

氨基葡萄糖—半胱氨酸美拉德反应产物对 B16-F10 的抑制作用

林晓彰, 刘必谦*, 周湘池, 章思思, 宋丽青

(宁波大学 应用海洋生物教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为评估氨基葡萄糖—半胱氨酸美拉德反应产物(GCMRPs)对小鼠皮肤黑色素瘤细胞 B16-F10 黑色素合成能力的影响, 选择不同浓度 GCMRPs 作用于 B16-F10 细胞, 观察该产物对 B16-F10 细胞形态、增殖能力、酪氨酸酶酶活及黑色素含量的变化. 结果显示: GCMRPs 可明显抑制 B16-F10 黑色素合成, 并表现出一定的细胞毒性. 该产物在 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 黑色素合成抑制率为 42.31%. 与曲酸相比, 其毒性较大. 因此, GCMRPs 在皮肤美白上的应用有待进一步研究.

关键词: 黑色素; 酪氨酸酶; 半胱氨酸; 氨基糖; 美拉德反应产物

中图分类号: Q813

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 03-0022-04

黑色素是由酪氨酸酶催化经过一系列氧化反应产生的一种黑褐色物质, 决定了人体皮肤、毛发颜色, 同时保护人体皮肤免受紫外线照射^[1], 但由其引起的一系列色素沉着性疾病对患者造成巨大的心理压力^[2]. 因此, 美白剂的研发和使用成为皮肤美容行业关注的焦点. 随着人们对美白化妆品安全性的日益重视, 目前美白剂中常见添加成分也饱受争议. 如氢醌等由于毒性大、稳定性差, 在临床上可造成许多不良反应, 已被禁用^[3]. 因此, 人们迫切需要一种安全高效的美白剂. 笔者以氨基葡萄糖—半胱氨酸美拉德反应产物为研究对象, 探讨其对色素细胞黑色素合成能力的影响, 综合评估该产物作为一种美白剂成分的可行性.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠皮肤黑色素瘤细胞 B16-F10 购自上海中科院细胞所. 虾蟹壳氨基葡萄糖盐酸盐, 浙江金科海洋生物化学有限公司; 半胱氨酸, solarbio 公司; 曲酸(KA)、二甲基亚砷(DMSO), sigma 公司; DMEM 培养基、小牛血清、胰蛋白酶, gbico 公司; 甲基噻唑基四唑(MTT)细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒, 凯基生物有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 GCMRPs 的制备

精确称取一定量等摩尔半胱氨酸及氨基葡萄糖盐酸盐, 使其质量浓度为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 用 $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 为 10, 105°C 加热 8 h. 待反应完全后, 立即冰水浴冷却, 4°C 保存备用.

1.2.2 样品预处理

将一定量的 GCMRPs 冻干成粉后溶于新鲜 DMEM 培养液, 配制成 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 过滤除菌, 置于 4°C 保存, 临用时稀释至终浓度 65、125、250、500 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

1.2.3 细胞培养

将小鼠皮肤黑色素瘤细胞 B16-F10 接种于含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的新鲜 DMEM 培养液(pH 7.2~7.4), 于 37°C , 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中常规传代培养. 实验用细胞为接种后处于对数生长期细胞. 待细胞生长至对数生长期, 消化酶解细胞制备细胞悬浮液, 以每孔 1×10^5 密度接种于 24 孔板中, 待细胞贴壁后, 弃去培养基, 分别加入新鲜含不同浓度 GCMRPs、KA 的培养基, 继续培养 72 h, 期间换液 1 次. 待培养结束, 收集细胞用于黑色素含量和酪氨酸酶酶活的测定.

收稿日期: 2013-03-22.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 宁波市科技计划项目 (2006B100069).

