

芦荟皮酪氨酸酶抑制剂有效成分的提取与分析

邱 凌, 钟 雪, 庄江兴, 杜 娟, 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: 以芦荟的表皮、同化薄壁组织和维管束组织为材料, 经组织捣碎匀浆、石油醚萃取、过滤、旋转蒸发浓缩, 得到芦荟皮酪氨酸酶抑制剂的提取物。研究该提取物对蘑菇酪氨酸酶的效应, 结果表明, 芦荟皮质部提取物对蘑菇酪氨酸酶有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 值为 0.439 mg/mL, 抑制机理为可逆混合型。对其中的有效成分——芦荟大黄素进行含量测定, 结果为 0.4%, 说明芦荟大黄素在芦荟皮中占有相当的比例。

关键词: 酪氨酸酶; 芦荟; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)02-0227-04

芦荟 (*Aloe vera*) 原产非洲的多年生常绿草本植物, 多肉质, 生命力极强。早在公元前 1552 年古埃及的书中就记载了芦荟的效能。在我国民间有用芦荟作药用和美容的传统。《本草纲目》中也记载了芦荟的药效。芦荟富含多种活性物质, 具有医疗、食用、美容、保健等多种功效。世界粮农组织在最近公布的一项调查表明, 芦荟的种类繁多, 在所有野生果蔬所含的营养价值最高, 被誉为“21 世纪的最佳保健食品”^[1]。芦荟作为美容化妆品的填充材料, 具有良好的抵抗紫外线照射, 阻止皮肤褐变, 加速皮肤新陈代谢, 增强皮肤弹性, 使之显得柔软、光滑、丰满, 还可以消除粉刺、雀斑、皲裂。芦荟制成的洗面奶, 护肤霜、美容霜等系列产品早已问世。但是, 芦荟对黑色素生成的影响尚未被人们所完全认识^[2-3]。芦荟大黄素 (Aloe-emodin) 广泛的存在于芦荟中, 它具有明显的抗肿瘤活性、抗菌活性、免疫抑制活性和抑制黑色素细胞生成等作用。作者试图从酶学角度进一步了解芦荟对黑色素形成酶——酪氨酸酶 (EC. 1. 14. 18. 1) 的活力的影响, 探讨其对酶的作用机理, 阐明芦荟作为化妆品增白剂的作用原理。

1 材料与方法

1.1 材 料

芦荟为漳州市远太芦荟制品有限公司提供的新鲜的百合科芦荟属库拉索芦荟 (*Aloe vera* Linne)。蘑菇酪氨酸酶 (Tyrosinase) 购自 Sigma 化学公司, L-多巴

(L-DOPA) 购自 Aldrich 公司, 芦荟大黄素购自上海友思生物技术有限公司, 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

1.2.1 芦荟皮粗提物的提取

将新鲜芦荟洗净, 取芦荟表皮、同化组织和维管束的组织为材料, 去除叶肉中大型薄壁细胞组成的储水组织。按 1:3 (质量浓度) 加入预冷的蒸馏水, 组织捣碎, 布氏漏斗抽滤, 得到澄清的液体。加入等体积的石油醚分 3 次萃取上清液, 得到的水相萃取液于 50℃ 的水浴旋转蒸发浓缩至干, 用定量水溶解得到芦荟皮粗提物的浓缩液。

1.2.2 酶活力测定

参考文献[4]方法, 在磷酸缓冲液 (pH 6.8) 中, 以 0.5 mmol/L 的 L-DOPA 为底物, 30℃ 下测定波长为 475 nm 的光密度值 (OD_{475nm}) 随着时间的增长直线, 从斜率计算酶的活力, 产物的消光系数按 3 700 L/(mol·cm) 计算^[5]。酶活力单位 (U) 定义为每分钟催化 L-DOPA 氧化产生 1 μ mol 的产物的酶量。

