

# 天然活性物美白功效的细胞生物学研究

杨亚军<sup>1</sup>, 林莉<sup>1</sup>, 丁家宜<sup>2</sup>, 刘峻<sup>2</sup>, 程艳<sup>1</sup>

(1. 南京珈依生化有限公司, 江苏 南京 210038; 2. 中国药科大学中药生物技术研究室, 江苏 南京 210038)

**摘要:** 研究天然活性物对 B16 黑色素细胞的增殖、细胞内酪氨酸酶活性及黑色素形成的影响。结果表明, 各活性物能不同程度地抑制细胞增殖; 除人参皂苷 Rb 外, 各活性物能降低细胞内酪氨酸酶活性; 茶多酚、金银花提取物和葡萄籽提取物较其他活性物能明显减少细胞黑色素的含量, 是较为理想的化妆品美白添加剂。此研究模型能快速简便地筛选美白剂。

**关键词:** 化妆品; 黑色素细胞; 黑色素; 酪氨酸酶; 天然活性物; 美白剂

**中图分类号:** TQ 658      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1001 - 1803(2002)03 - 0019 - 03

近年来随着人们对黑色素生成生物学机制的不断认识, 加之化学美白剂存在安全性问题, 从天然植物中寻找安全高效的美白活性物质已成为化妆品研究的热点。黑色素是黑色素细胞内合成的一种高分子生物色素, 其合成途径为<sup>[1,9]</sup>: 在黑色素细胞内, 酪氨酸经酪氨酸酶催化形成多巴, 多巴去氢后形成多巴醌, 后者重新排列成 5, 6 - 醌吲哚, 其发生聚合后与黑素体内的结构蛋白结合形成黑素蛋白即黑色素。黑色素合成后, 从黑色素细胞输送到角质细胞, 并随角质细胞的成熟而弥散到表皮各层, 最后随表皮脱落而消失。由于受紫外线、遗传、内分泌、炎症介质、饮食不当等因素的影响, 黑色素代谢异常, 黑素细胞分泌的黑色素增加, 造成局部皮肤过黑, 表现为黄褐斑、雀斑和炎症后色素沉着等, 妨碍患者的美容, 并对其心理造成严重的影响。因此, 除减少紫外线辐射外, 皮肤美白应该从多个途径考虑, 主要通过: 选择性破坏黑色素细胞的功能; 降低体内酪氨酸酶的活力; 抑制黑色素的生成<sup>[2,3]</sup>。本文通过建立体外培养 B16 黑色素细胞模型, 研究各天然活性物对细胞内酪氨酸酶的作用以及其对细胞增殖率和细胞黑色素生成的影响, 为化妆品添加天然美白剂提供实验依据。

## 1 材料与实验方法

### 1.1 材料

(1) B16 黑色素细胞株, 中国科学院上海细胞研究所提供。

(2) 试剂: 1640 培养基, DL - 多巴, 酪氨酸酶, 胰蛋白酶, 均为美国 Sigma 公司产品; 二甲基亚砜 (DMSO), 脱氧胆酸钠, 上海化学试剂公司; 小牛血清, 杭州四季青生物工程有限公司; 四甲基偶氮唑蓝

(MTT), 上海生物工程公司。

(3) 受试物: 氢醌 (阳性对照物), 熊果苷, BL - 99, Vc 双棕榈酸酯, Melatonin, 曲酸衍生物, 金银花提取物, 葡萄籽提取物, 大黄提取物, 均由各原料公司赠送; 黄芩苷, 茶多酚, 牛磺酸, 人参皂苷 Rb, 甘草黄酮, 橙皮苷, 山楂黄酮, 葛根素, 来自中国药科大学中药生物技术研究室。

(4) 主要仪器: UV - 753 分光光度计, 酶联免疫检测仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠 B16 黑色素细胞培养<sup>[4]</sup>

