

水仙醇提物对斑马鱼胚胎黑色素合成的抑制作用

张文娟, 许璟瑾, 陈晓莹, 李秀敏, 陈金妹, 潘裕添, 薛钰*

(闽南师范大学菌物产业工程技术中心, 福建漳州 363000)

【摘要】 目的 以斑马鱼为模型, 重点研究水仙鳞茎的醇提物对斑马鱼黑色素合成的抑制效应。方法 将斑马鱼胚胎暴露在 0、50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度的水仙花醇提物中, 观察其黑色素生成情况, 并进一步测定体内黑色素合成通路关键蛋白酪氨酸酶的酶活性变化和其他标记基因的时空表达, 同时以 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熊果苷 (arbutin, Ar) 处理组为阳性对照。结果 定性观察表明, 随着水仙提取物处理浓度的增加, 对斑马鱼黑色素合成的抑制明显增强; 进一步检测黑色素合成相关基因的时空表达, 证明了水仙醇提物通过抑制酪氨酸酶 (TYR)、银色毛发 (SILV) 和 *Mitfa* 等基因的 mRNA 表达而抑制黑色素合成; 最后, 通过检测酪氨酸酶的酶活性, 发现随着醇提物浓度的增加导致酶活性逐渐降低。结论 水仙醇提物能有效地抑制斑马鱼胚胎黑色素的生成, 同时该研究也为斑马鱼模型在天然美白化合物筛选和产品开发的应用提供了研究基础和思路。

【关键词】 斑马鱼; 水仙醇提物; 基因表达; 酪氨酸酶

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 04-0425-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.014

Alcohol extracts of *Narcissus* bulb inhibits melanogenesis in zebrafish embryos

ZHANG Wen-juan, XU Jing-jin, CHEN Xiao-ying, LI Xiu-min, CHEN Jin-mei, PAN Yu-tian, XUE Yu*

(Engineering Technology Center of Mushroom Industry of Minnan Normal University, Fujian Zhangzhou 363000, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to explore the inhibitory effect of alcohol extracts of *Narcissus* bulb on melanogenesis in zebrafish embryos. **Methods** Zebrafish embryos were exposed to different concentrations of alcohol extracts of *Narcissus* (0, 50, 100, 200, and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and then the formation of melanin was observed. Furthermore, we measured the enzyme activity of tyrosinase (TYR), which plays a pivotal role in melanogenesis. Meanwhile, the spatial and temporal pattern of melanin-specific marker genes were detected. Arbutin (Ar) was used as a positive control in all these experiments. **Results** The treatment of alcohol extracts of *Narcissus* bulb inhibited melanogenesis in the zebrafish embryos in a dose-dependent manner. Furthermore, the mRNA expression levels of melanin-related genes such as *tyrosinase* (TYR), *silver* (SILV) and *Mitfa* were significantly reduced after treatment with different concentrations of *Narcissus* extracts by *in-situ* and semi-quantitative PCR. Finally, the enzyme activity of tyrosinase was also gradually decreased with increasing concentrations of the alcohol extracts. **Conclusions** *Narcissus* alcohol extracts can effectively inhibit the production of melanin in zebrafish embryos. This study provides potential evidence and approaches for the screening of natural whitening compounds using zebrafish models.

【Key words】 Zebrafish; *Narcissus* alcohol extracts; Gene expression; Tyrosinase

Corresponding author: XUE Yu. Email: xueyu0614@163.com

【基金项目】 福建省自然科学基金项目 (2015J05070); 闽南师范大学杰出青年科研人才计划资助 (MJ14007)。

【作者简介】 张文娟 (1991 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 化学生物学。E-mail: zhwenjuan1106@163.com

【通讯作者】 薛钰 (1986 -), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 细胞与发育生物学。E-mail: xueyu0614@163.com

水仙(*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem.)又名中国水仙,属于石蒜科(*Amaryllidaceae*)水仙属(*Narcissus* L.),是多年生球茎类的草本植物。鳞茎卵状至广卵状球形,外被棕褐色皮膜。叶狭长带状,蒴果室背开裂。水仙鳞茎,微辛味苦、性寒、归心、肺经,清热解毒,散结消肿^[1,2]。石蒜科植物在很早以前就被用作药用植物,水仙属植物富含生物碱,其具有抗病毒,抗疟疾,抗肿瘤,催吐剂,抑制乙酰胆碱酯酶等功效^[3-5]。漳州市种植水仙历史悠久,源远流长,产量居全国首位而被命名为“中国水仙花之乡”,是中国的“十大名花”之一^[6]。本研究因地制宜,以漳州市水花水仙花鳞茎为研究对象,探索它在抑制黑色素形成过程中的抑制效应,因为在前期的细胞实验中研究结果表明水仙醇提物比水提物更具有美白功效,所以本文以水仙醇提物进行研究。