1.2.3 效应物对酶活力的影响

参考文献[6]方法, 先加入 0.1 mL 含不同浓度的芦荟提取物于比色杯中, 再加进 2.8 mL 预先在 30℃ 恒温水浴保温的底物溶液, 然后加入 0.1 mL 酪氨酸酶水溶液, 即刻充分混匀, 在 30℃ 恒温条件下检测波长为 475 nm 的光密度值随着时间的增长直线, 从直线的斜率计算出酶的活力。抑制作用机理是通过 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) 的变化来判断。

1.2.4 芦荟大黄素含量的测定

收稿日期: 2007-03-13

基金项目: 国家自然科学基金 (30570408) 和福建省重点科技项目 (2007N0051) 资助

*通讯作者: chenqx @xmu.edu.cn

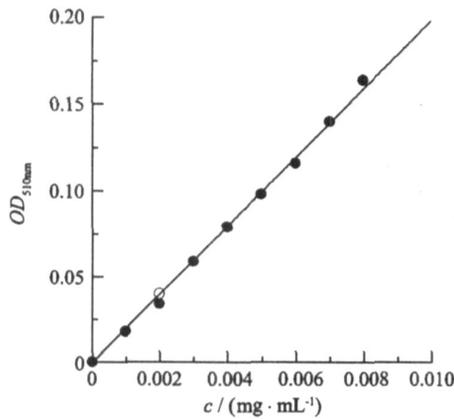


图1 芦荟大黄素的标准曲线
Fig. 1 The criterion curve of Aloe-emodin

参考文献[7]方法,将一定量的样品液置于 10 mL 容量瓶中,用 30% 的乙醇补齐至 5 mL,加入 0.3 mL 的 5% NaNO₂ 水溶液,混匀 5 min 后,加入 0.3 mL 的 10% Al(NO₃)₃ 水溶液,混匀 6 min 后,加入 2 mL 的 1 mol/L NaOH,混匀,用 30% 的乙醇稀释至刻度,静置 10 min 后检测波长为 510 nm 处的光密度值,进行定量分析.

2 结果

2.1 芦荟提取物中的大黄素含量的测定

以芦荟大黄素的标准品为参照,按参考文献[7]的方法,测定波长为 510 nm 处的光密度值与样品芦荟大黄素含量之间的定量关系(表 1),消光系数按 0.050 mL/mg 计算.结果(图 1)表明,10 μL 0.51 g/mL 芦荟皮粗提物中含 20 μg 芦荟大黄素,含量为 0.4%.表明芦荟皮的提取物中有相当含量的芦荟大黄素,其结构说明芦荟皮提取物对酪氨酸酶有较强的抑制作用,芦荟大黄素可能是其中的有效成分.

2.2 芦荟提取物对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

以芦荟皮提取物为效应物,研究它对蘑菇酪氨酸酶活力的影响.在以 L-多巴为底物的测活体系中,加入不同浓度的芦荟提取物,检测酶的活力.以不加效应物为对照,测定酶相对的剩余活力,结果(图 2)表明,芦荟粗提物对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶有较强的抑制作

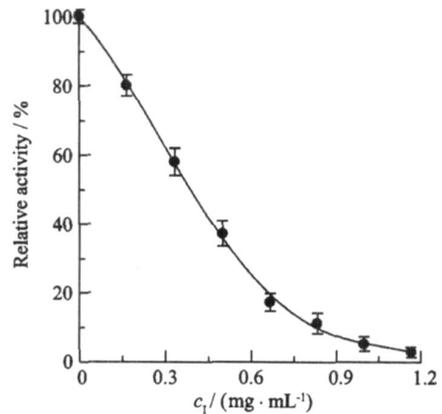


图2 芦荟皮提得的抑制剂对蘑菇酪氨酸酶活力的抑制作用

Fig. 2 The inhibition on the activity of mushroom tyrosinase from the outer husk of Aloe

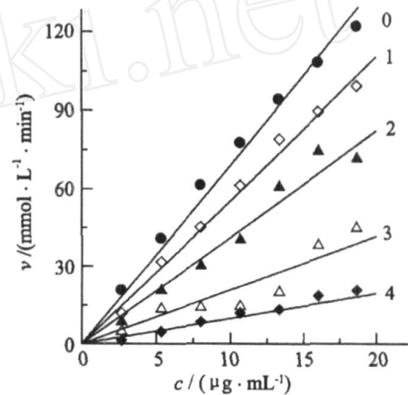


图3 在不同浓度的抑制剂作用下酶活力和酶量的关系
直线 0~4 分别代表测活体系中加入芦荟皮粗提物的浓度为 0, 0.25, 0.5, 0.75 和 1.0 mg/mL

