

# 药用植物对蘑菇酪氨酸酶激活作用的研究

陈良华<sup>1,2</sup>, 邱凌<sup>1</sup>, 明艳林<sup>2</sup>, 钟雪<sup>1</sup>, 童庆宣<sup>2</sup>, 陈清西<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门华侨亚热带植物引种园, 药用植物与植物药研发中心, 福建 厦门 361002)

**摘要:**以采集自厦门周边地区的 15 种药用植物为材料, 研究药用植物的提取分离物对蘑菇酪氨酸酶的效应. 结果表明: 绞股蓝乙醇提取物、金毛狗脊乙醇提取物、爵床乙醇提取物、大青乙醇提取物、溪黄草石油醚和乙酸乙酯萃取物、千里光乙酸乙酯和正丁醇萃取物、翅柄马兰石油醚和乙酸乙酯萃取物, 以及金酸枣正丁醇萃取物具有轻微激活作用, 激活率分别为 3.4%、20%、20%、40%、38.3%、27.6%、36%、42%、20%、50% 和 30%; 扭序花正丁醇萃取物、野慈姑乙醇提取物、毛麝香乙醇提取物、使君子乙酸乙酯和正丁醇萃取物、冬青氯仿萃取物具有较好的激活作用, 激活率分别为 55%、60%、68.2%、62%、60% 和 80%; 而金酸枣石油醚萃取物、冬青乙酸乙酯萃取物、斑鸠菊正丁醇萃取物和白面风乙醇提取物具有明显的激活作用, 激活率分别为 120%、150%、170% 和 327%. 动力学分析激活机理主要有混合性、竞争性和反竞争性 3 种激活类型.

**关键词:**酪氨酸酶; 药用植物; 激活作用; 动力学

**中图分类号:** Q 356.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479 (2008) S2-0110-05

白癜风是由多种原因引起的色素代谢障碍性疾病, 临床上以皮肤色素脱失斑为特征. 由于酪氨酸酶是各种生物体内色素形成的关键酶, 在多种能决定黑素生成的类型、数量和质量因素中, 黑素细胞中酪氨酸酶的活性是调节黑素生成的关键因素之一, 所以能够激活酪氨酸酶、增强其活性的药物, 可促进色素的合成, 有助于白癜风损区色素的恢复<sup>[1-2]</sup>. 自然界中不乏对白癜风有治疗作用, 对酪氨酸酶活力起调节作用的植物, 但它们是否在黑素生成中起作用还有待进一步证实. 我们就采集厦门周边地区的 15 种药用植物对酪氨酸酶活性的作用及酶动力学进行了体外实验研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

15 种药用植物绞股蓝、金毛狗脊、爵床、大青、溪黄草、千里光、翅柄马兰、金酸枣、扭序花、野慈姑、毛麝香、使君子、冬青、斑鸠菊和白面风均采自厦门周边地区同安、海沧、集美和鼓浪屿等, 经福建省亚热带植物研究所植物分类学家张永田研究员鉴定; 蘑菇酪氨酸

酶 (Mushroom Tyrosinase) 购自 Sigma 化学公司, L-多巴 (L-DOPA) 购自 Aldrich 公司, 其他试剂为国产分析纯, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水.

### 1.2 方法

(1) 植物乙醇提取物制备: 采集的药用植物除杂晒干, 经高速粉碎机粉碎后, 分别称取粉末置三角瓶中, 加入 8~10 倍量的 75% 乙醇溶液, 60℃ 水浴条件下浸提 24 h, 经抽滤获得乙醇提取液, 提取液通过旋转蒸发仪减压浓缩, 回收溶剂, 冻干样品, 获得乙醇提取物, 称取适量提取物, 用双蒸水溶解, 配制成浓度为 15 mg/mL 的样品, 备用.

(2) 植物提取物溶剂极性递增分离法制备: 药用植物乙醇提取液浓缩成浸膏, 用水溶解悬浮, 悬浮液置梨式分液漏斗中, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇有机溶剂萃取, 各萃取液经旋转蒸发仪减压浓缩, 回收溶剂, 冻干样品, 乙醇提取物极性递增分离成石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物; 称取适量萃取物, 用双蒸水溶解, 配制成浓度为 15 mg/mL 的样品, 备用.

