

人参积雪草组合物对抗衰老的协同作用机制研究

张卫红¹, 何一凡², 孟宏², 蒋丽刚³, 兰俐³, 任晗堃¹
(1.太和康美(北京)中医研究院有限公司, 北京, 102401;
2.北京工商大学百雀羚前沿科学研究院, 北京, 100048;
3.百雀羚前沿科学研究院, 上海, 200040)
DOI:10.61369/CDCST.2026020001

摘 要: 探究人参积雪草组合物抵御衰老的作用机制。采用脂多糖(LPS)诱导RAW264.7细胞炎症模型, 比较各提取物对炎症因子(IL-1 α 、IL-6)分泌的影响; 基于人皮肤成纤维细胞(HFF-1)模型, 通过测定光损伤后, 提取物对于细胞活力和ROS自由基的影响, 进而评估产品抗皱功效。结果显示, 在测试浓度为0.156%、0.313%、0.625%时, 人参积雪草组合物能显著抑制炎症因子(IL-1 α 、IL-6), 且效果优于同等浓度的单一提取物($p<0.01$); 在0.313%浓度下, 可有效清除UVA诱导成纤维细胞ROS含量, 且效果优于同等浓度的单一提取物($p<0.01$); 与UVA辐照组相比, 在0.078%浓度下可以显著提升细胞活力($p<0.05$), 其效果优于同等浓度的单一提取物($p<0.01$)。人参积雪草组合物具有抗衰老功效, 且该功能可能通过抑制炎症因子IL-1 α 和IL-6产生的抗炎通路, 以及提升光损伤后细胞活力和降低ROS自由基含量共同实现, 其作用效果优于单一提取物, 说明组合物间存在协同增效的作用。



张卫红

关键词: 组合物; 衰老; 作用机制; 协调增效

作者简介: 张卫红, 硕士, 高级工程师, 太和康美(北京)中医研究院有限公司, 从事特色植物功效原料的研究,
E-mail: zhangweihong@beaut-n-health.com。

皮肤老化包括内源性老化、外源性老化。内源性老化为自然衰老过程, 表现为皮肤变薄、干燥、皱纹形成与松弛; 外源性老化则由空气污染、吸烟、日光照射等因素造成, 以皮肤粗糙、弹性下降为主要特征。其中, 长期紫外线暴露是外源性老化的主要诱因, 约占面部老化的80%, 过量紫外线辐射引发的红肿、色素沉着及皱纹等症状, 即为皮肤光老化^[1-3]。

炎症是对机体物理创伤、有害化学物质等的复杂应激反应, 会引起免疫系统相关细胞的活化, 并产生IL-1 α 和IL-6等^[4]。内源性衰老过程中, 全身低度炎症呈持续升高, 其特征为IL-1、IL-6以及TNF- α 等炎症因子系统性上调^[5-7]。因此降低细胞中炎症因子IL-1 α 和IL-6含量, 是评估皮肤老化的一项重要指标。

氧化平衡的改变是影响皮肤老化另一因素。在内源性老化过程中, 活性氧(ROS)主要通过葡萄糖和线粒体功能障碍产生三磷酸腺苷(ATP)过程中的细胞氧化代谢产生, 而在外源性老化过程中, 紫外线会打破氧化还原平衡, 从而导致皮肤老化。在老化过程中, 氧化应激归因于ROS含量增加以及酶促和非酶保护剂水平的降低。因此, 降低UVA照射后细胞中ROS含量, 从而减少氧化平衡的破化, 是评估抗光老化的另一重要指标^[8]。早衰症患者的人类皮肤成纤维细胞在慢性氧化应激条件下也表现出清除

活性受损^[9]。UVA是导致成纤维细胞的细胞活力下降的主要因素, 它能穿透真皮层, 直接损伤成纤维细胞的DNA, 导致细胞衰老、凋亡^[10]。研究物质具备“抗UVA”能力时, 其细胞活力可维持在较高水平, 能持续合成胶原蛋白等支撑物质, 从根源上减少皱纹产生、维持皮肤紧致。因此, 以成纤维细胞为模型, 研究物质在UVA照射下对细胞中ROS含量和细胞活力的影响, 从而评估该物质对紫外损伤的抵御作用。