Fig. 3 Effect of different concentrations on the activity of mushroom tyrosinase from the outer husk of Aloe

用,随着效应物浓度的增大,酶的活力呈指数的下降,测定导致酶活力下降一半所需要的抑制剂的浓度(IC_{50})为 0.439 mg/mL.

2.3 芦荟提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理

在测活体系中,固定底物(L-DOPA)浓度为 0.5 mmol/L,加入不同浓度的芦荟提取物,改变加入的蘑

表 1 芦荟大黄素标准曲线的绘制
Tab. 1 The criterion curve of Aloe emodin

	OD_{510nm}								
	0.000	0.018	0.034	0.059	0.079	0.098	0.116	0.140	0.164
浓度(mg/mL)	0.000	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008
含量(μg)	0.0	10	20	30	40	50	60	70	80

菇酪氨酸酶的酶量,测定酶催化 *L*-DOPA 的氧化活力.图 3 表示酶在含不同浓度的芦荟提取物的测活体系中,酶的活力与加入的酶量之间的关系.酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线,随着效应物浓度的增大,直线斜率降低,说明了芦荟的粗提物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用属于可逆的过程.也就是说增加效应物的浓度将导致酶活力下降是由于酶活力受到抑制,催化效率降低,而不是通过减少有效酶量,而引起酶活力下降.

2.4 芦荟粗提物对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型及抑制常数的测定

在测活体系中,固定加入的酶量,改变底物 *L*-DOPA 的浓度,测定酶在不同浓度抑制剂下的催化活力.以酶反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线,说明酶促反应遵循米氏 (Michaelis-Menten) 动力学方程.以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,可以判断芦荟的提取物对该酶的抑制作用类型.实验结果见图 4-I 所示,为一组相交在第二象限的直线,横轴截距和纵轴截距都因为效应物浓度的变化而改变,米氏常数 (K_m) 随效应物浓度的增大而变大,酶促反应的最大速度 (V_m) 则随效应物浓度的增大而下降,其抑制类型属于混合型.二次作图,以双倒数的斜率(图 4-II)和纵轴截距(图 4-III)对所含的效应物的浓度作图为直线,分别求出抑制剂对游离酶抑制常数 (K_i) 为 0.48 mmol/L 和对酶-底物络合物抑制常数 (K_{is}) 为 3.73 mmol/L.

3 讨 论

芦荟素等很多有效成分多合成、成熟于叶的同化组织细胞中的叶绿体类囊体,通过维管束的鞘细胞最终转运到维管束韧皮部的大型薄壁细胞中^[8],因此芦荟表皮、同化组织和维管束中存在大量的有效成分.芦荟叶的表皮下是同化薄壁组织和储水组织,其中储水组织占叶片横切面的 60%~70%,但是叶肉部分的薄壁细胞只发挥储水、保湿等功效,叶肉部分的提取物对酪氨酸酶活力没有任何影响,因此本文作者只取芦荟表皮至维管束间的同化薄壁组织为材料所得的提取物进行研究.

芦荟皮提取物导致蘑菇酪氨酸酶酶活力下降 50% 所需的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为 0.439 mg/mL,抑制类型表现为混合性.表明该提取物既通过与底物 *L*-DOPA 竞争蘑菇酪氨酸酶的活性中心来抑制酶活性,又通过反应产生酶-底物-抑制剂三元络合物 (EDS) 而产生抑制作用,从而影响了底物与酶的正常结合而产生抑制作用.测定粗提物的有效成分芦荟大黄素