黑色素主要由两种醌型的聚合物组成,分别是真黑素和褐黑素;真黑素是典型的生物黑色素,外在表现形式为棕色或黑色;褐黑素含有硫原子,外在表现为黄色或微红棕色^[7]。黑素细胞中黑素的合成及分泌是一项复杂、精确的调控过程,有多种信号分子的参与并相互关联^[8]。已知调节黑色素形成的信号通路:cAMP 依赖的信号通路 Wnt 信号通路以及 ERK 信号通路,三条信号通路都涉及小眼畸形相关转录因子(Mitf),该转录因子不仅参与黑色素细胞的生存、增殖、分化等,还是调节黑色素形成的关键调控蛋白^[9]。上调 Mitf 活性可以激活黑色素形成相关酶的表达,从而促进黑色素的生成;反之,下调 Mitf 活性可以降低相关酶的表达,从而抑制黑色素的形成。

斑马鱼体表具有色素,其色素是由来源于神经嵴的三种类型的色素细胞产生的。这些细胞包括载黑素细胞、黄色素细胞和虹细胞。黄色素细胞和虹细胞结合形成了微黄色的条纹,载黑素细胞最终形成了表皮上的纵向黑色条纹^[10-12]。斑马鱼的黑色素形成首先开始于视网膜色素上皮细胞,随后黑色素细胞在背部外侧沉着;皮肤上的黑色素大约在 24 h 就可以观察到,而酪氨酸酶基因的转录和翻译发生在早期,在视网膜色素上皮细胞形成可见色素之前 7 h 就可以检测酪氨酸酶 mRNA 的表达,在皮肤上形成可见色素之前的 3 h 就可以检测其酪氨酸酶的酶活性^[13-15]。鉴于斑马鱼黑色素生成较快,小分子能渗透且具有操作较容易等特点,该研究用斑马鱼作为模型进行筛选和研究影响黑色素生成的化合

物。

黑色素是由动物黑色素细胞分泌的生物色素,它通过吸收紫外线来保护人体的皮肤免受紫外线的伤害。而近年来,环境污染越来越严重,使得臭氧空洞逐步扩大,这让人体的皮肤吸收到的紫外线的含量越来越多,随着社会经济快速发展,现代人工作压力不断增加,不规律的作息导致黑色素形成酶的代谢紊乱从而导致人群患有各种黑色斑症甚至引发黑色素瘤。此外,现代人尤其是现代女性对美白这一审美标准不断提升,特别在以白为美的东方国家,美白型化妆品已经成为美妆护肤行业的主打产品之一,市场上的美白型化妆品不乏掺杂化学合成的美白组分,长期使用对人体皮肤会造成不可逆损伤,因此寻找既能减缓表皮色素过度沉积又对人体无害的纯植物提取美白成分具有巨大的开发价值和市场前景。目前,对水花水仙花美白功能研究方面尚未有文献报道,因此本研究在开发一种新型的美白产品具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用斑马鱼(*Danio rerio*)为 TU 品系,由清华大学生命科学院孟安明课题组惠赠。斑马鱼的养殖和繁殖参照标准的方法^[16,17]。取卵前夜,将雌雄的野生型 TU 品系斑马鱼喂饱后放入交配缸中,插入隔板;次日清晨拔掉挡板待交配产卵,斑马鱼胚胎在受精后 30 min 内收集,洗涤后放入 90 mm 培养皿,加入 Holfreter 水(0.05 g/L KCl,0.1 g/L CaCl₂,0.025 g/L NaHCO₃,3.5 g/L NaCl)培养于 28℃ 恒温培养箱中,在体式镜下挑选发育正常胚胎,用于试验。

1.2 实验药物

采集新鲜的水仙花鳞茎,冻干后粉碎,用 80% 乙醇使其完全浸没,在 40~50℃ 下浸提 2 h,提取 5 遍,收集并合并提取液,将提取液浓缩后于 60℃ 烘箱中烘干,得水花水仙花醇提物。

1.3 药物浓度的确定

为探索水花水仙花醇提物对斑马鱼胚胎作用的最佳浓度,进行了以下实验,以 6 孔板为实验容器,每孔放 40 枚胚胎,设置 6 个药物浓度梯度,在胚胎发育到 2 h 时,分别向每个孔加入浓度为 0、50、100、200、500、1000 μg/mL 的水花水仙花醇提物。以在 Holfreter 水中培养的胚胎作为空白对照(0 μg/mL),在

胚胎发育到 72 h 时观察其死亡情况和发育情况并详细记录,期间每隔 12 h 换溶液一次并将死亡胚胎及时移除。

1.4 胚胎暴露实验

为观察不同浓度处理下斑马鱼幼鱼鱼体黑色素生成的情况。以 6 孔板为实验容器,每孔 40 枚胚胎,根据(1.3)中的最佳作用浓度梯度,在斑马鱼胚胎受精后发育到 2 h 时,每孔加入 4 mL 的不同浓度的药物,每 12 h 更换一次溶液,本实验以 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 熊果苷(arbutin, Ar)溶液作为标准阳性对照^[18],在药物处理至 48 h 和 72 h 时在显微镜下观察其黑色素生成情况,并拍照记录。

