

# 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究

陆彬<sup>1</sup>, 楼鸳鸯<sup>1</sup>, 陈楚楚<sup>1</sup>, 章超男<sup>1</sup>, 徐超<sup>1</sup>, 方兆华<sup>2</sup>

(1. 浙江工业大学 生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310032; 2. 伽蓝(集团)股份有限公司 研发中心, 上海 200233)

**摘要:**为探讨美白化学品熊果苷对黑色素合成的抑制效果,以斑马鱼胚胎为模型,将其暴露于不同浓度的熊果苷溶液后,观察其黑色素生成情况,并进一步测定体内黑色素合成通路上部分关键基因的表达.定性观察表明,随着熊果苷浓度的增加,其对黑色素合成的抑制明显增强.基因表达分析表明,熊果苷通过对眼皮肤白化病II型(OCA2),酪氨酸酶(TYR)和银色毛发(SILV)等黑色素合成相关基因的抑制,进而抑制了黑色素的合成.上述结果解释了熊果苷在黑色素抑制过程中的作用机理,为斑马鱼胚胎模型在美白物质筛选中的应用提供了基础.

**关键词:**熊果苷;斑马鱼胚胎;黑色素

**中图分类号:**X506      **文献标志码:**A      **文章编号:**1672-9102(2015)01-0116-05

## Research of arbutin inhibits melanin synthesis in zebrafish embryos

Lu Bin<sup>1</sup>, Lou Yuanyang<sup>1</sup>, Chen Chuchu<sup>1</sup>, Zhang Chaonan<sup>1</sup>, Xu Chao<sup>1</sup>, Fang Zhaohua<sup>2</sup>

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China; 2. Jala (Group) Company Limited R & D Center, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** In order to investigate the inhibitory effect of one of the whitening chemicals arbutin on melanin synthesis, zebrafish embryos was used as a model, after exposing them to different concentrations of arbutin solution, the melanin synthesis were observed, furthermore expressions of several crucial genes on the melanin synthesis pathway in the embryos were measured. The results of qualitative observation showed that, with the increasing concentration of arbutin, its inhibition on melanin synthesis is significantly enhanced. The gene expression analysis showed that, arbutin inhibit the melanin synthesis by suppressing the expression of melanin synthesis-related genes, such as oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), tyrosinase (TYR) and silver (SILV). These results explain the mechanism in melanin inhibiting process of arbutin, and provide a basis for the application of zebrafish embryo model in whitening chemicals screening.

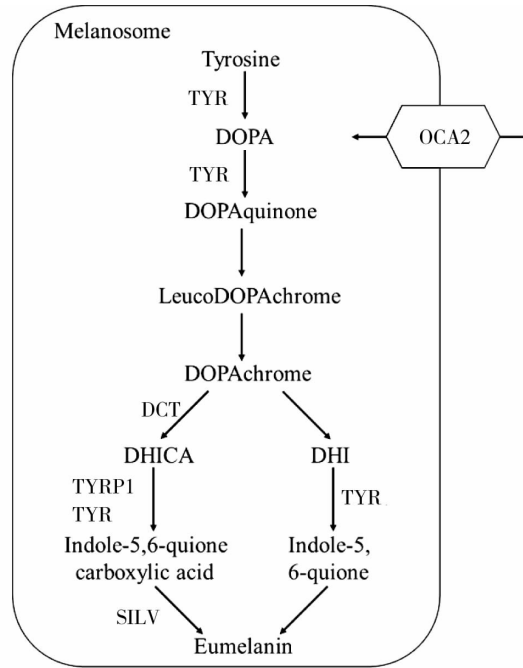
**Keywords:** arbutin; zebrafish embryos; melanin

随着美白逐渐成人们的审美标准,美白产品市场发展十分迅速,此类产品已经成为护肤产品的主流,同时人们也越来越青睐天然温和、安全有效的美白产品.熊果苷(Arbutin)作为从杜鹃花科植物熊果叶中分离出来的天然活性美白物质,在化妆品中有广泛的应用<sup>[1-2]</sup>.目前对于美白活性物质的研究多用豚鼠皮肤或小鼠黑色素瘤细胞等作为模型,而这些模型存在着成本高,耗时长,操作复杂等缺点.

斑马鱼作为一种模式生物,已被应用于筛选化妆品美白活性物,比起目前广泛使用的其他模式生物,斑马鱼有着其固有的很多优点<sup>[3]</sup>.斑马鱼体型小,易于管理,早期形态便于观察,能极大的减少饲养空间和管理成本,同时降低了实验所需的试剂量和实验废液量.斑马鱼产卵量高,且其胚胎具有光学通透性,可以清楚地观察到其体内黑色素的量,即美白效果.而且,斑马鱼基因与人类基因的相似度达到87%,这意

味着在其身上实验所得到的结果在多数情况下也适用于人体<sup>[4]</sup>. 因此,黑色素研究中所得到的结果可以为进一步的临床应用提供依据.

