

明其具有体外调节脂肪细胞糖脂代谢的作用, 具有进一步研究并运用于临床的前景。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[J]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 213-214.
- [2] 赵素容, 卢宏伟, 陈金龙, 等. 地黄梓醇降糖作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (1): 171-172.
- [3] Tamori Y, Masugi J, Nishino N. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes[J]. Diabetes, 2002, 51(7): 2045-2055.
- [4] 杨桂枝, 高小平, 宴菊芳. GOD-POD法微量测定方法建立及其在3T3-L1脂肪细胞和HepG2细胞糖摄取检测应用[J]. 四川解剖学杂志, 2003, 11(1): 12-14.
- [5] 李晋宏. 52首治疗糖尿病的中药复方用药规律研究[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(2): 176-177.
- [6] 李莉. 生地黄治疗糖尿病的药理研究[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(4): 670-672.
- [7] 张汝学, 顾国明, 张永祥, 等. 地黄低聚糖对实验性糖尿病与高血糖大鼠糖代谢的调节作用[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(1): 14-17.
- [8] 曾艳, 贾正平, 张汝学, 等. 地黄寡糖在2型糖尿病大鼠模型上的降血糖作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 411-415.
- [9] 于震, 王军, 李更生, 等. 地黄苷D滋阴补血和降血糖作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2001, 28(4): 240-242.
- [10] 陈立, 杨明伟. 小檗碱与梓醇及其配伍对胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞葡萄糖转运子4蛋白及C-Cb1相关蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1510-1514.

(编辑: 梁进权)

库拉索芦荟中7种单体化合物对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

钟佳胜, 刘 丹, 吴小芳, 丁雯静, 万金志(中山大学药学院药物分析实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 研究库拉索芦荟中7种单体化合物对蘑菇酪氨酸酶催化氧化左旋多巴的活力的影响, 并确定活性成分的抑制类型。方法 以左旋多巴为底物, 37℃条件下, 以酶标仪记录反应体系在475 nm下光密度随时间的变化, 通过相对酶活力比较加药后酶活力的变化, 并通过Lineweaver-Burk曲线判定抑制类型, 通过Dixon曲线求抑制常数。结果 库拉索芦荟中的芦荟苦素具有很强的蘑菇酪氨酸酶抑制作用, 且强于 β -熊果苷, 其50%抑制浓度(IC₅₀)为108.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抑制类型为非竞争性抑制, 抑制常数 K_i =130.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而其余6种化合物的抑制作用较弱或没有抑制作用。结论 芦荟苦素是库拉索芦荟中主要的蘑菇酪氨酸酶抑制成分。

关键词: 库拉索芦荟; 蘑菇酪氨酸酶; 芦荟苦素; 抑制作用; 抑制类型

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)02-0114-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.002

Effects of Seven Compounds from *Aloe barbadensis* Mill on Activities of Mushroom Tyrosinase

ZHONG Jiasheng, LIU Dan, WU Xiaofang, DING Wenjing, WAN Jinzhi (Laboratory for Pharmaceutical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of seven compounds from *Aloe barbadensis* Mill on the activity of mushroom tyrosinase in the catalysis of levodopa, and to determine the inhibition type of active components. **Methods** Tyrosinase activity was measured by the absorbance variations accompanying with the oxidation of the substrate levodopa which were recorded with a microplate reader at 475 nm under a constant temperature of 37℃. Inhibition type was determined by Lineweaver-Burk plot, and inhibition constant(K_i) was calculated by Dixon graphs. **Results** Aloesin was a strong noncompetitive inhibitor of mushroom tyrosinase and was more potent than arbutin, with an IC₅₀ value of 108.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a K_i value of 130.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The other compounds had weak activities or even had no activities. **Conclusion** Aloesin is the main mushroom tyrosinase inhibitor in *Aloe barbadensis* Mill.

