

油茶花提取物的美白功效评价

金蒙¹, 施蒂儿², 茹琪¹, 吴晓琴¹, 沈建福^{1*}

(1. 浙江大学 生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江大学 理学部, 浙江 杭州 310058)

摘要: 通过比较不同油茶副产品提取物的体外酪氨酸酶活性抑制作用, 筛选出最佳抑制效果的油茶花提取物, 并以曲酸作为阳性对照, 采用体外培养的人 A375 黑色素瘤细胞模型和斑马鱼胚胎模型探究油茶花提取物对体内酪氨酸酶活性和黑色素合成的影响。结果表明, 油茶花、油茶叶、油茶蒲和油茶粕提取物均表现出较好的酪氨酸酶活性抑制效果。其中, 油茶花效果最佳, 其酪氨酸酶活性半抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.49 g/L。与曲酸相比, 油茶花提取物表现出显著的胞内酪氨酸酶活性抑制作用和黑色素合成抑制作用 ($p < 0.01$), 作用质量浓度为 160 mg/L 时, 胞内酪氨酸酶活性抑制率达到 34.30%±0.24%, 相对黑色素含量相比空白对照组减少了 26.41%±0.35%。当油茶花提取物暴露质量浓度为 100 mg/L 时, 其对斑马鱼体内酪氨酸酶抑制率达到 32.47%±0.35%, 相对黑色素含量降至 64.39%±0.85%, 作用效果与曲酸相当。油茶花提取物在体内外均表现出了较好的酪氨酸酶抑制效果, 对细胞和斑马鱼黑色素生成具有显著抑制作用, 且安全性较高。

关键词: 油茶花提取物; 美白作用; 酪氨酸酶; A375 细胞; 斑马鱼胚胎; 日化原料

中图分类号: TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 07-1513-07

Evaluation on whitening effect of *Camellia oleifera* flowers extract

JIN Meng¹, SHI Dier², RU Qi¹, WU Xiaoqin¹, SHEN Jianfu^{1*}

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 2. Faculty of Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: Extracts from different *Camellia oleifera* parts were compared on their *in vitro* inhibitory activity against tyrosinase, and *Camellia oleifera* flowers extract with the best inhibitory performance was selected. Using kojic acid as positive control, the effects of *Camellia oleifera* flowers extract on tyrosinase activity and melanin synthesis *in vivo* and *in vitro* were investigated by human A375 melanoma cell lines and zebrafish embryo model. The results showed that all the extracts from *Camellia oleifera* flowers, leaves, shell as well as meal exhibited good inhibitory effects on tyrosinase activity, and *Camellia oleifera* flowers extract had the best inhibitory effect with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.49 g/L. Compared with kojic acid, *Camellia oleifera* flowers extract showed significant inhibition of intracellular tyrosinase activity and melanin synthesis ($p < 0.01$). When the mass concentration was 160 mg/L, the inhibition rate of intracellular tyrosinase activity reached 34.30%±0.24%, and the relative melanin content decreased by 26.41%±0.35%. When the exposure mass concentration of *Camellia oleifera* flowers extract was 100 mg/L, the inhibition rate of tyrosinase in zebrafish reached 32.47%±0.35%, and the relative melanin content was reduced to 64.39%±0.85%, indicating similar inhibitory effect to kojic acid. *Camellia oleifera* flowers extract with high safety displayed good tyrosinase inhibition *in vitro* and *in vivo*, and significantly inhibited melanin production in cells and zebrafish.

Key words: *Camellia oleifera* flowers extract; whitening effect; tyrosinase; A375 cells; zebrafish embryos; cosmetic materials

收稿日期: 2022-10-08; 定用日期: 2023-01-13; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220909

基金项目: 国家自然科学基金 (31270722)

作者简介: 金蒙 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: jmeng@zju.edu.cn. 联系人: 沈建福 (1964—), 男, 教授, E-mail: shenjif107@zju.edu.cn.

油茶又名茶籽树, 含油量高, 是中国特有的木本油料植物^[1]。油茶花、油茶叶、油茶蒲与油茶粕是油茶加工后的主要副产品。其中, 油茶粕的年均产量约为 39.71 t^[2]。但是由于开发不足, 油茶副产品利用率较低, 通常被当作废弃物抛荒或者焚烧, 因此对于油茶副产品的功效应用研究亟待开发。目前, 对油茶及其副产品的研究集中在抑菌^[3-5]、抗氧化^[6-8]、抗炎^[9-10]、抗肿瘤^[11-12]等功效, 而美白功效方面研究较少。其中, 油茶花作为油茶的繁殖器官, 本身应含有较多的功效成分, 但目前对油茶花的功效作用研究还处于起步阶段。

酪氨酸酶又称单酚氧化酶, 常见于动植物、微生物及人体中, 其可以催化酪氨酸等酚类化合物反应形成黑色素, 是黑色素合成十分关键的一环^[13]。黑色素快速累积并分布不均匀时, 会导致皮肤的局部色素沉着, 从而产生雀斑、褐斑等皮肤问题^[14]。因此, 降低酪氨酸酶活性并进而抑制黑色素产生是皮肤美白的主要方式。目前, 已研究出的酪氨酸酶抑制剂分为天然类(来源于植物和真菌)和人工合成类。常见的酪氨酸酶抑制剂如来源于真菌的曲酸、人工合成的氢醌等细胞毒性大, 副作用较强。因此, 来源于植物类的酪氨酸酶抑制剂因其安全、高效的特性成为目前酪氨酸酶抑制剂主要的研究方向。已有研究证明, 油茶壳的 1,3-丁二醇提取物^[15]、香水莲花的乙醇提取物^[16]等天然产物对酪氨酸酶有显著的抑制活性。

