

文章编号:1001-6880(2015)1-0134-05

# 松茸多糖 TMSP-5 亚组分Ⅱ的美白活性及途径研究

王琪<sup>1</sup>, 王领<sup>2</sup>, 何聪芬<sup>1\*</sup>, 刘晓英<sup>3</sup>, 刘光荣<sup>3</sup>, 李富恒<sup>2</sup><sup>1</sup>北京工商大学理学院 北京市植物资源研究开发重点实验室,北京 100048;<sup>2</sup>东北农业大学生命科学学院,哈尔滨 150030; <sup>3</sup>无限极(中国)有限公司,广州 510665

**摘要:**本文初步研究了松茸多糖 TMSP-5 亚组分Ⅱ的美白作用机理。采用酪氨酸酶抑制实验、细胞水平黑色素测定实验来综合评价 TMSP-5 亚组分Ⅱ的美白功效;选定 *MITF*、*POMC* 和 *TYR* 三个靶基因作为研究对象,通过实时定量 PCR 实验,进一步阐明 TMSP-5 亚组分Ⅱ的美白作用靶点。结果显示, TMSP-5 亚组分Ⅱ对酪氨酸酶具有一定的抑制作用,125 μg/mL 时酪氨酸酶抑制率为 56.5%;不同浓度(3、30、300 μg/mL)的 TMSP-5 亚组分Ⅱ样品能成剂量依赖的方式抑制 B16 细胞内黑色素水平,当浓度为 300 μg/mL 时, TMSP-5 亚组分Ⅱ样品能够减少黑色素的含量,且优于熊果苷;TMSP-5 亚组分Ⅱ对 *MITF*、*POMC*、*TYR* 的表达水平均起下调作用,从而影响了黑素的形成。结果表明, TMSP-5 亚组分Ⅱ样品具有一定的美白功效。TMSP-5 亚组分Ⅱ样品对酪氨酸酶生成的重要基因和主要影响因子的基因水平的表达起到抑制作用,从而减少酪氨酸酶的量。

**关键词:**TMSP-5 亚组分Ⅱ;美白;黑色素;基因

中图分类号:Q949.95

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.027

## Study on the Whitening Activity and Pathway of *Tricholoma matsutake* TMSP-5 II

WANG Qi<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>2</sup>, HE Cong-fen<sup>1\*</sup>, LIU Xiao-ying<sup>3</sup>, LIU Guang-rong<sup>3</sup>, LI Fu-heng<sup>2</sup><sup>1</sup>Science College of Beijing Technology and Business University, Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing 100048, China; <sup>2</sup>Northeast Agricultural University, School of Life Science, Harbin 150030, China; <sup>3</sup>Infinitus International (China) Company, LTD, Guangzhou, Guangdong 510665, China

**Abstract:** The mechanism of whitening activity of *Tricholoma matsutake* TMSP-5II was studied in this paper. The evaluation of whitening activity was performed by Tyrosinase Inhibitory Activity (TIA) and melanin determination. The results showed that TMSP-5II can inhibit tyrosinase activity, and the inhibition rate was 56% with the concentration of 125 μg/mL. In addition, TMSP-5II can significantly inhibit the melanin production of B16 in a dose dependent way, and the inhibitory activity was better than that of arbutin. *MITF*, *POMC* and *TYR* were selected to perform the real-time quantitative PCR (RT-PCR) experiments in order to determine the possible targeting gene of TMP-5II and the results indicated that TMSP-5II played an important role in the reduction of expression levels of *MITF*, *POMC* and *TYR*, leading to a decreased melanin production. Therefore, TMSP-5II reduced the gene expression of the proteins that play an essential role in the production of melanin.

**Key words:** TMSP-5 II; whitening; melanin; genes

松茸 [*Tricholoma matsutake* ( S. Ito et Imai ) Sing. ], 学名松口蘑, 是一种天然珍稀名贵“药食同源”的真菌<sup>[1]</sup>, 营养价值和药用价值极高。它含有丰富的优质蛋白质、不饱和脂肪酸、粗纤维、核酸衍生物、甾体、皂苷、蒽醌类、酚类、生物碱、香豆素、三萜、多糖等多种成分<sup>[2,3]</sup>。据文献记载, 松茸具有强精补肾、益肠胃、理气化痰、驱虫<sup>[4]</sup>等功效。现代医

