为 100  $\mu\text{g/mL}$ 、300  $\mu\text{g/mL}$  和 500  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.1.2 斑马鱼胚胎暴露实验

将受精后 0.75 h 的斑马鱼胚胎经过不同金线莲提取物处理后观察 72 h 色素沉着情况, 结果如图 2 所示。空白对照组(WT)眼部、背脊两侧、背脊部黑色素和黄色素沉积明显(图 2:A, F, K), 金线莲总提物和醇沉物的高浓度组与未经处理的胚胎相比眼部和背脊部黑色素沉着只有少许减少(图 2:D, I)。与未经金线莲提取物处理的胚胎相比, 醇提组眼部和背脊部的黑色素和黄色素沉着明显减少, 其中对黄色素的抑制作用甚至比阳性对照强(图 2:N, O), 而且随着药物浓度的增加, 抑制黑色素和黄色素沉着的作用逐渐增强。金线莲总提组和醇沉组虽然对黑色素也具有一定的抑制作用, 由于总提组成分更加广泛和不确定, 而醇沉组对胚胎具有较高的毒性及发育致缓效应, 因此本研究以醇提组为主要研究对象进行后续的实验。

### 2.2 半定量 PCR 检测黑色素合成相关基因的表达

金线莲醇提物在斑马鱼胚胎中抑制黑色素效果最明显且毒副作用最小, 因此本研究通过检测斑马鱼黑色素相关基因的表达, 进一步探索金线莲醇提

物如何抑制黑色素的形成。

以  $\beta\text{-actin}$  为内参, 利用 PCR 检测 *dct*、*oca2*、*silv*、*tyrp1b*、*tyr* 和 *mitfa* 基因的表达, 结果如图 3 所示。与空白对照组相比, 加入醇提物组分后扩增出的 *dct*、*oca2* 和 *silv* 的基因电泳条带亮度明显下降, *tyrp1b*、*tyr* 和 *mitfa* 基因电泳条带亮度相对于对照组有减弱趋势, 并且随着金线莲醇提物浓度的升高而逐渐减弱(图 3A)。利用 ImageJ 软件计算各个基因 mRNA 的相对表达量(图 3:B~G), 统计分析表明: 加药组中 *dct*、*oca2* 和 *silv* 的 mRNA 水平相对于空白对照组明显下降, 其中高浓度组(500  $\mu\text{g/mL}$ )的基因表达量减少到空白对照组的 50% 左右, *oca2* 在低浓度(100  $\mu\text{g/mL}$ )下其表达量已显著下降; *tyr* 的表达随着加药浓度增加呈浓度梯度减弱, 在高浓度(500  $\mu\text{g/mL}$ )下表达量明显下降; *mitfa* 的表达虽有减弱, 但其差异并不显著。以上结果表明: 金线莲醇提物可以抑制黑色素合成相关基因的 mRNA 表达, 并且随着浓度的升高抑制效果越明显。

