

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0163-04

5 种石斛抗衰老与美白活性研究

袁明焱^{1,3}, 王雅琴¹, 李一泽¹, 谢 勇¹, 杨 柳^{1,2*}¹中国科学院昆明植物研究所植物医生研发中心;²中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201;³安徽中医药大学药学院, 合肥 230011

摘要: 分别采用水与乙醇提取获得石斛茎的水提物与醇提物, 选用 DPPH 自由基清除实验、酪氨酸酶活性抑制实验与 HDFa 胶原蛋白分泌实验来考察《化妆品名录》收载的 5 种石斛—铁皮石斛, 金钗石斛, 美花石斛, 束花石斛, 流苏石斛的抗衰老与美白活性。研究发现, 铁皮石斛醇提物在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, DPPH 自由基清除率为 55.416%; 金钗石斛水提物与铁皮石斛水提物在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, 酪氨酸酶抑制率分别为 8.023% 与 8.488%; 束花石斛水提物在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, 胶原蛋白分泌增加率为 22.153%。结果表明, 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, 铁皮石斛醇提物有较强的自由基清除活性, 金钗石斛水提物与铁皮石斛水提物有微弱的酪氨酸酶抑制活性; 束花石斛水提物在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, 有较好的促进胶原蛋白分泌作用。

关键词: 石斛; 化妆品名录; 抗衰老; 美白活性

中图分类号:R961.1; R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.024

Study on Anti-aging and Whitening Activity of Five *Dendrobium* Species from “Cosmetic List”

YUAN Ming-yan^{1,3}, WANG Ya-qin¹, LI Yi-zhe¹, XIE Yong¹, YANG Liu^{1,2*}¹R & D Center of Dr. Plant, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences;²State Key Laboratory of Phytochemistry and plant Resources in West China, Kunming

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

³College of pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230011, China

Abstract: There were five *Dendrobium* species: *Dendrobium officinale*, *Dendrobium nobile*, *Dendrobium loddigesii*, *Dendrobium chrysanthum* and *Dendrobium fimbriatum* in the "Cosmetics List". The stems of the five *Dendrobium* species were extracted by water and ethanol to obtain their aqueous extracts and alcoholic extracts, respectively. Then their anti-aging and whitening activities were investigated by DPPH radical scavenging experiment, tyrosinase activity inhibition test and HDFa collagen secretion test. At the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DPPH free radical scavenging rate of the ethanol extract of *Dendrobium officinale* was 55.416% and the tyrosinase inhibition rates of water extract of *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale* were 8.023% and 8.488%, respectively; The increase rate of collagen secretion of water extract of *Dendrobium chrysanthum* was 22.153% at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results indicated the ethanol extract of *Dendrobium officinale* had a strong free radical scavenging activity, and the water extracts of *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale* had weak tyrosinase inhibitory activities at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The water extract of *Dendrobium chrysanthum* had a good role in promoting collagen secretion at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This study built the foundation for the development and utilization of *Dendrobium* in Cosmetics.

Key words: *Dendrobium*; Cosmetics List; anti-aging; whitening activity

石斛属作为兰科植物, 在全球约有 1500 种, 其中中国分布有 80 余种, 主要分布于西南与华南地

区^[1]。石斛中主要活性成分为多糖、生物碱、倍半萜与联苄等^[2], 有着抗氧化、抗衰老、美白、抗肿瘤与免疫调节等功效^[3]。近年来, 石斛的应用范围越加广泛, 不仅可作药物、食品保健品, 它在化妆品领域的应用也日渐升温^[4]。在 2015 版《已使用化妆品原料名称目录》中, 铁皮石斛, 金钗石斛, 美花石

