

# 龙眼果核中没食子酸的体外美白作用及机制探索

黄海潮, 郑公铭\*, 张小红, 聂阳, 巫玮  
(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

**[摘要]** **目的:**观察从龙眼果核中提取分离的没食子酸对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的作用及对其黑色素合成的影响,探索其作用机制。**方法:**体外培养小鼠黑色素瘤 B16 细胞,利用不同质量浓度没食子酸处理一定时间,采用四甲基唑氮蓝(MTT)法观察其对细胞增殖的影响,测定细胞内黑色素的含量变化,观察没食子酸对黑色素合成的影响;通过形态学观察,Hoechst 33342 染色法及逆转录聚合酶链式反应判断药物抑制细胞的作用方式以及对细胞中酪氨酸酶表达变化的影响,研究其减少黑色素分泌的作用机制。**结果:**当没食子酸质量浓度 1~64 mg·L<sup>-1</sup>时,药物对 B16 细胞抑制作用变化明显,药物作用 24,48,72 h 时的半抑制浓度分别为 32.29,22.47,18.68 mg·L<sup>-1</sup>。没食子酸能明显减少 B16 细胞中黑色素的含量,在一定范围内,与药物作用的质量浓度及作用时间呈正相关;其对 B16 细胞的抑制作用及黑色素分泌的影响在不同质量浓度下通过不同方式起作用,在较低质量浓度(≤16 mg·L<sup>-1</sup>)时,药物通过凋亡的方式起抑制作用,在较高质量浓度(>16 mg·L<sup>-1</sup>)时,其通过直接杀伤的方式起抑制作用;在没食子酸质量浓度≤32 mg·L<sup>-1</sup>时,能明显减少 B16 细胞中酪氨酸酶的表达。**结论:**没食子酸对 B16 细胞具有明显的抑制作用,并可降低细胞中黑色素的含量。没食子酸对 B16 细胞中酪氨酸酶表达具有明显抑制作用。

**[关键词]** 没食子酸; 龙眼; 美白作用; 分子机制; 细胞凋亡; 半抑制浓度

**[中图分类号]** R285.5;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0121-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190121

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150824.0954.004.html>

**[网络出版时间]** 2015-08-24 9:54

***In Vitro* Whitening Effect and Mechanism of Gallic Acid from *Dimocarpus longan* Stone** HUANG Hai-chao, ZHENG Gong-ming\*, ZHANG Xiao-hong, NIE Yang, WU Wei (Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study effect and mechanism of gallic acid which extracted and separated from *Dimocarpus longan* stone on melanin synthesis of B16 cells. **Method:** Cultured mouse melanoma B16 cells *in vitro*, and treated with different concentrations of gallic acid in different time. Its effect on B16 cells proliferation was observed by MTT assay, content change of B16 cells melanin was determined to observe effects of gallic acid on melanin synthesis. By morphological observation, Hoechst 33342 staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were adopted to determine inhibition ways of gallic acid on B16 cells, and changes of tyrosinase expression in B16 cells. Mechanism of gallic acid on B16 cells melanin secretion was investigated. **Result:** Gallic acid had inhibitory effects on B16 cells significantly at the concentration range of 1-64 mg·L<sup>-1</sup>, half inhibiting concentration (IC<sub>50</sub>) of gallic acid on B16 cells growth were 32.29, 22.47, 18.68 mg·L<sup>-1</sup> after treated for 24, 48, 72 h, respectively. Gallic acid significantly reduced melanin synthesis in B16 cells, and had positively related with concentration and acting time in a certain range. Inhibitory effect of gallic acid on B16 cells and melanin synthesis in different ways with different concentrations. At low concentrations (≤16 mg·L<sup>-1</sup>), its inhibitory effect through apoptosis, at high concentration (>16 mg·L<sup>-1</sup>), its inhibitory effect through cell directly killing way. When the concentration of gallic acid≤32 mg·L<sup>-1</sup>, it significantly reduced expression of tyrosinase in B16 cells. **Conclusion:** Gallic acid has obvious inhibitory effect on B16 cells and can reduce the

**[收稿日期]** 20150320(008)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2010B020312006);广东省中医药管理局科研项目(20121105)

**[第一作者]** 黄海潮, 硕士, 实验师, 从事药物活性以及功能研究, Tel:020-28854990, E-mail: huanghac@gdyzy.edu.cn

**[通讯作者]** \* 郑公铭, 博士, 教授, 从事物质提取分离研究, Tel:020-28854943, E-mail: zhenggm@gdyzy.edu.cn

content of melanin in B16 cells. Gallic acid has obvious inhibitory effect on tyrosinase expression in B16 cells.

