

L-半胱氨酸作为化妆品美白添加剂的作用机理

杨美花, 李智聪, 刘凤娇, 庄江兴, 王 勤, 陈清西*

(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)

摘要:酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)是黑色素形成的关键酶,其抑制剂的研究是当前美白添加剂研究的热点.研究了 L-半胱氨酸(L-Cys)对蘑菇酪氨酸酶和小鼠 B16 黑色素瘤细胞粗提的酪氨酸酶的抑制效应,实验结果表明,L-Cys 对 2 种来源的酪氨酸酶有较强的抑制作用,其半效抑制浓度分别为 1.75,15 $\mu\text{mol/L}$. 对小鼠 B16 黑色素瘤细胞粗提的酪氨酸酶的抑制主要表现为显著延长酶促反应的迟滞时间,同时显著降低酶的活力.进一步对 L-Cys 在细胞毒性方面进行了研究,结果表明,在 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,L-Cys 对小鼠黑色素瘤细胞 B16 的生长未显示出明显影响,对细胞状态、代谢 MTT 的能力、细胞增殖率等均无影响,无明显细胞毒性,是一种有潜力的增白剂,为 L-Cys 作为美白添加剂提供了依据.

关键词:L-半胱氨酸;黑色素;酪氨酸酶;B16 黑色素瘤细胞

中图分类号:Q 356.1

文献标识码:A

文章编号:0438-0479(2009)04-0581-04

黑色素是在黑素小体内合成的一类具有复杂结构、非均质的类多酚聚合体,其量的多少以及分布决定着肤色的深浅,其代谢失调会导致色素沉着性疾病^[1]. 哺乳动物体内,酪氨酸酶首先催化 L-酪氨酸羟化成为 L-多巴(L-DOPA),并进一步催化 L-DOPA 氧化生成多巴醌,再经过多步酶促和非酶促反应,最终生成黑色素.酪氨酸酶是皮肤黑色素生物合成的关键酶,决定黑色素合成的速率^[1]. 当前化妆品市场上的美白产品的主要添加剂如曲酸及其衍生物、熊果甙、抗坏血酸及其衍生物、维生素 E、绿茶提取物、甘草提取物等,均是通过抑制酪氨酸酶的活性从而抑制黑色素合成,达到美白的效果^[2-4]. 因此,寻找安全、高效的酪氨酸酶抑制剂成为化妆品添加剂研究的热点.

L-半胱氨酸(L-Cys)是一种含有巯基的天然氨基酸,作为改性剂广泛应用于食品加工领域.近年来,L-Cys 作为抗氧化剂,在果蔬保鲜领域也有较多研究^[5],但是 L-Cys 作为美白化妆品添加剂的作用机理尚未见报道.本文研究了其对黑色素合成的关键酶——酪氨酸酶活力的影响,并对其作为化妆品美白添加剂的可能性进行了研究.

1 材料与方法

收稿日期:2008-10-31

基金项目:福建省重点科技计划项目(2007N0051),福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目资助

*通讯作者:chenqx@xmu.edu.cn

1.1 材 料

小鼠 B16 黑色素瘤细胞购自 CTCC;RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;双抗(10 000 U/mL 青霉素、10 000 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、胰酶、L-DOPA 与蘑菇酪氨酸酶均购自 Sigma Aldrich 公司;L-Cys 购自奥伯生物试剂公司.其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方 法

1.2.1 L-Cys 对蘑菇酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应吸收光谱的影响

采用文献[6]的测活体系,在含有 0.5 mmol/L L-DOPA,3.33 $\mu\text{g/mL}$ 酪氨酸酶,0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)的反应体系中,加入不同浓度的 L-Cys,30 s 下监测酶催化 L-DOPA 氧化过程吸收光谱的变化情况,波长为 230~800 nm.

1.2.2 L-Cys 对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

参考文献[6],以 L-DOPA 为底物,在含不同浓度 L-Cys 的测活体系中,30 s 下分光光度计监测波长为 475 nm 处的光密度值的变化,反应时间为 3 min,计算酶的活力.

