

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.19.008

葡萄籽原花青素及其柔性纳米脂质体的抗氧化及对酪氨酸酶活性的抑制作用*

窦晨^{1,2}, 丁雄^{1,2}, 潘蕊^{1,2}, 赵声兰^{1,2}, 程欣^{1,2,3,Δ}

(1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南 昆明 650500; 3. 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要:目的 探讨葡萄籽原花青素(GSP)及其柔性纳米脂质体(GSP-FL)的抗氧化活性,以及对酪氨酸酶活性的影响。方法 体外测定GSP及GSP-FL对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧基-3-氧化物(PTIO)自由基的清除率,以及对三价铁离子(Fe^{3+})的还原能力。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测GSP对过氧化氢(H_2O_2)诱导的细胞氧化损伤的保护作用。体外测定GSP及GSP-FL对酪氨酸单酚酶、酪氨酸二酚酶活性的影响。以3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)为底物,测定GSP及GSP-FL对Melan-a细胞胞内酪氨酸酶活性的影响;采用氢氧化钠裂解法测定GSP-FL对Melan-a细胞胞内黑色素含量的影响。结果 GSP及GSP-FL均具有良好的抗氧化活性。与GSP比较,GSP-FL可显著降低对Melan-a细胞的毒性($P < 0.05$);与模型组($250 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$)比较,GSP质量浓度为12.5~50.0 mg/mL时可显著提高氧化损伤细胞的存活率($P < 0.05$)。GSP及GSP-FL均可抑制细胞内酪氨酸酶的活性,并减少细胞黑色素的生成。结论 GSP-FL具有抗氧化活性,能降低药物的细胞毒性,且可通过抑制酪氨酸酶的活性来抑制黑色素的生成,有望进一步开发成具有美白功效的化妆品制剂。

关键词: 葡萄籽原花青素;柔性纳米脂质体;抗氧化;酪氨酸酶;黑色素

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)19-0044-07

Antioxidation and Inhibition of Tyrosinase Activity of Grape Seed Proanthocyanidins and Their Flexible Nano-Liposomes

DOU Chen^{1,2}, DING Xiong^{1,2}, PAN Rui^{1,2}, ZHAO Shenglan^{1,2}, CHENG Xin^{1,2,3}

(1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650500; 2. The Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in University of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, China 650500; 3. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: Objective To investigate the antioxidation activity of grape seed proanthocyanidins (GSP), their flexible nano-liposomes (GSP-FL), and their effects on the activity of tyrosinase. **Methods** The scavenging rates of GSP and GSP-FL on the free radicals such as 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), that was ABTS, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) and the reduction ability of GSP and GSP-FL on the ferric ion (Fe^{3+}) were measured *in vitro*. The protective effect of GSP on the oxidative damage of cells induced by the hydrogen peroxide (H_2O_2) was tested by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The effects of GSP and GSP-FL on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase were measured *in vitro*. The effects of GSP and GSP-FL on the activity of intracellular tyrosinase of Melan-a cells were measured with the L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) as the substrate. The effect of GSP-FL on the intracellular melanin content of Melan-a cells was measured by the sodium hydroxide lysis method. **Results** Both GSP and GSP-FL had good antioxidant activities. Compared with GSP, GSP-FL can significantly reduce the toxicity to Melan-a cells ($P < 0.05$). Compared with those in the model group ($250 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$), the survival rate of

* 基金项目: 云南省科技厅科技计划项目[202001AZ070001-008]; 云南省科技计划项目[2018ZF013]; 云南科学技术院项目[202002AA100007]; 云南省傣医药与彝医药重点实验室培育计划项目[2017DG006]。

第一作者: 窦晨, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药物新剂型, (电子信箱)2721472641@qq.com。

Δ通信作者: 程欣, 女, 博士研究生, 副教授, 研究方向为纳米医药与药物新剂型, (电子信箱)chengxin920@126.com。

[17] 吕艳艳, 张俊莉, 毕宇峰, 等. 秦息痛片联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的临床效果及对血清IL-17、IL-6水平的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(1): 8-10.

[18] 孙标, 邓翠翠, 王加, 等. 黄芩苷对大鼠类风湿性关节炎软骨损伤的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(7): 1440-1446.

[19] CHE N, SUN XX, GU L, et al. Adiponectin Enhances B-Cell

Proliferation and Differentiation via Activation of Akt1/STAT3 and Exacerbates Collagen-Induced Arthritis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 626310.

[20] 刘静, 燕丽君. 雷公藤内酯醇对类风湿性关节炎模型大鼠血管新生和PTEN/PI3K/AKT通路的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(6): 1227-1233.

(收稿日期: 2021-09-24; 修回日期: 2022-03-21)

oxidatively damaged cells could significantly improved when the mass concentration of GSP was in the range of 12.5–50.0 mg/mL ($P < 0.05$). Both GSP and GSP-FL could inhibit the activity of intracellular tyrosinase and reduce the synthesis of melanin.

Conclusion GSP-FL has antioxidation activity, can reduce the cytotoxicity of drugs, and can inhibit the synthesis of melanin by inhibiting the activity of tyrosinase, which is expected to be further developed into a cosmetic preparation with the whitening effect.

