补骨脂酚对酪氨酸酶活性的影响及动力学分析

李娜，王亚静*，朱光媚，王婷婷，周浩，田倩瑜，张哲
（天津中医药大学 现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心，天津 300193）

［摘要］ **目的**：采用酶促反应动力学方法研究补骨脂酚对酪氨酸单酚酶和二酚酶活性的影响，并考察补骨脂酚对酪氨酸酶的作用机制及动力学参数。**方法**：在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲体系中，分别以 *L*-酪氨酸和左旋多巴为底物，37 ℃反应后在 475 nm处测定吸光度，研究补骨脂酚对酪氨酸酶催化反应进程和酶活性抑制的影响，计算抑制动力学参数。**结果**：补骨脂酚对酪氨酸单酚酶和二酚酶均有抑制作用，半抑制浓度分别为 1.49，0.41 mmol·L^{-1}，其中对酪氨酸二酚酶的抑制作用表现为可逆抑制，其抑制作用表现为竞争性抑制，抑制常数 0.955 mmol·L^{-1}。**结论**：在低浓度范围内，补骨脂酚对酪氨酸酶的抑制作用较熊果苷更明显，具有开发成天然酪氨酸酶抑制剂的潜力。

［关键词］ 化妆品；美白作用；补骨脂酚；酪氨酸酶；动力学；熊果苷；左旋多巴
［中图分类号］ R283.6；R284.1；Q55；R945 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2017)01-0030-04
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010030
［网络出版地址］ http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1457.026.html
［网络出版时间］ 2016-10-27 14:57

Kinetics and Effect of Bacuchiol on Tyrosinase Activity

LI Na, WANG Ya-jing*, ZHU Guang-mei, WANG Ting-ting, ZHOU Hao, TIAN Qian-yu, ZHANG Zhe
(*Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin* 300193, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: By adopting method of enzymatic reaction kinetics to investigate effects of bacuchiol on monophenolase and diphenolase activity of tyrosinase, and to inspect its mechanism and calculate kinetic parameters. **Method**: In the phosphate buffer system at 37 ℃ and pH of 6.8, absorbance was measured at 475 nm, the effect of bacuchiol on catalytic reaction of tyrosinase process was investigated, the inhibition rate of enzyme activity and kinetic parameters of bacuchiol were studied with *L*-tyrosine and *L*-dopa as substrate, respectively. **Result**: Bacuchiol could efficiently inhibit monophenolase and diphenolase activity of tyrosinase, their half inhibitory concentrations were 1.49 mmol · L^{-1} and 0.41 mmol · L^{-1}, respectively. It was found that the inhibition type of diphenolase was a reversible inhibition. Lineweaver-Burk diagram showed that the inhibition effect of bacuchiol on diphenolase was a competitive behavior and its inhibition constant was 0.955 mmol · L^{-1}. **Conclusion**: Compared with arbutin, the inhibition effect of bacuchiol on tyrosinase is more obvious in the low concentration range, so it worths developing into whitening products.

［**Key words**］ cosmetics; whitening effect; bacuchiol; tyrosinase; kinetics; arbutin; *L*-dopa

酪氨酸酶是黑色素合成的关键限速酶，在治疗色素障碍性皮肤病中，酪氨酸酶抑制剂发挥着重要作用[1]。近年来，以酪氨酸酶抑制剂作为美白剂开发的美白祛斑产品均能达到一定功效[2]。传统

［收稿日期］ 20160303(017)
［基金项目］ 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09508-105，2012ZX0903201-046)
［第一作者］ 李娜，在读硕士，从事药物制剂设计研究，Tel：15620501675，E-mail：lixiaona1023@163.com
［通讯作者］ * 王亚静，副研究员，从事药物制剂设计研究，Tel：022-59596169，E-mail：yajing022@163.com

