

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720081152645

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

砂仁活性物质对酪氨酸酶抑制作用机理的研究

Study on the mechanism of inhibition to tyrosinase by  
active molecules from Amomum

刘凤娇

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 月 日

论文答辩时间: 2011 年 月 日

学位授予日期: 2011 年 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 月

---

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2011年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

---

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在            年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：2011 年 月 日

导师签名：

日期：2011 年 月 日

## 目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	2
1 前 言.....	5
1.1 砂仁的研究概况.....	5
1.1.1 砂仁的医药典籍记载.....	5
1.1.1.1 话是开胃，温脾止泻，理气止痛.....	5
1.1.1.2 行气安胎.....	6
1.1.1.3 理气祛痰、醒酒.....	6
1.1.2 砂仁的化学成分研究.....	6
1.1.2.1 挥发油类.....	6
1.1.2.2 皂苷类.....	7
1.1.2.3 黄酮苷类.....	7
1.1.2.4 有机酸类.....	7
1.1.2.5 无机成分.....	7
1.1.3 砂仁的药理作用.....	7
1.1.3.1 对消化系统的作用.....	7
1.1.3.2 抗炎作用.....	8
1.1.3.3 利胆作用.....	8
1.1.3.4 镇痛作用.....	8
1.1.3.5 对免疫系统作用.....	8
1.1.3.6 对血小板聚集功能的影响.....	8
1.1.3.7 对神经系统的影响.....	8
1.1.3.8 抗氧化作用.....	9
1.1.3.9 其他作用.....	9
1.1.4 砂仁的临床应用.....	9
1.2 酪氨酸酶的研究概况.....	9

1.2.1 酪氨酸酶的概述 .....	9
1.2.2 酪氨酸酶的结构和理化性质 .....	10
1.2.3 酪氨酸酶的活性中心和催化机制 .....	11
1.2.4 与酪氨酸酶相关的应用研究概况 .....	12
1.2.4.1 酪氨酸酶与黑色素代谢 .....	12
1.2.4.2 微生物中的酪氨酸酶 .....	14
1.2.4.3 植物中的酪氨酸酶 .....	14
1.2.4.4 酪氨酸酶在其他方面的应用 .....	15
<b>1.3 酪氨酸酶抑制剂的研究概况 .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 酪氨酸酶抑制剂的分类 .....	15
1.3.2 天然活性产物对酪氨酸酶的抑制作用 .....	16
1.3.3 酪氨酸酶抑制剂的应用 .....	17
<b>1.4 本文研究的内容与意义 .....</b>	<b>17</b>
<b>2 实验材料与仪器 .....</b>	<b>19</b>
2.1 实验试剂 .....	19
2.1 实验仪器 .....	20
<b>3 实验方法 .....</b>	<b>22</b>
3.1 样品的制备方法 .....	22
3.1.1 样品的提取 .....	22
3.1.2 样品的分离 .....	22
3.1.3 提取后的样品的进一步分离纯化 .....	22
3.2 效应物对酪氨酸酶的抑制作用机理的测定 .....	24
3.2.1 效应物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响 .....	24
3.2.2 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶作用的研究 .....	24
3.2.3 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型和抑制常数的测定 .....	24
3.2.4 效应物对酶抑制作用动力学常数的测定 .....	25
3.3 测定砂仁提取物清除自由基的能力 .....	25