[Key words] gallic acid; *Dimocarpus longan*; whitening; molecular mechanism; apoptosis; half inhibiting concentration

传统美白剂对皮肤有刺激性、致敏性、腐蚀性,甚至毒性作用<sup>[1]</sup>,严重影响着消费者的身体健康,寻找天然植物美白剂成为了国内外学者的研究热点。我国具有丰富的中草药资源,但关于美白剂的研究与开发相对于国外要滞后,具有很大的开发潜力。龙眼的果核具有止血、定痛、理气、化湿的功效,且能治创伤出血、疝气、疥癣、湿疮等<sup>[2]</sup>。研究发现龙眼果核的总多酚提取物具有较好的抑制酪氨酸酶活性,并分离纯化制得纯度达 99% 的没食子酸。没食子酸易溶于水,具有抗氧化、抑菌、抗自由基等生物活性<sup>[3-4]</sup>及抗肿瘤作用,可抑制肥大细胞瘤的转移,延长生存期<sup>[5]</sup>;也是杀锥虫候选药物<sup>[6]</sup>;对肝脏具有保护作用,可抵抗四氯化碳诱导的肝脏生理和生化转变<sup>[7]</sup>;可通过抑制内皮 NO 的生成诱导血管内皮依赖性收缩和对内皮依赖性松弛<sup>[8]</sup>。本实验选择与人体黑色素细胞生理上较为接近的小鼠黑色素瘤 B16 细胞为研究模型,探索没食子酸的体外美白作用及其机制,为没食子酸的深入开发研究提供理论基础。

## 1 材料

MyCycler™ 680 型温度梯度 PCR 仪和 Gel 100 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),TD3(800B)型水平离心机(湘仪离心机厂),DMIL 型荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司),311 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱和 MSC-Advantage1.2 型二级生物安全柜(美国 Thermo 公司),Microplate Reader 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),DYY-2C/DYCP-31DN 型琼脂糖凝胶电泳仪(北京六一公司)。小鼠黑色素瘤 B16 细胞(中国医学科学院细胞研究所),没食子酸(自制,经 RP-HPLC 分析纯度 99%,结构经 ESI-MS,<sup>1</sup>H-MR 和 <sup>13</sup>C-NMR 确定),RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(FBS,杭州四季青公司),胰蛋白酶(美国 Amresco 公司),四甲基唑氮蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购自美国 Sigma 公司,磷酸缓冲液(PBS,pH 7.2,杭州吉诺公司),逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒购自北京鼎国公司。

## 2 方法与结果

**2.1 没食子酸溶液配制** 将提取纯化的没食子酸溶于无血清 RPMI-1640 培养基中,配成 128 mg·L<sup>-1</sup> 母液,用无菌微孔滤膜过滤除菌,备用。

**2.2 细胞培养、传代**<sup>[9-10]</sup> 将 B16 细胞接种于含有 10% FBS,100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素,0.1 g·L<sup>-1</sup> 硫酸链霉素的 RPMI-1640 培养基,于 37 ℃,饱和湿度,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h 后换液 1 次,细胞接种第 3 天用 0.25% 胰酶消化传代,细胞传代至第 4 代,取对数生长期细胞进行实验。取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶消化,细胞计数,制成 4 × 10<sup>4</sup> 个/mL 单细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔加入单细胞悬液 100 μL,接种 24 h,将培养基换成无血清 RPMI-1640 培养基,待用。

**2.3 试验分组** 设置对照和试验组,每组 3 个平行复孔,没食子酸终质量浓度分别为 1,2,4,8,16,32,64,128 mg·L<sup>-1</sup>,于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度条件下培养,分别设了 24,48,72 h 作用时间组。

