

白藜芦醇-葡萄多酚复方口服液的抗氧化活性和美白作用评价

刘会平¹, 邓玉娣², 廖文镇², 孔晶晶², 周思云², 蒋亮¹

(1. 时代生物科技(深圳)有限公司, 广东深圳 518115)

(2. 南方医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 广东广州 510515)

摘要: 本研究研制了一款白藜芦醇-葡萄多酚复方美白口服液, 评价其抗氧化活性和美白作用, 并对机理进行初步探讨。抗氧化活性实验结果表明, 美白口服液具有较强的抗氧化活性, 不仅能还原铁离子, 还对 DPPH⁺、ABTS⁺、过氧化自由基均有显著的清除作用。对 DPPH⁺、ABTS⁺ 的 IC₅₀ 分别为 10.32±1.20 μg/mL、87.06±9.52 μg/mL; 对过氧自由基的清除、吸收能力分别为 1649.00±2.78 μmol equiv. vit. C/g、4251.30±566.71 μmol of trolox equivalents (TE)/g。以人肝癌细胞 HepG2 为细胞模型, 美白口服液的胞内抗氧化活性可达 5570.10±312.09 μmol of quercetin equivalents (QE)/100 g。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, 进行体外美白作用评价。结果表明, 在一定添加量下, 美白液能抑制 B16 细胞增殖、酪氨酸酶活性和蛋白表达量, 从而减少黑色素的生成。这款复方美白口服液具有良好的抗氧化性与美白作用, 将在功能食品、保健品行业有较好的应用前景。

关键词: 白藜芦醇; 葡萄多酚; 抗氧化; B16 黑色素瘤细胞; 美白; 酪氨酸酶

文章编号: 1673-9078(2019)06-119-128

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.016

Evaluation of the Antioxidant Activity and Whitening Effect of a Resveratrol-Grape Polyphenol Composite Oral Solution

LIU Hui-ping¹, DENG Yu-di², LIAO Wen-zhen², KONG Jing-jing², ZHOU Si-yun², JIANG Liang¹

(1. Times Biotechnology (Shenzhen) Co. Ltd., Shenzhen 518115, China)(2. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: This study developed a resveratrol-grape polyphenol composite whitening oral solution, evaluated its antioxidant activity and whitening effect, and discussed preliminarily the underlying mechanism. The results of the antioxidant activity experiments showed that the whitening oral solution exhibited strong antioxidant activity: not only reduced iron ions, but also exerted significant scavenging effects on the DPPH⁺ and ABTS⁺ free radicals and peroxides. The IC₅₀ values for DPPH⁺ and ABTS⁺ radical scavenging activities were 10.32±1.20 μg/mL and 87.06±9.52 μg/mL, respectively. The peroxy radical scavenging and absorption capacities were 1649.00±2.78 μmol Vit. C equivalents/g and 4251.30±566.71 μmol Trolox equivalents (TE)/g, respectively. In human hepatoma cell line HepG2 model, the intracellular antioxidant activity of the whitening oral solution reached 5570.10±312.09 μmol quercetin equivalents (QE)/100 g. The mouse melanoma B16 cells, which are physiologically relevant to the human melanocytes, were selected as the research models to evaluate *in vitro* the whitening effect. The results showed that at a certain dose, the whitening oral solution could inhibit the proliferation of B16 cells, cellular tyrosinase activity and protein expression of B16 cells, thereby reducing the production of melanin. This composite whitening oral solution exhibited good antioxidant activity and whitening effect, thus, will have great prospects for the functional foods and healthcare products industry.

Key words: resveratrol; grape polyphenols; anti-oxidation; B16 melanoma cells; whitening; tyrosinase

近年来, 人们的审美意识不断提高, 掀起了人们追求皮肤白皙与润泽的热潮, 这引起了广大商家和

收稿日期: 2018-12-24

作者简介: 刘会平(1978-), 男, 高级工程师, 研究方向: 天然植物活性产物、海洋活性多肽

通讯作者: 蒋亮(1988-), 男, 硕士, 研究方向: 天然植物活性产物、海洋活性多肽

发者的重视, 推动着美白产品的研究与开发。但仅仅通过使用护肤品和化妆品无法真正保护和美化肌肤, 只有从内部调理, 才能使面色红润光泽, 肌肤细腻。因此服用美容饮品以达到由内而外的美, 已经成为了大多数女性的共识。

人类皮肤颜色的深浅主要取决于黑色素的含量与分布。酪氨酸经酪氨酸酶催化羟化为多巴并进而形成

多巴醌,经DHI氧化酶和DHICA氧化酶的作用形成黑色素^[1]。酪氨酸酶作为生物体黑色素合成的关键酶及限速酶,是一种含铜氧化还原酶^[2],在其催化黑色素合成的过程中,氧的存在是必需条件^[3]。因此,抗氧化作用对减少黑色素的合成有重要作用。它可能通过阻断或减弱酪氨酸酶的活性,减少黑色素的合成^[4,5]。同时具有抗氧化及酪氨酸酶抑制活性的物质,能结合两者的作用,更好地减少黑色素合成。其次,抗氧化还能减少各种外源性因素产生的自由基,从而避免皮肤的胶原纤维氧化(呈现黄色)导致肤色偏黄^[6]。

维生素C(Vitamin C, Vc)、熊果苷和曲酸具有较强的抗氧化活性,目前已经作为美白剂应用于功能食品和化妆品中^[7]。虽已有文献报道天然活性成分抑制酪氨酸酶的活性和抗氧化能力,但大部分研究的是单一成分,复合成分的抗氧化性与美白功效之间的关系研究少有报道,也无较明确的结论。因此,本课题研制了一款由多种天然活性物质白藜芦醇与葡萄多酚复配的美白口服液,对其进行系统的抗氧化评价,并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,探索该款复方口服液的美白效果及其作用机制,以期开发新型美白功能饮品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

B16 鼠黑色素瘤细胞、人肝癌细胞 HepG2, 购自 ATCC 细胞库。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS), 美国 Gibco 公司; 左旋多巴(L-Dopa)、二甲基亚砜(DMSO)、TritonX-100、噻唑兰(MTT)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、荧光素钠盐、二氯荧光素二乙酸(DCFH-DA)、2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(ABAP), 美国 Sigma 公司; 总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 1,1-苯基-2-苦肟基自由基(DPPH), 源叶生物科技有限公司; NaOH、GAPDH、TYR, 广州一科生物科技有限公司; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、细胞裂解液, 广州斯佳生物科技有限公司。

1.3 主要仪器设备

VORTEX-GENIE2 可调速旋涡混匀器, 美国 Scientific industries; HH-S6 水浴锅, 江苏省金坛市荣

华仪器制造有限公司; FilterMax F5 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices; CP214 电子天平, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; UV-1601 紫外可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器有限公司; 3111 细胞培养箱, 美国 Thermo Scientific; ZHJH-C1209C 超净工作台, 上海智域分析仪器制造有限公司; BDS300 倒置生物显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; BX53 荧光显微镜, 日本 Olympus; TG16-WS 台式高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.4 方法

