



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170306

## 植物乳杆菌 CGMCC8198 破碎上清液对 黑色素生成的抑制作用

张彩姣, 俞晓亭, 潘丽娟, 周浩, 张同存, 罗学刚

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 黑色素是由黑色素细胞合成的一种生物色素, 能避免皮肤被紫外线灼伤, 过度增长或分布不均会影响美观, 导致老年斑、雀斑、黑斑病等病症。通过对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CGMCC8198 破碎上清液 (LAS) 的抗氧化和黑色素生成抑制活性进行检测, 结果表明: LAS 能明显清除 ABTS 和 DPPH 自由基, 并显著降低小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 内黑色素的生成, 且对细胞活性几乎无影响。LAS 可降低细胞内的黑色素生成关键酶——酪氨酸酶的活性, 而对细胞外酪氨酸酶的活性则无影响。通过实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)、免疫印迹实验 (Western blot) 和荧光素酶报告基因检测分析, 结果表明: LAS 能够抑制酪氨酸酶和其相关蛋白家族成员 TRP-1、TRP-2 及该家族上游关键转录调控因子小眼畸形相关转录因子 (MITF) 的转录表达; 抑制 MITF 以及 TYR 启动子转录活性。

**关键词:** 植物乳杆菌; 黑色素; 抗氧化; MITF

中图分类号: TQ658 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2019)03-0015-07

### Inhibitory Effect of *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 Lysis Supernatant on Melanogenesis

ZHANG Caijiao, YU Xiaoting, PAN Lijuan, ZHOU Hao, ZHANG Tongcun, LUO Xuegang

(Key Lab of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Melanin is a biological pigment synthesized by melanocytes, which can prevent the skin from being burned by UV rays. Overgrowth or uneven distribution of melanin can affect the appearance and lead to senile plaques, freckles, black spots and other diseases. The antioxidization ability and melanogenesis inhibition of the cell lysis supernatant (LAS) prepared from *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 were tested. LAS can clearly scavenge free radicals ABTS and DPPH. In B16F10 melanoma cells, LAS significantly reduced the intracellular melanin production, but did not affect the cell activity. Then, the effects of LAS on the activity of tyrosine and the key enzyme of melanin production were analyzed. LAS reduced the activity of intracellular tyrosinase and had no effect on the activity of extracellular tyrosinase. The effect of LAS was analyzed by RT-PCR, Western blot and Luciferase reporter assay. LAS could inhibit not only the transcription and expression of tyrosinase, tyrosinase-related protein TRP-1 and TRP-2, but also their key regulation factor MITF. The results of luciferase reporter assay show that LAS could inhibit the promoter activity of both TYR and MITF.

**Key words:** *L. plantarum*; melanogenesis; anti-oxidation; MITF

黑色素是由黑色素细胞合成的一种生物色素, 能够保护细胞 DNA, 避免皮肤被紫外线灼伤, 但其过速增长或分布不均会导致皮肤局部黑色素沉积过度, 导

致老年斑、雀斑、黑斑病等病症<sup>[1-2]</sup>。酪氨酸相关蛋白 (TRPs) 家族和小眼畸形相关转录因子 (MITF) 是影响黑色素生成最重要的分子, TRPs 家族包括酪氨酸酶

收稿日期: 2017-11-09; 修回日期: 2018-01-19

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2017YFD0400303); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2012AA022108)

作者简介: 张彩姣 (1991—), 女, 河北人, 硕士研究生; 通信作者: 罗学刚, 教授, luoxuegang@tust.edu.cn

(TYR)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (TRP-1) 和酪氨酸酶相关蛋白 2 (TRP-2). TYR 是黑色素生成过程中的限速酶, 其表达和活性决定着黑色素生成的速度和数量; MITF 对 TYR、TRP-1 和 TRP-2 的转录调控至关重要. 目前市场上很大一部分美白剂的机理都是抑制酪氨酸酶的活性<sup>[3]</sup>, 常用的美白成分有熊果苷、曲酸、维生素 C 及其衍生物等<sup>[4]</sup>. 虽然应用广泛, 但也存在一些副作用, 比如曲酸的细胞毒性会导致皮炎甚至癌症<sup>[5-6]</sup>, 维生素 C 的稳定性差等, 致使其应用都不是很完美. 此外, 一些氧化剂如阳光、烟雾中的紫外线 (UV) 引起的活性氧 (ROS) 也会导致皮肤黑色素沉积过多<sup>[7]</sup>. 体内过量的自由基可引发疾病和提前衰老<sup>[8]</sup>, 它可以刺激黑色素激活因子如 PGE2 和  $\alpha$ -MSH 的分泌, 从而促进黑色素合成<sup>[9]</sup>. 一些 ROS 清除剂或抑制剂可以减少黑色素生成和皮肤色素沉着, 例如应用还原型谷胱甘肽 (GSH) 和抗坏血酸衍生物来治疗色素沉着过度等问题<sup>[10-11]</sup>.