斛, 束花石斛与流苏石斛提取物已作为化妆品原料被列入其中, 石斛为主要功效原料的各种化妆品逐渐增多, 有着广泛的应用价值和市场前景^[5]。

研究发现, 中药的美白活性主要是通过促血液循环改善肤色、减少黑色素含量及抗氧化保护肤色 3 大途径^[6]。酪氨酸酶是黑色素形成过程中的主要限速酶, 可以考察样品对酪氨酸酶是否有抑制作用来评价其美白功效^[7]。通过对活性氧氮自由基基团的清除抑制作用衡量抗氧化活性的高低是目前最常用的一类^[8]。目前, 抗衰老化妆品按其作用不同大致可以分为保湿型、抗氧化型以及生物活性化妆品^[9]。对化妆品的抗衰老活性主要通过测定其清除自由基能力, 促进胶原蛋白分泌能力与成纤维细胞体外增殖能力来考察^[10,11]。石斛作为化妆品原料已受到了广泛的关注, 但是对其的美白、抗衰老研究多集中在一种石斛上, 尤其是铁皮石斛, 还未有研究对《化妆品名录》所收载的 5 种石斛进行系统研究^[12]。本研究通过对《化妆品名录》所收载的 5 种石斛的茎的水提物与醇提物进行 DPPH 自由基清除实验、酪氨酸酶活性抑制实验与 HDFa 胶原蛋白分泌实验来考察 5 种石斛的抗衰老与美白活性。

1 材料

1.1 药材

新鲜铁皮石斛, 金钗石斛, 美花石斛, 束花石斛, 流苏石斛 5 种石斛全草采自云南省文山市, 经胡江苗副研究员鉴定为铁皮石斛, 金钗石斛, 美花石斛, 束花石斛, 流苏石斛, 样品标本保存于中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室。

1.2 细胞与试剂

成人真皮纤维原细胞(human dermal fibroblasts-adult, HDFa)购自 Cascade Biologics; DMEM(高糖)培养基、PBS、Hank 平衡盐溶液(hank's balanced salt solution, HBSS)、青链霉素和胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 0.25% 胰酶(含 EDTA)购自 Gibco 公司; DPPH、水溶性维生素 E(Trolox)、蘑菇酪氨酸酶、左旋多巴(L-Dopa)和曲酸(Kojic Acid)购自 Sigma 公司; 转移生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)购自 Peprotech 公司; 胶原蛋白 ELISA 试剂盒购自 TaKaRa 公司; MTS 试剂购自 Promega 公司。

1.3 样品处理

取新鲜铁皮石斛, 金钗石斛, 美花石斛, 束花石斛, 流苏石斛 5 种石斛的茎烘干后, 分别用水和乙醇回流提取两次, 每次 2 h, 抽滤并合并滤液, 减压浓缩得石斛水提物与醇提物。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

样品编号 No.	样品名称 Name	溶剂 Solvent
1	金钗石斛水提物 <i>Dendrobium nobile</i> water extract	H ₂ O
2	金钗石斛醇提物 <i>Dendrobium nobile</i> alcohol extract	DMSO
3	美花石斛水提物 <i>Dendrobium loddigesii</i> water extract	H ₂ O
4	美花石斛醇提物 <i>Dendrobium loddigesii</i> alcohol extract	DMSO
5	流苏石斛水提物 <i>Dendrobium fimbriatum</i> water extract	H ₂ O
6	流苏石斛醇提物 <i>Dendrobium fimbriatum</i> alcohol extract	DMSO
7	束花石斛水提物 <i>Dendrobium chrysanthum</i> water extract	H ₂ O
8	束花石斛醇提物 <i>Dendrobium chrysanthum</i> alcohol extract	DMSO
9	铁皮石斛水提物 <i>Dendrobium officinale</i> water extract	H ₂ O
10	铁皮石斛醇提物 <i>Dendrobium officinale</i> alcohol extract	DMSO

1.4 实验方法

1.4.1 DPPH 自由基清除实验

将待测药物与 DPPH(终浓度为 100 μM)混合反应, 设定 3 个重复孔, 同时设置不含药物的空白对照孔和 Trolox 阳性对照孔, 30 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 酶标仪测定 OD 值, 检测波长为 515 nm, 计算得到抗氧化率。

$$\text{抗氧化率} (\%) = (1 - \frac{\text{实验孔 OD}_{515 \text{ nm}}}{\text{空白孔 OD}_{515 \text{ nm}}}) \times 100\%$$