1.5 检测斑马鱼体内的酪氨酸酶活性

分别收集不同药物浓度溶液处理的 48 h 和 72 h 的幼鱼,每个浓度收集 50 枚胚胎,放入 1.5 mL 的离心管中,用 PBS 洗 3 遍,5000 r/min 离心 3 min,彻底吸走液体,得到胚胎;向离心管中加入 250 mL PBS 缓冲液(100 mmol/L, pH 6.8)冰浴条件下对胚胎进行超声 35 s(超声探头为 2 mm,超声过程设定为超声 5 s,间歇 10 s),之后 10 000 r/min、4℃离心 15 min,得上清液,得上清液即为酪氨酸酶液^[19]。

使用考马斯亮蓝法制作蛋白标曲,参照文献^[20],绘制的蛋白标准曲线见图 1。

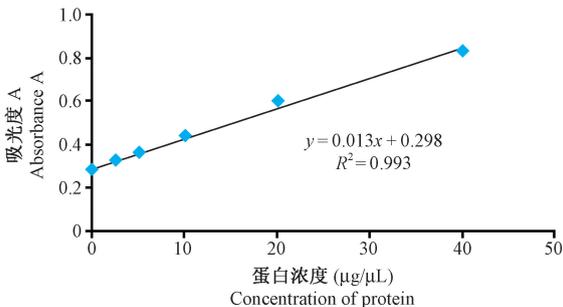


图 1 蛋白标准曲线

Fig. 1 Standard curve of the protein

酶液制备好后,考马斯亮蓝方法测定酶液中的蛋白含量,将样品测出的 A 值带入标准曲线中计算出样品中的蛋白含量。在参考文献^[19]中测酪氨酸酶液的吸光度的变化(ΔA),根据下面的计算公式计算酶活力。

$$\text{酶活力}(U/g) = \frac{A \times V \times 1000}{T \times M} \quad (1)$$

式中: ΔA :吸光变化值,V:反应总体积(mL),T:反应时间(min),M:样品蛋白含量(mg/mL)。

1.6 检测黑色素合成相关基因的表达

1.6.1 黑色素合成相关基因克隆的引物序列

该研究中的所有基因序列从斑马鱼数据库 <http://zfin.org/> 上下载而来,引物通过软件 Primer 6.0 设计。本研究用于构建克隆的所有引物序列如表 1 所示,F(forward)表示正向引物,R(reverse)表示反向引物。

表 1 黑色素相关基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of the melanin-related genes	
基因名 Genes	引物序列(5' - 3') Primer sequences(5' - 3')
<i>mitfa</i>	F-GGACAACCACAACCTCAT R-CCACTAACTCAGCGGAATA
<i>tyr</i>	F-TCCTCTGTGTCTCATCCT R-TGAAGTATCCGTGTTGTG
<i>silv</i>	F-GCAGAAGACACAGTTATCG R-CAGCATCACACATTATTCA
<i>tyrp1b</i>	F-CAGTGGTGCTGTTGTAG R-TGGCTGTATTCTCAATGTCT
<i>det</i>	F-CTGTGACCAATGAGGAGATT R-CATAGGATTTGGACTGTGT
<i>oca2</i>	F-CAGTCAAGATGCCGATGT R-TCCAGTGAAGTCCGATGT
β -actin	F-ACGAACGACCAACCTAAACTCT R-TTAGACAACACTCTCCCTTTGC

1.6.2 半定量 PCR 检测黑色素相关基因的表达

收集不同浓度水仙提取物溶液处理至 48 h 和 72 h 的胚胎,每组各收集 50 枚,提 total RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,作为半定量 PCR 的模板,具体操作实验方案参照文献^[21]。PCR 扩增条件如下所示:①95℃ 5 min;②95℃ 30 s;③65℃ 30 s,之后每个循环降低 3℃;④72℃ 30 s;⑤重复②到④ 6 个循环;⑥95℃ 30 s;⑦56℃ 30 s;⑧72℃ 30 s;⑨重复⑥到⑧ 28 个循环;⑩72℃ 10 min;⑪16℃ 1 h(如若不能及时取出可加此步),部分条件可以微调,如基因 *tyr*、*tyrp1b*、*silv* 在步骤 7)52℃ 30 s;⑨重复 25 循环。

