

白藜芦醇美白功效的初步研究

作者

1. 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 清华大学生命科学学院, 北京 100084;
 2. 江苏隆力奇生物科技股份有限公司研发中心, 常熟 215555;
 3. 中国科学院动物研究所, 北京 100101
- 史先敏^{1,2} 严泽民² 谢静红²
..... 周华锋² 何宏轩³ 段明星¹

摘要

研究了白藜芦醇对 B16 黑色素细胞的增殖、细胞内酪氨酸酶活性及黑色素合成的影响。结果表明, 白藜芦醇可抑制细胞增殖, 对细胞内酪氨酸酶活性有明显抑制作用, 能明显减少细胞内黑色素的含量, 从而起到美白的作用。与熊果苷和乙基 Vc 相比较, 白藜芦醇在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的较低浓度下即可达到前二者在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下的抑制效果。

关键词

白藜芦醇 美白 酪氨酸酶 黑色素

A Preliminary Research on the Whitening Effect of Resveratrol

SHI Xiannmin^{1,2} YAN Zemin² XIE Jinghong² ZHOU Huaifeng² HE Hongxuan³ DUAN Mingxing¹

(1. State Key Laboratory of Biomembrane and Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Jiangsu Longliqi Group Co., Ltd., Changshu 215555, China; 3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The effect of resveratrol to the proliferation of B16 melanocyte, the activity of cellular tyrosinase and the synthesis of melanin were investigated. The results showed that resveratrol can inhibit the cellular proliferation, reduce the activity of cellular tyrosinase, and obviously decreased the content of cellular melanin compared with arbutin and ethyl vitamin C. 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resveratrol solution has the same effect with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin and ethyl Vc.

Key words: resveratrol whitening tyrosinase melanin

俗话说:一白遮百丑。白皙的皮肤是最吸引人的原因之一。对于天生黄皮肤的亚洲女性来说,一直以来都将能拥有白皙肤质当作美容之中的重要课题,因此,一切可以令面部肌肤美白的产品在市场上都很“红”。不论是来自美国的雅诗兰黛集团,还是来自法国的欧莱雅集团,以及日本化妆品界“四小花旦”的资生堂、POLA、嘉娜宝与 KOSE,或者新生代的 FANCL 等品牌,都将为亚洲人研发的美白产品作为其在亚洲市场的重要产品线^[1]。美白产品最重要的功效成分就是其中的美白添加剂,所以开发新型安全的美白剂就成了各大化妆品公司的研发重点。

白藜芦醇广泛存在于葡萄、松树、虎杖、决明子

和花生等天然植物和果实中^[2],具有广泛的生物活性,目前在药品和食品方面的研究较多,但对其在化妆品中的应用研究还相对较少,故我们对白藜芦醇的美白效果进行了研究。本文通过建立体外培养 B16 黑色素细胞模型,研究白藜芦醇对细胞内酪氨酸酶的作用以及其对细胞增殖率和细胞黑色素生成的影响,并与常用的美白化合物熊果苷和乙基维 C 进行了比较。为白藜芦醇作为化妆品美白添加剂提供实验依据。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

酪氨酸酶和二甲基亚砜 (DMSO) 购置于 Sigma 化学公司; L-3,4-二羟基苯氨酸 (L-DOPA) 为 Aldrich 化学公司产品;白藜芦醇原料(市售);水为蒸馏水;其它试剂为国产分析纯。

收稿日期:2011-04-09

酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;CO₂培养箱,日本 SANYO 公司;分光光度计,日本 HITACHI 公司;UV759 紫外-可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;数显控温水浴锅,上海浦东新区电理仪器厂。

1.2 实验方法^[3-4]

1.2.1 小鼠 B16 黑色素细胞培养

无菌条件下,将 1×10⁵ 个/mL 的小鼠 B16 黑色素细胞接种于含 10% (体积分数) 小牛血清的 DMEM 培养基的培养瓶中,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 天用 0.25% 胰酶消化传代一次。

1.2.2 细胞增殖率的测定

待细胞生长到对数期,用 0.25% 胰酶消化,调整到细胞 2×10⁴ 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL。置于培养箱中培养 24 h 后,弃上清液,添加待测药物。每一浓度设 8 个孔,对照组不加药物,代之同量维持液,孵育 72 h。药物作用 72 h 后,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 10 μL,4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 100 μL,振荡 10 min 左右,在酶标仪上检测各孔吸光度值,波长为 490 nm。细胞增殖率 = 药物组平均吸光度值/对照组平均吸光度值 × 100%。