Key words: grape seed proanthocyanidins; flexible nano-liposomes; antioxidation; tyrosinase; melanin

人体黑色素的合成受黑色素生成途径中的多种黑素体蛋白和酶的调控^[1],包括酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白1和多巴色素互变异构酶等。酪氨酸酶可催化2个黑色素生成的限速步骤,即酪氨酸羟基化为3,4-二羟基苯丙氨酸(*L*-DOPA)和将*L*-DOPA氧化为多巴醌^[2],故黑色素的产生主要依赖于酪氨酸酶的表达和激活^[3]。生理剂量的自由基在黑色素生成的最后阶段能加速5,6-二羟基吲哚和吲哚醌之间的反应,从而刺激黑色素的生成,增加皮肤的色素沉着^[4]。葡萄籽原花青素(GSP)是从葡萄籽中提取的多酚化合物,是天然、低成本的抗氧化剂,具有抗氧化^[5]、清除自由基^[6]等药理学活性,但分子结构中的不饱和键降低了其储存的稳定性^[7]。将GSP包载于柔性纳米脂质体(FL)中,可增加其稳定性和功能性。本研究中探讨了GSP及GSP-FL的抗氧化活性,以及对酪氨酸酶活性的影响,为制备具有美白功效的化妆品制剂提供参考。现报道如下。

1 仪器、试剂与细胞

1.1 仪器

OSB-2100型旋转蒸发仪(倍捷科技<上海>有限公司);90Plus型纳米激光粒度仪(美国布鲁克海文仪器有限公司);Sorvall ST 8R型高速冷冻离心机, Multiskan型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Discovery DV215CD型分析天平(美国奥豪斯公司,精度为0.0001g);Scientz-IID型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);PI80H型超声波处理器(德国 Elma 公司)。

1.2 试剂

GSP(天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,批号为002200604028,纯度不低于95%);大豆卵磷脂(批号为1112J021),四甲基偶氮唑盐(MTT,批号为715F051),均购自北京索莱宝科技有限公司;胆固醇(批号为624J033),脱氧胆酸钠(批号为909P021,纯度大于99%),均购自北京兰杰柯科技有限公司;L-酪氨酸(批号为RH221350),酪氨酸酶(批号为R002875),三吡啶三吡嗪(TPTZ,批号为R012773),均购自上海凇恩科技发展有限公司;L-DOPA(美国Sigma公司,批号为WXBD0797V);曲酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为12002059);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基(上海源叶生物有限公司,批号为S28J12M138964);2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS,梯希爱<上海>化成工业

发展有限公司,批号为KZTCI-AE);曲拉通X-100(TritonX-100,美国Amresco公司,批号为21B1756838);2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧基-3-氧化物(PTIO,九鼎化学<上海>科技有限公司,批号为YCLQJNY);七水合硫酸亚铁(FeSO_4 ,批号为20200918),过氧化氢(H_2O_2 ,批号为20210201),均购自广东光华科技股份有限公司;水为超纯水。

1.3 细胞

小鼠永生化黑色素细胞系 Melan-a 细胞来源于广州医科大学,由云南中医药大学药剂教研室培养。

2 方法与结果

2.1 GSP-FL 的制备(薄膜分散-超声法)

称取卵磷脂250 mg、胆固醇17 mg,精密称定,分别溶于15 mL氯仿;称取脱氧胆酸钠15 mg,溶于5 mL甲醇,超声溶解。将上述3种溶液置圆底烧瓶中,混匀。40℃水浴条件下以旋转蒸发仪去除有机溶剂,直至烧瓶内壁形成干燥、透明的均匀薄膜。称取GSP 80 mg,溶于6 mL水,置圆底烧瓶中,40℃水浴条件下继续旋转30 min,冰浴条件下超声(功率为150~180 W,频率为20~25 kHz)处理5 min,0.22 μm 微孔滤膜滤过,4℃条件下密封保存。在前期优化制备工艺的基础上制备GSP-FL^[8],采用超速离心法测定,其包封率为 $(70.79 \pm 0.02)\%$,载药量为 $(1.16 \pm 0.01)\%$,粒径为 $(156.47 \pm 7.03) \text{ nm}$,多分散系数为 0.26 ± 0.01 ,Zeta电位为 $-(42.35 \pm 4.00) \text{ mV}$ 。

2.2 GSP 及 GSP-FL 的抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除率测定

取DPPH自由基2 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用无水乙醇定容,即得质量浓度为0.04 mg/mL的DPPH自由基溶液,避光保存,现配现用。采用80%乙醇溶解维生素C(V_c),采用无水乙醇溶解GSP及GSP-FL,配制成质量浓度分别为3.13,6.25,12.5,25,50 $\mu\text{g/mL}$ 的待测试样溶剂。于96孔板^[9]中加入各反应液,50 μL 待测试样溶剂和150 μL DPPH自由基溶液为 A_0 ,150 μL DPPH自由基溶液及50 μL 待测试样为 A_1 ,50 μL 待测试样和150 μL 待测试样溶剂为 A_2 。37℃条件下反应30 min,采用酶标仪于519 nm波长处测定吸光度。 V_c 为阳性对照, A_2 为空白对照,以空白柔性纳米脂质体(EL)排除脂质体对吸光度的干扰。DPPH自由基清除率($\%$) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。采用SPSS 26.0统计学软件进行回归分析,并计算半数抑制浓度(IC_{50})。

结果见图1。可见,在3.13~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内, V_c ,GSP,GSP-FL对DPPH自由基的清除率均逐渐增加;对DPPH自由基的 IC_{50} 分别为 $(15.277 \pm 2.392)\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(9.791 \pm 0.615)\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(9.271 \pm 0.424)\mu\text{g}/\text{mL}$ 。GSP与GSP-FL表现出比 V_c 更好的DPPH自由基清除活性。EL对DPPH自由基的活性无影响。

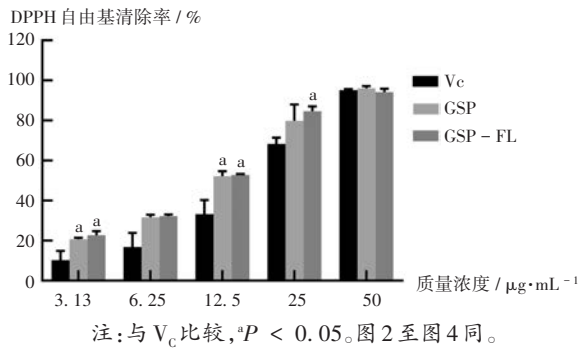


图1 GSP,GSP-FL, V_c 对DPPH自由基的清除率

Note: Compared with V_c , $^aP < 0.05$ (for Fig. 1 - 4).

