

甘草黄酮类化合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制

傅博强¹, 李欢¹, 王小如^{1,2,3*}, LEE Frank SC^{2,3}

- (1. 厦门大学化学化工学院化学系现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005;
2. 国家海洋局第一研究所环境与生命过程中物质迁移与反应机理研究室, 青岛 266061;
3. 青岛市现代分析科学及中药标准化重点实验室, 青岛 266061)

摘要:研究了甘草中四种黄酮类化合物甘草甙、异甘草素-葡萄糖芹菜甙、异甘草甙和甘草查耳酮甲对酪氨酸酶单酚酶活性的抑制。结果表明异甘草素-葡萄糖芹菜甙、异甘草甙和甘草查耳酮甲的 IC_{50} 分别为 0.072 mM, 0.038 mM, 0.0258 mM, 它们都属于竞争性抑制剂, 甘草甙没有抑制活性。研究表明, 异甘草素-葡萄糖芹菜甙、异甘草甙和甘草查耳酮甲可以作为潜在的美白化妆品添加剂。

关键词:甘草; 黄酮; 酪氨酸酶; 抑制

中图分类号: R282.71

Inhibitory Effects of Several Licorice Flavonoids on the Monophenolase Activity of Tyrosinase

FU Bo-qiang¹, LI Huan¹, WANG Xiao-ru^{1,2,3*}, LEE Frank SC^{2,3}

- (1. Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Sciences of the Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Material Transport & Transformation in Environment & Life Processes Lab, First Institute of Oceanography, Qingdao 266061, China;
3. Qingdao Key Lab of Analytical Science and Standardization of Chinese Medicines, Qingdao 266061, China)

Abstract: The inhibitory effects of several licorice flavonoids including liquiritin, licuraside, isoliquiritin and licochalcone A on the monophenolase activity of tyrosinase were studied. The results indicated that the IC_{50} values of licuraside, isoliquiritin and licochalcone A were 0.072 mM, 0.038 mM, 0.0258 mM, respectively, and they are all competitive inhibitors. These flavonoids have the potential to be further developed into effective skin whitening agents. Different from the above flavonoids, no inhibitory activity was observed for liquiritin.

Key words: licorice; flavonoids; tyrosinase; inhibition

甘草 (*Glycyrrhiza*) 是最常见的中草药, 截至 1995 年, 国内外已从甘草中分离得到 106 种黄酮类化合物^[1]。现代药理研究表明, 甘草黄酮具有抗氧化^[2]、抗溃疡^[3]、抗病原微生物^[4]以及抑制人体中某些酶的作用^[5], 甘草黄酮正日益被国际医药市场看好。酪氨酸酶 (tyrosinase) 是皮肤黑素生物合成的关键酶, 它有两个主要功能: 作为单酚酶, 羟基化单酚生成邻二酚; 作为双酚酶, 氧化邻二酚生成邻醌^[6]。雀斑、黄褐斑、老人斑等的形成, 实际上是体内酪氨酸

代谢的失调和色素的异常沉积造成。抑制酪氨酸酶活性, 可改善皮肤中色素细胞的酪氨酸酶的代谢, 阻止色素沉着形成。天然产物化妆品, 特别是加有中草药有效活性成分的化妆品的开发越来越受到国内外厂商的高度重视。市场调查发现, 兰蔻、雅芳、妮维雅等美白产品均使用了甘草提取物或甘草黄酮^[8]。已有一些研究揭示了甘草抑制酪氨酸酶的物质基础和量效关系, 雷铁池等^[9]研究发现 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 18-甘草酸双铵盐对体外培养 B16 F10 鼠黑素瘤细胞的酪氨酸酶活性和黑素含量抑制的效果与 50 $\mu\text{mol/L}$ 的熊果苷无统计学上的差异 ($P > 0.05$)。Yokota 等^[10]的研究证明 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的甘草黄

收稿日期: 2005-03-22

接受日期: 2005-04-08

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20235020)

*通讯作者 Tel: 86-532-88963253; E-mail: mt2elp@fio.org.cn

酮 glabridin 可以降低 B16 鼠黑素瘤细胞中 T1 和 T3 酪氨酸酶同功酶的活性, 0.5% glabridin 可以抑制 UVB 诱导的豚鼠皮肤色素和红斑的生成。Nerya 等^[11]的研究证明甘草黄酮 glabrene 和 isoliquiritigenin 可以抑制酪氨酸酶中的单酚酶和二酚酶活性, IC_{50} 值分别为 3.5 和 8.1 μM 。本文的主要目的是研究我们从乌拉尔甘草中分离纯化得到的四种甘草黄酮: 甘草甙、异甘草素-葡萄糖芹菜甙、异甘草甙和甘草查耳酮甲对酪氨酸酶单酚酶活性的影响, 探讨它们对酪氨酸酶的抑制类型及作用机理, 以期得到甘草中新的皮肤美白添加剂, 并为甘草提取物作为增白剂提供分子机理上的理论依据。