1.4.2 酪氨酸酶活性抑制实验

将待测药物与 L-Dopa 混合, 加入酪氨酸酶(终浓度 25 U/mL)开始反应, 设定 3 个重复孔, 同时设置不含药物的空白对照和 Kojic Acid 阳性对照, 室温, 5 min, 酶标仪测定 OD 值, 检测波长为 490 nm。计算得到酪氨酸酶活性抑制率。

$$\text{酪氨酸酶活性抑制率} (\%) = [1 - \frac{\text{样品 OD}_{490 \text{ nm}}}{\text{实验对照孔 OD}_{490 \text{ nm}}}] \times 100$$

1.4.3 HDFa 胶原蛋白分泌实验

96 孔细胞培养板上, 将 HDFa 细胞与待测化合

物混合,设置不含药物的空白对照和 TGF- β 阳性对照;37 °C,5% CO₂ 培养3天,收取细胞培养上清,存于-80 °C;加入MTS,采用MTS比色法检测490 nm的OD值;按胶原蛋白ELISA试剂盒中提供的方法检测胶原蛋白的分泌,酶标仪测定OD值,检测波长为450 nm。计算得到胶原蛋白分泌增加率。胶原蛋白分泌增加率(%)=(实验孔OD450 nm/细胞存活率/空白孔OD450 nm-1)×100%。

2 实验结果

2.1 五种石斛样品体外抗氧化实验结果

五种石斛水提物与醇提物DPPH自由基清除试验结果显示,醇提物DPPH自由基清除率高于水提物。就水提物而言,铁皮石斛>美花石斛>流苏石斛>束花石斛>金钗石斛;而醇提物中,则是铁皮石斛>流苏石斛>金钗石斛>束花石斛>美花石斛。具体结果见表2。

表2 样品体外抗氧化实验

Table 2 *In vitro* antioxidant test of the sample

样品 Sample	浓度 Concentration (g/mL)	抗氧化率 Antioxidation rate (%)
Trolox	25	96.116
1	100	1.036
2	100	29.456
3	100	6.215
4	100	23.694
5	100	4.855
6	100	36.060
7	100	1.101
8	100	24.212
9	100	8.157
10	100	55.416

2.2 五种石斛样品对酪氨酸酶的抑制作用结果

五种石斛水提物与醇提物酪氨酸酶的抑制作用结果并未表现出醇提物高于水提物这一规律。在水提物中,铁皮石斛>金钗石斛>美花石斛>束花石斛>流苏石斛;而醇提物则是,美花石斛>铁皮石斛>流苏石斛>金钗石斛>束花石斛。具体结果见表3。

2.3 五种石斛样品对HDFa胶原蛋白分泌的促进作用及细胞毒性作用结果

五种石斛水提物与醇提物对HDFa均无明显的

毒副作用,对HDFa胶原蛋白分泌的促进作用并无醇提物高于水提物这一规律,在水提物中,束花石斛>美花石斛>流苏石斛>铁皮石斛>金钗石斛;而醇提物中则是,铁皮石斛>美花石斛>金钗石斛>流苏石斛>束花石斛。具体结果见表4。

表3 样品对酪氨酸酶的抑制作用

Table 3 Inhibitory effect of the sample on tyrosinase

样品 Sample	浓度 Concentration (g/mL)	酪氨酸酶抑制率 Tyrosinase inhibition rate (%)
Kojic Acid	10	65.634
1	100	8.023
2	100	-6.395
3	100	5.000
4	100	6.977
5	100	0.116
6	100	1.279
7	100	4.186
8	100	-7.558
9	100	8.488
10	100	2.907

表4 样品对HDFa胶原蛋白分泌的促进作用及细胞毒性作用

Table 4 Cytotoxic effects and promote collagen secretion on HDFa of the sample

样品 Sample	浓度 Concentration (μ g/mL)	细胞存活率 Survival rate of cell (%)	胶原蛋白分泌增加率 Collagen secretion increase rate (%)
TGF- β	0.01	126.023	64.787
1	10	115.668	-14.743
2	10	104.311	-6.567
3	10	106.591	5.901
4	10	111.356	-1.126
5	10	117.955	-5.052
6	10	109.569	-8.172
7	10	101.023	22.153
8	10	116.719	-40.950
9	10	122.614	-11.787
10	100	108.347	4.957