Fig. 1 Scavenging rates of GSP, GSP-FL and V_c on the DPPH free radical

2.2.2 ABTS⁺自由基清除率测定^[10]

取过硫酸钾13.40 mg和ABTS 38.40 mg,精密称定,分别置25 mL容量瓶中,用纯水充分溶解并定容,置烧杯中1:1混匀,室温避光放置12 h,即得ABTS⁺自由基贮备液;使用前用纯水稀释10~20倍,直至吸光度为 0.70 ± 0.02 ,即得ABTS⁺自由基工作液。采用80%乙醇溶解 V_c ,采用无水乙醇溶解GSP及GSP-FL,配制成质量浓度分别为1.56,3.13,6.25,12.5,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。于96孔板中加入各反应液,75 μL 待测试样溶剂和75 μL ABTS⁺自由基工作液为 A_0 ,75 μL ABTS⁺自由基工作液及75 μL 待测试样为 A_1 ,75 μL 待测试样和75 μL 待测试样溶剂为 A_2 。室温下反应6 min,采用酶标仪于734 nm波长处测定吸光度。 V_c 为阳性对照, A_2 为空白对照。ABTS⁺自由基清除率($\%$) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。

结果见图2。可见,在1.56~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内, V_c ,GSP,GSP-FL对ABTS⁺自由基的清除率均逐渐增加;对ABTS⁺自由基的 IC_{50} 分别为 $(12.387 \pm 1.79)\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(10.722 \pm 1.80)\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(10.403 \pm 2.33)\mu\text{g}/\text{mL}$ 。GSP,GSP-FL, V_c 的ABTS⁺自由基清除活性相似。EL对ABTS⁺自由基的活性无影响。

2.2.3 PTIO自由基清除率测定^[11]

取PTIO自由基10 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用纯水定容,即得PTIO自由基工作液。用纯水溶解 V_c ,GSP,GSP-FL,配制成质量浓度分别为0.0125,0.025,0.05,0.1,0.2,0.4 mg/mL的溶液。于96孔板中加入各反应液,40 μL 纯水和160 μL PTIO自由基工作液为 A_0 ,160 μL PTIO自由基工作液及40 μL 待测试样

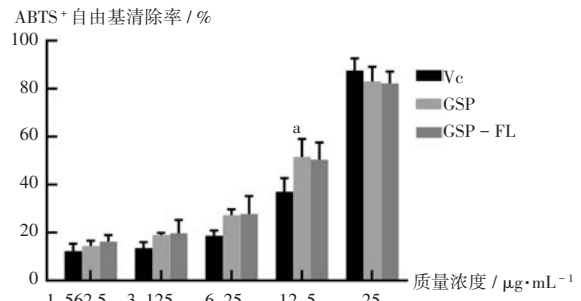


图2 GSP,GSP-FL, V_c 对ABTS⁺自由基的清除率

Fig. 2 Scavenging rates of GSP, GSP-FL and V_c on the ABTS⁺ free radical

为 A_1 ,40 μL 待测试样和160 μL 纯水为 A_2 。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置30 min,采用酶标仪于557 nm波长处测定吸光度。以 V_c 为阳性对照。PTIO自由基清除率($\%$) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。

结果见图3。可见,在0.0125~0.4 mg/mL质量浓度范围内, V_c ,GSP,GSP-FL对PTIO自由基的清除率均逐渐增加;对PTIO自由基的 IC_{50} 分别为 $(0.097 \pm 0.001)\text{mg}/\text{mL}$ 、 $(0.220 \pm 0.056)\text{mg}/\text{mL}$ 、 $(0.187 \pm 0.037)\text{mg}/\text{mL}$ 。GSP与GSP-FL表现出对PTIO自由基的清除活性,但效果不如 V_c 。GSP-FL质量浓度为0.0125~0.1 mg/mL时,对PTIO自由基的清除率显著高于 V_c ($P < 0.05$)。EL对PTIO自由基的活性无影响。

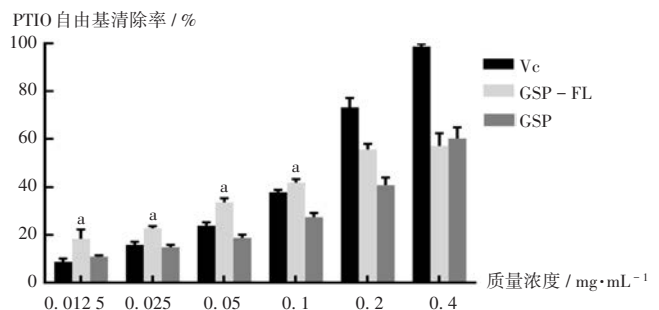


图3 GSP,GSP-FL, V_c 对PTIO自由基的清除率

Fig. 3 Scavenging rates of GSP, GSP-FL and V_c on the PTIO free radical

2.2.4 铁离子(Fe^{3+})还原能力测定^[10]