**2.4 没食子酸对细胞增殖的抑制率**<sup>[10]</sup> 采用 MTT 法检测。将作用时间已到的细胞小心弃去上清,每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶液,于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续作用 4 h,轻轻吸去上清,加入 DMSO 80 μL,振荡 10 min,于 492 nm 处测定吸光度 A,按抑制率 = (1 - A<sub>试验组</sub>/A<sub>对照组</sub>) × 100% 计算抑制率,见图 1。结果显示没食子酸对 B16 细胞有明显的抑制作用,且抑制作用与药物的作用时间、质量浓度呈正相关。当药物质量浓度达 16 mg·L<sup>-1</sup> 时,曲线斜率增大,表明药物的抑制作用明显增强;在药物质量浓度达 64 mg·L<sup>-1</sup> 时,曲线斜率趋于平缓,表明该质量浓度接近药物的最大作用质量浓度,经曲线拟合确定没食子酸作用 24,48,72 h 的半抑制浓度(half inhibiting concentration, IC<sub>50</sub>)分别为 32.29,22.47,18.68 mg·L<sup>-1</sup>。

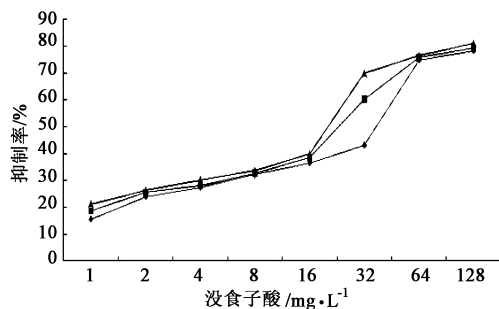


图 1 没食子酸对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的抑制率

Fig.1 Inhibition rate of gallic acid on mouse melanoma B16 cells

**2.5 没食子酸对细胞黑色素合成的影响**<sup>[11]</sup> 采用

NaOH裂解法测定。将作用时间已到的细胞用胰酶消化,用PBS洗2遍,调整细胞数至 $1 \times 10^5$ 个/mL,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠(含10% DMSO)  $100 \mu\text{L}$ 于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴2 h,于405 nm处测定A,分析没食子酸对B16细胞黑色素合成的影响,见图2。结果说明没食子酸对B16细胞黑色素的合成有明显抑制作用,A在 $1 \sim 64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 变化明显,当药物质量浓度达 $64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,曲线变化趋缓,表明该质量浓度对黑色素的抑制作用接近最大值。

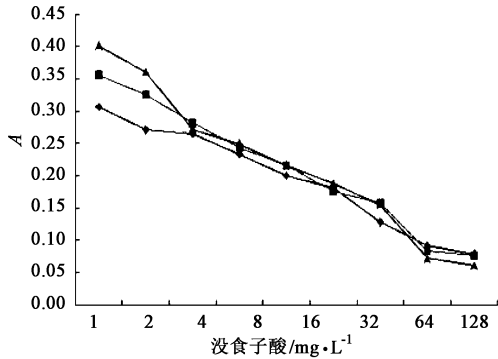
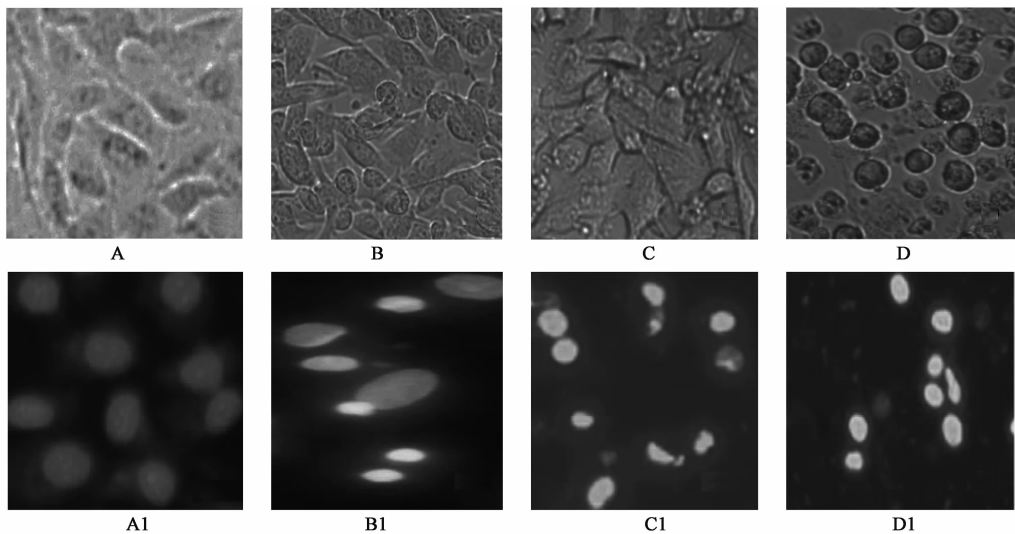


