

肉苁蓉苯乙醇苷-光甘草定协同 抗皮肤色素沉着功效

刘璐瑶¹, 王宝娟^{2,3}, 李明杰⁴, 胡君萍¹, 杨建华^{2,3*}

(1. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆药物临床研究重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011; 4. 沙雅县人民医院 药学科, 新疆 阿克苏 842008)

摘要: 为探究肉苁蓉苯乙醇苷 (PhGs) 和光甘草定 (Gla) 协同抑制皮肤色素沉着作用, 通过体外酪氨酸酶活性抑制实验、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐阳离子 (ABTS⁺) 自由基清除实验, 初步筛选了 PhGs 和 Gla 的复配质量比。进一步构建了 UVB 诱导 B16F10 细胞色素沉着模型, 以酪氨酸酶活性、黑色素含量为指标, 评价了药物抑制黑色素的生成作用; 构建了脂多糖 (LPS) 诱导 HaCaT 细胞炎症模型, 以抑制白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 释放效果为指标, 评价了药物的抗炎作用; 构建偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH) 诱导 HaCaT 细胞氧化应激模型, 以提升超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、过氧化氢酶 (CAT) 活力为指标, 评价了药物的抗氧化作用。通过上述 3 种细胞模型综合筛选出最佳的 PhGs 和 Gla 复配质量比。结果表明, 以 $m(\text{PhGs}):m(\text{Gla})=1:1$ 、 $5:1$ 、 $10:1$ 制备的 PhGs/Gla(1:1)、PhGs/Gla(5:1)、PhGs/Gla(10:1) 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=6.8) 在抑制酪氨酸酶活性、抗氧化方面具有较好的抑制作用和协同效应, 对酪氨酸酶抑制率分别为 94.37%、92.93%和 88.06%; 对 DPPH 自由基清除率分别为 89.44%、88.72%和 88.10%; 对 ABTS⁺ 自由基清除率分别为 100.13%、100.01%和 99.87%。当质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, PhGs/Gla(1:1)、PhGs/Gla(5:1)、PhGs/Gla(10:1) DMEM 溶液未对 B16F10 和 HaCaT 细胞表现出细胞毒性; PhGs/Gla(1:1) DMEM 溶液的酪氨酸酶活性抑制能力更强 (酪氨酸酶活性 23.80%), 黑色素含量 (30.90%) 显著降低; PhGs/Gla(1:1) DMEM 溶液抑制 IL-6、TNF- α 释放效果, 以及增强 SOD、CAT 活力的能力最佳, 表现出良好的 PhGs 和 Gla 复配协同性能, 均优于单一用药, 也高于 PhGs/Gla(5:1)、PhGs/Gla(10:1) DMEM 溶液。PhGs 和 Gla 复配通过抑制黑色素生成、抗炎及抗氧化作用, 协同发挥改善皮肤色素沉着药效。

关键词: 肉苁蓉苯乙醇苷; 光甘草定; 协同作用; 抗皮肤色素沉着; 抗氧化; 抗炎; 医药原料

中图分类号: TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 05-1092-11

Synergistic anti-skin pigmentation effect of *Cistanche* phenylethanoid glycosides and glabridin

LIU Luyao¹, WANG Baojuan^{2,3}, LI Mingjie⁴, HU Junping¹, YANG Jianhua^{2,3*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China; 2. Pharmaceutical Department of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Department of Pharmacy, Urumqi 830011, Xinjiang, China; 3. Xinjiang Key Laboratory of Clinical Drug Research, Urumqi 830011, Xinjiang, China; 4. Department of Pharmacy, Shaya County People's Hospital, Aksu 842008, Xinjiang, China)

Abstract: To investigate the synergistic effect of *Cistanche* phenylethanol side (PhGs) and glabridin (Gla) against skin pigmentation, the mass ratio of PhGs and Gla was screened by *in vitro* tyrosinase inhibition experiment, 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and 2,2-diazo-bis(3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid)diammonium cation (ABTS⁺) free radical scavenging experiments. The UVB-induced cytopigmentation model of B16F10 was established, and the inhibition on melanin production was

evaluated using tyrosinase activity and melanin content as indexes. The inflammatory model of HaCaT cells induced by lipopolysaccharide (LPS) was established, and the anti-inflammatory effect of the drug was evaluated by inhibiting the release of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). The oxidative stress model of HaCaT cells induced by azodiisobuamidine hydrochloride (AAPH) was further established, and the enhanced activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was used as indexes to evaluate the antioxidant effect of the drug. The optimal mass ratio of PhGs and Gla was determined by the above three cell models. The results showed that aqueous solutions of PhGs/Gla(1 : 1), PhGs/Gla(5 : 1) and PhGs/Gla(10 : 1) prepared with $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla}) = 1 : 1, 5 : 1, 10 : 1$ exhibited good inhibitory and synergistic effects on tyrosinase activity and antioxidant activity. The inhibition rates of PhGs/Gla(1 : 1), PhGs/Gla(5 : 1) and PhGs/Gla(10 : 1) aqueous solutions with a mass concentration of 0.4 g/L were 94.37%, 92.93% and 88.06%, respectively. The scavenging rates of DPPH free radicals were 89.44%, 88.72% and 88.10%, respectively. The scavenging rates of ABTS⁺ free radicals were 100.13%, 100.01% and 99.87%, respectively. When the mass concentration was 25 $\mu\text{g/mL}$, PhGs/Gla(1 : 1), PhGs/Gla(5 : 1) and PhGs/Gla(10 : 1) aqueous solutions showed no cytotoxicity to B16F10 and HaCaT cells. The inhibition of tyrosinase activity in PhGs/Gla(1 : 1) aqueous solution was stronger (tyrosinase activity 23.80%), and the melanin content (30.90%) was significantly decreased. PhGs/Gla(1 : 1) aqueous solution showed the best inhibition effect on IL-6 and TNF- α release, and the ability to enhance the activity of SOD and CAT. The combination of PhGs and Gla showed good synergistic performance, superior to single drug and higher than PhGs/Gla(5 : 1) and PhGs/Gla(10 : 1) aqueous solution. The combination of PhGs and Gla played a synergistic role in improving skin pigmentation by inhibiting melanin production, anti-inflammatory and antioxidant effects.

Key words: *Cistanche* phenylethanoid glycosides; glabridin; synergistic effects; anti-skin pigmentation; anti-oxidation; anti-inflammatory; drug materials

皮肤色素沉着是由损伤、皮肤炎症、紫外线照射等因素引起的皮肤病^[1-2], 这些因素都可能导致黑色素异常增加, 进而引发黄褐斑、雀斑以及炎症后色素沉着(PIH)等问题^[3-4], 影响人们的精神状况和生活质量。目前, 皮肤色素沉着的治疗主要聚焦于抑制黑色素形成的关键酶——酪氨酸酶^[5-6]。最新研究^[7-8]表明, 皮肤色素沉着依赖于表皮中角质形成细胞和黑素细胞之间的紧密相连, 角质形成细胞释放的自由基、炎症因子等一旦接触黑素细胞, 就会诱导酪氨酸酶活性增加, 导致黑色素含量增加, 并且它们还会加快黑色素转运, 使黑色素在皮肤表层沉积。因此, 治疗皮肤色素沉着需要抑制黑色素生成、抗炎和抗氧化等多种措施并举。

目前, 传统药物制剂, 如对苯二酚、氢醌等, 在治疗皮肤色素沉着方面虽有一定效果, 但作用方式较为单一, 且可能产生不良反应^[9-10]。相比而言, 天然药物成分天然、作用温和, 越来越受到消费者的认可和推崇^[11-12]。特别是多种植物提取物复配^[13-14], 不仅能够抑制黑色素的生成, 还具有抗炎和抗氧化等多种作用, 为治疗皮肤色素沉着提供了新的思路和方法。

肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Ma)具有独特的药用价值, 被誉为“沙漠人参”。研究发现, 肉苁蓉含有的标志性成分苯乙醇苷具有较好的抗氧化活性^[15]和抗炎作用^[16], 也具有一定的酪氨酸酶抑制作用^[17]。光

甘草定是光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)中的一种黄酮类成分, 具有强大的美白作用, 被称为“美白黄金”^[18]。中医治疗皮肤色素沉着通常从健脾益肾、清热解毒、益气补血等方面入手^[19]。肉苁蓉苯乙醇苷可补肾阳、益精血, 光果甘草能补脾益气、清热解毒, 二者协同可抗色素沉着。肉苁蓉苯乙醇苷与光甘草定复配可能从多维度、多靶点抗皮肤色素沉着, 全波段防护紫外线, 协同抑制酪氨酸酶活性和减少黑色素生成, 还能减少自由基和炎症因子, 降低皮肤炎症和氧化应激, 调控黑色素生成和转运。然而, 肉苁蓉苯乙醇苷和光甘草定协同抑制皮肤色素沉着作用鲜见文献报道。