取TPTZ粉末7.8 mg,精密称定,溶于2.5 mL 40 mmol/L盐酸溶液中,超声(功率为80 W,频率为40 kHz)使其完全溶解,即得10 mmol/L TPTZ溶液;取27.029 mg氯化铁,精密称定,置10 mL容量瓶中,用纯水溶解并定容,即得10 mmol/L氯化铁溶液;将300 mmol/L醋酸盐缓冲液、10 mmol/L TPTZ溶液和10 mmol/L氯化铁溶液按10:1:1混匀,即得 Fe^{3+} 抗氧化能力工作液。取 FeSO_4 50.59 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,用纯水溶解并定容,梯度稀释成浓度分别为0.5,1,1.5,2,2.5,3,3.5 mmol/L的 FeSO_4 标准溶液。在96孔板中加入不同浓度的 FeSO_4 溶液20 μL ,再加入180 μL Fe^{3+} 抗氧化能力工作液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温孵

育 6 min, 采用酶标仪于 593 nm 波长处测定吸光度。以 FeSO_4 溶液的浓度为横坐标(X)、吸光度为纵坐标(Y)进行线性回归, 得标准曲线 $Y = 1.009X + 0.2084$ ($R^2 = 0.9927, n = 7$)。在 96 孔板中加入 20 μL 质量浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL 的 GSP, GSP-FL, V_c 溶液, 再加入 180 μL Fe^{3+} 抗氧化能力工作液, 37 $^\circ\text{C}$ 条件下恒温孵育 6 min, 采用酶标仪于 593 nm 波长处测定吸光度。样品溶液对 Fe^{3+} 的还原能力以 FeSO_4 含量表示, 以 V_c 为阳性对照。根据标准曲线测定 GSP, GSP-FL, V_c 溶液对 Fe^{3+} 的还原能力。

结果见图 4。可见, 在 0.05 ~ 0.2 mg/mL 质量浓度范围内, GSP, GSP-FL, V_c 对 Fe^{3+} 的还原能力均逐渐增强, 但 GSP 和 GSP-FL 的还原能力不如 V_c 。EL 对 Fe^{3+} 的还原能力无影响。

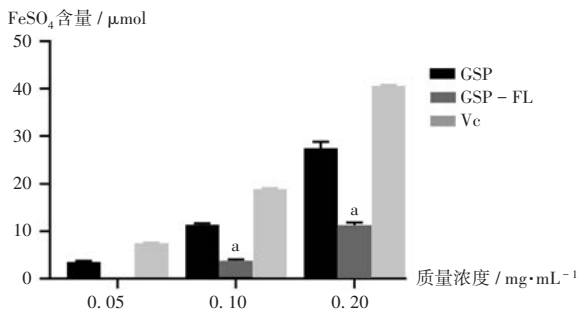


图 4 GSP, GSP-FL, V_c 对 Fe^{3+} 的还原能力

Fig. 4 Reduction abilities of GSP, GSP-FL and V_c on the Fe^{3+}

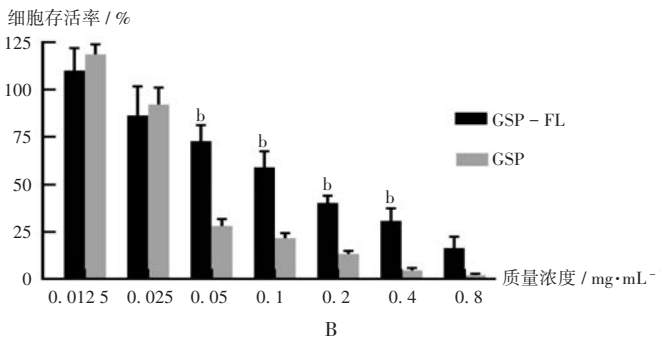
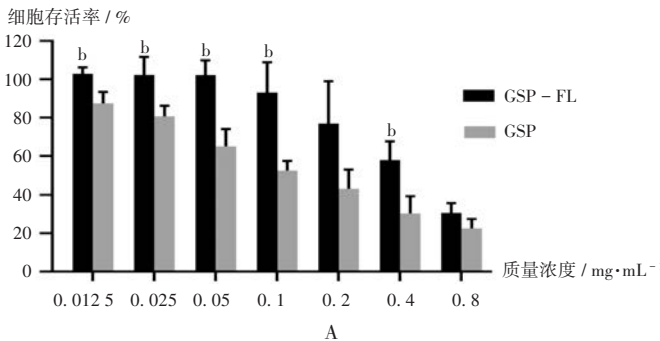
2.3 GSP 对 H_2O_2 诱导 Melan-a 细胞氧化损伤的保护作用

2.3.1 GSP 及 GSP-FL 对 Melan-a 细胞的毒性 (MTT 法)

取处于对数生长期的 Melan-a 细胞, 胰蛋白酶消化, 离心 (转速为 800 r/min) 3 min, 采用血细胞计数法调整细胞悬液的密度为 7.5×10^5 / mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 置细胞培养箱 (温度为 37 $^\circ\text{C}$, CO_2 浓度为 5%, 下同) 中培养 24 h, 弃去细胞培养基; 每孔分别加入 100 μL 质量浓度分别为 0.012 5, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL 的 GSP 及 GSP-FL 溶液, 每个质量浓度设 5 个复孔, 重复试验 3 次。另设阴性对照组 (等量的细胞 + 细胞培养液) 与空白对照组 (等量的细胞培养液), 于细胞培养箱中分别培养 24 h 和 48 h。加入 20 μL 质量浓度为 5 mg/mL 的现配 MTT 溶液, 于细胞培养箱中孵育 4 h, 弃去上清液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 振荡 10 min, 充分溶解, 采用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度。细胞抑制率 (%) = $[1 - (A_{\text{GSP/GSP-FL}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白对照组}})] \times 100\%$ 。

