

白首乌中多糖等活性成分对酪氨酸酶活力的影响

王晓岚, 姚文杰, 苑亮

(江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了探讨白首乌对黑素合成的影响, 从白首乌中提取分离了多糖、C₂₁甾苷及磷脂, 用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定了白首乌含有的多糖、C₂₁甾苷及磷脂对蘑菇酪氨酸酶活力的影响。结果表明白首乌含有的多糖对酪氨酸酶二酚酶活力有显著的抑制作用, IC₅₀ 为 31.8 μg/mL, 多糖是酪氨酸酶的可逆性抑制剂, 抑制类型为竞争性抑制, 磷脂对酪氨酸酶的抑制作用较弱, 而 C₂₁甾苷对酪氨酸酶有激活作用。提示白首乌含有的多糖有可能被用作皮肤增白剂或作为色素沉着抑制剂, 也有可能成为安全有效的食品褐变抑制剂。

关键词: 白首乌; 多糖; 酪氨酸酶; 黑素合成; 抑制作用

中图分类号: R 282.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)10—1097—04

Effect of the Polysaccharides and Other Active Extracts from *Cynanchum auriculatum* on the Activity of Tyrosinase

WANG Xiao-lan, YAO Wen-jie, YUAN Liang

(Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To explore the effect of *Cynanchum auriculatum* on melanin synthesis. The polysaccharides, C₂₁ steroidal glycosides, and phosphatide were extracted and separated from *Cynanchum auriculatum*. The effects of polysaccharides, C₂₁ steroidal glycosides, and phosphatide extracted from *Cynanchum auriculatum* on mushroom tyrosinase activity were detected respectively by measuring the oxidation rate of l-dopa. The results indicated that the soluble polysaccharides of *Cynanchum auriculatum* could inhibit the activity of mushroom tyrosinase obviously and concentration that resulted in 50% activity lost for diphenol oxidase activity was 31.8 μg/mL. The polysaccharides from *Cynanchum auriculatum* was a reversible competitive inhibitor for the oxidation of l-dopa. The phosphatide extracted from *Cynanchum auriculatum* had weak inhibitory effect on activity of mushroom tyrosinase while the C₂₁ steroidal glycosides had activation effect on the tyrosinase. The results suggest that polysaccharides of *Cynanchum auriculatum* might be used as a skin whitening agent or as a hyperpigmentation inhibitor. It also have the potential to be further developed into a safe and effective food browning inhibition agent.

Keywords: *Cynanchum auriculatum*, polysaccharides, tyrosinase, melanin synthesis, inhibition

收稿日期: 2013-07-15

基金项目: 江南大学科研项目(210000-01205028)。

作者简介: 王晓岚(1962—), 女, 江苏无锡人, 医学博士, 副教授, 主要从事中药药理学及功能性食品研究。

E-mail: wangxl@jiangnan.edu.cn

酪氨酸酶是一种含铜的多酚氧化酶,它是生物体黑素合成过程中的限速酶,催化酪氨酸羟化为多巴、多巴氧化为多巴醌以及5,6-二羟基吲哚(DHI)氧化为5,6-吲哚醌3个步骤。其表达和活性决定着黑色素生成的量和速度^[1]。反应过强可引起黑素过多症,如雀斑、黄褐斑等,黑色素生成过多是黄褐斑形成的根本原因^[2];反应过弱或缺乏反应,则可引发白发、白癜风等。它的活性决定着黑色素的合成及合成量的多少,控制其活力即可控制黑色素的生成量。

滨海白首乌(文中简称白首乌)是萝藦科(Asclepiadaceae)马利筋亚科(Asclepioideae)鹅绒藤属(*Cynanchum linn*)植物耳叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight)的块根,在江苏省滨海县广泛种植和食用,是临床常用的补益和抗衰老中药,自古以来就被视为摄生防老、益精养颜的珍品^[3],至今种植地的人们用它外涂去除皮肤色斑。现代研究发现白首乌中含有多种活性成分,如C₂₁甾苷、多糖、磷脂等。作者将分别检测这些成分对酪氨酸酶活力的影响,从而探讨白首乌影响黑素合成的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白首乌药材为江苏省盐城市首乌科技发展有限公司惠赠,并经该公司高级工程师孙春诗鉴定。药材于通风、干燥、避光处保存。蘑菇酪氨酸酶(EC. 1.14.18.1,比活力为5370 U/mg)及左旋多巴(1-dopa)均为Sigma公司产品。