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.), 为五加科植物的干燥根和根茎, 位列“中华九大仙草”, 其主要活性成分有人参皂苷、多糖、挥发油及氨基酸等^[11], 其中人参皂苷是核心活性成分。人参中含有多种人参皂苷单体, 包括Rb1、Rh2、Re、Rf、Rg1、Rg2等^[12], 对于降低细胞内炎症因子以及降低光老化引起的ROS含量均有明显作^[13,14]。

积雪草(*Centella asiatica*(L.)Urb.), 别名雷公根、老虎草, 始载于《神农本草经》, 是传统药用植物之一。其主要成分为三萜类及其苷类、挥发油、黄酮类、生物碱等, 其中三萜类被视作积雪草发挥护肤功效作用的关键成分, 包括积雪草酸、羟基积雪草酸、积雪草苷、羟基积雪草苷^[15-16], 具有抗炎、抗菌、强肌肤基底层细胞的活力等多种功效^[17-18]。

目前, 化妆品中人参、积雪草单一提取物的护肤应

用较多,但以人参、积雪草为原料进行原料组合物之间的功效作用及与单一提取物的作用机制未见研究报道。文章以人参、积雪草组合物为研究对象,采用LPS诱导RAW264.7细胞炎症模型、UV诱导人皮肤成纤维细胞(HFF-1)模型探究人参、积雪草组合后的功效作用机制。

1 实验材料

1.1 主要试剂

人参根,北京仟草中药饮片有限公司;积雪草,北京仟草中药饮片有限公司;95%乙醇,天津鑫竟成酒业销售有限公司;甘油,广州升月进出口贸易有限公司;己二醇,北京仁泰科技有限公司;D101型大孔吸附树脂,天津允开树脂科技有限公司;小鼠巨噬细胞(RAW264.7),中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心;胎牛血清(FBS, Gibco);DMEM高糖培养基(DMEM, Gibco);二甲基亚砷(DMSO, Sigma);磷酸盐缓冲液(PBS, Gibco);噻唑蓝(MTT, Sigma);白细胞介素-6酶联免疫检测试剂盒(Mouse IL-6 ELISA kit, Boster);荧光探针DCFH-DA(Sigma)。

1.2 主要仪器

超净台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司);倒置显微镜(Leica);二氧化碳培养箱(Thermo);电动助吸器(Eppendorf);细胞废液抽取泵(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);酶标仪(Tecan);紫外辐照箱(北京中科博达仪器科技有限公司);流式细胞仪(贝克曼库尔特有限公司)。

2 试验方法

2.1 人参提取物制备

(1)取人参根,粉碎过50目筛(筛下备用);按照一定料液比,纯水回流提取2次,每次提取1h,提取结束后,过滤,合并2次的滤液;

(2)滤液用D101大孔树脂吸附步骤(1)得到的滤液,纯水洗脱后,收集体积分数为60%乙醇水溶液洗脱液,然后将洗脱液浓缩除去乙醇,得到人参提取物浸膏;

(3)按浸膏总质量的5倍加入质量分数为60%甘油水溶液进行复溶处理,过滤后按照精滤液总质量加入2%1,2-己二醇,灭菌处理,得到人参提取物。

2.2 积雪草提取物制备

(1)取积雪草全草,粉碎过50目筛(筛下备用);按照一定料液比,体积分数为40%乙醇水溶液回流提取2次,每次提取2h,提取结束后,过滤,合并2次的滤液;

(2)滤液采用D101大孔树脂吸附步骤(1)得到的滤液,分别采用纯水、不同浓度的乙醇水溶液洗脱,收集体积分数为60%乙醇水溶液洗脱液,然后将洗脱液浓缩除去乙醇,得到积雪草提取物浸膏;

