



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117547524 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 13

(21) 申请号 202311746579.1

(22) 申请日 2023.12.19

(71) 申请人 上海中医药大学

地址 201203 上海市浦东新区蔡伦路1200号

(72) 发明人 郭夫江 吴华丽 李医明 李晓烨  
刘静雯

(74) 专利代理机构 上海海颂知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31258

专利代理师 何葆芳

(51) Int. Cl.

A61K 31/122 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 8/35 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

吉马酮化合物的新用途

(57) 摘要

本发明公开了一种吉马酮化合物的新用途，所述的新用途是指以吉马酮化合物为活性成分用于制备预防或/和治疗色素沉着性疾病的药物或化妆品。本发明的研究结果显示：吉马酮化合物对小鼠B16F10细胞黑素的合成能力具有显著抑制活性，能有效减少斑马鱼体内黑色素的合成；并且，吉马酮能显著抑制小鼠B16F10细胞酪氨酸酶的活力，可明显抑制黑素小体向树突尖端的转运，并能显著下调黑素小体maker蛋白HMB45的表达，因而可望作为活性成分用于制备预防或/和治疗色素沉着性疾病的药物或化妆品，对色素沉着性疾病的预防和治疗具有重要意义和应用价值。

1. 一种吉马酮化合物的新用途,其特征在于:所述的新用途是指以吉马酮化合物为活性成分用于制备预防或/和治疗色素沉着性疾病的药物或化妆品。

2. 根据权利要求1所述的新用途,其特征在于:所述的色素沉着疾病包括黄褐斑、雀斑、妊娠斑、蝴蝶斑、炎症后色素沉着、药物诱导的色素沉着中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的新用途,其特征在于:所述的化妆品是指用于使皮肤黑色素减退、美白淡斑的护肤品。

4. 根据权利要求1或3所述的新用途,其特征在于:所述化妆品的类型包括香皂、洗面奶、沐浴露、柔肤水、护肤啫喱、护肤乳液、护肤霜、精华液、面膜、气雾剂、喷雾剂中的至少一种类型。

5. 根据权利要求4所述的新用途,其特征在于:所述化妆品中还包括化妆品领域可接受的、制成各种类型所必须的辅料。

## 吉马酮化合物的新用途

### 技术领域

[0001] 本发明是涉及吉马酮化合物的新用途,属于医药技术领域。

### 背景技术

[0002] 色素沉着是人体皮肤由于多种因素刺激而使黑色素分泌异常增多导致皮肤呈现不同颜色、不同范围及深浅各异的色素变化,是一种常见的多发性皮肤疾病,主要分为黄褐斑、雀斑、妊娠斑、蝴蝶斑等类型,不仅影响了患者的面部美观,而且对其造成了较大的心理压力,影响了生活质量。据统计,全球约有15%的人口投资于皮肤美白产品的生产,其中亚洲占主导地位,消费需求量大[[J].J Enzyme Inhib Chem,2017,32(1):403]。因此,抗黑素过度合成、改善肤色的药物或美白产品一直以来都受到临床或化妆品研发领域的极大关注。

[0003] 黑色素是影响人的皮肤、眼睛和头发颜色的重要因素[[J].中国中药杂志,2020,45(24):5898-5916.]。黑色素合成稳态对维持皮肤颜色、保护皮肤免受紫外辐射及氧化压力等影响因素起到重要作用。然而,黑色素的异常生成或分布不均会影响皮肤的美观甚至引发相关的皮肤疾病,如皮肤黯沉、肤色不均、雀斑、黄褐斑等色素沉着性症状[[J].Int J Mol Sci,2016,17(7):114]。因此,减少黑色素的过度生成是美白祛斑的主要方法。

[0004] 早期应用的黑素合成抑制剂有氢醌和一些含汞物质等,虽然作用显著,但毒副作用较大;如今广泛使用的抗黑素生成成分如熊果苷、曲酸、维生素C等又存在刺激性、安全隐患、稳定性不佳或效果缓慢等问题。此外,激光治疗及手术磨削等手段虽然效果显著,但术后不良反应较多,且治疗费用昂贵,患者顺应性差[[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(10):115-119]。

[0005] 另外,随着人们追求天然、绿色、安全、健康的意识日益增强,植物源性化妆品成分日渐受到消费者的青睐。中药作为天然活性成分供给的一大来源,在美白产品研发领域具有良好的优势与广阔的应用前景。

[0006] 吉马酮(Germacrone)又名牻牛儿酮,化学名为(E,E)-3,7-二甲基-10-(1-甲基亚乙基)-3,7-环癸二烯-1-酮,是一种天然倍半萜类化合物,主要来源于牻牛儿苗科、杜鹃花科及姜科植物莪术、郁金中,分子式为 $C_{15}H_{22}O$ ,分子量为218,具有如下化学结构式:

[0007] 。现有研究表明:吉马酮具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎抑菌、调节糖脂代谢等广泛的药理活性,目前所报道的用途有消炎抑菌、抗肿瘤、抗病毒感染、抗血栓、保肝利胆和治疗银屑病,但至今未见吉马酮在抑制黑色素合成、美白祛斑方面的用途报道。

### 发明内容

[0008] 针对现有技术存在的上述问题,本发明的目的是提供吉马酮化合物的新用途,以拓宽该化合物的应用价值。

[0009] 本发明所述的吉马酮化合物的新用途,是指以吉马酮化合物为活性成分用于制备预防或/和治疗色素沉着性疾病的药物或化妆品。

[0010] 本发明所述的色素沉着疾病包括但不限于：黄褐斑、雀斑、妊娠斑、蝴蝶斑、炎症后色素沉着、药物诱导的色素沉着。

[0011] 本发明所述的药物可以各种给药途径给予患者，包括但不限于口服、透皮、肌肉、皮下和静脉注射。

[0012] 本发明所述药物的剂型不限，只要是能够使活性成分有效地到达体内的剂型都可以，包括：片剂、糖衣片剂、薄膜衣片剂、肠溶衣片剂、胶囊剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、口服液、口含剂、颗粒剂、冲剂、丸剂、散剂、膏剂、丹剂、混悬剂、粉剂、溶液剂、注射剂、栓剂、软膏剂、硬膏剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、贴剂等。