1.2.3 乳酸脱氢酶(LDH)测试

将对数生长期的细胞接种于 24 孔板中,细胞 5×10⁴ 个/mL,每孔 1 mL,置培养箱中培养 24 h 后,弃上清液,添加待测药物。药物作用 72 h 后,取细胞培养上清液,按照 LDH 检测试剂盒使用说明进行操作。取细胞培养上清液 0.25 mL,加入 0.25 mL 基质缓冲液,0.05 mL 辅酶 I 溶液,充分混匀后 37℃ 水浴 15 min。再加入 0.25 mL 2,4-二硝基苯肼溶液,充分混匀后 37℃ 水浴 15 min 后加入 2.5 mL 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液,充分混匀后室温放置 3 min。测 440 nm 下的吸光度值。由标准曲线确定细胞培养上清液中 LDH 含量。

1.2.4 细胞内酪氨酸酶活力测定

细胞培养方法同上。药物作用 3 天后,弃去上清液,用 pH 6.8 PBS 冲洗两遍,每孔加 90 μL 含 1%

Triton X-100 的 PBS。冰浴中超声破碎,每孔加 10 μL 10 mM 的 L-DOPA,37℃ 孵育 60 min,测量 490 nm 下各孔吸光度值。

抑制率 = (1 - 药物组平均吸光度值/对照组平均吸光度值) × 100%

1.2.5 细胞内黑色素含量测定

将 B16 黑色素细胞以 1×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板。每孔 3 mL,孵育 24 h 后,弃上清液,添加待测药物,药物作用 3 d 后,弃上清液,PBS 洗涤,每孔加入 0.5 mL 胰酶消化细胞 3 min,加 2 mL 维持液终止消化,分别对每组细胞计数。细胞悬液离心弃上清液,沉淀中加入 1 mol/L NaOH 溶液,80℃ 加热 30 min。用分光光度计检测 475 nm 下的吸光度。

黑色素合成抑制率 = [1 - (药物孔吸光度值/药物孔细胞数)/(对照孔吸光度值/对照孔细胞数)] × 100%

2 结果与讨论

2.1 白藜芦醇抑制 B16 细胞增殖作用的研究

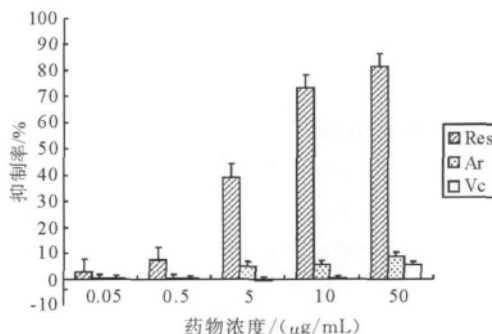


图 1 细胞 MTT 检测结果

图 1 表明,白藜芦醇在高浓度(50 μg/mL)时对细胞的生长有明显的抑制作用,细胞毒性要高于熊果苷和乙基 Vc,但随着浓度的降低,白藜芦醇对细胞增殖的抑制作用大大降低。

2.2 白藜芦醇对细胞 LDH 漏出的影响

乳酸脱氢酶(LDH)是一种稳定的蛋白质,存在于正常细胞的胞质中,一旦细胞膜受损,LDH 即被释放到细胞外,通过检测细胞培养上清液中 LDH 的活性,可判断细胞受损的程度。

表 1 细胞 LDH 检测结果

	对照	0.5 μg/mL	5 μg/mL	10 μg/mL	50 μg/mL
白藜芦醇	359.9 ± 12.4	389.4 ± 9.6	447.8 ± 7.9	538.1 ± 13.1	499.8 ± 22.4**
熊果苷	359.9 ± 12.4	361.4 ± 8.2	363.3 ± 9.7	378.7 ± 11.4	448.6 ± 32.1**
乙基 Vc	359.9 ± 12.4	357.1 ± 8.4	361.8 ± 6.5	365.7 ± 9.4	381.2 ± 30.9**

** 与对照相比, P < 0.01

表 1 数据说明在高浓度时 LDH 的泄漏明显较高,在低浓度(0.5 μg/mL)时,细胞的生长基本正常,与对照相比较 LDH 的漏出无明显变化。这一结果说明白藜芦醇在化妆品中应在较低的浓度下使用。

如图 2 所示,在 0.5 μg/mL 浓度下,各药品对细胞的生长都没有明显影响。

2.3 白藜芦醇在细胞水平上对酪氨酸酶的抑制作用研究

图3结果表明,与熊果苷和乙基Vc相比较,白藜芦醇对B16细胞内的酪氨酸酶具有更好的抑制作用。白藜芦醇在0.5 μg/mL的浓度下,其对酪氨酸酶的抑制作用即与熊果苷在50 μg/mL浓度下的抑制作用相当。

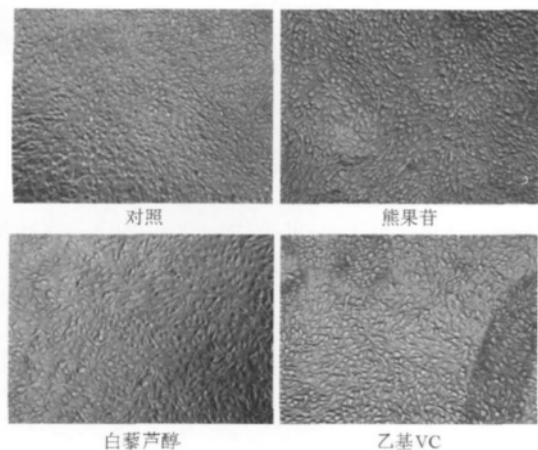


图2 不同美白剂对细胞形态的影响
(0.5 μg/mL, 72 h, 100X)