结果见图 5。可见, 与 GSP-FL 相比, 给药 24 h 后, GSP 质量浓度为 0.012 5 ~ 0.8 mg/mL 时的细胞毒性较强, 且 48 h 时的细胞毒性更强。给药 24 h 和 48 h 后, GSP-FL 的平均 IC_{50} 为 $(0.443 \pm 0.09) \text{mg/mL}$ 和 $(0.137 \pm 0.00) \text{mg/mL}$,

显著高于 GSP 的 $(0.140 \pm 0.40) \text{mg/mL}$ 和 $(0.049 \pm 0.01) \text{mg/mL}$ ($P < 0.05$)。GSP-FL 降低了游离药物的细胞毒性, 提高了细胞的存活率。故推测将 GSP 包载于 FL 中可显著增加药物的安全性。EL 质量浓度为 0.8 mg/mL 时, 对 Melan-a 细胞的抑制率为 $(25.2 \pm 9.99)\%$, 随着其不断稀释, 抑制率降低, 故 EL 毒性较低。



注: 与 GSP 比较, $^b P < 0.05$ 。

图 5 加入 GSP 和 GSP-FL 后 Melan-a 细胞的存活率 ($n = 3$)

A. 24 h B. 48 h
Note: Compared with those with GSP, $^b P < 0.05$.

Fig. 5 Survival rates of Melan-a cells after adding GSP and GSP-FL ($n = 3$)

2.3.2 H_2O_2 诱导 Melan-a 细胞氧化损伤模型的建立

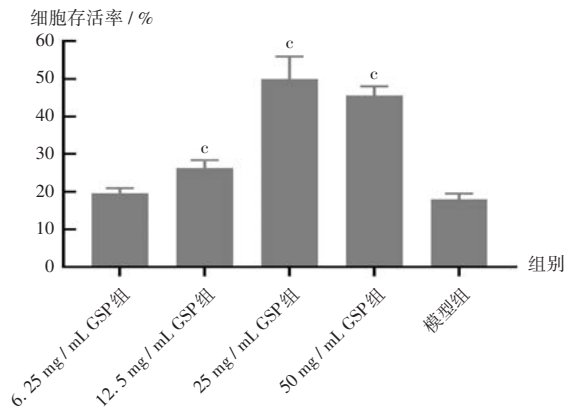
取处于对数生长期的 Melan-a 细胞, 用含有 10% 胎牛血清的 1640 完全培养液稀释, 直至细胞悬液的密度为 5×10^4 / mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 置细胞培养箱中培养 48 h, 弃去上清液, 每孔加入 100 μL 25, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 溶液, 造模 8 h, 每个浓度设置 5 个复孔, 重复试验 3 次。另设阴性对照组 (等量的细胞 + 细胞培养液) 与空白对照组 (等量的细胞培养液)。计算细胞抑制率。结果 H_2O_2 溶液浓度为 25, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$ 时, Melan-a 细胞抑制率分别为 $(9.11 \pm 5.81)\%$ 、 $(16.69 \pm 9.60)\%$ 、 $(40.95 \pm 3.52)\%$ 、 $(63.18 \pm 4.64)\%$ 、 $(91.09 \pm 3.04)\%$ 、 $(93.21 \pm 2.26)\%$ ($n = 3$)。

2.3.3 GSP 对 H_2O_2 诱导 Melan-a 细胞氧化损伤的保护作用 (MTT 法) [12]

前期试验考察了 150, 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的作用, 结果其浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 时, GSP 组的保护作用与模型

组相比,具有显著差异($P < 0.05$)。故将细胞分为4组,即阴性对照组(等量的细胞+细胞培养液)、空白对照组(等量的细胞培养液)、模型组($250\text{ }\mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$)、不同质量浓度($6.25, 12.5, 25, 50\text{ mg/mL}$)的GSP组。按2.3.2项下方法将Melan-a细胞均匀接种于96孔板,空白对照组仅加入等量培养液,培养24 h,弃去上清液。GSP组分别加入含不同质量浓度GSP的培养液 $100\text{ }\mu\text{L}$,在空白对照组、阴性对照组和模型组中加入等量的培养液,培养24 h,弃去上清液。在模型组和GSP组中分别加入 $100\text{ }\mu\text{L } 250\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 溶液,在空白对照组、阴性对照组中加入等量培养液。将96孔板转移至细胞培养箱中培养8 h,计算细胞抑制率。

结果见图6。可见,与模型组比较,GSP质量浓度为 $12.5\sim 50\text{ mg/mL}$ 时,能显著增加 H_2O_2 造成的氧化损伤细胞的存活率($P < 0.05$);但GSP质量浓度为 50 mg/mL 时,其保护作用低于 25 mg/mL ,推测在质量浓度为 50 mg/mL 时, H_2O_2 对细胞仍有一定毒性。由于FL减少了 H_2O_2 与细胞的直接接触,降低了药物对细胞的刺激性。



注:与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图6 不同GSP质量浓度对氧化损伤Melan-a细胞存活率的影响
Note: Compared with those in the model group, $P < 0.05$.