[0013] 本发明所述药物中，还可含有其它活性成分和/或不影响有效成分的次要成分和/或药学上可接受的载体和/或各种制剂所必要的辅料等。

[0014] 本发明所述的化妆品是指用于使皮肤黑色素减退、美白淡斑的护肤品。

[0015] 本发明所述化妆品的类型可以为香皂、洗面奶、沐浴露、柔肤水、护肤啫喱、护肤乳液、护肤霜、精华液、面膜、气雾剂、喷雾剂等各种类型。这些类型均可通过本领域技术人员熟知的方法制得。

[0016] 本发明所述化妆品中还可包括化妆品领域可接受的、制成各种类型所必须的辅料，例如增溶剂、防腐剂、抗氧化剂、pH调节剂、促渗剂、脂质体、保湿剂、增稠剂、螯合剂、肤感调节剂、表面活性剂、乳化剂、香精、色素，以及其他功效添加剂等。

[0017] 与现有技术相比，本发明具有如下显著性有益效果：

[0018] 本发明的研究结果显示：吉马酮化合物对小鼠B16F10细胞黑素的合成能力具有显著抑制活性，能有效减少斑马鱼体内黑色素的合成；并且，吉马酮能显著抑制小鼠B16F10细胞酪氨酸酶的活力，可明显抑制黑素小体向树突尖端的转运，并能显著下调黑素小体maker蛋白HMB45的表达，因而可望作为活性成分用于制备预防或/和治疗色素沉着性疾病的药物或化妆品，对色素沉着性疾病的预防和治疗具有重要意义和应用价值。

## 附图说明

[0019] 图1体现了不同浓度的吉马酮在作用72小时后对B16F10细胞的毒性影响；

[0020] 图2a体现了不同浓度的吉马酮和与其骨架类似的莪术二酮化合物分别对抑制 $\alpha$ -MSH诱导的色素沉着的不同作用效果；

[0021] 图2b体现了不同试验组对B16F10细胞黑素含量的影响；图中：\*是表示与模型组相比， $P<0.05$ ；\*\*是表示与模型组相比， $P<0.01$ ；

[0022] 图3a体现了不同浓度的吉马酮对B16F10细胞中黑素含量的影响；图中：\*是表示与模型组相比， $P<0.05$ ；\*\*是表示与模型组相比， $P<0.01$ ；

[0023] 图3b体现了B16F10细胞经不同浓度的吉马酮化合物作用后在显微镜下观察到的细胞图片；

[0024] 图4体现了不同浓度的吉马酮对B16F10细胞中酪氨酸酶活力的影响；

[0025] 图5体现了吉马酮对B16F10细胞中黑素小体生成和转运的影响；

[0026] 图6体现了吉马酮对B16F10细胞内黑素小体标志物HMB45表达的影响；

[0027] 图7体现了吉马酮对斑马鱼体内色素沉着的影响；

[0028] 图8体现了不同浓度的吉马酮对斑马鱼体内色素生成的影响；图中：\*是表示与对

照组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*是表示与对照组相比,  $P < 0.01$ 。

### 具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0030] 下述实施例中所用的吉马酮化合物和莪术二酮化合物均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司, 纯度均高于98%。

[0031] 实施例1检测化合物吉马酮对小鼠B16F10细胞的毒性

[0032] (1) B16F10细胞培养

[0033] 从液氮罐中取出冻有B16F10细胞的冻存管, 迅速放入37℃水浴中, 并不停摇动, 在1min内使其完全融化; 将细胞悬液转移至1.5mL离心管中, 于室温下、1000r/min离心1min, 弃去上清液后加入1mL高糖DMEM培养基重悬, 然后转移至10cm中皿中, 再加入含10% FBS、添加1%双抗的DMEM培养基, 吹匀, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养细胞至贴壁后更换培养基继续培养, 当细胞长至80%时传代(实验用细胞保持在20代以内)。

[0034] (2) 铺板

[0035] 计数B16F10细胞, 以 $1 \times 10^4$ /孔的细胞密度接种于96孔板中, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。

[0036] (3) 给药

[0037] 细胞贴壁后, 改换含2.5% FBS的DMEM进行培养, 分别加入不同浓度的吉马酮样品溶液, 并设置空白对照组, 且分别作用时间为72h。

[0038] (4) CCK-8法测定细胞存活率

[0039] 配制含10% CCK-8反应液的DMEM培养基, 每孔加入100μL反应液, 于37℃培养箱中反应1h, 然后于450nm波长下检测吸光度值, 计算细胞存活率。

[0040] (5) 数据分析

[0041] 利用PRISM软件进行作图并分析数据, 所有数据均采用mean ± SEM表示,  $n \geq 3$ 。多组间比较用ANOVA分析, Tunnnett检验; 两组间比较用t检验。 $P < 0.05$ 认为组间差异具有统计学意义。

[0042] (6) 实验结果

[0043] 图1体现了不同浓度的吉马酮在作用72小时后对B16F10细胞的毒性影响, 由图1所示可见: 在5 ~ 50μM浓度范围内, 吉马酮对B16F10细胞均未产生明显毒性。

[0044] 实施例2对比吉马酮和与其骨架类似的莪术二酮对黑色素合成调控的差异

[0045] (1) B16F10细胞培养

[0046] 从液氮罐中取出冻有B16F10细胞的冻存管, 迅速放入37℃水浴中, 并不停摇动, 在1min内使其完全融化; 将细胞悬液转移至1.5mL离心管中, 于室温下、1000r/min离心1min, 弃去上清液后加入1mL高糖DMEM培养基重悬, 然后转移至10cm中皿中, 再加入含10% FBS、添加1%双抗的DMEM培养基, 吹匀, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养细胞至贴壁后更换培养基继续培养, 当细胞长至80%时传代(实验用细胞保持在20代以内)。

[0047] (2) 铺板

[0048] 将B16F10细胞以 $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于6孔板,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。

[0049] (3) 给药

[0050] 细胞贴壁后,改换含2.5% FBS的DMEM进行培养,分别加入100nM的 $\alpha$ -MSH溶液(M组)及5、10 $\mu$ M的莪术二酮、5、10 $\mu$ M的吉马酮样品溶液,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养72h;并以氢醌(HQ)为阳性对照药。