3 结论

对五种石斛的水提物,醇提物共10个样品进行

了 DPPH 自由基清除能力、酪氨酸酶抑制能力及促胶原蛋白分泌能力的评价。结果显示,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,铁皮石斛醇提物有较强的抗氧化活性,DPPH 自由基清除率为 55.41%;金钗石斛水提物,铁皮石斛水提物有微弱的酪氨酸酶抑制活性,抑制率分别为 8.023% 与 8.488%;与 HDFa 共培养的结果显示,五种石斛对 HDFa 无细胞毒性,束花石斛水提物在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,具有一定的促胶原蛋白分泌作用,其胶原蛋白分泌增加率为 22.153%。DPPH 自由基清除能力中,五种石斛醇提物活性强于水提物活性,这可能是由于水提物中主要成分为多糖与蛋白质,而醇提物中主要成分为多酚与黄酮类化合物,这类成分是其抗氧化的物质基础。综合 DPPH 自由基清除能力、酪氨酸酶抑制能力及促胶原蛋白分泌能力考察,铁皮石斛的美白活性与抗衰老活性是五种石斛中最佳的。本研究是首次将《化妆品名录》中所收载的五种石斛原料进行一个系统的美白与抗衰老活性研究,为今后石斛在化妆品领域的开发与应用提供了理论依据与参考价值。但由于该研究是考察 5 种石斛水提物与醇提物的美白与抗衰老活性,水提物与醇提物之间,5 种石斛之间活性差异较大,这可能是由于在水提物与醇提物中,不同石斛之间化学物质组成不同所导致的,但具体原因尚不明确,有待进一步的研究。

参考文献

- Chen XM(陈晓梅),Guo SX(郭顺星). Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2001,13(1):70-75.
- Qu XX(屈小媛),Wu YX(武玉祥),Zhang JL(张久磊). Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium* [J]. *Tianjin Agric Sci*(天津农业科学),2015,21(4):19-23.
- Li HC(李海春). Comparative study on antioxidant and anti-aging activities of eight *Dendrobium* polysaccharides [D]. Guangzhou:South China Agricultural University(华南农业大学),2016.
- Zhang GL(张光浓),Bi ZM(毕志明),Wang ZT(王峥涛),et al. Advances in chemical constituents of *Dendrobium* [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*(中草药),2003,34(6):5-7.
- List of used cosmetic raw materials(已使用化妆品原料名称目录). IECIC 2015[S]. China;CFDA(国家食品药品监督管理总局),2015.
- Wang YF(王一帆),Lai JZ(赖家珍),Long XY(龙晓英),et al. Advances in evaluation of whitening mechanism and efficacy of traditional Chinese medicine [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm*(广东药学院学报),2014,30:525-529.
- Pilar AROCA. Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis[J]. *Eur J Biochem*,1992,208:155-163.
- Li GL(李桂林),Sun JY(孙静雅),Wu SH(吴宿慧),et al. Comparison of antioxidant activities of commonly used Chinese medicines for whitening and freckle[J]. *J Chin Med*(中医学报),2015,30:1467-1469.
- Li X(李想),Hu JJ(胡君姣),Li Q(李琼),et al. Anti-aging cosmetics and their efficacy evaluation[J]. *Flavour Frag Cosme*(香料香精化妆品),2013,5:58-62.
- Li XD(李小迪). Skin aging and anti-aging cosmetics [J]. *Flavour Frag Cosme*(香料香精化妆品),2001,3:23-26.
- Li XY(刘晓英). Anti-aging effect of brown algae extract [J]. *Detergent & Cosme*(日用化学品科学),2012,35(8):33-37.
- Feng B(冯冰),Wu Y(吴越),Zhao Y(赵亚),et al. Study on the cosmetic efficacy of *Dendrobium nobile* compound at the cellular level[J]. *China Surfactant Deter & Cosme*(日用化学工业),2014,44:568-571.