

蔷薇花总黄酮对酪氨酸酶的抑制作用及其动力学行为

盛晓笑, 王春丽*
(华东理工大学药学院, 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237)

摘要: **目的** 考察蔷薇花 *Rosa multiflora* Thunb. 总黄酮对酪氨酸酶的抑制作用, 并评价其动力学行为。**方法** 超声提取总黄酮后, 以 *L*-多巴和 *L*-酪氨酸为底物, 考察该成分对酪氨酸酶单酚酶、二酚酶的抑制作用, Lineweaver-Burk 双倒数作图法确定其对二酚酶的作用机制类型。**结果** 总黄酮对酪氨酸酶单酚酶、二酚酶均有抑制作用, IC₅₀ 分别为 0.59、2.43 mg/mL。其中, 对二酚酶的抑制作用机制为混合型抑制, 抑制常数 K_I 、 K_{IS} 分别为 4.17、10.39 mg/mL。**结论** 蔷薇花总黄酮是有效的酪氨酸酶抑制剂。
关键词: 蔷薇花总黄酮; 酪氨酸酶; 动力学
中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0097-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.018

Inhibitory effect of total flavonoids from *Rose multiflora* on tyrosinase and the kinetic behaviors

SHENG Xiao-xiao, WANG Chun-li*
(Shanghai Municipal Key Laboratory for New Drug Design; College of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)
KEY WORDS: total flavonoids from *Rose multiflora* Thunb.; tyrosinase; kinetics

酪氨酸酶广泛存在于微生物、动植物以及人体中, 是目前惟一已明确的黑色素代谢酶, 在黑色素生成过程中起着至关重要的作用, 同时具有单酚酶和二酚酶活性。它可催化 *L*-酪氨酸合成 *L*-多巴, 然后将多巴氧化生成多巴醌, 进而形成色素, 其在人体中过量表达是导致雀斑、黄褐斑、黑色素瘤等色素沉着疾病的主要原因^[1-2], 故寻找天然有效的酪氨酸酶抑制剂是美白化妆品及皮肤用药的研究热点。
蔷薇花为落叶小灌木野蔷薇 *Rose multiflora* Thunb. 的花朵, 自古就是佳花名卉, 作为芳香理气药可用于治疗胃痛、胃溃疡等疾病。杨春艳^[3]报道了其化学成分和抗氧化活性, 从中分离鉴定出 9 个酚类化合物, 其中儿茶素、丁香酚 4-*O*- β -*D*-(6-*O*-没食子酰基)葡萄糖苷、异槲皮苷和木麻黄素显示了很强的抗氧化活性, 表明蔷薇花富含天然抗氧化剂, 可用于保护人类健康, 具有潜在应用价

值。目前, 对玫瑰花、月季花抗氧化和美白成分的研究颇多^[4-6], 但蔷薇花相对较少, 故本实验研究其在体外对酪氨酸酶活性的抑制作用, 并确定动力学因素^[7], 为该植物在美白化妆品领域的应用开发提供依据。
1 材料
UV1900 紫外分光光度计 (上海亚研电子科技有限公司); JY5002 电子天平 (上海复平仪器仪表有限公司); WK-400B 高速药物粉碎机 (山东精诚机械有限公司); SHZ-3 循环水多用真空泵 (上海沪西分析仪器厂有限公司); YH 系列电子恒温水浴锅 (江苏近湖镇教学仪器厂); SK3310HP 超声波清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司)。酪氨酸酶 (美国 Worthington 公司, 1 070 U/mg); *L*-多巴、*L*-酪氨酸对照品 (Aladdin 公司)。蔷薇花购自安徽亳州, 经华东理工大学顾江萍副教授鉴定为正品, 研磨成粉末备用。无水乙醇、氢氧化钠、磷酸

收稿日期: 2017-04-11
作者简介: 盛晓笑 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药筛选和评价。E-mail: 18801950911@163.com
* 通信作者: 王春丽, 女, 副教授, 研究方向为天然抗氧化剂的发现与应用。E-mail: wangchunli@ecust.edu.cn

二氢钾、硝酸铝、亚硝酸钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮制备与含有量测定

2.1.1 总黄酮提取^[8] 称取蔷薇花粉 5 g，置于 250 mL 锥形瓶中，加入 100 mL 50% 乙醇，60 ℃ 下超声提取 30 min，减压抽滤，得到提取液，浓缩后置于 100 mL 量瓶中，去离子水定容，即得。

2.1.2 总黄酮富集纯化^[9] 采用 HZ-816 大孔树脂，上样体积流量 1.0 mL/min，300 mL 7 mg/mL 提取液上样，200 mL 75% 乙醇洗脱，收集洗脱液，浓缩后真空冻干，即得冻干粉。