1 材料与方法

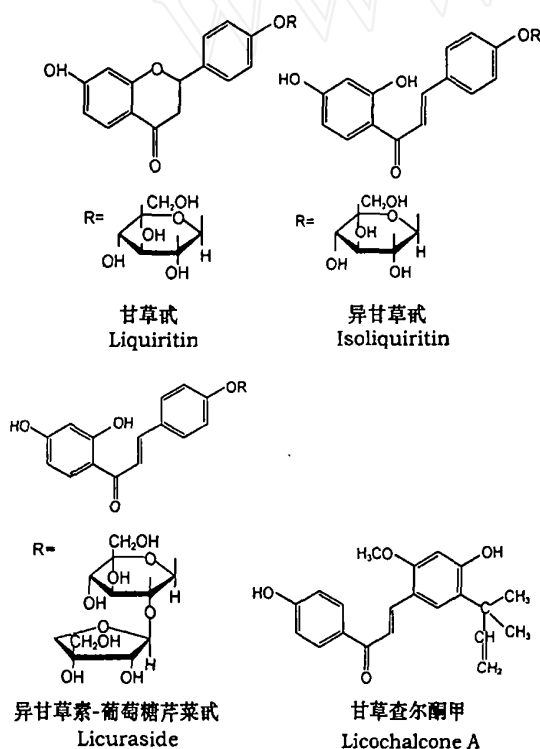


图1 四种甘草黄酮的化学结构

Fig. 1 Molecular structure of the four licorice flavonoids investigated in this study

1.1 材料

酪氨酸酶购于 Fluka 化学公司, 从蘑菇提取纯化, 酶的比活力为 2440 U/mg (25 $^{\circ}\text{C}$)。二甲亚砜 (DMSO) 为 Sigma 化学公司产品; L-酪氨酸 (L-Tyr) 为 Fluka 化学公司产品。磷酸氢二钠、磷酸二氢钾为国产分析纯, 甘草黄酮类化合物为本室从梁外乌拉尔

甘草中分离纯化, 经结构鉴定, 分别为甘草甙 (Licuritin)、异甘草素-葡萄糖芹菜甙 (Licuraside)、异甘草甙 (Isoliquiritin), NMR, UV-Vis 和 MS 数据与文献报道^[12,13]一致。甘草查耳酮甲 (Licochalcone A) 由本室王巧娥博士用高速逆流色谱仪纯化^[14]。四种甘草黄酮的结构见图 1。使用的超纯水用 Millipore Milli-Q⁵⁰超纯水机制备。

样品用 AT21 Comparator 型电子天平 (METTLER TOLEDO, 瑞士) 称量。酶活力用 SPECTRA max M2 (Molecular Devices Co., USA) 多功能酶标仪测定。

1.2 方法

酪氨酸酶单酚酶活力测定^[15]: 在 96 孔板中, 加入 10~30 μL 预先在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴保温的 5 mmol/L L-酪氨酸溶液到磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 体系中, 然后加入 1~6 μL 的甘草黄酮纯品 (溶于 DMSO 溶液), 甘草甙、异甘草素-葡萄糖芹菜甙、异甘草甙和甘草查耳酮甲的浓度分别为: 5.203 mmol/L, 4.636 mmol/L, 2.974 mmol/L, 2.92 mmol/L。30 $^{\circ}\text{C}$ 保温孵育 5 min 后加入一定量的蘑菇酪氨酸酶水溶液, 立刻混匀。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下用多功能酶标仪在 475 nm 测定吸光度值, 每个样品做 3 个平行样。以未加酶的体系为空白, 作出吸光度随时间的增长直线, 从直线的斜率求得酶活力。

L-酪氨酸的终浓度为 0.25 mmol/L, 加入酪氨酸酶水溶液 30 μL , 测定不同甘草黄酮纯品加入量 (1、2、4、6 μL), 即不同浓度甘草黄酮对酪氨酸酶单酚酶活性的抑制程度, 以抑制率对抑制剂浓度作图, 由图求出抑制酶活力 50% 时所需抑制剂的浓度, 即 IC_{50} 值。固定 5 mmol/L 的 L-酪氨酸的加入量为 30 μL , 改变加入的酪氨酸酶的量, 依次为 10、20、30、40 μL , 测定在一系列甘草黄酮加入量 (对异甘草甙和甘草查耳酮甲为 1、2、3、4 μL , 对异甘草素-葡萄糖芹菜甙为 1、2、4、6 μL) 条件下对酪氨酸酶催化 L-酪氨酸羟甲基化活力的影响。以剩余酶活力对加入的酶量作图, 判断抑制反应是否可逆。