Fig. 6 Effects of GSP with different mass concentrations on the survival rates of oxidatively damaged Melan-a cells

2.4 GSP和GSP-FL对体外酪氨酸酶活性的影响

2.4.1 对酪氨酸酶单酚酶及二酚酶活性的影响

以 2.0 mmol/L 的酪氨酸溶液或 2.0 mmol/L 的 $L\text{-DOPA}$ 为底物,按表1进行反应,采用96孔板,在 $200\text{ }\mu\text{L}$ 测活体系中加入浓度为 2.0 mmol/L 的酪氨酸溶液(或 $L\text{-DOPA}$)和磷酸盐缓冲液,置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中预热 10 min ,加入质量浓度为 $0.1, 0.2, 0.4, 0.8\text{ mg/mL}$ 的GSP, GSP-FL溶液各 $50\text{ }\mu\text{L}$ 及质量浓度为 $0.003, 0.006, 0.012, 0.025, 0.05\text{ mg/mL}$ 的曲酸溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$,加入质量浓度为 150 U/mL 酪氨酸酶溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$,置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中继续反应 15 min ,采用酶标仪于 475 nm 波长处测定吸光度。抑制率($\%$) = $[(A_1 - A_2) - (A_3 -$

表1 体外酪氨酸酶活性试验反应液组成(μL)

Tab. 1 Composition of reaction solution for tyrosinase activity test (μL)

试剂	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
L-酪氨酸/L-DOPA	50	0	50	0
磷酸盐缓冲液	50	100	50	100
纯水	50	50	0	0
GSP/GSP-FL/曲酸	0	0	50	50
酪氨酸酶	50	50	50	50

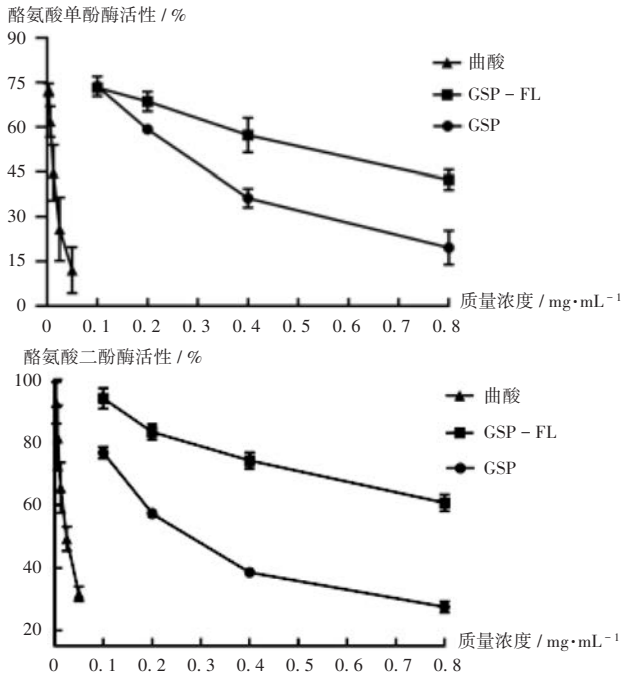


图7 GSP和GSP-FL、曲酸对酪氨酸酶单酚酶及二酚酶的活性作用

Fig. 7 Effects of GSP, GSP-FL and kojic acid on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase

表2 对酪氨酸酶单酚酶及二酚酶作用的 IC_{50} ($\bar{X} \pm s, \text{mg/mL}$)
Tab. 2 IC_{50} of GSP, GSP-FL and kojic acid on the monophenolase and diphenolase of tyrosinase ($\bar{X} \pm s, \text{mg/mL}$)

试剂	酪氨酸单酚酶	酪氨酸二酚酶
GSP	0.243 ± 0.00	0.294 ± 0.01
GSP-FL	0.503 ± 0.08^d	1.057 ± 0.03^d
曲酸	0.010 ± 0.00	0.024 ± 0.01

注:与曲酸比较, $P < 0.05$ 。表3和表4同。

Note: Compared with those with kojic acid, $P < 0.05$ (for Tab. 2-4).

$A_4)] / (A_1 - A_2) \times 100\%$ 。

结果显示见图7。可见,曲酸质量浓度低于 0.05 mg/mL 时,对酪氨酸单酚酶及二酚酶活性均有抑制作用;GSP和GSP-FL对酪氨酸酶活性的抑制作用均随质量浓度的升高而降低。GSP-FL对酪氨酸单酚酶的 IC_{50} 约为GSP的2倍,对酪氨酸二酚酶的 IC_{50} 约为GSP的3.5倍。详见表2。

2.4.2 酶促动力学反应

固定底物 $L\text{-DOPA}$ 溶液的浓度为 2 mmol/L ,分别

配制浓度为 20, 40, 60, 80, 100 U / mL 的酪氨酸酶溶液及质量浓度为 0. 05, 0. 1, 0. 2, 0. 4, 0. 8, 1. 6 mg / mL 的 GSP 溶液, 按表 1 进行反应, 测定 GSP 对酪氨酸酶的抑制机制, 得到酶活性随酶量变化的关系图(图 8), 酶活性对酶量是一条相对的直线, 随着待测样品溶剂质量浓度的升高, 酶活性减少。提示 GSP 是通过抑制酶活性而不是减少有效酶量来降低对 *L* - DOPA 的催化效率的。