大多数乳酸菌无毒、无害, 并且乳酸菌菌体及其代谢产物具有较强的抗氧化活性<sup>[12]</sup>. 它的抗氧化活性主要是指对超氧阴离子自由基 ( $O_2^-$ )、羟自由基 (OH $\cdot$ ) 和 1, 1-二苯基-2-苦味肼基自由基 (DPPH) 的清除作用及抗脂质过氧化性<sup>[13-14]</sup>. Liu 等<sup>[15]</sup>研究表明人体摄入某些乳酸菌后, 不仅可以降低活性氧的累积, 而且可以降低  $O_2^-$  和过氧化氢的浓度. Kullisssr 等<sup>[16]</sup>发现大多数乳酸菌是通过产生 SOD 酶和 GSH 而具有清除 OH $\cdot$  和过氧化氢的能力. 一些乳酸菌由于菌株中 NADH 和 NADPH 作用, 还具有还原活性<sup>[17]</sup>.

植物乳杆菌 (*L. plantarum*) CGMCC8198 具有很好的降血脂、降血糖等功效<sup>[18-20]</sup>, 但其在抑制黑色素形成及美容护肤等领域的作用尚不清楚. 本文采用小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 为模型, 验证植物乳杆菌 (*L. plantarum*) CGMCC8198 其菌体破碎上清液 (LAS) 对黑色素生成的抑制效果.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

植物乳杆菌 (*L. plantarum*) CGMCC8198、非洲绿猴肾成纤维细胞 COS-7 和 pGL3-Basic 载体均为本实验室保藏, 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 购自中国科学院上海细胞生物学研究所.

#### 1.1.2 试剂与仪器

DPPH、2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺

酸)二铵盐 (ABTS)、噻唑蓝 (MTT)、曲酸、左旋多巴 (L-DOPA)、蘑菇酪氨酸酶和二甲基亚砷 (DMSO), 美国 Sigma-Aldrich 公司; TYR、TRP-1、TRP-2 和 MITF 的抗体, 美国 Abcam 公司.

Synergy 多功能微孔方板检测仪, 美国 Biotek 公司; CO<sub>2</sub> 恒温培养箱, 美国 Thermo Forma 公司; ECLIPSE TS100-F 型倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; StepOnePlus Real-time PCR 仪, 美国 ABI 公司; Odyssey 红外激光成像系统, 美国 Li-cor Biosciences 公司.

### 1.2 样品制备

-80 °C 保藏的植物乳杆菌以 1% 的接种量接入 10 mL MRS 培养基中, 37 °C 厌氧培养箱中培养至  $10^8$  mL<sup>-1</sup>. 连续活化 3 代后, 将植物乳杆菌 CGMCC8198 的菌液于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液. 将得到的菌体用 PBS 洗 2 次, 重复离心, 最终用与原始培养基等体积的 PBS 将菌体重悬进行超声破碎. 超声条件: 振幅 300, 超声 3 s 停 4 s, 超声时间 30 min. 菌体破碎上清液 (LAS) 用 0.22  $\mu$ m 针式过滤器过滤, -20 °C 冰箱保存.

### 1.3 抗氧化能力测定

ABTS 工作液的配制: 称取 ABTS 粉末 38.4 mg, 用 PBS 定容至 10 mL, 得 7 mmol/L 溶液; 称取过硫酸钾 37.8 mg, 用 1 mL 去离子水溶解, 得 140 mmol/L 溶液; 将 10 mL 7 mmol/L ABTS 溶液和 176  $\mu$ L 140 mmol/L 过硫酸钾溶液混合, 在室温、避光条件下静置过夜, 形成 ABTS<sup>+</sup> 储备液. 使用前用 PBS 稀释成工作液, 要求其在 734 nm 下的吸光度为  $0.7 \pm 0.02$ .