1.2 仪器设备

R-201型旋转蒸发仪,上海申顺生物科技有限公司产品;AL 104型电子分析天平,梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司制造;Muitiskan MK3多功能酶标仪,上海雷勃分析仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 C₂₁甾苷提取 参照文献[3]称取白首乌粉末500 g,加入1.5 L 95%乙醇加热回流3 h,过滤得到醇提液。滤渣再经乙醇提取两次。提取液经减压浓缩,室温挥发溶剂后,得到醇提物。将此提取物溶于甲醇水溶液(v:v=9:1)中,用石油醚振摇脱脂3次,萃余液加适量的蒸馏水减压浓缩回收甲醇,以氯仿进行多次萃取。将氯仿萃取液合并,浓缩至小体积后滴加于5倍石油醚中,搅拌分散,析出沉淀物,经

过滤干燥得总甾苷10.67 g。

1.3.2 多糖提取 参照文献[4]白首乌粉20 g经多次乙醇提取后,取残渣风干,按照料液比1:20进行沸水浸提,提取液用 α -淀粉酶、糖化酶去淀粉,用木瓜蛋白酶及Sevag试剂(氯仿:正丁醇为5:1)去除蛋白质,上清液浓缩至一定体积,加入乙醇沉淀,经离心分离沉淀后,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,真空干燥得白首乌多糖1.39 g。

1.3.3 磷脂提取 参考文献[5-6],白首乌粉200 g用Folch试剂(v(氯仿):v(甲醇)=2:1)800 mL经回流4 h,过滤后滤渣重复提取两次,提取液浓缩至干,并用适量氯仿溶解,经5倍石油醚沉淀甾体类化合物,离心分离得到的上清液通过减压浓缩挥发溶剂后,得到总磷脂2.96 mg。

1.3.4 3种提取物影响酪氨酸酶活力分析方法 取适量总甾苷、多糖、总磷脂分别用溶剂(丙二醇:乙酸乙酯:磷酸盐缓冲液体积比=9:1:18)溶解配制成浓度为1 mg/mL的溶液(多糖则用磷酸盐缓冲液溶解配制,3种提取物在反应体系的终浓度为0.2 mg/mL),通过酶促反应检测其对酪氨酸酶二酚酶活力的影响。取待测物溶液50 μ L,并用pH 6.8磷酸盐缓冲液适量稀释至140 μ L与酪氨酸酶液(25 U/mL)50 μ L混合,于37 $^{\circ}$ C孵育5 min,加入15 mmol/L的1-dopa溶液60 μ L,继续孵育2 min,立即于酶标仪492 nm处测光吸收值。酪氨酸酶抑制率按以下公式计算^[7-8]:

$$\text{酶抑制率}(\%) = [(A-B) - (C-D)] / (A-B) * 100$$

式中:A=A_{492-药+酶};B=A_{492-药-酶};C=A_{492+药+酶};D=A_{492+药-酶}。

1.3.5 多糖对酪氨酸酶抑制作用及机理探讨 把多糖用磷酸盐缓冲液稀释为不同浓度(终浓度分别为0.01、0.02、0.04、0.08、0.12 mg/mL),按上述方法测光吸收值,其光吸收值随时间变化的曲线即多糖抑制酪氨酸酶催化氧化底物的反应进程曲线。酶的终浓度为9.2 μ g/mL,1-dopa溶液的终浓度为3.6 mmol/L。

在含上述浓度的多糖抑制酪氨酸酶测活体系中,确定底物为1-dopa溶液,其用量为60 μ L(终浓度为3.6 mmol/L),加入不同浓度的酪氨酸酶,测定酶活力与酶浓度的关系,通过作图法判断抑制剂的作用机理。

上述浓度的多糖抑制酪氨酸酶测活体系中,确

定酪氨酸酶溶液的用量为 50 μL (终浓度为 9.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),加入不同体积的 l-dopa 溶液,多糖对酪氨酸酶抑制作用类型的测定采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图判断,抑制常数通过直线的斜率和纵轴截距对效应物含量二次作图测定。

