

DOI: 10.3969/j.issn.1004-4949.2022.01.011

海藻酸钠对酪氨酸酶的抑制作用

李 燕¹, 王 芳², 谌 燃³, 贾淇媛⁴, 周海峰⁵

(1.广州市龙洞人民医院美容皮肤科, 广东 广州 510520;

2.成都画美医疗美容医院, 四川 成都 610000; 3.北京铭颜医疗美容门诊部, 北京 100000;

4.北京新星靓医疗美容医院, 北京 100000; 5.深圳曹孟君医疗美容门诊部, 广东 深圳 518000)

【摘要】目的 研究海藻酸钠对酪氨酸酶及黑色素生成的抑制作用。**方法** 开展酶抑制动力学实验, 通过荧光光谱分析海藻酸钠对酪氨酸酶活性抑制效果, 并研究海藻酸钠对黑素细胞抑制效果。**结果** 海藻酸钠能够显著抑制酪氨酸酶活性, 海藻酸钠浓度小于20 mmol/L时, 浓度越高, 抑制效果越好。超过20 mmol/L时, 海藻酸钠对酪氨酸酶活性抑制率65.45%, 海藻酸钠浓度增加, 对胞内黑色素生成抑制率随之上升, 降低黑色素生成量; 海藻酸钠与酪氨酸酶的相互作用对氨基酸残基疏水性环境产生破坏性, 出现内源性荧光光谱红移; 海藻酸钠对黑素细胞活性超过90%, 未产生明显毒性。**结论** 皮肤相关疾病治疗药剂及美白化妆品中可以使用海藻酸钠, 效果良好。

【关键词】 海藻酸钠; 酪氨酸酶; 抑制作用; 黑色素合成

中图分类号: TQ658

文献标识码: A

文章编号: 1004-4949 (2022) 01-0039-04

Inhibitory Effect of Sodium Alginate on Tyrosinase

LI Yan¹, WANG Fang², SHEN Ran³, JIA Qi-yuan⁴, ZHOU Hai-feng⁵

(1.Department of Cosmetology and Dermatology, Guangzhou Longdong People's Hospital, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2.Chengdu Huamei Aesthetic & Plastic Hospital, Chengdu 610000, Sichuan, China;

3.Beijing Mingyan Medical Beauty Clinic, Beijing 100000, China;

4.Beijing Xinxingliang Medical Beauty Hospital, Beijing 100000, China;

5.Shenzhen CAO Mengjun Medical Beauty Clinic, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

【Abstract】Objective To study the inhibitory effect of sodium alginate on tyrosinase and melanin production. **Methods** Enzyme inhibition kinetics experiment was carried out. The inhibitory effect of sodium alginate on tyrosinase activity was analyzed by fluorescence spectroscopy, and the inhibitory effect of sodium alginate on melanocytes was studied. **Results** Sodium alginate could significantly inhibit tyrosinase activity. When the concentration of sodium alginate was less than 20 mmol/L, the higher the concentration, the better the inhibitory effect. More than 20 mmol/L, the inhibition rate of sodium alginate on tyrosinase activity was 65.45%. With the increase of sodium alginate concentration, the inhibition rate of intracellular melanin production increased, and the melanin production decreased. The interaction between sodium alginate and tyrosinase was destructive to the hydrophobic environment of amino acid residues, resulting in the red shift of endogenous fluorescence spectra. Sodium alginate had no obvious toxicity to melanocytes with the activity of more than 90%. **Conclusion** Sodium alginate can be used in the treatment of skin-related diseases and whitening cosmetics, and the effect is good.

【Key words】 Sodium alginate; Tyrosinase; Inhibition effect; Melanin synthesis

酪氨酸酶对人体皮肤组织有不良影响, 可使皮肤中黑色素增加, 容易引发雀斑、黄褐斑、黑素瘤等皮肤病, 对健康造成不良影响^[1]。当前很多化妆品中具有色素沉着和安全抑制剂。很多

第一作者: 李燕 (1985.10-), 女, 湖南益阳人, 本科, 主治医师, 主要从事皮肤美容工作

引用格式: 李燕, 王芳, 谌燃, 等. 海藻酸钠对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 医学美容, 2022, 31(1): 39-42.