### 2.3 斑马鱼黑色素相关基因 mRNA 的时空表达

本研究进一步通过整胚原位杂交技术验证金线莲醇提物是否影响了黑色素合成相关基因 mRNA

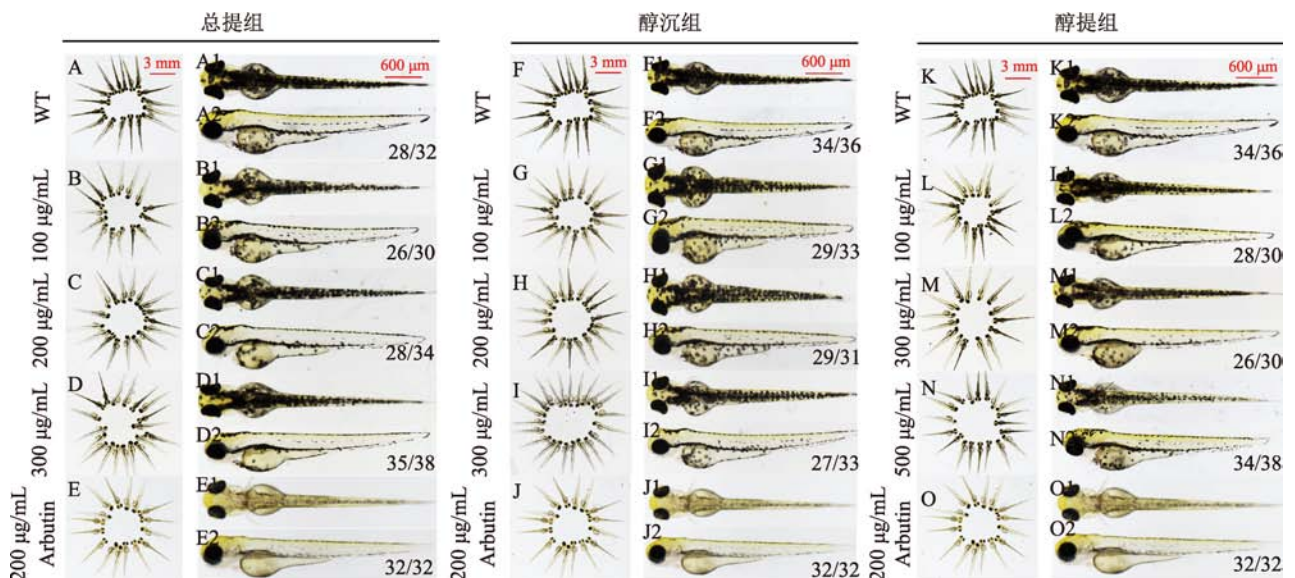


图 2 金线莲不同组分对斑马鱼胚胎黑色素沉着的影响

Fig. 2 Effects of *Anoectochilus roxburghii* extracts on melanogenesis in zebrafish embryos

A~E: 金线莲总提物处理组; F~J: 金线莲醇沉物处理组; K~O: 金线莲醇提物处理组; A1~O1 为俯视图, A2~O2 为侧视图。图中数值为统计数据; 比例尺如图中所示。