1.6.3 整胚原位杂交实验试剂与方法

原位杂交中所用探针制备的方法及实验中所用试剂及具体操作步骤参照文献^[21, 22]。

2 结果

2.1 水仙醇提取物作用斑马鱼胚胎浓度的确定

胚胎发育到 2 h 时,分别向每个孔加入浓度为 50、100、200、500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水仙花醇提取物,以 Holfreter H₂O 培养组为对照组,观察胚胎发育的状况及死亡情况,其结果如图 2 所示:胚胎发育到 72 h

时,在 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下,胚胎发育有明显的迟缓,其死亡率是 100%;而在低浓度(≤ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理下,胚胎发育正常,且死亡率小于 20%。因此该研究最终选择 50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的作为实验浓度梯度。

2.2 水仙花提取物抑制斑马鱼幼鱼黑色素的生成

斑马鱼胚胎经过 50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水仙花溶液处理后,结果如图 3 所示:与对照组相比,48 h 时期斑马鱼胚胎整体黑色素生长都有不同程度的减少,且随着醇提物浓度的增加,其黑色素总量逐渐减少(图 3a-e₂)。在空白对照组中,从侧面观察,斑马鱼的脊柱上下两侧可以明显地观察到大量的黑色斑点,此即是斑马鱼胚胎中沉着的黑色素,从背部观察,斑马鱼胚胎背部及整个背脊都有大量的色素沉积(图 3a₁, a₂)。而在 50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 醇提物处理组中,无论从背面还是侧面观察,斑马鱼胚胎在脊椎及背部可明

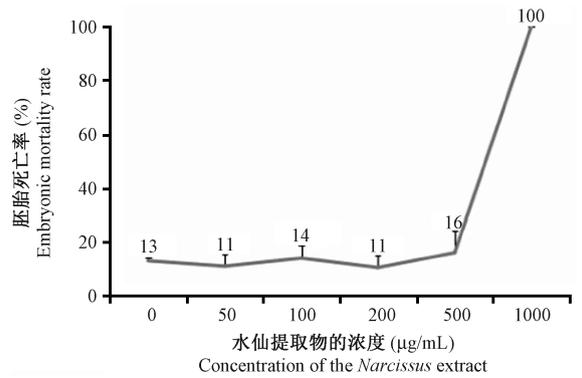


图 2 不同浓度的水仙醇提物对斑马鱼胚胎死亡率的影响

Fig. 2 Embryonic mortality induced by different concentrations of *Narcissus* alcohol extracts

显观察到黑色素依次递减,尤其在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组,图 3 中 e₁、e₂ 的比例超过了 90%,黑色素显著减少,无明显的黑色素沉着点,接近于阳性对照组(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熊果苷, Ar)(图 3b₁ - b₂、

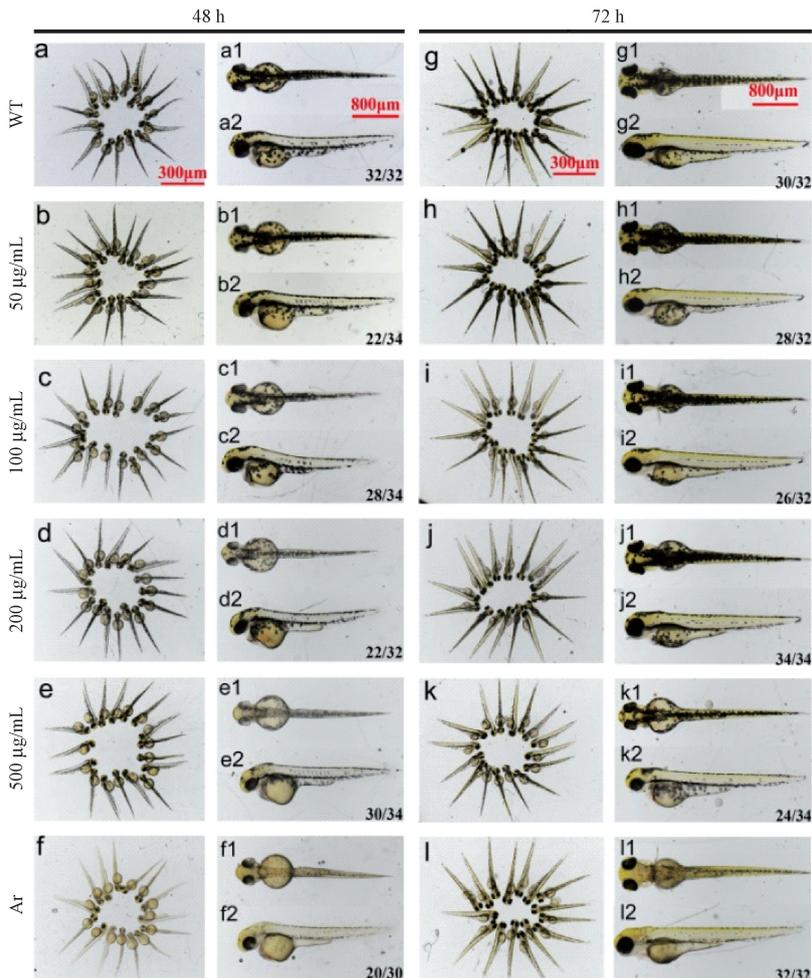


图 3 不同浓度水仙醇提物对斑马鱼黑色素生成的影响

Fig. 3 Effects of *Narcissus* alcohol extracts on melanogenesis in the zebrafish embryos