Keywords: *Aloe barbadensis* Mill; Mushroom tyrosinase; Aloesin; Inhibition; Inhibition type

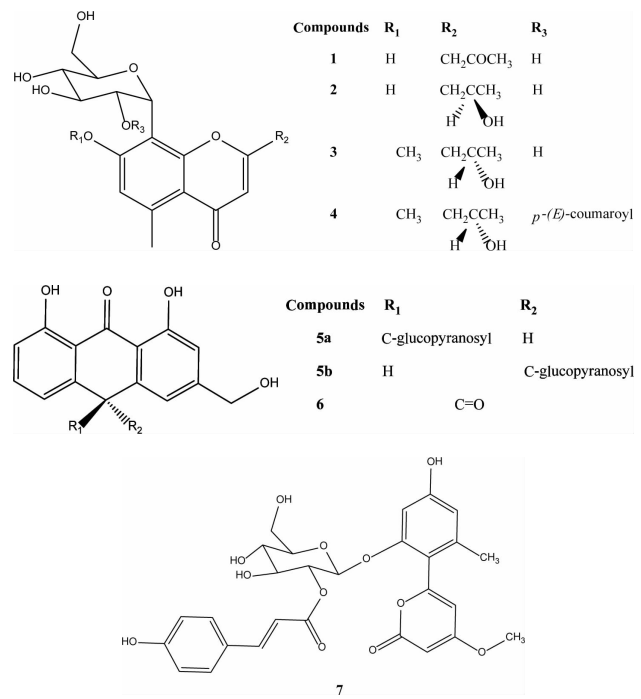
收稿日期: 2012-10-16

作者简介: 钟佳胜, 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物活性成分的研究。Email: zjs12309@21cn.com。通讯作者: 万金志, 副教授, 研究方向: 天然药物及中药的研究开发与质量评价, 芦荟作用物质基础与组效关系研究。Email: jinzhiwan2004@yahoo.com.cn。

基金项目: 2012年度“十二五”农村领域国家科技计划课题“区域特产资源生态高附加值加工质量安全控制关键技术研究”(2012BAD36B02)。

酪氨酸酶(EC. 1. 14. 18. 1)又称多酚氧化酶, 广泛存在于动植物中, 是黑色素生物合成过程中的主要限速酶^[1]。它通过将左旋酪氨酸羟化生成左旋多巴(L-DOPA), 再经过一系列的反应生成黑色素, 进而导致皮肤色素沉着性疾病^[2]。酪氨酸酶抑制剂通过抑制酶活力, 阻断黑色素的生成, 从而防治酪氨酸酶过度表达导致的疾病。

库拉索芦荟(*Aloe barbadensis* Mill)为百合科(Liliaceae)芦荟属(*Aloe* L.)多年生常绿草本植物, 是重要的化妆品原料, 具有消除色斑、美白等作用^[3]。研究发现, 芦荟的这些功效与其能够抑制酪氨酸酶的活力有关, 但有效成分尚不明确^[4]。为探究其有效成分, 本研究以L-DOPA为底物, 通过微孔板检测系统, 采用速率法, 以 β -熊果苷为阳性对照, 研究了库拉索芦荟中的7种单体化合物(结构如图1)对蘑菇酪氨酸酶活力的影响, 同时探讨了活性成分的抑制类型, 揭示芦荟用于皮肤脱色剂和防治皮肤色素沉着性疾病的物质基础与可能的作用机理。



1. Aloesin(芦荟苦素); 2. 8-C-glucosyl-(*R*)-aloesol; 3. 8-C-glucosyl-7-O-methyl-(*S*)-aloesol; 4. Isoaloesin D(异芦荟色苷D); 5. Aloin (5a. aloin A, 5b. aloin B)(芦荟苷); 6. Aloe-emodin(芦荟大黄素); 7. Aloenin-2'-*p*-coumaroyl ester(2'-对香豆酰芦荟宁);

图1 库拉索芦荟中的化合物1~7的结构

Figure 1 Structures of compounds 1~7 from *Aloe barbadensis* Mill

1 材料与方法

1.1 仪器 FlexStation 3多功能酶标仪(SoftMax Pro 5 软件), 美国Molecular Devices公司; 8道移液枪, 德

国Eppendorf公司; SB25-12D型超声波清洗器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; AL135型十万分之一天平, 瑞士Mettler Toledo公司; 96孔板, 美国Corning公司。

1.2 试剂 蘑菇酪氨酸酶(965 U/mg), 美国Worthington Biochemical公司; 左旋多巴(L-DOPA), 美国Boston Biomedical公司; 二甲基亚砜(DMSO), Sigma公司; 芦荟大黄素对照品, 上海同田生物技术有限公司, 批号: 10081531; 其余化合物为自制, 经中山大学药学院药物分析实验室万金志副教授鉴定, 鉴定方法为IR、UV、MS和NMR, HPLC面积归一化法计算纯度均大于95.0%; 芦荟丙酮提取物, 自制; 其他试剂均为分析纯; 配制溶液所用水为超纯水。