用含质量分数为 10 % 小牛血清的 1640 培养液在 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 的条件下培养 B16 黑色素细胞, 细胞接种量为 3 × 10<sup>6</sup> 个/L, 每 3 d 传一次。

#### 1.2.2 细胞增殖率的测定<sup>[5]</sup>

选择对数生长期的 B16 黑色素细胞, 用 0.25 % 胰酶消化, 调整细胞浓度为 2 × 10<sup>4</sup> 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 180 μL, 置于 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养 24 h。镜下观察生长状态良好的, 分别加入不同浓度的受试物 20 μL/孔, 继续培养 48 h。于结束前 4 h 加入 MTT 30 μL/孔, 4 h 后弃上清液, 然后加入 DMSO 150 μL/孔, 振荡 10 min 左右, 用酶联免疫检测仪测定 475 nm 波长处的吸光度。

#### 1.2.3 细胞内酪氨酸酶活力测定<sup>[6~8]</sup>

取 B16 黑色素细胞接种于 35 cm<sup>2</sup> 的培养瓶, 接种量为 6 × 10<sup>5</sup> 个/瓶, 培养 48 h 后更换成含不同浓度受试物的培养基, 继续培养 48 h, 以不加活性物作为对照。0.25 % 胰酶消化后, 用 pH 6.8 的 PBS (磷酸缓冲液) 吹打成细胞悬液, 低温离心后弃上清液, 收

收稿日期: 2001 - 07 - 10; 修回日期: 2002 - 01 - 14

作者简介: 杨亚军 (1973 -), 男, 江苏人, 毕业于中国药科大学, 学士, 工程师, 联系电话: (025) 5308271。

获细胞团块。加入 1 mL 0.5 % 的脱氧胆酸钠, 冰浴 15 min, 裂解细胞制备含酪氨酸酶提取液。取该提取液 0.5 mL, 于 37 °C 预温后加入 0.3 % 多巴溶液 0.5 mL, 37 °C 水浴反应 5 min, 用紫外分光光度计在 475 nm 处测定吸光度。

1.2.4 细胞内黑色素含量测定<sup>[6~8]</sup>

细胞培养方法同 1.2.3。在收获的 B16 黑色素细胞团块中加入 1 mL 0.1 mol/L 的 NaOH (含 10 % DMF-SO), 80 °C 水浴 30 min, 用紫外分光光度计在 400 nm 处测定吸光度。

2 结果

2.1 不同浓度的天然活性物对 B16 黑色素细胞增殖率的影响

实验结果表明, 各种天然活性物对 B16 黑色素细胞增殖率均有不同程度的抑制作用。在浓度为  $1 \times 10^{-5}$  g/mL 时, 人参皂苷 Rb、山楂黄酮和牛磺酸对细胞增殖的抑制作用较其它活性物显著, 其抑制率分别为 38.4 %, 45.4 %, 50.3 %; 在  $1 \times 10^{-3}$  g/mL 的高浓度时, 除金银花提取物、葡萄籽提取物、葛根素、山楂黄酮外, 其它活性物对细胞增殖的抑制率均超过 50 %, 其中黄芩苷的抑制率最高, 可达 85.3 %, 与阳性对照氢醌的细胞毒性相当。结果见表 1。

表 1 不同浓度的天然活性物对 B16 黑色素细胞增殖的抑制率

活性物	质量浓度 <sup>1)</sup> / g mL <sup>-1</sup>			
	$1 \times 10^{-5}$	$(1 \times 10^{-6})$	$\times 10^{-4}$	$(1 \times 10^{-5}) \times 10^{-3}$ ( $1 \times 10^{-4}$ )
氢醌	15.2	51.4		89.5
黄芩苷	24.9	18.0		85.3
茶多酚	28.5	21.6		77.3
曲酸衍生物	30.0	44.1		75.3
牛磺酸	50.3	54.3		67.6
大黄提取物	23.3	23.5		65.7
人参皂苷 Rb	38.4	47.2		61.1
Melatonin	10.8	34.3		58.0
甘草黄酮	27.2	43.5		54.3
橙皮苷	16.0	38.0		53.4
熊果苷	16.1	37.7		52.9
BL - 99	22.2	48.1		50.6
Vc 双棕榈酸酯	21.5	31.4		49.5
金银花提取物	13.4	18.6		40.9
山楂黄酮	45.4	44.8		40.1
葡萄籽提取物	21.6	19.1		37.8
葛根素	13.3	22.4		32.3