[0051] (4) 测定细胞中蛋白含量

[0052] 培养72h后,用PBS (pH=7.2) 将B16F10细胞清洗2次,每孔加入100 $\mu$ L的Western及IP裂解液(含1nM PMSF)将细胞裂解,于4℃下裂解20min,再于4℃下12000rpm离心10min,收集上清液进行蛋白定量。

[0053] 使用BCA试剂盒对蛋白进行定量:取试剂A、试剂B按50:1的体积比配制成BCA工作液备用,取标准蛋白液(0.5mg/mL)与PBS (pH=7.2)按照0:20、1:19、2:18、4:16、8:12、12:8、16:4、20:0的比例加入96孔板中;再加适当体积样品到96孔板中,用PBS (pH=7.2)稀释至总体积为20 $\mu$ L,并每孔加入200 $\mu$ L BCA工作液后,于37℃孵育30min;于562nm处测定吸光度值,计算蛋白浓度。

[0054] (5) 测定细胞中黑色素含量

[0055] 培养72h后,用PBS (pH=7.2) 将B16F10细胞清洗2次,每孔加入100 $\mu$ L的Western及IP裂解液(含1nM PMSF)将细胞裂解,于4℃下裂解20min,再于4℃下12000rpm离心10min,收集沉淀进行黑色素含量测定:

[0056] 向黑色素沉淀中加入80 $\mu$ L的NaOH(含10% DMSO),然后置于80℃恒温箱中煮1h,再于3000rpm下离心1min;取约70 $\mu$ L于96孔板,测定在405nm波长下的吸光度值,计算黑色素的含量。

[0057] (6) 数据分析

[0058] 利用PRISM软件进行作图并分析数据,所有数据均采用mean $\pm$ SEM表示,n $\geq$ 3。多组间比较用ANOVA分析,Tunnett检验;两组间比较用t检验。P<0.05认为组间差异具有统计学意义。

[0059] (7) 实验结果

[0060] 表1不同试验组对B16F10细胞黑素含量的影响

[0061]

|  | 对照组 | 模型组 | 莪术二酮组     |            | 吉马酮组      |            |
|--|-----|-----|-----------|------------|-----------|------------|
|  |     |     | 5 $\mu$ M | 10 $\mu$ M | 5 $\mu$ M | 10 $\mu$ M |

|        |        |            |     |          |          |          |
|--------|--------|------------|-----|----------|----------|----------|
| [0062] | 结构式    | —          | —   |          |          |          |
|        | 倍数 (%) | 100        | 211 | 171      | 173      | 136      |
|        |        | 100        | 264 | 259      | 237      | 179      |
|        |        | 100        | 325 | 208      | 185      | 152      |
|        |        | 100        | 305 | 239      | 198      |          |
|        | P 值    | 0.0004 ### |     | 0.1222   | 0.0349 * | 0.0122 * |
|        | P 值    |            |     | 0.0418 * |          |          |

[0063] 注:0.0418是10 $\mu$ M浓度的吉马酮与10 $\mu$ M浓度的莪术二酮的t检验所得P值;表中:\*是表示与模型组相比,P<0.05;\*\*是表示与模型组相比,P<0.01。

[0064] 图2a体现了不同浓度的吉马酮和与其骨架类似的莪术二酮化合物分别对抑制 $\alpha$ -MSH诱导的色素沉着的不同作用效果;图2b体现了不同试验组对B16F10细胞黑素含量的影响;图中:\*是表示与模型组相比,P<0.05;\*\*是表示与模型组相比,P<0.01;

[0065] 结合表1及图2a和图2b可见:虽然莪术二酮也能一定程度地抑制 $\alpha$ -MSH诱导的B16F10细胞的黑色素合成,且呈现出一定的剂量依赖性;但吉马酮对黑色素合成的抑制作用明显优于同剂量的莪术二酮。

[0066] 实施例3考察不同浓度的吉马酮样品对小鼠B16F10细胞中黑素的调控效应

[0067] (1) B16F10细胞培养

[0068] 从液氮罐中取出冻有B16F10细胞的冻存管,迅速放入37 $^{\circ}$ C水浴中,并不停摇动,在1min内使其完全融化;将细胞悬液转移至1.5mL离心管中,于室温下、1000r/min离心1min,弃去上清液后加入1mL高糖DMEM培养基重悬,然后转移至10cm中皿中,再加入含10%FBS、添加1%双抗的DMEM培养基,吹匀,于37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养细胞至贴壁后更换培养基继续培养,当细胞长至80%时传代(实验用细胞保持在20代以内)。

[0069] (2) 铺板

[0070] 将B16F10细胞以 $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于6孔板,于37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。

[0071] (3) 给药

[0072] 细胞贴壁后,改换含2.5%FBS的DMEM进行培养,分别加入100nM的 $\alpha$ -MSH溶液(M组)及不同浓度的吉马酮样品溶液,于37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养72h;并以氢醌(HQ)为阳性对照药。

[0073] (4) 测定细胞中蛋白含量

[0074] 培养72h后,用PBS(pH=7.2)将B16F10细胞清洗2次,每孔加入100 $\mu$ L的Western及IP裂解液(含1nM PMSF)将细胞裂解,于4 $^{\circ}$ C下裂解20min,再于4 $^{\circ}$ C下12000rpm离心10min,收集上清液进行蛋白定量。

[0075] 使用BCA试剂盒对蛋白进行定量:取试剂A、试剂B按50:1的体积比配制成BCA工作液备用,取标准蛋白液(0.5mg/mL)与PBS(pH=7.2)按照0:20、1:19、2:18、4:16、8:12、12:8、16:4、20:0的比例加入96孔板中;再加适当体积样品到96孔板中,用PBS(pH=7.2)稀释至总体积为20 $\mu$ L,并每孔加入200 $\mu$ L BCA工作液后,于37℃孵育30min;于562nm处测定吸光度值,计算蛋白浓度。

[0076] (5) 测定细胞中黑色素含量

[0077] 培养72h后,用PBS(pH=7.2)将B16F10细胞清洗2次,每孔加入100 $\mu$ L的Western及IP裂解液(含1nM PMSF)将细胞裂解,于4℃下裂解20min,再于4℃下12000rpm离心10min,收集沉淀进行黑色素含量测定:

[0078] 向黑色素沉淀中加入80 $\mu$ L的NaOH(含10% DMSO),然后置于80℃恒温箱中煮1h,再于3000rpm下离心1min;取约70 $\mu$ L于96孔板,测定在405nm波长下的吸光度值,计算黑色素的含量。

[0079] (6) 测定细胞中酪氨酸酶活性

[0080] 加入不同浓度的药物培养72h,用PBS洗2遍,收集细胞于EP管中,每管加入100 $\mu$ L Western及IP裂解液(含1nM PMSF),于4℃下裂解20min,再于4℃下12000rpm离心10min,取上清用于酪氨酸酶的活性测定:

[0081] 取含20 $\mu$ g蛋白的体积样品加入96孔板,用PBS(pH=6.8)定容至100 $\mu$ L,再加入0.01%g/mL L-DOPA 100 $\mu$ L,于37℃避光孵育30min,然后在波长475nm处测定吸光度值,并计算酪氨酸酶的相对活性。

[0082] (7) 数据分析

[0083] 利用PRISM软件进行作图并分析数据,所有数据均采用mean $\pm$ SEM表示,n $\geq$ 3。多组间比较用ANOVA分析,Tunnett检验;两组间比较用t检验。P<0.05认为组间差异具有统计学意义。

[0084] (8) 实验结果

[0085] 图3a体现了不同浓度的吉马酮对B16F10细胞中黑素含量的影响;图中:\*是表示与模型组相比,P<0.05;\*\*是表示与模型组相比,P<0.01;图3b体现了B16F10细胞经不同浓度的吉马酮化合物作用后在显微镜下观察到的细胞图片;图4体现了不同浓度的吉马酮对B16F10细胞中酪氨酸酶活力的影响;由图3a、图3b和图4所示结果可见:不同浓度的吉马酮能一定程度地抑制 $\alpha$ -MSH诱导的B16F10细胞的黑色素合成,并能抑制细胞内酪氨酸酶活力,且呈现出一定的剂量依赖性。

[0086] 实施例4探究吉马酮对小鼠B16F10细胞黑素小体生成的影响

[0087] (1) B16F10细胞培养

[0088] 从液氮罐中取出冻有B16F10细胞的冻存管,迅速放入37℃水浴中,并不停摇动,在1min内使其完全融化;将细胞悬液转移至1.5mL离心管中,于室温下、1000r/min离心1min,弃去上清液后加入1mL高糖DMEM培养基重悬,然后转移至10cm中皿中,再加入含10%FBS、添加1%双抗的DMEM培养基,吹匀,于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养细胞至贴壁后更换培养基继续培养,当细胞长至80%时传代(实验用细胞保持在20代以内)。

[0089] (2) 铺板

[0090] 将B16F10细胞以1 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔的密度接种于中皿,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。



[0091] (3) 给药

[0092] 细胞贴壁后,改换含2.5%FBS的DMEM进行培养,并加入100nM的 $\alpha$ -MSH溶液(M组)和25 $\mu$ M的吉马酮样品,作用时间为72h。

[0093] (4) 透射电子显微镜观察黑素小体

[0094] 细胞培养72h后,用PBS(pH=7.2)清洗细胞3次,用2.5%的戊二醛固定细胞2h,再用PBS清洗细胞5次,每次10min,之后用1%的钨酸处理细胞2h,PBS清洗5次,每次10min,接着用梯度乙醇脱水(30%、50%、70%、80%),用90%、100%的丙酮置换乙醇进一步脱水,用包埋液包埋,超薄切片机切片,通过醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染法染色后,使用透射电子显微镜观察黑素小体。

[0095] (5) 实验结果

[0096] 图5是B16F10细胞经25 $\mu$ M吉马酮处理72小时后,通过透射电子显微镜观察得到的细胞显微图,由图5所示可见:吉马酮能抑制 $\alpha$ -MSH诱发的黑素小体的过快成熟,并能减少黑素小体的数目。

[0097] 实施例5考察吉马酮对小鼠B16F10细胞内黑素小体特异性标志物HMB45表达的影响

[0098] (1) B16F10细胞培养

[0099] 从液氮罐中取出冻有B16F10细胞的冻存管,迅速放入37℃水浴中,并不停摇动,在1min内使其完全融化;将细胞悬液转移至1.5mL离心管中,于室温下、1000r/min离心1min,弃去上清液后加入1mL高糖DMEM培养基重悬,然后转移至10cm中皿中,再加入含10%FBS、添加1%双抗的DMEM培养基,吹匀,于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养细胞至贴壁后更换培养基继续培养,当细胞长至80%时传代(实验用细胞保持在20代以内)。

[0100] (2) 铺板

[0101] 将B16F10细胞以 $5 \times 10^3$ /孔的密度接种于24孔板的细胞爬片上,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。

[0102] (3) 给药

[0103] 细胞贴壁后,改换含2.5%FBS的DMEM进行培养,并加入100nM的 $\alpha$ -MSH溶液(M组)和25 $\mu$ M的吉马酮样品,培养至细胞达到50%融合度。

[0104] (4) 免疫荧光检测HMB45表达

[0105] 给药作用结束后,用PBS(pH=7.2)将细胞洗3次,用4%多聚甲醛固定细胞10min,PBS洗涤细胞3次,再用0.5% Tritonx-100透化处理细胞5min,PBS洗涤细胞3次,之后用5%的BSA封闭,于室温下放置1h,摇床轻摇;然后用PBS洗涤3次后,用抗HMB45(稀释比例1:300)抗体于4℃下过夜孵育,第二天孵育荧光二抗,用封片剂(含DAPI)封片,通过激光共聚焦拍摄HMB45的表达情况。

[0106] (5) 实验结果

[0107] 图6体现了吉马酮对B16F10细胞内黑素小体标志物HMB45表达的影响,由图6所示可见:吉马酮能抑制 $\alpha$ -MSH诱发的B16F10细胞内HMB45的表达,且能抑制B16F10细胞树突的延伸及黑色素的转运。

