

本文引用:刘朝圣,龚 坚,申梦洁.湘西龙山百合对小鼠 B-16 黑色素瘤细胞黑色素含量、酪氨酸酶活性的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(2):145-148.

湘西龙山百合对小鼠 B-16 黑色素瘤细胞 黑色素含量、酪氨酸酶活性的影响

刘朝圣^{1,2},龚 坚³,申梦洁³

(1.湖南中医药大学第一附属医院皮肤科,湖南 长沙 410007;2. 重庆市中医院皮肤科,重庆 400011;
3. 湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 观察不同浓度湘西龙山百合提取液对小鼠 B-16 细胞细胞活力、黑色素含量、酪氨酸酶活性的影响。方法 选用同一传代小鼠 B-16 黑色素瘤细胞并分组,分别加入不同浓度百合提取液、维生素 C 二种溶液作用 3 d 后,用 MTT 法测定 B-16 细胞活力;用 Maeda 等的方法测定 B-16 细胞酪氨酸酶活性;用 Victoria 等的方法测定 B-16 细胞黑色素含量。结果 湘西龙山百合提取液对小鼠 B-16 细胞的酪氨酸酶活性、黑色素合成的抑制作用明显强于维生素 C,组间差异有统计学意义($P<0.05$),且其抑制作用随浓度的增加而增加;同时湘西龙山百合提取液其细胞毒性作用同样强于维生素 C,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 百合提取液对 B-16 细胞的生长、酪氨酸酶活性和黑色素合成的抑制作用强于维生素 C,其抑制作用与浓度呈正相关。

[关键词] 湘西龙山百合;维生素 C;B-16 细胞;黑色素;酪氨酸酶

[中图分类号] R285.5;R275

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.02.008

Effects of Xiangxi Longshan Lily on Melanin Content and Tyrosinase Activity in B-16 Melanoma Tumor Cells of Mouse

LIU Chaosheng^{1,2}, GONG Jian³, SHEN Mengjie³

(1. Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Department of Dermatology, Chongqing TCM Hospital, Chongqing, 400010, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of different concentrations of Xiangxi Longshan lily extract on cell viability, melanin content and tyrosinase activity in mouse B-16 cells. **Methods** The same passage B-16 mouse melanoma cells were selected and divided into different groups, then different concentrations of lily extract and vitamin C were added after 3 days. The B-16 cell viability was measured by MTT, B-16 tyrosinase activity in cells was measured by using Maeda's method, and the content of B-16 melanoma cells was conducted by Victoria's method. **Results** The effect of Xiangxi Longshan Lily extract in inhibiting tyrosinase activity and synthesis of melanin was better than Vitamin C, the difference was statistically significant between groups ($P<0.05$), and the inhibition increased with the concentration. Similarly, the cell toxicity from the Xiangxi Longshan Lily extract was stronger than Vitamin C, a statistically significant difference between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion** The inhibition effect of lily extract on cell viability, tyrosinase activity and concentration of melanin in cells is stronger than vitamin C, and the inhibition effect is positively correlated with the concentration.

[Keywords] lily; Vitamin C; B-16 cells; melanin; tyrosinase

[收稿日期] 2016-05-17

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目 (13C679); 湖南省中医药科研计划重点项目 (201518); 重庆市人社局博士后特别资助基金项目 (Xm2015087); 湖南省“十二五”重点学科开放基金项目 (ZXLXK201508)。

[作者简介] 刘朝圣,男,博士,副教授,研究方向:皮肤病中西医结合防治,E-mail:chaoliu2807@sina.com。

随着人们生活水平和审美标准的提高,越来越多的人追求皮肤的白皙与润泽。近年来,美白化妆品顺应“回归自然”的潮流,纷纷选用自然界绿色、无毒、有效的物质为原料,以满足消费者的需求。

祖国传统医学认为百合味甘微苦,性微寒,入肺、胃、心经,具有养阴润肺、清心安神的功效^[1];现代分析表明,百合主要含皂苷类、多糖类、磷脂类、生物碱类等活性成分,还含有淀粉、蛋白质、氨基酸、各种维生素和微量元素等营养物质^[2],有较高的临床应用价值。从外观而言,新鲜百合本身色白晶莹,按照中医皮肤“以色治色”理论,其在美白领域应有较大应用前景。湖南湘西龙山百合是全国知名的道地药材,在前期临床观察基础上,本研究探讨湘西龙山百合对小鼠 B-16 黑色素瘤细胞株酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响,为百合在美白领域应用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 受试物