1.3 试剂的配制

1.3.1 磷酸盐缓冲液 分别精密称取NaH₂PO₄·2H₂O 0.5200 g和Na₂HPO₄·12H₂O 1.1938 g, 加入适量超纯水, 超声溶解, 定容至100 mL, 配制成pH 6.8的1/15 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液, 4℃保存, 备用。

1.3.2 蘑菇酪氨酸酶溶液 精密称取适量蘑菇酪氨酸酶, 加入适量4℃的磷酸盐缓冲液溶解、定容, 配制浓度为0.2 mg·mL⁻¹的蘑菇酪氨酸酶溶液, 4℃保存, 现配现用。

1.3.3 L-DOPA溶液 精密称取适量L-DOPA, 加入适量磷酸盐缓冲液, 超声至完全溶解、定容, 配制浓度为2.0 mmol·L⁻¹的L-DOPA溶液, 4℃保存, 现配现用。

1.3.4 样品溶液 水溶性差的异芦荟色苷D、芦荟苷和芦荟大黄素, 精密称取适量, 加入一定量DMSO溶解, 配制浓度为4.0 mg·mL⁻¹的储备液, 以磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。其余化合物水溶性较好, 精密称取适量, 加入超纯水配制浓度为4.0 mg·mL⁻¹的储备液, 以磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。

1.4 样品对酶活力的影响

1.4.1 酶活力的测定 采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定化合物对酶活力的影响, 在参考文献^[5]方法的基础上稍加改进。反应在96孔板中进行, 依次加入蘑菇酪氨酸酶溶液、样品溶液、磷酸盐缓冲液、L-DOPA溶液各50 μL, 反应体系总体积为200 μL。同时设立对照组, 依次加入蘑菇酪氨酸酶溶液50 μL, 磷酸盐缓冲液100 μL, L-DOPA溶液50 μL。

加样完毕后立即使用多功能酶标仪震荡混匀5 s, 在37℃恒温条件下记录波长475 nm下反应体系的OD值随时间变化的曲线。取酶促反应呈一级动力学时

直线的斜率为酶活力，按以下公式计算相对酶活力，每组平行3次实验，取平均值。

相对酶活力(%)= $v_s/v_c \times 100$

其中， v_c 为对照组的酶活力($OD_{475} \cdot \text{min}^{-1}$)， v_s 为样品组的酶活力($OD_{475} \cdot \text{min}^{-1}$)。

1.4.2 50 %抑制浓度(IC_{50})的计算 分别测试不同样品(浓度为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对蘑菇酪氨酸酶活力的影响，对相对酶活力小于50 %的样品进行复筛，分别测定浓度为100, 200, 300, 400, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品对酶活力的影响，计算 IC_{50} 。

1.5 样品对酶的抑制类型及抑制常数的测定 在反应体系中，固定蘑菇酪氨酸酶的浓度，改变底物L-DOPA的浓度(终浓度分别为0.5, 0.7, 1.0, 1.4, $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)，分别测定在不同浓度样品下(终浓度分别为100, 200, 300, 400, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)酶促反应的初速度，由Lineweaver-Burk双倒数图确定抑制类型，双倒数图的横轴截距为 $-1/K_m$ (K_m 为米氏常数)，纵轴截距为 $1/V_{\text{max}}$ (V_{max} 为最大反应速度)，并通过Dixon曲线计算抑制常数。

2 结果

2.1 样品对蘑菇酪氨酸酶活力的影响 酶促反应在3 min内呈一级动力学，以0~3 min直线斜率为酶活力。7种单体化合物及芦荟丙酮提取物对蘑菇酪氨酸酶活力的影响见表1。芦荟丙酮提取物具有微弱的蘑菇酪氨酸酶抑制作用，进一步实验发现，化合物1(芦荟苦素)能够显著地抑制蘑菇酪氨酸酶的活力，且显著强于阳性药物 β -熊果苷，化合物2和5在 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用较弱，化合物3, 4, 6, 7在 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时未表现出抑制活性。

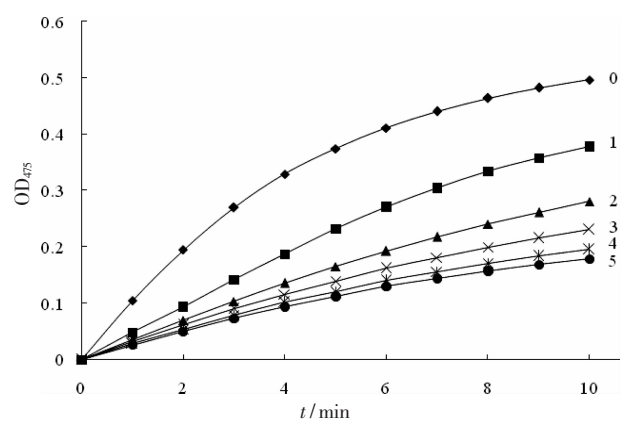
表1 库拉索芦荟中7种单体化合物及丙酮提取物对蘑菇酪氨酸酶催化L-DOPA活力的影响