本研究通过比较油茶花、油茶叶、油茶蒲和油茶粕 4 种产量最多的油茶副产品的体外抑制酪氨酸酶活性效果, 筛选出具有潜在美白功效的油茶花提取物。并通过人 A375 黑素瘤细胞模型和斑马鱼胚胎美白模型评价油茶花提取物的体内外美白效果, 为油茶花提取物在美白日化产品中的应用提供理论基础。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

油茶花、油茶叶、油茶蒲、油茶粕, 浙江省常山县芳村镇; 人 A375 黑素瘤细胞(A375 细胞), 中国科学院上海细胞生物所; 曲酸(质量分数 99%), 酪氨酸酶(25 kU), 上海麦克林生化科技股份有限公司; Triton X-100(质量分数 ≥ 95%), 左旋多巴(L-DOPA, AR), 上海阿拉丁试剂有限公司; 胎牛血清, 浙江天杭生物科技股份有限公司; DMEM 高糖培养基(含丙酮酸钠)、胰蛋白酶(体积分数为 0.25%)、双抗溶液(青霉素-链霉素混合液, 青霉素 G 钠盐 10 kU/mL; 硫酸链霉素质量浓度 10 g/L)、磷酸缓冲液(PBS, pH=7.4 或 pH=6.8, pH=6.8

的 PBS 用于测定酪氨酸酶活性, pH=7.4 的 PBS 用于细胞培养), 白鲨生物科技有限公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 质量浓度 5 g/L), 上海源叶生物科技有限公司; 乙醚、无水乙醇、二甲基亚砜(DMSO)、NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH, AR, 国药集团化学试剂有限公司; 没食子酸、芦丁, 色谱级, 北京索莱宝科技有限公司。

Eon 酶标仪, 美国 BioTek 仪器有限公司; HF90 二氧化碳培养箱, 上海博讯实业有限公司; L420 台式低速自动平衡离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; SPX 型恒温生化培养箱, 宁波江南仪器厂; ALPHA1-4LDpuls 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; KQ-300DB 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; SMZ745T 体式显微镜(非荧光), 日本 Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 油茶副产品提取物的制备

参考文献[17]的方法稍作改进。油茶花、油茶叶、油茶蒲和油茶粕经过挑选除去病变部分后 37 °C 低温热风干燥 48 h, 粉碎过 60 目筛。按照 1 : 10 料液比(g : mL)加入体积分数为 50%的乙醇溶液, 磁力搅拌 3 h, 50 °C 超声提取 2 h, 4000 r/min 离心 10 min 取上清液, 旋蒸除去乙醇, 最后 -20 °C 真空冷冻干燥 72 h 至干粉, 得到油茶副产品提取物冻干粉。

1.2.2 总多酚与总黄酮含量的测定

采用福林酚比色法^[18]测定油茶副产品提取物的总多酚含量, 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法^[17]测定总黄酮含量。

1.2.3 体外酪氨酸酶抑制活性的测定

将油茶花、油茶叶、油茶蒲和油茶粕提取物用 PBS 溶液配制成适宜浓度的溶液。在 1.5 mL 离心管中依次加入 200 μL 待测溶液、200 μL PBS 缓冲液(pH=6.8)、100 μL 质量浓度 0.2 g/L(即 100 U/mL)酪氨酸酶溶液, 37 °C 水浴 10 min。加入 200 μL 质量分数 1 g/L L-DOPA 溶液后, 迅速将各管反应溶液移入 96 孔板中。以曲酸为阳性对照, 以 PBS 为空白对照, 每隔 30 s 测定波长为 475 nm 处的吸光度, 以单位时间内吸光度的变化作为评价酶活性的标准。体外酪氨酸酶抑制率计算公式见式(1)。

$$\text{体外酪氨酸酶抑制率}/\% = \frac{\text{OD}_{475(\text{空白})} - \text{OD}_{475(\text{样品})}}{\text{OD}_{475(\text{空白})}} \times 100 \quad (1)$$

式中: OD_{475(空白)}与 OD_{475(样品)}分别为空白对照组与待测样品组在波长为 475 nm 时的吸光度。

1.2.4 A375 细胞、人永生化角质形成细胞(HaCaT)细胞增殖率的测定

采用 MTT 法测定细胞增殖率。将细胞以 2.5 ×

10^4 个/mL接种于96孔板,贴壁后吸弃上清液,分别加入质量浓度为10、20、40、80、160和320 mg/L的油茶花提取物和曲酸,在37℃、体积分数5% CO₂条件下培养48 h。培养结束,吸弃上清液,加DMEM高糖培养基(180 μL/孔),避光加MTT(20 μL/孔),孵育4 h,吸弃上清液,加DMEM高糖培养基(150 μL/孔),摇床振荡5 min,以未给药的细胞作为空白对照,测定波长为570 nm处的吸光度。细胞增殖率计算公式见式(2)。

$$\text{细胞增殖率}/\% = \frac{\text{OD}_{570(\text{样品})}}{\text{OD}_{570(\text{空白})}} \times 100 \quad (2)$$