百合原材料为湖南新世纪集团提供的卷丹百合 *Lilium lancifolium* (龙山百合) 的干燥肉质鳞叶;维生素 C (Vit C, 规格 2 mL:0.1 g):石药集团维生素药业有限公司,批号 H13022052。

1.2 试剂

2,6-二氯酚靛酚 (2,6-D),北京索莱宝生物科技有限公司产品,批号:D8410;小牛血清,美国 HyClone 公司产品,批号:NWK0489;DMEM 高糖培养基,美国 HyClone 公司产品,批号:NAC1362;左旋多巴(L-dopa),南京奥多福尼生物科技有限公司产品,批号:A0169;噻唑蓝(MTT),中国 Solarbio 公司产品,批号:M8180;二甲基亚砜(DMSO),中国 Solarbio 公司产品,批号:M0231;2.5 g/L 胰酶,北京索莱宝生物科技有限公司产品,批号:T1300;pH 6.8 磷酸缓冲液(PBS),北京中彬金桥公司产品,批号:ZLI-9062;Triton X-100,北京索莱宝生物科技有限公司产品,批号:T8200;无水乙醇、2-丙二醇,均为国药集团产品。

1.3 仪器

DNP-9162 CO₂ 孵箱,上海精宏实验设备有限公司生产;752-P 酶联免疫检测仪,上海现科仪器有限公司生产;TG-16M 低温冷冻离心机,上海卢湘仪离

心仪器有限公司生产。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠 B-16 黑色素瘤细胞购自湖南省湘雅医学院细胞库。待细胞生长至融合状态,经 0.25% 胰蛋白酶消化,用含有 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液传代,置于 CO₂ 培养箱 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度环境中进行培养。每一次实验取自同一传代细胞,初始接种细胞浓度为 5 000 个/cm² 左右。

2.2 药品制备

2.2.1 百合提取物的配制 参照张秀芳、贺文英等报道的方法^[3]提取百合提取液:将龙山百合粉碎,用无水乙醇浸泡、振荡或搅拌,浸泡 24 h 以上,24 h 后滤过,收集浸取液;剩余的药渣再加无水乙醇溶液浸取 24 h 以上。将两次浸取液的滤液,回收乙醇,最后得到百合提取物(浓度为 45.5 g/mL)。

2.2.2 百合提取物中 Vit C 含量的测定 采用 2,6-D 滴定法进行测定^[4]。将一定量的百合提取液溶于草酸中,用相应浓度的 2,6-D 溶液去缓慢滴定混合液,当混合液开始出现淡红色时,停止滴定,从 2,6-D 消耗量计算出被检样品中 Vit C 的量。

2.2.3 不同浓度百合提取液及 Vit C 溶液的配制 (1) 配制溶媒:先配制 PEH 溶液(按双蒸水:无水乙醇:2-丙二醇=2:3:5 的比例配制),后用 0.01 mol/L 的 PBS 液将 PEH 溶液释成 100 mL/L 溶液作为溶媒;(2) 用溶媒将百合提取物和 Vit C 配成 10 g/L 的浓度,再把 10 g/L 维生素 C 溶液稀释成 0.01、0.02、0.04、0.08 g/L 的浓度备用^[5];根据所测定的百合提取液中 Vit C 含量按比例稀释成 4 组浓度的百合溶液,使其中所含 Vit C 的量分别与 4 组浓度的 Vit C 溶液接近。

2.3 MTT 法测定 B-16 黑色素瘤细胞活力抑制率

取第 3 代小鼠 B-16 黑色素瘤细胞以 6×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。37 °C CO₂ 孵箱中培养 1 d 后,吸弃上清液,实验组(百合组、Vit C 组) 每孔加入 DMEM 高糖培养液 180 μ L 及百合溶液或 Vit C 溶液 20 μ L,每一浓度 4 个孔;空白对照组每孔加入 180 μ L DMEM 高糖培养液和 20 μ L 溶媒溶液;空白孔不接种细胞。37 °C CO₂ 孵箱中孵育 3 d。药物作用 3 d 后,每孔加入 0.5%

MTT 20 μL ,继续孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 180 μL DMSO,振荡 10 min,选择 490 nm 波长以空白孔调零,在酶联免疫检测仪上测各孔吸光度值。每一实验重复 4 次,细胞活力抑制率=(1-实验组各浓度平均吸光度值 \div 空白对照组各浓度平均吸光度值) $\times 100\%$ 。

