

灵芝提取液延缓皮肤衰老的实验研究

江南, 许晓燕, 魏巍, 余梦瑶, 罗霞*

(四川省中医药科学院, 中药细胞与分子生物学实验室, 成都 610041)

摘要: 目的 观察灵芝提取液延缓 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠皮肤衰老的作用。方法 以 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠为模型, 同时背部涂抹灵芝提取液, 治疗 42 d 后, 测定小鼠背部皮肤组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量、脂褐质(LF)含量、羟脯氨酸含量。结果 灵芝提取液低、中、高剂量均能不同程度提高皮肤中 SOD 活力, 降低 MDA 含量, 减少 LF 含量, 提高小鼠皮肤中羟脯氨酸的含量($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且具有明显的量效关系。结论 灵芝提取液具有延缓 D-半乳糖所致衰老小鼠的皮肤衰老作用。

关键词: 灵芝提取液; D-半乳糖; 皮肤衰老; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 脂褐质; 胶原蛋白

中图分类号: Q417; Q95-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2016)04-0585-03

Ganoderma lucidum Extract can Resist Skin Tissue Senility

JIANG Nan, XU Xiaoyan, WEI Wei, YU Mengyao, LUO Xia*

(Sichuan Academy of Chinese Medicine Science, Cellular and Molecular Lab, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of *Ganoderma lucidum* extract on resisting the skin tissue senility of D-galactose caused mice subacute senility. **Methods** The mice models with D-galactose caused subacute senility were smeared with *G. lucidum* extract on their backs. The contents of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), lipofuscin (LF) and hydroxyproline in the skin tissue homogenates from the mice back were then examined after 42 days. **Results** *G. lucidum* extract could obviously enhance the skin SOD activity of the subacute senile mice, decrease MDA and LF content, and increase the hydroxyproline amount. **Conclusion** *G. lucidum* extract can effectively resist the skin senility of D-galactose caused the mice subacute senility.

Key words: *Ganoderma lucidum* extract; D-galactose; skin senility; superoxide dismutase; malondialdehyde; lipofuscin; collagen

衰老是生物在生命过程中机体的形态、结构和功能逐渐衰退的总现象, 其发生和发展是多因素诱发和多层次变化的综合结果(Kagan, 2002)。皮肤位于体表, 是人体最大的器官, 也是机体最早显现机体衰老的组织。皮肤衰老不仅影响容颜, 还与许多皮肤病有病因学联系, 因此预防和延缓皮肤衰老已成为医学和美容的研究热点(Frolkins, 1999)。

灵芝 *Ganoderma lucidum* 是珍贵的药用真菌, 属于担子菌纲 Basidiomycetes 多孔菌目 Polyporales, 在我国有着悠久的历史。本实验室前期的研究工作获得了四川省农作物品种审定的药用植物品种

“宇泽灵芝”(审定编号: 2015008), 该品种具有明显的抗氧化、清除自由基的功效。本文针对由“宇泽灵芝”提取制备获得的化妆品用灵芝提取液(Q/SAC-MS. 01-2015), 探讨其在延缓皮肤衰老方面的作用, 为灵芝化妆品的进一步应用开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 化妆品用灵芝提取液, 四川省中医药科学院提供(Q/SACMS. 01-2015, 批号: 20150301)。

收稿日期: 2016-05-20 接受日期: 2016-06-08

基金项目: 四川省公益性科研院所基本科研项目“具有抗衰老功效的灵芝化妆品原料的系统研究”(A-2015N-14); 四川省精深加工研究岗位建设项目[批准号: 川农业(2009)75号]; 四川省重大科技计划项目“以川产药材为主要原料的中药相关产品的开发与产业化”(14ZC2234); 四川省科技基础条件平台项目: 四川省农业微生物资源共享平台(中医药院)(15010302); 菌类药材整合式全产业链创新研发服务示范, 四川省科技厅科技服务业示范项目(2016GFW0186); 四川省中医药科学技术研究专项“特色菌类药材化妆品-灵芝雪融霜的开发研究”(2016C006); 四川省“十三五”农作物及畜禽育种攻关项目: 突破性道地药材新品种选育与育种材料创新(16ZC2867)