1.4.1 美白口服液的制备

美白口服液的配方: 葡萄多酚 35 mg、葡萄皮粉(含 10%白藜芦醇) 30 mg、血橙果粉 15 mg、雨生红球藻(含 2.5%虾青素) 10 mg、Vc 100 mg、酵母抽提物(谷胱甘肽) 10 mg。将各种美白活性成分按比例溶于蒸馏水, 使终浓度为 4 mg/mL, 超声溶解 1 h, -4 °C 冰箱避光保存备用。

1.4.2 抗氧化指标

1.4.2.1 铁离子还原能力

称取 27.8 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 溶解并定容到 1 mL, 此时浓度即为 100 mM。取适量 100 mM FeSO_4 溶液稀释至 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mM。96 孔板的每个检测孔中加入 180 μL FRAP 工作液。空白对照孔中加入 5 μL 蒸馏水, 标准曲线检测孔内加入 5 μL 各种浓度的 FeSO_4 标准溶液, 37 °C 孵育 3~5 min 后测定 A_{593} 。以 FeSO_4 质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标建立标准曲线, 得回归方程 $y=0.2108x+0.1316$, $R^2=0.9906$ 。

样品检测孔内加入 5 μL 各种样品或 0.15~1.5 mM 的 Trolox 作为阳性对照, 轻轻混匀, 37 °C 孵育 3~5 min 后测定 A_{593} 。根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力(用 FeSO_4 标准溶液的浓度表示)。

1.4.2.2 DPPH 自由基清除率

取 1 mL 样品溶液, 加入 1 mL 0.2 mM 的 DPPH 溶液, 混匀室温下在黑暗处反应 30 min 后, 在 517 nm 波长下测定样品的吸光值。同时, 空白组为 1 mL 样品溶液与 1 mL 甲醇溶液的混合液, 对照组为 1 mL DPPH 溶液与 1 mL 甲醇混合液。计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}}} \right] \times 100\%$$

1.4.2.3 ABTS 自由基清除率

各取 0.15 mL 样品溶液, 加入 2.85 mL ABTS 自由基溶液, 混匀, 在室温下静置 10 min 后, 在 734 nm 波长下测定样品的吸光值。同时进行空白组实验(用

0.15 mL 蒸馏水代替样品溶液), 每个浓度重复 3 次。计算公式如下:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = [1 - \frac{A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}}] \times 100\%$$

1.4.2.4 过氧化自由基清除能力 (PSC)

参照 Adom 等^[5]细胞外抗氧化活性的测定方法。样品稀释液加入到 96 孔板中每孔加样 100 μL ; 配荧光剂和 ABAP 溶液; 每孔加入 100 μL 的荧光剂及 50 μL 的 ABAP 激发剂; 样品、荧光剂及激发剂加入到 96 孔板之后, 立即放到酶标仪上进行读数; 读取数据完成后, 数据用 Windows excel 导出; 用 Sigmaplot 软件换算出积分面积, 用下列公式计算出 PSC 值:

$$\text{PSC value} = 1 - \frac{\text{SA}}{\text{CA}}$$

其中: SA 是样品/标准品的积分面积值; CA 是对照组的积分面积。

用 Calcsyn 软件计算半抑制浓度 (the half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值; 抗氧化值用 Vc 当量表示: $\mu\text{mol of vitamin C equivalents}(\text{VCE})/\text{g of sample} \pm \text{SD}$ 。

1.4.2.5 过氧自由基吸收能力检测 (ORAC)

$$\text{Relative ORAC value} = \frac{\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}}{\text{AUC}_{\text{trolox}} - \text{AUC}_{\text{blank}}} \left(\frac{\text{molarity of trolox}}{\text{molarity of sample}} \right)$$

1.4.2.6 胞内抗氧化实验

参考 Wolfe^[8]报道的方法。当培养瓶中 HepG2 细胞长到占培养瓶底部面积的 90% 时, 铺种细胞于 96 孔黑板 (黑边白底), 细胞密度为 6×10^4 个/孔, 每孔中含 100 μL 培养基细胞混合液, 由于边际效应黑色 96 孔板边缘四周不加细胞。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 培养 24 h 后吸出培养基用无菌 PBS 冲洗一次; 加入配置好的样品、标准品、对照组和空白组 (对照组和空白组只加入浓度为 25 μM 的 DCFH-DA 培养基溶液)。设置荧光酶标仪, 经过样品的 96 孔板孵育 1 h 后, 用负压吸引器吸取出培养基, 用 100 μL 的无菌 PBS 冲洗一次; 加入 100 μL 浓度为 600 μM 的 ABAP 溶液, 空白孔除外, 空白孔加入 100 μL 氧化培养基, 立即把 96 孔板放入荧光酶标仪中开始检测荧光值。程序结束后, 拷贝原始数据到 excel 中; 用 Sigmaplot 软件对样品、标准品荧光强度进行面积积分。

减去空白荧光值后, 在样品浓度相对应的时间-荧光强度直线下的面积就是 CAA 值, 计算公式如下:

$$\text{CAA}(\text{units}) = 1 - \frac{\int \text{SA}}{\int \text{CA}}$$

其中: $\int \text{SA}$ 是样品的积分面积; $\int \text{CA}$ 是对照组的积分面积。计算三次平行实验结果得到 CCA 值, 单位用 $\mu\text{mol of quercetin}$

参考 Huang 等^[6,7]报道的方法。样品、不同浓度的标准品 (2.5、5、10、20 μM) 和空白对照在黑色 96 孔板中分别加入 50 μL 每孔; 盖上盖子, 放在预热到 37 $^{\circ}\text{C}$ 的酶标仪中孵育 10 min; 每孔加入 100 μL 荧光素溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 再次孵育 20 min; 除了空白孔外, 每孔加入 90 μL AAPH 溶液; 开始读板, 采集荧光信号变化值; 根据荧光信号变化, 由下列公式计算积分面积:

$$\text{AUC} = (0.5 \cdot f_1/f_1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + \dots + f_i/f_1 + \dots + f_{34}/f_1 + 0.5 \cdot f_{35}/f_1) \times \text{CT}$$

其中: f_1 是第一次读取荧光值, f_i 表示第 i 次读取的荧光信号值, CT 表示每次循环间隔时间。

不同浓度的 Trolox 荧光动力学曲线下面积与 Trolox 浓度建立的标准曲线和线性方程 $y = 1.0803x + 0.8508$, 线性决定系数 R^2 为 0.9996, 表明标准曲线的相关性较高。所有样品和标准品的 AUC 减去空白对照的 AUC, 最终 ORAC 值由 Trolox 标准品浓度和 AUC 值的线性关系直线图计算, ORAC 值单位表示是 $\mu\text{mol of trolox equivalents}(\text{TE})/\text{g of DW}$ 样品, 数据表达形式为平均值 \pm 方差。