$c_1 - c_2, d_1 - d_2, e_1 - e_2$)。

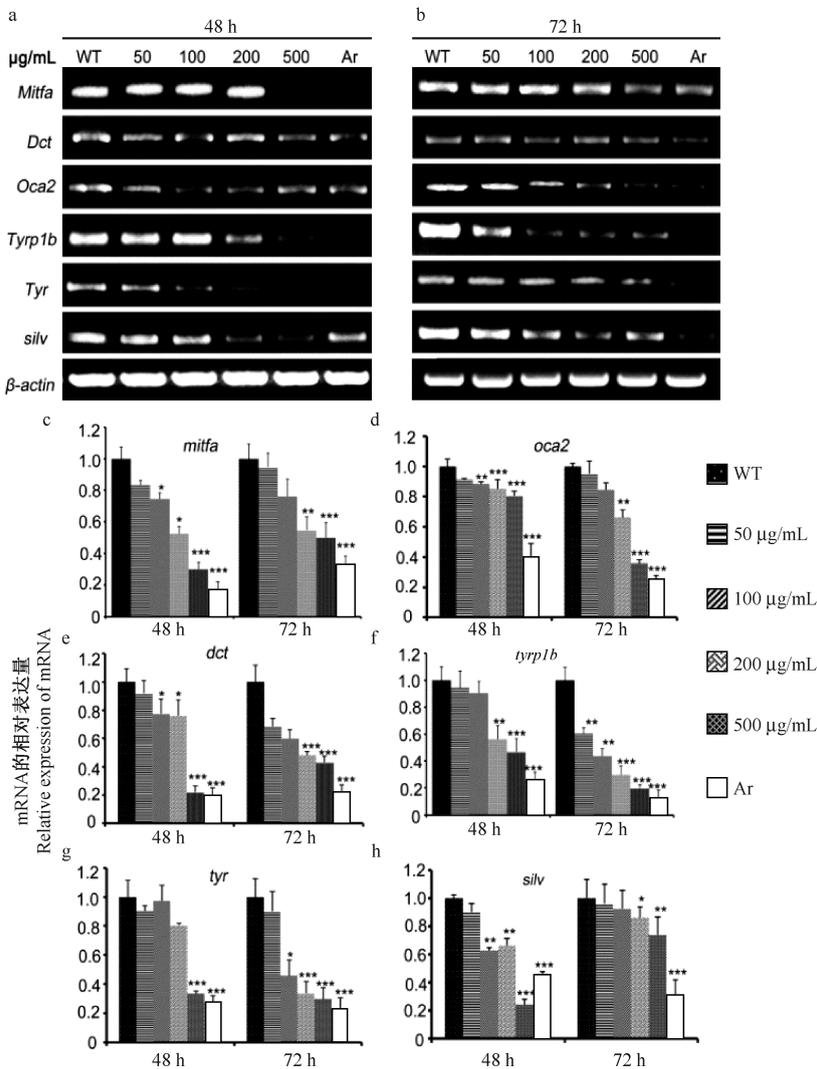
斑马鱼胚胎发育至 72 h 时,对照组胚胎除了黑色素以外,黄色素也开始形成。与 48 h 的变化趋势相似,100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 醇提取物处理组,其黑色素逐渐减少,躯干新形成的黄色素也受到了抑制,尤其在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,两种色素的形成减少尤其明显(图 3 g-l)。

2.3 水仙花醇提取物抑制斑马鱼黑色素合成相关基因的表达

前面实验结果显示水仙花醇提取物能抑制色素形成,因此我们想进一步探索水仙花提取物是否抑制了调控黑色素形成的相关基因的 mRNA 表达? *Mitfa* 是小眼畸形转录因子 (microphthalmia-associated

transcription factor), 可调控 TRPs (tyrosinase-related proteins) 家族的表达,参与黑色素的生成^[23]。酪氨酸酶是黑色素合成过程中的关键酶,整个黑色素合成的过程中主要涉及了眼皮肤白化病 II 型 (*oca2*)、酪氨酸酶 (*tyr*)、多巴素互变酶 (*DCT*)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (*TYRP1*) 和银色毛发 (*SILV*) 等多个基因^[24-26]。该研究用半定量 PCR 检测上述基因的 mRNA 表达情况。