1.2.3 小鼠 B16 细胞酪氨酸酶粗提液的制备

小鼠 B16 细胞用完全培养基培养(RPMI 1640,含 10%胎牛血清,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 U/mL).细胞裂解方法按照分子克隆介绍的方法^[7],并略做修改.小鼠 B16 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 48 h,至细胞接近融合状态,37 $^{\circ}\text{C}$ 下用胰酶消化 5 min,收集细胞,采用裂解缓冲液(0.25 mol/L Tris-HCl,pH

7.8)对细胞重悬并计数,调整细胞浓度至约 2×10^5 / mL,置液氮中速冻 1 min 后置 37 °C 解冻,反复冻融 5 次裂解细胞,15 000 r/min 离心 10 min,上清即为小鼠 B16 细胞酪氨酸粗提酶液。

1.2.4 L-Cys 对小鼠 B16 细胞酪氨酸酶活力的影响

B16 细胞粗提液酪氨酸酶活性测定采用 96 孔酶标板测定,在 100 μ L 体系(含 0.4 mg/L L-DOPA 和不同浓度的 L-Cys,及恒定量的酶液)中,在 30 °C 下测定 475 nm 的光密度值随时间的增长曲线,从斜率计算酶的活力,产物的消光系数按 3 700 L/(mol · cm) 计算。

1.2.5 L-Cys 对小鼠 B16 细胞的毒性测定

(1)细胞形态和贴壁状态观察:将小鼠 B16 细胞分别接种于不含 L-Cys 和含 200 μ mol/L L-Cys 的完全培养基中,在不同时间(0,2,4,6,12,24 和 48 h)后,显微镜下观察细胞形态、贴壁情况有无差异。

(2)代谢 MTT 能力:小鼠 B16 细胞接种于 96 孔板上,培养 48 h,弃去培养基,换成含 0.8 mg/mL MTT 和不同浓度的 L-Cys (0,25,50,100 和 200 μ mol/L)的完全培养基继续培养 6 h,然后,采用细胞裂解液(5 mL HCl + 50 mL Triton X-100,异丙醇定容至 500 mL)裂解,对照实验为不含 L-Cys 的完全培养基。使用酶标仪检测,检测波长 570 nm,参比波长 630 nm,比较同样细胞浓度下,代谢 MTT 能力的变化。

(3)细胞增殖率:小鼠 B16 细胞接种于 96 孔酶标板上培养 6~8 h,使细胞贴壁。用完全培养基对 L-Cys 进行倍半稀释后,考察 4 个 L-Cys 浓度梯度(25,50,100 和 200 μ mol/L),每个梯度 3 个重复,对照加入同体积的不含 L-Cys 完全培养基。使用 MTT 法检测细胞增殖率,以不含 L-Cys 的细胞增殖率作为 100%^[8]。

2 实验结果

2.1 L-Cys 对蘑菇酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化反应吸收光谱的影响

在不含 L-Cys 的测活体系中,酶氧化反应的产物在 475 nm 处有一个特征吸收峰,随着 L-Cys 浓度增大,该吸收峰明显下降,当 L-Cys 浓度达 6.0 μ mol/L 时,该特征吸收峰完全消失(图 1),说明 L-Cys 对酪氨酸酶的活力有明显的抑制作用。

2.2 L-Cys 对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

研究 L-Cys 对蘑菇酪氨酸酶活力的影响,在含有 0.5 mmol/L L-DOPA 的测活体系中,加入不同浓度的 L-Cys 为效应物,研究其对酶活力的影响。结果

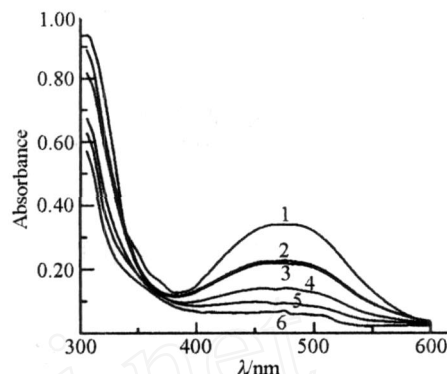


图 1 L-Cys 对酪氨酸酶氧化 L-DOPA 产物的吸收光谱的影响

曲线 1~6 对应的 L-Cys 浓度分别为 0,2,3,4,5,6 μ mol/L

Fig. 1 Effect of L-Cys on the absorbance spectra of the product of L-DOPA oxidized by tyrosinase