式中:OD_{570(空白)}与OD_{570(样品)}分别为空白对照组与待测样品组在波长为570 nm时的吸光度。

1.2.5 A375细胞胞内酪氨酸酶抑制活性的测定

采用多巴氧化法^[19]测定胞内酪氨酸酶抑制活性。将A375细胞以 2.5×10^4 个/mL接种于96孔板,贴壁后吸弃上清液,分别加入质量浓度为10、40和160 mg/L的油茶花提取物和曲酸,培养48 h。培养结束,用体积分数0.25%胰蛋白酶消化细胞,并将细胞沉淀收集于1 mL离心管中。PBS洗涤沉淀2次,加入含体积分数1% Triton X-100的PBS缓冲液200 μL,置于-80℃冰箱冻存30 min,室温融化后在10000 r/min、4℃条件下离心15 min,上清液即为酪氨酸酶粗提液。取50 μL上清液于96孔板中,加入150 μL 1 g/L L-DOPA溶液,37℃下反应2 h,以未给药的细胞作为空白对照,测定波长475 nm处的吸光度。胞内酪氨酸酶抑制率计算公式见式(3)。

$$\text{胞内酪氨酸酶抑制率}/\% = \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}_1}{\text{OD}_0} \times 100 \quad (3)$$

式中:OD₀与OD₁分别为空白对照组与待测样品组在波长为475 nm时的吸光度。

1.2.6 A375细胞胞内相对黑色素含量的测定

采用NaOH裂解法^[19]测定胞内相对黑色素含量。培养方式同1.2.4节。培养结束,用体积分数0.25%胰酶消化细胞,并将细胞沉淀收集于1 mL离心管中。PBS洗涤沉淀2次,加入1 mL乙醇-乙醚溶液[V(乙醇):V(乙醚)=1:1],37℃水浴15 min,3000 r/min离心5 min,取沉淀加入600 μL 1 mol/L NaOH溶液(含体积分数10%的DMSO),95℃水浴0.5 h。冷却后,以未给药的细胞作为空白对照,测定波长405 nm处的吸光度。胞内相对黑色素含量计算公式见式(4)。

$$\text{胞内相对黑色素含量}/\% = \frac{\text{OD}_{405(\text{样品})}}{\text{OD}_{405(\text{空白})}} \times 100 \quad (4)$$

式中:OD_{405(空白)}与OD_{405(样品)}分别为空白对照组与待

测样品组在波长为405 nm时的吸光度。

1.2.7 斑马鱼胚胎暴露实验^[20]

使用6孔板为实验载体,每孔加入6~8 h发育正常的斑马鱼胚胎40枚。用塑料吸管吸干养殖水(pH为6.5~7.5,硬度为6~8)后,每孔加入3.0 mL不同暴露浓度的受试样品稀释液(10、50、100 mg/L油茶花提取物),(28±0.5)℃恒温培养,每24 h换一次液。同时设置3个平行组、空白对照组及阳性对照组(0.1 g/L曲酸)。于体视显微镜下观察和记录胚胎72 h时的黑色素颗粒分布。所有的实验步骤遵循实验动物护理和使用指南(第八版,ISBN-10:0-309-15396-4),由浙江大学实验动物福利伦理审查委员会批准。

1.2.8 斑马鱼体内相对黑色素含量的测定

1.2.7节中各受试物暴露处理72 h后每组分别收集40只斑马鱼胚胎,置于-80℃冰箱处死,PBS冲洗3次,加入含体积分数1% Triton X-100的PBS缓冲液100 μL,超声破碎处理(5 min,10000 r/min),4℃离心15 min,上清液为酶粗提液。取沉淀物,采用NaOH裂解法测定斑马鱼体内相对黑色素含量,实验方法同1.2.6节。斑马鱼体内相对黑色素含量计算公式见式(5)。

$$\text{体内相对黑色素含量}/\% = \frac{\text{OD}_3}{\text{OD}_2} \times 100 \quad (5)$$

式中:OD₂与OD₃分别为空白对照组与待测样品组在波长为405 nm时的吸光度。

1.2.9 斑马鱼体内酪氨酸酶活性的测定

采用多巴氧化法^[19]测定1.2.7节中所得斑马鱼酪氨酸酶粗提液的酪氨酸酶活性,实验方法同1.2.5节。酪氨酸酶抑制率计算公式见式(6)。

$$\text{酪氨酸酶抑制率}/\% = \frac{\text{OD}_4 - \text{OD}_5}{\text{OD}_4} \times 100 \quad (6)$$

式中:OD₄与OD₅分别为空白对照组与待测样品组在波长为475 nm时的吸光度值。

1.3 数据处理

采用SPSS 24.0、GraphPad Prism8和Origin 2018软件进行数据处理,以“均值±标准偏差”表示,采用Duncan多重比较法进行显著性差异检验。

2 结果与讨论

2.1 油茶副产品提取物的总多酚含量

以标准品质量浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)绘制没食子酸与芦丁的标准曲线。没食子酸的标准曲线为 $y = 0.0228x + 0.1028$ ($R^2 = 0.9992$)。芦丁的标准曲线为 $y = 0.0012x + 0.0400$ ($R^2 = 0.9967$)。表1为油茶副产品提取物总多酚与总黄

酮含量的测定结果,其中油茶花的总多酚含量最高,质量分数为 16.52% (用不带标准偏差的形式表示,下同),显著高于油茶蒲和油茶粕提取物,高于油茶叶提取物。油茶花的总黄酮含量也最高,质量分数为 8.47%,显著高于其他油茶副产品提取物。