DPPH 工作液的配制: 称取 DPPH 粉末 3.944 mg, 用甲醇溶解并定容至 20 mL, DPPH 浓度为 0.5 mmol/L, 4 °C 避光保存. 使用前用甲醇稀释成工作液, 反应物在 514 nm 下测定吸光度.

ABTS 清除实验: 取不同浓度的 LAS 样品 100  $\mu$ L, 加入到 100  $\mu$ L ABTS 工作液中, 混匀, 37 °C 避光孵育 30 min. 以 PBS 为空白对照, 在 734 nm 下测定吸光度 ( $A$ ). 以曲酸作为阳性对照组, ABTS 清除率按照式 (1) 计算.

$$\text{ABTS清除率} = \left(1 - \frac{A}{0.7}\right) \times 100\% \quad (1)$$

DPPH 清除实验: 取不同浓度的 LAS 样品和甲醇各 100  $\mu$ L, 分别加入到 100  $\mu$ L DPPH 工作液中, 混匀, 37 °C 避光孵育 30 min, 以甲醇为空白对照 ( $A_0$ ), 在 514 nm 下测定 LAS 样品的吸光度 ( $A_1$ ). 取不同浓

度的 LAS 样品 100  $\mu$ L, 加入到 100  $\mu$ L 甲醇中混匀, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 在 514 nm 下测定吸光度 ( $A_2$ ). 以曲酸作为阳性对照组, DPPH 清除率按照式 (2) 计算.

$$\text{DPPH清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

#### 1.4 黑色素含量的检测与细胞活力的测定

小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 和非洲绿猴肾成纤维细胞 COS-7 分别用 DMEM-HG 培养基和 F12 完全培养基培养, 加入体积分数为 10% 的胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液 (100  $\times$ ), 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养.

黑色素含量的检测: 将对数生长期的小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞接种于 6 孔板, 用 5%、10% 和 20% 的菌体破碎上清液 (LAS) 处理 B16F10 细胞 48 h, 观察培养基颜色变化. 用 NaOH 裂解法检测细胞内黑色素含量, 每孔加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 500  $\mu$ L, 65  $^{\circ}$ C 裂解 30 min, 用移液器将细胞液吹匀, 加入到 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 用酶标仪测定 490 nm 下吸光度.

细胞活力的测定: 采用 MTT 法测细胞活力. LAS 体积分数为 0%、5%、10%、20%, 800  $\mu$ mol/L 曲酸作为阳性对照, 将细胞与 LAS 样品孵育 48 h 后, 弃掉培养基, 用 5 mg/mL 的 MTT 溶液代替, 再培养 4 h. 去除 MTT 溶液, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 采用多功能微孔方板检测仪测定其在 490 nm 下的吸光度.

#### 1.5 酪氨酸酶活性的检测

##### 1.5.1 细胞内酪氨酸酶活性检测

取对数生长期的小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入含有不同体积分数 (0%、5%、10%、20%) LAS 的培养基, 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h. 用含有 1% Triton X-100 的 PBS 溶液裂解细胞, 与 10 mmol/L 的 L-DOPA 于 37  $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, 用酶标仪在 490 nm 下测定吸光度.

##### 1.5.2 细胞外蘑菇酪氨酸酶活性检测

用蘑菇酪氨酸酶检测了 LAS 是否对其有抑制作用, 检测方法参照文献[21]进行了一些改动. 向 96 孔板中每孔加入 40  $\mu$ L 10 mmol/L 的左旋多巴、40  $\mu$ L 125 单位的蘑菇酪氨酸酶、80  $\mu$ L PBS 和 40  $\mu$ L 不同浓度的 LAS 样品混合均匀, 曲酸作为阳性对照, 灭菌水作为阴性对照, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min, 490 nm 下测定吸光度.