图2 没食子酸对小鼠黑色素瘤 B16 细胞黑色素分泌的影响  
Fig.2 Effect of gallic acid on melanin secretion of mouse melanoma B16 cells

2.6 荧光检测细胞凋亡情况 取对数生长期的 B16 细胞用胰蛋白酶消化后接种于 30 mm 培养皿中,培养至细胞完全贴壁且汇合度 80% ~ 90%。根

据 2.4 项下结果,设置高 ( $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),中 ( $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),低 ( $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 质量浓度没食子酸组和对照组。药物作用 48 h 后,用 PBS 冲洗 2 遍,用  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Hoechst 33342 对细胞染色 10 min,运用荧光显微镜观察细胞情况,见图 3。Hoechst 33342 能少许进入正常细胞膜,使其染上低蓝色,而凋亡细胞的膜通透性增强,因此进入凋亡细胞中的 Hoechst 33342 比正常细胞的多,荧光强度要比正常细胞高。此外,凋亡细胞的染色体 DNA 的结构发生了改变,从而使该染料能更有效地与 DNA 结合。正常的 B16 细胞为梭形或不规则形,其 Hoechst 核染为低亮蓝色,为正常细胞核;通过对细胞 Hoechst 33342 染色及细胞图片对比,发现在质量浓度  $< 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞出现明显凋亡的状态,在该质量浓度范围内,部分细胞变形,Hoechst 核染结果显示细胞凋亡明显且细胞的凋亡数量与药物质量浓度呈正相关;在药物质量浓度达  $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞呈圆形,周围出现明显的细胞碎片,表明在该质量浓度下多数细胞因药物的直接杀伤作用,细胞破裂呈碎片状。说明药物在不同质量浓度下对 B16 细胞的作用方式不同,在较低质量浓度 ( $\leq 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的情况下,没食子酸主要以凋亡的方式抑制 B16 细胞生长;在较高质量浓度时 ( $> 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时,以杀伤的方式抑制 B16 细胞的生长。



A, A1. 对照组; B, B1. 没食子酸  $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; C, C1. 没食子酸  $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; D, D1. 没食子酸  $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

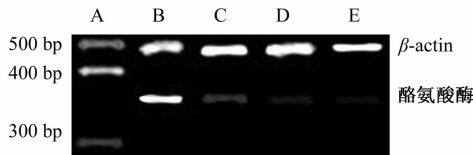
图3 不同质量浓度没食子酸对小鼠黑色素瘤 B16 细胞形态的影响(免疫荧光,  $\times 400$ )

Fig.3 Effects of different concentrations of gallic acid on B16 cells morphology (IF,  $\times 400$ )

2.7 没食子酸对 B-16 细胞中酪氨酸酶 mRNA 表达的影响<sup>[12]</sup> 取对数生长期的 B16 细胞用胰蛋白酶消化后,接种于 30 mm 培养皿,培养至细胞完全贴

壁且汇合度达 80% ~ 90%。设置高 ( $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),中 ( $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),低 ( $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 质量浓度没食子酸组和对照组。药物作用 48 h 后按 Trizol 抽提试剂盒

说明书提取总 RNA, 逆转录反应体系 10  $\mu$ L。参照文献[12]设计引物, 内参  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为上游 5'-TCAGAAGGACTCCTATGTG-3', 下游 5'-TCTCTTTGATGTCACGCAC-3', 扩增产物长度 500 bp。酪氨酸酶为上游 5'-TTCAAAGGGGTGGATGACC-3', 下游 5'-GACACATAGTAATGC ATCC-3', 长度 319 bp。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物 4  $^{\circ}$ C 保存。产物加至 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。利用凝胶成像扫描系统分析。酪氨酸酶是黑色素形成过程中主要的限速酶, 其活性大小决定着黑色素形成的数量, 酪氨酸酶活性强, 黑色素形成多。检测不同质量浓度没食子酸对酪氨酸酶表达的影响, 见图 4。结果显示随着没食子酸质量浓度的增大, 酪氨酸酶表达逐渐减少, 在高质量浓度情况下,  $\beta$ -actin 的表达较少, 可能是因为在该质量浓度下, 细胞数量减少所引起的表达降低。