3.3.1 测定提取物对 1,1-二苯基-2-苦苯肼自由基 (DPPH) 清除作用.....	25
3.3.2 测定提取物对羟基自由基清除作用.....	25
3.3.3 测定提取物对超氧阴离子自由基清除作用.....	25
3.3.4 测定提取物体外抗氧化作用.....	25
<b>3.4 测定砂仁提取物抑菌效果.....</b>	<b>26</b>
3.4.1 培养菌株.....	26
3.4.2 双层平板法测定提取物抑菌能力.....	26
<b>3.5 效应物对小鼠 B16 黑素瘤细胞产黑色素相关指标的影响.....</b>	<b>26</b>
3.5.1 细胞培养液的配制.....	26
3.5.2 细胞复苏.....	26
3.5.3 细胞培养与传代.....	26
3.5.4 细胞冻存.....	27
3.5.5 光学倒置显微镜下细胞形态的观察.....	27
3.5.6 小鼠 B16 黑素瘤细胞增殖率的测定方法.....	27
3.5.7 小鼠 B16 黑素瘤细胞中酪氨酸酶活性的测定方法.....	27
3.5.8 小鼠 B16 黑素瘤细胞中黑色素生成量的测定方法.....	28
<b>4. 结果.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 砂仁提取物的萃取.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 砂仁提取物对酪氨酸酶的作用机理测定.....</b>	<b>29</b>
4.2.1 石油醚层提取物对蘑菇酪氨酸酶的影响.....	29
4.2.2 氯仿层提取物对蘑菇酪氨酸酶的影响.....	29
4.2.3 乙酸乙酯层提取物对蘑菇酪氨酸酶的影响.....	30
4.2.4 正丁醇层提取物对蘑菇酪氨酸酶的影响.....	31
4.2.4.1 正丁醇层提取物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	31
4.2.4.2 正丁醇层提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定.....	31
4.2.4.3 正丁醇层提取物对酪氨酸酶的二酚酶的抑制作用机理.....	33
4.2.5 水层提取物对蘑菇酪氨酸酶的影响.....	33
4.2.5.1 水层提取物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	33

4.2.5.2 水层提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定	34
4.2.5.3 水层提取物对酪氨酸酶的二酚酶的抑制作用机理	35
4.2.6 30%乙醇洗脱物对蘑菇酪氨酸酶的影响	36
4.2.6.1 30%乙醇洗脱物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响	36
4.2.6.2 30%乙醇洗脱物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定	37
4.2.6.3 30%乙醇洗脱物对酪氨酸酶的二酚酶的抑制作用机理	38
4.2.7 60%乙醇洗脱物对蘑菇酪氨酸酶的影响	39
4.2.7.1 60%乙醇洗脱物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响	39
4.2.7.2 60%乙醇洗脱物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定	39
4.2.7.3 60%乙醇洗脱物对酪氨酸酶的二酚酶的抑制作用机理	40
<b>4.3 砂仁提取物抗氧化性研究</b>	<b>41</b>
4.3.1 采用 DPPH 法测定砂仁提取物清除氧自由基能力	41
4.3.2 测定提取物清除羟基自由基的能力	44
4.3.3 测定提取物清除超氧阴离子自由基的能力	46
4.3.4 测定提取物总还原力	49
<b>4.4 砂仁提取物抑菌研究</b>	<b>51</b>
4.4.1 砂仁粗提物对枯草芽孢杆菌的作用	51
4.4.2 砂仁粗提物对大肠杆菌的作用	52
4.4.3 砂仁粗提物对沙门氏菌的作用	53
4.4.4 砂仁粗提物对铜绿假单胞菌的作用	54
4.4.5 砂仁粗提物对葡萄球菌的作用	55
4.4.6 砂仁粗提物对肺炎克雷伯化菌的作用	56
<b>4.5 砂仁提取物对 B16 细胞产黑色素相关指标的影响</b>	<b>57</b>
4.5.1 普通光镜下砂仁提取物作用前后 B16 形态学变化	57
4.5.2 砂仁提取物对黑色素瘤细胞 B16 的增值抑制作用	58
4.5.3 正丁醇层提取物对 B16 细胞酪氨酸酶活力及黑色素含量的影响	60
4.5.4 水层提取物对 B16 细胞酪氨酸酶活力及黑色素含量的影响	61
4.5.5 30%乙醇洗脱物对 B16 细胞酪氨酸酶活力及黑色素含量的影响	62