#### 1.6 酪氨酸酶的转录表达

##### 1.6.1 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

使用 Trizol 试剂从培养的细胞中提取细胞总 RNA, 并使用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录. PCR 条件: 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 28 个循环. 反应结束分别取 6  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳.  $\beta$ -actin (199 bp) 上游引物 5'-CGTTGACATCCGTAAGACC-3', 下游引物 5'-GAAGGTGGACAGTGAGGC-3', 退火温度 56  $^{\circ}$ C; TYR (373 bp) 上游引物 5'-ACACCTGAGGGACCACTAT-3', 下游引物 5'-CATTGGCTTCTGGGTAAACT-3', 退火温度 54  $^{\circ}$ C; TRP-1 (264 bp) 上游引物 5'-GCCACAAGGAGTTAGAAGACA-3', 下游引物 5'-CCAGTAAGGAAGGGAGAAAGAG-3', 退火温度 58  $^{\circ}$ C; TRP-2 (360 bp) 上游引物 5'-AGAAGTTTGACAGCCCTCC-3', 下游引物 5'-CAAGTTGCTCTGCGGTAG-3', 退火温度 56  $^{\circ}$ C; MITF (162 bp) 上游引物 5'-AACGGGAACAGCAACGAGC-3', 下游引物 5'-TCAACAGATCAGGCGAGCA-3', 退火温度 54  $^{\circ}$ C.

##### 1.6.2 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

取对数生长期的黑色素瘤 B16 细胞接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 加入含有不同体积分数 (0%、5%、10%、20%) LAS 的培养基, 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h. 用 Bestar SybGreen qPCR Mastermix 进行扩增: 95  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环. 熔解曲线: 95  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s.

##### 1.6.3 免疫印迹实验 (Western blot)

弃掉细胞培养皿中的培养基, PBS 冲洗 2~3 次, 每孔加入 300  $\mu$ L 的细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 再用细胞刮刀刮下细胞, 收集在 EP 管中, 100  $^{\circ}$ C 煮沸 15 min; 取 40  $\mu$ L 样品进行 SDS-PAGE 电泳 (5% 浓缩胶, 电压 80 V; 12% 分离胶, 电压 120 V, 电泳时间 2~3 h), 电转移至醋酸纤维素膜上, 经水冲洗后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 然后加入兔抗 TYR、TRP-1、TRP-2、MITF 一抗抗体, TYR 和 MITF 稀释 1 000 倍, TRP-1 和 TRP-2 稀释 5 000 倍; 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜. 用 PBS 洗涤 3 次, 每 5 min 换液 1 次; 加入稀释 1 000 倍的 TRITC 标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, Odyssey 远红外成像系统分析.

#### 1.7 荧光素酶活性检测

在 COS-7 细胞中应用荧光素酶活性检测 LAS 对 pGL3-TYR 和 pGL3-MITF 质粒的抑制作用. 用含有 TYR 和 MITF 启动子的质粒转染 COS-7 细胞, 4 h

后将培养基换为含有不同浓度 LAS 的培养基,培养 24 h,利用 luci 裂解液裂解细胞,与 luci 底物反应,在多功能微孔检测仪上检测.

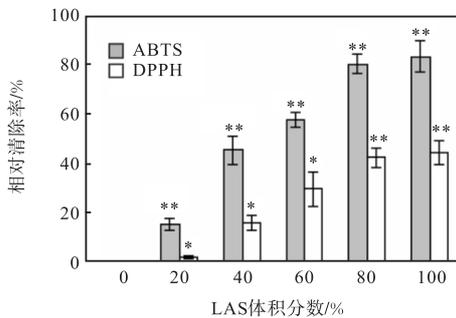
### 1.8 数据处理

实验数据使用 SPSS V13.0 软件处理;各组实验数据以“平均值 ± 标准差”表示. 组间统计学差异显著性比较采用 *t* 检验, \**P*<0.05 表示统计学上有显著性差异, \*\**P*<0.01 表示统计学上有极显著性差异.

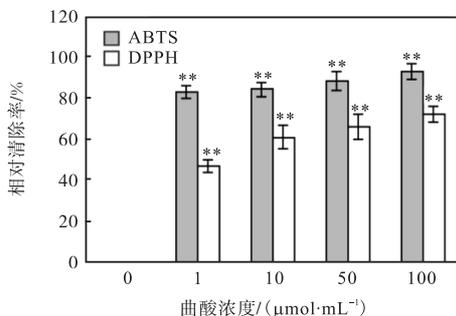
## 2 结果与分析

### 2.1 LAS的抗氧化作用

LAS 的抗氧化作用如图 1 所示. LAS 对 ABTS 和 DPPH 的清除能力随着加药量的增加而增强. 100%的 LAS 对 ABTS 的相对清除率为 82.65%, 对 DPPH 的相对清除率为 44.30%, 结果表明: LAS 对自由基有一定的清除作用,尤其是对 ABTS 的自由基清除能力很强. 曲酸对 ABTS 和 DPPH 自由基都有明显的清除作用,尤其是对 ABTS 的作用更加明显. 因此,以曲酸为对照,说明以该抗氧化体系检测 LAS 的抗氧化作用的结果合理.