2.1.3 总黄酮含有量测定 采用硝酸铝显色法^[10]。以芦丁为对照品，称取 10 mg，95% 乙醇溶解定容至 50 mL，得 0.2 mg/mL 标准液。取 7 支试管，分别加入 0、1、2、3、4、5、6 mL 标准液，再加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL，摇匀，放置 6 min，加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL，摇匀，放置 6 min，加入 4% 氢氧化钠溶液 10 mL，摇匀，放置 15 min，以试剂作为空白参照，紫外分光光度计在 510 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标（*A*），芦丁对照品含有量为横坐标（*X*）进行回归，得方程为 $A = 11.182X + 0.012$ ($r = 0.9994$)，在实验质量浓度范围内具有良好的线性关系。

用去离子水将总黄酮粉末配制成 1 mg/mL 样品液，取 1 支空试管加入 1 mL 样品液，再加入 1 mL 5% 亚硝酸钠溶液，摇匀，反应 6 min 后加入 1 mL 10% 硝酸铝溶液，再摇匀，反应 6 min 后加入 10 mL 4% 氢氧化钠溶液，反应 15 min，在 510 nm 波长处测定吸光度，重复 3 次，计算平均值，测定含有量，测得每 1 g 蔷薇花粉中含有 25.9 mg 总黄酮。

2.2 抑制酪氨酸酶实验

2.2.1 酶活力测定 *L*-多巴在酪氨酸酶催化作用下，所产生的多巴色素在 475 nm 波长处有最大吸收，此时每 1 min 增加 0.001 为 1 个酶活力单位，即 1 U/min。再根据酶催化反应体系吸光度随着时间的改变拟合增长方程，其斜率即为酶活力值。

在试管中依次加入 PBS 缓冲液、1.5 mmol/L *L*-多巴溶液、去离子水、酪氨酸酶溶液各 1 mL，摇匀，立即置于紫外分光光度计中，在 475 nm 波长下进行动力学分析，每 30 s 读取吸光度，共读取 5 min。经动力学分析后，得方程 $Y = 0.0646X + 0.0272$ ($R^2 = 0.9993$)，酶活力值为 65 U/mL（以下实验体系均在该酶活力下进行操作）。

2.2.2 单酚酶抑制活性测定 在酪氨酸转化为黑色素时，酪氨酸酶的催化作用主要发生在酪氨酸转化为多巴、多巴转化为多巴醌的过程中，多巴醌是 1 种有色物质，在 475 nm 波长处有吸收，可利用分光光度计测定其含有量^[11]。冻干粉用 PBS 缓冲液配制成 0.3、0.5、0.7、1 mg/mL 待测液，以 *L*-酪氨酸（*L*-Tyr）为底物。按照表 1 所示，精密吸取总黄酮、PBS（pH = 6.8）、1.5 mmol/L *L*-Tyr 溶液和水，充分混合均匀，28 ℃ 下水浴 10 min 后，加入酪氨酸酶溶液，继续水浴 15 min，在 475 nm 波长处测定吸光度，计算酪氨酸酶单酚酶抑制率（*I*），计算公式为 $I = \{ [(A-B) - (C-D)] / (A-B) \} \times 100\%$ 。

表 1 待测样品组成 I（mL）

成分	A 组	B 组	C 组	D 组
总黄酮	0	0	1	1
PBS (pH = 6.8)	1	1	1	1
1.5 mmol/L <i>L</i> -酪氨酸	1	1	1	1
酪氨酸酶溶液	1	0	1	0
水	1	2	0	1

2.2.3 二酚酶抑制活性测定 将冻干粉用 PBS 缓冲溶液配制成 1、3、5、10 mg/mL 待测液，以 *L*-多巴（*L*-Dopa）为底物，其他操作同“2.2.2”项，组成见表 2。

表 2 待测样品组成 II（mL）

成分	A 组	B 组	C 组	D 组
总黄酮	0	0	1	1
PBS (pH = 6.8)	1	1	1	1
1.5 mmol/L <i>L</i> -多巴	1	1	1	1
酪氨酸酶溶液	1	0	1	0
水	1	2	0	1

2.2.4 二酚酶抑制酪氨酸酶类型判定^[12-13] 固定酪氨酸酶活力为 65 U/mL，按“2.2.3”项下方法测定当 *L*-Dopa 浓度为 0.25、0.5、1、1.5、2 mmol/L 时，0、2、4、6、8、10 mg/mL 总黄酮溶液的吸光度 *A*，根据其改变计算初速度 v_0 ，绘制浓度-初速度曲线。再利用底物 *L*-Dopa 浓度、 v_0 的倒数，通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图，通过米氏常数 K_m 和酶促反应最大速率 v_m 的变化判断抑制类型。