4.5.6 60%乙醇洗脱物对 B16 细胞酪氨酸酶活力及黑色素含量的影响 .....	63
<b>4.6 砂仁活性物质的分离与鉴定.....</b>	<b>63</b>
4.6.1 波长的选择 .....	63
4.6.2 有效组分的高效液相色谱(HPLC)分析 .....	64
4.6.3 HPLC 温度选择 .....	65
4.6.4 HPLC 流动相选择 .....	65
4.6.5 有效成分 HPLC 鉴定 .....	66
<b>5 讨 论.....</b>	<b>68</b>
5.1 砂仁的有效成分纯化和分析.....	68
5.2 砂仁提取物对酪氨酸酶的抑制机理 .....	69
5.3 砂仁提取物的抗氧化和抗菌作用.....	69
5.4 砂仁提取物的对小鼠 B16 细胞增殖和酪氨酸酶活力及黑色素含量的作用 .....	71
<b>6 结 论.....</b>	<b>73</b>
展 望 .....	75
参考文献 .....	76
发表论文 .....	87
致 谢 .....	88



**CONTENTS**

<b>Chinese Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>English Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Amomum research profile</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Amomum medical record books.....	5
1.1.1.1 Appetizer, warm the spleen to stop diarrhea .....	5
1.1.1.2 Tocolysis.....	6
1.1.1.3 Expectorant, sober.....	6
1.1.2 Chemical Constituents of Amomum .....	6
1.1.2.1 Volatile oil .....	6
1.1.2.2 Saponins .....	7
1.1.2.3 Flavonoid glycosides.....	7
1.1.2.4 Organic acids .....	7
1.1.2.5 Inorganic components .....	7
1.1.3 Pharmacological effects of Amomum .....	7
1.1.3.1 The role of the digestive system.....	7
1.1.3.2 Anti-inflammatory.....	8
1.1.3.3 Choleric effect .....	8
1.1.3.4 Analgesia.....	8
1.1.3.5 The role of the immune system .....	8
1.1.3.6 On platelet aggregation .....	8
1.1.3.7 Effects on the nervous system.....	8
1.1.3.8 Antioxidant.....	9
1.1.3.9 Other roles.....	9
1.1.4 Clinical application of Amomum .....	9
<b>1.2 Research Survey of tyrosinase</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Overview of tyrosinase.....	9

1.2.2 Structure and physicochemical properties of tyrosinase .....	10
1.2.3 Tyrosinase active center and catalytic mechanism .....	11
1.2.4 Tyrosinase-related applied research .....	12
1.2.4.1 Tyrosinase and metabolism of melanin .....	12
1.2.4.2 Microorganisms tyrosinase .....	14
1.2.4.3 Tyrosinase in plants .....	14
1.2.4.4 Applications of tyrosinase in other areas .....	15
<b>1.3 Overview of tyrosinase inhibitors .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Classification of tyrosinase inhibitors .....	15
1.3.2 Inhibition of tyrosinase by natural active products .....	16
1.3.3 Application of tyrosinase inhibitors .....	17
<b>1.4 Content and meaning of this study .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Experimental materials and equipment .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Experimental reagents .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Experimental equipment .....</b>	<b>20</b>
<b>3 Methods .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Sample preparation method .....</b>	<b>22</b>
3.1.1 Extraction of samples .....	22
3.1.2 Separation of the sample .....	22
3.1.3 Samples further purified .....	22
<b>3.2 Mechanism of inhibition of tyrosinase determination .....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Effector of the mushroom tyrosinase activity of single phenol .....	24
3.2.2 Effector of mushroom tyrosinase enzyme of the second phenol .....	24
3.2.3 Effector of mushroom tyrosinase inhibition of type and constants .....	24
3.2.4 Effector enzyme inhibition on the determination of kinetic constants .....	25
<b>3.3 Determination of Amomum extract antioxidant activity .....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Determination of scavenging effect of extracts on DPPH .....	25