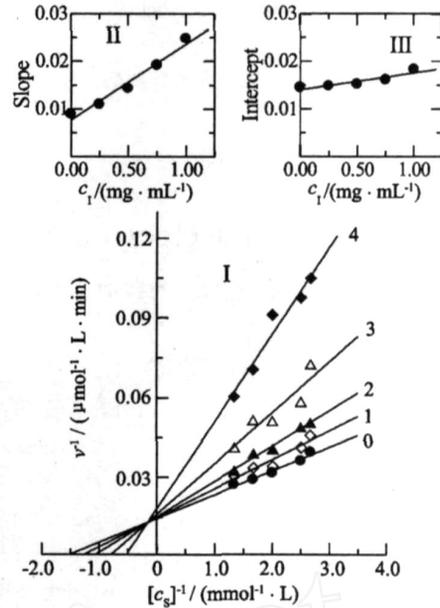


图 4 芦荟皮的提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用
直线 0~4 分别代表测活体系中加入的芦荟皮粗提物的浓度为 0, 0.25, 0.5, 0.75 和 1.0 mg/mL

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots on the activity of mushroom tyrosinase from the outer husk of Aloe

($C_{15}H_{10}O_5$) 的含量为 0.4%,说明芦荟大黄素在芦荟皮中占有相当的比例.芦荟大黄素在苯环上连接有两个游离的羟基,所以能够有效地与活性中心结合,从而能够有效地与底物竞争活性中心;同时本身又含有两个醛基,醛基有可能与蘑菇酪氨酸酶的活性中心的亲核基团结合,造成空间位阻,阻止底物的结合,从而降低酪氨酸酶的活力,发挥调控作用.综上所述:芦荟皮提取物对酪氨酸酶有较强的抑制作用,芦荟大黄素可能是其中的有效成分.

参考文献:

- [1] 常秀莲,冯咏梅,丛丽华,等.芦荟的生物学功效研究进展[J].食品科技,2007(5):10-13.
- [2] 陈清西,宋康康.酪氨酸酶的研究进展[J].厦门大学学报:自然科学版,2006,45(5):731-737.
- [3] Sanchez Ferrer A, Rodriguez Lopez J N, Garcia Canovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. BBA-protein and Molecular Enzymology, 1995, 1247:1-11.
- [4] 黄璜,刘晓丹,陈清西.苯甲醛族化合物抑制蘑菇酪氨酸酶活力的研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2003,42(1):98-101.
- [5] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. Jour-

- nal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18(6):491 - 496.
- [6] 胡源,刘克武,喻东,等. 马铃薯酪氨酸酶的性质[J]. 化学研究与应用, 2005, 17(1):55 - 57.
- [7] 庄向平,虞杏英,杨更生,等. 银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法[J]. 中草药, 1992, 23(3):122 - 124.
- [8] 胡正海,廖海民,沈宗根,等. 芦荟属植物含芦荟素结构研究[J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(6):506 - 513.

The Inhibitory Effect on Mushroom Tyrosinase by the Extraction of the Inhibitor from the Outer Husk of Aloe vera

QIU Ling, ZHONG Xue, ZHUANG Jiang-xing, DU Juan, 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 : Mushroom Tyrosinase is an enzyme that is very important in the browning of fruit and vegetable. Browning of animal usually is caused by effect of Tyrosinase itself. The outer husk of aloe is separated to get the coarse inhibitor of Mushroom Tyrosinase by pounding to pieces, filtrating, extracting, distilling to concentrate liquid attained. We use this inhibitor to act with Mushroom Tyrosinase. Through this way, we can detect the influence of coarse inhibitor on Mushroom Tyrosinase (the rate of inhibit, the type of inhibit): the inhibitor's concentration leading to 50% activity lost (IC_{50}) of it was determined to be 0.439 mg/mL. The mechanism of this coarse extraction effecting on enzyme is reversible. The type of this coarse extraction effecting on enzyme is mixed type. The inhibition constant (K_I) was determined to be 0.258 mg/mL. The K_S was determined to be 3.335 mg/mL. As to the major constitution of coarse inhibitor: Aloe-emodin, we detect the content of this compound is 0.4%. Through its structure, we can conclude that Aloe-emodin is the main compound which has strong influence on the activity of Mushroom Tyrosinase.

Key words : tyrosinase; *Aloe vera*; inhibition; kinetics