分别收集 48 h 和 72 h 的样品提取总 RNA,反转录后进行半定量 PCR 检测 *mitfa*、*dct*、*oca2*、*tyrp1b*、*tyr* and *silv* 基因的表达,以为 β -actin 内参,其结果如图 4 所示:48 h 时的基因 *mitfa*、*tyrp1b*、*tyr*、*silv* 随着水仙花药物浓度的增加而逐渐减弱,且在高浓度水



注:差异显著性分析均是与对照组 (WT) 相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 水仙醇提取物抑制斑马鱼胚胎黑色素相关基因的表达

Note. All the differences are significant as compared with the control (WT), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 4 *Narcissus* alcohol extracts inhibits the expression levels of melanin-related genes in zebrafish embryos

仙花醇提取物处理下其电泳条带明显减弱;*dct*、*oca2* 在不同浓度水仙花提取物处理下,其表达趋势减少(图 4a);72 h 时基因 *oca2*、*tyrp1b*、*tyr*、*silv* 电泳条带减弱最明显,其趋势与 48 h 相似,都是随着药物浓度的增加而逐渐减弱(图 4b)。通过 Image J 软件计算各时期各个基因 mRNA 的相对表达量,结果如图 4c-h 所示:不论是 48 h 还是 72 h,水仙花醇提取物使这 6 个黑色素合成相关基因的表达量均有逐步下调的变化趋势,其中 *tyr* 和 *tyrp1b* 这两个相关基因的表达量同对照组相比下降趋势尤为明显,高浓度药物处理组其表达量仅为对照组的 20% (图 4f-g)。如图 4c 所示,*mitfa* 的表达量在高浓度药物下分别降至对照组的 20% (48 h) 和 30% (72 h)。48 h 与 72

h 两个时期的其他基因表达量也有不同程度的降低,且与对照组相比,差异有显著性(图 4c-h)。

基于前面的实验结果,该研究想进一步确定黑色素形成相关基因的 mRNA 时空表达变化。受精后 2 h 加入不同浓度水仙提取物,72 h 检测 *tyrp1b*、*tyr* 和 *silv* 的时空表达变化,在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物处理组 3 个基因的时空表达变化与对照组相比并不明显,但随着药物处理浓度的增加,*silv*、*tyr*、*tyrp1b* 在眼、背脊部及头部的表达明显减少,尤其是在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下减弱尤为显著,在背部几乎不表达,接近于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 熊果苷阳性对照组(Ar),(图 5a、b、c),说明水仙提取物能达到与熊果苷相似的美白效果。