ORAC 值计算公式如下公式所示:

equivalents (QE)/100 g, 数据表达形式为平均值 \pm 方差。样品的中值浓度则由 $\log (f_a/f_u)/\log (\text{dose})$ 计算获得; f_a 是样品处理组的效应 (CAA units), f_u 是不被样品处理的数值 (1-CAA units)。

1.4.3 B16 细胞实验

1.4.3.1 细胞培养

将 B16 细胞接种于含有 10% FBS, 1% 双抗 (100 U/mL 青霉素, 0.1 g/L 硫酸链霉素) 的 RPMI-1640 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 饱和湿度, 5% CO_2 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^[9]。

1.4.3.2 细胞增殖活性检测 (MTT)

采用 MTT 法检测^[10]。取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 细胞计数, 制成 4×10^4 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。

设置试验组和对照组 (Vc), 每组至少 3 个平行复孔。用样品干预后, 细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度条件下培养, 分别设了 24、48 h 作用时间组。

将作用时间已到的细胞小心弃去上清, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中继续

作用 4 h, 轻轻吸去上清, 加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 于 490 nm 处测定吸光度 A, 计算抑制率。

$$\text{细胞活性抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}}\right) \times 100\%$$

1.4.3.3 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%。药物作用 48 h 后, 用 PBS 冲洗 2 遍, 用倒置显微镜观察拍照; 用 10 mg/L Hoechst 33342 染液对细胞染色 10 min, 运用荧光显微镜观察细胞情况^[11]。

1.4.3.4 黑色素合成量的检测

采用 NaOH 裂解法测定。将作用时间已到的细胞用胰酶消化, 吹打成单细胞悬液, 取 100 μ L 细胞计数, 其余细胞悬液离心, 弃去上清后, 加入 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液 (含 10% DMSO) 于 80 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 转移至 96 孔板, 每孔加 100 μ L, 选择 405 nm 波长, 以空白孔调零, 用酶联免疫检测仪测定吸光度值, 每一个实验重复 3 次, 分析口服液对 B16 细胞黑色素合成的影响。计算黑色素合成抑制率。

$$\text{黑色素合成抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100\%$$

1.4.3.5 酪氨酸酶活性的检测

培养一段时间后弃去上清液, 每孔加入含 1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液 90 μ L, 然后加入 10 μ L 1.0 mg/mL L-DOPA, 超声 30 s, 30 $^{\circ}$ C 处理 30 min 后再测定 475 nm 的吸光值。按如下公式计算酪氨酸酶活性抑制率。

$$\text{酪氨酸酶活性抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100\%$$

1.4.3.6 酪氨酸酶蛋白表达量的检测

取标准蛋白 10 μ L, 加入 90 μ L PBS 稀释 10 倍。再在各孔分别加入 0、1、4、8、12、16、20 μ L 的标准蛋白, 再补齐 PBS 至每孔 20 μ L。在酶标仪上 595 nm 波长下测吸光度, 绘制标准曲线。各处理组细胞培养 48 h 后分别收集各组总蛋白, 根据标准曲线公式计算样品蛋白浓度。加上样缓冲液以及 PBS 至同一浓度, 98 $^{\circ}$ C 煮沸变性, 进行凝胶电泳, 并电转印至 PVDF 膜 (恒流 200 mV, 转膜时间 120 min), 于常温下, 使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 TYR 单克隆抗体和 GAPDH 抗体, 4 $^{\circ}$ C 恒温过夜后, TBST 洗膜 15 min \times 3 次, 二抗室温孵育 1 h, 再使用 TBST 洗膜 15 min \times 3 次, 加入显影液曝光, 拍照^[12]。

1.4.4 统计学方法

应用 SPSS19.0 进行数据分析, 实验数据采用单因素方差分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $p < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 铁离子还原能力

酸性条件下抗氧化物可以还原 Ferric-tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ, 在 593 nm 测定蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 的吸光度值即可获得样品中的总抗氧化能力^[13]。由表 1 可知, 当质量浓度为 0.125 mg/mL 时, 美白口服液的总抗氧化性能略低于维生素 E (Vitamin E, VE)。当质量浓度为 0.25 mg/mL 时, 美白口服液的总抗氧化活性略高于 Vc, 与 VE 接近。之后随着浓度的增加, 美白口服液的抗氧化活性增大, 说明口服液在低浓度时抗氧化效果不明显, 在较高浓度下才能发挥良好的抗氧化性能。

表 1 美白口服液对铁离子还原能力的影响

Table 1 Effect of oral whitening solution on iron ion reducing ability

project	Concentration/(mg/mL)	Total antioxidant capacity/(nM, $\bar{x} \pm s$)
sample	0.0625	0.29 \pm 0.03**
	0.125	0.87 \pm 0.03**
	0.25	2.13 \pm 0.14
	0.5	4.54 \pm 0.15**
	1	9.10 \pm 0.29**
	2	15.14 \pm 0.09**
	4	15.04 \pm 0.37**
Vitamin C	0.25	3.49 \pm 0.05**
	4	15.32 \pm 0.07**
Vitamin E	0.125	0.91 \pm 0.01
	0.25	2.20 \pm 0.01*

注: 与对照组 VE(0.125 mg/mL)比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

2.2 DPPH 自由基清除率

DPPH 是一种稳定的自由基, 其乙醇溶液显紫色, 在 515 nm 处有最大吸收。当抗氧化剂存在时, DPPH 自由基中的 N 原子得到 H 质子会被还原, 颜色变浅, 吸光值降低, 常用来测试样品的抗氧化能力^[14-16]。如图 1 所示, 美白口服液对 DPPH 自由基有一定的清除活力, 且有浓度依赖效应。在低浓度 (1.25 μ g/mL) 时样品清除 DPPH 自由基效果不明显。随着浓度的增加, 在浓度为 10 μ g/mL 时, 样品对 DPPH 自由基清除率可达 41.54%, 浓度为 20 μ g/mL 时, 对 DPPH 自由基清除率可达 91.83%。曲线拟合后, 计算得到美白口服液对 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 10.32 \pm 1.20 μ g/mL。