本文拟通过体外生化实验和建立3种细胞模型, 探究肉苁蓉苯乙醇苷(PhGs)和光甘草定(Gla)之间是否有协同作用, 并得到发挥协同作用的最佳复配质量比。以期为天然植物护肤品的开发提供理论支持和实践指导, 为推动护肤品行业向更加天然、健康、高效的方向发展提供助力。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

小鼠黑色素瘤细胞 B16F10(货号: STCC20013G-1), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 人永生化角质形成细胞 HaCaT(货号: iCell-h066), 赛百慷(上海)

生物技术股份有限公司。

肉苁蓉苯乙醇苷、光甘草定, 陕西天行健生物化工技术有限公司; 酪氨酸酶, 合肥巴斯夫生物科技有限公司; 熊果苷、L-酪氨酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 日本 Tokyo Chemical Industry 公司; 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS), 上海易恩化学技术有限公司; 抗坏血酸 (V_C), 天津市大茂化学试剂厂; 过硫酸钾、无水乙醇, 天津市致远化学试剂有限公司; 氢氧化钠, 成都华邑药用辅料制造有限责任公司; 磷酸氢二钾, 上海山浦化工有限公司; 左旋多巴 (L-DOPA), 上海源叶生物科技有限公司; Cell Counting Kit-8 试剂 (CCK8), 北京希诺因子科技有限公司; 曲拉通 X-100 (Triton X-100)、二甲亚砜 (DMSO)、偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH)、脂多糖 (LPS), 北京索莱宝生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清 (FBS), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 青链霉素混合液, 上海达希尔生物科技有限公司; 人 IL-6 ELISA 试剂盒、人 TNF- α ELISA 试剂盒、人 CAT ELISA 试剂盒, 武汉菲恩生物科技有限公司; 总超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所, 所有试剂均为分析纯。

Multiskan FC 型全波长酶标仪、Heracell 371 型 CO_2 恒温培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; KQ-200VDB 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; DVKW-D-2 型数显电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器厂; DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; KN4006B 型 UVB 紫外辐射仪 (辐照强度 8 mW/cm^2), 徐州市科诺医学仪器设备有限公司。

1.2 方法

首先, 将 PhGs 和 Gla 分别加入磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=6.8) 或体积分数为 50% 乙醇水溶液中, 配成质量浓度为 0.001、0.005、0.025、0.1、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 g/L 的溶液。然后, 将 PhGs 和 Gla 按照 $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla}) = 40 : 1$ 、 $20 : 1$ 、 $10 : 1$ 、 $5 : 1$ 、 $1 : 1$ 、 $1 : 5$ 、 $1 : 10$ 、 $1 : 20$ 、 $1 : 40$ 配成总质量浓度为 0.4 g/L PhGs/Gla 溶液, 分别记为 PhGs/Gla(40 : 1)~PhGs/Gla(1 : 40) 溶液。

1.3 生化实验

1.3.1 酪氨酸酶活性抑制实验

首先, 在 96 孔板中依次加入 50 μL 待测样品溶液、50 μL PBS (pH=6.8)、50 μL 质量浓度 1 g/L 的 L-酪氨酸溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 再加入 50 μL 质量浓度 0.4 g/L (即 200 U/mL) 的酪氨酸酶溶液,

随后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。以熊果苷 (Arb) 为阳性对照, PBS (pH=6.8) 为空白对照, 用酶标仪测定溶液在 490 nm 处的吸光度, 并根据式 (1) 计算体外酪氨酸酶抑制率 (%)。

$$\text{酪氨酸酶抑制率} / \% = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{反应}} - A_{\text{反应对照}}}{A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}}} \right) \right\} \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_{\text{反应}}$ 为含有样品溶液、L-酪氨酸溶液、PBS 和酪氨酸酶溶液的吸光度; $A_{\text{反应对照}}$ 为含有样品溶液、L-酪氨酸溶液和 PBS 溶液的吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为 L-酪氨酸溶液、PBS 溶液和酪氨酸酶溶液的吸光度; $A_{\text{空白对照}}$ 为 L-酪氨酸和 PBS 溶液的吸光度。

1.3.2 DPPH 自由基清除能力测定

首先, 准确称取 0.0197 g (0.05 mmol) 的 DPPH 溶于 250 mL 无水乙醇中, 配成浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 工作液。然后, 将 PhGs 和 Gla 使用体积分数 50% 乙醇分别配成质量浓度为 0.001、0.01、0.1、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 g/L 的 PhGs 乙醇溶液和 Gla 乙醇溶液, V_C 乙醇溶液按同法配制。再后, 将 PhGs 乙醇溶液和 Gla 乙醇溶液按 $m(\text{PhGs 溶液}) : m(\text{Gla 溶液}) = 40 : 1$ 、 $20 : 1$ 、 $10 : 1$ 、 $5 : 1$ 、 $1 : 1$ 、 $1 : 5$ 、 $1 : 10$ 、 $1 : 20$ 、 $1 : 40$ 混合均匀, 得到 9 种复配质量比的 PhGs/Gla 乙醇溶液, 分别记为 PhGs/Gla(40 : 1)~PhGs/Gla(1 : 40) 乙醇溶液。最后, 在 96 孔板中加入 100 μL 不同样液和 100 μL 的 DPPH 工作液, 混合均匀后, 在室温下避光 30 min, 用酶标仪测定其在 517 nm 处的吸光度。以 V_C 为阳性对照, 每个实验重复 3 次。根据式 (2) 计算 DPPH 自由基清除率 (%)。

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = \left\{ 1 - \left(\frac{A_1 - A_3}{A_2} \right) \right\} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为样品溶液+DPPH 工作液的吸光度; A_2 为体积分数 50% 乙醇+DPPH 工作液的吸光度; A_3 为样品溶液+体积分数 50% 乙醇的吸光度。

1.3.3 ABTS⁺ 自由基清除能力测定

首先, 称取 1 g (1.82 mmol) 的 ABTS 溶于去离子水中配成终浓度为 7.4 mmol/L 的 ABTS 工作液; 称取 0.5 g 过硫酸钾溶于去离子水中配成终浓度为 2.6 mmol/L 的过硫酸钾工作液; 将 ABTS 工作液和过硫酸钾工作液等体积混匀, 避光反应 12 h, 制得 ABTS⁺ 工作液。然后, 按照 1.3.2 节方法, 配制 PhGs 乙醇溶液、Gla 乙醇溶液和 V_C 乙醇溶液, 以及 PhGs/Gla(40 : 1)~PhGs/Gla(1 : 40) 乙醇溶液。最后, 在 96 孔板中加入 40 μL 不同样液和 160 μL 的 ABTS⁺ 工作液, 混合均匀后, 室温下避光反应 6 min, 用酶标仪测定溶液在 734 nm 处的吸光度。根据式 (3) 计算 ABTS⁺ 自由基清除率 (%)。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}/\% = \left\{ 1 - \left(\frac{A_1 - A_3}{A_2} \right) \right\} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_1 为样品溶液+ABTS⁺工作液的吸光度; A_2 为去离子水+ABTS⁺工作液的吸光度; A_3 为样品溶液+去离子水的吸光度。

1.4 细胞实验

1.4.1 细胞培养

待 B16F10 和 HaCaT 细胞复苏后, 将其接种至 DMEM 高糖培养基(含质量分数 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液)中, 于 37 °C、CO₂ 体积分数 5%、湿度 70% 的培养箱中培养 24 h, 在显微镜下观察细胞生长状况, 根据细胞生长状况进行换液或传代。

1.4.2 实验分组

取对数生长期的 B16F10 和 HaCaT 细胞, 以适当细胞数接种于 96 孔板中, 培养 24 h 使细胞贴壁。用 DMEM 培养基配制不同质量浓度的样品溶液。设置正常组、模型组、PhGs 低剂量(125 μg/mL)组、PhGs 中剂量(250 μg/mL)组、PhGs 高剂量(500 μg/mL)组、Gla 低剂量(6.25 μg/mL)组、Gla 中剂量(12.5 μg/mL)组、Gla 高剂量(25 μg/mL)组和质量浓度 25 μg/mL PhGs/Gla(1:1)组、PhGs/Gla(5:1)组和 PhGs/Gla(10:1)组。