(a) LAS 对 ABTS 和 DPPH 的清除作用



(b) 曲酸对 ABTS 和 DPPH 的清除作用

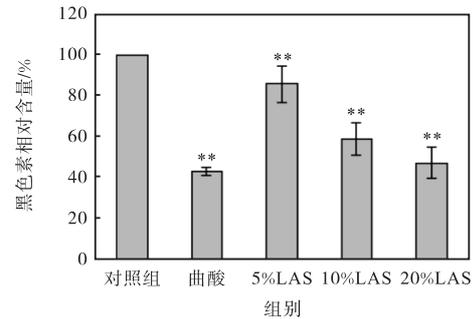
图 1 LAS 的抗氧化作用

Fig. 1 Antioxidant effect of LAS

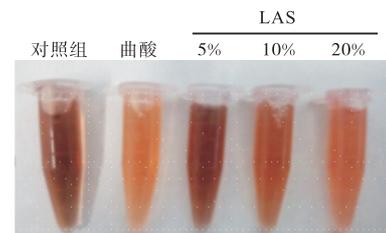
### 2.2 LAS对小鼠黑色素瘤细胞 B16F10的影响

LAS 对 B16F10 细胞活力和黑色素生成的影响

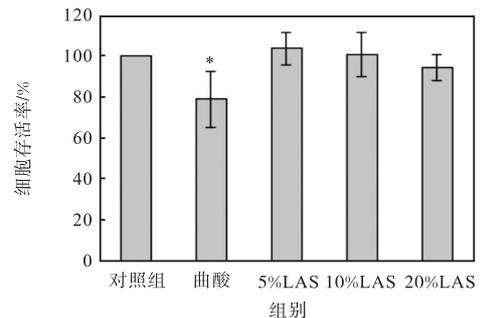
如图 2 所示.



(a) LAS 对黑色素瘤 B16F10 细胞的黑色素含量的影响



(b) LAS 对细胞培养基颜色的影响



(c) LAS 对黑色素瘤 B16F10 细胞增殖的影响

图 2 LAS 对 B16F10 细胞活力和黑色素生成的影响

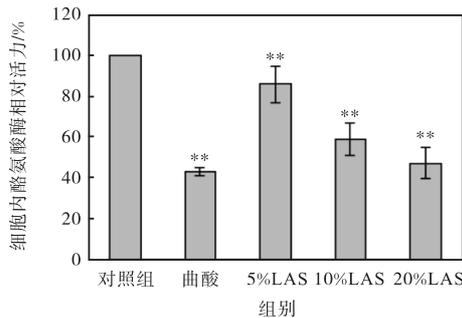
Fig. 2 Effects of LAS on B16F10 cell viability and melanin production

由图 2(a)可知,20%的 LAS 对细胞内黑色素的抑制效果接近于阳性对照曲酸的,说明 LAS 有一定的黑色素抑制作用. 同时,在用 NaOH 裂解法检测细胞内黑色素之前,将加不同体积分数 LAS 培养了 48 h 的细胞培养基收集于 EP 管中,对细胞培养基颜色的观察结果如图 2(b)所示. 从培养基颜色来看,随着加药浓度的增加,培养基颜色逐渐变浅. 与对照组相比,20%加药组培养基颜色明显变浅,说明细胞分泌的黑色素明显减少, LAS 对黑色素生成有一定的抑制作用. 由图 2(c)可知,随着加药量增加,细胞存活率有所降低;当加药量为 20%,细胞的存活率为 94.13%,说明细胞生长情况良好,加药不会对细胞数量造成严重影响. 阳性对照曲酸的加药量为 800 μmol/L,此浓度下细胞的存活率为 78.93%,虽然