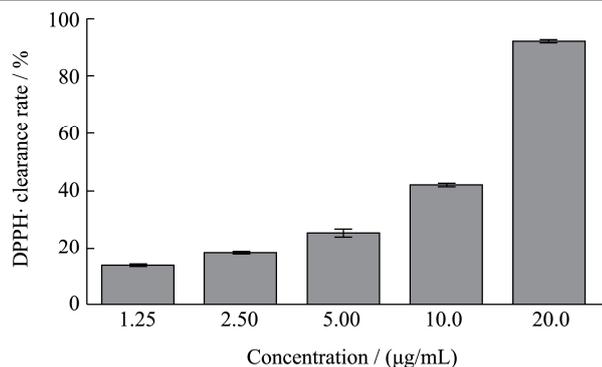


图1 美白口服液对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 Effect of oral whitening solution on DPPH free radical scavenging rate

2.3 ABTS 自由基清除率

ABTS 可被 $K_2S_2O_8$ 、 MnO_2 、ABAP 和 H_2O_2 等各种试剂氧化, 生成蓝绿色的自由基阳离子 ABTS。ABTS 相当稳定, 在 414、645、734 和 805 nm 处有最大吸收峰。在抗氧化剂存在下, ABTS 与之反应, 变成没有颜色的 ABTS^[17]。由图 2 可知, 美白口服液对 ABTS 自由基有清除作用, 且有浓度依赖效应。当口服液浓度在 12.5 µg/mL 时, 对 ABTS 自由基清除率仅为 6.44%。随着浓度进一步增大, 当口服液浓度为 100 µg/mL 时, 清除率为 56.30% (>50%)。经计算, 可得到美白口服液对 ABTS 自由基的 IC_{50} 为 87.06 ± 9.52 µg/mL。

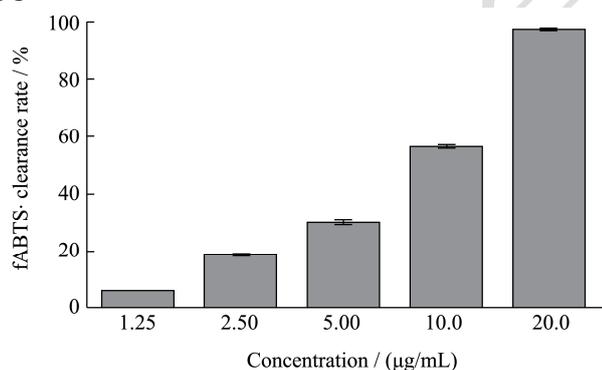


图2 美白口服液对 ABTS 自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of oral whitening solution on ABTS free radical scavenging rate

2.4 过氧化自由基清除能力 (PSC)

37 °C 下, ABAP 降解产生过氧化自由基 ($ROO\cdot$), 引起无荧光信号的非荧光二氯荧光素 (DCFH) 分解产生具有荧光信号的荧光二氯荧光素 (DCF)^[18]。根据 DCFH 被氧化的程度来表达检测样品的抗氧化能力。化合物抑制 DCFH 的氧化作用, 导致产生较小的 SA, 较高的 PSC 值。PSC 单元图对应着一个典型的

曲线, 其描述了在一定实验条件下抗氧化剂实际的抑制特点。通过 CalcuSyn 软件得到标准品和样品的剂量-反应曲线。由图 3、4 可知, 在不同质量浓度下标准品 Vc 和美白口服液在不同时间下其荧光积累量逐渐递增, 分布均匀, 样品和 Vc 抑制了 DCFH 的氧化作用, 导致产生较小的 SA, 较高的 PSC 值。计算得到样品的 PSC 值为 1649.00 ± 2.78 µmol equiv. vit. C/g。

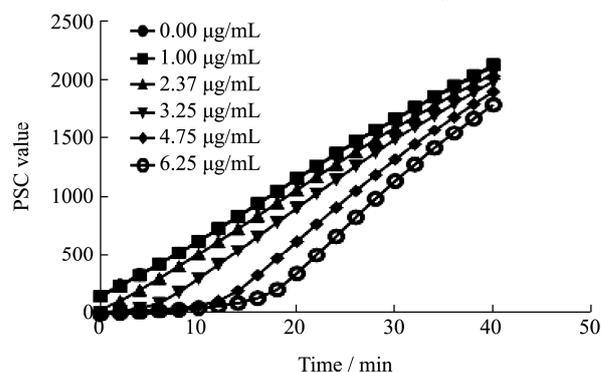


图3 标准品 VC 清除过氧化自由基的时间动力学与剂量-反应曲线

Fig.3 Time kinetics and dose-response curves of VC scavenging peroxidative free radicals

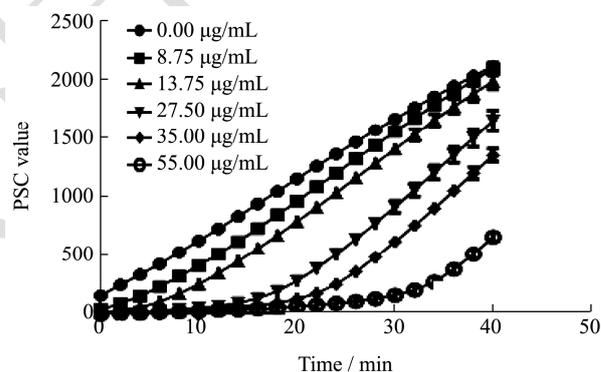


图4 美白口服液清除过氧化自由基的时间动力学与剂量-反应曲线

Fig.4 Time kinetics and dose-response curves of oral whitening solution scavenging peroxidase free radicals

2.5 过氧自由基吸收能力检测 (ORAC)

ORAC 法使用荧光素 (fluorescein, FL) 为氧化底物, 以 2,2'-偶氮-(2-脒基丙烷) 二盐酸盐 (AAPH) 作为过氧自由基来源, 在抗氧化剂作用下, 荧光衰退曲线下面积与荧光自然衰退曲线下面积的差作为衡量抗氧化剂的抗氧化能力指标, 结果以抗氧化剂 Trolox 作为标准进行表达, 用来定量表征样品的抗氧化能力^[19,20]。图 5 为不同浓度的 Trolox 标准溶液的荧光动力学曲线。随着浓度的增加, 荧光淬灭的时间逐渐延长。荧光动力学曲线的下面积也随着浓度的增大而逐渐增大。图 6 为美白口服液清除自由基的荧光动力学图谱。

其中对照样品由于未添加任何抗氧化剂, 荧光相对强度较早达到最低值。加入样品后, 它的荧光强度迅速衰减, 在 70 个循环时荧光相对强度才接近最低值。因为样品具有抗氧化活性, 可以暂时抑制或延缓对荧光液的氧化, 故可以在一定时期内维持荧光液的荧光强度。计算可得到样品的 ORAC value 为 $4251.30 \pm 566.71 \mu\text{mol}$ of trolox equivalents (TE)/g。