第一作者: 林晓彰 (1989-), 男, 浙江温州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 酪氨酸酶抑制剂. E-mail: evilforcelin@163.com

*通信作者: 刘必谦 (1960-), 男, 湖南邵阳人, 研究员, 主要研究方向: 生物资源开发利用和现代生物技术. E-mail: lbqhy@nbu.edu.cn

1.2.4 细胞形态观察

待 B16-F10 贴壁培养至对数生长周期, 以 0.25% 胰蛋白酶酶解消化细胞, 轻轻吹散吹匀后, 进行细胞计数. 用新鲜 DMEM 培养液将 B16-F10 细胞以每孔 5×10^3 密度接种 96 孔板培养, 待细胞贴壁后, 弃去原培养液, 加入含不同浓度 GCMRPs 的新鲜培养基, 以新鲜 DMEM 培养基为对照, 以含同样浓度梯度曲酸的 DMEM 培养基为参照. 各组设 5 个复孔分别继续培养 48 h 后, 在倒置显微镜下观察细胞形态并拍照记录.

1.2.5 GCMRPs 对细胞增殖的影响

对数生长期的小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 按每孔 5×10^3 密度接种于 96 孔细胞培养板中, 待贴壁后弃去各孔旧培养液, 分别加入 200 μL 阴性对照(新鲜 DMEM 培养液)和含不同浓度 GCMRPs, 样品终浓度分别为 65、125、250、500 和 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 各组设 5 个复孔, 培养 48 h 后每孔加入 MTT 20 μL ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 混匀继续培养 4 h. 用 1 mL 注射器吸取培养基, 每孔加 DMSO 150 μL , 酶标板上振荡 10 min, 使结晶紫充分溶解后测定各孔 A490 nm 值记 $A_{\text{实验}}$. 以仅加 MTT 溶液的空白孔为对照记 $A_{\text{对照}}$, 计算公式如下:

$$\text{细胞增殖率}/\% = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) \times 100\%.$$

1.2.6 酪氨酸酶酶活的测定 u_1, v_1

收集 5×10^6 个细胞, 以 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10

min, 弃上清, 细胞沉淀用 PBS 洗 2 遍. 向细胞沉淀加 1% Triton X-100 0.5 mL, 匀, 置 -80°C 冰箱冷冻 30 min. 取出, 室温下融解后, 以 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min. 上清液即为酪氨酸酶粗提液. 向上清液中加 0.5 mL 0.1% L-DOPA, 37°C 反应 10 min, 于 96 孔板中, 测定各孔 475 nm 处的吸光值. 酪氨酸酶酶活抑制率的计算公式如下:

$$\text{酪氨酸酶酶活抑制率}/\% = (1 - (\text{药物组 } A_{475}/\text{细胞数})/(\text{空白组 } A_{475}/\text{细胞数})) \times 100\%.$$

1.2.7 黑色素合成量的测定

根据 Tu 等^[4]方法并略作修改, 以 0.25% 胰酶消化细胞, 收集 5×10^6 个细胞, PBS 洗 2 遍. 加入含有 10% DMSO 的 1 mol L^{-1} NaOH 溶液 0.5 mL, 80°C 水浴加热 2 h 后, 用酶标仪测定各组在 405 nm 处的吸光值, 黑色素合成抑制率的计算公式如下:

$$\text{黑色素合成抑制率}/\% = (1 - (\text{药物组 } A_{405}/\text{细胞数})/(\text{空白组 } A_{405}/\text{细胞数})) \times 100\%.$$