[0108] 实施例6探究吉马酮对斑马鱼体内色素生成的影响

[0109] (1) 斑马鱼胚胎培养及给药

[0110] 斑马鱼受精胚胎由上海交通大学医学院附属同仁医院科研中心提供。将受精后鱼卵转移至6孔板中,加入用养鱼水配制的不同浓度梯度(25-100 $\mu$ M)的吉马酮样品,以PTU(50 $\mu$ g/mL)作为阳性对照。加药完毕后将鱼卵置于培养箱中培养48h。随机选取对照及实验组的斑马鱼,在显微镜下观察并拍照。最后,将所有组别及重复组的照片导入Image J软件(图片尺寸大小一致),统计斑马鱼的黑色素含量。

[0111] (2) 实验结果

[0112] 图7体现了吉马酮对斑马鱼体内色素沉着的影响;图8体现了不同浓度的吉马酮对斑马鱼体内色素生成的影响;图中:\*是表示与对照组相比, $P<0.05$ ;\*\*是表示与对照组相比, $P<0.01$ ;由图7和图8所示可见:吉马酮能剂量依赖地减少斑马鱼体内的色素合成,且对斑马鱼胚胎的存活及发育无显著影响。

[0113] 由本发明的上述研究结果可见:吉马酮化合物对小鼠B16F10细胞黑素的合成能力具有显著抑制活性,能有效减少斑马鱼体内黑色素的合成;并且,吉马酮能显著抑制小鼠B16F10细胞酪氨酸酶的活力,可明显抑制黑素小体向树突尖端的转运,并能显著下调黑素小体maker蛋白HMB45的表达,因而可望作为活性成分用于制备预防或/和治疗色素沉着性疾病的药物或化妆品,对色素沉着性疾病的预防和治疗具有重要意义和应用价值。

[0114] 最后有必要在此说明的是:以上实施例只用于对本发明的技术方案作进一步详细地说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,本领域的技术人员根据本发明的上述内容作出的一些非本质的改进和调整均属于本发明的保护范围。