固定酶的终浓度为 13.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 改变底物 L-酪氨酸浓度, 测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 判断抑制剂的抑制类型。通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化反应的动力学参数, 包括表观米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 的变化, 对酶的抑制作用机理进行判断。

甘草黄酮对酪氨酸酶的抑制率按下式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

其中 A_0 为无抑制剂时空白的酶活力, A_I 为有抑制剂时的酶活力。

2 结果

2.1 四种甘草黄酮对酪氨酸酶单酚酶活力的影响

抑制率对抑制剂浓度的关系曲线见图 2, 并得出异甘草素-葡萄糖芹菜甙、异甘草甙和甘草查耳酮甲的 IC_{50} 分别为 0.072 mmol/L, 0.038 mmol/L, 0.0258 mmol/L。甘草甙没有抑制活性。

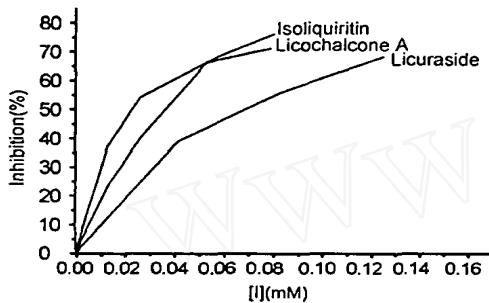


图 2 异甘草素葡萄糖芹甙、异甘草甙与甘草查耳酮甲对酪氨酸酶活力的抑制与浓度的关系曲线

Fig. 2 The relationship between the inhibition on tyrosinase and the concentration of inhibitor including licuraside, isoliquiritin and licochalcone A

2.2 三种对酪氨酸酶单酚酶活性有抑制的甘草黄酮抑制效应机理的判断

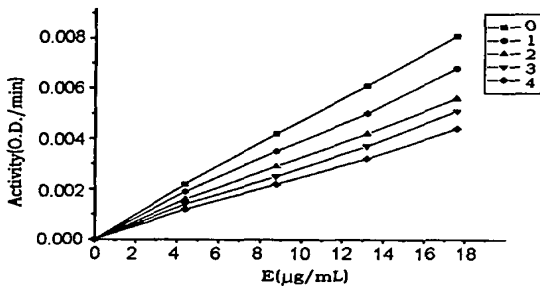


图 3 异甘草甙对酪氨酸酶抑制效应机理判断

(0、1、2、3、4 对应的抑制剂浓度分别为 0、0.014、0.029、0.045、0.059 mmol/L)

Fig. 3 Determination of the inhibitory mechanism of isoliquiritin on tyrosinase. Concentrations of isoliquiritin for curves 0 ~ 4 were 0、0.014、0.045、0.059 mmol/L, respectively.

图 3、4、5 表示酪氨酸酶经异甘草甙、异甘草素葡萄糖芹甙与甘草查耳酮甲作用后的剩余酶活力与加入的酶量间的关系。酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线, 随着甘草黄酮浓度的增大, 直线的斜率降低, 说明

这三种甘草黄酮对酪氨酸酶的抑制属于可逆过程。它们是通过抑制酶活力而导致催化效率的下降, 而不是通过降低有效的酶量来达到酶活力的下降。

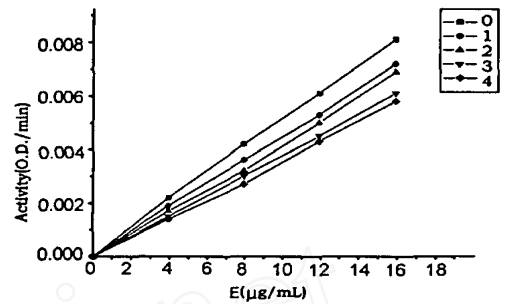


图 4 异甘草素-葡萄糖芹菜甙对酪氨酸酶抑制效应机理判断 (0、1、2、3、4 对应的抑制剂浓度分别 0、0.023、0.046、0.093、0.14 mmol/L)

Fig. 4 Determination of the inhibitory mechanism of licuraside on tyrosinase. Concentrations of licuraside for curves 0-4 were 0、0.023、0.046、0.093、0.14 mmol/L, respectively.