在 UVB 诱导的 B16F10 色素沉着模型中, 模型组细胞加入 30 μL 的 PBS (pH=7.4) 置于 UVB 紫外辐射仪正下方 3 cm 辐射 110 s; 实验组先用 100 μL 不同质量浓度样品溶液预处理 1 h 后加入 30 μL 的 PBS 置于 UVB 紫外辐射仪正下方 3 cm 辐射 110 s; 正常组始终使用高糖 DMEM 培养基; 空白组不接种细胞, 代之等量培养基。

在 LPS 诱导的 HaCaT 细胞炎症模型中, 模型组用质量浓度为 20 μg/mL 的 LPS 的 PBS 溶液培养 24 h; 实验组先用 100 μL 不同质量浓度样品溶液预处理 24 h 后加入 20 μg/mL 的 LPS 溶液培养 24 h; 正常组始终使用 DMEM 高糖培养基; 空白组不接种细胞, 代之等量培养基。

在 AAPH 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激模型中, 模型组用 100 mL 浓度为 25 mmol/L 的 AAPH (2.5 mmol) 溶液培养 24 h; 实验组用 100 μL 不同质量浓度的样品溶液预处理 24 h 后加入浓度为 25 mmol/L 的 AAPH 溶液培养 24 h; 正常组始终使用 DMEM 高糖培养基; 空白组不接种细胞, 代之等量培养基。

以上每组设置 3 个复孔, 置于 37 °C、CO₂ 体积分数 5%、湿度 70% 的培养箱中培养。

1.4.3 细胞毒性测定

采用 CCK8 法测定细胞毒性。取对数生长期的 B16F10、HaCaT 细胞, 使用质量分数 0.25% 胰酶消化 3 min, 培养基终止消化后反复吹打, 制成密度

1×10⁴ 个/mL 的细胞悬液, 将细胞均匀接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 细胞周边的孔加 PBS。待细胞贴壁后, 加入不同质量浓度的样液, 每组 3 个复孔, 置于温度 37 °C、CO₂ 体积分数 5%、湿度 70% 的培养箱中培养 24、48、72 h 后弃液。所有组均加入含有体积分数 10% 的 CCK8 DMEM 高糖培养基 100 μL, 继续孵育 60 min。用酶标仪测定溶液在 450 nm 处的吸光度。根据式 (4) 计算细胞活力 (%)。

$$\text{细胞活力}/\% = \frac{A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}}{A_0 - A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (4)$$

式中: $A_{\text{加药}}$ 为含有细胞、CCK8 溶液和样品溶液的孔的吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为含有培养基和 CCK8 溶液、不含细胞的孔的吸光度; A_0 为含有细胞、CCK8 溶液、不含样品溶液孔的吸光度。

1.4.4 酪氨酸酶活性测定

采用 L-DOPA 法测定酪氨酸酶活性。按 1.4.2 节方法处理细胞 48 h 后, 弃上清液, 用 PBS (pH=7.4) 洗 2 次, 每孔加入质量分数 1% 的 Triton X-100 溶液 50 μL, 迅速放入 -80 °C 冰箱冻存 30 min, 室温融化, 使细胞破裂, 于 37 °C 预温 5 min, 每孔加入浓度 10 mmol/L 的 L-DOPA 溶液 10 μL, 于 37 °C、CO₂ 体积分数 5%、湿度 70% 的培养箱放置 1 h, 用酶标仪测定溶液在 475 nm 处的吸光度, 实验重复 3 次。根据式 (5) 计算酪氨酸酶活性 (%)。

$$\text{酪氨酸酶活性或黑色素含量}/\% = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100 \quad (5)$$

式中: $A_{\text{实验组}}$ 为 UVB 照射下, 含有细胞和样品溶液的孔的吸光度; $A_{\text{正常组}}$ 为未经 UVB 照射, 含有细胞和样品溶液的孔的吸光度; $A_{\text{空白组}}$ 为含有培养基而没有细胞的孔的吸光度。

1.4.5 黑色素含量测定

采用 NaOH 裂解法测定黑色素含量。按 1.4.2 节方法处理细胞 72 h 后, 弃上清液, 用 PBS 洗 2 次, 加入 100 μL 含体积分数 10% DMSO 的 NaOH 水溶液(浓度为 1 mol/L), 于 90 °C 烘箱放置 1 h 后, 用酶标仪测定溶液在 490 nm 处的吸光度, 实验重复 3 次。根据式 (5) 计算黑色素含量 (%)。

1.5 炎症因子含量和氧化应激指标测定

按 1.4.2 节方法处理细胞 48 h 后, 用细胞刮刀收集各组 HaCaT 细胞, 离心, 收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6、TNF-α 含量。

按 1.4.2 节方法处理细胞 48 h 后, 用细胞刮刀收集各组 HaCaT 细胞, 反复冻融使细胞破碎, 并在 4 °C 下以 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书测定 SOD 活力和 CAT 含量。

1.6 联合指数测定

利用联合指数 (CI) 法^[20]判断 PhGs 和 Gla 按

不同质量比复配在抑制酪氨酸酶活性和抗氧化方面是否具有协同增效作用。联合指数按公式(6)计算。

$$CI = \frac{D_1}{DX_1} + \frac{D_2}{DX_2} \quad (6)$$

式中: D_1 、 D_2 分别为复配处理时, 活性达到 $x\%$ 时两种药物各自的质量浓度 (g/L); DX 为两种物质单独使用时, 活性达到 $x\%$ 所需的质量浓度 (g/L)。采用 Compusyn 软件进行计算, $CI > 1$ 表示具有拮抗效果, $CI = 1$ 表示具有相加效果, $CI < 1$ 表示具有协同效果。

1.7 数据分析

所有数据均以“算数平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)”表示, 讨论时使用平均值。采用 Graph Prism 9.5.0 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 PhGs、Gla 及复配物对酪氨酸酶活性的影响

图 1 为 PhGs PBS 溶液、Gla PBS 溶液和 PhGs/Gla PBS 溶液对酪氨酸酶活性的抑制作用。

从图 1a 可以看出, PhGs PBS 溶液、Gla PBS 溶液和 Arb PBS 溶液抑制酪氨酸酶活性的半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 (2.192 ± 0.038) g/L、 (1.376 ± 0.025) 和 (0.101 ± 0.003) $\mu\text{g/mL}$, 抑制酪氨酸酶活性的强弱顺序为 $\text{Arb} > \text{Gla} > \text{PhGs}$ 。

从图 1b 可以看出, 当质量浓度为 0.4 g/L 时, PhGs/Gla(10:1)、PhGs/Gla(5:1)和 PhGs/Gla(1:1) PBS 溶液对酪氨酸酶抑制率分别为 88.06%、92.93% 和 94.37%, 后两者高于同质量浓度的单一组分 (PhGs PBS 溶液和 Gla PBS 溶液) 的酪氨酸酶抑制率 (36.92% 和 92.71%), 且 PhGs/Gla(1:1) PBS 溶液的抑制率与阳性对照 Arb 相当。经计算, PhGs/Gla(1:5)~PhGs/Gla(1:40) PBS 溶液的 $CI > 1$; PhGs/Gla(40:1)~PhGs/Gla(1:1) PBS 溶液的 $CI < 1$ 。表明 $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla}) = 40 : 1$ 、 $20 : 1$ 、 $10 : 1$ 、 $5 : 1$ 、 $1 : 1$ 时, 两者具有很好的协同增效作用。