学研究表明, 松茸还具有治疗糖尿病、抗癌、抗过敏、抗氧化、抗辐射等特殊功效。

研究表明, 松茸多糖是松茸的主要活性成分, 但目前国内外对于松茸多糖的研究主要集中在多糖的提取、分离纯化与结构分析等方面;国内外的研究人员对松茸多糖的功效研究也较多, 结果发现, 松茸多糖具有增强免疫力、降血糖、抗肿瘤、防治心血管疾病等功效, 然而对松茸多糖美白功效的研究甚少, 只有少数几篇国内外的文章和专利提及松茸多糖在美白方面的应用<sup>[5-7]</sup>, 但都没有详细阐述是松茸多糖中的何种组分在起作用。鉴于此, 本课题组前期选取

收稿日期:2014-07-10 接受日期:2014-12-02

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD23B00);无限极(中国)有限公司项目(19000531955)

\*通讯作者 Tel:86-10-68984946; E-mail:congfenhe@126.com

产地为云南的松茸为原料,通过前期的水提醇沉法、分级醇沉法将松茸醇沉粗多糖分离为九个组分,再经人体美白评价实验和 GPC-MALLS 系统检测对其美白活性进行跟踪,筛选出最佳组分 TMSP-5 亚组分Ⅱ(松茸多糖分级醇沉第五组分亚组分Ⅱ)。本实验主要对具有美白效果较好的一组分 TMSP-5 亚组分Ⅱ的美白功效及作用途径进行研究,充实目前对于松茸多糖基础研究的内容,旨在为松茸资源在化妆品中的开发利用提供了理论依据和技术支持。

## 1 材料与试剂

### 1.1 实验材料

松茸粗多糖的分级醇沉第五组分 TMSP-5 亚组分Ⅱ。

### 1.2 实验试剂

酪氨酸酶(25kU)、DPPH(美国 SIGMA 公司);L-酪氨酸、Vc、熊果苷(北京化工厂);小鼠 B16 黑素瘤细胞、青霉素、链霉素(军事医学科学院);DEME 培养液(美国 GIBCO 公司);胰酶(Introvigen 公司);CCK-8 试剂盒[日本同仁化学研究所(Dojindo)];胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物制品有限公司);二甲基亚砜(北京化学试剂公司);TritonX-100(北京鼎国生物技术有限责任公司);Quant 一步法 RT-

PCR 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器

$\text{CO}_2$  培养箱(美国 Forma-Scientific 公司);酶联仪(美国分子设备公司);超声波破碎仪、超净工作台(国产);显微镜 DP72(日本 OLYMPUS 公司);离心机(德国 eppendorf 公司);皮肤黑色素和血红素测试仪(Mexameter MX18,德国 CK 电子公司);分光测色仪(CM-2600d,日本柯尼卡美能达公司);Mx3000p<sup>TM</sup> 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 酪氨酸酶抑制实验

取 4 支试管分别编号为  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $T_1$ 、 $T_2$ ,然后按表 1 的顺序在各管中加入相应的试剂, $C_1$ 、 $T_1$  在加入酪氨酸酶之前先放入 37 °C 水浴锅内 10 min,然后再加入酪氨酸酶,然后将  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $T_1$ 、 $T_2$  共同放入 37 °C 水浴锅内 10 min,反应结束后,取出分别测定  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $T_1$ 、 $T_2$  各管在 475 nm 处的吸光度值,做三次平行,同样的方法测定熊果苷溶液和维生素 C 对酪氨酸酶的抑制率并将其作为对照。根据公式计算样品对酪氨酸酶活性的抑制率。

$$\text{抑制率 } T(\%) = [(C_1 - T_1)/C_1] \times 100\%$$

表 1 酪氨酸酶抑制实验试剂配比表

Table 1 Ratio of reagents table in tyrosinase inhibition experiment

名称 Name	浓度(pH) Concentration	$C_1$ (mL)	$C_2$ (mL)	$T_1$ (mL)	$T_2$ (mL)
L-酪氨酸	0.05%	1	1	1	1
样品	-	0	0	1	1
PBS	pH=6.8	2	2.5	1	1.5
酪氨酸酶	-	0.5	0	0.5	0
总体积	-	3.5	3.5	3.5	3.5

注: $C_1$  和  $T_1$  加入 0.5 mL 酪氨酸酶,酶活为 100 U/mL。

Note: Add 0.5 mL tyrosinase into  $C_1$  and  $T_1$  tubes, and the enzyme activity was 100 U/mL.