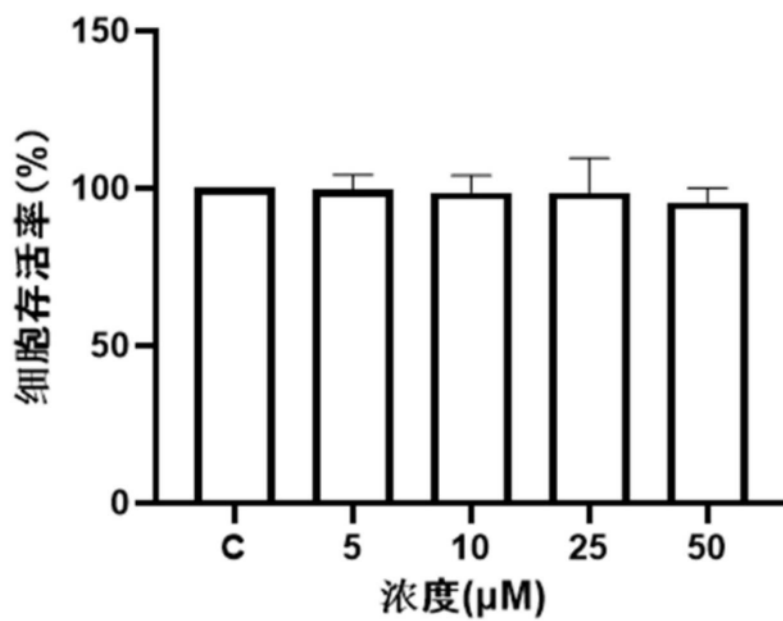


图1

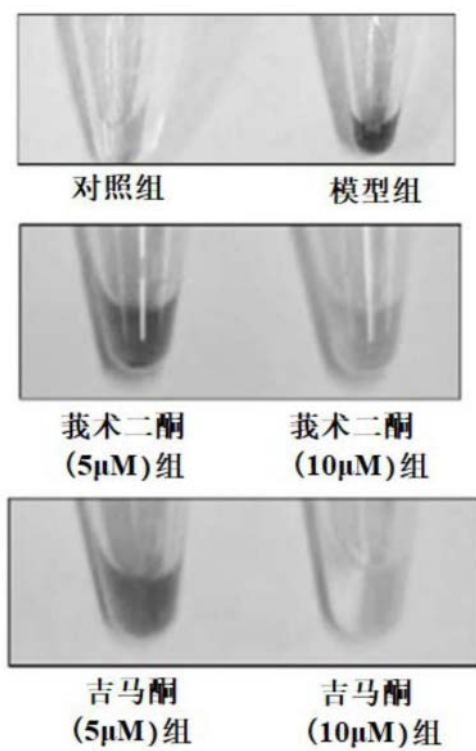


图2a

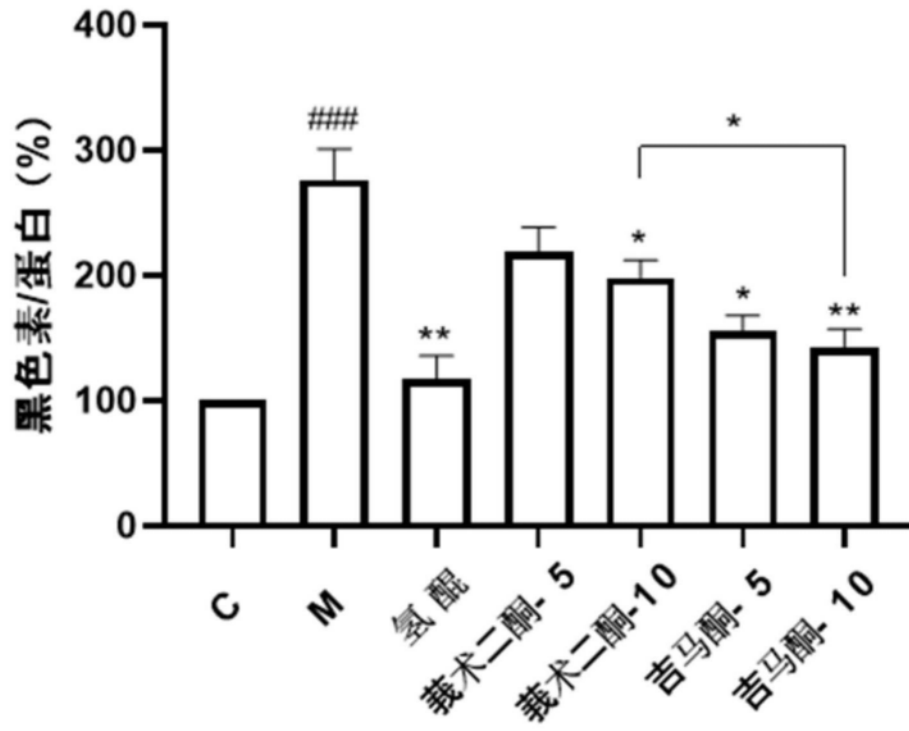


图2b