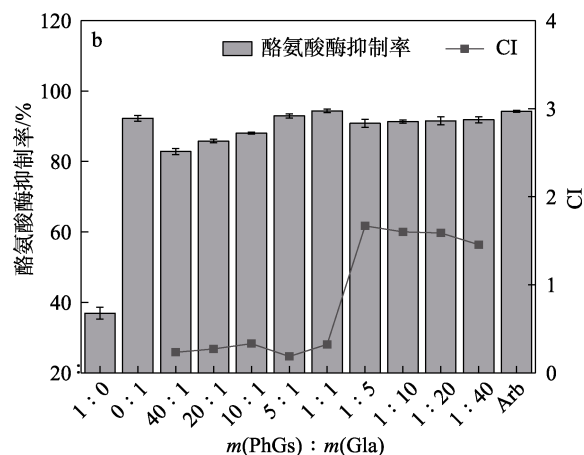
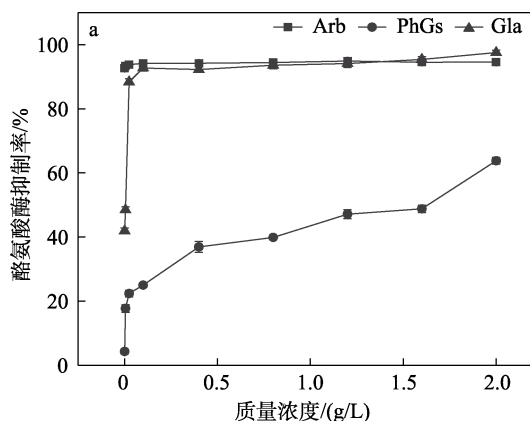
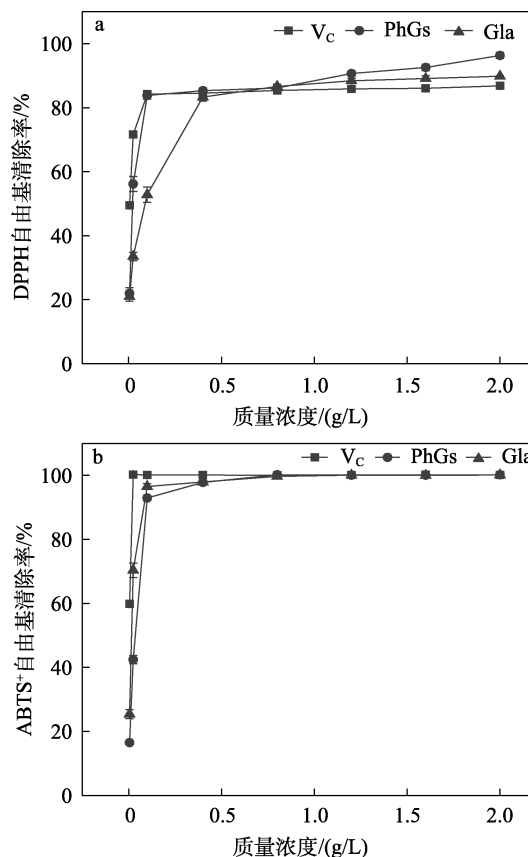


图 1 不同质量浓度 PhGs PBS 溶液、Gla PBS 溶液 (a) 和质量浓度为 0.4 g/L 的 PhGs PBS 溶液、Gla PBS 溶液、PhGs/Gla PBS 溶液 (b) 对酪氨酸酶的抑制作用和 CI 值
Fig. 1 Inhibition of tyrosinase by PhGs PBS solutions with different mass concentrations, Gla PBS solution (a) and PhGs PBS solution, Gla PBS solution and PhGs/Gla PBS solution with a mass concentration of 0.4 g/L (b) and CI value

2.2 PhGs、Gla 及复配物对清除自由基的影响

图 2 为 PhGs 乙醇溶液、Gla 乙醇溶液和 PhGs/Gla 乙醇溶液对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除能力。

从图 2a 可以看出, PhGs、Gla 和 V_C 对 DPPH 自由基的 IC_{50} 分别为 (21.135 ± 1.164) 、 (55.537 ± 5.230) 、 (2.852 ± 0.252) $\mu\text{g/mL}$, 对 DPPH 自由基清除能力强弱顺序为 $V_C > \text{PhGs} > \text{Gla}$ 。



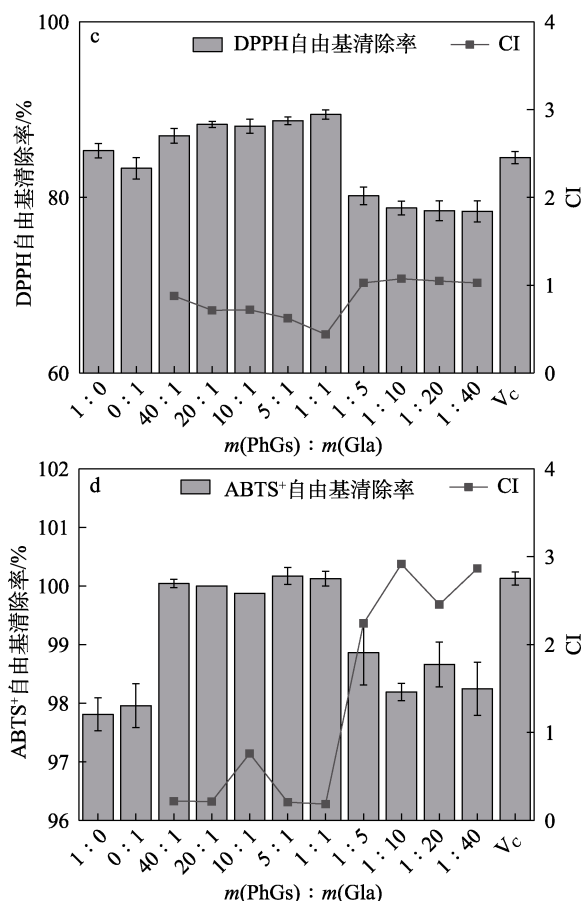


图 2 不同质量浓度 PhGs 乙醇溶液、Gla 乙醇溶液对 DPPH 自由基 (a)、ABTS⁺ 自由基 (b) 的清除率; 质量浓度为 0.4 g/L 的 PhGs 乙醇溶液、Gla 乙醇溶液、PhGs/Gla 乙醇溶液对 DPPH 自由基 (c)、ABTS⁺ 自由基 (d) 的清除率和 CI 值

Fig. 2 Scavenging rate of DPPH free radical (a) and ABTS⁺ free radical (b) by PhGs ethanol solutions and Gla ethanol solutions with different mass concentrations; Scavenging rates and CI values of PhGs ethanol solution, Gla ethanol solution and PhGs/Gla ethanol solution with a mass concentration of 0.4 g/L on DPPH free radical (c) and ABTS⁺ free radical (d)

从图 2b 可以看出, PhGs 乙醇溶液、Gla 乙醇溶液和 V_c 乙醇溶液对 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 分别为 (22.709 ± 0.686) 、 (11.677 ± 0.120) 、 (3.237 ± 0.345) $\mu\text{g/mL}$, 对 ABTS⁺ 自由基清除能力强弱顺序为 $V_c > \text{Gla} > \text{PhGs}$ 。

从图 2c 可以看出, 当质量浓度为 0.4 g/L 时, PhGs/Gla(40 : 1)~PhGs/Gla(1 : 1)乙醇溶液对 DPPH 自由基清除率 (87.02%~89.43%) 高于同质量浓度的单一组分 (PhGs 乙醇溶液和 Gla 乙醇溶液) 的清除率 (85.32%和 83.31%), 与阳性对照 V_c 的清除率 (84.54%) 相当。经计算, PhGs/Gla(1 : 5)~ PhGs/Gla(1 : 40) 乙醇溶液的 $CI > 1$, 具有拮抗作用; PhGs/Gla(40 : 1)~PhGs/Gla(1 : 1) 乙醇溶液的 $CI < 1$, 且 DPPH 自由基清除率均 $\geq 85\%$, 具有较强的 DPPH

自由基清除能力。

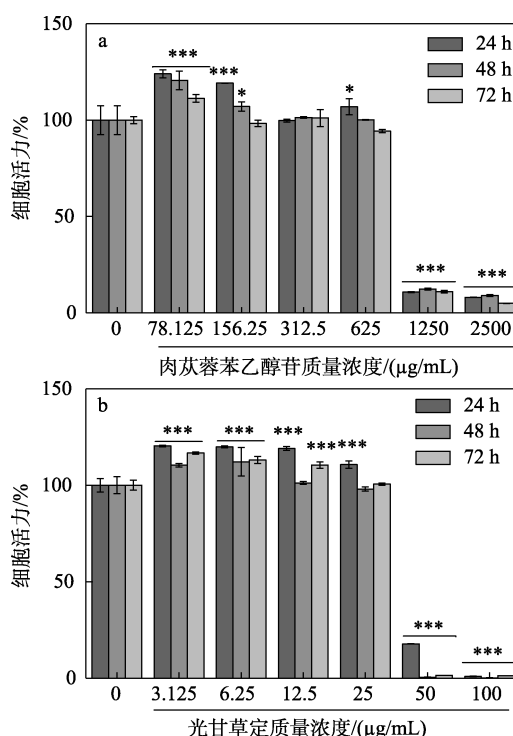
从图 2d 可以看出, 当质量浓度为 0.4 g/L 时, PhGs/Gla(40 : 1)~PhGs/Gla(1 : 1) 乙醇溶液对 ABTS⁺ 自由基清除率 (99.87%~100.13%) 高于同质量浓度的单一组分 (PhGs 乙醇溶液和 Gla 乙醇溶液) 的清除率 (97.81%和 97.96%), 与阳性对照 V_c 的清除率 (99.92%) 相当。经计算, PhGs/Gla(1 : 5)~PhGs/Gla(1 : 40)乙醇溶液的 $CI > 1$, 具有拮抗作用; PhGs/Gla(40 : 1)~PhGs/Gla(1 : 1)乙醇溶液的 $CI < 1$, 具有较强的 ABTS⁺ 自由基清除能力。