(3) 酶反应及其动力学的研究: 参考文献 [3], 在 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 的测活体系中, 以 0.5 mmol/L 的 L-DOPA 为底物, 分别加入不同浓度的样品和酶液, 最终反应体系为 3.0 mL, 效应物的终浓度为 0~0.5 mg/mL, 酶浓度为 3.33 μg/mL, 以双蒸水作为实验对照. 30℃ 恒温条件下测定波长为 475 nm

收稿日期: 2008-08-28

基金项目: 国家基础科学人才培养基金项目 (J0630649), 福建省重点科技项目 (2007N0051) 和厦门市科技创新项目 (3502Z20062008) 资助

\* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

的光密度值 ( $OD_{475nm}$ ) 随着时间的增长直线,从直线的斜率求得酶活力,产物的消光系数按  $3700 L / (mol \cdot cm)$  计算<sup>[4]</sup>. 固定提取物的浓度 ( $0.2 mg/mL$ ), 改变底物浓度,用 Lineweaver-Burk 双倒数作图,通过所得直线求出激活剂作用下的表观米氏常数 ( $K_{mapp}$ ) 和表观最大反应速度 ( $V_{mapp}$ ), 与不加效应物时原始的  $K_m$  和  $V_m$  进行比较,以判定激活剂作用于底物和酪氨酸酶的方式.

## 2 结果

### 2.1 药用植物对酪氨酸酶激活作用的筛选

采集的 15 种药用植物,根据样品的数量制备成不同层次的测试样品,少量的样品制备获得乙醇提取物,大量的样品以极性递增分离法制备成石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物.在以 L-多巴为底物的测活体系中,加入效应物浓度为  $0.40 mg/mL$ ,检测酪氨酸酶激活作用,同时以不加样品的测活体系设定空白对照.结果(表 1)表明绞股蓝乙醇提取物、金毛狗脊乙醇提取物、爵床乙醇提取物、大青乙醇提取物、溪黄草石油醚和乙酸乙酯萃取

表 1 15 种药用植物对酪氨酸酶激活作用

Tab 1 The effect of 15 kind of medicine plants on the active of tyrosinase

药用植物	样品	样品浓度 / ( $mg \cdot mL^{-1}$ )	激活率 / %
绞股蓝 <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Mak	乙醇提取物	0.4	3.4
金毛狗脊 <i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Sm.	乙醇提取物	0.4	20
爵床 <i>Rostellularia procumbens</i> (L.)	乙醇提取物	0.4	20
大青 <i>Clerodendron cyrtophyllum</i> Turcz.	乙醇提取物	0.4	40
溪黄草 <i>Rabdosia serra</i> (Maxim.)	石油醚萃取物	0.4	38.3
	乙酸乙酯萃取物	0.4	27.6
千里光 <i>Senecio scandens</i> Buch-Ham.	乙酸乙酯萃取物	0.4	36
	正丁醇萃取物	0.4	42
翅柄马兰 <i>Pteracanthus alatus</i> (Wall. ex Nees) Bremek	石油醚萃取物	0.4	20
	乙酸乙酯萃取物	0.4	50
金酸枣 <i>Spondias cytherea</i> Sonn.	正丁醇萃取物	0.4	30
	石油醚萃取物	0.4	120
扭序花 <i>Clinacanthus nutans</i> (Burm. f.) Lindan	正丁醇萃取物	0.4	55
野慈姑 <i>Sagittaria trifolia</i> L.	乙醇提取物	0.4	60
毛麝香 <i>Adenosma glutinosum</i> (Linn.) Druce	乙醇提取物	0.4	68.2
使君子 <i>Rangoon creeper</i>	乙酸乙酯萃取物	0.4	62
	正丁醇萃取物	0.4	60
冬青 <i>Ilex Chinensis</i> Sims	氯仿萃取物	0.4	80
	乙酸乙酯萃取物	0.4	170
斑鸠菊 <i>Vernonia solanifolia</i> Benth.	正丁醇萃取物	0.4	150
白面风 <i>Inula cappa</i> (Buch-Ham.) DC.	乙醇提取物	0.4	327