收稿日期: 2021-10-20

修回日期: 2021-11-29

天然化合物中均含有能够与酶相结合的抑制剂与底物,但是在使用过程中容易出现难以有效分解的现象^[2]。对酪氨酸酶活性能够起到良好抑制效果的自然产物有香豆素、黄酮及其衍生物、生物碱、萜类、苷类物品等,但是在物品使用过程中需要考虑到如何进行提取以及提取成本的问题,因此整体经济实用性不强^[3]。本研究分析了海藻酸钠的应用方式、化学结构,对抑制酪氨酸酶活性合成的作用情况,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 美国PerkinElmer公司出产的LS55荧光/磷光分光光度计、Lambda900紫外-可见分光光度计,以及美国Bio-Rad公司出产的680酶标仪。上海阿拉丁生化公司生产的海藻酸钠、曲拉通X-100、酪氨酸酶、左旋多巴;北京鼎国昌盛公司生产的PBS磷酸盐缓冲液、MTT噻唑兰;美国ScienCell研究实验室提供的黑素细胞专用培养基、黑素细胞。

1.2 方法

1.2.1测定酪氨酸酶活性 在3 ml 50 mmol/L PBS中添加2.9 ml 1 mmol/L左旋多巴溶液,将混合溶液放入32 ℃水浴,保温处理20 min。之后添加0.1 ml酪氨酸酶溶液,将混合溶液摇匀,在恒温环境下测量在不同时间点混合液吸光度变化情况。1个酪氨酸酶活力单位判断标准为1 min内混合溶液中475 nm波长吸光度值变动超过0.001。

1.2.2测定酪氨酸酶抑制率 配置0.25、0.5、2、4、8、16、32、64 mmol/L浓度海藻酸钠溶液,将2.8 ml 1 mmol/L左旋多巴溶液与0.1 ml以上不同浓度海藻酸钠溶液进行充分混合。将制作完成的混合溶液放入32 ℃水浴,保温处理20 min。之后添加0.1 ml酪氨酸酶溶液,将混合溶液充分摇匀之后,在室温状态下测量以上不同浓度溶液在475 nm处的吸光度,收集实验中得到的各项数值,制作吸光度-时间曲线。通过以下公式得出抑制率(R): $R = (1 - S_1/S_0) \times 100\%$ 。在该公式中,海藻酸钠溶液添加之后的曲线斜率以 S_1 表示,酪氨酸酶抑制率表示以R表示,没有海藻酸溶液添加的溶液绘制的

曲线斜率以 S_0 表示。

1.2.3培养黑素细胞 通过黑素细胞专用培养基进行黑素细胞培养,将其放入37 ℃ 5%CO₂的细胞培养箱之中培养,在细胞满足对数生长期条件下开展实验。

1.2.4黑素细胞中酪氨酸酶活性的抑制 设置每孔8000个密度,将黑素细胞放入96孔板中进行实验,经过12 h之后,在96孔板中加入不等量海藻酸钠。至72 h培养之后,对黑素细胞进行洗涤处理,使用PBS进行清洗。将50 μl 1%曲拉通X-100加入96孔板之中。将处理完成的黑素细胞放入-80 ℃冰箱环境下放置30 min。在室温状态下,取出黑素细胞分析。在黑素细胞破裂同时温度达到37 ℃之后,将50 μl 10.2%左旋多巴添加至黑素细胞之中。使用外-可见分光光度测量475 nm位置中的吸光度值。计算酪氨酸酶活性抑制率。

1.2.5海藻酸钠的细胞毒性 设置每孔8000个细胞密度,进行黑素细胞培养,设置96孔细胞培养板。将0.25、2、16、64 mmol/L加入96孔细胞培养板之中。每一个细胞板设置6个复孔。在完成24、72 h细胞培养之后,通过MTT法分析细胞活性。