Table 1 Effects of compounds 1~7 and aloe acetone extract on the activity of mushroom tyrosinase for the catalysis of L-DOPA

样品	相对酶活力 /%	RSD/%
1	27.3	1.13
2	91.3	0.80
3	N	-
4	N	-
5 (5a+5b)	89.8	1.65
6	N	-
7	N	-
芦荟丙酮提取物	91.5	0.84
β -熊果苷	86.6	1.38

注：表中的相对酶活力为样品浓度 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时所测得；N表示 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时未表现出抑制活性。

不同浓度的芦荟苦素对蘑菇酪氨酸酶催化氧化L-DOPA的抑制作用如图2，随着芦荟苦素浓度的增大，酶促反应的速度减慢。以相对酶活力对芦荟苦素浓度作图(图3)，求得芦荟苦素导致蘑菇酪氨酸酶活力下降的 IC_{50} 为 $108.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



注：曲线0~5分别代表反应体系中芦荟苦素的浓度为0, 100, 200, 300, 400, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

图2 不同浓度芦荟苦素存在时的酶促反应进程

Figure 2 Substrate reaction in the presence of different concentrations of aloesin

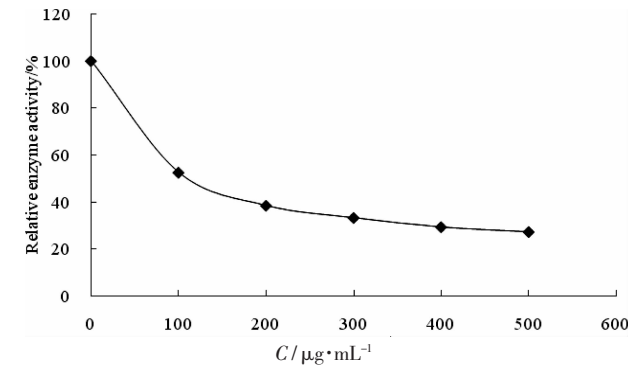


图3 芦荟苦素对蘑菇酪氨酸酶催化L-DOPA活力的抑制作用

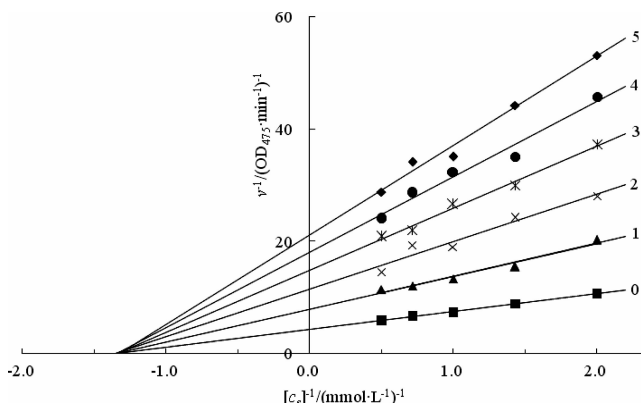
Figure 3 Effects of aloesin on the activity of mushroom tyrosinase for the catalysis of L-DOPA

2.2 芦荟苦素对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型及抑制常数

芦荟苦素对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的Lineweaver-Burk双倒数作图(图4)为一组横轴截距不变的直线，米氏常数 $K_m=0.78 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，不受芦荟苦素浓度的影响，最大反应速度 V_{max} 随芦荟苦素浓度的增大而减小，说明芦荟苦素对蘑菇酪氨酸酶的抑制为非竞争性抑制。芦荟苦素与蘑菇酪氨酸酶的结合和底物分子与酶的结合相互独立，不改变酶对底物的亲和力。它不仅能与游离酶(E)结合，而且能与酶-底物络合物(ES)结合，结合常数相等。