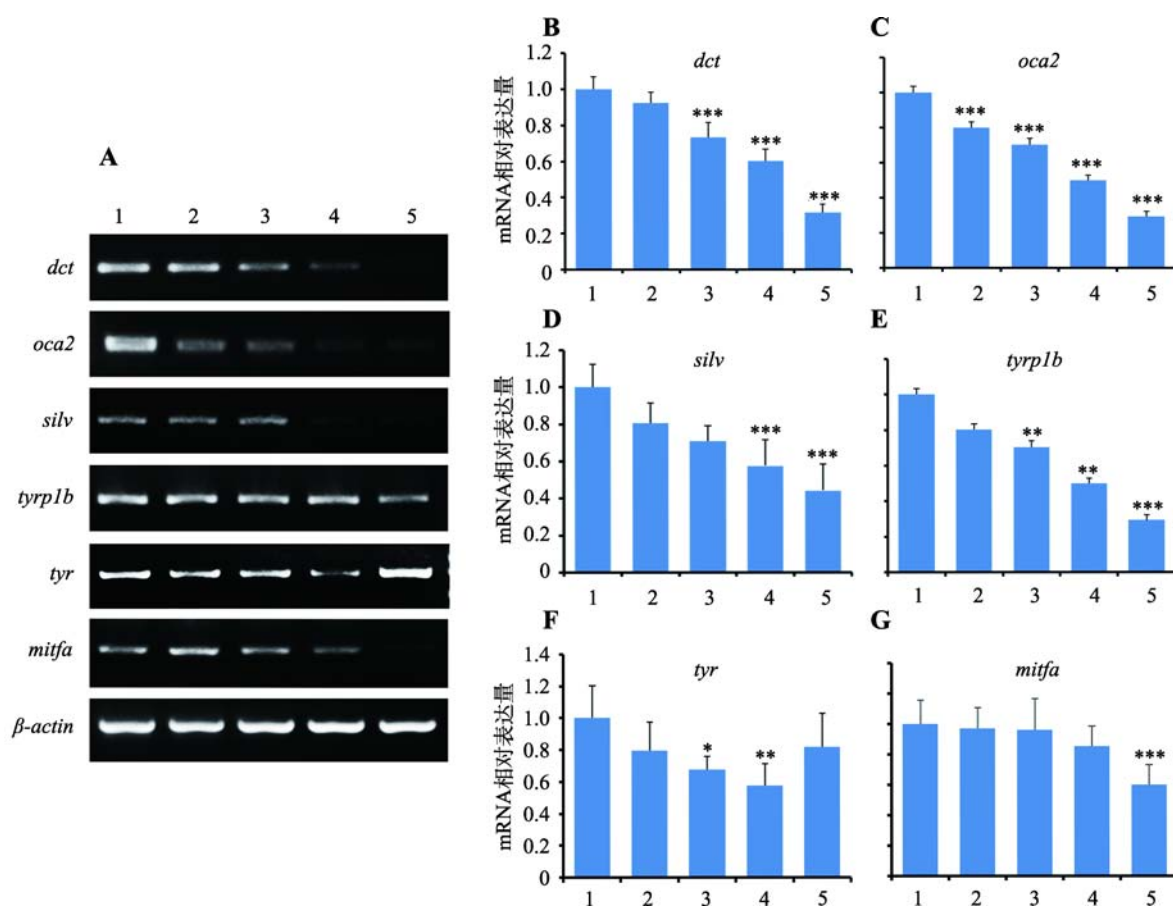


图 3 黑色素合成相关基因的表达

Fig. 3 The mRNA expression levels of melanin-related genes

A: 基因扩增电泳图; B~G: mRNA 相对表达量统计分析。1: WT; 2: 100  $\mu\text{g/mL}$ ; 3: 300  $\mu\text{g/mL}$ ; 4: 500  $\mu\text{g/mL}$ ; 5: 200  $\mu\text{g/mL}$  Arbutin; \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ , \*\*\*表示  $P < 0.001$ 。

的时空表达。斑马鱼胚胎加入金线莲醇提取物处理至 72 h, 检测 *tyr*、*silv*、*tyrp1a* 和 *tyrp1b* 基因的时空表达变化。

从图 4(A~E, K~O)中可以看出, *tyr*、*tyrp1a* 的染色部位主要在眼部、脊柱两侧区域的表皮细胞, *tyr* 的表达在低浓度处理组(100  $\mu\text{g/mL}$ )有略微变弱(图 4: A, B), 高浓度组(500  $\mu\text{g/mL}$ )眼部和脊柱两侧的染色部位颜色比对照组明显变浅, 甚至比阳性对照组(Ar)都浅, 与半定量 PCR 结果一致(图 4: D, E); *tyrp1a* 的表达在金线莲醇提取物处理组与对照组相比颜色变浅较为明显, 高浓度组(500  $\mu\text{g/mL}$ )染色基本消失(图 4: K~O)。从图 4(F~J, P~T)中可以看出, *silv*、*tyrp1a* 的染色部位主要在眼部、脊柱两侧、背部神经嵴区域, 随着药物浓度的增加, 眼部、脊柱两侧、背部神经嵴区域的颜色逐渐变浅, 高浓度组

(500  $\mu\text{g/mL}$ )染色基本消失。上述结果表明, 金线莲醇提取物可以抑制 *tyr*、*silv*、*tyrp1a* 和 *tyrp1b* mRNA 的时空表达, 并且随着加药浓度的增加, 抑制效果逐渐加强。金线莲醇提取物可以通过抑制黑色素合成相关基因的转录水平从而抑制黑色素的形成。

## 2.4 酪氨酸酶活性测定

酪氨酸酶是酪氨酸和多巴向黑色素转变过程中的主要限速酶, 在黑色素的合成过程中起着关键性的作用。为了验证金线莲醇提取物是否对斑马鱼体内的酪氨酸酶活性有影响, 本文对发育至 72 h 的斑马鱼幼鱼进行了酪氨酸酶活性的测定, 结果如图 5 所示。