(3)按浸膏总质量的5倍加入质量分数为60%的甘油水溶液进行复溶处理,过滤后按照精滤液总质量加入2%1,2-己二醇,灭菌处理,得到积雪草提取物。

2.3 人参积雪草提取物制备

(1)制备人参提取物浸膏

人参提取物浸膏制备,同2.1章节中的(1)、(2)。

(2)制备积雪草提取物浸膏

积雪草提取物浸膏制备,同2.2章节中的(1)、(2)。

(3)人参积雪草组合物的制备

按8:9(m/m)取步骤(1)和(2)得到的人参提取物浸膏和积雪草提取物浸膏,混合,按总浸膏质量的5倍加入质量分数为60%的甘油水溶液进行复溶处理,过滤后按照精滤液总质量加入2%1,2-己二醇,灭菌处理,得到人参积雪草组合物。

2.4 基于LPS诱导RAW264.7细胞分泌IL-1 α 、IL-6的检测

2.4.1 基于RAW264.7细胞的毒性检测

采用MTT法检测细胞活性,筛选最大安全浓度,具体操作步骤如下:

(1)细胞接种:将细胞接种至96孔板,在37℃、5%CO₂培养箱中孵育18~24h;

(2)试验分组:阴性对照(培养基)、阳性对照(含5%DMSO培养基)和调零孔(PBS)和试验组。试验组每个待测样设置9个浓度梯度,每个梯度3个重复孔;

(3)受试液配制:按表1设计,采用细胞悬液将其配置成一系列体积分数的受试物;

表1 待测样的浓度梯度

样品名称	浓度梯度 /% (v/v)
人参提取物	0.078、0.156、0.0313、0.625、1.25、2.50、5.00、 10.00、20.00
积雪草提取物	
人参积雪草组合物	

(4) 给样：细胞生长18~24h后弃上清，加入含不同浓度受试物的培养基，置于37℃、5%CO₂培养箱继续孵育18~24h；

(5) 检测：弃上清后加入0.5mg/mL无菌过滤MTT轻轻混匀，37℃避光孵育4h。结束后弃上清加150μLDMSO，震荡20min使其溶解，酶标仪测试OD570nm值；

(6) 相对细胞活率计算公式见式(1)：

$$\text{细胞活率} = \frac{\text{试验组OD} - \text{调零孔OD}}{\text{溶剂对照组OD} - \text{调零孔OD}} \times 100\% \quad (1)$$

用t-test 统计分析细胞相对活力，检验标准α=0.05，p<0.05差异具有显著性意义。

2.4.2 炎症因子的检测

将细胞接种至96孔板中，37℃，5%CO₂培养箱孵育过夜；待96孔板中细胞铺板生长24h后，进行分组给样，每个处理组均设3个复孔。组1中，空白对照与阴性对照组均加入含1% DMSO的细胞培养基，阳性对照组加入含0.001%地塞米松的细胞培养基；组2中，空白对照与阴性对照组均加入细胞培养基，样品组加入含有相应浓度样品的细胞培养基；各组处理完后，于37℃、5% CO₂培养箱继续培养24h后，将板内培养基吸出弃去，加入PBS清洗一次，空白对照组加入细胞培养基，阴性对照组、样品组和阳性对照组加入含LPS的细胞培养基，继续置于37℃，5% CO₂培养箱继续培养24h后收集上清液。取各孔细胞上清液，按照ELISA试剂盒操作流程，检测IL-1α、IL-6含量。

2.5 基于UVA辐照 HFF-1细胞 ROS表达的影响

2.5.1 基于 HFF-1细胞的毒性检测

细胞为成纤维细胞模型，其余与2.4.1中细胞毒性测试方法相同。

2.5.2 基于UVA辐照 HFF-1细胞 ROS 表达检测

将细胞接种至6孔板中，37℃、5% CO₂培养箱孵育18~24h。配制受试物和阳性对照进行分组给药。

组1：空白对照与阴性对照加入含0.1% DMSO 培养基，阳性对照加入含0.001% 维生素E培养基；

组2：空白对照与阴性对照加入细胞培养基，样品组加入含相应浓度受试物的培养基。

继续培养24 h后弃去培养基，用预热PBS 洗涤2次，加入1 mL PBS，需照射的组别以30 J/cm² UVA 处理。照射完成后弃去 PBS，再用预热 PBS 洗涤1次，加入DMEM 培养基继续培养2 h。