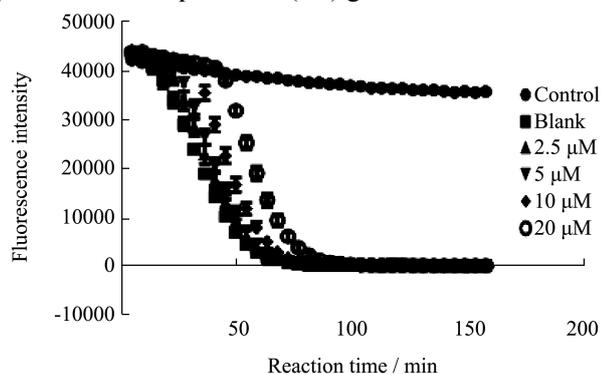


图5 Trolox 吸收过氧自由基的时间动力学与剂量-反应曲线
Fig.5 Time kinetics and dose-response curves of peroxygen free radical absorbed by trolox

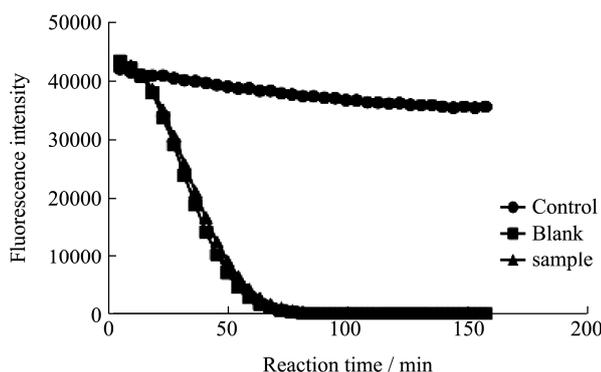


图6 美白口服液吸收过氧自由基的时间动力学与剂量-反应曲线

Fig.6 Time kinetics and dose-response curves of peroxygen free radical absorbed by whitening oral solution

2.6 细胞抗氧化实验

尽管目前对单体和食物混合物的总抗氧化能力评价有许多种化学评价方法, 但是这些化学方法未能充分的考虑体内生理代谢环境的影响、待测物质在体内的消化及吸收等问题。因此, 本课题采用了细胞内抗氧化实验。HePG2 细胞内 ABAP 产生的过氧化氢自由基氧化还原型 DCFH 生成荧光物氧化型二氯荧光素 ($2',7'$ -dichlorofluorescein, DCF), 抗氧化剂抑制了反应的进行, 反映在实验中即为荧光强度的减小^[21]。细胞抗氧化能力的测定采用了 PBS 清洗的处理方法, 主要反映抗氧化剂在细胞内部的抗氧化活性。如图 7 和图 9 所示, 随着标准品和样品浓度的增加, 二者抑制荧

光物 DCF 生成的作用均增强。但标准品抑制荧光物 DCF 生成的能力明显强于美白液。CAA 值反映的是植物化学物在细胞内的吸收、代谢及细胞水平的抗氧化能力, 是更接近动物水平的体外抗氧化值, 相对化学抗氧化方法数值更准确^[22]。利用 CAA 计算公式, 得到美白口服液的 CAA 值为 $5570.10 \pm 312.09 \mu\text{mol}$ of quercetin equivalents (QE)/100 g。对比图 8 和图 10, 可判断美白液的中值浓度略大于槲皮素标准品。

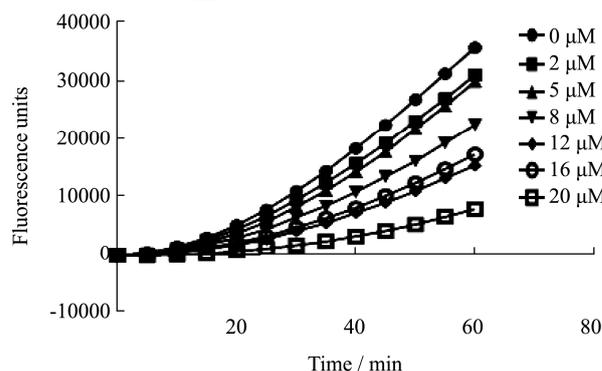


图7 槲皮素标准品细胞内抗氧化的时间动力学与剂量-反应曲线

Fig.7 Time kinetics and dose-response curves of quercetin standards on intracellular antioxidants

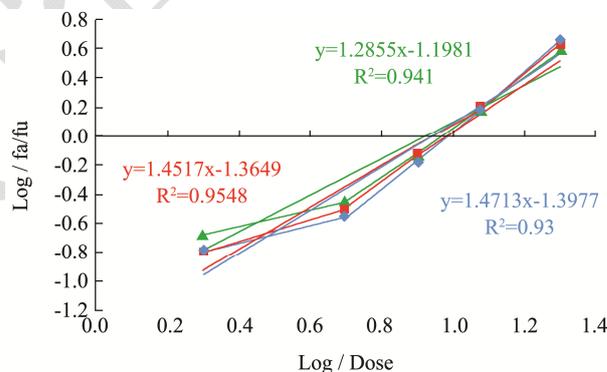


图8 标准品的拟合方程

Fig.8 Fitting equation for standards

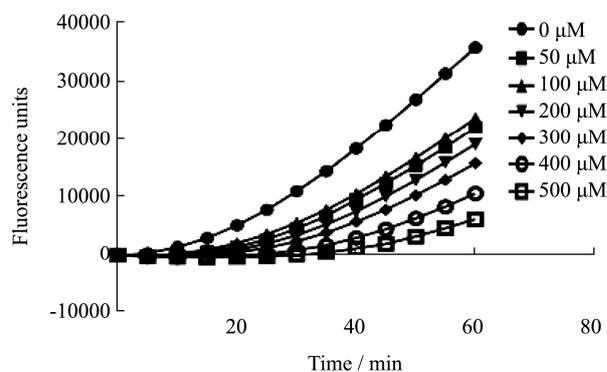


图9 美白口服液细胞内抗氧化的时间动力学与剂量-反应曲线

Fig.9 Time kinetics and dose-response curve of oral whitening solution on intracellular antioxidant

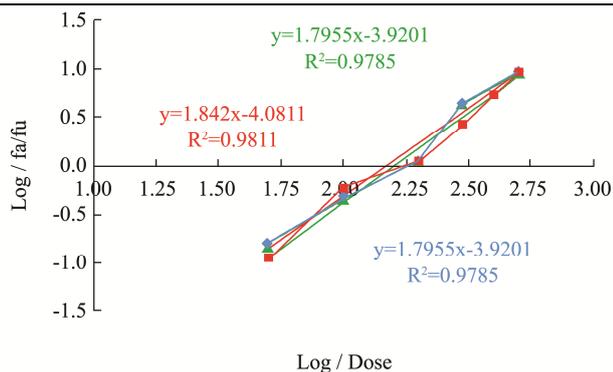


图 10 美白口服液的拟合方程

Fig.10 Fitting equation for oral whitening solution

2.7 细胞增殖活性(MTT)