黑色素的合成过程中,酪氨酸酶是关键酶. 酪氨酸酶催化黑色素合成途径中的两个初始步骤,即酪氨酸羟基化成3,4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)和DOPA氧化成多巴醌. 然后多巴醌可由两条独立的途径生成黑色素. 整个合成黑色素的过程中主要涉及了眼皮肤白化病II型(OCA2)、酪氨酸酶(TYR)、多巴色素互变酶(DCT)、酪氨酸酶相关蛋白1(TYRP1)和银色毛发(SILV)等多个基因<sup>[5-6]</sup>,如图1.



注: TYR: 酪氨酸酶; DCT: 多巴色素互变酶; TYRP1: 酪氨酸酶相关蛋白1; SILV: 银色毛发; OCA2: 眼皮肤白化病II型.

图1 脊椎动物中黑色素的合成途径(源自 Braasch 等人 2007 年的研究)

本研究采用斑马鱼胚胎作为模式生物,比较观察了不同浓度的熊果苷溶液对斑马鱼胚胎黑色素生成的抑制效果,并测定了经不同浓度的熊果苷溶液处理后其体内与黑色素合成相关基因的表达情况,推测了熊果苷的黑色素抑制机理.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

试剂:熊果苷样品,苯硫脲(PTU,阳性对照),链霉蛋白酶(Pronase),三卡因甲基磺酸盐溶液(tricaine methanesulfonate solution),3%甲基纤维素(methyl cellulose),DMSO均购于美国Sigma公司(St. Louis, MO, USA).总RNA提取试剂,反转录试剂,PCR反应液均购于康为世纪生物科技有限公司(中国北京).本实验中的其它试剂均为分析纯.将对照品和样品均溶于DMSO中,配制成贮备液,-20℃避光保存,临用时再稀释成所需浓度,且溶剂DMSO的体积浓度为0.1%.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 斑马鱼的饲养与胚胎的收集

成年斑马鱼(购于中国科学院水生生物研究所,武汉)饲养于实验室循环水养殖系统中,饲养条件为:28.5℃,光/暗周期为14/10h,饲养用水经循环系统过滤并充分曝气,pH值保持8.0左右,每天喂食丰年虫3次,每周喂食6d.

产卵时,选择形态正常,个体较大和健康的性成熟斑马鱼,在孵化系统按雌雄比1:2进行配对饲养于15L玻璃水族箱中,共约10~15条.在产卵前一天晚上22:00熄灯,次日早上8:00系统自动开灯,在光照刺激下开始产卵,约30min后,开始收集胚胎.将收集的胚胎充分的清洗去除脏物后,在显微镜下挑选出健康发育正常的胚胎用于接下去的实验.

#### 1.2.2 斑马鱼胚胎暴露实验

以96孔板作为试验容器,每孔中加入200  $\mu\text{L}$ 的待测化合物溶液,胚胎发育到受精后4 h时,按1个胚胎/孔随机分配到96孔板中,每个浓度设置一块板,设置3个浓度组.每天更换待测化合物暴露液并搅拌,以确保活性成分分布均匀.于受精后4 h时加入0.2 mM的苯硫脲(PTU)用于不干扰发育条件下产生透明的斑马鱼,作为标准阳性对照.基于表型的色素沉着评估,于暴露48 h后用荧光倒置显微镜(Nikon,日本)观察熊果苷对斑马鱼的黑色素抑制效果.观察前,胚胎用链霉菌蛋白酶(Pronase)去除卵膜,用三卡因甲基磺酸盐溶液麻醉后,放入装有3%甲基纤维素的凹玻片上,在荧光倒置显微镜下拍摄.对斑马鱼色素沉着情况进行打分:无或轻度 <10%,中度 10%~49%,显著 >50%.

用上述相同方法将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的熊果苷溶液(空白,0.5 mM,1 mM,5 mM,10 mM)中,于暴露72 h后每个暴露浓度收集约60尾发育正常且健康的斑马鱼胚胎,平均分配到5个1.5 mL的离心管中(每个浓度5个平行组).之后经提取斑马鱼体内总RNA—反转录—实时定量PCR,测定熊果苷对斑马鱼黑色素基因表达的差异(表达量与管家基因rpl8比较).