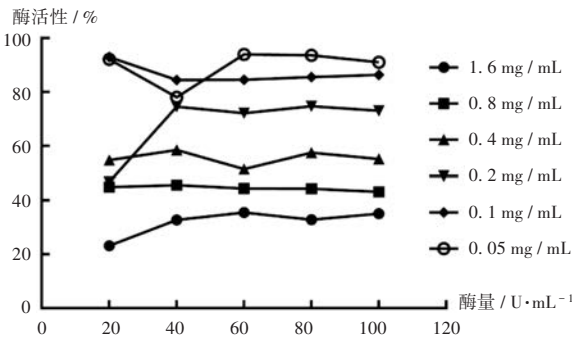


图 8 GSP 对酪氨酸酶的抑制效应机制

Fig. 8 Mechanism of inhibitory effect of GSP on tyrosinase

2.5 GSP 和 GSP - FL 对细胞内酪氨酸酶活性的影响

2.5.1 Melan - a 细胞胞内酪氨酸酶抑制率^[12-14]

取对数生长期的 Melan - a 细胞, 胰蛋白酶消化, 调整细胞悬液的密度为 2.5×10^5 / mL, 并接种于 6 孔板中, 培养 24 h。加入含不同质量浓度 GSP、GSP - FL 及曲酸的培养基, 另设阴性对照(等量的细胞 + 细胞培养液)。培养 24 h 和 48 h, 弃去培养基, 加入 500 μ L 1% TritonX - 100 溶液, 静置 5 min。用细胞刮刀刮下每孔中的细胞, 置冰面充分裂解 1 h, 冷冻, 离心(转速为 14 000 r / min) 10 min。取上清液 100 μ L, 加入 96 孔板中, 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中预热 10 min。加入 3 mmol / L *L* - DOPA 溶液 100 μ L, 继续反应 1 h, 采用酶标仪于 475 nm 波长处测定吸光度, 每个浓度设置 3 个复孔, 同时设置空白孔(100 μ L 1% TritonX - 100 和 100 μ L 3 mmol / L *L* - DOPA), 重复 3 次试验。酪氨酸酶活性(%) = $(A_{\text{GSP/GSP-FL/曲酸}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

结果见表 3。可见, 随着作用时间的增加, GSP 及 GSP - FL 对酪氨酸酶活性的抑制作用均逐渐增强。24 h 后, 在质量浓度为 0. 8 mg / mL 的 GSP 及 GSP - FL 作用下, Melan - a 细胞胞内酪氨酸酶活性显著低于曲酸 ($P < 0. 05$); 48 h 后, 在质量浓度为 0. 4 mg / mL 的 GSP 及 GSP - FL 作用下, Melan - a 细胞胞内酪氨酸酶活性显著低于曲酸 ($P < 0. 05$)。

2.5.2 Melan - a 细胞胞内黑色素含量

取对数生长期的 Melan - a 细胞, 胰蛋白酶消化, 调整细胞悬液的密度为 2.5×10^5 / mL, 并接种于 6 孔板中, 培养 24 h。加入含不同质量浓度 GSP - FL 及曲酸的

表 3 GSP 及 GSP - FL、曲酸对细胞内酪氨酸酶活性的影响($n = 3$)

Tab. 3 Effects of GSP, GSP-FL and kojic acid on the activity of intracellular tyrosinase ($n = 3$)

培养 时间	质量浓度 (mg / mL)	酶活性($\bar{X} \pm s$, %)		
		GSP	GSP - FL	曲酸
24 h	0	100. 00 $\pm$ 0. 00	100. 00 $\pm$ 0. 00	100. 00 $\pm$ 0. 00
	0. 2	116. 62 $\pm$ 6. 90	149. 29 $\pm$ 3. 30	
	0. 4	82. 82 $\pm$ 3. 10	117. 22 $\pm$ 3. 50	
	0. 8	65. 29 $\pm$ 4. 60 ^d	71. 38 $\pm$ 2. 70 ^d	78. 56 $\pm$ 0. 70
	1. 6			69. 40 $\pm$ 2. 20
	3. 2			54. 67 $\pm$ 1. 10
48 h	0. 1	93. 21 $\pm$ 3. 10	109. 44 $\pm$ 6. 20	
	0. 2	43. 33 $\pm$ 5. 40	63. 88 $\pm$ 8. 80	
	0. 4	22. 43 $\pm$ 2. 50 ^d	31. 51 $\pm$ 4. 50 ^d	73. 31 $\pm$ 3. 70
	0. 8			45. 36 $\pm$ 6. 50
	1. 6			16. 35 $\pm$ 1. 80

培养基, 另设阴性对照组(等量的细胞 + 细胞培养液), 培养 24 h 或 48 h, 弃去培养基。加入 500 μ L 1% TritonX - 100 溶液, 静置 5 min, 用细胞刮刀刮下每孔中的细胞, 置冰面上充分裂解 1 h, 冷冻, 离心(转速为 14 000 r / min) 10 min。取离心后的细胞黑色素沉淀, 加入 100 μ L 1 mol / L NaOH 溶液(含 10% 二甲基亚砷)中, 80 $^{\circ}$ C 条件下加热 1 h 至完全溶解, 采用酶标仪于 405 nm 波长处测定吸光度, 重复 3 次试验。黑色素含量(%) = $(A_{\text{GSP-FL/曲酸}}) / A_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$ 。

结果见表 4。可见, 随着 GSP - FL 质量浓度的升高和作用时间的延长, 黑色素的合成均减少。24 h 后, GSP - FL 质量浓度为 0. 8 mg / mL 时, Melan - a 细胞胞内黑色素含量显著低于曲酸组 ($P < 0. 05$); 48 h 后, GSP - FL 质量浓度为 0. 4 mg / mL 时, 细胞胞内黑色素含量显著低于曲酸组 ($P < 0. 05$)。因药物本身存在的颜色会干扰黑色素吸光度的测定, 且无法通过试验设计进行排除, 故未对 GSP 进行测定。

3 讨论

多数体外抗氧化的检测方法仅能评价化合物清除某一种自由基的能力, 且各有优、缺点, 各种方法联用才能更好地反映某化合物的抗氧化活性。本研究中通过测定 GSP 及 GSP - FL 对 DPPH, ABTS⁺, PTIO 自由基的清除能力及对 Fe³⁺ 的还原能力, 综合评价其抗氧化活性, 结果表明 GSP 及 GSP - FL 均具有良好的抗氧化活性, 对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 均低于 V_c 。早有研究报道, GSP 是比 V_c 和维生素 E 琥珀酸乙酯更强的自由基清除剂^[15]。GSP 能显著增加 H₂O₂ 氧化损伤细胞的存活率, 降低细胞的氧化损伤程度, 但其作用机制需作进一步研究。

体外酶学试验结果显示, GSP 和 GSP - FL 均表现出

表 4 GSP-FL 对细胞内黑色素合成的影响 (n = 3)
Tab. 4 Effect of GSP-FL on the synthesis of intracellular melanin (n = 3)