2 结果与分析

2.1 白首乌不同提取物对酪氨酸酶活力的影响

由图 1 可知,从白首乌中分离出的 C_{21} 甾苷对酪氨酸酶有激活作用(抑制率为负),多糖对酪氨酸酶有显著的抑制作用,而磷脂对酶的抑制作用较弱。

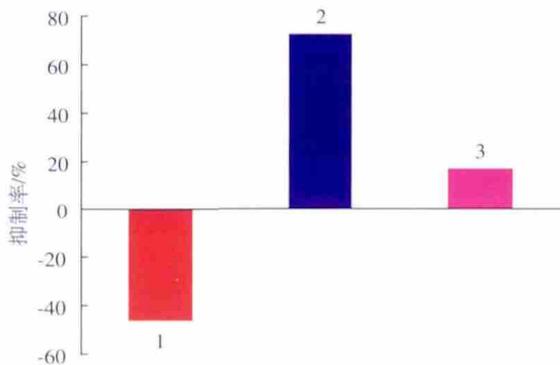


图 1 白首乌 C_{21} 甾苷(1)、多糖(2)、磷脂(3)对酪氨酸酶活力的抑制率

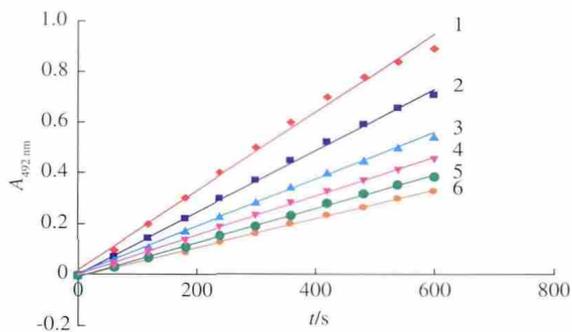
Fig. 1 Inhibition of tyrosinase activity by C_{21} steroidal glycosides (1),soluble polysaccharides (2),and phosphatide(3) from *Cynanchum auriculatum*

2.2 多糖对酪氨酸酶抑制作用及机理

多糖影响酪氨酸酶催化 l-dopa 氧化不存在迟滞过程,酶作用的进程曲线为直线,在反应体系中加入多糖后,直线的斜率随着加入的多糖浓度增大而下降(图 2),说明多糖对酪氨酸酶活力有抑制作用。

多糖对酪氨酸酶活力的浓度效应试验结果见图 3。随着抑制剂浓度的增大,相对酶活力下降,导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度(IC_{50})为 31.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 4 表示酪氨酸酶经多糖作用后的剩余酶活力与加入酶量间的关系,得到一组通过原点的直线,随着加入的多糖浓度增大,直线的斜率降低,说明多糖对酪氨酸酶的抑制作用属于可逆过程,多糖是酪氨酸酶的可逆抑制剂,增加效应物含量导致酶活力的下降是通过抑制酶活力降低其催化速率,而不是通过降低其有效的酶量而使其活力下降。



直线 1~6 多糖的质量浓度分别为:0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.12 mg/mL

图 2 白首乌多糖对酪氨酸酶抑制作用的进程曲线

Fig. 2 Progress curves for inhibition of tyrosinase by polysaccharides from *Cynanchum auriculatum*

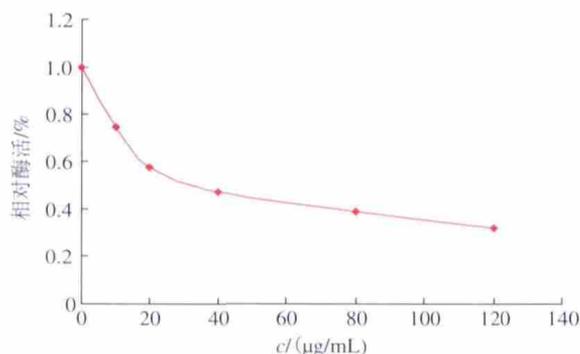


图 3 白首乌多糖对酪氨酸酶活力的影响

Fig. 3 Effect of polysaccharides from *Cynanchum auriculatum* on tyrosinase activity

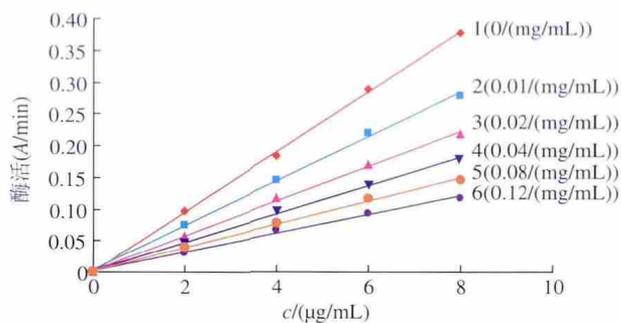


图 4 白首乌多糖对酪氨酸酶抑制机理

Fig. 4 Inhibitory mechanism of polysaccharides from *Cynanchum auriculatum* on tyrosinase activity

图 5 为多糖对酪氨酸酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图,得到 1 组纵轴截距不变的直线,说明多糖作为酪氨酸酶抑制剂,它不改变酶促反应的最大反应速度(V_{max}),只影响米氏常数(K_m),且 K_m 值随着抑制剂浓度的增大而增大,表现酶对底物的亲和力下降,底物与抑制剂同酶分子

的结合是相互竞争的,其抑制剂类型为竞争性类型。图中表现出酶反应的 V_{max} 不随抑制剂浓度增大而变化,说明多糖只能与游离酶(E)结合,而不能与酶-底物络合物(ES)结合。