从图 5 中可以看出, 与对照组相比, 低浓度醇提组幼鱼的酪氨酸酶活性有降低但没有显著性。随着金线莲醇提取物浓度的增加, 酪氨酸酶的活性逐渐

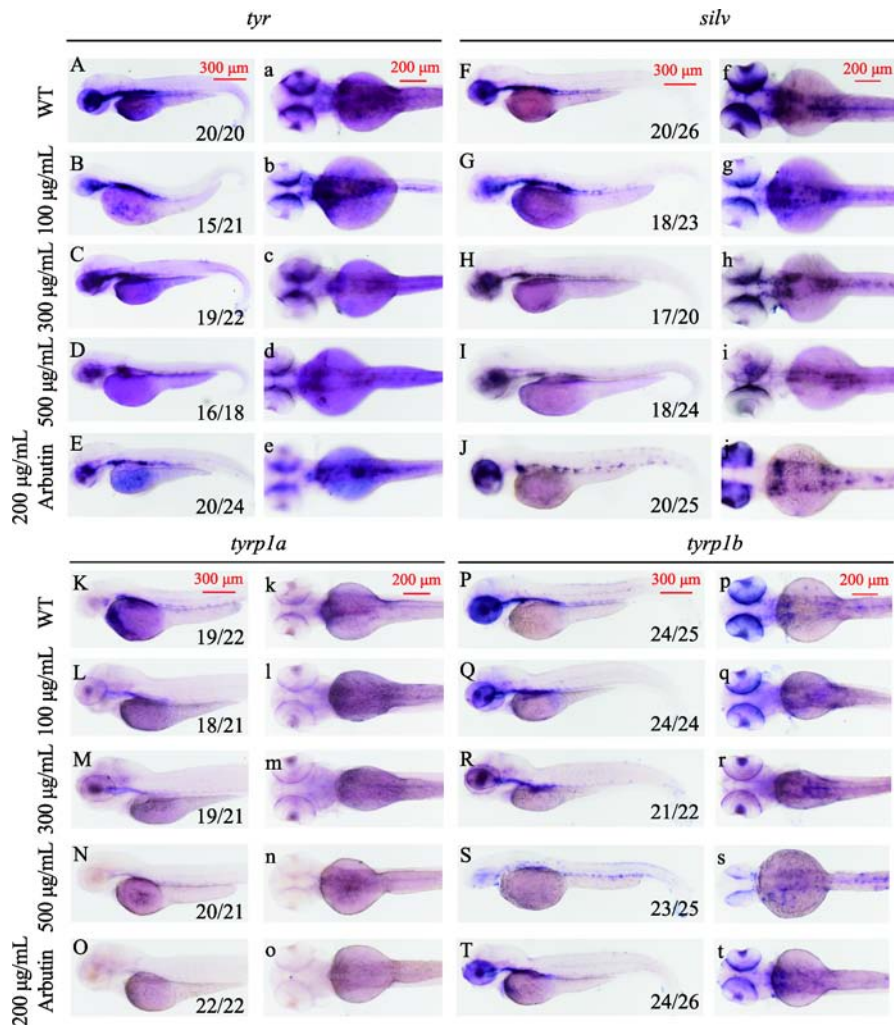


图 4 斑马鱼黑色素相关基因 mRNA 的时空表达

Fig. 4 The spatial and temporal expression patterns of melanin-related genes

金线莲醇提取物处理后检测 72 h 时黑色素相关基因的 mRNA 表达。A~T 为侧视图；a~t 为俯视图。图中数值代表统计数据，比例尺如图中所示。

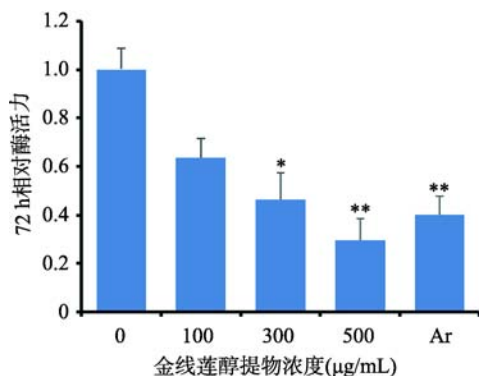


图 5 金线莲醇提取物对斑马鱼酪氨酸酶活性的影响

Fig. 5 The influence of *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts on tyrosinase activity in zebrafish