采用DCFH-DA 探针孵育细胞，收集后通过流式细胞仪检测平均荧光强度(MFI)。

数据采用Excel软件处理与作图，组间差异性分析使用单因素方差分析，以p<0.05作为统计学显著性差异的标准。

2.5.3 基于UVA辐照 HFF-1细胞活力测试

将细胞接种至6孔板中，37℃、5% CO₂培养箱孵育18~24h。试验分对照组、阳性对照组(0.001% 维生素E)及受试组。待细胞达到试验要求后弃去原液，加入含相应浓度药品的培养基(对照组含0.1% DMSO)，继续孵育24 h。加样结束，用预温PBS洗涤两次。照射组接受30 J/cm² UVA照射，达到照射剂量后，随后更换为新鲜DMEM 培养基继续培养18~24h后，通过MTT法检测各组细胞活力测试。

数据采用Excel软件处理与作图，组间差异性分析使用单因素方差分析，以p<0.05作为统计学显著性差异的标准。

细胞相对活力计算，见式(2)。

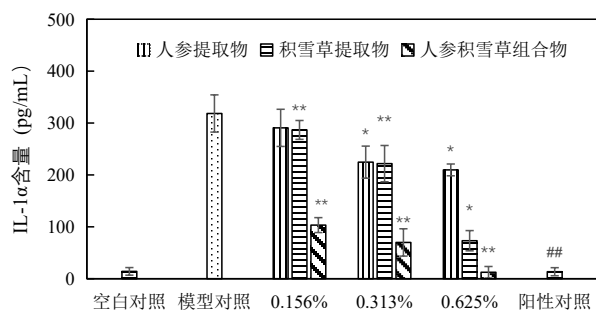
$$\text{细胞相对活力} = \frac{\text{试验组OD} - \text{调零孔OD}}{\text{溶剂对照组OD} - \text{调零孔OD}} \times 100\% \quad (2)$$

3 结果与讨论

3.1 LPS诱导 RAW264.7细胞分泌炎症因子的影响

依据RAW264.7细胞活力(≥85%)及形态特征，确立了0.625%为最高给药浓度，设定3个浓度梯度。作为介导炎症级联与衰老的核心预警因子，IL-1α在LPS刺激下显著升高，证实炎症模型构建有效。如图1所示，人参积雪草组合物在0.156%至0.625%浓度区间内，可显著逆转LPS诱导的IL-1α过表达现象。统计学分析表明，组合物活性

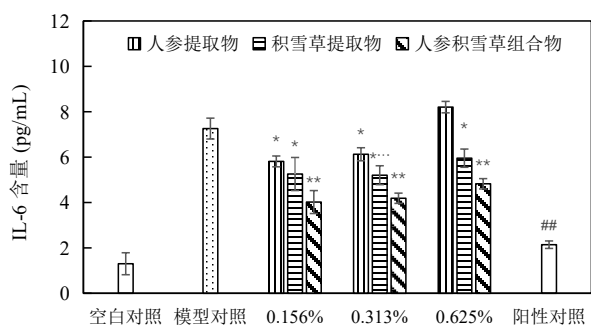
强于同浓度的单一提取物,揭示了人参积雪草组合物在抑制促炎因子分泌中具有协同效应,表现为协同增效关系。



注: **表示差异极显著, $P < 0.01$; *表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图1 炎症因子 IL-1α 分泌的影响

IL-6作为介导免疫应答与衰老的核心促炎因子,生物效应类似于 IL-1β,通过激活下游其他细胞因子的产生,诱发机体特异性、非特异性免疫反应发生,进而诱导衰老。通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞构建炎症模型,IL-6 含量大幅上调证实模型有效。结果如图2所示,表明,人参积雪草组合物在0.156%至0.625%浓度区间内,可显著遏制 IL-6 过表达,且组合物活性抑制作用显著强于同浓度的单一提取物。这一结果说明人参、积雪草组合物间有互补抑制 IL-6 分泌作用,二者组合后为协同增效关系。