2.4 酪氨酸酶活性抑制率的测定

以 L-Dopa 为底物,参考 Maeda 等^[6]的方法测定细胞酪氨酸酶活性抑制率。各组及加药情况同上,药物作用 3 d 后,弃去上清液,0.01 mol/L 的 PBS 洗 2 次,每孔加 90 μL 10 mL/L 的 Triton X-100,震荡 5 min 以溶解细胞,每孔加 10 μL 10 g/L 的 L-Dopa,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,于 490 nm 波长处,以空白孔调零,测各孔吸光度值。每一实验重复 4 次,酪氨酸酶活性抑制率=(1-实验组各浓度平均吸光度值 \div 对照组各浓度平均吸光度值) $\times 100\%$ 。

2.5 黑色素合成抑制率的测定^[7]

将培养的第 3 代黑色素细胞以 1×10^4 个/ cm^2 密度接种于 5 个 6 孔板,24 h 后换液,实验组(百合组、维生素 C 组)每孔加入 4.5 mL DMEM 高糖培养液及 0.5 mL 百合溶液或 Vit C 溶液,空白对照组每孔加入 4.5 mL DMEM 高糖培养液和 0.5 mL 溶媒溶液;空白孔不接种细胞。每一浓度 3 个孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 50 mL/L CO_2 孵箱孵育 3 d 后,弃去上清液,每孔加入 2.5 g/L 胰酶 1 mL 于室温下消化 2 min,加入 4 mL DMEM 高糖培养液中中止消化,吹打成单细胞悬液。取 0.5 mL 作细胞计数,其余细胞悬液 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 1 mol/L 的 NaOH,振荡 5 min。选择 490 nm 波长在酶联免疫检测仪上测吸光度值。每一实验重复 4 次,黑色素合成抑制率=[1-(实验孔吸光度值 \div 实验孔细胞密度) \div (空白组对照孔吸光度值 \div 空白组对照孔细胞密度)] $\times 100\%$ 。

2.6 统计分析

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。符合正态分布时,采用参数检验,方差齐时组内采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Newman-keuls 法检验,方差不齐者用 Tampane's T2 检验;不符合正态分布时,采用非参数检验,等级资料多样本比较采用 Kruskal-wallis H 秩和检验。所有结果以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示。

3 结果

3.1 不同浓度百合提取液与 Vit C 对小鼠 B-16 细胞活力抑制率的影响

表 1 显示,百合提取液及 Vit C 对小鼠 B-16 细胞活性均有抑制作用,其抑制作用均随着浓度的增高而增高;但同一浓度,Vit C 组对小鼠 B-16 细胞活力影响较小,尤其是 Vit C 浓度为 0.01 g/L 时,对小鼠 B-16 细胞活力影响最弱;而浓度为 0.08 g/L 的百合提取液对小鼠 B-16 细胞活力抑制作用最强。说明百合提取液对小鼠 B-16 细胞有较强的细胞毒性作用;百合液组及 Vit C 组组内各浓度差异具有统计学意义($P < 0.01$),同浓度百合组与 Vit C 组两两对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度百合提取液、Vit C 对小鼠 B-16 细胞活力抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	0.08 g/L	0.04 g/L	0.02 g/L	0.01 g/L
百合液组	16	50.42 \pm 0.66*	41.53 \pm 0.72*	36.84 \pm 0.56*	29.14 \pm 0.57*
Vit C 组	16	37.46 \pm 0.44	30.12 \pm 0.67	24.31 \pm 0.66	19.68 \pm 0.49
F	1	921.036	1 011.523	1138.226	1826.620
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Vit C 组相比 * $P < 0.05$ 。

3.2 不同浓度百合提取液与 Vit C 对小鼠 B-16 细胞酪氨酸酶抑制率的影响

表 2 显示,百合提取液及 Vit C 对小鼠 B-16 细胞酪氨酸酶活性均有抑制作用,其抑制作用均随着浓度的增高而增高;在同等浓度下,百合提取液对酪氨酸酶抑制作用明显强于 Vit C 组。百合组及 Vit C 组组内各浓度差异具有统计学意义 ($P = 0.000 < 0.01$),两组同浓度组间两两对比 $P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度百合提取液、Vit C 对小鼠 B-16 细胞酪氨酸酶活性抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	0.08 g/L	0.04 g/L	0.02 g/L	0.01 g/L
百合液组	16	56.37 \pm 0.67*	50.01 \pm 0.68*	44.84 \pm 0.79*	39.01 \pm 0.94*
Vit C 组	16	44.95 \pm 0.93	37.55 \pm 0.63	30.92 \pm 1.07	23.32 \pm 0.81
F		399.215	720.809	437.563	636.972
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Vit C 组相比 * $P < 0.05$ 。