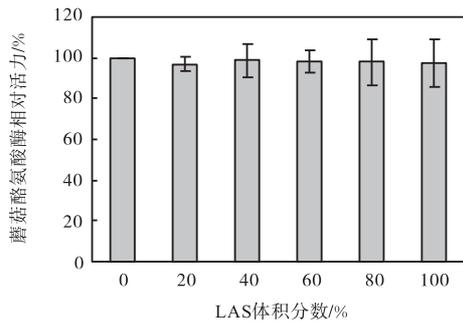
细胞有所死亡,但这个浓度的细胞存活率不会对后续实验造成严重影响。

### 2.3 LAS对酪氨酸酶活性的影响

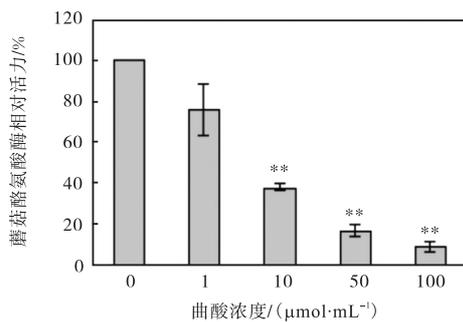
LAS 对酪氨酸酶活性的影响如图 3 所示. LAS 给药后明显抑制 B16F10 细胞内酪氨酸酶的活性,并且随着 LAS 给药浓度的增加而降低,当 LAS 的加药量为 20% 时,细胞内酪氨酸酶的抑制率为 39.95% (图 3(a)).



(a) LAS 对细胞内酪氨酸酶活性的影响



(b) LAS 对蘑菇酪氨酸酶活性的影响



(c) 曲酸对蘑菇酪氨酸酶活性的影响

图 3 LAS对酪氨酸酶活性的影响

Fig. 3 Effect of LAS on tyrosinase activity

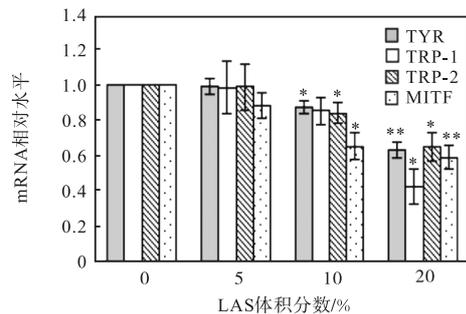
LAS 对细胞外酪氨酸酶活性的影响如图 3(b) 所示,随着 LAS 加药剂量的增加,蘑菇酪氨酸酶的活性并没有变化,LAS 并不能抑制蘑菇酪氨酸酶的活性.为了排除实验过程中一些试剂等外部因素的干扰,同时也用曲酸检测了对蘑菇酪氨酸酶活性的影

响,结果如图 3(c) 所示.曲酸能显著抑制蘑菇酪氨酸酶活性,100 μmol/mL 的曲酸能抑制 90.99% 的蘑菇酪氨酸酶活性.由图 3(b) 和图 3(c) 可以得出结论,LAS 并不能抑制酪氨酸酶自身的活性.综上所述说明 LAS 影响黑色素的生成并不是通过抑制酪氨酸酶自身的活性.

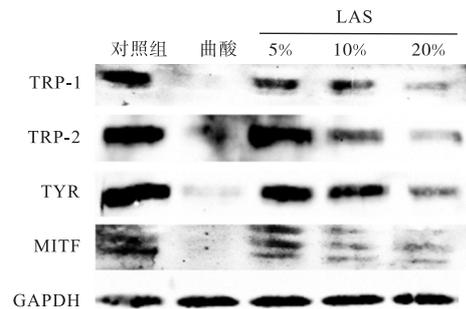
### 2.4 LAS对酪氨酸酶转录表达的影响

LAS 对酪氨酸酶转录表达的影响如图 4 所示.在 LAS 给药 48 h 后的 B16F10 细胞中,实时荧光定量 PCR 结果显示,LAS 能明显降低 TYR、TRP-1、TRP-2、MITF 的表达,且随着 LAS 给药量的增加,其抑制作用呈剂量依赖性增强.当 LAS 的加药量为 20% 时,对 TYR 的抑制率为 36.90%,对 TRP-1 的抑制率为 57.72%,对 TRP-2 的抑制率为 35.12%,对 MITF 的抑制率为 40.88% (图 4(a)).