化妆品中应用的多为人工合成的酪氨酸酶抑制剂，由于其含汞化合物的毒性[3]和氢醌的致敏性[4]，使得在化妆品领域应用受到限制[5-6]。中药来源的天然酪氨酸酶抑制剂以其取材天然、效果显著、安全性高等特点日益成为化妆品研发的热点。补骨脂酚为补骨脂挥发油的主要成分，质量分数约占 60%，具有抗炎、抗菌、弱雌激素样作用。已有公司利用补骨脂酚的抗炎、抗菌作用生产了抗粉刺产品，且临床试验显示补骨脂酚不会导致皮肤干燥或刺激[7]。粉刺、炎症等皮肤问题后期常伴随黑色素过度沉着，而目前补骨脂酚对酪氨酸酶活性影响的相关研究、作用机制及动力学分析却鲜有报道。故本实验分别以 *L*-酪氨酸和 *L*-多巴为底物，研究补骨脂酚对酪氨酸酶活性的影响及其作用机制、动力学分析，为补骨脂酚作为酪氨酸酶抑制剂提供理论依据。

1 材料

Synergy HTX 型多功能酶标仪（美国伯腾仪器有限公司）。二甲基亚砜（DMSO）和蘑菇酪氨酸酶（比活力 5 771 U·mg^{-1}，批号 SLBJ5647V）均购自美国 Sigma 公司，补骨脂酚（南京泽朗医药科技有限公司，批号 FY10330710，纯度 98%），熊果苷（天津中新药业，批号 W15-2-3），*L*-酪氨酸和左旋多巴（*L*-dopa）（中国食品药品检定研究院，批号分别为 111577-200201，100170-200303）。

2 方法与结果

2.1 供试液的配制

2.1.1 磷酸盐缓冲液　精密称取磷酸二氢钾 6.805 g，加水定容至 250 mL；精密称定氢氧化钠 0.944 g，加水定容至 118 mL；两者混匀并用水稀释至 1 L，得 pH 6.8 磷酸盐缓冲液（PBS）。

2.1.2 酪氨酸酶溶液　将 50 kU 酪氨酸酶用 PBS 定容至 50 mL 量瓶中，得 1 kU·mL^{-1}酪氨酸酶溶液。

2.1.3 不同浓度补骨脂酚溶液　精密称定补骨脂酚一定量，加 PBS-DMSO（9∶1）混合液溶解，配成不同质量浓度的溶液。

2.1.4 *L*-酪氨酸和 *L*-dopa 溶液　精密称定 *L*-酪氨酸和 *L*-dopa 一定量，加 PBS 溶解并定容至棕色量瓶中，超声 10 min，摇匀后于 4 ℃保存。

2.2 酪氨酸酶活性的测定　根据 Choi 等[8]的方法进行适当调整，总反应体系 100 μL，见表 1。利用微量移液器分别准确吸取 a，b，c，d 中的底物、溶剂、药品置 96 孔板对应位置，每组平行 6 组，混匀，在 25 ℃恒温水浴中恒温 10 min，加入酪氨酸酶，放入 37 ℃恒温水浴中恒温后立即移至酶标仪中，于 475 nm处测定吸光度 A，分别记为 A_a，A_b，A_c，A_d。按 $[1-(A_d-A_c)/(A_b-A_a)]$ 计算样品抑制酪氨酸酶的活性。

表 1　酪氨酸酶活性测定的反应液组成及用量

Table 1　Composition and volume of reaction solution for determination of tyrosinase activity　μL