物、千里光乙酸乙酯和正丁醇萃取物、翅柄马兰石油醚和乙酸乙酯萃取物,以及金酸枣正丁醇萃取物具有轻微激活作用,激活率分别为 3.4%、20%、20%、40%、38.3%、27.6%、36%、42%、20%、50%和 30%;扭序花正丁醇萃取物、野慈姑乙醇提取物、毛麝香乙醇提取物、使君子乙酸乙酯和正丁醇萃取物、冬青氯仿萃取物具有较好的激活作用,激活率分别为 55%、60%、68.2%、62%、60%和 80%;而金酸枣石油醚萃取物、冬青乙酸乙酯萃取物、斑鸠菊正丁醇萃取物和白面风乙醇提取物具有明显的激活作用,激活率分别为 120%、150%、170%、和 327%。表明 15种药用植物的提取物和萃取物对酪氨酸酶都有不同程度的激活作用。

### 2.2 具有明显激活作用的药用植物对酪氨酸酶的浓度效应

在以 L-多巴为底物的测活体系中,加入不同浓度的样品,检测 4种药用植物对酪氨酸酶激活作用的浓度效应,同时以不加样品的测活体系设定空白对照。由图 1-A 可知金酸枣石油醚萃取物在低浓度下有轻微的

抑制作用,随浓度的增加激活作用逐渐增强,当浓度达 0.4 mg/mL 时激活率为 120%;由图 1-B 可知冬青乙酸乙酯萃取物在 0~0.1 mg/mL 浓度范围,对酶具有一定的激活作用,随浓度的增加激活作用显著增强,当浓度达 0.4 mg/mL 时激活率为 150%;由图 1-C 可知斑鸠菊正丁醇萃取物在 0~0.4 mg/mL 浓度范围,随效应物浓度的增加,酶的活力不断增强,当浓度达 0.4 mg/mL 时激活率为 170%;由图 1-D 可知白面风乙醇提取物对酪氨酸酶具显著激活作用,随效应物浓度的增加激活率显著提高,当浓度达 0.4 mg/mL 时激活率为 327%。

### 2.3 药用植物对酪氨酸酶激活作用的动力学分析

用 Lineweaver-Burk 双倒数作图,通过所得直线求出激活剂作用下的表观米氏常数 ( $K_{m,app}$ )和表观最大反应速度 ( $V_{m,app}$ ),与不加效应物时原始的  $K_m$  和  $V_m$  进行比较 (见表 2),以判定药用植物对酪氨酸酶的激活类型。结果表明 (图 2) 毛麝香乙醇提取物,千里光正丁醇萃取物、冬青氯仿萃取物和大青乙醇提取