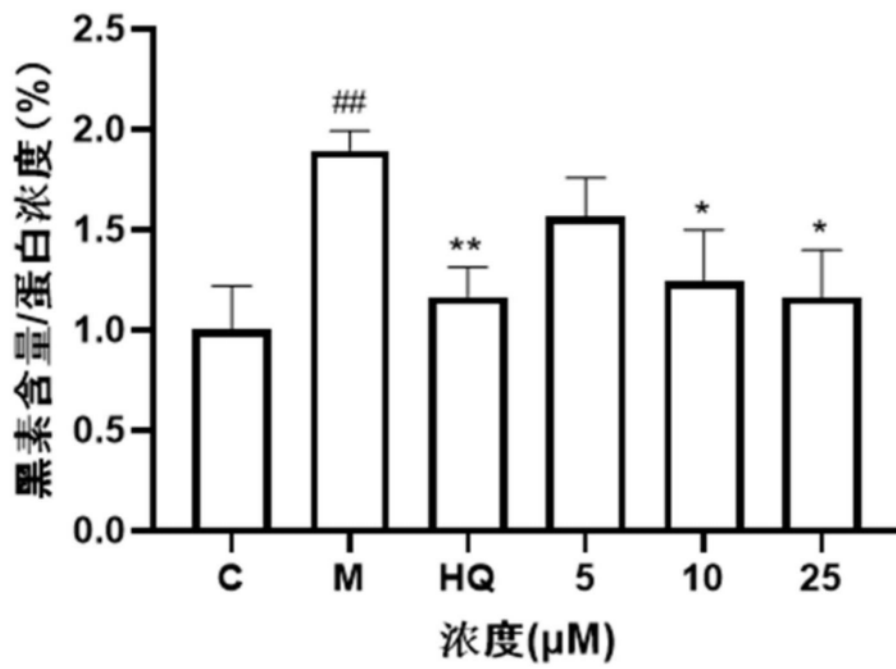


图3a

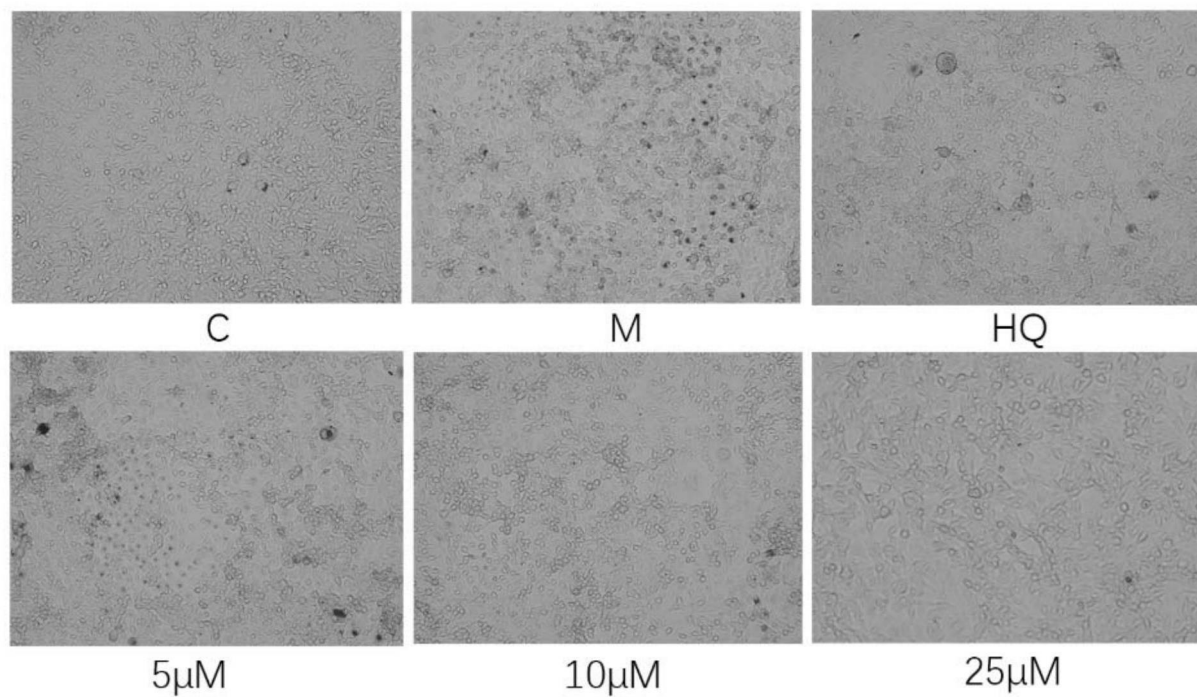


图3b

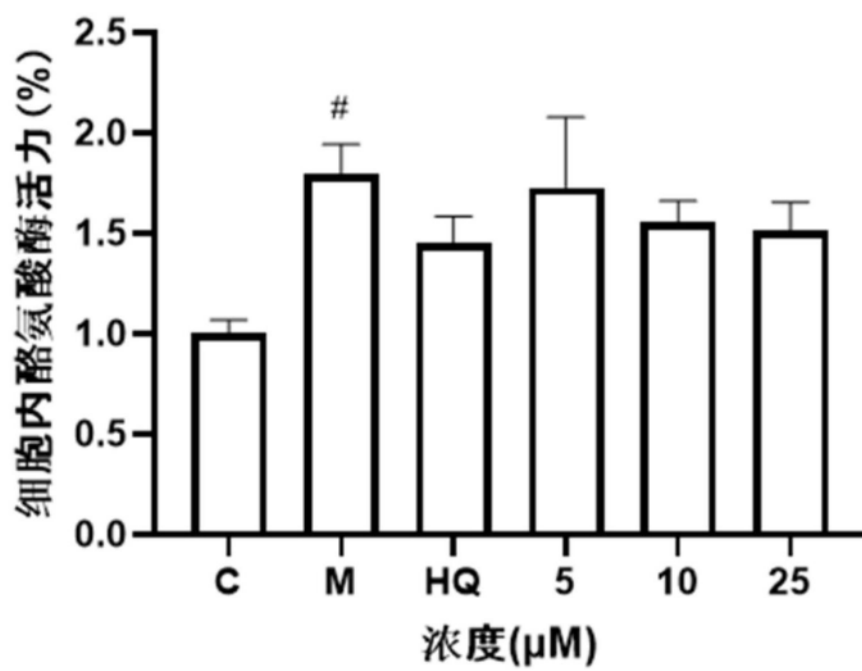


图4

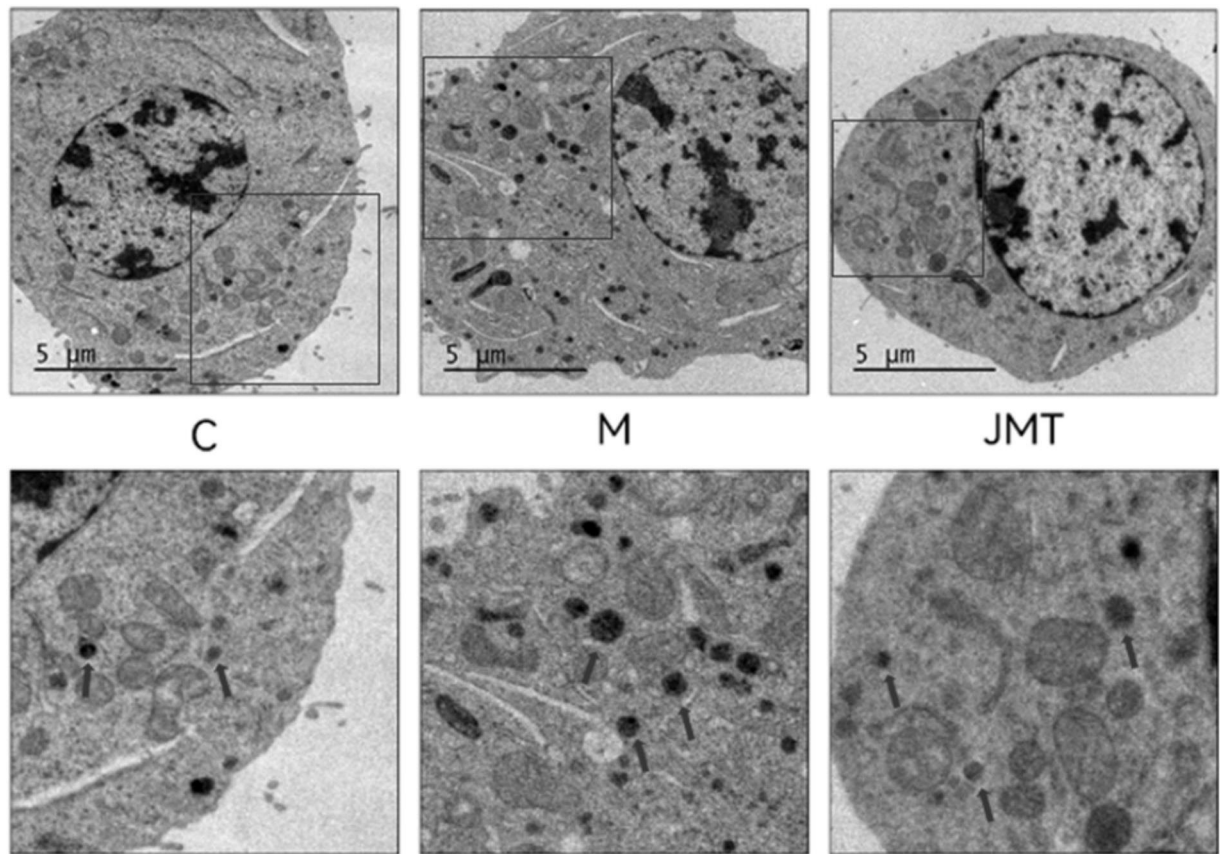


