

柚皮素抑制酪氨酸酶活性的研究

刘圆圆¹ 李海艳² 刘选梅¹

(1.邵阳学院基础医学院 湖南 邵阳 422000; 2.邵阳学院第一附属医院药剂科, 湖南邵阳 422000)

摘要: 本论文以柚皮素为研究对象, 通过对酪氨酸酶活性抑制率的测定评价柚皮素的酶活抑制效果。结果表明柚皮素具有较强的对酪氨酸酶活性的抑制作用, 实验中柚皮素对酪氨酸酶抑制率最高可达 59.5%。柚皮素具有抑制黑色素生物合成的潜在功能, 在食品、医药和美容等方面具有很大的应用前景。

关键词: 柚皮素; 酪氨酸酶; 抑制

Study on the inhibition of tyrosinase activity by naringenin

Liu Yuanyuan¹ Li Haiyan² Liu Xuanmei¹

Abstract: In this paper, we take naringenin as the research target, and the purpose is to evaluate the inhibition effect of naringenin on tyrosinase activity by measuring the inhibition rate of tyrosinase activity. Here, we showed clearly that naringenin had the capacity to inhibit tyrosinase (TYR) activity, and the highest inhibitory rate of naringenin on tyrosinase was 59.5%. Therefore, the data indicate that naringenin has the potential to be used as a melanogenesis inhibitor in food, medical and cosmetic industry.

Keywords: naringenin; TYR; inhibition

1 研究背景

黄酮类化合物属于酚类化合物, 具有较高的综合应用价值, 尤其药用价值, 如抑菌、止咳、抗氧化、抗癌和防癌等。同时, 通过促进糖脂代谢、间接预防糖尿病, 保护心血管系统的功能^[1-3]。黄酮类化合物在柚子、柑桔等柑橘类水果中含量丰富, 尤其是柑橘皮中。其中, 柚子中主要的黄酮类化合物为柚皮素。研究表明, 柚皮素具有抗炎作用和对性激素代谢的不同类型影响, 同时柚皮素可以与雌激素受体相结合^[4], 也可以作为抗癌和抗动脉粥样硬化^[5]的潜在应用化合物。此外, 柚皮素还具有自由基清除的能力, 这与实验室前期研究的橘皮中黄酮类化合物的粗提取物具有一定的抗氧化性一致。同时, 前期研究还显示橘黄酮具有黑色素抑制剂的潜在功能, 柚皮素作为黄酮类化合物的一种, 目前国内外尚鲜有柚皮素抑制酪氨酸酶活性甚至黑色素合成的报道。因此, 通过对柚皮素抑制黑色素生成关键酶即酪氨酸酶活性的研究, 可以为深入研究黑色素肿瘤的治疗药物提供基础实验方向, 具有重要意义。

酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR), 因含金属铜, 属于金属氧化还原酶类, 本质上为一个铜膜结合糖蛋白^[6]。该酶的含铜结构在催化反应中起很重要的作用, 会导致一些具有金属整合型功能的化合物能够作为黑色素生成的抑制剂^[6]。酪氨酸酶作为黑色素形成过程中的首要的关键酶, 主要催化如下两个反应: ①以酪氨酸为底物催化其羟基化生成多巴, 体现单酚氧化酶活性^[7]; ②以多巴为底物催化其生成产物多巴醌, 体现多酚氧化酶活性^[7], 上述两个连续催化过程皆需要氧分子参与进行。因此, 一些具有抗氧化活性的物质同时也拥有抑制酪氨酸酶的活性。研究表明, 超声波辅助提取柚皮中黄酮类化合物具有一定的抗氧化活性^[8], 且食源性柚皮苷不但具有抗氧化性还具有保护肝肾损伤的作用^[9], 很显然, 柚皮素具有抗氧化活性已经被大量实验文献证实, 那我们不经思考, 这是否也意味着柚皮素可能同时具有抑制酪氨酸酶的活性。

目前已知酪氨酸酶广泛存在于自然界, 包括动植物、人体乃至于各类微生物, 例如在植物体中, 许多酚类化合物可以作为酪氨酸酶的底物, 当植物组织受到损伤时, 酪氨酸酶将会把它们催化生成褐色产物, 同时酪氨酸酶还与人的衰老、昆虫伤口恢复以及生长发育有着密切的联系^[10]。在人体内, 黑色素异常过量生成可导致系列美学问题, 如雀斑、黄褐斑、老年斑等, 这些都是和色素过多沉着有关。因此, 酪氨酸酶不但直接参与黑色素的形成, 间接导致与上述色素过度沉积等引起的皮肤病, 还与食品的褐变, 昆虫防御体系、