### 1.2.3 黑色素合成相关基因的表达测定

总RNA的提取、mRNA的逆转录反应、PCR扩增参考李玉珑等人<sup>[7]</sup>和王道等人<sup>[8]</sup>的方法并按照说明书(CWBIO, Beijing, CHINA)进行.每个浓度约取10个暴露72 h后的斑马鱼胚胎.扩增条件为:先95  $^{\circ}\text{C}$ 下10 min进行变性处理,然后95  $^{\circ}\text{C}$ 下退火15 s,最后60  $^{\circ}\text{C}$ 下延伸1 min,经过扩增40个循环.每个样品做5个重复,取平均值.mRNA相对表达水平计算公式为 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ,其中 $\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{Target}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{X}} - (\text{CT}_{\text{Target}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{0}}$ .该公式中X表示任何时间点或者处理的样本,对照组为0.

### 1.3 数据处理

使用Origin软件对数据进行处理、作图,并用t-检验进行显著性分析, $p < 0.05$ 为显著,用\*表示; $p < 0.01$ 为极显著,用\*\*表示.

## 2 结果

### 2.1 斑马鱼胚胎暴露实验

如图2所示,斑马鱼胚胎经过2 mM,4 mM,8 mM,12 mM的熊果苷溶液暴露48 h后,其体内黑色素沉着都有不同程度的减少,且随着熊果苷溶液浓度的增加黑色素沉着减少得越多.在空白对照组中,斑马鱼胚胎的脊柱上下两侧可以明显地观察到大量的黑色斑点,此即是斑马鱼胚胎中沉着的黑色素;在2 mM熊果苷溶液处理组中,斑马鱼胚胎相同部位上可明显观察到黑色素沉着的减少;在4 mM,8 mM,12 mM熊果苷溶液处理组中,斑马鱼胚胎相同部位上观察到的黑色素沉着依次递减,12 mM处理组相较于空白对照组的黑色素沉着则已显著减少,无明显的黑色素沉着点.将斑马鱼胚胎中黑色素沉着的主要部位放大后如图3所示,可以清楚地观察到经熊果苷溶液处理后,黑色素在斑马鱼胚胎中的沉着较空白对照组有显著的减少.

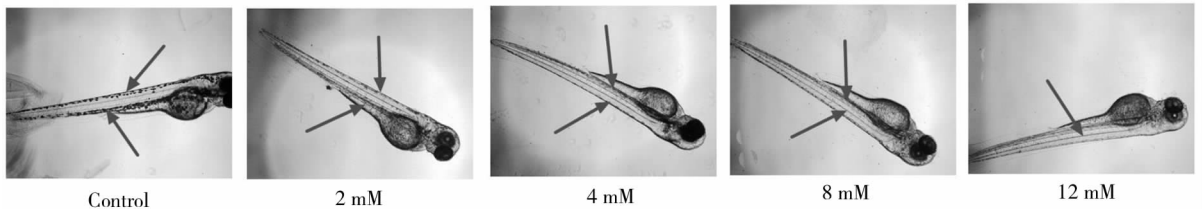


图2 整体美白效果对比图

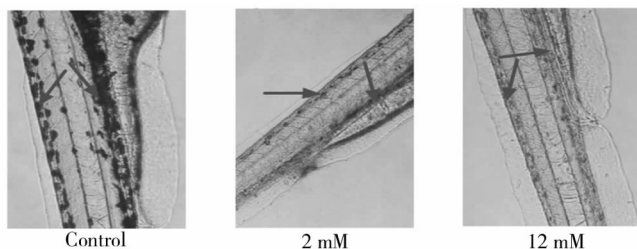


图3 局部美白效果对比图

注:图2,图3中箭头所指位置即为黑色素沉着部位.