3.3 不同浓度百合提取液与 Vit C 对小鼠 B-16 细胞黑色素合成抑制率的影响

如表 3 可知,百合提取液和 Vit C 液随浓度的增加对细胞黑色素的合成的抑制率增加;百合提取

液对细胞黑色素合成的抑制率在各浓度都显著高于 Vit C 液。百合液组及 Vit C 组组内各浓度差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 同浓度百合组及 Vit C 组组间两两对比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 不同浓度百合提取液、Vit C 对小鼠 B-16 细胞黑色素合成抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	0.08 g/L	0.04 g/L	0.02 g/L	0.01 g/L
百合液组	12	48.09±1.67*	37.84±0.72*	33.41±0.33*	28.65±1.75*
Vit C 组	12	36.07±1.43	26.98±0.33	21.43±0.62	15.61±1.87
F		58.954	369.053	719.843	51.596
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Vit C 组相比 * $P < 0.05$ 。

4 讨论

现代研究表明,阻断或抑制新的黑色素形成,还原或加速已有黑色素分解是美白主要机制。而中医学认为气血阻滞、肝气郁结等原因使黑色素、色斑等形成,可通过服用养血补血、活血行气、舒肝解郁的中草药来减少黑色素的形成^[8]。实验研究发现多种中草药提取物中富含美白活性成分,如酚类、黄酮类、多糖类、挥发油、有机酸、三萜皂苷类等,均具有美白作用,并且可以从多种途径抑制黑色素生成及促进黑色素排出,从而达到美白效果。如,甘草的有效成分通过有效清除超氧离子和抑制酪氨酸酶的活性美白^[9],白藜芦醇和熊果苷等通过吸收紫外线减少黑色素的合成^[10]等。并根据这些美白机制开发出多种中药美白产品。现代药理研究表明百合有抗肿瘤、抗氧化活性、镇静及抗应激损伤等作用^[11-13]。

本研究旨在观察百合提取液对黑色素合成的影响。有文献表明 Vit C 已被证实为酪氨酸酶抑制剂,能从多种途径抑制黑色素的生成^[4],故本实验选用 Vit C 为实验的对照药物。研究结果显示:湘西龙山百合提取液对小鼠 B-16 细胞酪氨酸酶活性有明显的抑制作用,也能明显减少 B-16 细胞的黑色素生成,表明龙山百合有较好的美白功用,其基本机制是

通过抑制酪氨酸酶活性进而减少黑色素的合成。但是,随着百合提取液浓度的增高,其对小鼠 B-16 细胞活性的抑制作用也不断增加,即细胞毒性作用增强。因此湘西龙山百合提取液直接作为美白用品是不合适的,湘西龙山百合中的美白物质基础、细胞毒性物质以及其美白的具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 高学敏. 中药学[M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 470-471.
- [2] 黄燕萍. 百合的研究现状[J]. 中国药业, 2010, 19(8): 88.
- [3] 张秀芳, 贺文英, 常彦景, 等. 几种中草药美白护肤化妆品的研制[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1997(4): 60-63.
- [4] 王丽彬. 柑橘中维生素 C 的测定[J]. 食品安全导刊, 2015(18): 106-107.
- [5] 马晶波, 冯树芳, 李 锋, 等. 甘草黄酮对 B16 黑色素瘤细胞代谢的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2003, 30(4): 353-355.
- [6] Maeda K, Fukuda M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in Melanocyte culture [J]. J pharmol Exp Ther, 1996, 276(2): 765-769.
- [7] Victoria VM, Kohayashi N, Matsunaga J, et al. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation [J]. Anal Biochem, 1999, 270(2): 207-219.
- [8] 石 宇, 李德如. 中药在皮肤美容中的应用研究进展[J]. 中国美容医学, 2008, 17(5): 766-768.
- [9] 黄晓凤, 顾 华, 何 黎, 等. 植物美白剂的研究进展[J]. 中华皮肤科杂志, 2013, 46(9): 688-690.
- [10] 郑洪艳, 庞建平, 苏 宁, 等. 天然植物紫外线防护效果研究[J]. 香料香精化妆品, 2013(5): 33-35.
- [11] 朱 泉, 韩永斌, 顾振新, 等. 百合多糖研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 370-374.
- [12] 李利华. 百合多糖的含量测定及抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 14: 2954-2957.
- [13] 高 昱, 易刚强, 刘平安, 等. 湘产百合核心种质库的 SRAP 体系的建立[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(12): 13-18.
- [14] 曾伟成, 郑能武, 陈曾曼. 维生素 C 对酪氨酸酶催化反应的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2001(6): 300-302.

(本文编辑 杨 瑛)