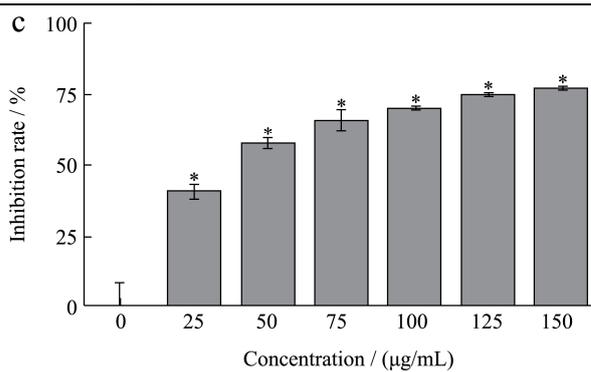
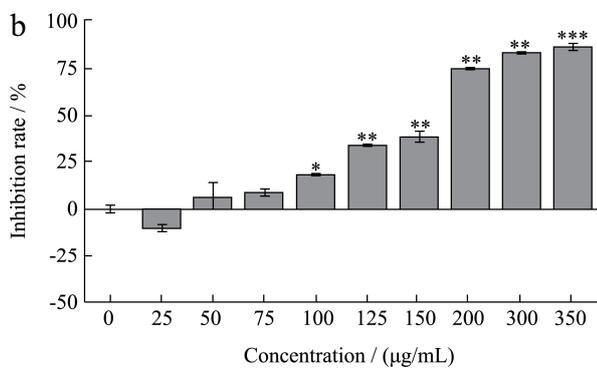
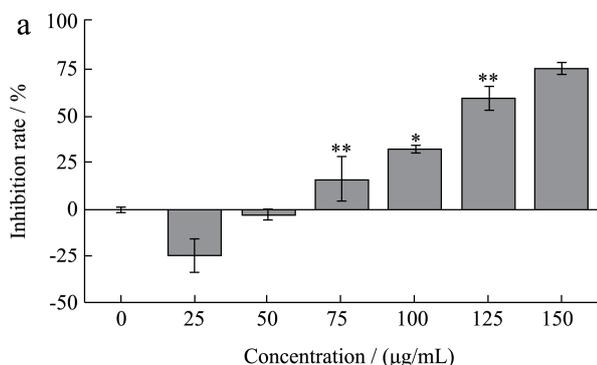


图 11 美白口服液对 B16 细胞增殖活性的影响

Fig.11 Effect of oral whitening solution on proliferative activity of B16 cells

注: a: 美白口服液干预 24 h, b: Vc 干预 24 h, c: 美白口服液干预 48 h.

对比图 11a、b 可知, 当美白口服液和维生素 C 质量浓度小于 50 µg/mL 时, 二者均能促进 B16 细胞增殖。当美白液质量浓度达 125 µg/mL 时, B16 细胞增殖的抑制率高于 50%, 而此浓度下, 维生素 C 对 B16 细胞抑制率仍小于 50%。由此可知, 美白液及维生素 C 均能通过抑制黑色素细胞的生长来达到美白的功效, 且美白液的效果明显优于 Vc。由图 11c 可知, 质量浓度达 100 mg/L 时, 曲线斜率趋于平缓, 表明该质量浓度接近美白的最大作用质量浓度。对比图 11a、c 可知, 美白液质量浓度为 50 µg/mL 时, 作用 48 h, 对 B16 细胞增殖的抑制率为(57.69±1.8407)%, 明显高于同等浓度下作用 24 h 美白液对 B16 细胞增殖的抑制率。综上, 一定浓度的美白液在对 B16 细胞增殖方面有明显的抑制作用, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$), 且抑制作用与其作用时间、质量浓度呈正相关。经曲线拟合确定美白液作用 24 h、48 h, Vc 作用 24 h 的 IC_{50} 分别为 121.22 ± 24.22 、 36.94 ± 0.22 、 169.42 ± 3.36 µg/mL。

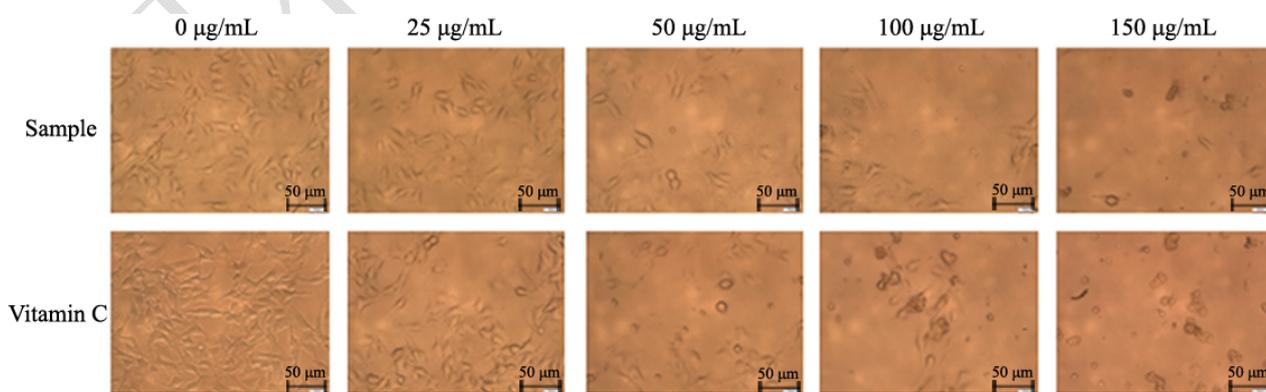


图 12 不同质量浓度美白口服液对 B16 细胞形态的影响 (光学显微镜, ×400)

Fig.12 Effect of different concentration of oral whitening solution on the morphology of B16 cells (Optical microscope, ×400)

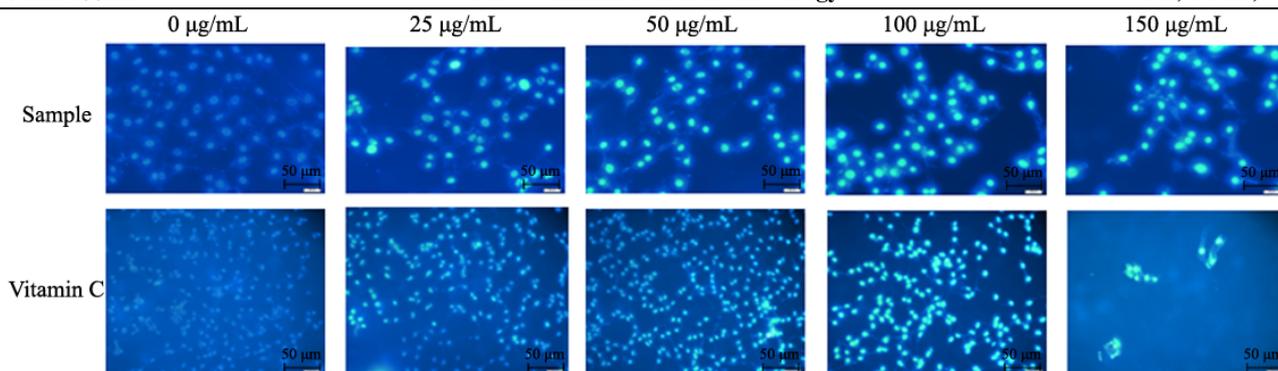


图 13 不同质量浓度美白口服液对 B16 细胞形态的影响 (荧光显微镜, ×400)