1) 括号内为氢醌的实验浓度。

2.2 不同天然活性物对 B16 黑色素细胞内酪氨酸酶活性的影响

测定 B16 黑色素细胞在天然活性物作用后各瓶细胞内酪氨酸酶的活性, 由表 2 可看出, 除人参皂苷 Rb 外, 各活性物对 B16 黑色素细胞酪氨酸酶活性均有不同程度的抑制作用, 其中茶多酚、BL - 99 (10 μg/mL) 的抑制率较高, 分别为 53.87 % 和 45.00 %; 在 50 μg/mL 时, 金银花提取物对可抑制 B16 黑色素细胞酪氨酸酶活性, 其抑制率为 48.10 %, 而人参皂苷 Rb 可激活 B16 黑色素细胞酪氨酸酶。

表 2 不同天然活性物对 B16 黑色素细胞酪氨酸酶活性的抑制率 ( $\bar{X} \pm SD$ , n = 3)

Tab. 2 Inhibiting rate of various natural active products on tyrosinase activity in B16 melanocyte ( $\bar{X} \pm SD$ , n = 3)

天然活性物	浓度 / μg mL <sup>-1</sup>	抑制率 / %
金银花提取物	50	48.10 ± 7.78
大黄提取物	50	28.80 ± 7.92
Vc 双棕榈酸酯	50	19.83 ± 2.71
葡萄籽提取物	50	18.20 ± 6.79
熊果苷	50	9.33 ± 0.65
人参皂苷 Rb	50	- 30.35 ± 4.88
甘草黄酮	20	17.37 ± 7.98
茶多酚	10	53.87 ± 16.11
BL - 99	10	45.00 ± 12.45
曲酸衍生物	10	16.93 ± 3.20

2.3 不同天然活性物对 B16 黑色素细胞合成黑色素的影响

各瓶细胞分别添加不同量的天然活性物, B16 黑色素细胞合成黑色素的能力各不相同, 结果见表 3。

表 3 不同天然活性物对 B16 黑色素细胞黑色素生成的抑制率 ( $\bar{X} \pm SD$ , n = 3)

Tab. 3 Inhibiting rate of various natural active products on melanogenesis of B16 melanocyte ( $\bar{X} \pm SD$ , n = 3)

天然活性物	浓度 / μg mL <sup>-1</sup>	抑制率 / %
熊果苷	500	30.55 ± 6.15
Vc 双棕榈酸酯	500	19.83 ± 2.71
人参皂苷 Rb	500	- 38.10 ± 9.33
葡萄籽提取物	50	38.50 ± 11.78
金银花提取物	50	30.93 ± 1.86
茶多酚	10	17.10 ± 6.05

从表3可以看出,葡萄籽提取物、金银花提取物(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )对B16黑色素细胞黑色素的合成具有较强的抑制作用,其抑制率分别为38.50%和30.93%,而人参皂苷Rb(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )对B16黑色素细胞黑色素的合成具有明显的促进作用。

### 3 讨论

B16黑色素细胞由正常黑色素细胞突变所致,其生化代谢与正常黑色素细胞相似,故B16黑色素细胞成为医药部门进行色素病变研究广泛使用的细胞,近年来,已逐渐应用于化妆品美白剂的功能性评价<sup>[2]</sup>。这种利用离体细胞培养来筛选美白剂的细胞生物学方法,比体外生化法更直观、更接近使用效果,同时较人体实验更快速、简便,已成为美白化妆品添加剂功效评价的重要方面。