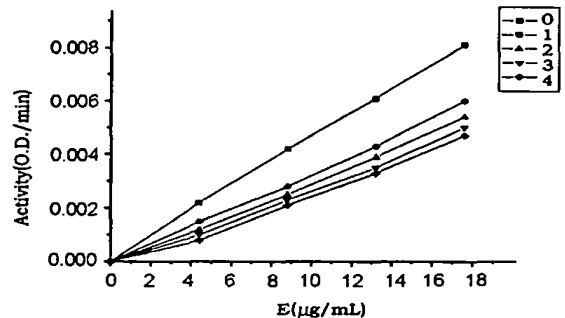


图 5 甘草查耳酮甲对酪氨酸酶抑制效应机理判断 (0、1、2、3、4 对应的抑制剂浓度分别为 0、0.014、0.029、0.044、0.058 mmol/L)

Fig. 5 Determination of the inhibitory mechanism of licochalcone A on tyrosinase. Concentrations of licochalcone A for curves 0 ~ 4 were 0、0.014、0.029、0.044、0.058 mmol/L, respectively.

2.3 三种对酪氨酸酶单酚酶活性有抑制的甘草黄酮的抑制机理的判断

在测活体系中, 固定酶的浓度, 改变底物 L-酪氨酸的浓度, 测定一系列不同浓度抑制剂对酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 判断抑制剂的抑制类型。由图 6、图 7、图 8 可见三种甘草黄酮的 Lineweaver-Burk 双倒数图均为相交于 $1/V_{max}$ 轴的一组直线, 不管抑制剂浓度如何, 这组直线的纵截距不变, 仍为 $1/V_{max}$ 。但各直线的斜率 K_{app}/V_{max} 随抑制剂

浓度的增加而增加,横截距则随抑制剂浓度的增加其负值增加。说明最大反应速度 (V_m) 不随抑制剂浓度变化,米氏常数 (K_m) 随着抑制剂浓度增大而增加。

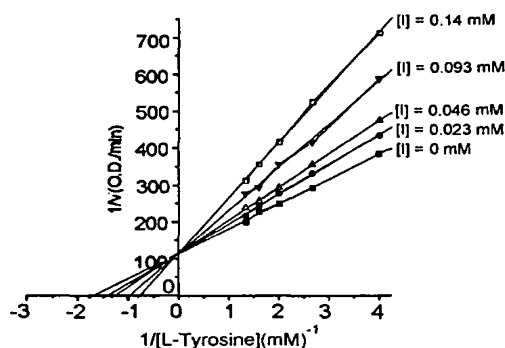


图6 异甘草素葡芹甙:不同固定抑制剂浓度 [I] 下的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 6 Lineweaver-Burk plots of licuraside at different concentrations

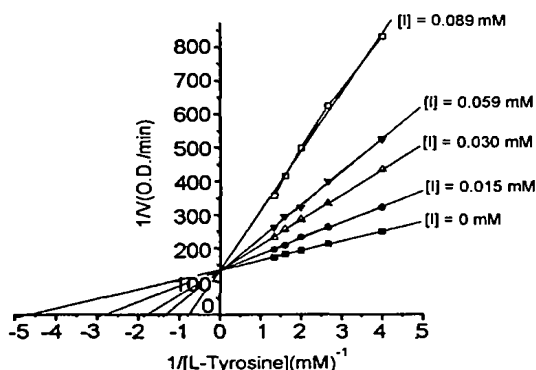


图7 异甘草甙:不同固定抑制剂浓度 [I] 下的 Lineweaver-Burk 双倒数

Fig. 7 Lineweaver-Burk plots of isoliquiritin at different concentrations

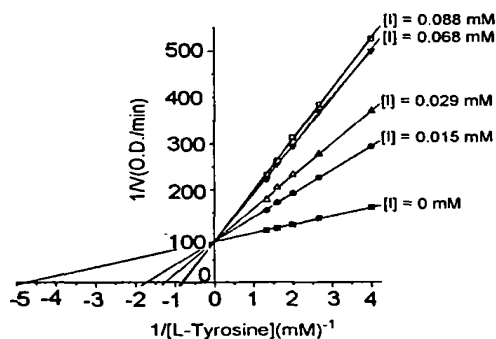


图8 甘草查耳酮甲:不同固定抑制剂浓度 [I] Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 8 Lineweaver-Burk plots of licochalcone A at different concentrations