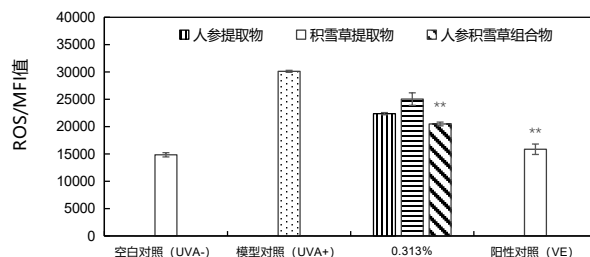
注: **表示差异极显著, $P < 0.01$; *表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图2 样品对炎症因子 IL-6 表达的影响

3.2 基于 UVA 诱导 HFF-1 细胞 ROS 的影响

根据 HFF-1 细胞活力 ($\geq 85\%$) 及形态特征,确立了受试物给药浓度为0.313%。

基于 UVA 诱导人皮肤成纤维细胞 (HFF-1) 模型,通过测定光损伤后,受试物对于细胞 ROS 产生的影响,进而评估其抗氧化功效。如图3所示,与 UVA 辐照组相比,人参积雪草组合物,0.313% 浓度下,可有效清除 UVA 诱导成纤维细胞 ROS 含量,在0.313% 浓度下,其效果优于相同浓度的单提物,证明人参、积雪草两种植物提取物可以起到协同增效的作用。

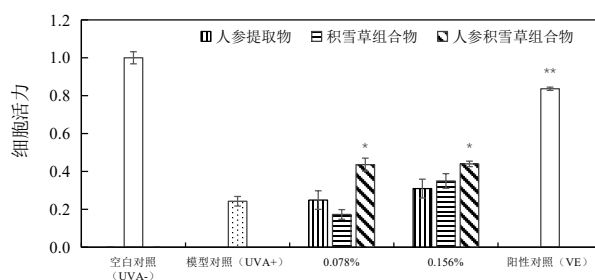


注: **表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

图3 样品对 ROS 表达的影响

3.3 基于 UVA 辐照 HFF-1 细胞活力的影响

基于 UV 诱导人皮肤成纤维细胞 (HFF-1) 模型,检测受试物对细胞活力的影响评估其抗老化作用 (图4)。人参积雪草组合物在0.078% 浓度下可显著提升细胞活力 ($p < 0.05$),其效果优于同浓度的单体物,说明人参和积雪草的组合物对 UVA 辐照 HFF-1 细胞活力的提升具有协同增效的作用。



注: *表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图4 样品对细胞活力的影响

4 结论

人参提取物和积雪草提取物经组合后,可有效抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子 IL-α、IL-6 的过度释放;同时,能够有效清除 UVA 诱导成纤维细胞 ROS,显著提升成纤维细胞的细胞活力 ($p < 0.01$),其作用效果显著优于同等浓度的单一提取物,表明人参、积雪草组合物具有组间协同增效作用。人参积雪草组合物,可以有效降低紫外线引起的皮肤老化损伤,预期应用于抗皱、修护、舒缓类化妆品中,具有较好的应用前景。

参考文献

[1]Shoubing, Zhang, Enkui, et al. Fighting against Skin Aging[J]. Cell Transplantation, 2018, 27(5):729-738.