反应液组成	a	b	c	d
底物	10	10	10	10
溶剂	90	80	70	60
药品	–	–	20	20
酪氨酸酶	–	10	–	10

注：底物为 *L*-酪氨酸或 *L*-dopa，溶剂为 PBS-DMSO（9∶1）混合液，药品为熊果苷或补骨脂酚。酶的终浓度为 200 U·mL^{-1}。

2.2.1 补骨脂酚、熊果苷对酪氨酸单酚酶活性的抑制作用　以 0.5 g·L^{-1} *L*-酪氨酸为底物，熊果苷为阳性对照，将补骨脂酚、熊果苷按相同方法分别配成 0.1，0.2，0.3，0.4，0.5，1.0 mmol·L^{-1}的溶液，按 **2.2** 项下步骤操作，37 ℃恒温水浴中恒温 20 min 立即移至酶标仪中，于 475 nm 处测定 A，比较各浓度下补骨脂酚、熊果苷对酪氨酸单酚酶的抑制情况，见图 1。结果发现在 0.1～0.5 mmol·L^{-1}浓度下，随着补骨脂酚浓度增大，对酪氨酸酶的抑制率逐渐增强，且各浓度下抑制作用明显强于熊果苷。当浓度为 1 mmol·L^{-1}时，二者抑制率相差不大。经浓度自然对数-酶抑制率回归方程计算，补骨脂酚的半抑制浓度（IC_{50}）1.49 mmol·L^{-1}。

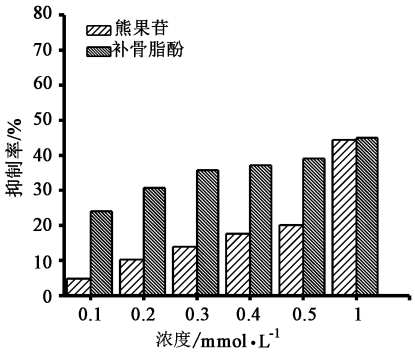

图 1　补骨脂酚、熊果苷对酪氨酸单酚酶活性的抑制作用

Fig. 1　Inhibition of bakuchiol and arbutin on monophenolase for oxidation of tyrosinase

2.2.2 补骨脂酚、熊果苷对酪氨酸二酚酶活性的抑制作用　以 1 g·L^{-1} *L*-dopa 为底物，熊果苷为阳性对照，配制 0.01，0.1，0.2，0.3 mmol·L^{-1}的补骨脂酚和熊果苷溶液，按 **2.2** 项下步骤操作，放入 37 ℃恒温水浴中恒温 10 min，立即移至酶标仪中，于 475 nm 处测定 A，比较各浓度下补骨脂酚、熊果苷对

酪氨酸二酚酶的抑制情况，见图 2。结果发现补骨脂酚在各个实验浓度下对酪氨酸二酚酶的抑制作用均明显强于熊果苷，且呈一定的浓度依赖性。经浓度自然对数-酶抑制率回归方程计算，补骨脂酚的 IC_{50} 0.41 mmol·L^{-1}。由图 1，2 可知，熊果苷对酪氨酸单酚酶有较强的抑制作用，对酪氨酸二酚酶抑制作用较弱，而补骨脂酚不仅对酪氨酸单酚酶有较强的抑制作用，在较低浓度下对酪氨酸二酚酶也有很强的抑制作用。

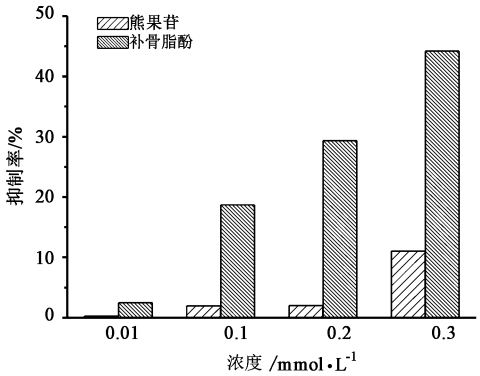

图 2　补骨脂酚、熊果苷对酪氨酸二酚酶活性的抑制作用

Fig. 2　Inhibition of bakuchiol and arbutin on diphenolase for oxidation of tyrosinase

2.3　补骨脂酚对酪氨酸酶抑制作用的机制分析[9]