表 1 不同油茶副产品提取物总多酚和总黄酮质量分数
Table 1 Mass fraction of total polyphenols and total flavonoid in extracts of different *Camellia oleifera* by-products extracts

样品名称	总多酚质量分数/%	总黄酮质量分数/%
油茶花提取物	16.52±0.23 ^a	8.47±0.13 ^a
油茶叶提取物	15.81±0.53 ^a	5.92±0.22 ^b
油茶蒲提取物	7.79±0.32 ^b	3.03±0.10 ^c
油茶粕提取物	6.24±0.16 ^c	2.58±0.17 ^d

注:组间字母完全不相同说明有显著性差异 ($p < 0.05$),用 a、b、c、d 表示。

2.2 油茶副产品提取物对体外酪氨酸酶活性的抑制作用

油茶副产品提取物抑制酪氨酸酶活性的 IC_{50} 如表 2 所示,实验方法同 1.2.3 节。不同浓度的油茶粕提取物对体外酪氨酸酶抑制率的影响见图 1。

表 2 油茶副产品提取物抑制酪氨酸酶活性的 IC_{50}
Table 2 IC_{50} values of inhibitory tyrosinase activity of *Camellia oleifera* by-products extracts

样品名称	抑制酪氨酸酶活性 IC_{50} / (g/L)
油茶花提取物	0.49
油茶叶提取物	0.96
油茶蒲提取物	8.01
油茶粕提取物	—

注:油茶粕提取物对体外酪氨酸酶活性的抑制率无法达到 50%,因此无法测出 IC_{50} 。

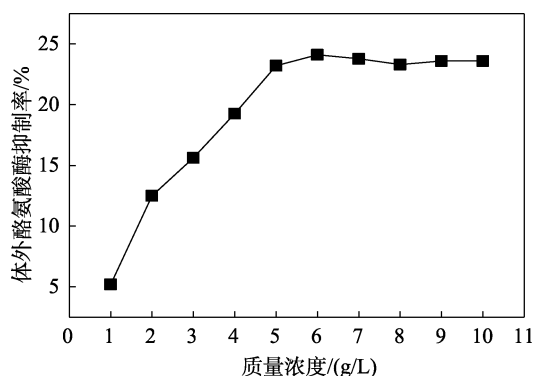


图 1 不同质量浓度的油茶粕提取物对体外酪氨酸酶抑制率的影响

Fig. 1 Effect of *Camellia oleifera* meal extract with different mass concentrations on *in vitro* tyrosinase inhibition rate

由表 2 可知,油茶副产品提取物中油茶花提取

物的酶活抑制效果最强, IC_{50} 为 0.49 g/L, 大约是等浓度曲酸的 1/5, 强于其他油茶副产品提取物。由图 1 可知, 体外酪氨酸酶抑制率随着油茶粕提取物浓度增加而升高, 并在油茶粕提取物质量浓度为 6 g/L 时达到最大 (抑制率为 24.11%), 之后趋于平缓。可见油茶粕提取物对体外酪氨酸酶抑制率达不到 50%, 无法测出 IC_{50} 。综上, 油茶花提取物具有优异的抑制酪氨酸酶活性的功效, 可能是由于油茶花提取物中的总多酚含量和总黄酮含量要高于其他油茶副产品提取物。而已有研究表明, 天然原料在美白方面主要起作用的成分有多酚类^[16]、多糖类^[8]、黄酮类^[16], 且多酚类物质与黄酮类物质与抑制酪氨酸酶酶活作用有相关性。

2.3 油茶花提取物对 A375 和 HaCaT 细胞增殖率的影响

人 A375 黑素瘤细胞在不同浓度的油茶花提取物和曲酸中 48 h 的细胞增殖率如图 2 所示。由图 2 可知, 油茶花提取物和曲酸在低浓度时, 对细胞生长无明显影响; 当质量浓度达到 320 mg/L 时, 油茶花提取物和曲酸对 A375 细胞增殖有显著抑制作用, 细胞增殖率分别下降至 $51.26\% \pm 7.21\%$ 、 $72.37\% \pm 8.79\%$, 且油茶花提取物对细胞增殖的抑制作用明显强于同浓度曲酸, 可见油茶花提取物中活性成分能够减缓 A375 黑素瘤细胞的增殖, 间接起到美白作用。

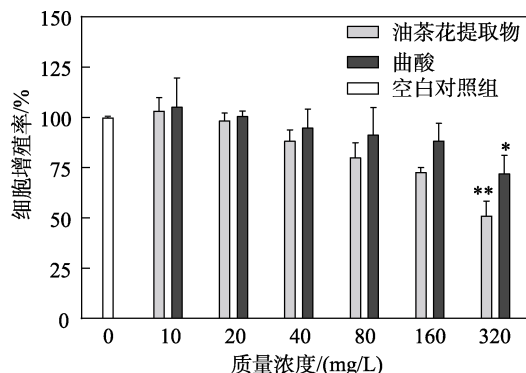


图 2 油茶花提取物对 A375 细胞增殖率的影响
Fig. 2 Effect of *Camellia oleifera* flowers extract on proliferation rate of A375 cells

