

阿育魏实提取物对酪氨酸酶的激活作用

刘亚亚, 王强*, 彭秧

(新疆大学理化测试中心, 乌鲁木齐 830046)

[摘要] **目的:**研究阿育魏实不同提取物对酪氨酸酶活性和黑色素生成的影响。**方法:**以阿育魏实为材料,通过乙醇提取得到总提取物即醇提物,然后依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到相应的提取物。采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法和 NaOH 裂解法研究了该提取物对酪氨酸酶的效应和黑色素上调率。**结果:**所得阿育魏实乙醇和乙酸乙酯提取物对酪氨酸酶激活作用较明显,对黑色素生成具有直接刺激作用,与对照品补骨脂和驱虫斑鸠菊相比,阿育魏实乙酸乙酯提取物 IC₅₀为(13.64 ± 7.78) g·L⁻¹,对酪氨酸酶激活作用优于临床治疗白癜风药物补骨脂[IC₅₀(21.18 ± 2.88) g·L⁻¹]。**结论:**阿育魏实乙酸乙酯提取物具有较好的体外酪氨酸酶激活及促进黑色素生成作用,可为临床治疗白癜风药物提供依据。

[关键词] 阿育魏实; 白癜风; 酪氨酸酶; 黑色素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0117-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140117

Activation Effect on Mushroom Tyrosinase of *Trachyspermum ammi* Seeds

LIU Ya-ya, WANG Qiang*, PENG Yang

(Center for Physical and Chemical Analysis, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

[Abstract] **Objective:** The active effects on mushroom tyrosinase of the extracts from *Trachyspermum ammi* seeds and melanin synthesis were studied. **Method:** A ethanol extract of *T. ammi* was partitioned into petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butyl alcohol of the five fractions. Ethanol extract and ethyl acetate extract of *T. ammi* showed more potent *in vitro* activation of tyrosinase activity with L-DOPA as a substrate, and melanin content increasing activity. **Result:** The ethyl acetate extract of *T. ammi* activated tyrosinase at IC₅₀ (13.64 ± 7.78) g·L⁻¹, and the IC₅₀ value of *Psoralea corylifolia*, a positive control, was (21.18 ± 2.88) g·L⁻¹. **Conclusion:** Ethyl acetate extract of *T. ammi* has a significant effect on activating the activity of tyrosinase and increasing melanin content *in vitro*. The project results showed an experimental evidence for clinical administration of the drugs in treating vitiligo.

[Key words] *Trachyspermum ammi*; vitiligo; tyrosinase; melanin

白癜风是一种临床较常见的色素减退性皮肤病,易诊断,难治疗^[1]。研究发现,酪氨酸酶是黑色素生成的关键酶,其活性与黑色素合成量呈正相关^[2]。用离体酶学方法可以从药材中筛选出对酪氨酸酶有激活作用有效成分,从而使皮肤重新出现色素沉着,以达到缓解或治愈白癜风目的。阿育魏实是传统的维吾尔药材。原产于埃及、伊朗和阿富

汗等地,我国新疆喀什、和田地区亦有栽培^[3-4]。阿育魏实为味辛性热,具有散寒祛湿,理气开胃,软坚消炎等功能。

用阿育魏实为主所制成的复方制剂消白软膏,在维医中用来清除局部异常黏液质,治疗白癜风^[5-8]。研究通过测定阿育魏实提取物对蘑菇酪氨酸酶活性和黑色素生成的影响,研究治疗白癜风的

[收稿日期] 20130813(016)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJUEDU2011104)

[第一作者] 刘亚亚,在读硕士,从事天然药物化学与药物分析研究,E-mail:lyy3613@sina.com

[通讯作者] *王强,博士,高级工程师,从事天然药物化学研究,Tel:0991-8582966,E-mail:xjuwq@sina.com

作用机制,为研发新的治疗白癜风药物提供基础依据。

1 材料

阿育魏实、补骨脂、驱虫斑鸠菊均购于新疆维吾尔医药市场,经新疆药物研究所杨伟俊博士鉴定为伞形科植物阿育魏 *Trachyspermum ammi* L. Sprague 的成熟果实,标本存放于新疆维吾尔自治区药物研究所标本室。补骨脂素对照品购自阿拉丁(批号 P101248),蘑菇酪氨酸酶(批号 T3824)和 L-多巴(批号 D009)购自美国 Sigma 公司。实验所用试剂均为市售分析纯。

Lambda 17 型紫外-可见分光光度计(PERKIN-ELMER),ZFQ85A 型旋转蒸发器(上海医械专机厂),BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 有限公司),HH-W600 型三用恒温水箱(江苏省金坛市医疗仪器厂)。