固定底物 *L*-dopa 添加量为 10 μL，加入不同浓度（0，0.2，0.4 mmol·L^{-1}）的补骨脂酚溶液，酶的添加量分别为 0，8，12，16，20 μL，考察不同浓度补骨脂酚下酶量与酶活力的关系，见图 3。酪氨酸酶抑制剂对二酚酶的抑制作用可分为可逆抑制和不可逆抑制。结果表明补骨脂酚是通过抑制酪氨酸酶的活力来致使酶催化效率降低，而不是通过减少有效酶量所致，提示补骨脂酚对酶的抑制作用为可逆过程。因此，补骨脂酚在美白过程中不存在不可逆转的副作用，如有不适即可停止。

2.4　补骨脂酚对酪氨酸酶的动力学分析[9]　在酶测活体系中，固定加酶量为 20 μL，改变底物 *L*-dopa 浓度（0.6，0.8，1.0，1.25，1.5，2.0 mmol·L^{-1}），测定不同浓度（0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 mmol·L^{-1}）补骨脂酚对酶活力的影响。以底物浓度的倒数（S^{-1}）为横坐标，反应初速度的倒数（v^{-1}）为纵坐标，绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。还可通过比较酶催化反应的动力学参数［表观米氏常数（K_m）和最大反应速度（V_{max}）］变化来判断。催化反应速度按 $v = \Delta A_{475\ nm}/t$（选取 0～3 min 时间段）计算，见图 4。结果得线性拟合方程分别为 $Y = 7.670X + 0.349$，$Y = 8.142X + 0.349$，$Y = 8.766X + 0.353$，$Y = 9.505X + 0.352$，$Y = 10.483X + 0.353$，$Y = 11.550X + 0.349$，R^2 均≥0.98，随着补骨脂酚质量浓度的增大，直线的横轴截距减小，而纵轴的截距固定不变，即 V_{max} 不变（2.86 μmmol·L^{-1}·min^{-1}），K_m 变大（21.94，23.29，25.07，27.18，29.98，33.03 mmol·L^{-1}），符合竞争性抑制。计算抑制常数[10]（*K*）0.955 mmol·L^{-1}。

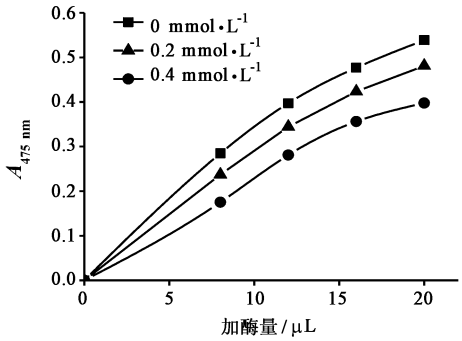

图 3　不同浓度补骨脂酚下酪氨酸酶用量与酶活力的关系

Fig. 3　Effect of bakuchiol on oxidation of *L*-dopa with different concentration of tyrosinase

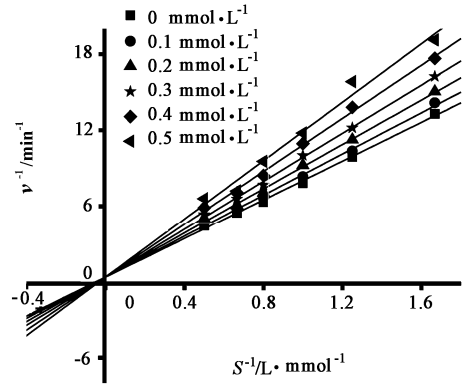

图 4　补骨脂酚对酪氨酸酶催化氧化 *L*-多巴抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 4　Lineweaver-Burk plots of inhibition of bakuchiol on *L*-dopa catalyzed by tyrosinase