Ar: 阳性对照组, Arbutin 浓度为 200 µg/mL。

降低, 高浓度组(500 µg/mL)酪氨酸酶活性显著降低, 仅是空白对照组的 1/3, 效果甚至强于阳性对照组 (Ar), 与半定量 PCR 和整胚原位杂交结果相一致。表明金线莲醇提取物可以抑制酪氨酸酶的活性, 从而抑制黑色素的产生。

## 2.5 金线莲醇提取物在斑马鱼黑色素大量形成情况下依然具有抑制作用

金线莲醇提取物对斑马鱼早期胚胎具有抑制黑色素效果。斑马鱼黑色素在 24 h 开始形成, 72 h 黑色素已经大量形成, 为探究金线莲醇提取物在斑马鱼黑色素已经大量形成的情况下是否仍然能进一步抑制黑色素形成, 本文在胚胎发育至 72 h 时开始加入



500  $\mu\text{g/mL}$  金线莲醇提取物, 处理 48 h 之后观察 5 d 幼鱼体表黑色素沉着情况, 检测酪氨酸酶活性及黑色素合成相关基因的 mRNA 表达。

从图 6 (A~C)可以看出,加入金线莲醇提取物组幼鱼眼部和背脊部的黑色素和黄色素沉着与对照组相比有较为明显的减少,与阳性药物(Ar)的效果相差无几。且加入金线莲醇提取物组的酪氨酸酶活性明显低于对照组,高浓度组酪氨酸酶活性降低到了对照组的 40%,差异显著(图 6D)。进一步通过半定量 PCR 检测黑色素合成相关基因的表达水平,结果如图 6E 所示:经过高浓度的金线莲醇提取物处理后, *tyr*、*tyrp1b* 和 *oca2* 的 mRNA 表达水平均有明显下调,具

有显著性差异。其中 *tyrp1b*、*oca2* 的基因相对表达量减少到对照组的 60%左右;金线莲醇提取物对 *tyr* 的抑制效果尤为明显。实验结果表明,在色素已经大量形成的情况下,金线莲醇提取物仍然可以抑制斑马鱼幼鱼体内酪氨酸酶的活性及黑色素合成相关基因的表达,从而抑制黑色素继续形成。

2.6 金线莲醇提取物对斑马鱼黑色素的抑制效果具有可逆性

本研究在探讨金线莲对黑色素的抑制效果同时,也进一步探究了该抑制效果是否具有可逆性。将受精后 0.75 h 的胚胎加入 500  $\mu\text{g/mL}$  金线莲醇提取物处