作者简介: 江南(1976—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究领域为菌类药材开发及应用, E-mail: jnan12@sina.com

* 通信作者 Corresponding author, E-mail: 287748567@qq.com

1.1.2 试验动物 雌性 KM 小鼠 70 只, 体质量 18 ~ 22 g, 由四川省中医药科学院实验动物中心提供[实验动物生产许可证号 SCXK(川)2013-19]。

1.1.3 药品及试剂 D-半乳糖(成都市科龙化工试剂厂, 批号: 2015070501); 维生素 E(汤臣倍健, 批号: 20141204E); 总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(南京建成生物工程公司, 批号: 20150627); 丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物工程公司, 批号: 20150624); 羟脯氨酸测试盒(南京建成生物工程公司, 批号: 20150519); 脂褐质(LF)ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物, 批号: 20150701A)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模及给药 60 只 KM 小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只: 正常衰老组、衰老模型组、阳性药(维 E)组、灵芝低剂量组、灵芝中剂量组、灵芝高剂量组。适应性饲养后进行实验。除正常衰老组每日颈背部皮下注射 0.3 mL 生理盐水外, 其余各组每日颈背部皮下注射 5% D-半乳糖 0.3 mL, 连续注射给药 42 d(丁玉琴, 周红梅, 2005)。实验前用脱毛剂将小鼠背部双肩胛之间皮肤脱毛 3 cm × 3 cm。正常衰老组、衰老模型组每日背部涂抹生理盐水 20 μL, 阳性药(维 E)组每日背部涂抹 20% 维 E 50 μL, 灵芝低、中、高剂量组每日背部分别以 10%、20%、40% 浓度的灵芝提取液 50 μL 涂抹。涂抹后, 保鲜膜保护 0.5 h, 连续涂抹 42 d。

1.2.2 标本取材方法 使用高瑞英等(2010)的方法, 实验第 43 天颈椎脱臼处死各组小鼠, 同时处死 6 ~ 8 周龄青年小鼠 10 只, 均取背部脱毛后皮肤组织块约 0.5 g, 经预冷生理盐水漂洗, 除去皮下脂肪和其他结缔组织, 滤纸拭干, 称定质量, 皮肤组织块剪碎后放入匀浆管中, 加入 9 倍质量的预冷生理盐水制成 10% 组织匀浆(在冰水中进行)备用。

1.2.3 皮肤超氧化物歧化酶活力、MDA 含量测定 参照 T-SOD 试剂盒说明书测定超氧化物歧化酶(SOD)活力。参照 MDA 试剂盒说明书测定 MDA 含量。

1.2.4 皮肤 LF 含量测定 参照 LF 试剂盒说明书测定 LF 含量。

1.2.5 皮肤羟脯氨酸、胶原蛋白含量的测定 取各组小鼠背部皮肤组织, 去除皮下脂肪和结缔组织后, 乙酰干燥后, 称取 80 ~ 100 mg 组织块, 剪碎, 加 6 mol · L⁻¹ HCL 1 mL, 放入磨口试管中加盖, 95 °C

水解 5 h, 参照羟脯氨酸试剂盒说明书测定羟脯氨酸含量。样品中胶原蛋白的含量用胶原蛋白中羟脯氨酸含量除以 13% 进行计算(邵邻相, 赵铁军, 2003)。

1.3 统计学分析

实验的详细数据用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 实验数据以平均值 ± 标准差表示, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 灵芝提取液对小鼠皮肤中 SOD 活力、MDA 含量、LF 含量的影响