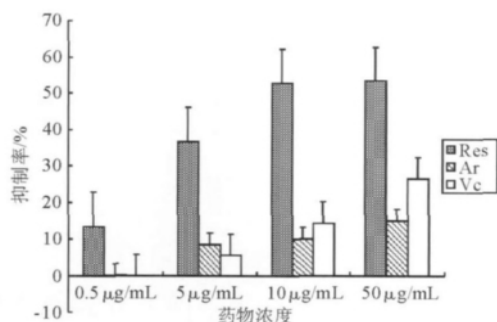


图3 白藜芦醇对B16细胞内酪氨酸酶的抑制作用

2.4 白藜芦醇对细胞内黑色素含量的影响

图4数据表明,在10 μg/mL和0.5 μg/mL两个浓度条件下,白藜芦醇对B16细胞内黑色素合成的抑制效果都要大大好于熊果苷和乙基Vc。白藜芦醇在0.5 μg/mL的浓度下,其对黑色素合成抑制作用即与乙基Vc在10 μg/mL的浓度下的抑制作用相当。

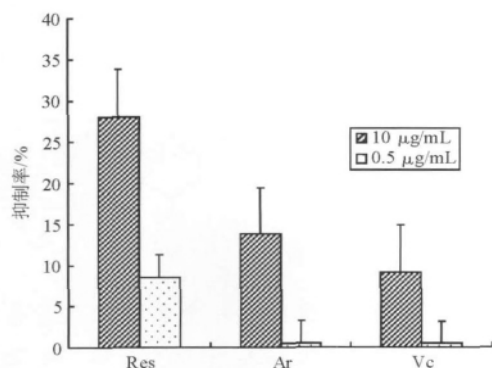


图4 白藜芦醇对B16细胞内黑色素含量的影响

3 结论

白藜芦醇被誉为继紫杉醇之后的又一新的绿色抗癌药物,是一种最近研究较热的化合物,美国学者阿尔·敏德尔1998年编辑出版的《抗衰老圣典》中,白藜芦醇被列为“100种最热门有效的抗衰老物质”之一。近年对白藜芦醇的研究越来越多,但大都集中在药品和食品方面的应用,由于现有的研究报道其具有很好的抗氧化和消除自由基的效果^[5-7],我们推测白藜芦醇可能具有良好的美白效果,所以在本研究中,我们采用了体外培养的B16黑色素细胞模型,对白藜芦醇的美白效果进行了研究。

我们通过研究发现,白藜芦醇的确对B16黑色素细胞的增殖和细胞内的酪氨酸酶具有一定的抑制作用,从而减少了黑色素的合成,起到美白的效果。本研究也发现与熊果苷和乙基Vc相比较,白藜芦醇对B16细胞具有较大的细胞毒性,但是在较低的浓度条件下,白藜芦醇的毒性大大降低,而且其能达到熊果苷和乙基Vc在较高浓度条件下的美白效果,所以在实际的生产应用中,我们可以通过控制白藜芦醇的添加量,达到低毒美白的效果。对于企业生产,与添加熊果苷相比较,添加白藜芦醇还能在一定程度上降低生产成本。

本文通过研究白藜芦醇对细胞内酪氨酸酶的作用以及其对细胞增殖率和细胞黑色素生成的影响,对白藜芦醇的美白效果进行了初步的评价,为化妆品添加白藜芦醇作为美白剂提供了实验依据。

参考文献

- [1] 刘美娜. 2009 护肤流行完全趋势[EB/OL]. http://tj.xinhuanet.com/shkj/2008-12/22/content_15247230.htm. 2008-12-22.
- [2] 韩晶晶, 刘炜, 毕玉平. 白藜芦醇的研究进展[J]. 生物工程学报, 2008, 24(11): 1851-1859.
- [3] 鲍建才, 等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 246-253.
- [4] 袁新初, 周乾毅. 烫伤大鼠脂质过氧化改变及三七保护作用探讨[J]. 中草药, 2002, 33(5): 446-447.
- [5] Aziz M H, Kumar R, Ahmad N. Cancer chemoprevention by resveratrol: In vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (Review) [J]. International Journal of Oncology, 2003, 23(1): 17-28.
- [6] Ratan H L, Steward W P, Gescher A J, et al. Resveratrol-A prostate cancer chemopreventive agent? [J]. Urologic Oncology, 2002, 7(6): 223-227.
- [7] Wu J M, Wang Z R, Hsieh T C, et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant, present in red wine (Review) [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2001, 8(1): 3-17.