人体的衰老密切相关, 研究意义重大。本文以实验室前期研究为基础, 综合国内外对柚皮素的相关研究, 选择脂溶性强的柚皮素为实验对象, 检测体外酪氨酸酶活性大小, 以期后续抑制黑色素生物合成的机理探索与应用提供前期理论基础。

2 实验材料

2.1 仪器

紫外分光光度计 (天津市普瑞斯仪器有限公司, 型号: 722SP)、电子天平 (上海精密科学仪器有限公司, 型号: FA2004B)、PH计 (上海精密科学仪器有限公司, 型号: PHSJ-3F)、恒温水浴锅 (江苏新春兰科学仪器有限公司, 型号: HH-M6)、电热恒温干燥箱 (上海跃进医疗器械厂, 型号: GZX-DH)、微量加样器 (Eppendorf Research plus) 试管、试管架、洗耳球、烧杯等。

2.2 耗材

蘑菇酪氨酸酶 (Sigma, T3824-25KU)、L-多巴 (Sigma, D9628-5G)、L-抗坏血酸/维生素C (上海生工, A100143-0100)、柚皮素 (上海生工, A606686)、K₂HPO₄ (上海生工, A501728)、KH₂PO₄ (上海生工, A100781) 等

2.3 试剂配置

①1.50mmol/L 磷酸钾缓冲溶液(100ml, pH6.5)

分析天平分别准确称量 K₂HPO₄·3H₂O 4.56 g 和 KH₂PO₄ 2.72 g, 然后用蒸馏水定容至 400 ml 得到 0.2 mmol/L 的溶液, 置于烧杯里面, 将 31.5 ml K₂HPO₄·3H₂O 和 68.5 ml KH₂PO₄ 混合于烧杯后保存于冰箱中备用。

②10mmol/L 底物多巴(20ml)

用分析天平准确称量 0.0392g 多巴, 用刻度吸管吸取 20ml 蒸馏水, 将多巴溶于蒸馏水中, 用即配制成 10mmol/L 多巴, 现配现用。

③10mg/L VC(10ml)

在避光环境中, 用分析天平准确称量 0.1gVC, 用刻度吸管吸取 10ml 蒸馏水, 将 VC 溶于蒸馏水中, 即配制成 10mg/ml 的 VC, 现配现用

④10mg/ml 柚皮素(10ml)

在避光环境中, 用分析天平准确称量 0.1g 柚皮素, 用刻度吸管准确吸取 10ml 二甲基亚砜, 将柚皮素溶于二甲基亚砜, 即配制成 10mg/ml 柚皮素, 现配现用。

⑤124u/mg 酪氨酸酶试剂

先将 0.002g 粉状酶用 100ml 缓冲溶液配制制成 1240u/mg, 放在棕

色玻璃瓶里,冰箱里保存,再取出 10ml 即为 124u/mg 酪氨酸酶,现配现用。

3 实验方法

柚皮素对酪氨酸酶活性的抑制作用

酪氨酸酶的活性的测定^[11]:以10mmol/L L-多巴为底物;5.0mg/mL柚皮素为实验样品;5.0mg/mL浓度大小的维生素C为阳性对照溶液;磷酸盐缓冲液为空白对照;配置124U/mg的蘑菇酪氨酸酶溶液为催化剂。

取五支干净干燥试管,编号,按表1 试剂组成进行实验,实验的条件为各个试管充分混匀后于25° C水浴锅中反应5min,立刻用已经预热的722紫外分光光度计在475nm波长下测定并且记录吸光度A值,计算酶活抑制率(%)或酶活大小(%)。重复上述实验三次。

酶活抑制率(%)=[(A_{空白}-A_{样品})/A_{空白}] $\times$ 100%

酶活大小(%)=(A_{样品}/A_{空白}) $\times$ 100%

表1 各组反应液组成

实验组号	第一组	第二组	第三组	第四组	第五组
底物/ μ l	500	500	500	500	500
样品(或VC) / μ l	0	50	100	500	1000
磷酸盐缓冲液 / μ l	1500	1450	1400	1000	500
酪氨酸酶溶液 / μ l	500	500	500	500	500
总计/ μ l	2500	2500	2500	2500	2500