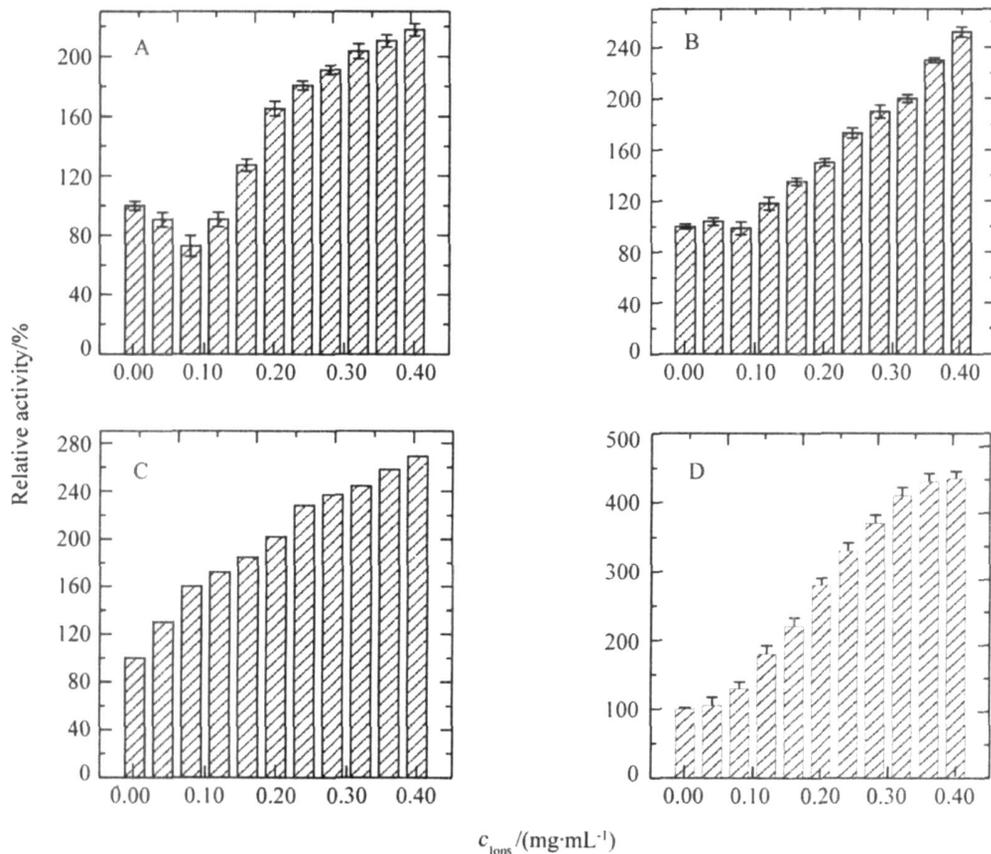


图 1 药用植物对酪氨酸酶的激活作用

A. 金酸枣石油醚萃取物; B. 冬青乙酸乙酯萃取物; C. 斑鸠菊正丁醇萃取物; D. 白面风乙醇提取物

Fig 1 The activation effect of medicine plants on the tyrosinase

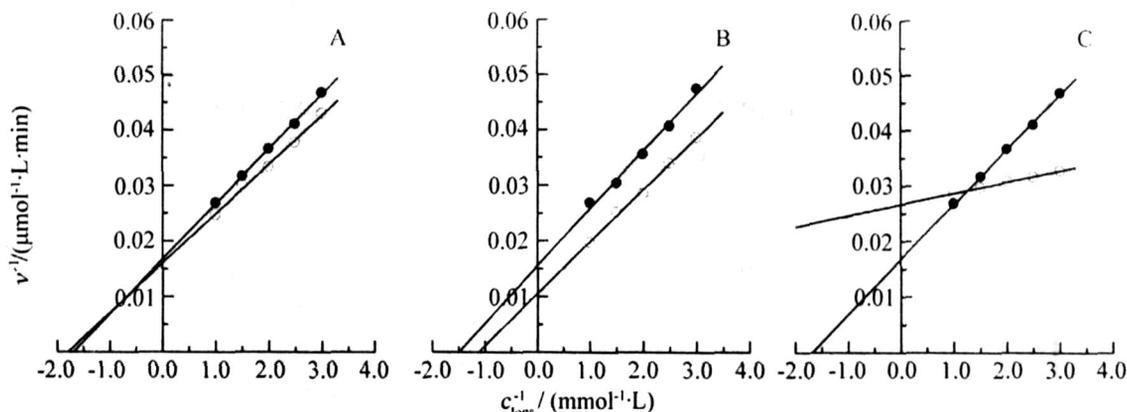


图 2 药用植物对酪氨酸酶的激活类型

A. 毛麝香乙醇提取物; B. 使君子正丁醇萃取物; C. 扭序花正丁醇萃取物

Fig 2 The activation type of medicine plant on mushroom tyrosinase

表 2 药用植物对酪氨酸酶激活作用的动力学分析

Tab 2 The activation analysis for medicine plants on mushroom tyrosinase

效应物	激活类型	常数测定	
		$K_m$	$V_m$
对 照		0.6642	64.39
毛麝香乙醇提取物	混合型	0.5542	62.43
千里光正丁醇萃取物	混合型	0.5703	66.10
冬青氯仿萃取物	混合型	0.3701	78.20
大青乙醇提取物	混合型	0.6276	67.70
使君子乙酸乙酯萃取物	反竞争性	0.8760	83.00
使君子正丁醇萃取物	反竞争性	0.8805	94.69
扭序花正丁醇萃取物	竞争性	0.5270	64.39