LAS 给药 48 h 后,酪氨酸酶及其相关基因在蛋白水平上的表达明显下调,且呈剂量依赖性,蛋白水平结果(图 4(b))与转录水平相符.这表明 LAS 给药能够抑制黑色素生成相关基因的表达.



(a) 转录水平分析



(b) LAS 对酪氨酸酶基因家族蛋白水平的作用

图 4 LAS对酪氨酸酶转录表达的影响

Fig. 4 Effect of LAS on transcriptional expression of tyrosinase

### 2.5 LAS对 MITF 及 TYR 启动子转录活性的影响

为进一步验证 LAS 对黑色素生成的抑制机理,对 TYR 和 MITF 的启动子活性进行了检测,如图 5

所示. 加入 LAS 后能剂量依赖性的抑制 TYR 和 MITF 的启动子活性, 当 LAS 的体积分数为 20% 时, 对 MITF 的抑制率为 23.00%, 对 TYR 的抑制率为 40.45%. 结果可知, LAS 能抑制 MITF 和 TYR 的启动子转录活性.

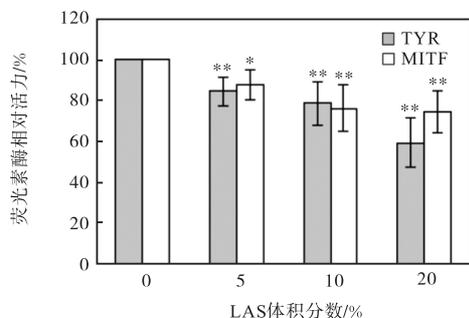


图5 荧光素酶活性分析 LAS 对 TYR 和 MITF 启动子的影响

Fig. 5 Effect of LAS on the promoter activity of TYR and MITF

### 3 讨论

由于黑色素在基底层异常蓄积, 导致人们遭受着黑斑病、雀斑等问题的困扰, 影响人们的生活质量. 随着对黑色素生物合成的不断研究, 研究者们发现了在黑色素合成过程中起关键作用的限速酶——酪氨酸酶, 酪氨酸酶抑制剂成了解决黑色素合成的重要手段, 一些美白产品也都加入了酪氨酸酶抑制剂. 但是, 大部分酪氨酸酶抑制剂的副作用也逐渐暴露出来, 如熊果苷的光敏性、曲酸和维生素 C 的低效能等情况. 冯荣楷等<sup>[22]</sup>对 643 个从文献及数据库中取得的酪氨酸酶抑制剂进行皮肤毒性研究, 发现其中约一半带有刺激性、腐蚀性或致癌性. 因此, 很有必要寻找更安全可用的酪氨酸酶抑制剂. 已有研究<sup>[23]</sup>表明, 从奶牛粪便中分离的乳酸菌菌株可用于开发酪氨酸酶抑制剂的潜在药物. 本研究中, LAS 可以抑制细胞内酪氨酸酶的活性, 且对细胞的生长几乎没有影响, 相比其他酪氨酸酶抑制剂来说使用更安全. 并且发现, LAS 对黑色素生成的抑制作用很可能是通过抑制 MITF 和 TYR 的启动子转录活性, 从而下调 TYR、TRP-1、TRP-2 及 MITF 的转录表达而发挥的.

黑色素的生成还与氧自由基有关. 研究<sup>[24]</sup>表明, 氧自由基通过刺激黑色素激活因子如 PGE2 和  $\alpha$ -MSH 的分泌来促进黑色素的合成, 导致色素沉着. 因此, 阻断或清除自由基也可以抑制黑色素的形成. 抗坏血酸、半胱氨酸等都是通过抗氧化性来抑制

黑色素合成的. 采用 ABTS 和 DPPH 自由基清除法对 LAS 的抗氧化活性进行了分析, 证明了 LAS 对自由基有一定的清除作用, 尤其是对 ABTS 的自由基清除活性很高. LAS 中对黑色素生成有抑制作用的功能组分尚不明确, 有研究<sup>[25]</sup>表明多糖类物质可以抑制酪氨酸酶活性, 且某些乳酸菌发酵产生的胞外多糖可以降低 B16 细胞黑色素产量, LAS 的主要功能组分可能是胞外多糖, 但仍尚需进一步研究.