图5

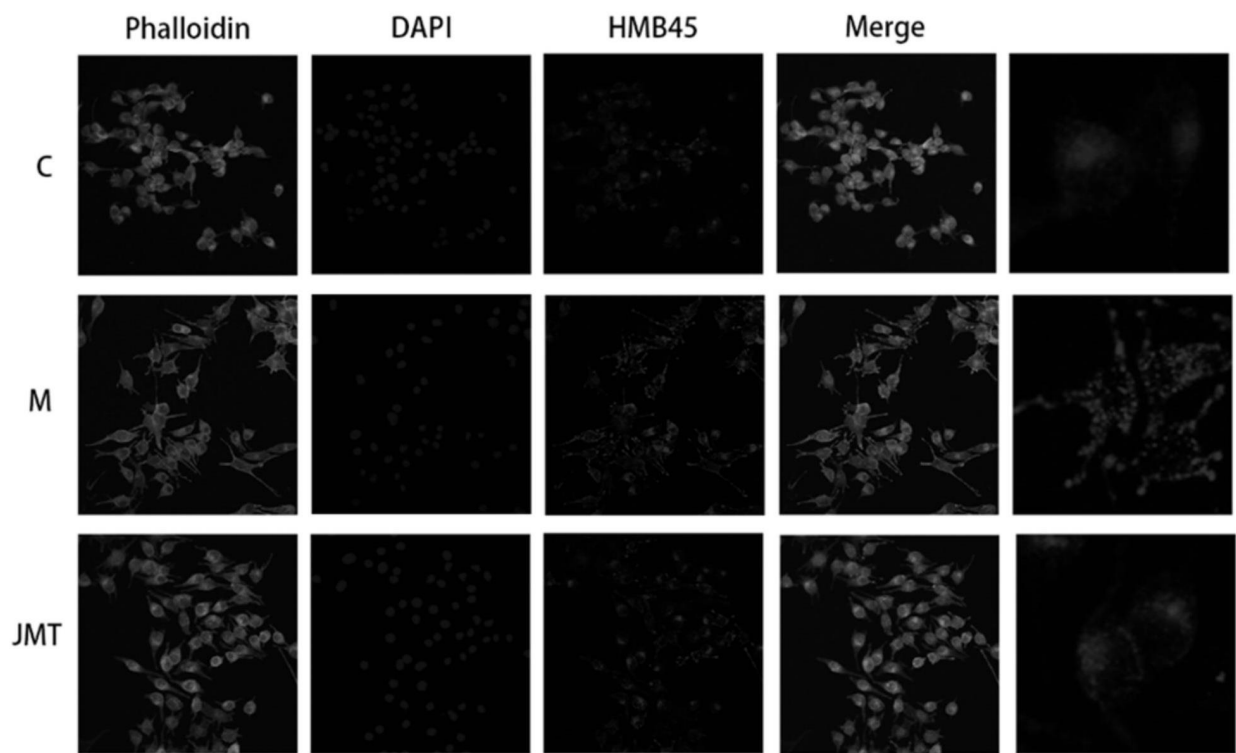


图6

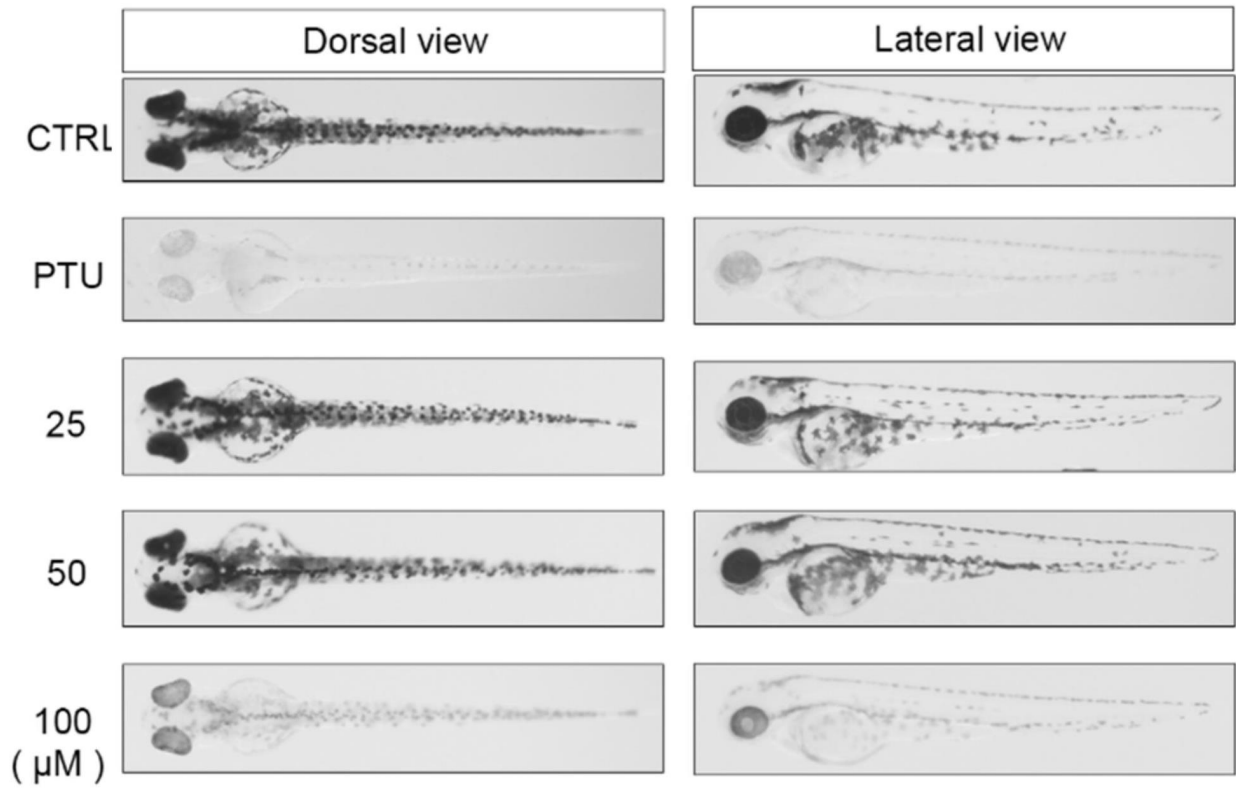


图7

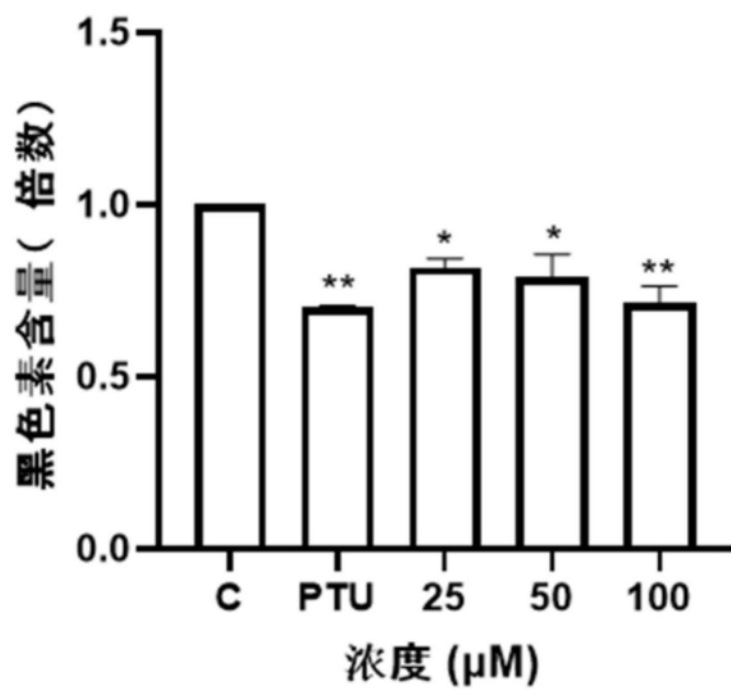


图8