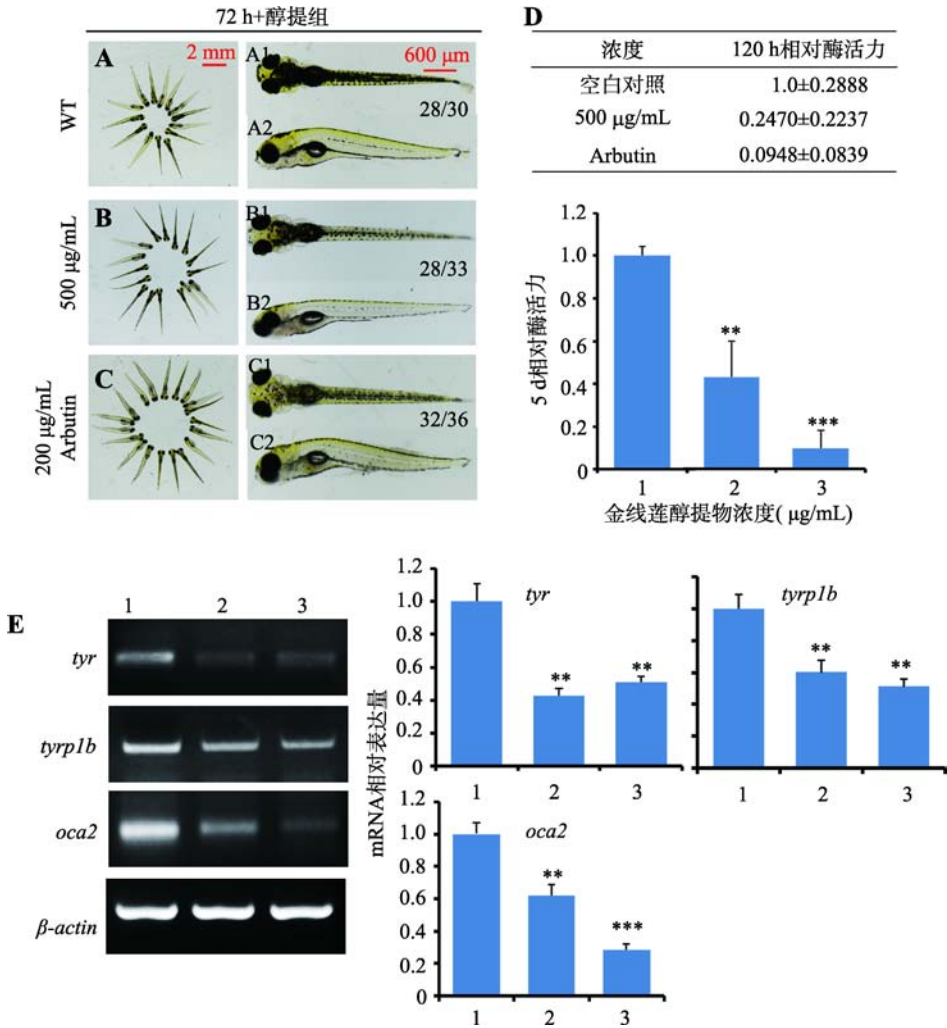


图 6 金线莲醇提取物对斑马鱼幼鱼黑色素的抑制作用

**Fig. 6** The inhibitory effect of *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts on melanogenesis in zebrafish larvae  
A~C: 表观图; D: 酪氨酸相对酶活力; E: 基因扩增电泳图。1: 空白对照; 2: 500  $\mu\text{g/mL}$ ; 3: 200  $\mu\text{g/mL}$  Arbutin。图中斑马鱼为 5 d 的幼鱼。



理至 72 h, 置换回正常培养液(Holfreter 水), 持续观察体表色素沉着及发育状况, 发现至第 7 d, 约 80% 的幼鱼体表色素的恢复接近于未处理组(图 7A)。另一种情况下, 在黑色素大量形成的 72 h 时期加入醇提取物, 处理 2 d 后置换成 Holfreter 水培养, 其色素也会逐渐恢复, 直至第 9 d 体表色素的恢复接近于未处理组, 比例超过 70%。由此推测, 在撤销药物之后的第 4 d 开始, 黑色素能可逆地恢复到接近未处理组的水平, 且加入金线莲醇提取物的斑马鱼发育到第 9 d 时发育状况良好, 和未处理组发育时期一致。结果表明, 金线莲醇提取物对斑马鱼黑色素的抑制效果具有可逆性。

### 3 讨 论

本文利用斑马鱼筛选金线莲具有抑制黑色素形成的活性组分, 克服了体外细胞模型和哺乳动物模型的不足。实验结果表明, 加入金线莲醇提取物组与加入其他两种组分(醇沉物组和总提取物组)的斑马鱼相比较, 黑色素和黄色素沉着明显减少, 初步筛选出金线莲醇提取物在斑马鱼黑色素形成过程中具有最佳的抑制效果; 本研究还对金线莲醇提取物如何抑制黑色素形成进行了初步的机理研究, 结果显示: 金线莲醇提取物通过抑制黑色素相关基因的 mRNA 表达, 进而抑制酪氨酸酶活性, 减少黑色素的合成, 从而发挥美白功效; 此外, 金线莲醇提取物在斑马鱼黑色素已经大量形成的情况下其抑制效果依旧显著, 并且这种抑制效果具有可逆性。