2 方法

2.1 阿育魏实回流提取与萃取 将阿育魏实用蒸馏水洗净,放置在阴凉处晾干,粉碎,过 20 目筛。称取 300 g 阿育魏实,用 95% 乙醇回流提取 3 次,趁热过滤,合并滤液。滤液减压回收溶剂,得乙醇提取物(TL_{EO}) 55.14 g。将 TL_{EO} 加水混悬,依次用石油醚(沸程 60~90 °C)、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次,分别减压回收溶剂,得石油醚萃取物(TL_{PE}) 3.95 g,三氯甲烷萃取物(TL_{TM}) 0.83 g,乙酸乙酯萃取物(TL_{EA}) 2.09 g,正丁醇萃取物(TL_{NB}) 3.87 g,并对各部位进行酪氨酸酶激活活性实验。

2.2 酪氨酸酶激活作用的测定^[9] 将上述提取物用适量二甲基亚砷溶解,然后用磷酸缓冲液(0.2 mol·L⁻¹, pH 6.8)定容,制成含不同浓度提取物的溶液。以 5 mmol·L⁻¹ L-DOPA 为底物,在 0.05 mol·L⁻¹

磷酸缓冲液(pH 6.8)的 3 mL 测活体系中,先加入 0.1 mL 不同浓度的提取物于比色杯中,再加入 2.8 mL 预先在 37 °C 恒温水浴保温的底物溶液,然后加入 0.1 mL 蘑菇酪氨酸酶水溶液,立刻混匀,在 37 °C 恒温条件下测定波长为 475 nm 的吸光度(A) 随时间的增长曲线以及 A。

根据在 475 nm 下的 A 计算提取物对酪氨酸酶的激活率(%),并将酶活性激活率(%)达到 50% 时激活剂的浓度测定为 IC₅₀ 值。激活率(%)可以根据下式进行:

$$\text{激活率} = [(C - D) - (A - B)] / (A - B) \times 100\%$$

式中: A = A_{475-药+酶}; B = A_{475-药-酶}; C = A_{475+药+酶}; D = A_{475+药-酶}; 同时以不加样品的测活体系设定空白对照,此外,另取补骨脂乙醇提取物(FP_{EO})、补骨脂素和驱虫斑鸠菊乙醇提取物(VA_{EO})作为阳性参比对照。

2.3 多巴色素自动氧化生成黑色素量的测定

首先,将蘑菇酪氨酸酶 1 mL(100 U)与 5 mmol·L⁻¹ L-DOPA 反应液 1 mL 混合,37 °C 保温 5 min,加入提取物 1 mL,置 37 °C 保温 30 min 最后用 1 mol·L⁻¹ HCl 0.2 mL 终止反应,将反应混合物于 3 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min,弃上清,沉淀物用 6 mol·L⁻¹ 盐酸洗 1 次,蒸馏水洗 2 次离心后的沉淀用 1 mol·L⁻¹ NaOH 3 mL 充分溶解,于 400 nm 处测 A₄₀₀。

$$\text{黑色素生成上调率} = [A_{400\text{加药组}} / A_{400\text{空白对照组}}] \times 100\%$$

本实验提取物质量浓度均选取 10 g·L⁻¹。

3 结果与分析

3.1 阿育魏实不同提取物对酪氨酸酶活性的影响 将阿育魏实不同提取组分配制成 10 g·L⁻¹ 的磷酸缓冲溶液,酪氨酸酶激活率测定结果见表 1。

表 1 阿育魏实不同提取物对酪氨酸酶激活作用

No.	样品名称	质量浓度/g·L ⁻¹	激活率/%	No.	样品名称	质量浓度/g·L ⁻¹	激活率/%
1	TL _{EO}	10	18.05	5	TL _{NB}	10	1.28
2	TL _{PE}	10	-	6	FP _{EO}	10	20.68
3	TL _{TM}	10	-	7	VA _{EO}	10	43.93
4	TL _{EA}	10	25.71	8	补骨脂素	0.5	46.84

阿育魏实 3 种提取物对酪氨酸酶的激活率都为正值,表明 3 种阿育魏实提取物对酪氨酸酶均有不同程度的激活作用。与 10 g·L⁻¹ 补骨脂醇提取物对照组比较,阿育魏实醇提取物对酪氨酸酶的激活调控作用较为显著,达 18.05%;阿育魏实乙酸乙酯提取物具较明显的酪氨酸酶激活作用,激活率达