HaCaT 人永生角质形成细胞在不同浓度的油茶花提取物和曲酸中 48 h 的细胞增殖率如图 3 所示。

由图 3 可知, 曲酸质量浓度高于 20 mg/L 时, HaCaT 细胞增殖已受到抑制, 当曲酸质量浓度达到 320 mg/L 时, 细胞增殖率为 $75.71\% \pm 1.18\%$, 对细胞具有显著抑制作用。曲酸的细胞毒性较强, 可能与其直接破坏细胞膜的完整性有关, 对细胞增殖具有无差别的抑制作用^[21]。

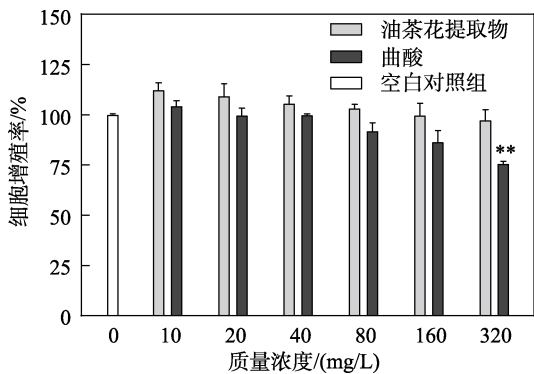


图 3 油茶花提取物对 HaCaT 细胞增殖率的影响
Fig. 3 Effect of *Camellia oleifera* flowers extract on proliferation rate of HaCaT cells

而油茶花提取物在低浓度时可以促进 HaCaT 细胞生长; 油茶花提取物质量浓度为 320 mg/L 时, 细胞增殖率为 99.73%±5.99%。由此可见, 在质量浓度低于 320 mg/L 时, 油茶花提取物对 HaCaT 细胞增殖无明显抑制作用, 与对 A375 细胞形成对比, 油茶花提取物对恶性黑色素瘤有显著的抑制作用, 而对角质形成细胞增殖具有保护作用, 安全性较高。有研究^[23]发现了一种可以选择性抑制 A375 细胞增殖, 而对 HaCaT 细胞无明显影响的物质(低氘水)。该物质能通过抑制 A375 细胞迁移、影响细胞周期并诱导 A375 细胞发生凋亡等方式抑制细胞增殖。因此, 猜测油茶花提取物也可能通过以上途径抑制细胞增殖。

2.4 油茶花提取物对胞内酪氨酸酶活性的抑制作用

油茶花提取物对细胞内酪氨酸酶抑制率的影响见图 4。

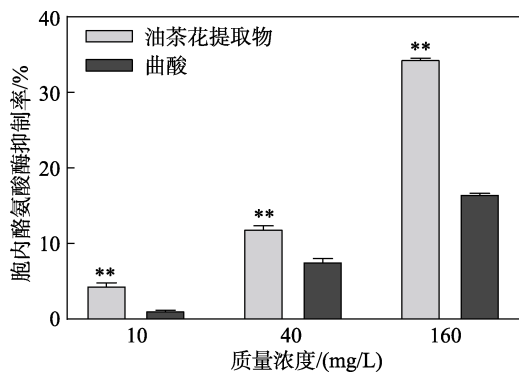


图 4 油茶花提取物对细胞内酪氨酸酶抑制率的影响
Fig. 4 Effect of *Camellia oleifera* flowers extract on inhibition rate of intracellular tyrosinase

由图 4 可知, 油茶花提取物和曲酸的浓度越高, 对胞内酪氨酸酶抑制率越大, 且油茶花提取物对胞内酪氨酸酶抑制率要显著强于曲酸 ($p < 0.01$)。在油茶花提取物质量浓度为 160 mg/L 时, 对 A375 细胞胞内酪氨酸酶抑制率达到 34.30%±0.24%, 表明油茶花提取物具有优异的抑制 A375 细胞胞内酪氨酸酶活性的作用。曲酸和油茶花提取物对胞内外酪氨酸酶活性抑制作用的差异可能是因为曲酸和油茶花

提取物无法直接作用于 A375 细胞胞内的酪氨酸酶, 而是通过对细胞的不同作用, 调节细胞生长与蛋白表达, 从而影响酪氨酸酶的活性^[23-24]。

2.5 油茶花提取物对胞内相对黑色素含量的影响

油茶花提取物和曲酸对细胞内相对黑色素含量的影响如图 5 所示。

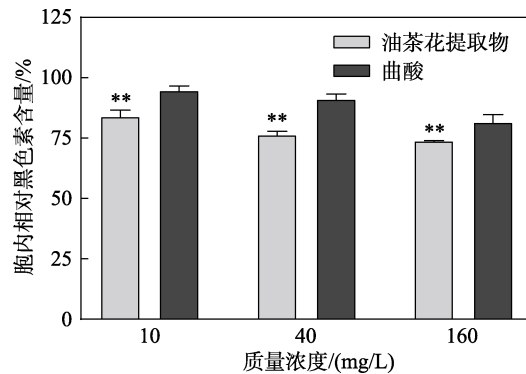
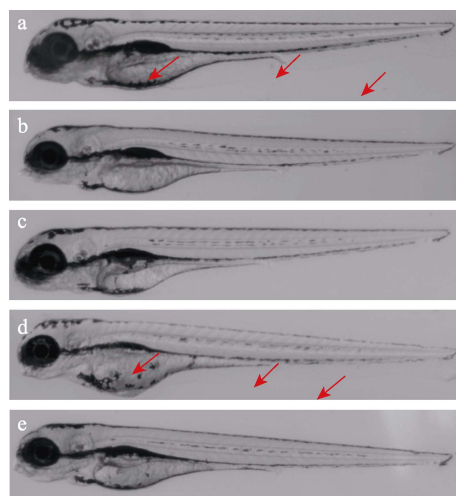