氢醌细胞毒性很强,有可能造成不可逆性皮肤白斑,故其作为脱色剂时限量使用<sup>[9,10]</sup>。黄芩苷的细胞增殖抑制率可达85.3%,与阳性对照物氢醌的细胞毒性相当;人参皂苷Rb可促进黑色素的合成,其结果与其激活酪氨酸酶作用的结果一致。故黄芩苷与人参皂苷Rb不宜作美白剂使用。

茶多酚对B16黑色素细胞具有较大的毒性,并可显著抑制酪氨酸酶活性、阻碍黑色素合成,故推测其具有选择性细胞毒性,可作为较好的化妆品美白添加剂。金银花提取物和葡萄籽提取物对B16黑色素细胞毒性较小,对细胞内酪氨酸酶活性抑制率不高,但能明显减少细胞黑色素含量。因此,金银花提取物和葡萄籽提取物亦可作为美白类化妆品添加剂。

天然活性物对B16黑色素细胞的毒性与细胞数目

有关,因此,每次实验均应将细胞数目控制在一定范围内,从而将细胞毒性与酶活性抑制作用区别开来。在天然活性物对细胞增殖无明显抑制的条件下研究其对酶活性的作用强弱才具有可行性。

此外,研究结果提示,影响黑色素合成的因素是多方面的,可能不仅仅与酪氨酸酶活性有关。

### 参考文献:

- [1] 殷蕾,李斌,蒋人俊,等. 美白添加剂美白效果的评价研究[J]. 日用化学工业, 1997(3): 41-44.
- [2] 李莉. 几种美白类化妆品添加剂功效的生物学机理[A]. 中国香协. '98中国化妆品学术研讨会论文集[C]. 无锡:中国香料香精化妆品工业协会, 1998. 172.
- [3] 阎世翔. 化妆品科学(下册)[M]. 北京:科学技术文献出版社, 1998. 287.
- [4] 鄂征. 组织培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993.
- [5] 许爱娥,尉小冬,毕志刚,等. 黑素生成素对黑色素细胞增殖和黑色素合成作用的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30(1): 21-23.
- [6] Jayne A B, Sarah C H, Stanley SB. Evidence for a calcium/calmodulin involvement in density-dependent melanogenesis in murine B16 melanoma cell[J]. Pigment Cell Res, 1991, 4: 112-119.
- [7] Jayen A B, Mandy E, Sheila M N. Calcium play a complex roke in the regulation of meianogenesis in B16 melanoma cell[J]. Pigment Cell Res, 1993, 6: 385-393.
- [8] Hideya A, Akira I, Yutaka M. Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in respinse to various melanogenesis regulatory agents[J]. J Cell Physiol, 1993, 165: 608-614.
- [9] 徐良,步平. 美白祛斑化妆品及其未来发展[J]. 日用化学工业, 2001, 31(2): 42-45.
- [10] 雷铁池,朱文元. 皮肤脱色剂的分子机制及其相关研究[J]. 国外医学皮肤病性病分册, 2000, 26(4): 222-224.

## Research in cytobiology on the effectiveness of natural active products

YANG Ya - jun<sup>1</sup>, LIN Li<sup>1</sup>, DING Jia - yi<sup>2</sup>, LIU Jun<sup>2</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>

(1. Nanjing Ganon Biochemistry Co., Ltd., Nanjing 210038, China;

2. Department of Chinese Traditional Medicine Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

**Abstract:** It was investigated that natural active products affected the proliferation of B16 melanocyte, the activity of cellular tyrosinase and the synthesis of melanin. The results showed that inhibition of every active material displayed various degrees on cellular proliferation, that each agent reduced the activity of cellular tyrosinase except ginsenoside Rb, and that tea polyphenols, the extracts of honeysuckle flower and grape seeds obviously decreased the content of cellular melanin compared with others. The three products are preferable whitening agents. The model can quickly screen whitening agent.

**Key words:** cosmetic; melanocyte; melanin; tyrosinase; natural active products; whitening agent