25.71%。随着阿育魏实乙酸乙酯提取物质量浓度的增加,酪氨酸酶激活率呈上升趋势,表明乙酸乙酯提取物对酪氨酸酶的激活作用与剂量呈正相关。其 IC₅₀ 为 (13.64 ± 7.78) g·L⁻¹, 强于对照品补骨脂 IC₅₀ 为 (21.18 ± 2.88) g·L⁻¹。

3.2 阿育魏实不同提取物对酪氨酸酶黑素合成的

激活作用 阿育魏实不同提取物对酪氨酸酶黑素合成的激活作用如表 2 所示。从表 2 可知,阿育魏实的几种溶剂提取物均有上调黑色素生物合成的功效,其中乙酸乙酯提取物促进黑色素生成的效果更为明显。在 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与对照组 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 补骨脂素的黑色素上调率接近,但小于同浓度的驱虫斑鸠菊的乙醇提取物。阿育魏实乙醇提取物 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时

可使黑素生成的上调率达到 136.79% ;而补骨脂醇提取物在 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平时对黑素生成的上调率仅为 105.71% ,激活效果不如阿育魏实乙醇提取物明显。

3.3 对酪氨酸酶激活的动力学分析 本次实验在测活体系中,固定酶的质量浓度为 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,改变底物(*L*-DOPA)的浓度,测定不同激活剂浓度下的反应初始速率(V_0)。见表 3。

表 2 阿育魏实不同提取物对酪氨酸酶黑素合成的激活作用

No.	样品名称	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	黑色素生成上调率/%	No.	样品名称	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	黑色素生成上调率/%
1	TL _{EO}	10	136.79	5	TL _{NB}	10	126.29
2	TL _{PE}	10	95.11	6	FP _{EO}	10	105.71
3	TL _{TM}	10	138.94	7	VA _{EO}	10	219.26
4	TL _{EA}	10	172.37	8	补骨脂素	0.5	181.58

表 3 阿育魏实乙酸乙酯萃取物对酪氨酸酶的激活动力学参数

质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
0	1.11	34.48	10	0.28	34.48
5	0.4	58.82	15	0.19	58.82

通过阿育魏实乙酸乙酯提取物动力学分析,随着乙酸乙酯浓度的增大, K_m 降低,表明乙酸乙酯对酪氨酸酶催化氧化 *L*-DOPA 具有竞争性激活作用,这可能是由于乙酸乙酯部位有效成分分子结构与 *L*-DOPA 相似,能结合在酶的活性中心上,被催化氧化成二醌,并进一步氧化得到色素,表现出与底物相互竞争酶的特征。

4 结论

阿育魏实乙醇和乙酸乙酯提取物对酪氨酸酶激活作用较明显,对黑素生成具有直接刺激作用,与对照品补骨脂和驱虫斑鸠菊相比,阿育魏实乙酸乙酯提取物对酪氨酸酶激活作用优于临床治疗白癜风药物补骨脂,表明阿育魏实药材乙酸乙酯提取物具有较好的激活酪氨酸酶的作用。研究表明,阿育魏实具有开发成为临床治疗白癜风药物的潜力,但其具体药效成分及作用机制尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Kemp E Helen, Elizabeth A Waterman, Anthony P Weetman. Autoimmune aspects of vitiligo [J]. Autoimmunity, 2001, 34(1):65.
 [2] Abu Tahir M, K Pramod, S H Ansari, et al. Current remedies for vitiligo [J]. Autoimmunity Reviews, 2010, 9(7):516.

[3] Chauhan Baby, Gopal Kumar, Mohammed Ali. A review on phytochemical constituents and activities of *trachyspermum ammi* (L.) Sprague fruits [J]. Amer J Pharm Tech Res, 2012, 2(4):329.
 [4] 吴霞,杨峻山. 阿育魏实化学成分的研究 II [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(14):2.
 [5] Davazdahemami S, F Sefidkon, M R Jahansooz, et al. Chemical composition of the essential oils from foliages and seeds of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) in two planting dates (spring and summer) [J]. J Essen Oil Bear Plants, 2011, 14(5):639.
 [6] Paul S, Kang S C. Studies on the viability and membrane integrity of human spermatozoa treated with essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill fruit [J]. Andrologia, 2012, 44:117.
 [7] 刘勇民,沙吾提依克木. 维吾尔药志 [M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社, 1986:211.
 [8] 阿布都热依木卡地尔. 中华本草——维吾尔药卷 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:201.
 [9] Matsuda Hideaki, Masayuki Higashino, Yoshiaki Nakai, et al. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. Inhibitory effects of some Arctostaphylos plants on melanin biosynthesis [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(1):153.
 [10] 姜泽群. 几种中药有效成分促黑色素生成的机制研究 [D]. 武汉:华中科技大学, 2009.

[责任编辑 邹晓翠]