(图 2)表明,随着效应物浓度的增大,酶的活力呈指数下降,当 L-Cys 浓度达 7.0 μ mol/L 时,酶活力完全丧失。说明 L-Cys 对蘑菇酪氨酸酶活力有极强的抑制作用,测定导致酶活力下降一半所需要的抑制剂的浓度 (IC_{50}) 为 1.75 μ mol/L。

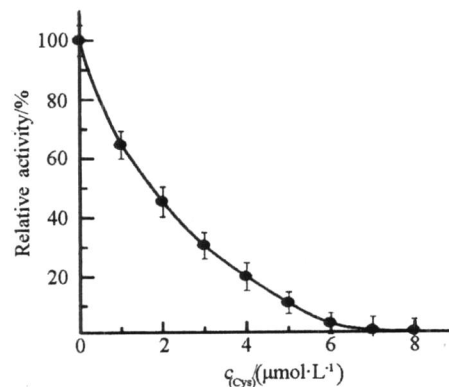


图 2 L-Cys 对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of L-Cys on the activity of mushroom tyrosinase

2.3 L-Cys 对小鼠 B16 细胞粗提液酪氨酸酶活力的影响

研究 L-Cys 对小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶活力的影响,含有 0.5 mmol/L L-DOPA 为底物、不同浓度的 L-Cys 为效应物的测活体系中,加入恒定量的小鼠 B16 细胞酶提取液,30 °C 下测定波长为 475 nm 的光密度值随时间的变化曲线,结果见图 3a。当反应体系加入了 L-Cys 时,酶反应的动力学曲线发生了改变(图 3a 曲线 1~6),表现为迟滞时间的延长和初始稳态速度的下降。测定不同浓度的 L-Cys 对酶反应的迟

滞时间和稳态速度的影响,结果分别见图3b和图3c,显示L-Cys不仅能够延长酶反应的迟滞时间,又降低了酶的稳态速度.当L-Cys浓度小于 $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,随着L-Cys浓度的增大,迟滞时间明显延长,当L-Cys浓度为 $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,迟滞时间延长到 $2\text{ }252\text{ s}$,而酶的稳态活力仅下降 7.42% ,说明L-Cys主要通过延长反应的迟滞时间而表现其抑制作用;当L-Cys浓度继续升高,迟滞时间进一步增加,同时酶反应的稳态速度则随着L-Cys浓度的增大而呈指数下降,当效应物浓度达 $18\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,酶初始速度下降到 43.5% ,其半效抑制浓度约为 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$.表明浓度较高时,L-Cys不仅影响延长酶反应时间,而且显著降低酶的稳态速度.

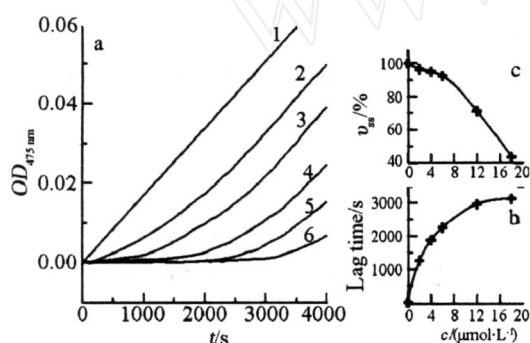


图3 L-Cys对小鼠B16细胞酪氨酸酶的抑制进程曲线(a)及对酪氨酸酶迟滞时间(b)和稳态活力(c)的影响
曲线1~6抑制剂浓度分别为:0,2,4,6,12和18 $\mu\text{mol/L}$

Fig.3 (a) Progress curves for the inhibition of tyrosinase from mouse B16 melanoma cells by L-Cys; (b) and (c) denote the effects of L-Cys on the lag time and on the steady-state activity of the enzyme, respectively

2.4 L-Cys对小鼠B16细胞毒性检测

研究不同浓度的L-Cys(0,25,50,100和200 $\mu\text{mol/L}$)对小鼠B16细胞毒性,处理不同时间(0,2,4,6,12,24和48 h)后,显微镜下观察B16细胞无异常变化,4~6 h后均贴壁完全.在培养过程中定期观察,细胞呈典型的贴壁细胞特征,单层生长,略呈长梭状,细胞质呈半透明,无异常颗粒或膨胀、缩小、变形,这些现象均与对照组相一致,说明L-Cys对小鼠B16细胞的生长没有影响.调整细胞浓度为 $5\times 10^5/\text{mL}$,以正常细胞代谢MTT的能力为100%,分别测定不同浓度(25,50,100和200 $\mu\text{mol/L}$)的L-Cys处理后的MTT代谢能力水平,测定结果分别为:97%、107%、103%、96%,经在不同浓度L-Cys处理的小鼠B16细胞增殖率也基本保持不变,均为 $(100.0\pm 5.5)\%$.显

示L-Cys对小鼠B16细胞无毒性,对该细胞是安全的.