图 5 油茶花提取物对细胞内相对黑色素含量的影响
Fig. 5 Effect of *Camellia oleifera* flowers extract on relative melanin content in cells

由图 5 可知, 油茶花提取物能够减少细胞中黑色素的形成。以空白对照组胞内相对黑色素含量为 100%, 作用浓度越高, 油茶花提取物和曲酸对黑色素形成的抑制率越大, 且油茶花提取物的效果要显著强于曲酸。在油茶花提取物质量浓度为 160 mg/L 时, 细胞中相对黑色素含量减少了 26.41%±0.35%, 该结果与细胞内酪氨酸酶活性抑制率结果一致。因此, 推测油茶花提取物通过抑制细胞内酪氨酸酶活性, 减少了黑色素的生成。

2.6 油茶花提取物对斑马鱼体内黑色素形成的影响

油茶花提取物对斑马鱼黑色素合成的抑制实验结果见图 6、7。



a—空白对照组; b—10 mg/L 油茶花提取物; c—50 mg/L 油茶花提取物; d—100 mg/L 油茶花提取物; e—100 mg/L 曲酸

图 6 油茶花提取物对斑马鱼黑色素形成的影响
Fig. 6 Effect of *Camellia oleifera* flowers extract on melanin formation in zebrafish

由图 6 箭头处对比可知,相比空白对照组,油茶花提取物暴露浓度越高,斑马鱼的黑色素颗粒越少,其抑制黑色素生成效果越好。由图 7 可知,油茶花提取物对斑马鱼体内黑色素的形成具有显著抑制作用,在暴露质量浓度为 100 mg/L 时,油茶花提取物组斑马鱼体内相对黑色素含量降低至 64.39%±0.85%,与同浓度曲酸组抑制作用相当。这一结论与图 6 相符。曲酸在细胞内和斑马鱼体内表现出的抑制作用差异可能是因为斑马鱼胚胎相对于 A375 细胞具有更佳的曲酸吸收能力,具体作用机制需今后进行更多研究来验证。

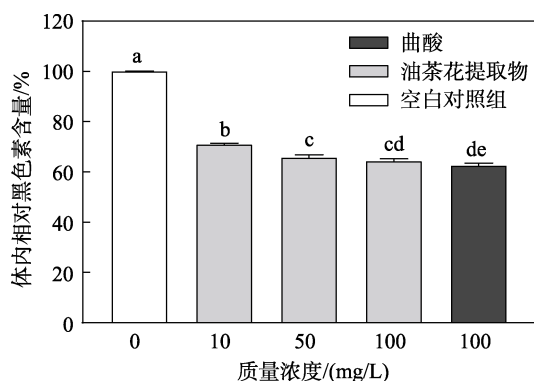


图 7 油茶花提取物对斑马鱼体内相对黑色素含量的影响
Fig. 7 Effect of *Camellia oleifera* flowers extract on relative melanin content in zebrafish

2.7 油茶花提取物对斑马鱼体内酪氨酸酶活性的影响

油茶花提取物对斑马鱼体内酪氨酸酶活性的影响结果见图 8。

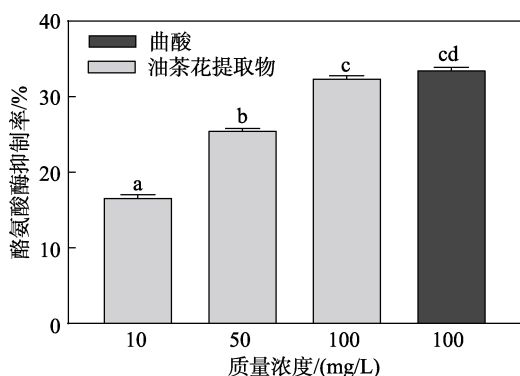


图 8 油茶花提取物对斑马鱼体内酪氨酸酶活性的影响
Fig. 8 Effect of *Camellia oleifera* flowers extract on tyrosinase activity in zebrafish

由图 8 可知,油茶花提取物对斑马鱼体内酪氨酸酶活性具有显著的抑制作用,且呈浓度依赖性。当油茶花提取物暴露质量浓度为 100 mg/L 时,对酪氨酸酶抑制率最大,达到 32.47%±0.35%,与同暴露浓度的曲酸作用相当。这一结果与 2.6 节体内相对

黑色素含量结果一致。同时,斑马鱼胚胎模型的实验结果与细胞实验结果相符,由于斑马鱼生成黑色素的过程与人类相似,这更加表明油茶花提取物在美白功效方面的优势。有研究表明,一些天然产物提取物可以通过抑制斑马鱼胚胎黑色素上游基因 MITF 的表达来抑制酪氨酸酶的活性和黑色素的生成,如水仙醇提取物^[23]、芝麻酚^[24]。因此,油茶花提取物可能也是通过上述途径来抑制酪氨酸酶的活性和黑色素的生成。

3 结论

(1) 油茶花、油茶叶、油茶粕 3 种油茶副产品提取物对体外酪氨酸酶活性表现出显著的抑制作用,其 IC₅₀ 分别为 0.49、0.96、8.01 g/L。油茶粕提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用弱于其他油茶副产品提取物,在质量浓度为 6.0 g/L 时,达到最大抑制率(24.11%)。油茶花提取物优异的抑制作用可能与其较高的酚类物质含量有关。