2.3 总黄酮提取物对酪氨酸酶抑制活性的影响

2.3.1 单酚酶 在抑制酪氨酸酶催化反应的过程

中，提取物对于其活性的抑制率与提取物质量浓度呈剂量依赖性关系，方程为 $Y = -0.427\ 2X^2 + 1.215\ 5X - 0.068\ 8$ ($R^2 = 1$)，即随着提取物质量浓度的增大，对酪氨酸酶的抑制能力也在增加， IC_{50} 为 0.59 mg/mL 。

2.3.2 二酚酶 在抑制酪氨酸酶催化反应的过程中，提取物对于其活性的抑制率与提取物质量浓度呈剂量依赖性关系，方程为 $Y = 0.000\ 3X^3 - 0.01X^2 + 0.136X + 0.223\ 9$ ($R^2 = 1$)，即随着提取物质量浓度的增大，对酪氨酸酶的抑制能力也在增加， IC_{50} 为 2.43 mg/mL 。

2.4 总黄酮提取物对酪氨酸酶二酚酶活性抑制的动力学分析 浓度-初速度曲线见图 1，可知随着提取物质量浓度的增大，不同初始质量浓度的底物都有明显抑制作用，但差异显著；提取物与二酚酶之间的相互作用趋于平稳，表明是通过抑制酶的活性来降低其催化氧化效率，而不是直接使酶失去活力。由此推断，提取物抑制酪氨酸酶是一种可逆性抑制作用。

Lineweaver-Burk 双倒数直线图 2A，可知该图为相交于第二象限中一点的 1 组直线，并呈扇形展开，横、纵轴截距都随着提取物质量浓度的增大而

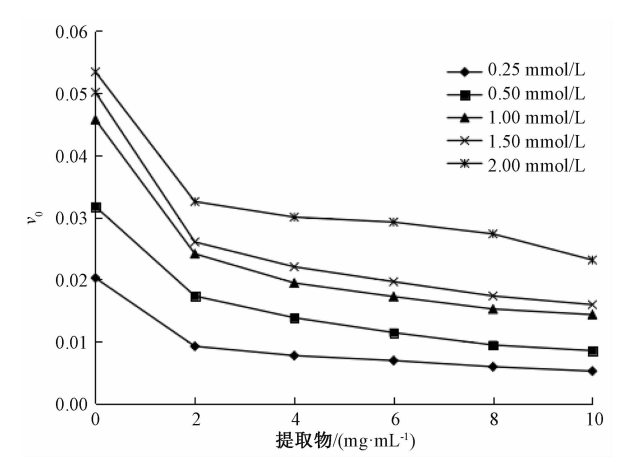


图 1 提取物质量浓度与抑制作用的关系
Fig. 1 Relationship between extract concentration and inhibition effect

变化，其中 K_m 值增大， v_{max} 值减小，表明抑制类型为混合型，即提取物不仅能与游离酶 (E) 结合，也能与酶和底物的络合物 (ES) 结合。以米氏方程的斜率和截距对提取物质量浓度进行二次作图^[14]，见图 2B、2C，分别求出提取物对游离酶的抑制常数 K_I 为 4.17 mg/mL ，对酶和底物络合物的抑制常数 K_{IS} 为 10.39 mg/mL 。