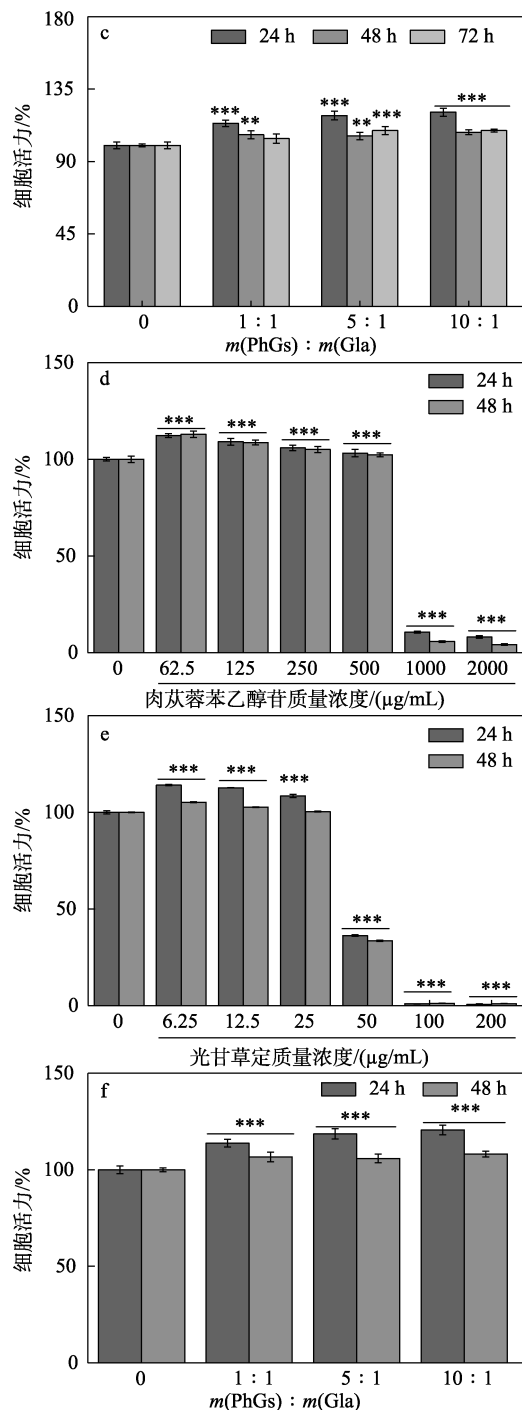
综合 9 种 PhGs/Gla 在抑制酪氨酸酶活性、抗氧化方面具有相对较好的抑制作用和协同效应, 选择 PhGs/Gla(1 : 1)、PhGs/Gla(5 : 1)和 PhGs/Gla(10 : 1) PBS 溶液进行后续细胞实验, 三者对酪氨酸酶抑制率分别为 94.37%、92.93%和 88.06%; 对 DPPH 自由基清除率分别为 89.44%、88.72%和 88.10%; 对 ABTS⁺ 自由基清除率分别为 100.13%、100.01%和 99.87%。

2.3 PhGs、Gla 及复配物对 B16F10、HaCaT 细胞活力的影响

图 3 为 PhGs DMEM 溶液、Gla DMEM 溶液、PhGs/Gla DMEM 溶液对 B16F10 和 HaCaT 细胞活力的影响。

从图 3a~c 可以看出, 质量浓度 78.125~625 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs (图 3a) 和 3.125~25 $\mu\text{g/mL}$ 的 Gla (图 3b) 对 B16F10 细胞未表现出细胞毒性; 质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs/Gla(1 : 1)、PhGs/Gla(5 : 1)、PhGs/Gla(10 : 1) DMEM 溶液未表现出细胞毒性 (图 3c)。





“*”表示数据间有差异 ($P < 0.05$); “**”表示数据间差异显著 ($P < 0.01$); “***”表示数据间差异极显著 ($P < 0.001$), 下同

图 3 PhGs DMEM 溶液 (a)、Gla DMEM 溶液 (b)、质量浓度 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs/Gla DMEM 溶液 (c) 对 B16F10 细胞活力的影响; PhGs DMEM 溶液 (d)、Gla DMEM 溶液 (e)、质量浓度 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs/Gla DMEM 溶液 (f) 对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of PhGs DMEM solutions (a), Gla DMEM solutions (b), PhGs/Gla DMEM solutions with a mass concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ (c) on the viability of B16F10 cells; Effects of PhGs DMEM solutions (d), Gla DMEM solutions (e) and PhGs/Gla DMEM solutions with a mass concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ (f) on the viability of HaCaT cells

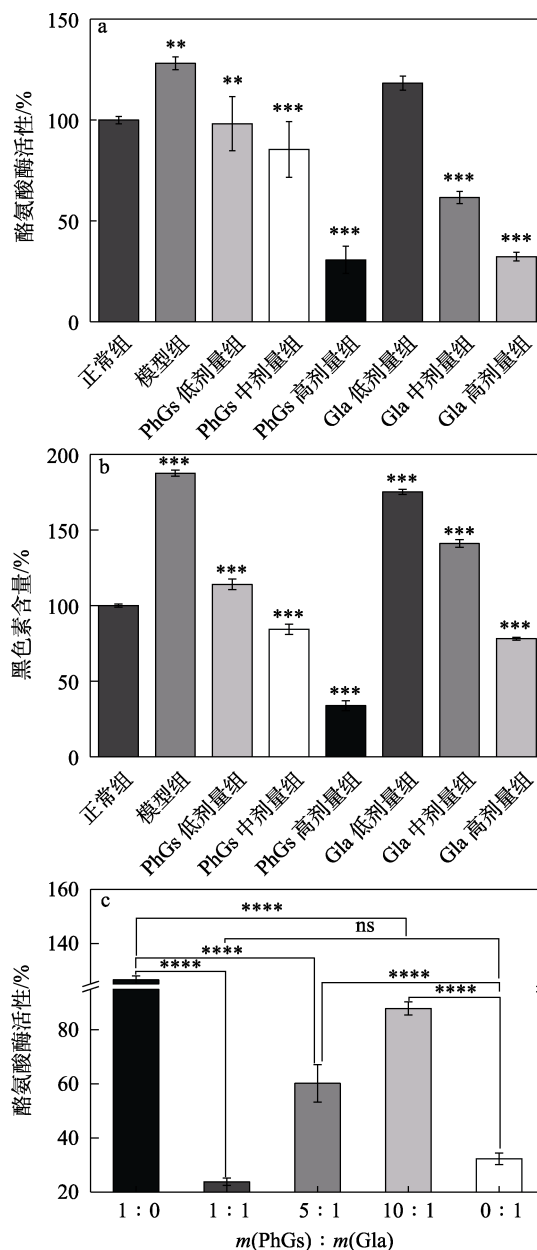
从图 3d~f 可以看出, 质量浓度 62.5~500 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs (图 3d) 和 6.25~25 $\mu\text{g/mL}$ 的 Gla (图 3e) 对 HaCaT 细胞未表现出细胞毒性; 质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs/Gla(1:1)、PhGs/Gla(5:1)、PhGs/Gla(10:1) DMEM 溶液未表现出细胞毒性 (图 3f)。

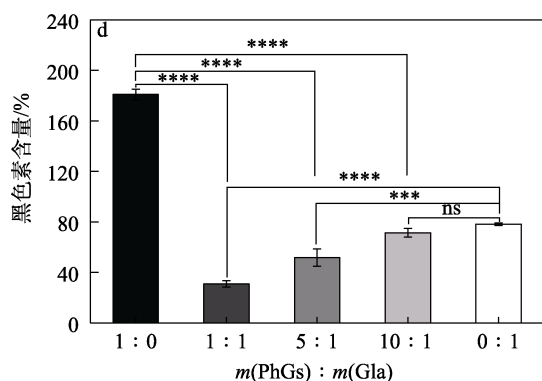
据此, PhGs 选择质量浓度为 125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 作为低、中、高剂量组, Gla 选择质量浓度 6.25、12.5、25 $\mu\text{g/mL}$ 作为低、中、高剂量组, 进行后续实验。