(2) 油茶花提取物对 A375 细胞增殖有一定的抑制作用,且效果优于曲酸。但油茶花提取物对 HaCaT 细胞增殖有促进作用,曲酸有一定的抑制作用。油茶花提取物可以显著降低 A375 胞内酪氨酸酶活性,当其质量浓度为 160 mg/L 时,胞内酪氨酸酶抑制率达到 34.30%±0.24%,抑制效果显著优于曲酸。同时,油茶花提取物可以抑制胞内黑色素合成,其抑制效果显著优于曲酸。

(3) 油茶花提取物对斑马鱼体内酪氨酸酶活性与黑色素生成均有显著的抑制作用,其抑制效果与曲酸相当。当暴露质量浓度为 100 mg/L 时,斑马鱼体内酪氨酸酶抑制率达到 32.47%±0.35%,体内相对黑色素含量降低至 64.39%±0.85%。

(4) 作为天然的植物提取物,油茶花提取物在体内外均表现出了较好的酪氨酸酶抑制效果,对 A375 细胞和斑马鱼黑色素生成具有显著抑制作用,且安全性高,是一种潜在的美白功能成分,在日用化妆品领域具有较高的应用前景。

参考文献:

- WANG Q L(王玲琼), XU Q L(徐巧林), DONG L M(董丽梅), et al. Chemical constituents from the fruit shell of *Camellia oleifera*[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany (热带亚热带植物学报), 2017, 25(1): 81-86.
- TANG C(唐聪). Study on antimicrobial activity of *Camellia meal*[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology(中南林业科技大学), 2016.
- WANG F(汪飞), QIU Y X(丘苑新), ZHAO L(赵丽), et al. Study on separation and purification of antibacterial substances from the seed meal of *Camellia oleifera* Abel[J]. Guangdong Agricultural Sciences (广东农业科学), 2014, 41(18): 83-86.
- QIU Y X, HE D, YANG J X, et al. Kaempferol separated from *Camellia oleifera* meal by high-speed countercurrent