Fig.13 Effect of different mass concentration of oral whitening solution on the morphology of B16 cells (Fluorescence microscope, ×400)

2.8 细胞凋亡情况

传代的 B16 黑色素瘤细胞主要为两极, 偶见三极的贴壁生长的上皮型细胞^[23]。由图 12 可见, 对照组细胞生长良好, 形态正常; 当加入不同浓度样品和 VC 时, 细胞形态均出现了不同程度的变化。当质量浓度较小时, 细胞形态和数量变化均不明显, 随浓度的继续升高, 开始导致细胞分布稀疏, 细胞树突减少或消失, 不能相互融合形成网状结构。

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^[24]。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^[25]。通过不同浓度美白液和 Vc 处理细胞后的 Hoechst 33342 染色图片 (图 13), 可以发现质量浓度大于 25 µg/mL 时, 细胞出现凋亡的状态, 部分细胞变形, 细胞凋亡明显且细胞的凋亡数量与干预物质量浓度呈正相关, 说明超过一定浓度的美白液能影响 B16 细胞的凋亡。

2.9 黑色素合成量

由图 14 可知, 相同作用时间和浓度下, 美白液 B16 细胞黑色素合成的抑制作用与 Vc 接近。在低浓度下, B16 细胞黑色素合成量与时间的关系不大。但高浓度下, 干预时间越长, B16 细胞黑色素合成量越少。干预 48 h, 黑色素总量在 25~100 mg/L 范围变化明显, 当美白液质量浓度超过 100 mg/L 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。结果说明, 一定浓度的美白液对 B16 细胞黑色素的合成有明显抑制作用, 且抑制作用与其作用时间、质量浓度呈正相关。

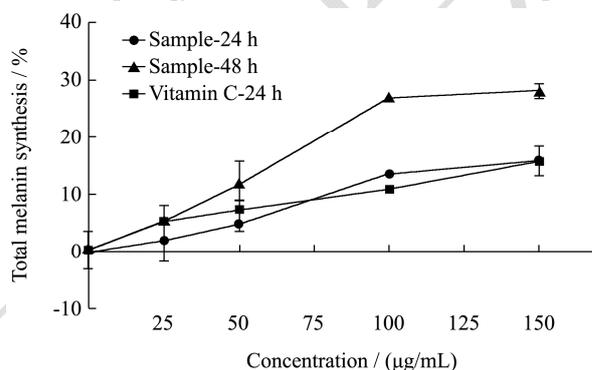


图 14 美白口服液对 B16 细胞黑色素分泌的影响

Fig.14 Effect of oral whitening solution on melanin secretion in B16 cells

2.10 酪氨酸酶活性

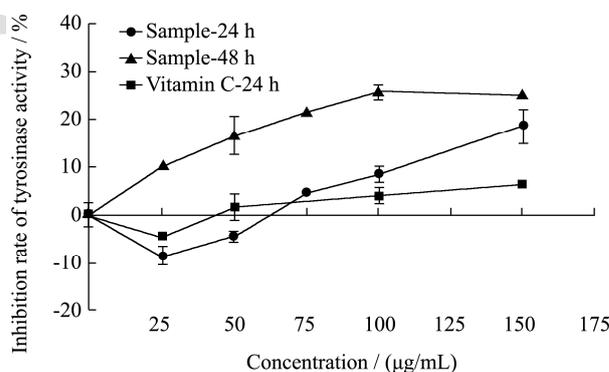


图 15 美白口服液对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

Fig.15 Effect of oral whitening solution on tyrosinase activity in B16 cells

美白液对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响如图 15 所示。说明美白液及 Vc 对酪氨酸酶的总活性均具有一定的抑制效果, 存在一定的浓度依赖性。在一定浓度范围内, 抑制率随着样品添加量的降低而显著降低。干预 48 h, 样品对酪氨酸酶活性的抑制作用高于干预 24 h 样品对酪氨酸酶活性的抑制作用。可初步判断, 抑制率随时间的延长而增大。

2.11 酪氨酸酶蛋白表达量

检测不同质量浓度美白液对酪氨酸酶表达的影响, 见图 16。结果显示随着美白液质量浓度的增大, 细胞内的酪氨酸酶蛋白表达量明显低于空白对照组, 结果表明美白液可以下调细胞内酪氨酸酶的蛋白表达水平, 有一定的质量浓度依赖性。这与 Kazuomi Sato 等^[26]研究发现的乙酰水杨酸可能是通过下调细胞内酪氨酸酶蛋白表达水平来抑制 B16 黑素瘤细胞内黑色素合成的结果相似。在高质量浓度情况下, GAPDH 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。

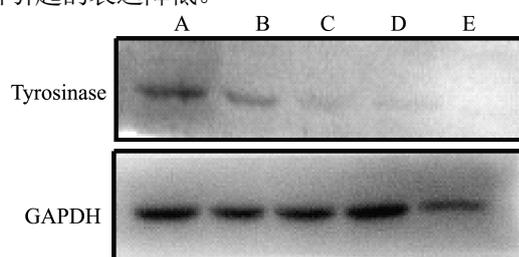


图 16 美白口服液对 B16 细胞中酪氨酸酶表达的影响

Fig.16 Effect of oral whitening solution on tyrosinase expression in B16 cells

注: A~E 美白液浓度分别为 0、25、50、100、150 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 结论

3.1 本文采用胞外抗氧化(包括铁离子还原能力、DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、过氧化自由基清除能力和过氧自由基吸收能力)和胞内抗氧化性能系统评价美白液的抗氧化特性。值得注意的是, 这款美白液含有水溶性和脂溶性物质。选用的 PSC 方法, 能够测定出包含水溶性和脂溶性部分的总抗氧化活性, 可更加全面的评价总抗氧化活性^[27]。整体上看, 美白液的抗氧化性能有浓度依赖趋势, 且接近同剂量的阳性对照物 Vc, 这可能和美白口服液中多种抗氧化物质的协同作用有关。

3.2 本文选择小鼠黑色素瘤 B16 细胞为模型, 研究美白液对黑色素合成的影响。结果揭示美白液能明显抑制黑色素细胞分泌, 作用机制在不同质量浓度下通过不同方式进行。细胞染色图片可直观看到, 美白液可抑制 B16 细胞增殖。Western blot 结果则揭示美白液在 B16 细胞上作用的分子机制可能是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。