2.4 PhGs、Gla 及复配物对 B16F10 内酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

图 4 为 PhGs DMEM 溶液、Gla DMEM 溶液、PhGs/Gla DMEM 溶液对 B16F10 内酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响。

B16F10 细胞因其易于产生黑色素, 方便观察, 被广泛用作筛选新化合物抗黑色素生成作用的模型^[21]。





“****”表示数据间差异极其显著 ($P < 0.0001$) ; “ns”表示数据间不具有差异性。下同

图4 PhGs DMEM溶液、Gla DMEM溶液对B16F10内酪氨酸酶活性(a)和黑色素含量(b)的影响;质量浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 的PhGs/Gla DMEM溶液对B16F10内酪氨酸酶活性(c)和黑色素含量(d)的影响

Fig. 4 Effects of PhGs DMEM solutions and Gla DMEM solutions on tyrosinase activity (a) and melanin content (b) in B16F10; Effects of PhGs/Gla DMEM solutions with a mass concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ on tyrosinase activity (c) and melanin content (d) in B16F10

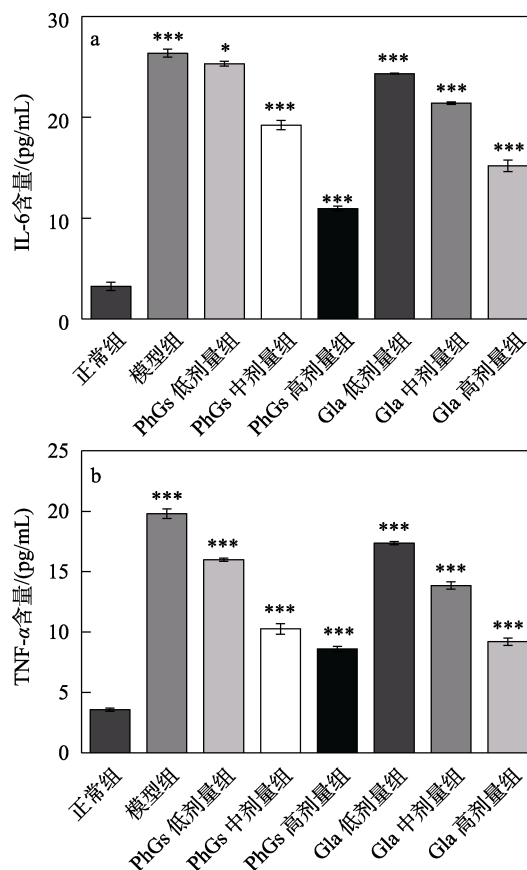
从图4可以看出,与正常组相比,UVB辐射后B16F10细胞中酪氨酸酶活性显著($P < 0.01$)升高,黑色素含量明显增多($P < 0.001$),表明色素沉着模型造模成功。PhGs和Gla治疗以剂量依赖性方式降低酪氨酸酶活性(图4a)和黑色素含量(图4b)($P < 0.01$)。在相同质量浓度条件下,与单一药物相比,PhGs/Gla(1:1)DMEM溶液的酪氨酸酶活性(23.80%)抑制能力更强(图4c),黑色素含量(30.90%)显著下降(图4d),表明PhGs和Gla联合使用能够协同增效。这是因为,PhGs中含有3,4-二羟基基团,可与酪氨酸酶活性中心铜离子螯合,阻止底物结合到酶的活性部位,竞争性抑制酪氨酸酶活性^[22]。Gla是光果甘草中一种特有成分,其结构中B环上的2-OH、4-OH与L-多巴、L-酪氨酸芳环结构上的一OH相似,易于与酶活中心结合而对酶产生抑制^[23-24]。推测协同效应的产生是因为,PhGs和Gla复配后分子间发生了相互作用,从而增加了酚羟基的相对含量;也可能是由于不同抑制成分结合到酶的不同位点,通过共同作用产生协同增效作用,提高了酪氨酸酶活性抑制能力。

2.5 PhGs、Gla及复配物对HaCaT细胞内IL-6、TNF- α 含量的影响

图5为PhGs DMEM溶液、Gla DMEM溶液、PhGs/Gla DMEM溶液对HaCaT细胞内IL-6、TNF- α 含量的影响。

由人角质形成细胞经自发转化分离得来的HaCaT细胞保持了完整的表皮分化特性和非致瘤性,与正常角质形成细胞非常接近,易于培养,是适合皮肤研究的稳定细胞模型^[25-26]。

从图5可以看出,与正常组相比,LPS模型组细胞的IL-6、TNF- α 含量显著增加($P < 0.001$),表明LPS诱导HaCaT细胞炎症模型复制成功。与模型组相比,随着样液质量浓度的提高,PhGs和Gla组的IL-6含量(图5a)、TNF- α 含量(图5b)降低($P < 0.001$)。PhGs/Gla(1:1)DMEM溶液抑制IL-6(图5c)、TNF- α (图5d)释放效果均优于单一药物的抑制作用,抑制能力高低顺序为PhGs/Gla(1:1)DMEM溶液 > PhGs/Gla(5:1)DMEM溶液 > PhGs/Gla(10:1)DMEM溶液。单独PhGs和Gla均以含量依赖性起到抗炎作用,而PhGs与Gla质量浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 时以 $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla}) = 1 : 1$ 、 $10 : 1$ 复配均可以产生抗炎作用。这是因为,PhGs中的酚羟基可以与自由基发生反应,生成相对稳定的酚氧自由基,中断自由基的链式反应,从而减轻氧化应激对细胞的损伤,发挥抗炎作用^[27]。而其中的苯环结构可能通过干扰核因子 κB (NF- κB)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路来降低其活性^[16,28];Gla可以抑制应激活化蛋白激酶(JNK、p38)的磷酸化,从而阻止其激活下游的炎症信号^[29]。



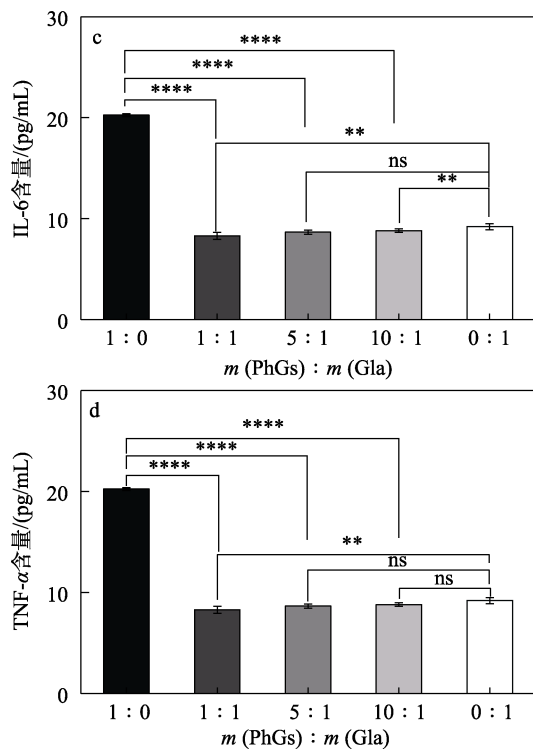


图 5 PhGs DMEM 溶液、Gla DMEM 溶液对 HaCaT 细胞内 IL-6 含量 (a) 和 TNF- α 含量 (b) 的影响; 质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs/Gla DMEM 溶液对 HaCaT 细胞内 IL-6 含量 (c) 和 TNF- α 含量 (d) 的影响

Fig. 5 Effects of PhGs DMEM solutions and Gla DMEM solutions on IL-6 content (a) and TNF- α content (b) in HaCaT cells; Effects of PhGs/Gla DMEM solutions with a mass concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ on IL-6 content (c) and TNF- α content (d) in HaCaT cells

单独使用 PhGs 或 Gla 可能只能部分抑制通路激活相关的炎症介质产生, 而二者联合使用时, 能够在通路的多个环节发挥协同抑制作用, 更有效地降低炎症相关基因的表达。