与青年小鼠组比较, 正常衰老组小鼠皮肤中的 MDA 含量升高($P < 0.05$), LF 含量增加($P < 0.01$), 说明随着正常的生长发育, 小鼠皮肤出现了老化现象。而与正常衰老组比较, D-半乳糖造成的衰老模型小鼠皮肤中的 SOD 活力明显下降($P < 0.01$), MDA 含量显著升高($P < 0.01$), LF 含量提高($P < 0.05$), 说明通过连续大剂量给小鼠注射 D-半乳糖, 造成了稳定的衰老模型。在此衰老模型基础上, 给予小鼠阳性药(维 E)和不同剂量的灵芝提取液涂抹, 均能不同程度提高皮肤中的 SOD 活力, 降低 MDA 含量, 减少 LF 含量($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且灵芝提取液具有明显的量效关系(表 1)。

表 1 灵芝提取液对小鼠皮肤中超氧化物歧化酶活力、丙二醛含量、脂褐质含量的影响

Table 1 Effect of *Ganoderma lucidum* extract on the activity of superoxyde dismutase, the content of malondialdehyde and lipofuscin in skin tissue of mice

组别	超氧化物歧化酶活力/(U/mgprot)	丙二醛含量/(nmol/mgprot)	脂褐质含量/(ng · mL ⁻¹)
青年小鼠组	78.72 ± 10.54	2.68 ± 0.77*	2.25 ± 0.72**
正常衰老组	74.27 ± 5.66	3.48 ± 0.75	3.51 ± 0.40
衰老模型组	52.19 ± 7.43**	5.22 ± 0.78**	4.00 ± 0.37*
阳性药(维 E)组	69.05 ± 6.56 ^{##}	1.97 ± 0.61 ^{##}	2.83 ± 0.52 ^{##}
灵芝低剂量组	55.59 ± 6.32	3.00 ± 0.87 ^{##}	3.13 ± 0.78 [#]
灵芝中剂量组	62.99 ± 5.45 ^{##}	2.94 ± 0.68 ^{##}	2.83 ± 0.68 ^{##}
灵芝高剂量组	68.13 ± 3.50 ^{##}	2.74 ± 0.68 ^{##}	2.59 ± 0.63 ^{##}

注: 与正常衰老组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与衰老模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 下同。

Notes: compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; the same below.

2.2 灵芝提取液对小鼠皮肤中羟脯氨酸、胶原蛋白含量的影响

与青年小鼠组比较, 正常衰老组小鼠皮肤中的

羟脯氨酸、胶原蛋白含量显著减少($P < 0.01$),说明随着正常生长,小鼠皮肤出现老化现象;而与正常衰老小鼠比较,以 D-半乳糖造成的衰老模型小鼠,皮肤中的胶原蛋白含量明显下降($P < 0.05$)。在此基础上,阳性药(维 E)和高剂量灵芝提取液的涂抹均能提高小鼠皮肤中胶原蛋白的含量($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 灵芝提取液对衰老小鼠皮肤中羟脯氨酸、胶原蛋白含量的影响
Table 2 Effect of *Ganoderma lucidum* extract on the content of hydroxyproline and collagen in skin tissue of mice

组别	羟脯氨酸含量/ ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 组织湿重)	胶原蛋白含量/ ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 组织湿重)
青年小鼠组	45.53 \pm 2.51 ^{**}	339.81 \pm 18.73 ^{**}
正常衰老组	42.14 \pm 2.47	314.46 \pm 18.47
衰老模型组	37.56 \pm 4.07 [*]	280.32 \pm 30.38 [*]
阳性(维 E)组	41.57 \pm 2.08 [#]	310.22 \pm 15.56 [#]
灵芝低剂量组	38.86 \pm 3.00	289.99 \pm 22.40
灵芝中剂量组	40.55 \pm 2.04	302.60 \pm 5.26
灵芝高剂量组	41.40 \pm 2.81 [#]	308.98 \pm 21.00 [#]