3.3 综上所述, 这款复方口服液具有较强的抗氧化活性, 且能抑制黑色素合成具有美白作用。可以预见, 将抑制黑色素形成以及抗氧化 2 种途径有机地结合,

可充分发挥美白液多成分、多靶点与多功效相结合的优势, 一定会开发出更多更好的美白功能食品。本课题组将开展老鼠与人体实验, 以更有力地证明其功效, 使其更快推向市场, 满足消费者的需求。

参考文献

- [1] Parvez S, Kang M, Chung H, et al. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents [J]. *Phytotherapy Research*, 2006, 20(11): 921-934
- [2] Fenoll L G, Penalver M J, Rodriguez-Lopez J N, et al. Tyrosinase kinetics: Discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(2): 235-246
- [3] 邱凌.天然植物活性物质对酪氨酸酶作用机理的研究[D]. 厦门:厦门大学,2009
QIU Ling. Study on the mechanism of action of natural plant active substances on tyrosinase [D]. Xiamen: Xiamen University, 2009
- [4] 王一帆,赖家珍,龙晓英,等.中药美白机制及功效评价进展[J].*广东药学院学报*,2014,4:525-529
WANG Yi-fan, LAI Jia-zhen, LONG Xiao-ying, et al. Progress in whitening mechanism and efficacy evaluation of traditional Chinese medicine [J]. *Journal of Guangdong College of Pharmacy*, 2014, 4: 525-529
- [5] Liu R H. Dietary bioactive compounds and their health implications [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(1): A18-A25
- [6] Dejian H, Boxin O, Maureen H W, et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2002, 50(16): 4437
- [7] Ming W Z, Rui F Z, Fang X Z. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(13): 7580-7587
- [8] Wolfe K L, Xinmei K, Xiangjiu H, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2008, 56(18): 8418-8426
- [9] Chang T S, Lin V C. Melanogenesis inhibitory activity of two generic drugs: Cinnarizine and trazodone in mouse B16 melanoma cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(12): 8787-8796
- [10] Xin M, Yuan-Yuan W, Xiao M, et al. Antagonism of

- phenanthrene cytotoxicity for human embryo lung fibroblast cell line HFL-I by green tea polyphenols [J]. Environmental Pollution, 2011, 159(1): 164-168
- [11] Komoike Y, Matsuoka M. Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2016, 310: 68-77
- [12] 李莹,王英,杨丙晔,等.Z-十八碳-9-烯-丙磺酰胺对小鼠 B16 细胞黑素生成的抑制作用[J].中国皮肤性病学杂志,2018, 10:1120-1123
- LI Ying, WANG Ying, YANG Bing-ye, et al. Inhibition of Z-octadec-9-ene-propanesulfonamide on melanogenesis in mouse B16 cells [J]. Chinese Journal of Dermatology and Venereology, 2018, 10: 1120 -1123
- [13] Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study [J]. J Agric Food Chem., 2002, 50(11): 3122-3128
- [14] Porto C D, Calligaris S, Celotti E, et al. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH- test [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2000, 48(9): 4241-4245
- [15] Standley L, Winterton P, Marnewick J L, et al. Influence of processing stages on antimutagenic and antioxidant potentials of rooibos tea [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(1): 114-117
- [16] 李小燕,何婉莺,彭颖,等.瑄溪蜜柚精油的抗氧化及其对 B16 细胞中酪氨酸酶的抑制效果[J].食品工业科技,2018, 5:86-89
- LI Xiao-yan, HE Wan-ying, PENG Ying, et al. Antioxidation of Guanxi honey pomelo essential oil and its inhibitory effect on tyrosinase in B16 cells [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 5: 86-89
- [17] Labrinea E P, Georgiou C A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 526(1): 63-68
- [18] 王立峰,鞠兴荣.3 种薏米的多酚提取物清除过氧化氢自由基抗氧化能力评价[J].食品科学,2012,19:39-44
- WANG Li-feng, JU Xing-rong. Evaluation of antioxidant capacity of hydrogen peroxide free radicals extracted from polyphenols extracted from three kinds of glutinous rice [J]. Food Science, 2012, 19: 39-44
- [19] 赵建,刘璇,文镜.荧光分光光度计测定保健食品总抗氧化能力[J].食品科学,2010,22:301-305
- ZHAO Jian, LIU Xuan, WEN Jing. Determination of total antioxidant capacity of health foods by fluorescence spectrophotometer [J]. Food Science, 2010, 22: 301-305
- [20] 杨涛,吴辉辉,徐青,等.抗氧化性能评价 ORAC 法及最新研究进展[J].食品工业科技,2009,7:352-355
- YANG Tao, WU Hui-hui, XU Qing, et al. ORAC method for antioxidant performance evaluation and recent research progress [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 7: 352-355
- [21] 李谣,陈金龙,夏春燕,等.基于 HepG2 细胞模型的香菇柄粉多酚抗氧化及抗增殖活性[J].食品科学,2016,11:190-196
- LI Yao, CHEN Jin-long, XIA Chun-yan, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols from mushroom handle powder based on HepG2 cell model [J]. Food Science, 2016, 11: 190-196
- [22] Wolfe K L, Xinmei K, Xiangjiu H, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(18): 8418-8426
- [23] 陈贞纯,贾玲燕,毛祖法,等.茶叶提取物对 B16 小鼠黑色素瘤细胞的生物学效应及机理研究[J].茶叶科学,2014,5: 465-472
- CHEN Zhen-chun, JIA Ling-yan, MAO Zu-fa, et al. Biological effects and mechanism of tea extract on B16 mouse melanoma cells [J]. Tea Science, 2014, 5: 465-472
- [24] Crowley L C, Marfell B J, Waterhouse N J. Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342 [J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2016, 9: 778-781
- [25] 黄海潮,郑公铭,张小红,等.龙眼果核中没食子酸的体外美白作用及机制探索[J].中国实验方剂学杂志,2015,19:121-124
- HUANG Hai-chao, ZHENG Gong-ming, ZHANG Xiao-hong, et al. *In vitro* whitening effect and mechanism of gallic acid in longan fruit nucleus [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 19: 121-124
- [26] Sato K, Takahashi H, Iraha R, et al. Down-regulation of tyrosinase expression by acetylsalicylic acid in murine B16 melanoma [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 31(1): 33-37
- [27] 王立峰,鞠兴荣.3 种薏米的多酚提取物清除过氧化氢自由基抗氧化能力评价[J].食品科学,2012,19:39-44
- WANG Li-feng, JU Xing-rong. Evaluation of antioxidant capacity of hydrogen peroxide free radicals extracted from polyphenols extracted from three kinds of glutinous rice [J]. Food Science, 2012, 19: 39-44

现代食品科技