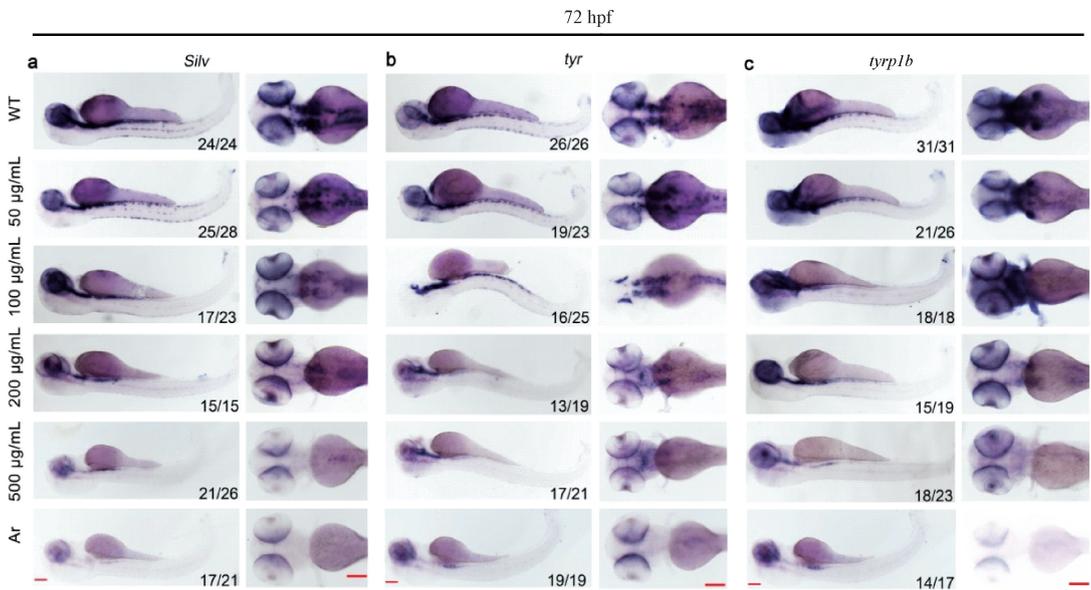


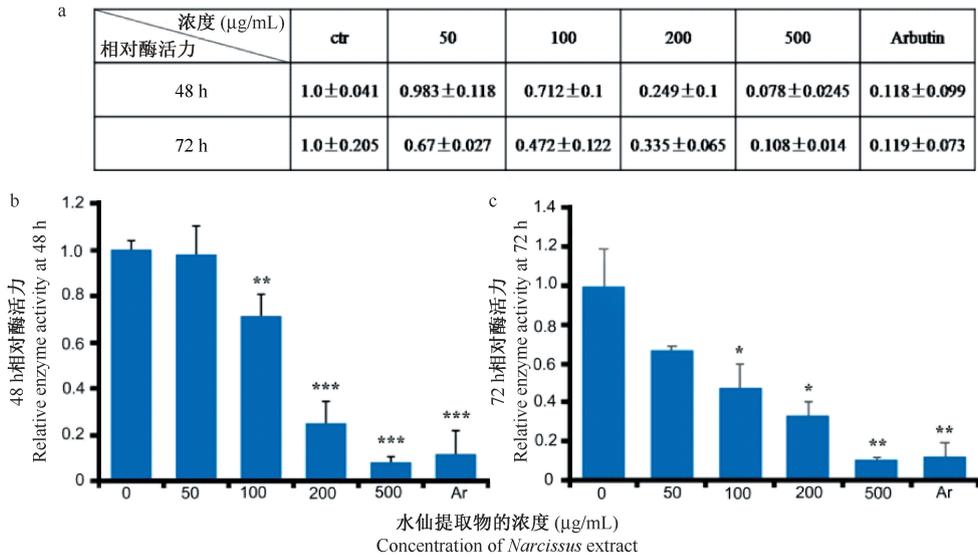
图 5 不同浓度水仙醇提取物对 *silv*、*tyr*、*tyrp1b* 时空表达的影响 (bar = 100 μm)

Fig. 5 The spatial and temporal expression patterns of *silv*, *tyr*, *tyrp1b* after treated with different concentrations of *Narcissus* alcohol extracts in the zebrafish embryos

2.4 水仙花醇提取物能使斑马鱼酪氨酸酶活性降低

前面的实验结果表明水仙花提取物对通过下调黑色素相关基因的表达抑制斑马鱼黑色素形成,而酪氨酸酶是黑色素生成的一个重要因素。因此该研究想检测一下加药后斑马鱼体内酪氨酸酶的活性是否有变化。将吸光度带入标曲,计算蛋白含量,再根据公式(1-1)进一步计算酶活力,其结果如图 6 所示:两个时期斑马鱼的酪氨酸酶活性都是在逐渐减少,在药物处理至 48 h 时,水仙花药物处理组斑马鱼酪氨酸酶活性是随着浓度增加而逐渐降低(图

6a),与对照组相比,200~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组酶活性降低很明显,酶活性大约只有对照组的 1/5,差异有显著性,甚至在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组其酪氨酸酶活性比阳性对照组的酶活性要更小(图 6b)。当水仙花药物处理至 72 h 时,其酪氨酸酶活性的变化趋势与 48 h 是一致的,随着药物浓度的增加其酶活逐渐减小。在中高浓度作用下酶活性的变化差异较明显(图 6c)。由此可见,水仙花药物抑制了斑马鱼体内酪氨酸酶活力。



注:差异显著性分析均是与对照组(0 $\mu\text{g/mL}$)相比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 6 水仙醇提取物对斑马胚胎酪氨酸酶活力的抑制效应

Note. All the differences are significant as compared with the control (0 $\mu\text{g/mL}$),

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 6 Inhibitory effects of *Narcissus* alcohol extracts on the tyrosinase activity in the zebrafish embryos

3 讨论

斑马鱼是一种优良的实验动物模型,与人类在器官系统和基因序列上都很相似,斑马鱼具有很多其他模式生物所不具备的优点,已被广泛应用于生物学各领域^[27, 28]。近年来,开始出现用斑马鱼作为新的模式生物来研究调节黑色素合成的化合物基于表型的筛选^[18]。本实验就以斑马鱼作为动物研究模型,探索水仙花醇提取物对黑色素合成抑制及其美白效果,接下来可进一步研究建立筛选化妆品美白活性物的斑马鱼模型,检测和验证样品的美白活性成分对斑马鱼黑色素合成的抑制作用。

本研究采用斑马鱼作为实验模型评价水仙花提取物对黑色素合成的抑制效果。实验结果表明,水仙花提取物能够通过抑制酪氨酸酶活性以及黑色素合成相关基因的表达,来有效抑制斑马鱼胚胎黑色素的合成。在一定的浓度范围内,药物浓度越高,抑制效果越明显。通过实验得出,能够有效抑制斑马鱼黑色素合成且对其生长发育无影响的最适合浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ (图 2)。实验检测出水仙花提取物处理后斑马鱼体内酪氨酸酶活力的降低(图 6),且通过半定量 PCR 进一步检测出黑色素合成相关基因的 mRNA 的表达都下调(图 4),还通过原位杂交检测了相关基因在时空上的表达,结果都显示各个基因表达减少(图 5)。但本研究中所用的半定量 PCR