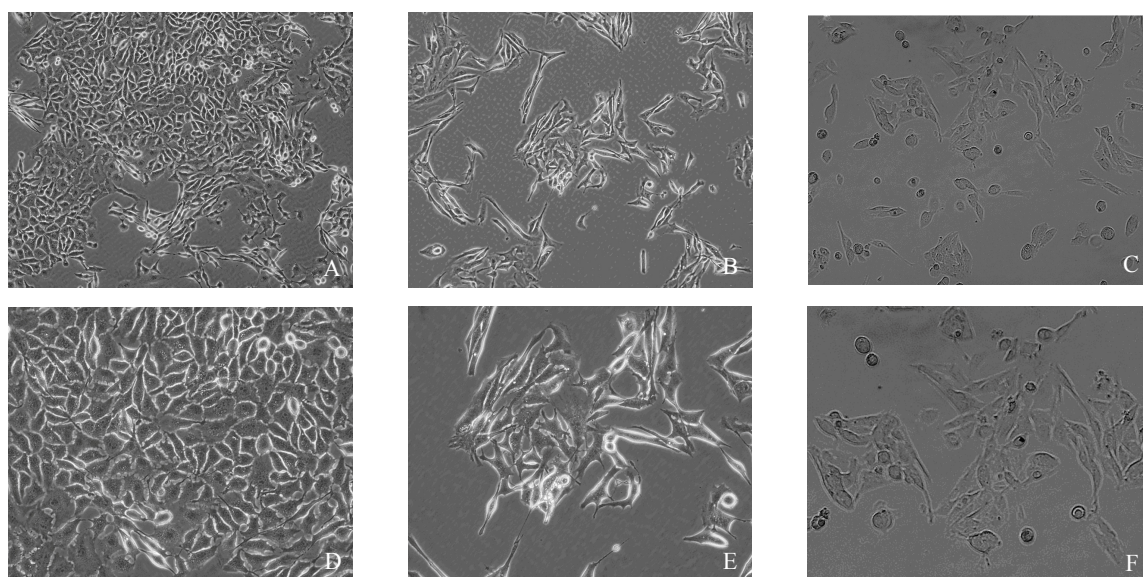
1.2.8 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行单因素方差分析和配对 t 检验.

2 结果

2.1 GCMRPs 对 B16-F10 细胞形态的影响

经不同浓度 GCMRPs 和 KA 处理细胞 48 h 后, 于倒置显微镜观察各组细胞形态变化(图 1). 从图



A 为空白对照组(40 $\times$); B 为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ KA 组(40 $\times$); C 为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GCMRPs 组(40 $\times$); D 为空白对照组(100 $\times$); E 为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ KA 组(100 $\times$); F 为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GCMRPs 组(100 $\times$)

图 1 GCMRPs 对 B16-F10 细胞形态的影响

1 可知, 正常 B16-F10 细胞为梭型成纤维状贴壁细胞, 且相互融合构成网状结构. 当给药浓度为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, GCMRPs 组细胞明显变圆, 树突状突起明显缩短, 部分细胞细胞核出现浓缩现象; 而 KA 组细胞明显变细变长, 树突增多.

2.2 GCMRPs 对 B16-F10 细胞增殖的影响

以相同浓度梯度的曲酸做阳性对照, 以不加任何样品为阴性对照, 结果见表 1. 由表 1 可以知道, GCMRPs、KA 均能降低 B16-F10 细胞株的增值率, 且随着样品浓度的增加, 细胞的存活率逐渐下降, 其增殖抑制率逐渐升高; 当 GCMRPs 达到 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, B16-F10 抑制率达 55.68%, 而相对 KA 只有 37.06%. 另外, 在较低浓度 ($65 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 时, KA 对 B16-F10 的增值率基本无影响, 而 GCMRPs 的抑制率为 19.15%, 显现一定的细胞毒性.

表 1 GCMRPs 对小鼠皮肤黑色素瘤细胞 B16-F10 增值率、酪氨酸酶活抑制率和黑色素合成抑制率影响($n=5$)

剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	组别	细胞增值率/%	酪氨酸酶抑制率/%	黑色素合成抑制率/%
62.5	GCMRPs	80.65 $\pm$ 8.38*	7.96 $\pm$ 3.17*	16.82 $\pm$ 1.71**
	KA	97.07 $\pm$ 3.03	11.29 $\pm$ 1.26*	26.21 $\pm$ 2.01**
125	GCMRPs	65.87 $\pm$ 8.22**	10.90 $\pm$ 4.20**	18.68 $\pm$ 4.09**
	KA	78.82 $\pm$ 5.69**	39.09 $\pm$ 3.19**	32.82 $\pm$ 2.53**
250	GCMRPs	53.42 $\pm$ 8.83**	28.71 $\pm$ 3.73**	25.08 $\pm$ 1.24**
	KA	70.14 $\pm$ 4.32**	55.18 $\pm$ 1.75**	58.93 $\pm$ 1.71**
500	GCMRPs	44.32 $\pm$ 4.92**	52.51 $\pm$ 1.12**	42.31 $\pm$ 1.76**
	KA	62.94 $\pm$ 9.98**	62.18 $\pm$ 1.68**	63.57 $\pm$ 3.22**
1 000	GCMRPs	37.24 $\pm$ 1.91**	57.53 $\pm$ 3.08**	48.65 $\pm$ 1.87**
	KA	59.04 $\pm$ 3.43**	64.99 $\pm$ 1.28**	76.99 $\pm$ 1.87**

注: *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$.

2.3 GCMRPs 对 B16-F10 酪氨酸酶酶活及黑色素含量的影响

由表 1 知, GCMRPs 和 KA 均可显著降低 B16-F10 细胞黑色素含量及酪氨酸酶酶活, 且其抑制率都具浓度依赖性, 当给药浓度为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, GCMRPs 对 B16-F10 酪氨酸酶酶活抑制率及细胞黑色素含量分别为 52.51% 和 42.31%, 而同浓度 KA 则分别为 62.18% 和 63.57%, 说明 GCMRPs 粗提物抑制黑色素能力较 KA 略弱.

3 讨论

黑色素合成是一个复杂的酶促生化反应过程,

其中酪氨酸酶是黑色素生成的关键酶类, 因此对美白剂的研发, 往往利用对酪氨酸酶酶活的抑制来达到美白效果. 目前, 大量的酪氨酸酶抑制剂被用于美白剂配方中, 如氢醌、曲酸、熊果苷等^[5]. 但随着人们自我安全意识的提高, 这些配方慢慢被其他成分所取代. 曲酸是由真菌代谢物中提取的一种高效皮肤美白剂^[6], 但该成分有致敏作用, 可能还有致癌危险, 因此已遭到日本政府的禁止^[7-8]. GCMRPs 对体外酪氨酸酶具有显著的抑制作用, 可有效抑制黑色素的合成, 其抑制效率比曲酸更好(另文发表). 因此, 可用于进一步在细胞层面研究产物对黑色素合成的影响.

本研究以小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 为模型, 研究 GCMRPs 对 B16-F10 细胞形态、细胞毒性及黑色素合成的影响, 以此综合评估 GCMRPs 做为美白剂成分的可行性. 研究表明, GCMRPs 对 B16-F10 酪氨酸酶酶活及黑色素合成均有明显抑制作用, 但随着浓度的升高, 其对癌细胞增殖能力也逐渐增大, 细胞形态有很大的改变, 说明 GCMRPs 存在一定毒性. 与之相比, 曲酸的毒性较小. 目前, 对美拉德反应产物的毒性说法不一^[9], 但已有报道, 其细胞毒性或抑癌集中于低分子量的小分子产物 (<1 kDa), Chen 等^[10]的研究也证实了这点. 另外, Bartling 等^[11]研究发现, 美拉德反应产物可诱导癌细胞的凋亡或坏死, 因此 GCMRPs 对 B16-F10 细胞形态的这种改变是否是由于凋亡或坏死引起的还需进一步研究. 研究发现, 相同浓度药物对酪氨酸酶酶活抑制率与对黑色素合成抑制率不一致, 且部分差异较大, 表明黑色素合成可能不单单只有酪氨酸酶参与, 还可能与其他因素引起. 目前报道黑色素合成还与胞内 2 种酶 TRP-1、TRP-2 及胞外细胞因子有关^[12-13]. 同时酪氨酸酶经高尔基体糖基化加工后才具有活性, 并转运至细胞膜上^[14], 当细胞受到外界刺激时, 成熟的酪氨酸酶还将被降解^[15]. Park 等^[16]报道氨基葡萄糖就可通过抑制未成熟酪氨酸酶的糖基化而达到抑制黑素合成的功效. 因此, 就 GCMRPs 抑制黑色素合成机理还有待研究. GCMRPs 成分较复杂, 其能否应用于美白剂成分尚需进一步分离纯化, 并做临床实验.