3 讨论

皮肤衰老的特征是失去弹性和柔软性,出现皱纹、干燥角化、色素过量沉积等。自由基学说(陈瑾,李荣亨,2004)认为,皮肤衰老是由于年龄增加,体内如 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase)等抗氧化酶活性降低,清除自由基能力下降,自由基在体内大量堆积,引起脂质过氧化终产物 MDA 增多。MDA 与体内一些生物大分子交联形成 Schiff 碱,即 LF。LF 难溶于水,不易被排除,大量堆积于皮肤细胞内出现老年斑。因此,MDA 和 LF 可作为皮肤衰老的评价指标。皮肤是否保持光滑细嫩则主要取决于真皮下的胶原蛋白含量。羟脯氨酸是胶原蛋白的特有氨基酸之一,约占胶原蛋白全部氨基酸残基的 13.4%,是维持胶原蛋白纤维稳定性的重要单元,通常羟脯氨酸的含量随着皮肤衰老而降低,是反映胶原蛋白纤维变化的敏感生化指标。随着衰老的发生发展,自由基大量增加可引起胶原蛋白交联、老化,皮肤失去弹性。

本试验采用 D-半乳糖所致的衰老小鼠模型,试验结果证实,模型小鼠皮肤中的 SOD 活力明显下降($P < 0.01$),MDA 含量显著升高($P < 0.01$),LF 含量增加($P < 0.05$),皮肤中的胶原蛋白含量明显下降($P < 0.05$),说明通过连续大剂量给小鼠注射 D-半乳糖,造成了稳定的衰老小鼠模型。通过连续

涂抹灵芝提取液与阳性药(维 E),均能不同程度提高皮肤中 SOD 活力,降低 MDA 含量,减少 LF 含量($P < 0.01, P < 0.05$),提高皮肤组织中胶原蛋白含量($P < 0.05$),说明灵芝提取液有较强的抗氧化和清除自由基作用,具有营养皮肤、延缓皮肤衰老的功效。

随着全球人口老龄化趋势的发展,抗皮肤衰老化妆品深受产品开发者的重视和消费者的欢迎。添加中药材提取物的抗皮肤衰老化妆品具有功效持久稳定、作用温和、副作用小等优点(胡侃等,2008),因此,研究开发含有中药材提取物的抗皮肤衰老化妆品成为当前国内外化妆品研发的热点之一。《神农本草经》记载灵芝可“久食轻身不老,延年神仙”,中医长期以来将其作为滋补强壮、固本扶正的名贵药材,人体试验研究发现,灵芝具有明显抗衰老、抗氧化作用(王英,2003)。在国家公布的《已使用化妆品原料名称目录(2015 版)》中,灵芝也位列其中。本研究以获得新品种审定的“宇泽灵芝”这一特色菌类药材资源为对象,通过分离提取获得具有抗衰老作用的提取物,为开发抗衰老化妆品新产品打下坚实的基础。而“宇泽灵芝”提取物中的主要抗衰老成分及其作用机制则有待进一步研究。

参考文献:

- 陈瑾,李荣亨. 2004. 衰老的自由基机制[J]. 中国老年学杂志, 24(7): 677-679.
- 丁玉琴,周红梅. 2005. 二至丸样皮肤组织衰老的实验研究[J]. 河南中医, 25(10): 28-30.
- 高瑞英,张秀宇,慕丹,等. 2010. 中草药提取物复配化妆品乳液延缓皮肤衰老实验研究[J]. 医药导报, 29(7): 857-859.
- 胡侃,李向阳,广丰. 2008. 全面解读中草药化妆品市场[J]. 中国化妆品: 行业, 10: 24-31.
- 邵邻相,赵铁军. 2003. 佛手提取液对小鼠皮肤胶原蛋白含量影响的研究[J]. 日用化学工业, 33(3): 157-158.
- 王英. 2003. 灵芝水煎剂对老年大鼠 NO、GSH-Px、LIP 以及免疫功能影响的实验研究[J]. 牡丹江医学学报, 5(24): 6-9.
- Frolkis VV. 1999. Aging, anti-aging, ontogenesis and periods of age development[J]. Gerontology, 45(4): 227.
- Kagan VE, Kisin ER, Kawai K, et al. 2002. Toward mechanism-based antioxidant interventions; lessons from natural antioxidants[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 959: 188-198.