- [2]Friedman O. Changes associated with the aging face[J]. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.*, 2005, 13:371-380.
- [3]武思敏, 袁梅, 高梓琪, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯在皮肤光老化炎症反应中的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021,7(12):2513-2519.
- [4]李晓敏, 张红霞, 范莹, 等. 芦荟胶抗炎功效研究 [J]. *日用化学工业 (中英文)*, 2022, 52(12):1320-1325.
- [5]Fulop T, Larbi A, Dupuis G, et al. Immunosenescence and Inflamm-Aging as Two Sides of the Same Coin[J]. *Friends or Foes & Front. Immunol*, 2018, 8:1960.
- [6]Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, et al. Immune system, cell senescence, aging and longevity-inflamm-aging reappraised[J]. *Curr. Pharm. Des.*, 2013, 19:1675-1679.
- [7]Chen B, Yang J, Song Y, Zhang D, et al. Skin Immunosenescence and Type 2 Inflammation: A Mini-Review with an Inflammaging Perspective [J]. *Front Cell Dev. Biol.*, 2022, 10:835675.
- [8]Federica Papaccio, Andrea D'Arino, Silvia Caputo. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(6): 1121.
- [9]Yan T, Li S, Jiang X, et al. Altered levels of primary antioxidant enzymes in progeria skin fibroblasts. *Biochem. Biophys Res Commun.*, 1999, 257:163-167.
- [10]Wang J, Yano S, Xie K, Ohata Y, Hara T. Genome-Wide RNA Sequencing Analysis in Human Dermal Fibroblasts Exposed to Low-Dose Ultraviolet A Radiation[J]. *Genes*, 2022, 29,13(6):974-976.
- [11]郭秀丽, 高淑莲. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2012, 14(4): 26-27.
- [12]黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. *中草药*, 2009, 40(1):164-164.
- [13]姜锐, 孙立伟, 赵大庆. 人参美容护肤作用机制及应用研究进展 [J]. *世界科学技术*, 2016, 18(11):1988-1991.
- [14]Xian Chang Sun, Ren X F, Chen L, et al. Glucocorticoid receptor is involved in the neuroprotective effect of ginsenoside Rg1 against inflammation-induced dopaminergic neuronal degeneration in substantia nigra[J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2016, 155(Pt A):94-103.
- [15]项佳媚, 肖伟, 许利嘉, 等. 积雪草的研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2016, 018(002):233-238,258.
- [16]吴琳, 赖维, 刘晨. 积雪草在皮肤美容应用中的研究进展 [C]. *美容医学大会春季年会暨青年学术会议*. 2014.
- [17]翁小香, 黄文武, 孔德云. 积雪草中三萜类成分及其药理活性研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2011, 42(9):709-716.
- [18]严明强, 任娟. 积雪草提取物在个人护理品中的应用 [J]. *香料香精化妆品*, 2009,(6):44-46.

Study on the Synergistic Effect and Mechanism of Herbal Panax Ginseng and Centella Asiatica in Resisting Skin Aging

Zhang Wei-hong¹, He Yi-fan², Meng Hong², Jiang Li-gang³, Lan Li³, Ren Han-kun¹

(1.Beijing Academy of TCM Beauty Supplements Co. Ltd, Beijing 102401;

2.Pechoin global cutting-edge science Institution, Beijing Technology and Business University, Beijing 10048;

3.Shanghai Pechoin Daily Chemical Co., Ltd., Shanghai 200040)

Abstract : To investigate the anti-aging mechanism of a compound comprising Panax ginseng and Centella asiatica. An inflammatory model was established by lipopolysaccharide (LPS) induced RAW264.7 macrophages to compare the effects of various extracts on the secretion of inflammatory factors (IL-1 α , IL-6). Based on a human foreskin fibroblast (HFF-1) model, the anti-wrinkle efficacy was evaluated by measuring cell viability and reactive oxygen species (ROS) levels following ultraviolet A (UVA)-induced photodamage. The results showed that at the tested concentrations of 0.156%, 0.313%, and 0.625%, the Panax ginseng and Centella asiatica compound significantly inhibited the secretion of inflammatory factors (IL-1 α , IL-6), with superior effects compared to individual extracts at equivalent concentrations ($p < 0.01$). At the concentration of 0.313%, the compound effectively reduced ROS levels in UVA-induced fibroblasts, outperforming individual extracts at the same concentration ($p < 0.01$). Compared to the UVA irradiation group, the compound at the concentration of 0.078% significantly enhanced cell viability ($p < 0.05$), with effects superior to those of individual extracts at equivalent concentrations ($p < 0.01$). The Panax ginseng and Centella asiatica compound exhibits anti-aging properties, potentially mediated through an anti-inflammatory pathway involving the inhibition of IL-1 α and IL-6 production, as well as by enhancing cell viability and reducing ROS levels after photodamage. The compound demonstrated synergistic effects, outperforming individual extracts.

Keywords : compound; aging; mechanism; synergistic effect