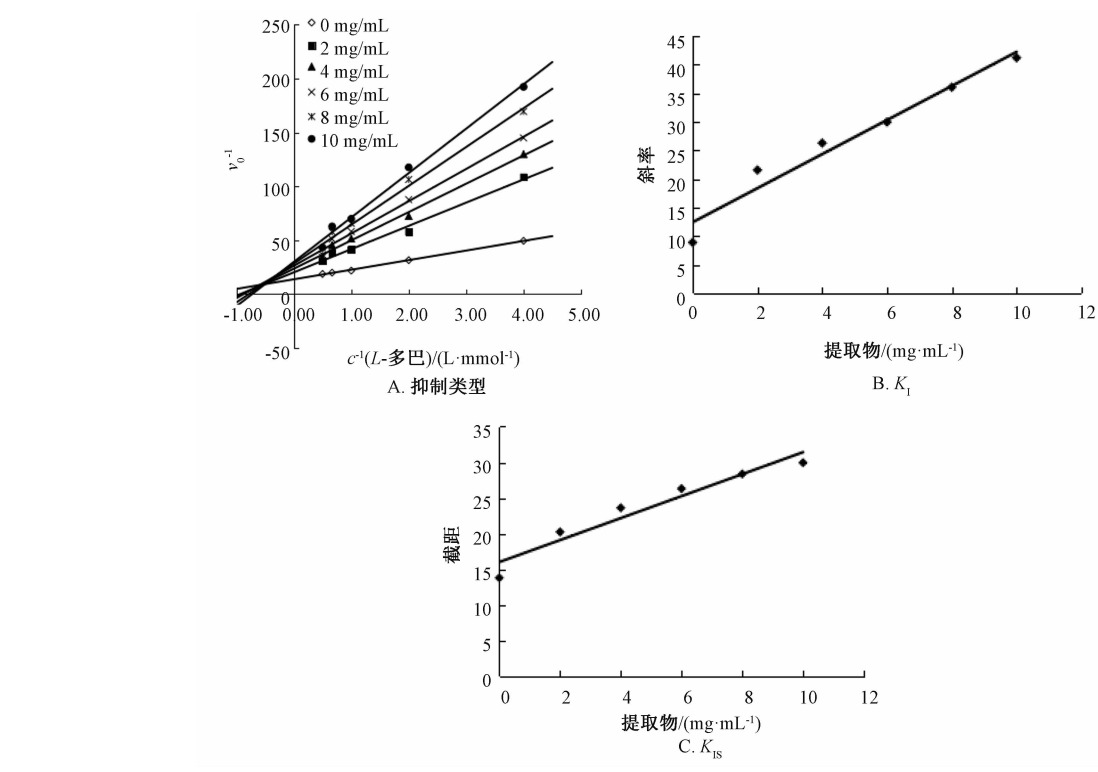


图 2 提取物抑制类型和抑制常数
Fig. 2 Inhibition type and inhibition constants of extract

3 讨论

蔷薇花含有丰富的总黄酮，利用大孔树脂纯化富集其粗提液时，每 1 g 所得冻干粉含 25.9 mg 总黄酮。在一定质量浓度范围内，其对酪氨酸酶活性的抑制作用呈剂量依赖性关系，对单酚酶、二酚酶的 IC₅₀ 分别为 0.59、2.43 mg/mL，可知该成分具有较强的美白功效。今后，可继续研究蔷薇花中具体单体化合物的体外和细胞内酪氨酸酶抑制效果。

参考文献：

[1] Parvez S, Kang M, Chung H S, *et al.* Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents[J]. *Phytother Res*, 2006, 20(11): 921-934.

[2] Chang T S. An updated review of tyrosinase inhibitors[J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(6): 2440-2475.

[3] 杨春艳. 构树、蔷薇、甘草三种植物活性成分研究[D]. 北京：中国科学院大学，2014.

[4] 刘红燕，王 妮. 玫瑰花多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 食品与药品，2014，16(4): 256-257.

[5] 王 蕾，符 玲，敬林林，等. 月季花抗氧化活性成分研究[J]. 高等学校化学学报，2012，33(11): 2457-2461.

[6] 张红城，李春阳，董 捷，等. 8 种蜂花粉醇提物对酪氨酸酶的单酚氧化活性的抑制作用[J]. 食品与生物技术学

报，2009，28(1): 14-17.

[7] Fenoll L G, Peñalver M J, Rodríguez-López J N, *et al.* Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates[J]. *Int J Biochem Cell B*, 2004, 36(2): 235-246.

[8] 王英豪，陈志春，张理平，等. 响应面法优化桑椹黄酮超声辅助提取工艺及对酪氨酸酶活性抑制研究[J]. 中国中医药信息杂志，2016，23 (2): 93-97.

[9] 张立华，张元湖，安春艳，等. 石榴皮提取物的大孔树脂纯化及其抗氧化性能[J]. 农业工程学报，2009，25(S1): 142-147.

[10] 杜志云，涂增清，张 焜，等. 超声波辅助提取槐花总黄酮及其对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 林产化学与工业，2011，31(3): 39-44.

[11] 钟佳胜，刘 丹，吴小芳，等. 库拉索芦荟中 7 种单体化合物对蘑菇酪氨酸酶活力的影响[J]. 中药新药与临床药理，2013，24(2): 114-117.

[12] 龚盛昭，杨卓如，程 江，等. 香草醛对酪氨酸酶活性的抑制[J]. 华南理工大学学报（自然科学版），2006，34(5): 53-57.

[13] 付建红，祁 瑞，郑 静，等. 新疆天山花楸黄酮类物质对酪氨酸酶的抑制机制[J]. 生物加工过程，2015，13(4): 63-67.

[14] 谢 娟. 芳杂环缩氨基硫脲类似物的合成及其抑制酪氨酸酶活性研究[D]. 南昌：南昌大学，2015.