2.6 PhGs、Gla 及复配物对 HaCaT 细胞内 SOD 活力、CAT 含量的影响

图 6 为 PhGs DMEM 溶液、Gla DMEM 溶液、PhGs/Gla DMEM 溶液对 HaCaT 细胞内 SOD 活力、CAT 含量的影响。

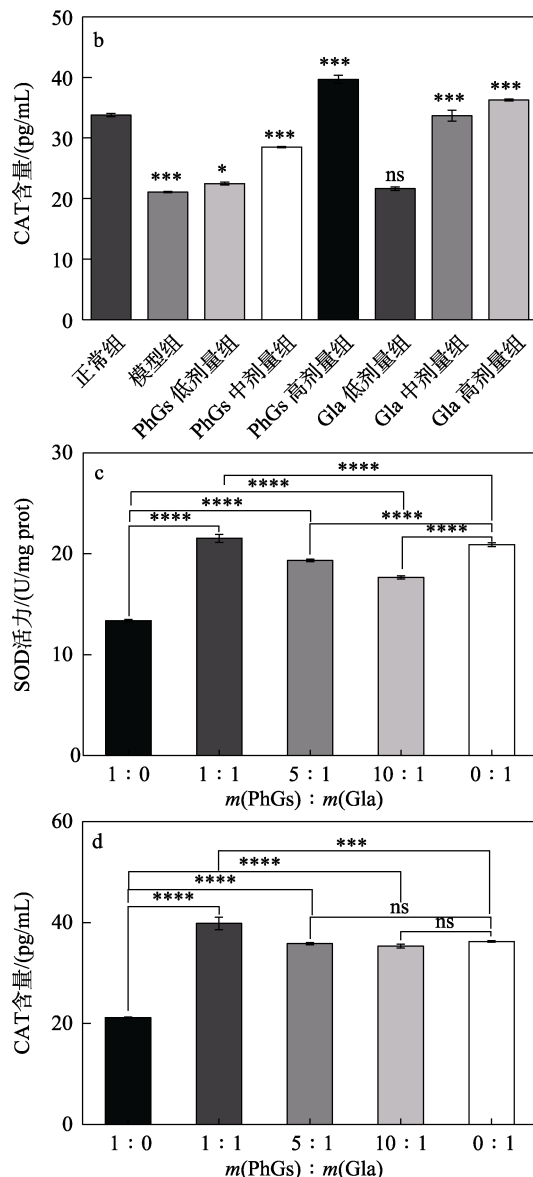
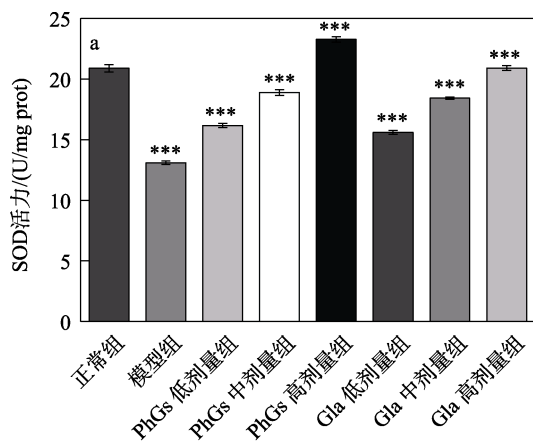


图 6 PhGs DMEM 溶液、Gla DMEM 溶液对 HaCaT 细胞内 SOD 活力 (a) 和 CAT 含量 (b) 的影响; 质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs/Gla DMEM 溶液对 HaCaT 细胞内 SOD 活力 (c) 和 CAT 含量 (d) 的影响

Fig. 6 Effects of PhGs DMEM solutions and Gla DMEM solutions on SOD activity (a) and CAT content (b) in HaCaT cells; Effects of PhGs/Gla DMEM solutions with a mass concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ on SOD activity (c) and CAT content (d) in HaCaT cells

从图 6 可以看出, 与正常组相比, AAPH 模型组细胞的 SOD、CAT 水平显著降低 ($P < 0.001$), 差异具有统计学意义。与模型组相比, 随着样液质量浓度的升高, PhGs 和 Gla 组的 SOD 活力 (图 6a)、CAT 含量 (图 6b) 均有所提高 ($P < 0.001$)。PhGs/Gla(1:1) DMEM 溶液增强 SOD 活力 (图 6c)、CAT 活力 (图 6d) 效果均优于单独 PhGs 或 Gla, 表明 $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla}) = 1 : 1$ 在抗氧化方面具有协

同增效的作用。这是因为, PhGs 结构中的 3,4-二羟基苯乙醇基团和咖啡酰基团是其清除自由基的活性基团。咖啡酰基团中的 α,β -不饱和酯键与苯环形成了共轭结构, 加上咖啡酰和 3,4-二羟基苯乙醇苯环上均有邻二酚羟基结构, 进一步增强了苯乙醇苷的抗氧化作用^[30-31]。而 Gla 不仅具有一OH 基团, 并且占据碳环上 2 和 3 位的双键, 延伸了两个苯环之间的共轭体系, 可以很容易地容纳奇数电子自由基^[32]。由此推测, 复配后 PhGs 与 Gla 发生相互作用或使羟基的数量增加、位置变化, 进而导致协同效应的产生。而不同 $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla})$ 复配影响分子间相互作用, 对羟基的数量和位置产生的影响有差异, 所以抗氧化协同效果有所差异。

皮肤细胞受到紫外线刺激后, 角质形成细胞产生大量的活性氧自由基及炎症因子, 它们可以提高

酪氨酸酶活性, 影响黑素细胞的增殖和分化, 催化黑色素的生成^[33-35]。这些因子能提高黑色素的存活率, 并促进黑色素向邻近的角质形成细胞转运^[36], 如图 7 所示。因此, 在治疗皮肤色素沉着时, 首要抑制黑色素生成的限速酶-酪氨酸酶, 由于自由基和炎症因子广泛参与黑色素的生成、转运和代谢过程, 所以还需采取措施减少自由基和炎症因子的产生, 通过抑制黑色素生成、抗炎和抗氧化, 不仅有助于从源头上控制黑色素的生成, 还能有效阻断黑色素在皮肤组织中的异常分布和沉积。

通过上述生化实验和细胞实验的筛选, $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla}) = 1 : 1$ 制备的 PhGs/Gla(1 : 1) DMEM 溶液可以协同抑制黑色素生成、抗炎和抗氧化, 表明 $m(\text{PhGs}) : m(\text{Gla}) = 1 : 1$ 复配具有全面的协同抗皮肤色素沉着作用。

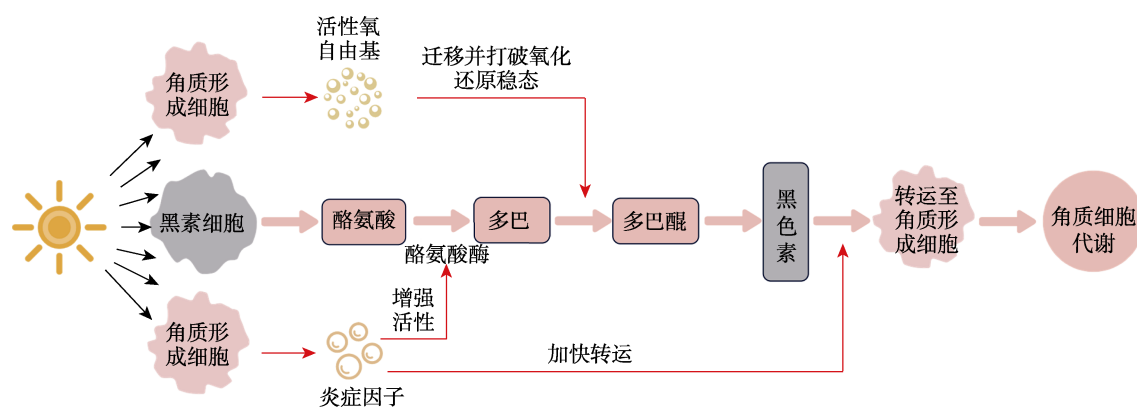


图 7 皮肤色素沉着形成过程示意图

Fig. 7 Skin pigmentation formation process

3 结论

通过生化实验和细胞实验对 PhGs 和 Gla 复配的多维度抗皮肤色素沉着效果进行了探究。

(1) 在抑制酪氨酸酶和抗氧化的生化实验中, PhGs/Gla(1 : 1)、PhGs/Gla(5 : 1)、PhGs/Gla(10 : 1) DMEM 溶液在抑制酪氨酸酶活性、抗氧化方面具有相对较好的抑制作用和协同效应。质量浓度 0.4 g/L 的 PhGs/Gla(1 : 1)、PhGs/Gla(5 : 1)、PhGs/Gla(10 : 1) 溶液对酪氨酸酶抑制率分别为 94.37%、92.93% 和 88.06%; 对 DPPH 自由基清除率分别为 89.44%、88.72% 和 88.10%; 对 ABTS⁺ 自由基清除率分别为 100.01%、100.13% 和 99.87%。