培养 时间	质量浓度 (mg / mL)	黑色素含量 ($\bar{X} \pm s, \%$)	
		GSP-FL	曲酸
24 h	0	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
	0.1	90.38 $\pm$ 4.90	
	0.2	79.67 $\pm$ 2.40	
	0.4	74.97 $\pm$ 3.90	
	0.8	71.17 $\pm$ 1.90 ^d	81.46 $\pm$ 3.50
	1.6		78.97 $\pm$ 3.80
	3.2		71.62 $\pm$ 4.90
	6.4		70.70 $\pm$ 4.70
48 h	0.05	74.44 $\pm$ 1.90	
	0.1	50.32 $\pm$ 10.30	
	0.2	44.48 $\pm$ 9.90	
	0.4	31.89 $\pm$ 9.20 ^d	97.25 $\pm$ 8.40
	0.8		82.49 $\pm$ 9.60
	1.6		71.81 $\pm$ 8.90
	3.2		64.06 $\pm$ 3.70

对酪氨酸单酚酶及二酚酶的抑制作用;但 GSP-FL 对酪氨酸单酚酶及二酚酶的抑制率显著低于 GSP,推测可能是由于 FL 外壳对药物的保护作用,在缺乏破乳剂的情况下,药物未突释出来。MTT 试验结果显示,GSP 会抑制正常 Melan-a 细胞的增殖,将 GSP 包载于 FL 中,显著降低了药物的细胞毒性。推测可能是由于脂质体的磷脂双分子层外壳较安全,可减少药物与细胞的直接接触,从而降低了药物对细胞的刺激性。在细胞试验中,GSP 及 GSP-FL 表现出对 Melan-a 细胞内酪氨酸酶活性、黑色素生成的抑制作用。皮肤美白剂的功能应在安全的药物剂量下减少细胞内黑色素的合成,不能因为过多的黑色素细胞死亡而使局部的皮肤颜色变浅,影响美观,甚至在无黑色素的保护作用下,导致皮肤晒伤^[16-17]。GSP-FL 在抑制细胞内酪氨酸酶活性和黑色素生成的同时,降低了细胞毒性,减少了黑色素细胞的死亡。

综上所述,GSP-FL 具有清除自由基、抗氧化、抑制酪氨酸酶活性和黑色素生成的作用,相比游离 GSP 和 GSP-FL 还能降低对正常细胞的毒性。有望将 GSP-FL 进一步开发成凝胶剂、乳膏剂等具有美白功效的化妆品制剂,但美白是多重酶、多种因素共同作用的结果,其药理作用和药效机制还需进一步验证。

参考文献

[1] KOBAYASHI T, URABE K, WINDER A, et al. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis[J]. EMBO Journal, 1994, 13(24):5818-5825.
[2] HEARING VJ, JIMENEZ M. Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level[J]. Pigment Cell Research, 1989, 2(2):75-85.

[3] HEARING VJ, TSUKAMOTO K. Enzymatic control of pigmentation in mammals[J]. FASEB J, 1991, 5(14):2902-2909.
[4] SOLANO F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources[J]. Molecules, 2020, 25(7):1537.
[5] HE X, GUO X, MA Z, et al. Grape seed proanthocyanidins protect PC12 cells from hydrogen peroxide-induced damage via the PI3K / AKT signaling pathway[J]. Neurosci Lett, 2021, 17(750):135793.
[6] SHAO ZH, VANDEN HOKE TL, LI CQ, et al. Synergistic effect of *Scutellaria baicalensis* and grape seed proanthocyanidins on scavenging reactive oxygen species *in vitro* [J]. Am J Chin Med, 2004, 32(1):89-95.
[7] BAKOWSKA - BARCZAK AM, KOŁODZIEJCZYK PP. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation[J]. Industrial Crops and Products, 2011, 34(2):1301-1309.
[8] 窦晨, 赵声兰, 丁雄, 等. Box- Behnken 响应面法优化葡萄籽原花青素柔质体的制备工艺[J]. 西北药学杂志, 2022, 37(3):1-7.
[9] 张航航. 甘草和红花中化学成分的 HPLC-IMS 分析及酪氨酸酶抑制活性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2020.
[10] 张良聪. 特境微生物天然产物体外抗氧化活性及构效关系分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
[11] LI XC. 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-Oxide (PTIO•) Radical Scavenging: A New and Simple Antioxidant Assay *In Vitro* [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(30):6288-6297.
[12] 穆秋霞. 英国红芸豆抗氧化肽对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2021.
[13] KO HH, CHANG YT, KUO YH, et al. *Oenothera laciniata* Hill Extracts Exhibits Antioxidant Effects and Attenuates Melanogenesis in B16-F10 Cells via Downregulating CREB / MITF / Tyrosinase and Upregulating p-ERK and p-JNK[J]. Plants, 2021, 10(4):727.
[14] HWANG JM, KUO HC, LIN CT, et al. Inhibitory effect of liposome-encapsulated anthocyanin on melanogenesis in human melanocytes [J]. Pharm Biol, 2013, 51(8):941-947.
[15] BAGCHI D, GARG A, KROHN RL, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro* [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 95(2):179-189.
[16] 贾爱群, 孙洋, 王建新. 美白剂的发展现状及其黑色素抑制机理的研究进[J]. 日用化学工业, 2001, 31(1):41-44.
[17] MARÇON CR, MAIA M. Albinism: epidemiology, genetics, cutaneous characterization, psychosocial factors [J]. An Bras Dermatol, 2019, 94(5):503-520.

(收稿日期: 2021-12-09; 修回日期: 2022-03-15)