在不同底物浓度条件下，以 $1/V$ 对芦荟苦素浓度作Dixon曲线(图5)，横轴截距即为 $-K_i$ ，求得抑制常

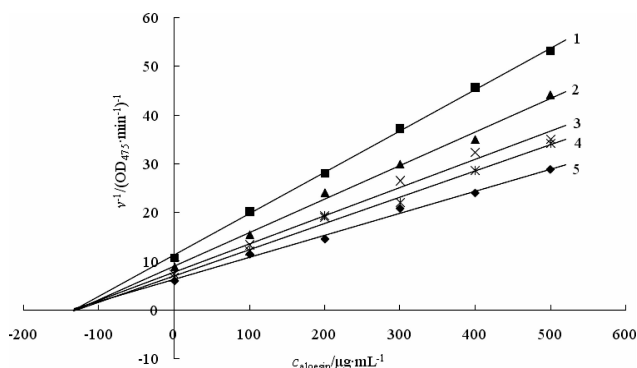
数 $K_i=130.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。



注：直线0~5分别代表反应体系中芦荟苦素的浓度为0, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

图4 芦荟苦素对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的Lineweaver-Burk双倒数作图

Figure 4 Lineweaver-Burk plots for inhibition of aloesin on mushroom tyrosinase



注：直线1~5分别代表反应体系中底物L-DOPA的浓度为0.5, 0.7, 1.0, 1.4, 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

图5 芦荟苦素对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的Dixon曲线

Figure 5 Dixon plots for inhibition of aloesin on mushroom tyrosinase

3 讨论

本实验使用了微孔板检测系统研究样品对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用，与使用紫外分光光度计的传统方法比较，该方法快速，准确性高，RSD值小，操作简单，所需样品量少，重现性高，并且可以同时测定多个样品，适用于高通量筛选。

本实验发现，芦荟丙酮提取物微弱地抑制了蘑菇酪氨酸酶的活性，为明确活性成分，课题组对已分离出的7个相对含量较大的单体化合物的酪氨酸酶抑制作用进行了研究，结果表明：(1)芦荟苦素是芦

荟中主要的酪氨酸酶抑制成分，且其作用显著强于阳性药物 β -熊果苷，其抑制类型为非竞争性抑制，50 %抑制浓度(IC_{50})= $108.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，抑制常数 $K_i=130.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。芦荟苦素与蘑菇酪氨酸酶的活性部位以外的部位结合，使酶-底物-抑制剂复合物(ESI)不能进一步释放产物。(2)除芦荟苦素，化合物2、5也可以微弱地抑制蘑菇酪氨酸酶的活性。丙酮提取物中化合物5即芦荟苷的含量较高，因此，虽然丙酮提取物中芦荟苦素的含量很低，丙酮提取物仍然具有一定的抑制作用。库拉索芦荟对蘑菇酪氨酸酶的抑制是多种化合物的共同作用，但以芦荟苦素为主要成分。(3)芦荟中色酮类成分7-OH和2位的 β -羰基可能是抑制酪氨酸酶的活性基团。分子的大小与抑制活性相关，分子太大可能导致无法进入靶点的活性口袋，从而不能产生抑制作用。有文献报道，反式对香豆酰基可能是抑制酪氨酸酶的活性基团^[6]，但实验发现，化合物4和化合物7在500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时均未表现出抑制活性，这可能与化合物4和化合物7分子相对较大有关。

本研究结果提示，芦荟苦素具有较强的酪氨酸酶抑制作用，是库拉索芦荟中主要的酪氨酸酶抑制成分。芦荟鲜叶中芦荟苦素的含量相对较高，但容易发生降解，因此，以芦荟生产具有美白等功效的产品时，在原材料采集、运输、储藏、生产加工过程中，应采取一定的措施，尽量减少芦荟苦素的降解。

参考文献：

- [1] Nakamura E, Miyamura Y, Matsunaga J, et al. A novel mutation of the tyrosinase gene causing oculocutaneous albinism type 1(OCA1)[J]. J Dermatol Sci, 2002, 28(2): 102-105.
- [2] 郭云集, 宋康康, 李智聪, 等. 甘醇酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47 (3): 383-386.
- [3] 赵寿经. 芦荟的国内外应用现状及开发前景[J]. 特产研究, 2000, 22(2): 56-59.
- [4] 邱凌, 钟雪, 庄江兴, 等. 芦荟皮酪氨酸酶抑制剂有效成分的提取与分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(2): 227-230.
- [5] Lin YF, Hu YH, Jia YL, et al. Inhibitory effects of naphthols on the activity of mushroom tyrosinase[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51 (1-2): 32-36.
- [6] Okamura N, Hine N, Harada S, et al. Three chromone components from Aloe vera leaves[J]. Phytochemistry, 1996, 43(2): 495-498.

(编辑：梁进权)