A. Marker; B. 对照组; C. 没食子酸 8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; D. 没食子酸 16  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; E. 没食子酸 32  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 4 没食子酸对小鼠黑色素瘤 B16 细胞中酪氨酸酶表达的影响  
Fig. 4 Effect of gallic acid on tyrosinase expression in mouse melanoma B16 cells

### 3 讨论

皮肤颜色主要受黑色素的数量和分布的影响, 黑色素合成的速度和数量主要受酪氨酸酶调节。酪氨酸酶有酪氨酸羟化酶、多巴氧化酶和 5,6-二羟基吲哚氧化酶的活性, 可以将底物酪氨酸氧化为多巴、多巴醌, 是黑色素合成的主要限速酶<sup>[12]</sup>。本文选择小鼠黑色素瘤 B16 细胞为模型, 研究龙眼核提取物——没食子酸对黑色素合成的影响。结果揭示没食子酸有明显抑制黑色素分泌的作用, 体外美白作用明显。其抑制黑色素分泌主要通过抑制 B16 细胞增殖方式起作用。没食子酸抑制黑色素分泌的细胞作用机制在不同质量浓度下通过不同方式进行。RT-PCR 结果揭示没食子酸在 B16 细胞上作用的分子机制主要通过抑制酪氨酸酶在 B16 细胞中的表达, 黑色素分泌下降, 从而引起细胞的凋亡或损伤, 最终抑制细胞的生长。

没食子酸作为一种多酚类成分广泛存在于植物

体内。植物多酚在美容护肤中具有独特生理活性, 并因其来源于天然植物, 使用安全, 日益受到消费者的欢迎<sup>[13]</sup>。前期提取并测定了广东茂名储良龙眼干果核的化学成分, 得到了含量丰富的没食子酸, 并对其美白作用进行了较深入的研究, 其美白作用及美白机制研究目前还鲜见文献报道, 本项目的深入研究将通过分子生物学探讨其抑制酪氨酸酶表达和酪氨酸酶相关蛋白的关系, 丰富其美白理论, 使龙眼果核资源得到充分的开发与利用。

#### [参考文献]

[1] 王颖异, 郭宝林, 张立军. 具有美白祛斑活性植物成分的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(11): 5-9.  
[2] Zheng G M, Wu P, Xie H H, et al. Polyphenols from longan seeds and their radical scavenging activities[J]. Food Chem, 2009, 116(2): 433-436.  
[3] 张雅丽, 李建科, 刘柳, 等. 五倍子没食子酸研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 30(10): 386-390.  
[4] 李肖玲, 崔岚, 祝德秋. 没食子酸生物学作用的研究进展[J]. 中国药师, 2004, 7(10): 767-769.  
[5] Koide T, Nose M M, Ogihara Y, et al. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds[J]. Planta Med, 1998, 64(1): 27-30.  
[6] Ohno T, Inoue M, Ogihara Y. Cytotoxic activity of gallic acid against liver metastasis of mastocytoma cells P-815[J]. Anticancer Res, 2001, 21(6A): 3875-3880.  
[7] Anand K K, Singh B, Saxena A K, et al. 3, 4, 5-Trihydroxy benzoic acid (gallic acid), the hepatoprotective principle in the fruits of Terminalia bellerica-bioassay guided activity[J]. Pharmacol Res, 1997, 36(4): 315-321.  
[8] Sanae F, Miyaichi Y, Hayashi H. Endothelium-dependent contraction of rat thoracic aorta induced by gallic acid[J]. Phytother Res, 2003, 17(2): 187-189.  
[9] 林菁, 彭华毅. 黄葵素诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞凋亡的研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1630-1634.  
[10] 张春香, 尹鸿萍. 几种美白活性物质对酪氨酸酶活性的体外抑制作用及细胞毒性[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(2): 72-75.  
[11] 喻丽红, 张超, 谭茵. 和厚朴酚对小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖以及黑色素合成的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(4): 439-441.  
[12] 赵京霞, 张蕾, 李萍, 等. 滋补肝肾方含药血清对小鼠黑色素瘤细胞酪氨酸酶活性及表达的调节作用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2567-2570.  
[13] 闵凡芹, 王成章. 微生物转化法生产没食子酸的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 236-242.

[责任编辑 刘德文]