3 讨论

异甘草素-葡萄糖芹菜甙、异甘草甙和甘草查耳酮甲抑制酪氨酸酶单酚酶活性的 IC_{50} 值分别为 0.072、0.038、0.0258 mM,甘草甙没有抑制活性。这可能是由于它们结构的不同造成的,四种黄酮中只有甘草甙为双氢黄酮,其它三种都为查尔酮,查尔酮的结构与 L-酪氨酸更类似,从而易于与酶活中心结合而对酶产生抑制,而且双氢黄酮分子的刚性大,所以甘草甙没有抑制活性。三种查尔酮中,甘草查耳酮甲为甙元,与酪氨酸酶活中心结合的空间位阻最小,因而 IC_{50} 值最小,异甘草甙为单糖黄酮甙,异甘草素-葡萄糖芹菜甙为双糖黄酮甙,前者分子小于后者,因而异甘草甙的 IC_{50} 值小于异甘草素-葡萄糖芹菜甙。

由 Lineweaver-Burk 双倒数图可知,酶与底物结合的亲和常数 $1/K_m$ 随抑制剂浓度增大而减小,说明其抑制机理表现为竞争型效应。竞争性抑制剂只增加酶-底物结合的表观 K_m (K_{mapp}),即 [I] 增加, K_{mapp} 就增加;而 V_{max} 保持不变。说明这三种甘草黄酮只与自由酶结合,与酪氨酸竞争酶活位点,把一部分酪氨酸酶从黑色素合成的催化环中带走,降低酪氨酸酶在其中的浓度,阻止底物 L-酪氨酸与酪氨酸酶的结合, L-酪氨酸不能与酶抑制剂的复合物 EI 结合,抑制剂甘草黄酮也不能与酶底物的复合物 ES 结合,从而抑制黑色素的合成。它们属于羟基型的酪氨酸酶抑制剂^[16],从而可以作为潜在的美白化妆品添加剂。

参考文献

- Hu JF(胡金锋), Shen F(沈凤嘉). A survey of the studies on chemical constituents of *Glycyrrhiza*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1996, 8(3): 77-91
- Haraguchi H, Ishikawa H, Mizutani K, et al. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorg Med Chem*, 1998, 6: 339-347
- Fukai T, Marumo A, Kaitou K, et al. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life Sci*, 2002, 71: 1449-1463
- Tanaka Y, Kikuzaki H, Fukuda S, et al. Antibacterial compounds of licorice against upper airway respiratory tract pathogens. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), 2001, 47: 270-273
- Jia GH(贾国惠), Jia SS(贾世山). Developments in the pharmacological function of licorice flavonoids. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998, 33: 513-516

- 6 Alvaro SF, Jos éNeptuno RL, Francisco GC, *et al.* Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *BBA-Protein Struct M*, 1995, 1247(1): 1-11
- 7 Xu BJ(徐宝军), Zheng YN(郑毅男), Wang YQ(王永奇). Study on brightening of natural product. *Chin Surf Detergent Cosmetics* (日用化学工业), 2001, 31(4): 65-66
- 8 Wu ZG(吴志刚), Wu S(吴书). New era of whitening. *Chin Cosmetics* (中国化妆品), 2001, 92(20): 20-28
- 9 Lei TC(雷铁池), Zhu WY(朱文元), Xia MY(夏明玉), *et al.* Comparative studies on regulation of melanogenesis in the responses of murine melanoma cells to ammonium glycyrrhizinate, arbutin and hydroquinone. *J Clin Dermatol* (临床皮肤科杂志), 2002, 29(2): 69-72
- 10 Yokota T, Nishio H, Kubota Y, *et al.* The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res*, 1998, 11: 355-361
- 11 Nerya O, Vaya J, Musa R, *et al.* Gabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 1201-1207
- 12 Liu Q(刘勤), Liu YL(刘永隆). Studies on chemical constituents of *Glycyrrhiza eurycarpa* P. C. Li. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1989, 24: 525-531
- 13 Liu Q(刘勤), Liu YL(刘永隆). Studies on chemical constituents of *Glycyrrhiza eurycarpa* P. C. Li (). *Acta Bot Sin* (植物学报), 1991, 33: 314-322
- 14 Wang QE, Lee SC, Frank, Wang XR. Isolation and purification of inflacoumarin A and licochalcone A from licorice by high speed counter-current chromatography. *J Chroma A*, 2004, 1048: 51-57
- 15 Huang H(黄璜), Song KK(宋康康), Chen QX(陈清西). Studies on whitening effect of kojic acid as cosmetic additive. *J Xiamen Univer, Nat Sci Edit* (厦门大学学报, 自然科学版), 2003, 42: 652-656
- 16 Li SY(李韶勇), Sun M(孙命), Qu N(曲娜), *et al.* The synthesis of melanin and the mechanism of its common inhibitor. *J of Tianjin Normal Univer, Nat Sci Edit* (天津师范大学学报, 自然科学版), 2002, 22(1): 17-21