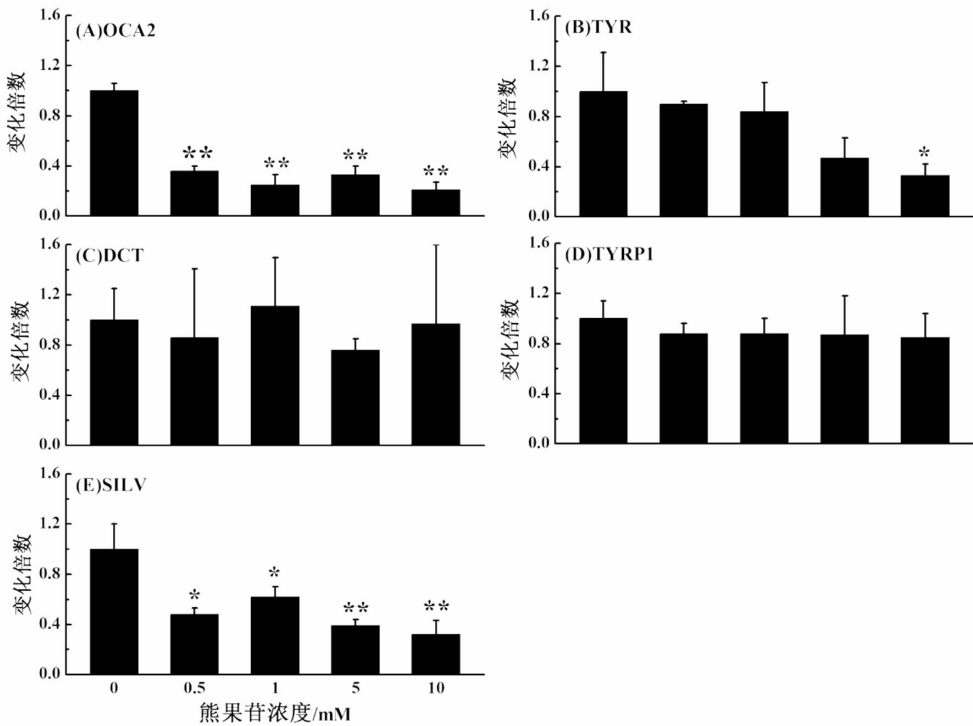
同时,将不通浓度熊果苷对斑马鱼胚胎的黑色素生成影响情况进行了统计(表 1),并将黑色素沉着的减少分为 3 个等级:无或轻度(<10%),中度(10%到 49%),显著(>50%).由表 1 可知,2 mM 熊果苷溶液处理组的斑马鱼胚胎大多数的黑色素沉着减少量为中度,而 4 mM,8 mM,12 mM 熊果苷溶液处理组的斑马鱼胚胎半数以上的黑色素沉着减少量都达到了显著,其中 12 mM 熊果苷溶液处理组的斑马鱼胚胎的黑色素沉着减少量更是全部为显著.而在本实验中,各浓度的熊果苷溶液对斑马鱼胚胎死亡率的影响基本不存在差异.

表 1 不同浓度熊果苷对斑马鱼胚胎黑色素生成影响情况

浓度/mM	无或轻度/%	中度/%	显著/%	胚胎(死亡/总数)
12	0(0)	0(0)	15(83.3)	3(16.7)
8	0(0)	1(5.6)	14(77.8)	3(16.7)
4	0(0)	7(38.9)	9(50.0)	2(11.1)
2	2(11.1)	12(66.7)	1(5.6)	3(16.7)

### 2.2. 黑色素合成相关基因的表达

以 rpl8 作为管家基因,测定了暴露于不同浓度的熊果苷溶液 72 h 后,斑马鱼胚胎中 5 个黑色素合成相关基因的表达,发现熊果苷使黑色素合成相关基因中 OCA2, TYR 和 SILV 的表达量与对照组相比显著下降,而基因 DCT 和 TYRP1 则与对照组无明显差异,如图 4. 此结果与 Villareal M O. 等人<sup>[5]</sup>对 B16 小鼠黑色素瘤细胞的研究结果一致,同时与之前表观看到的现象一致(见图 3). 因此可以推断:表观看到的经过熊果苷处理组的斑马鱼幼鱼黑色素减少,其实质是通过抑制了黑色素合成相关基因的表达,导致与黑色素合成相关的蛋白合成减少.



注:星号表示与对照组有显著差异: \* 表示  $p < 0.05$ , \*\* 表示  $p < 0.01$ .

图 4 黑色素合成相关基因的表达

### 3 讨论

本研究表明熊果苷能有效抑制黑色素合成相关基因的表达,进而抑制黑色素的合成,且抑制效果随其浓度的增加而增强.这与 Liu C S 等<sup>[6]</sup>关于苯硫脲(PTU)抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究结果中的表观现象相一致,而与其黑色素合成相关基因表达情况不一致. Liu C S 等的研究结果显示苯硫脲(PTU)使黑色素合成相关基因表达量上升,并解释为补偿-反馈机制(a compensatory mechanism).这可能是由于其暴露浓度相对较低,并没有达到严重减少黑色素合成的地步,斑马鱼胚胎可以通过自身调节来弥补,形成

所谓的补偿-反馈机制;而本研究中设置的熊果苷暴露浓度可能相对较高,对斑马鱼黑色素减少非常明显(由图3可知,即使在2 mM处理组,黑色素相对对照组减少非常的明显),这个影响不能靠自身弥补,因此也就不能用补偿-反馈机制去解释本研究的结论。