3.3.2 Determination of extract on hydroxyl radical scavenging .....	25
3.3.3 Determination of extract on scavenging superoxide anion .....	25
3.3.4 Determination of antioxidant extracts .....	25
<b>3.4 Determination of antibacterial extract of Amomum .....</b>	<b>26</b>
3.4.1 Cultured strains.....	26
3.4.2 Determination of double-plate capacity of Antimicrobial.....	26
<b>3.5 Effect on mouse B16 melanoma cells for melanin related indexes .....</b>	<b>26</b>
3.5.1 Preparation of cell culture medium .....	26
3.5.2 Cell recovery .....	26
3.5.3 Cell culture and passage.....	26
3.5.4 Cryopreservation .....	27
3.5.5 Inverted optical microscope observation of cell morphology .....	27
3.5.6 Murine B16 melanoma cell proliferation rate Determination .....	27
3.5.7 Murine B16 melanoma cells Determination of tyrosinase activity .....	27
3.5.8 Murine B16 melanoma cells Determination of melanin content .....	28
<b>4. Results .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Extraction of Amomum .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Villosum extract on the mechanis of determination of tyrosinase .....</b>	<b>29</b>
4.2.1 Layer of petroleum ether extract of mushroom tyrosinase.....	29
4.2.2 Chloroform extract of mushroom tyrosinase.....	29
4.2.3 Ethyl acetate extract layer of mushroom tyrosinase.....	30
4.2.4 Butanol extract layer of mushroom tyrosinase.....	31
4.2.4.1 N-butanol layer of mushroom tyrosinase extract on activity of single phenol.....	31
4.2.4.2 N-butanol layer of mushroom extract on inhibition of tyrosinase	

enzyme determination of two phenolic .....	31
4.2.4.3 Butanol extract on tyrosinase layer two Inhibitory mechanism of phenol.....	33
4.2.5 Extract the water layer of mushroom tyrosinase .....	33
4.2.5.1 Water layer extract mushroom tyrosinase activity of single phenol	33
4.2.5.2 Water layer extract mushroom tyrosinase inhibitory activity determination of two phenolic .....	34
4.2.5.3 Water layer extract on tyrosinase enzyme inhibition mechanism of two phenol.....	35
4.2.6 30% ethanol elution effect on mushroom tyrosinase .....	36
4.2.6.1 30% ethanol elution on mushroom tyrosinase activity of single phenol.....	36
4.2.6.2 30% ethanol elution on Mushroom Tyrosinase Inhibitory Effects of the Second Determination of phenol.....	37
4.2.6.3 30% ethanol eluate of the enzyme tyrosinase inhibition of the second mechanism of phenol .....	38
4.2.7 60% ethanol elution effect on mushroom tyrosinase .....	39
4.2.7.1 60% ethanol elution on mushroom tyrosinase activity of single phenol.....	39
4.2.7.2 60% ethanol elution on Mushroom Tyrosinase Inhibitory Effects of the Second Determination of phenol.....	39
4.2.7.3 60% ethanol eluate of the enzyme tyrosinase inhibition of the second mechanism of phenol .....	40
<b>4.3 Antioxidant Activity of Extracts of Amomum .....</b>	<b>41</b>
4.3.1 Amomum determined by DPPH free radicals scavenging ability of extracts.....	41
4.3.2 Determination of Hydroxyl Radical Scavenging Ability .....	44
4.3.3 Determination of Free Radical Scavenging ability of superoxide anion..	46
4.3.4 Determination of total reducing power of extracts .....	49