- chromatography for antibacterial application[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(12): 2383-2397.
- [5] ZHAO Y, SU R Q, ZHANG W T, *et al.* Antibacterial activity of tea saponin from *Camellia oleifera* shell by novel extraction method [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 153 (1):112604.
- [6] XIAO X M, HE L M, CHEN Y Y, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidative effects of *Camellia oleifera* Abel components[J]. Future Medicinal Chemistry, 2017, 9(17): 2069-2079.
- [7] QIU S S(邱松山), WANG Z H(王志辉), JIANG C C(姜翠翠). Free-radical scavenging capacity of sasanquasaponin from *Camellia oleifera* Abel[C]//Proceedings of the International Conference on Chemical Engineering and Advanced Materials (化学工程与先进材料国际会议), 2011: 2367-2370.
- [8] LAN W T(蓝梧涛), WU X H(吴雪辉), ZHANG W(章文), *et al.* Optimization of extraction process of polyphenols from *Camellia oleifera* leaves and its antioxidant activity *in vitro*[J]. China Oils and Fats (中国油脂), 2019, 44(2): 118-122.
- [9] JIAO B(焦兵), XU C T(许承婷), LI Q(黎青), *et al.* Chemical constituents of the flavonoids from *Camellia oleifera* and their anti-inflammatory activities *in vitro*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine (中成药), 2019, 41(2): 327-333.
- [10] JIAO B(焦兵), XU C T(许承婷), LI Q(黎青), *et al.* Chemical constituents of ethyl acetate extract from seed cake of *Camellia oleifera* and its anti-inflammatory activities[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (中国实验方剂学杂志), 2019, 25(22): 132-137.
- [11] ZHOU H, WANG C Z, YE J Z, *et al.* New triterpene saponins from the seed cake of *Camellia oleifera* and their cytotoxic activity[J]. Phytochemistry Letters, 2014, 8: 46-51.
- [12] ZONG J F, WANG R L, BAO G H, *et al.* Novel triterpenoid saponins from residual seed cake of *Camellia oleifera* Abel. show anti-proliferative activity against tumor cells[J]. Fitoterapia, 2015, 104(1): 7-13.
- [13] YAN Y L(严雅丽), ZHOU M X(周沫希), JIANG C P(姜春鹏), *et al.* *In vitro* evaluation of whitening effects of new functional plant salts[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2020, 37(5): 1002-1009.
- [14] STURM R A, TEASDALE R D, BOX N F. Human pigmentation genes: Identification, structure and consequences of polymorphic variation[J]. Gene, 2001, 277(1/2): 49-62.
- [15] LIU W, WANG M, XU S, *et al.* Inhibitory effects of shell of *Camellia oleifera* Abel extract on mushroom tyrosinase and human skin melanin[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2019, 18(6): 1955-1960.
- [16] SUN Y J(孙玉洁). Whitening and moisturizing effects of *Nymphaea odorata* aiton[D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2016.
- [17] CUI X Y(崔心禹). Study on the improvement effect of *Camellia oleifera* leaves extract on acne[D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2021.
- [18] Group Food Safety Standards. Determination of total polyphenol in plant extracts and its products Spectrophotometric method: T/AHFIA 005—2018[S]. Hefei: Anhui Food Trade Association (安徽省食品行业协会), 2019: 1-15.
- [19] GAO Y(高杨), FENG M(冯敏), CHEN Y(程毅), *et al.* Inhibition effects of norcantharidin on the proliferation, melanin synthesis and tyrosinase activity in human melanoma cell strain A375[J]. Hebei Medical Journal (河北医药), 2018, 40(17): 2569-2572, 2577.
- [20] Group Food Safety Standards. Guangzhou Huangpu cosmetic industry association. cosmetics-determination of whitening-zebrafish (*Danio rerio*) embryo assay: T/HPCIA 005—2022[S]. Guangzhou: Guangzhou Huangpu Cosmetic Industry Association (广州开发区黄埔化妆品产业协会), 2022.
- [21] LI L(李玲), SONG W M(宋伟民), ZHOU H(周华). Cytotoxicity of four skin lighteners on skin melanoma cells[J]. Journal of Ningxia Medical College (宁夏医学院学报), 2006, (2): 114-116, 119.
- [22] WU S M(吴斯敏), LIN X G(林贤桂), DU X Y(杜歆玥), *et al.* Effects of deuterium-depleted water on proliferation, migration, and apoptosis of human melanoma A375 cells[J]. Shandong Medical Journal (山东医药), 2022, 62(8): 1-5.
- [23] ZHANG W J(张文娟), XU J J(许瑾瑾), CHEN X Y(陈晓莹), *et al.* Alcohol extracts of *Narcissus bulb* inhibits melanogenesis in zebrafish embryos[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica (中国实验动物学报), 2017, 25(4): 425-432.
- [24] BAEK S H, LEE S H. Sesamol decreases melanin biosynthesis in melanocyte cells and zebrafish: Possible involvement of MITF via the intracellular cAMP and p38/JNK signalling pathways[J]. Experimental Dermatology, 2015, 24(10): 761-766.
- (上接第1504页)
- [32] CHU C S(褚朝森), WANG X L(王晓丽), HU Y T(胡玉涛), *et al.* Synthesis of triclin by ultrasonic phase transfer catalysis[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals (中国医药工业杂志), 2019, 50(4): 403-405.
- [33] SDAHL M, CONRAD J, BRAUNBERGER C, *et al.* Efficient and sustainable laccase-catalyzed iodination of *p*-substituted phenols using KI as iodine source and aerial O₂ as oxidant[J]. RSC Advances, 2019, 9(34): 19549-19559.
- [34] ADELAKUN O E, KUDANGA T, PARKER A, *et al.* Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012, 74(1/2): 29-35.
- [35] ANOUAR E, CALLISTE C A, KOSINOVA P, *et al.* Free radical scavenging properties of guaicol oligomers: A combined experimental and quantum study of the guaiacyl-moiety role[J]. Journal of Physical Chemistry A, 2009, 113(50): 13881-13891.
- [36] TONAMI H, UYAMA H, NAGAHATA R, *et al.* Guaiacol oxidation products in the enzyme-activity assay reaction by horseradish peroxidase catalysis[J]. Chemistry Letters, 2004, 33(7): 796-797.
- [37] ZHANG H M(张红漫), ZHENG R P(郑荣平), CHEN J W(陈敬文), *et al.* Investigation on the determination of lignocellulosics components by NREL method[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory (分析实验室), 2010, 29(11): 15-18.
- [38] LAN W, RENCORET J, LU F C, *et al.* Tricin-lignins: Occurrence and quantitation of triclin in relation to phylogeny[J]. Plant Journal, 2016, 88(6): 1046-1057.
- [39] LAN W, LU F C, REGNER M, *et al.* Tricin, a flavonoid monomer in monocot lignification[J]. Plant Physiology, 2015, 167(4): 1284-1295.
- [40] PEI J C(裴继诚). Lignocellulosic chemistry[M]. Beijing: China Light Industry Press (中国轻工业出版社), 2012: 80-85.
- [41] LAN W, MORREEL K, LU F C, *et al.* Maize triclin-oligolignol metabolites and their implications for monocot lignification[J]. Plant Physiology, 2016, 171(2): 810-820.
- [42] CHANG H T, SU Y C, CHANG S T. Studies on photostability of butyrylated, milled wood lignin using spectroscopic analyses[J]. Polymer Degradation and Stability, 2006, 91(4): 816-822.
- [43] COSTA S C C, DAMASCENO P K F, LIMA R G G, *et al.* Evaluation of antioxidant, photoprotective and antinociceptive activities of *Marcetia macrophylla* extract: Potential for formulation of sunscreens[J]. Brazilian Journal of Biology, 2021, 83: e246312.
- [44] LU F C, WEI L P, AZARPIRA A, *et al.* Rapid syntheses of dehydrodiferulates via biomimetic radical coupling reactions of ethyl ferulate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(34): 8272-8277.
- [45] VISMEH R, LU F C, CHUNDAWAT S P S, *et al.* Profiling of diferulates (plant cell wall cross-linkers) using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analyst, 2013, 138(21): 6683-6692.
- [46] YUE F X, GAO R L, PIOTROWSKI J S, *et al.* Scaled-up production of poaic acid, a plant-derived antifungal agent[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 103: 240-243.
- [47] AZARPIRA A, LU F C, RALPHA J. Reactions of dehydrodiferulates with ammonia[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2011, 9(19): 6779-6787.