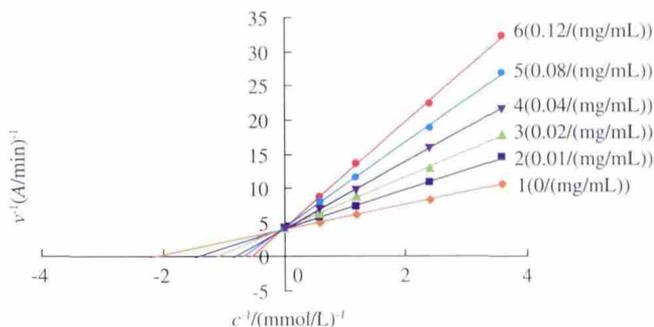


图5 多糖对酪氨酸酶抑制类型的测定

Fig. 5 Determination of the inhibitory type of polysaccharides from *Cynanchum auriculatum* on tyrosinase activity

3 结语

通过对白首乌含有的不同活性成分影响酪氨酸酶活性的考察表明:白首乌的 C_{21} 甾苷对酪氨酸酶有激活作用,进一步的研究结果将在另文发表。白首乌多糖对酪氨酸酶有显著的抑制作用, IC_{50} 为 $31.8 \mu\text{g/mL}$,多糖是酪氨酸酶的可逆性抑制剂,抑制类型为竞争性抑制。该研究结果不仅为白首乌治疗色素障碍性皮肤病提供了理论依据,并且白首乌多糖由于其可食性,对改善食品褐变现象也有实用前景,因为食品加工与储藏过程中经常会发生酶促褐变等变色现象,引起褐变的酶主要就是酪氨酸酶^[9]。绝大多数褐变影响食品加工与储藏的效果和质量的稳定,尽可能降低酪氨酸酶的活性有助于改善食品褐变。

参考文献:

- [1] 张晴,罗俊,黄能慧. 妇科再造丸含药血清对体外培养人黑色素细胞的抑制作用[J]. 中草药,2008,39(4):577-579.
ZHANG Qing,LUO Jun,HUANG Neng-hui. Inhibition of Fukezaizao Pill on proliferation and activity of tyrosinase of melanocytes[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**,2008,39(4):577-579.(in Chinese)
- [2] 应军,倪庆纯,杨威,等. 杭白菊、当归、丹参提取液抑制黄褐斑形成及机制研究[J]. 中草药,2011,42(5):958-961.
YING Jun,NI Qing-chun,YANG Wei,et al. Inhibition of extracts from Hangzhou Chrysanthemum Flos,Angelicae Sinensis Radix,and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma on formation of chloasma and their mechanism [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**,2011,42(5):958-961.(in Chinese)
- [3] 宋俊梅,陶冠军,汤坚,等. 白首乌中 C_{21} 甾苷元的分离与结构鉴定[J]. 无锡轻工大学学报,2002,21(2):176-178.
SONG Jun-mei,TAO Guan-jun,TANG Jian,et al. Isolation and characterization of C_{21} steroidal aglycones from *Cynanchum auriculatum*[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**,2002,21(2):176-178.(in Chinese)
- [4] 高丽君,王汉忠,崔建华,等. 白首乌可溶性多糖提取工艺研究[J]. 食品科学,2004,25(10):178-180.
GAO Li-jun,WANG Han-zhong,CUI Jian-hua,et al. Studies on the extraction technology of soluble polysaccharides from Radix *Cynanchum bungei*[J]. **Food Science**,2004,25(10):178-180.(in Chinese)
- [5] 常新全,丁丽霞. 中药活性成分分析手册[M]. 北京:学苑出版社,2002:728-729.
- [6] 徐凌川,马凤英,许昌盛. 不同产地加工方法对泰山白首乌磷脂含量的影响[J]. 食品与药品,2006,8(3):51-52.
XU Ling-chuan,MA Feng-ying,XU Chang-sheng. Effects of different habitat processing methods on the content of phosphatide in Radix *Cynanchum bungei* Decne[J]. **Food and Drug**,2006,8(3):51-52.(in Chinese)
- [7] 张红城,李春阳,董捷,等. 8种蜂花粉醇提物对酪氨酸酶的单酚氧化活性的抑制作用[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(1):14-17.
ZHANG Hong-cheng,LI Chun-yang ,DONG Jie,et al. Inhibiting effect of ethanolic extracts of eight kinds of bee pollens on the activity of tyrosinase to oxidize monophenol[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(1):14-17.(in Chinese)
- [8] Espin J C,Wichers H J. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity *in vitro* [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2001,1544:289-300.
- [9] 张婷婷,夏文水,姜启兴,等. 柠檬酸亚锡二钠对双孢菇罐头的护色作用[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(1):82-88.
ZHANG Ting-ting,XIA Wen-shui,JIANG Qi-xing,et al. Research on anti-browning of disodium stannous citrate in canned agaricus bisporus[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(1):82-88.(in Chinese)