### 2.2 DPPH·自由基清除实验

按照 Larrauri<sup>[8]</sup> 方法,测定阳性对照 Vc、熊果苷和样品的吸光度值。

$$\text{抑制率 } (\%) = [1 - (A_i - A_j)/Ac] \times 100\%$$

式中,  $A_i$  为 DPPH·液与测试液的吸光度;  $A_j$  为测试液与无水乙醇的吸光度;  $Ac$  为 DPPH·液与无水乙醇的吸光度。

### 2.3 细胞增殖实验

分别称取 10 mg TMSP-5 亚组分Ⅱ和熊果苷,溶

解于注射用水(无菌,无内毒素)中,配成 10 mg/mL 的溶液,并分别稀释至 0.5、1、2 mg/mL 和 4 mg/mL,备用。

将对数生长期的 B16 细胞经 0.25% 胰酶消化,利用 DMEM(含 10% 的胎牛血清)培养黑素瘤 B16 细胞,以每孔  $5 \times 10^3/100 \mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板,将细胞在 37 °C、体积分数为 5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下培养 48 h,分别加入 50  $\mu\text{L}$  上述四个浓度的样品至 96 孔板中,则终浓度分别为原来的三分之一,

每个浓度设 3 个以上复孔,以相同浓度的熊果苷为阳性对照,以注射用水溶液为空白对照,重复相同操作;继续培养 24 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8,24 h 后,测定 OD<sub>450</sub> 值,计算细胞的相对存活率。

相对存活率(100%) = 样品处理后的 OD<sub>450</sub> 值 / 注射用水溶液 OD<sub>450</sub> 值 × 100%

## 2.4 细胞黑色素含量测定

将对数生长期细胞制成单细胞悬液,以每孔  $0.5 \times 10^5/\text{mL}$  接种于 24 孔培养板,培养 48 h 后,分别加入 0.5 mL 1 mg/mL(样品浓度) TMP-5 亚组分 II 样品(2 孔平行),以注射用水溶液作为阴性对照,加入同样浓度的熊果苷作为阳性对照。将细胞在 37 °C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 48 h。倾去培养液,加入 1 mL 新鲜培养基,继续培养 24 h 后,弃去培养基,用 1 mL PBS 洗 1 次,0.25% 胰酶消化,收集细胞。计数后加入 100  $\mu\text{L}$  1 N NaOH,80 °C 水浴 2 h,测定 OD<sub>405</sub> nm,计算每  $1 \times 10^5$  细胞的 OD<sub>405</sub> nm 的吸收值。计算黑色素的相对含量。

黑色素相对含量 = 样品处理后的 OD<sub>405</sub> 值 / 注射用水溶液 OD<sub>405</sub> 值

## 2.5 MITF、POMC、TYR 基因表达水平测定实验<sup>[9,10]</sup>

选取 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (由黑色素含量测定实验所得)的 TMP-5 亚组分 II 和熊果苷处理小鼠黑素瘤 B16 细胞,并以注射用水溶液为空白对照。细胞培养结束后,进行总 RNA 的提取,采用实时定量 PCR 的实验方法检测。

实验中选定三个靶位点: MITF(小眼畸形转录因子)、POMC(促黑素细胞皮质素原)、TYR(酪氨酸酶)。TYR 是形成黑色素的生理过程中重要的限速酶,它的下调会影响酪氨酸的合成,从而影响黑素的形成。MITF 是影响和调节酪氨酸酶形成的主要因子,它的下调会影响 TRY 的合成。POMC 是形成促黑激素(Melanocyte Stimulating Hormone,  $\alpha$ -MSH)的重要前体,它的表达水平下调会影响  $\alpha$ -MSH 合成。

### 2.5.1 总 RNA 提取

细胞培养结束后,用移液器吸去培养基,用 3 mL 左右的 PBS 洗涤一次。进行细胞计数,1  $\times 10^6$  小鼠黑素瘤 B16 细胞中加入 1 mL Trizol,震荡 1 min,每 1 mL Trizol 中再加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 30 s,室温放置 3 min,2 ~ 8 °C 10000 rpm 离心 15 min,将上层水相转移到新管中,用异丙醇沉淀水相中的 RNA,每 1 mL Trizol 中再加入 0.6 mL 异丙醇,室温