(2) 在色素沉着、炎症和氧化应激的细胞模型中, 质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 PhGs/Gla(1 : 1)、PhGs/Gla(5 : 1)、PhGs/Gla(10 : 1) DMEM 溶液, 未对 B16F10 和 HaCaT 细胞表现出细胞毒性; PhGs/Gla(1 : 1) DMEM 溶液的酪氨酸酶活性抑制能力更强(酪氨酸酶活性 23.80%), 黑色素含量(30.90%)

显著下降; PhGs/Gla(1 : 1) DMEM 溶液抑制 IL-6、TNF- α 释放效果, 以及增强 SOD、CAT 活力的能力表现最佳, 具有复配协同效应。

PhGs 和 Gla 复配通过提亮肤色、抗炎和抗氧化来治疗皮肤色素沉着, 利用协同效应不仅能提升产品的功效, 还能有效降低成本。本文研究结果可以为天然功能性成分的开发利用, 及其在功效性护肤品中的联合应用提供参考。

参考文献:

- [1] NAUTIYAL A, WAIRKAR S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2021, 34(6): 1000-1014.
- [2] YARDMAN-FRANK J M, FISHER D E. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells[J]. *Experimental Dermatology*, 2021, 30(4): 560-571.
- [3] NEAGU N, CONFORTI C, AGOZZINO M, *et al.* Melasma treatment: A systematic review[J]. *Journal of Dermatological Treatment*, 2022, 33(4): 1816-1837.
- [4] HOSSAIN M R, ANSARY T M, KOMINE M, *et al.* Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 3970.

- [5] SONG X, NI M T, ZHANG Y, *et al.* Comparing the inhibitory abilities of epigallocatechin-3-gallate and gallic acid against tyrosinase and their combined effects with kojic acid[J]. Food Chemistry, 2021, 349(1): 129172.
- [6] ZOLGHADRI S, BEYGI M, MOHAMMAD T F, *et al.* Targeting tyrosinase in hyperpigmentation: Current status, limitations and future promises[J]. Biochemical Pharmacology, 2023, 212: 115574.
- [7] CICERO A L, DELEVOYE C, GILLES-MARSENS F, *et al.* Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation[J]. Nature Communications, 2015, 6: 7506.
- [8] SERRE C, BUSUTIL V, BOTTO J M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2018, 40(4): 328-347.
- [9] IRFAN M, SHAFEEQ A, SIDDIQ U, *et al.* A mechanistic approach for toxicity and risk assessment of heavy metals, hydroquinone and microorganisms in cosmetic creams[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 433: 128806.
- [10] ZHENG Y, DU X S, ZHANG L, *et al.* Hydroquinone-induced skin irritant reaction could be achieved by activating mast cells via mas-related G protein-coupled receptor X2[J]. Experimental Dermatology, 2023, 32(4): 436-446.
- [11] MENG H, LIU X K, LI J R, *et al.* Bibliometric analysis of the effects of ginseng on skin[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2022, 21(1): 99-107.
- [12] LIU F, QU L K, LI H, *et al.* Advances in biomedical functions of natural whitening substances in the treatment of skin pigmentation diseases[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(11): 2308.
- [13] WANG T T (王婷婷), ZHANG D (张頔), WANG Y J (王宇加), *et al.* Synergistic skin care of *Lonicera japonica* polyphenols and ethanol extract of *Vaccinium vitis-idaea* L.[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(3): 627-637.
- [14] WU Y (吴颖), LIU Q (刘晴), TANG W (唐文), *et al.* Application of complexes of *Salvia miltiorrhiza* volatile oil and dandelion extract in cosmetics[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(3): 562-568.
- [15] CHEN J R (陈君然), ZHU X Y (朱星宇), CUI H Y (崔瀚元), *et al.* Variations of active ingredients and antioxidant activities analysis of *Cistanche deserticola* from different breeds and parts in Xinjiang province[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2024, 45(21): 227-233.
- [16] XIAO L Y, YAO J, MIAO Y Y, *et al.* Tubuloside B, isolated from *Cistanche tubulosa*, a promising agent against M1 macrophage activation via synergistically targeting Mob1 and ERK1/2[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 153: 113414.
- [17] XU H H (许欢欢). Study on the phenylethanoid glycosides of *Herba cistanches* transdermal delivery and inhibitory effects on melanin synthesis in B-induced pigmentation in brown Guinea pig[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University (新疆医科大学), 2020.
- [18] HUANG J (黄洁), XIE C (谢翀), PAN Z (潘志), *et al.* Synergistic whitening, antioxidant and anti-inflammatory activities of glabridin, resveratrol and poldatin complex[J]. Flavour Fragrance Cosmetics (香料香精化妆品), 2024(3): 99-107, 233.
- [19] CHEN S G (陈实功). Orthodox manual of external medicine[M]. Beijing: China Medical Science Press (中医药科技出版社), 2018: 29.
- [20] WANG S Q, ZHU Y Z, ZHENG X B. Study and application of Chou-Talalay method for anti-tumor drug combination[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2013, 30(4): 449-453.
- [21] PILLAIYAR T, MANICKAM M, NAMASIVAYAM V. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors[J]. Journal of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry, 2017, 32(1): 403-425.
- [22] SHU P H, FEI Y Y, LI J P, *et al.* Two new phenylethanoid glycosides from *Ginkgo biloba* leaves and their tyrosinase inhibitory activities[J]. Carbohydrate Research, 2020, 494: 108059.
- [23] DING F R (丁芙蓉), JIA X Y (贾小演), WU X H (吴相欢), *et al.* Chemical composition, antioxidant, enzyme inhibitory and anti-inflammatory activities of *Hedychium flavum* flower[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2024, 36(1): 13-25.
- [24] HU Y (胡义). Molecular mechanisms of the green exreaction, gel design, and antioxidant activity study of *Licorice* flavonoids[D]. Shenzhen: Southern Medical University (南方医科大学), 2024.
- [25] YOSHIZAKI N, FUJII T, MASAKI H, *et al.* Orange peel extract, containing high levels of polymethoxyflavonoid, suppressed UVB-induced COX-2 expression and PGE2 production in HaCaT cells through PPAR- γ activation[J]. Experimental Dermatology, 2014, 23(S1): 18-22.
- [26] TANDEKA M, PIETER S, SONJA S, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Aspalathus linearis* and *Cyclopia* spp. extracts in a UVB/Keratinocyte (HaCaT) model utilising interleukin-1 α accumulation as biomarker[J]. Molecules, 2016, 21(10): 1323.
- [27] MUHTAR E, YLHAM G, TIEMUER A, *et al.* Unraveling the dual anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of acteoside: Computational insights and experimental validation [J]. Chemistry & Biodiversity, 2024, 4: e202401564.
- [28] LIAN J, XU Y S, SHI J, *et al.* Acteoside and isoacteoside alleviate renal dysfunction and inflammation in lipopolysaccharide-induced acute kidney injuries through inhibition of NF- κ B signaling pathway[J]. PLoS One, 2024, 19(5): e0303740.
- [29] PAN C X, LIU X Y, ZHENG Y T, *et al.* The mechanisms of melanogenesis inhibition by glabridin: Molecular docking, PKA/MITF and MAPK/MITF pathways[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(1): 212-222.
- [30] GAO Y (高燕), TAO P (陶培), WANG Y J (王毓杰), *et al.* Molecular mechanism of antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Cistanches Herba* based on network pharmacology[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy (中国现代应用药理学), 2022, 39(17): 2204-2215.
- [31] EMAM M, NEWARY E A S, AATI Y H, *et al.* Anti-alzheimer's potency of rich phenylethanoid glycosides extract from *Marrubium vulgare* L.: *In vitro* and *in silico* studies[J]. Pharmaceutics, 2024, 17(10): 1282.
- [32] RODRÍGUEZ-ARCE E, SALDÍAS M. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 143: 112236.
- [33] VERMA A, ZANOLETTI A, KAREEM K Y, *et al.* Skin protection from solar ultraviolet radiation using natural compounds: A review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2024, 22(1): 273-295.
- [34] ZHONG C, LIANG G T, LI P T, *et al.* Inflammatory response: The target for treating hyperpigmentation during the repair of a burn wound[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1009137.
- [35] HE X X, JIN S L, DAI X X, *et al.* The emerging role of visible light in melanocyte biology and skin pigmentary disorders: Friend or foe?[J]. Journal of Clinical Medicine, 2023, 12(23): 7488.
- [36] NAKANO S, ABE Y, NAKAJIMA K, *et al.* Establishment of a mouse model for post-inflammatory hyperpigmentation[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2021, 34(1): 101-110.