物为混合性激活作用,表明提取物在酶促反应体系中,既通过影响底物与酶的结合,又改变酶的空间构型,使酶与底物的亲和力增强,从而提高反应速度;使君子乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物为反竞争性激活作用,表明提取物只能与酶-底物络合物结合,使酶催化作用增强,但不能与游离酶结合;扭序花正丁醇萃取物为竞争性激活作用,表明提取物在酶促反应体系中,激活酪氨酸酶的方式不是提高酶促反应的速率,而是提高酶与底物的亲和力来完成的。

### 3 讨 论

酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶,提高皮肤内酪

氨酸酶的活性,可以增加黑色素的合成,起到治疗白癜风的作用。激活酪氨酸酶的药物目前研究较多的是中药,中药治疗白癜风、黄褐斑等色素性皮肤病已经成为目前研究的热点。近年进行了中药对蘑菇酪氨酸酶活性影响的大规模筛查,并在此基础上以鼠黑素瘤细胞和动物模型进行的实验<sup>[5]</sup>。本文研究了 15 种药用植物都有不同程度对酪氨酸酶的激活作用,其中白面风乙醇提取物具有很强的激活效果,冬青乙酸乙酯萃取物、斑鸠菊正丁醇萃取物和金酸枣石油醚萃取物也有对酪氨酸酶较强的激活作用,因此对它们可以进行系统的提取、分离和分析,以期最终得到对酪氨酸酶有较好激活效果的有效成分,可以为今后的白癜风和白化病等疾病研究提供基础。

### 参考文献:

- [1] 王建华,雷帆,胡波,等. 10种中药对酪氨酸酶激活作用的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(4): 40.
- [2] 涂彩霞,刘之力,任凤,等. 47种中药对酪氨酸酶活性的影响及酶动力学研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(6): 456 - 458.
- [3] 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.
- [4] Shi Y, Chen Q X, Wang Q, et al. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase [J]. Food Chemistry, 2005, 92: 707 - 712.
- [5] 刘秋均,段春燕. 影响酪氨酸酶活性的药物及其作用机理[J]. 中华实用中西医杂志, 2003, 3(16): 1002 - 1003.

## The Activation Effect of Medicine Plants on the Mushroom Tyrosinase

CHEN Liang-hua<sup>1,2</sup>, QIU Ling<sup>1</sup>, MING Yan-lin<sup>2</sup>,  
ZHONG Xue<sup>1</sup>, TONG Qing-xuan<sup>2</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. The Research and Development Center for Medicine Plant and Plant Drugs,

Xiamen Oversea Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, China)

**Abstract** The active effects of the extracts from 15 kind of medicine plants on mushroom tyrosinase were studied. The results showed that the ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum*, *Cibotium barometz*, *Rostellularia prostrans* and *Clerodendrum cyrtophyllum*, the petroleum ether and ethyl acetate extracts from *Rabdosia serena*, the ethyl acetate and n-butanol extracts from *Senecio scandens*, the petroleum ether and n-butanol extracts from *Pteracanthus alatus*, and the n-butanol extracts from *Spondias cytherea* have the slight active effect, the active rate achieved 3.4%, 20%, 20%, 40%, 38.3%, 27.6%, 36%, 42%, 20%, 50% and 30%, respectively. The n-butanol extracts from *Clinacanthus nutans*, the ethanol extracts from *Sagittaria trifolia* and *Adenosma glutinosum*, the ethyl acetate and n-butanol extracts from *Rangoon creeper*, and the chloroform extracts from *Ilex chinensis* have more activate effect, the activate rate achieves 55%, 60%, 68.2%, 62%, 60% and 80%, respectively. The petroleum ether extracts from *Spondias cytherea*, the ethyl acetate extracts from *Ilex pubescens*, the n-butanol extracts from *Vernonia solanifolia* and the ethanol extracts from *Inula cappa* also have the obvious activate effects to the tyrosinase, the activate rate achieves 120%, 150%, 170% and 327%, respectively. Kinetic analysis showed that activation mechanism mainly are the mixing property, the competitive and counter-competitive activation types.

**Key words:** tyrosinase; medicine plant; activation; kinetics