4 实验结果

柚皮素抑制蘑菇酪氨酸酶活性

检测柚皮素对蘑菇酪氨酸酶活性的影响,并使用已经广泛应用于美白产品的抗坏血酸(VC)作为阳性对照,如图1所示。结果显示柚皮素在四个浓度梯度:0.1,0.2,1,2 mg/ml下均能够抑制蘑菇酪氨酸酶的活性,抑制率分别大约为15.0%,24.8%,40.5%和59.5%($P < 0.05$),且呈现浓度依赖性的关系,同样条件下0.1,0.2,1,2 mg/ml VC的抑制率分别为40.3%,52.0%,85.0%,95.5% ($P < 0.05$)。尽管结果表明,柚皮素对蘑菇酪氨酸酶的抑制效果低于VC,但它仍然是一个有效地酪氨酸酶抑制剂。

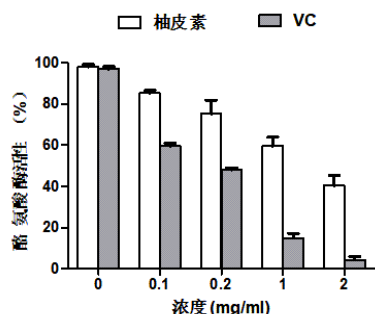


图1.柚皮素对蘑菇酪氨酸酶活性的影响

5 结论和讨论

通过实验可知柚皮素具有抑制酪氨酸酶活性的功能,且在目前

实验浓度范围内,随着浓度的增大,抑制效果逐渐增强,本实验中对酪氨酸酶抑制率最高可达 59.5%,但相同浓度下对酪氨酸酶的活性抑制效果均低于阳性对照组 VC。酪氨酸酶催化多巴底物最终生成黑色素的过程需要氧分子,柚皮素之所以能够抑制酪氨酸酶的活性,很有可能是由于其具有较强的抗氧化性,能消除氧分子,从而拮抗了氧对酪氨酸酶的激活。同时,酪氨酸酶作为黑色素生成过程中首要、唯一的关键酶,绝大部分黑色素抑制剂都可以通过抑制酪氨酸酶的活性来达到抑制效果,因此,柚皮素具有成为黑色素抑制剂的潜在价值。

基于柚皮素具有较好的体外抑制酪氨酸酶活性的作用,可以作为天然酶活抑制剂。未来可以进行细胞实验,甚至动物实验,进一步验证酶活抑制功能,为柚皮素在食品、药品、化妆品等领域的实际应用提供基础理论依据。

参考文献

- [1] Li R, Li J, Hu C M, et al. Therapeutic effect of hesperidin on adjuvant arthritis in rats and Its mechanisms[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2008, 24(4):494-498.
 - [2] Ohtsuki K, Abe A, Mitsuzumi H, et al. Effects of longterm administration of hesperidin and glucosyl hesperidin to spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2002, 48(5):420-422.
 - [3] Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology[J]. Nutrition Research, 2004, 24(10): 851-874.
 - [4] Wilcox L J, Borradaile N M, Huff M W. Antiatherogenic Properties of Naringenin, a Citrus Flavonoid[J]. Cardiovascular drug, 1999, 17(2): 160-178.
 - [5] Sánchez-Ferrer, Rodríguez-López JN, García-Cnovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1247: 1-11.
 - [6] Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10: 2440-2475.
 - [7] Cooksey CJ, Garratt PJ, L and EJ, et al. Evidence of the indirect formation of catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase[J]. J Biol Chem, 1997, 272(42): 26226-26235.
 - [8] 谭品鑫, 刘彦琳, 赵容慧. 超声辅助提取柚皮黄酮及其抗氧化性的研究[J]. 山东化工. 2018, 47(05): 8-9+12.
 - [9] 袁媛, 刘黄友, 闫海洋, 孙治. 食源性柚皮苷抗氧化性及其对呋喃所致小鼠肝肾损伤的保护作用[J]. 中国食品学报. 2019, 19(09): 13-20.
 - [10] Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(15): 1707-1723.
 - [11] Gupta SD, and Masakapalli SK. Mushroom TYR inhibition activity of Aloe vera L. gel from different germplasms[J]. Chin J Nat Medicines, 2013, 11, 616-620.
- [基金项目]: 2020年度邵阳市指导性科技计划项目(2020GXZ66)