参考文献:

[1] Chang T S. An updated review of tyrosinase inhibitors[J].

- International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10, 2440-2475.
- [2] Sehgal V N, Verma P, Srivastava G, et al. Melasma: Treatment strategy[J]. Journal of Cosmetic and Laser Herapy, 2011, 13(6):265-279.
- [3] Hamed S, Sriwiriyanon P, Mitchell A, et al. Comparative efficacy and safety of deoxyarbutin, a new tyrosinase-inhibiting agent[J]. Journal of Cosmetic Science, 2006, 57: 291-308.
- [4] Tu C X, Mao L, Lu S S, et al. Curcumin inhibits melanogenesis in human melanocytes[J]. Phytotherapy Research, 2012, 26:174-179.
- [5] 张建友, 方艳燕, 吴晓琴, 等. 天然活性美白化妆品研究现状及发展前景[J]. 精细化工, 2008, 25(1):72-75.
- [6] Parvez S, Kang M, Chung H S, et al. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries[J]. Phytotherapy Research, 2007, 21:805-816.
- [7] Petit L, Pierard G E. Skin-lightening products revisited[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2003, 25(4): 169-181.
- [8] Huh S, Jung E, Lee J, et al. Mechanism of melanogenesis inhibition by propafenone[J]. Archives of Dermatological Research, 2010, 302(7):561-565.
- [9] 曹治云, 陈旭征, 杜建. 美拉德产物的生物学效应研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(7):1491-1495.
- [10] Chen X M, Kitts D D. Antioxidant and anti-inflammatory activities of maillard reaction products isolated from sugar-amino acid model systems[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2011, 59(20), 11294-11303.
- [11] Bartling B, Rehibein G, Somaza V, et al. Maillard reaction products-rich food impair cell proliferation and induce cell death in vitro[J]. Apoptosis Experiment Dermatology, 2005, 14:601-608.
- [12] Olivares C, Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins[J]. Pigment Cell Melanoma Research, 2009, 22:750-760.
- [13] Costin G E, Hearing V J. Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress[J]. The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology, 2007, 21(4):976-994.
- [14] Imokawa G, Mishima Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells[J]. Cancer Research, 1982, 42: 1994-2002.
- [15] Jeong H S, Choi H R, Yun H Y, et al. Cetamide PC102 inhibits melanin synthesis via proteasomal degradation of microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2013, 375(1):81-87.
- [16] Park K C, Huh S Y, Choi H R, et al. Biology of melanogenesis and the search for hypopigmenting agents[J]. Dermatologica Sinica, 2010, 28:53-58.

Inhibitory Effect of Glucosamine-cysteine Maillard Reaction Product on B16-F10 Murine Skin Melanoma Cell Line

LIN Xiao-zhang, LIU Bi-qian*, ZHOU Xiang-chi, ZHANG Si-si, SONG Li-qing

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To assess the effect of glucosamine-cysteine Maillard reaction product (GCMRPs) on melanogenesis of B16-F10 melanoma cell line, different concentrations of GCMRPs are incubated with B16-F10 cell. The change in cell morphology, cell viability, tyrosinase activity and melanin content is investigated and measured respectively. The results show that GCMRPs exhibits obviously inhibitory effect in the biosynthesis of melanin with an inhibition of 43.21% in $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, but it also has more cytotoxicity than kojic acid with the same concentration level. Therefore, the application of GCMRPs in skin-lightening should be further studied.

Key words: melanin; tyrosinase; cysteine; glucosamine; Maillard reaction product

(责任编辑 史小丽)