放置 10 min;2 ~ 8 °C 10000 rpm 离心 15 min,移去上清,用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀;2 ~ 8 °C 不超过 7500 rpm 离心 5 min,弃上清;室温放置干燥 RNA 沉淀;加入 30  $\mu\text{L}$  DepcH<sub>2</sub>O 溶解 RNA,-70 °C 保存。

### 2.5.2 RNA 反转录为 cDNA

在无菌管中加入 2  $\mu\text{L}$  总 RNA,1  $\mu\text{L}$  Random primer (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、4  $\mu\text{L}$  dNTP mix (2.5 mM each)、加 DepcH<sub>2</sub>O 至 16  $\mu\text{L}$ ,混匀后 70 °C 水浴加热 5 min,立即冰浴。将无菌管中的混合物与 5  $\mu\text{L}$  5 × RT 反应缓冲液、1  $\mu\text{L}$  RNase inhibitor、1  $\mu\text{L}$  M-MuLV 反转录酶混合,混匀后置于 42 °C 温育 2 h,于 95 °C 放置 5 min 使酶失活,-20 °C 保存。

### 2.5.3 荧光定量 PCR 检测

PCR 反应体积为 80  $\mu\text{L}$ ,含有 40  $\mu\text{L}$  2 × SYBR Real-time PCR mix、2  $\mu\text{L}$  特异引物、1  $\mu\text{L}$  Taq 酶、1  $\mu\text{L}$  cDNA 模板、36  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序:预扩增 95 °C,10 min;然后 95 °C,1 min,58 °C,45 s,72 °C,40 s,40 个循环;最后 95 °C,1 min,55 °C,30 s,95 °C,1 min,1 个循环。用实时荧光定量 PCR 仪测定基因表达量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 酪氨酸酶抑制实验

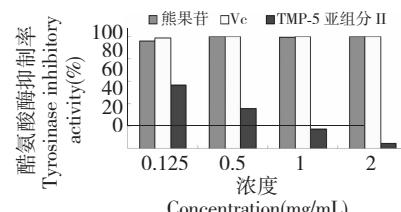


图 1 酪氨酸酶抑制率结果

Fig. 1 Result of tyrosinase inhibitory activity

由图 1 酪氨酸酶抑制率实验结果可以看出,在四个浓度下,阳性对照熊果苷和维生素 C 的酪氨酸酶抑制率接近 100%;随着 TMP-5 亚组分 II 浓度的增加,对酪氨酸酶的抑制率在相应的减小,当浓度为 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,酪氨酸酶抑制率为 56.5%;而当浓度达到 2 mg/mL 时,抑制率仅为 5.36%,这表明低浓度的 TMP-5 亚组分 II 可以通过抑制酪氨酸酶活性的途径,阻断多巴及多巴胺的形成,进而抑制黑色素的合成,达到美白的效果。

### 3.2 DPPH 自由基清除实验

由图 2 DPPH · 自由基清除实验结果表明,阳性

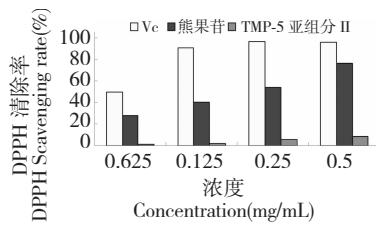


图 2 TMP-5 亚组分 II 对 DPPH 的清除效率

Fig. 2 DPPH-scavenging activity of TMSP-5 II

对照维生素 C 的自由基清除能力比熊果苷强。TMSP-5 亚组分 II 的 DPPH<sup>+</sup> 清除率较低,但随着浓度的升高,呈明显的上升趋势,当浓度为 500 μg/mL 时 DPPH<sup>+</sup> 清除率为 8.8%。当 TMSP-5 亚组分 II 浓度升高至一定程度,其抗氧化效果也会升高。

### 3.3 细胞增殖实验

细胞增殖实验属细胞水平实验,目的是检测 TMSP-5 亚组分 II 对于小鼠黑素瘤 B16 细胞活力的影响。实验结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出,在此四个浓度下,阳性对照熊果苷对于小鼠黑素瘤 B16 细胞的细胞活力稍有促进且影响不大。TMSP-5 亚组分 II 样品明显影响小鼠黑素瘤 B16 细胞的活力。如图可得,TMSP-5 亚组分