<b>4.4 Antimicrobial Research Amomum .....</b>	<b>51</b>
4.4.1 Amomum extracts of the role of Bacillus subtilis .....	51
4.4.2 Amomum extracts of the role of E. coli .....	52
4.4.3 Amomum extracts of the role of Salmonella.....	53
4.4.4 Amomum extracts of the role of Pseudomonas aeruginosa .....	54
4.4.5 Amomum extracts of the role of Staphylococcus.....	55
4.4.6 Amomum extracts of the role of Klebsiella pneumoniae .....	56
<b>4.5 Villosum extract on melanin production by B16 cells related indexes .....</b>	<b>57</b>
4.5.1 Villosum extract ordinary light microscope morphological changes .....	57
4.5.2 Villosum extract on B16 melanoma cells inhibit the added value .....	58
4.5.3 Butanol extract on B16 cell layer of tyrosinase activity and melanin content .....	60
4.5.4 Water layer on the B16 cell extracts of tyrosinase activity and melanin content .....	61
4.5.5 30% ethanol elution of B16 cells in tyrosinase activity and melanin content .....	62
4.5.6 60% ethanol elution of B16 cells in tyrosinase activity and melanin content .....	63
<b>4.6 Amomum Isolation and identification of active substances .....</b>	<b>63</b>
4.6.1 Wavelength .....	63
4.6.2 HPLC analysis of the effective components .....	64
4.6.3 HPLC temperature selection .....	65
4.6.4 HPLC mobile phase selection .....	65
4.6.5 HPLC identification of the active ingredient .....	66
<b>5 Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1 Amomum purification and analysis of the active ingredients..</b>	<b>68</b>

<b>5.2 Villosum extract on the inhibition mechanism of tyrosinase ...</b>	<b>69</b>
<b>5.3 Villosum extract antioxidant and antibacterial effects.....</b>	<b>69</b>
<b>5.4 Villosum extract on mouse B16 cell proliferation and tyrosinase activity and melanin content in the role .....</b>	<b>71</b>
<b>6 Conclusions .....</b>	<b>73</b>
<b>References.....</b>	<b>75</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘 要

酪氨酸酶(EC.1.14.18.1)是一种多亚基的含铜氧化还原酶,广泛存在于自然界中,其异常表达可引起各种各样的病变,如老年斑、雀斑、光照损伤、果蔬褐变及与人脑中的神经黑色素形成及神经退行性病变相关的帕金森病等。

砂仁为历代常用中药,是四大南药之一,在治疗胃肠道疾病中应用普遍,现代临床还用于对妇产科疾病、心力衰竭和抗肿瘤等方面的医疗,而其作用于酪氨酸酶的研究鲜有报道。本论文以砂仁为研究对象,经分级萃取得到五相萃取物,测定提取物对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的抑制作用机理。检测了砂仁提取物对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力及总还原力,同时研究了提取物对细菌的抑制作用。以小鼠 B16 黑色素瘤细胞为研究对象,研究了提取的效应物对细胞增殖率、酪氨酸酶活性、黑色素含量的影响,并对其活性成分进行分析鉴定。本文研究结果和内容如下:

- (1) 本文运用超声提取,分级萃取,大孔树脂 AB-8 及 HPLC 等分离纯化手段,以酪氨酸酶抑制活性为指标,对砂仁提取物活性成分进行了追踪分离,最终通过比较分析推测有效成分可能含有槲皮苷和异槲皮苷。
- (2) 对砂仁各提取物进行酪氨酸酶抑制活性实验,结果表明各提取物对酪氨酸酶二酚酶呈现不同程度的抑制作用,部分提取物对单酚酶也有较强抑制活性。同时深入研究探讨了效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理和抑制类型,测定了相关抑制常数。
- (3) 选择了砂仁各提取物作为效应物,研究其清除 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力,并测定了各效应物的总还原力。进一步验证天然活性物质与酪氨酸酶的结合方式,为确定天然活性物质的作用机理奠定基础。
- (4) 研究了砂仁提取物对细菌的抑制效果,探讨酪氨酸酶抑制剂与抗菌之间的联系,为进一步揭示酪氨酸酶在细菌生长中的作用提供支持。
- (5) 研究了砂仁中酪氨酸酶天然抑制剂对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的药效学效果,通过加药后细胞增殖率、酪氨酸酶活性和黑色素含量等指标的变化,确定筛选出的天然活性成分的毒性、抑制酶活力效果、抑制黑色素合成能力以及分解黑色素能力等机制,从而为酪氨酸酶抑制剂的应用提供理论支持。

关键词: 砂仁; 酪氨酸酶; B16 细胞; 生物学效应



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库