3　讨论

酪氨酸酶是一种结构复杂的含铜金属酶，又称多酚氧化酶、儿茶酚氧化酶，广泛存在于微生物、动植物及人体中[11]。酪氨酸酶的活性与黑色素合成有密切关系，是黑色素合成的关键限速酶，具有单酚酶活性和二酚酶活性[12]，能够催化 *L*-酪氨酸羟化成 *L*-dopa（单酚酶活性），并把 *L*-dopa 氧化成多巴醌（二酚酶活性），进而经过一系列反应生成黑色素[13]。黑色素在皮肤基底层大量积累会造成色素过度沉着从而引起雀斑、黄褐斑、老年斑等[14]。因此，抑制酪氨酸酶活性可减少黑色素生成，实现美白

效果。目前市场上公认并商业化的酪氨酸酶抑制剂为熊果苷,有研究指出熊果苷在不稳定条件下会出现一定程度的分解趋势,熊果苷会分解成氢醌和葡萄糖,而氢醌对皮肤有致敏性[15]。也有研究表明熊果苷过度使用会对皮肤造成永久性不可逆白斑。故开发一种新型的安全有效的酪氨酸酶抑制剂非常必要。

本研究发现补骨脂酚对酪氨酸酶具有抑制作用,可同时抑制酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活力。在低浓度范围内,补骨脂酚对酪氨酸酶的抑制作用明显高于熊果苷,对酪氨酸二酚酶的抑制作用表现为竞争性可逆抑制,如有不适,可立即停止使用,不会对皮肤造成不可逆转的副作用。提示补骨脂酚有抑制黑色素生成的作用,可考虑作为酪氨酸酶抑制剂应用于化妆品中,也可能对炎症后色素沉着有一定的淡化作用,为开发一种新型功能性化妆品奠定基础。但本实验仅通过生化酶学法考察补骨脂酚的美白功效,未涉及细胞、动物实验,与其他药物复配使用也尚不清晰,仍需进一步研究证实。

[参考文献]

[1] 邹先伟,蒋志胜. 植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展[J]. 中草药,2004,35(6):702-705.

[2] 吕静. 简述美白祛斑类化妆品[J]. 科技创新与应用,2012(13):32-33.

[3] Gholamhoseinian A, Razmi Z. Screening the methanolic extracts of some plants for tyrosinase inhibitory activity [J]. Toxicol Environ Chem, 2011, 94(2):310-318.

[4] Park S H, Oh T H, Kim S S, et al. Constituents with tyrosinase inhibitory activities from branches of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2012, 27(3):390-394.

[5] 万玉萍,孙灿,王建华,等. 1997—2007 云南省市售护肤类化妆品中氢醌、苯酚监督及检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(8):1599-1600.

[6] 罗碧,李国柱,王立军,等. 薰衣草花提取物对酪氨酸酶的抑制作用研究[J]. 日用化学工业,2015,45(2):90-93.

[7] 于悦,王亚静,皮佳鑫,等. 补骨脂酚研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2013,37(2):174-176.

[8] Choi H K, Lim Y S, Kim Y S, et al. Free-radical-scavenging and tyrosinase-inhibition activities of Cheonggukjang samples fermented for various times[J]. Food Chem, 2008, 106(2):564-568.

[9] 龚盛昭,邓相庆,李仕梅. 对羟基肉桂酸抑制酪氨酸酶活性的动力学研究[J]. 日用化学工业,2006,36(3):159-162.

[10] 龚盛昭,张凯,孙永. 总银杏酸对酪氨酸酶活性的影响及动力学研究[J]. 精细化工,2015,32(4):443-446.

[11] Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1247(1):1-11.

[12] 刘晓丹,黄璜,陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2003,42(1):102-106.

[13] 徐迪,马林,张凌,等. 酪氨酸酶催化氧化羟基吡啶类化合物的反应研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2002,41(6):33-35.

[14] Sima V H, Patris S, Aydogmus Z, et al. Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: Application to the skin whitening agents[J]. Talanta, 2011, 83(3):980-987.

[15] 佟文鑫,李佳兴,刘东红. 化妆品基础环境对 β-熊果苷稳定性的影响[J]. 日用化学品科学,2010,33(11):15-18,43.

[责任编辑 刘德文]