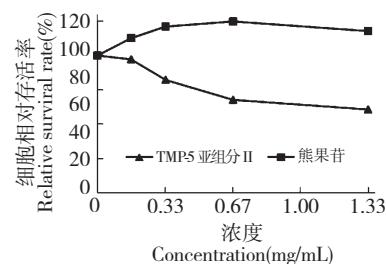


图 3 细胞增殖实验结果

Fig. 3 Result of cell proliferation assay

II 样品随着浓度的升高,其对小鼠黑素瘤细胞 B16 的抑制率增强,并呈现较好的线性关系,且 TMSP-5 亚组分 II 样品在终浓度为 0.33 mg/mL 时,细胞的存活率均会高于 80%。

### 3.4 细胞黑色素含量测定

根据细胞增殖实验的结果,选择 ≤ 1 mg/mL(样品浓度)的浓度进行细胞黑色素含量的测定实验。采集浓度为 300 μg/mL(终浓度)注射用水溶液以及同浓度的熊果苷和 TMSP-5 亚组分 II 样品处理后的小鼠黑素瘤细胞中黑色素状况分别见图 4 中的 A、B、C,放大倍数 100×。相同浓度不同样品的黑色素含量实验结果见图 4。

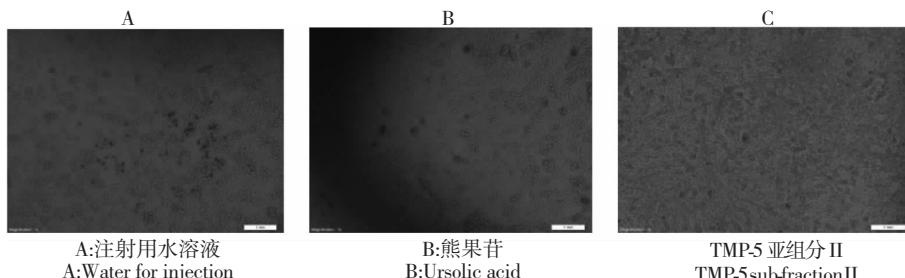


图 4 不同样品的细胞黑色素含量图

Fig. 4 Images of the cell melanin content of three materials

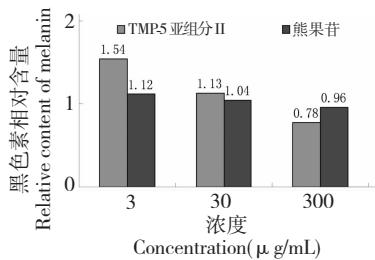


图 5 不同浓度样品的黑素相对含量

Fig. 5 The relative contents of melanin in different concentrations of samples

图 4 为采集的黑色素分布图片,从图中可以看出,TMSP-5 亚组分 II 处理的细胞中黑色素颗粒不明

显,而空白对照和阳性对照熊果苷处理的细胞中含有明显的黑色素颗粒。结合图 5 可以看出,300 μg/mL 时 TMSP-5 亚组分 II 的黑色素相对含量比熊果苷低 0.18。TMSP-5 亚组分 II 处理的细胞虽没有明显的黑色素颗粒,但其黑色素相对含量与熊果苷相差不大。这种现象契合了最新提出的一种美白理论,即没有减少黑色素的形成而是使黑色素分布均匀以达到肤色均匀美白的效果。

### 3.5 MITF、POMC、TYR 基因表达水平测定实验

1996 年 Maeda<sup>[11]</sup>首次报道了熊果苷的美白作用机理,熊果苷通过抑制酪氨酸酶活性,阻断多巴及多巴胺的形成,从而抑制黑色素的合成,起到美白的