这一方法本身具有争议性,其检测并不是很精确,因此后续可以用实时定量 PCR 进一步定量分析黑色素相关基因的表达。本研究检测了黑色素上游基因 *mitfa* 的 mRNA 表达,发现其在高浓度药物组,其 mRNA 的变化很明显,说明水仙花醇提取物抑制了黑色素合成过程的上游基因的表达,从而抑制了 *tyr*、*tyrp1b* 等基因的表达,但本研究还没有进一步探索水仙花醇提取物是通过哪种信号途径来影响黑色素合成的,Wnt 信号? cAMP 依赖的信号? 或 ERK 信号通路? 这些问题还有待继续探究。

参 考 文 献

- [1] Kornien KO and Evidente A. Chemistry biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners [J]. Chem-Inform, 2008. 108(40): p. 1982-2014.
- [2] 国家中药学管理局《中华本草》编委会,中华本草:精选本. 1998;上海科学技术出版社.
- [3] Aboukaram M, Shier WT. A simplified plaque reduction assay for antiviral agents from plants. demonstration of frequent occurrence of antiviral activity in higher plants [J]. J Nat Products, 1990. 53(2): 340-344.
- [4] Kaur M, Aggarwal NK, Dhiman R, et al. Antimicrobial activity of medicinal plant; *Parthenium hysterophorus* L [J]. Res J Med Plants, 2001, 10: 106-112.
- [5] López S, Bastida J, Viladomat F, et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts [J]. Life Sci, 2002. 71(21): 2521-2529.
- [6] 张慧平. 中国水仙遗传转化及花色成分分析 [D]. 2010,

福建农林大学.

- [7] 伍革民, 彭光旭. 动物黑色素研究进展 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2005, 35(1): 39-41.
- [8] Parvez S, Kang M, Chung HS, et al. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents [J]. *Phytother Res*, 2006, 20(11): 921-934.
- [9] Chang TS. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity [J]. *Materials*, 2012, 5(9): 1661-1685.
- [10] Jin EJ, Thibaudeau G. Effects of lithium on pigmentation in the embryonic zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1449(1): 93-99.
- [11] Hirata M, Nakamura K, Kondo S, et al. Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern [J]. *Dev Dyn*, 2005, 234(2): 293-300.
- [12] Kelsh RN, Brand M, Jiang YJ, et al. Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development [J]. *Development*, 1996, 123(3): 310-312.
- [13] Choi TY, Kim JH, Ko DH, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds [J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(2): 120-127.
- [14] Camp E, Lardelli M. Tyrosinase gene expression in zebrafish embryos [J]. *Dev Genes Evol*, 2001, 211(3): 150-153.
- [15] Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35-44.
- [16] 何嘉玲, 刘静, 王天奇, 等. 斑马鱼的质量标准化 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 99-102.
- [17] 陈维云, 何秋霞, 彭维兵, 等. 利用斑马鱼模型评价 Vc 和异 Vc-Na 抑制黑色素的生物活性 [J]. 山东科学, 2014, 27(6): 31-37.
- [18] 陆彬, 楼鸳鸯, 陈楚楚, 等. 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究 [J]. 湖南科技大学学报自然科学版, 2015, 30(1): 116-120.
- [19] 姚莉, 尚靖, 徐建国. B16 细胞中酪氨酸酶活性测定的方法学研究 [J]. 新疆中医药, 2007, 25(4): 16-18.
- [20] 李娟, 张耀庭. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量 [J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118-120.
- [21] 薛钰. 斑马鱼胚胎组织中心表达的 Bmp 信号在背腹分化中的作用 [D]. 清华大学. 2014
- [22] 幸岑璨. 斑马鱼 Tgfbeta1 通过 Smad5 调控后部侧线系统的发育 [D]. 清华大学. 2014.
- [23] Moore KJ. Insight into the microphthalmia gene [J]. *Trends Genet*, 1995, 11(11): 442-448.
- [24] Choi TY, Kim CH, Dong HK, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds [J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(2): 120-127.
- [25] Liu CW, Yan W, Zhou BS, et al. Characterization of a bystander effect induced by the endocrine-disrupting chemical 6-propyl-2-thiouracil in zebrafish embryos [J]. *Aquat Toxicol*, 2012, 118-119(2): 108-115.
- [26] Villareal MO, Han J, Yamada P, et al. Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(5): 450-457.
- [27] 王晓伟, 张红翠, 安晓晶, 等. 新型模式生物斑马鱼及其胚胎在人类疾病模型研究中的应用 [J]. 北方药学, 2012, 09(5): 42-43.
- [28] 刘辉, 戴家银. 斑马鱼在生态毒理学研究及环境监测中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5): 529-534.

[收稿日期] 2016-12-28