黑色素合成途径中涉及的相关基因如图1。在黑色素合成过程中,OCA2基因编码转运蛋白是必不可少的,主要与黑色素常染色体的转运有关。在酪氨酸转变为3,4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)和多巴醌的过程中,酪氨酸酶催化黑色素合成的两个反应限制步骤以及之后的2个步骤。多巴色素互变酶(DCT)与多巴色素(DOPACHROME)转化成5,6-二羟基吲哚-2-羧酸(DHICA)有关,而酪氨酸酶相关蛋白1(TYRP1)则涉及DHICA合成吲哚-2-羧酸-5,6-醌。SILV基因编码的蛋白质则在吲哚-2-羧酸-5,6-醌转变成真黑素的最后一步过程中起着催化作用<sup>[6,9-10]</sup>。本实验中,熊果苷对黑色素合成相关基因中OCA2, TYR和SILV的表达有显著的抑制作用,从而抑制了相应物质的合成,使最终黑色素的合成量显著减少。

作为一种模式生物,斑马鱼具有很多其他模式生物所不具备的优点,已被广泛应用于生物学各领域,如正向遗传学和反向遗传学、药物研发和人类疾病研究、细胞生物学、毒理学等<sup>[4]</sup>。近年来,开始出现用斑马鱼作为新的模式生物来研究调节黑色素合成的化合物基于表型的筛选。本实验验证了斑马鱼可以作为研究熊果苷对黑色素合成抑制及其美白效果的模式生物,接下来可进一步研究建立筛选化妆品美白活性物的斑马鱼模型,检测和验证样品的美白活性成分对斑马鱼黑色素合成的抑制作用。

熊果苷用于美白化妆品,其安全性也受到广泛关注。由表1可知,本实验中各浓度的熊果苷对斑马鱼胚胎是安全的,这与郭靖等<sup>[11]</sup>关于熊果苷对豚鼠皮肤安全性的研究结果相一致。所以,斑马鱼胚胎可以作为筛选美白物质的模式生物。

## 4 结论

本实验以斑马鱼胚胎为模型,采用半静态暴露的方式,探讨了美白化学品熊果苷对黑色素合成的抑制效果。定性观察表明,随着熊果苷浓度的增加,其对黑色素生成的抑制明显增强。基因表达分析表明,熊果苷通过对眼皮皮肤白化病II型(OCA2),酪氨酸酶(TYR)和银色毛发(SILV)等黑色素合成相关基因的抑制,进而抑制了黑色素的合成。实验结果解释了熊果苷在黑色素抑制过程中的作用机理,为斑马鱼胚胎模型在美白物质筛选中的应用提供了基础。

## 参考文献:

- [1] 房军,杜顺晶,金银龙. 熊果苷在化妆品中应用的研究进展[J]. 卫生研究,2009,38(1):111-113.
- [2] 王慧琛,王丽琴. 熊果苷的应用及检测研究进展[J]. 天津药学,2012,24(4):71-74.
- [3] Choi T Y, Kim J H, Ko D H, et al. Zebra? sh as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds[J]. Pigment Cell Research, 2007, 20:120-127.
- [4] 王佳佳,徐超,屠云杰,等. 斑马鱼及其胚胎在毒理学中的实验研究与应用进展[J]. 生态毒理学报,2007,2(2):123-135.
- [5] Villareal M O, Han J, Yamada P, et al. Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes[J]. Experimental Dermatology, 2009, 19:450-457.
- [6] Liu C S, Yan W, Zhou B S, et al. Characterization of a bystander effect induced by the endocrine-disrupting chemical 6-propyl-2-thiouracil in zebra? sh embryos[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 118/119:108-115.
- [7] 李玉珑,农小献,李虹辉,等. 鳊鱼生肌调节因子MyoD的克隆及其发育表达分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2013,36(4):63-68.
- [8] 王道,廖高鹏,肖亚梅. 黄鳍 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶基因克隆及其在雌雄个体间的表达分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2013,36(4):69-73.
- [9] Braasch I, Scharlt M, Volf J N. Evolution of pigment synthesis pathway by gene and genome duplication in fish[J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7:1-18.
- [10] 王玉林,何锦风,王维民,等. 皮肤黑色素的产生及美白浅析[J]. 日用化学品科学,2012,36(2):33-35.
- [11] 郭静,张伟,丁黎,等. 熊果苷制剂对豚鼠皮肤安全性及脱色作用的研究[J]. 宁夏医科大学学报,2012,34(6):593-595.