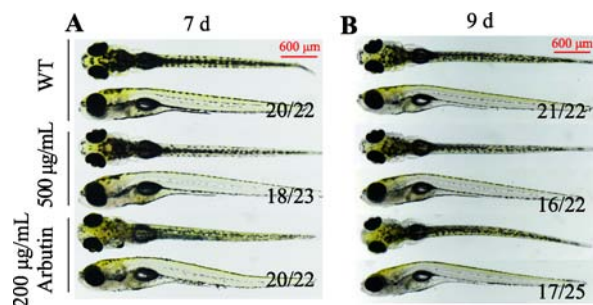


图 7 金线莲醇提取物对斑马鱼黑色素的抑制效果具有可逆性

Fig. 7 The inhibitory effect of *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts on melanogenesis is reversible in zebrafish

A: 0.75 h 加金线莲醇提取物, 72 h 撤除药物, 7 d 观察拍照; B: 72 h 加金线莲醇提取物, 5 d 撤除药物, 9 d 观察拍照。

本研究尚且存在许多不足, 目前本研究只是筛选到了具有抑制黑色素形成作用的活性组分, 金线莲醇提取物中包含黄酮类、生物碱、皂苷等成分<sup>[23]</sup>, 其中黄酮是一种很强的抗氧化剂, 能抑制过多油脂分泌, 调节体内分泌功能, 故能防治雀斑、黑斑及老人斑, 我们猜测在金线莲美白效果中黄酮成分起到了关键性作用, 真正发挥美白功效的究竟是哪一种或是哪几种具体物质还需通过实验进一步证实, 在接下来的研究中可以继续对金线莲醇提取物进行分离提纯, 进行后续的实验研究。

### 参考文献(References):

- [1] 曾健, 林竞成, 黄坚航. 金线莲的应用与开发. 海峡药, 1996, 8(4): 82–83. [DOI]
- [2] He CN, Wang CL, Guo SX, Xiao PG. Advances in chemistry and pharmacology on plants Orchidaceae Anoectochilus. *Chin Pharm J*, 2004, 39(2): 81–84.  
何春年, 王春兰, 郭顺星, 肖培根. 兰科开唇兰属植物的化学成分和药理活性研究进展. 中国药理学杂志, 2004, 39(2): 81–84. [DOI]
- [3] Lu B, Lou YY, Chen CC, Zhang CN, Xu C, Fang ZH. Research of arbutin inhibits melanin synthesis in zebrafish embryos. *J Hunan Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2015, 30(1): 116–120.  
陆彬, 楼鸳鸯, 陈楚楚, 章超男, 徐超, 方兆华. 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究. 湖南科技大学学报(自然科学版), 2015, 30(1): 116–120. [DOI]
- [4] Phelps HA, Neely MN. Evolution of the zebrafish model: from development to immunity and infectious disease. *Zebrafish*, 2005, 2(2): 87–103. [DOI]
- [5] Li HH, Huang P, Dong W, Zhu ZY, Liu D. A brief history of zebrafish research—toward biomedicine. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(4): 410–420.  
李辉辉, 黄萍, 董巍, 朱作言, 刘东. 斑马鱼研究走向生物医学. 遗传, 2013, 35(4): 410–420. [DOI]
- [6] Guan SY. Application of animal models in melanin-related studies. *Acta Lab Anim Sci Sinica*, 2009, 17(6): 475–477.  
管淑玉. 黑色素相关研究中动物模型的应用进展. 中国实验动物学报, 2009, 17(6): 475–477. [DOI]
- [7] Sun GJ, Pan J, Liu KC, Wang X, Wang SF. Effects of N-phenylthiourea (PTU) on melanogenesis and early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Sci*, 2011, 30(7): 387–390.  
孙桂金, 潘杰, 刘可春, 王雪, 王思锋. 苯硫脲对斑马鱼黑色素生成及早期发育的影响. 水产科学, 2011,