### 4 结语

本研究证明了植物乳杆菌 CGMCC8198 的菌体破碎上清液具有很好的抗黑色素生成及抗氧化的功能, 并揭示了益生菌抑制黑色素形成的部分作用机制, 将为相关化妆品及功能产品的研发提供新思路.

### 参考文献:

- [1] Beani J C. Ultraviolet A-induced DNA damage: Role in skin cancer[J]. Bulletin de l'Académie nationale de médecine, 2014, 198(2): 273-295.
- [2] Sima V H, Patris S, Aydogmus Z, et al. Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: Application to the skin whitening agents[J]. Talanta, 2011, 83(3): 980-987.
- [3] Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2003, 16(2): 101-110.
- [4] 姚彬, 张莉莉, 任清. 皮肤黑色素的形成及美白剂美白机理[J]. 北京日化, 2007, 12(2): 18-22.
- [5] Draelos Z D. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy[J]. Dermatologic Therapy, 2007, 20(5): 308-313.
- [6] 陈永红, 邹志飞, 王岚, 等. 曲酸对动物的毒性研究及安全性评价[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 536-540.
- [7] Solano F, Briganti S, Picardo M, et al. Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2006, 19(6): 550-571.
- [8] Lin M Y, Yen C L. Antioxidative ability of lactic acid bacteria[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1999, 47(4): 1460-1466.
- [9] Chakraborty A K, Funasaka Y, Slominski A, et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) de-

- rived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: Regulation by ultraviolet B[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1996, 1313(2): 130–138.
- [ 10 ] Uraivan P, Vanida T, Tasanee O, et al. Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2011, 34(5): 811–820.
- [ 11 ] Quevedo W C, Holstein T J, Dyckman J, et al. Inhibition of UVR-induced tanning and immunosuppression by topical applications of vitamins C and E to the skin of hairless (hr/hr) mice[J]. *Pigment Cell Research*, 2000, 13(2): 89–98.
- [ 12 ] 张江巍, 曹郁生, 李海星, 等. 乳酸菌抗氧化活性及检测方法[J]. *中国乳品工业*, 2005, 33(9): 53–56.
- [ 13 ] Lin M Y, Chang F J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356[J]. *Digestive Diseases & Sciences*, 2000, 45(8): 1617–1622.
- [ 14 ] Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H, et al. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E[J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(9): 2493–2499.
- [ 15 ] Liu C F, Pan T M. In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity[J]. *Journal of Food & Drug Analysis*, 2010, 18(2): 77–86.
- [ 16 ] Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects[J]. *British Journal of Nutrition*, 2003, 90(2): 449–456.
- [ 17 ] Talwalkar A, Kailasapathy K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(8): 2537–2546.
- [ 18 ] 张同存, 罗学刚, 古向超, 等. 高耐胆盐能力的菌株及胆盐水解酶基因: ZL201310491340.4[P]. 2015–12–23.
- [ 19 ] 张同存, 罗学刚, 古向超. 植物乳杆菌在降血脂和辅助减肥方面的作用: ZL201310518617.8[P]. 2015–05–20.
- [ 20 ] Jang J Y, Kim H N, Kim Y R, et al. Aqueous fraction from *Cuscuta japonica* seed suppresses melanin synthesis through inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in B16F10 cells[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 141(1): 338–344.
- [ 21 ] Kim H R, Kim H, Jung B J, et al. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells[J]. *Molecules & Cells*, 2015, 38(2): 163–170.
- [ 22 ] 冯荣楷, 唐海谊, 周志敏. 美白酪氨酸酶和腺苷酸环化酶抑制剂的计算机毒性研究[J]. *计算机与应用化学*, 2012, 29(10): 1231–1236.
- [ 23 ] Ji K, Cho Y S, Kim Y T. Tyrosinase inhibitory and antioxidative effects of lactic acid bacteria isolated from dairy cow feces[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2011, 83(3): 980–987.
- [ 24 ] 杨越楠, 王震宇, 商进. L-抗坏血酸在黑素合成中的作用[J]. *中国现代医生*, 2016, 54(27): 166–168.
- [ 25 ] 杨英歌, 黄继翔, 马凯, 等. 抑制黑色素合成的乳酸菌胞外多糖的筛选和性质研究[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 583–590.

责任编辑: 郎婧