作用,但熊果苷并不影响酪氨酸酶的表达和合成。

图 6 为 TMP-5 亚组分 II 处理细胞后分别对 MITF、

POMC、TYR 基因表达的影响结果。

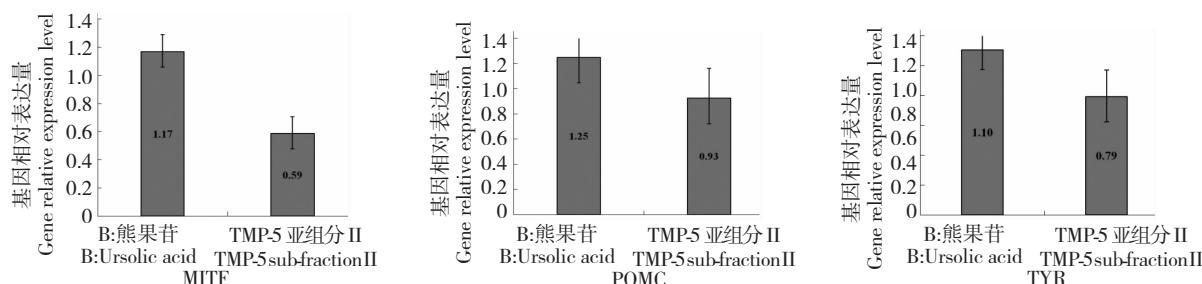


图 6 TMSP-5 亚组分 II 对 MITF、POMC、TYR 表达水平的影响

Fig. 6 Effect of TMSP-5 II on the expression levels of MITF, POMC and TYR

本实验采用熊果苷为阳性对照,由图 6 可知,熊果苷对 MITF、POMC、TYR 的表达水平没有影响,然而 TMSP-5 亚组分 II 对 MITF、POMC、TYR 的表达均起到下调的作用,从而影响黑素的形成,达到美白的作用。

## 4 结论

美白主要有两种方式,一是抑制黑色素合成酶的活性,如抑制酪氨酸酶,多巴色素互变酶等,以减少黑色素的生成。二是促进黑色素的排除,来达到美白的目的。

该研究通过对熊果苷和松茸多糖 TMP-5 亚组分 II 的美白功效及它们对黑色素细胞的黑素含量进行了比较研究,并且选定 MITF、POMC 和 TYR 三个靶基因作为研究对象,研究 TMP-5 亚组分 II 的美白作用靶点。结果显示:TMP-5 亚组分 II 具有清除 DPPH 自由基和抑制酪氨酸酶活性的作用,说明 TMP-5 亚组分 II 具有美白功效。TMP-5 亚组分 II 样品能够减少黑色素的含量,并且 TMSP-5 亚组分 II 对酪氨酸酶生成的重要基因和主要影响因子 MITF、POMC、TYR 的基因表达均起到下调作用,表明 TMSP-5 亚组分 II 具有一定的美白作用,美白机理可能是通过抑制酪氨酸酶活性,减少黑色素的生成。但其具体作用机制仍需进一步深入研究,以期松茸多糖在美白化妆品中具有良好的应用前景。

## 参考文献

- Cho IH, Kim YS, Choi HK. Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) using 1H NMR spectrometry and multivariate data analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43: 900-904.
- Yuan MH(元美花), Zhang JF(张剑峰), Nie FH(聂凤)

环), et al. Comparison of *Tricholoma matsutake* and medicinal value and processing method. *Chin Med Mod Distance Edu Chin* (中国中医院现代远程教育), 2014, 12: 106.

- Chen X(陈霞), Liu Q(刘芹), Ding K(丁侃). A review of *Tricholoma matsutake* in its chemical components, biological and pharmacological activities. *Chin Health Care Front* (中国医疗前沿), 2009, 4: 114-116.
- Liao LJ(廖丽娟), Jin GZ(金光洙). A review on chemistry and pharmacology of *Tricholoma matsutake* Sing. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2010, 29: 12-14.
- Lee H, Nam S, Kim M, et al. Skin whitening cosmetic composition. KR177018, 1999-03-20.
- Cho B, Jung J, Lee G, et al. Skin whitening cosmetic composition containing extracts of *Ramulus mori* and *Tricholoma matsutake*. KR 2004006512, 2004-01-24.
- Shin H, Park M. Whitening cosmetic compositions containing methyl trans-cinnamate which inhibit melanin formation and reduce denaturation of active ingredients during extraction of *Tricholoma matsutake* mushroom. KR 2006011035, 2006-02-03.
- Larrauri JA, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape peels. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 2694-2697.
- Liang X, Yu C, Sun J, et al. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 2006, 74: 4655-4665.
- Korem M, Gov Y, Kiran MD, et al. Transcriptional profiling of target of RNAIII-activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect Immun*, 2005, 73: 6220-6228.
- Maeda K, Naganuma J. Depigmenting action of arbutin and its new aspects in cosmetics science. *Nippon Koshobin Kagakishi*, 1996, 20: 12-16.