- 30(7): 387–390. [DOI]
- [8] Smith M, Hickman A, Amanze D, Lumsden A, Thorogood P. Trunk neural crest origin of caudal fin mesenchyme in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Proc Royal Soc B: Biol Sci*, 1994, 256(1346): 137–145. [DOI]
- [9] Liu CS, Yan W, Zhou BS, Guo YY, Liu HL, Yu HX, Giesy JP, Wang JH, Li GY, Zhang XW. Characterization of a bystander effect induced by the endocrine-disrupting chemical 6-propyl-2-thiouracil in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*, 2012, 118–119: 108–115. [DOI]
- [10] Villareal MO, Han J, Yamada P, Shigemori H, Isoda H. Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes. *Exp Dermatol*, 2010, 19(5): 450–457. [DOI]
- [11] Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García-Borrón JC, Hearing VJ. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J*, 1994, 13(24): 5818–5825. [DOI]
- [12] Fang D, Setaluri V. Role of microphthalmia transcription factor in regulation of melanocyte differentiation marker TRP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256(3): 657–663. [DOI]
- [13] Lister JA, Robertson CP, Lepage T, Johnson SL, Raible DW. Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development*, 1999, 126(17): 3757–3767. [DOI]
- [14] Wen S. Involvement of *mitfa* gene in body color formation of the ornamental fish[Dissertation]. Hunan Normal University, 2014.  
文胜. *mitfa* 基因在观赏鱼体色形成中的功能研究[学位论文]. 湖南师范大学, 2014. [DOI]
- [15] 张启勤. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展. 科技资讯, 2015, 13(18): 200–201. [DOI]
- [16] Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(6): 2440–2475. [DOI]
- [17] 舒文, 毛华明. 黑色素的研究进展. 国外畜牧学—猪与禽, 2003, 23(2): 31–34. [DOI]
- [18] Liu L, Xi DM, Chen L, Sun SR, He YD, Mao HM, Deng WD. Genetic variations of the tyrosinase gene. *China Anim Husb Vet Med*, 2010, 37(12): 115–120.  
刘丽, 席冬梅, 陈亮, 孙守荣, 何奕多, 毛华明, 邓卫东. 酪氨酸酶基因遗传变异的研究进展. 中国畜牧兽医, 2010, 37(12): 115–120. [DOI]
- [19] Chen WY, He QX, Peng WB, He XQ, Liu KC, Chu J, Han LW, Wang XM. Zebrafish model based biological activity evaluation formelanin inhibition of Vc and sodium erythorbate. *Shandong Sci*, 2014, 27(6): 31–37.  
陈维云, 何秋霞, 彭维兵, 何锡强, 刘可春, 楚杰, 韩利文, 王希敏. 利用斑马鱼模型评价 Vc 和异 Vc-Na 抑制黑色素的生物活性. 山东科学, 2014, 27(6): 31–37. [DOI]
- [20] Xue Y. Organizer-driven Bmp signal is required for zebrafish embryonic dorsoventral patterning[Dissertation]. Beijing: Tsinghua University, 2014.  
薛钰. 斑马鱼胚胎组织中心表达的 Bmp 信号在背腹分化中的作用[学位论文]. 北京: 清华大学, 2014. [DOI]
- [21] 李娟, 张耀庭, 曾伟, 罗璇, 廖长春. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118–120. [DOI]
- [22] Cao XJ, Sun SR, Wang XY, Tan YW, Zhao S, Mao HM, Deng WD. SLC24A5 gene affects pigmentation in vertebrates: a review. *China Anim Husb Vet Med*, 2008, 35(5): 52–56.  
曹绣娟, 孙守荣, 王鑫玉, 谭玉文, 赵珊, 毛华明, 邓卫东. SLC24A5 基因影响脊椎动物色素沉积的研究进展. 中国畜牧兽医, 2008, 35(5): 52–56. [DOI]
- [23] Cao YY. Studies on the chemical constituents of *anectochilus roxburghii*[Dissertation]. Fujian Medical University, 2008.  
曹扬远. 金线莲中化学成分的研究[学位论文]. 福建医科大学, 2008. [DOI]

(责任编辑: 张博)