3 讨论

本文使用紫外光谱法快速证明了L-Cys对蘑菇酪氨酸酶的活力有抑制,实验显示,L-Cys对酪氨酸酶有着显著的抑制作用,其抑制效果具有剂量依赖性,其 IC_{50} 为 $1.75\text{ }\mu\text{mol/L}$;L-Cys对B16细胞的酪氨酸酶研究结果显示,L-Cys对酪氨酸酶的抑制既影响了酶反应的迟滞时间,又影响了酶稳态活力.当L-Cys浓度小于 $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,L-Cys主要通过延长反应的迟滞时间而表现其抑制作用;当L-Cys浓度大于 $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,L-Cys不仅延长迟滞时间,而且明显降低酶的稳态速度,显示出双重的抑制作用.

关于L-Cys对酶活力的影响,基本上有2种说法:

(1) 硫醇类化合物可以结合酶活性中心的铜离子从而抑制酶的活力;

(2) 硫醇类化合物可以在酶促反应过程中与生成的产物醌发生一快速的非酶催化反应而结合形成一种稳定的无色化合物^[9].根据我们的研究结果,上述两种作用同时存在,迟滞时间明显延长,表明L-Cys结合了酶促反应产物,生成了无色物质,使酶不表现出活性;L-Cys也可以降低酶的稳态活力,说明L-Cys可以和酶的活性中心不可逆地结合,从而抑制了酶的活性.

L-Cys细胞毒性检测结果说明,在200 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下,L-Cys对B16细胞的细胞状态、增殖率、代谢能力等均无影响,从细胞水平上证明了L-Cys作为美白添加剂是安全的.

参考文献:

- [1] Perez Bernal A, Munoz Perez M A, Camacho F. Management of facial hyperpigmentation[J]. American Journal of Clinical Dermatology, 2000, 1(5): 261 - 268.
- [2] 陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(2): 274 - 282.
- [3] 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.
- [4] Huang X H, Chen Q X, Wang Q, et al. Inhibition of alkyl benzoic acids on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Food Chemistry, 2006, 94: 1 - 6.
- [5] Richard F C, Goupy G M, Nicolas J J. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning- Kinetic studies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40: 2108 - 2113.

- [6] Espín J C, Wichers H J. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity *in vitro* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1544: 289 - 300.
- [7] Sambrook R. Molecular cloning: laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2000: 189 - 192.
- [8] Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, et al. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45: 328 - 336.
- [9] Christine R, Florence R, Claude R, et al. A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by *L*-Cysteine [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1996, 28: 457 - 463.

Study on the Mechanism of *L*-Cysteine as a Whitening Cosmetic Additive

YANG Mei-hua, LI Zhi-cong, LIU Feng-jiao, ZHUANG Jiang-xing,
WANG Qin, CHEN Qing-xi *

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences,
Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : Tyrosinase (EC 1.14.18.1) is a key enzyme involved in the melanin biosynthesis. Nowadays, tyrosinase inhibition has become a hot spot on research of whitening cosmetic additive. In this paper, the effects of *L*-cysteine (*L*-Cys) on the activity of tyrosinase from both mushroom and mouse B16 melanoma cells were studied. The results showed that *L*-Cys could remarkably prolong the lag time and inhibit the activity of tyrosinase extracted from B16 cells, and the concentration for *L*-Cys leading to 50 % tyrosinase activity lost (IC_{50}) was 1.75 $\mu\text{mol/L}$ and 15 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Furthermore, the cells toxicity of *L*-Cys were assessed. The results showed that *L*-Cys has no obvious influence in cellular morphology, growth rate, metabolism of thiazole blue (MTT) of B16 melanoma cells, indicating that *L*-Cys is safe for using as a potential cosmetic additive. This research provided a basis for the usage of *L*-Cys as whitening cosmetic additive.

Key words : *L*-cysteine; melanogenesis; tyrosinase; B16 melanoma cell