2 结果与分析

2.1 酪氨酸酶活性分析 酪氨酸酶在32 ℃环境下能够催化左旋多巴,在实验时间逐渐增加的同时,能够产生吸光度曲线。在实验时间增加时,产物生成量随之相应增加。进行数值计算: $y = 0.0055x + 0.0020$ ($R^2 = 0.9949$)。可见,时间与产物生成量具有较高的相关性,酪氨酸酶大小数值即曲线斜率,实验进行酪氨酸酶保持较为稳定的活性,见图1。

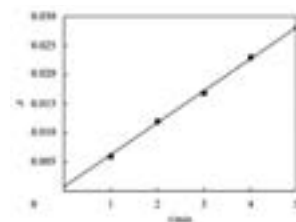


图1 酪氨酸酶活力曲线

2.2 海藻酸钠对酪氨酸酶的抑制作用 海藻酸钠能够显著抑制酪氨酸酶活性,降低产物产量。海藻

酸钠浓度小于20 mmol/L时,浓度越高,抑制效果越好,表现出浓度依赖型抑制特征。海藻酸钠浓度超过20 mmol/L时,其对酪氨酸酶产生的活性抑制率为65.45%,此时基本上达到一个确定的数值,浓度继续增加酪氨酸酶活性抑制率不会产生较大变化。共同培养黑素细胞与海藻酸钠,其对黑素细胞也具有一定的抑制作用。但是所起到的抑制效果不如直接添加至酪氨酸酶体系之中,主要是由于细胞体系内部复杂的环境。海藻酸钠能够通过细胞膜进行细胞交换,其内部组成成分较为复杂,不利于活性抑制效果的达成。但是依然能够产生一定的活性抑制效果。因此,海藻酸钠在体外能够达到更为良好的应用效果。因此当前色素紊乱性防治药剂及化妆品中加入了海藻酸钠,具有此作用机理。

2.3 海藻酸钠对黑色素合成的影响 随着海藻酸钠浓度的增加,对胞内黑色素生成抑制率也随之上升,能够有效降低黑色素生成量,其作用原理为酪氨酸酶是合成黑色素的限速酶。本次研究中曲酸对黑素细胞中黑色素生成也具有一定的抑制作用,但是综合效果不如海藻酸钠。同时曲酸的应用对人体具有一定的致癌风险,对细胞生长不利,因此综合分析海藻酸钠对抑制黑色素合成具有良好的效果,见图2。

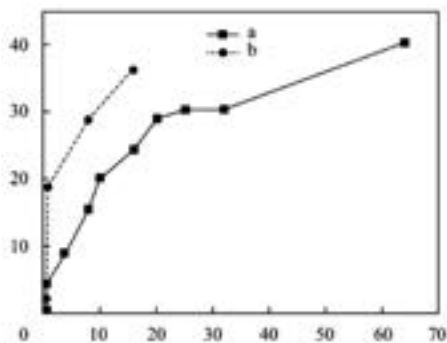


图2 海藻酸钠与曲酸对黑色素生成的抑制作用曲线

2.4 海藻酸钠对酪氨酸酶活性的抑制作用 研究不同浓度海藻酸钠下酪氨酸酶荧光发射光谱,可见随之海藻酸钠浓度的增加,酪氨酸酶内源荧光强度随之降低,说明酪氨酸酶与海藻酸钠的联合作用在一

定程度上减弱了酪氨酸酶内源性荧光。酪氨酸酶发射波长最大可达295 nm,但是在加入海藻酸钠之后,最大发射波长有所降低,因此海藻酸钠与酪氨酸酶的相互作用对氨基酸残基疏水性环境产生了一定的破坏性。酪氨酸酶包括多个亚基,亚基中包括金属铜离子,金属铜离子能够与氨酸残基结合而固定于酶活性中心,金属铜离子与氨酸残基之间通过内源氧桥连接,此即酪氨酸酶催化反应活性中心。同时酪氨酸酶铜离子吸附性能极佳,能够有效激发酪氨酸酶活性位点的铜,使得酪氨酸酶不可逆的失活。外在表现上酪氨酸酶结构呈现出一定变化,即内源性荧光光谱红移,因此证明了海藻酸钠的活性抑制效果,见图3。

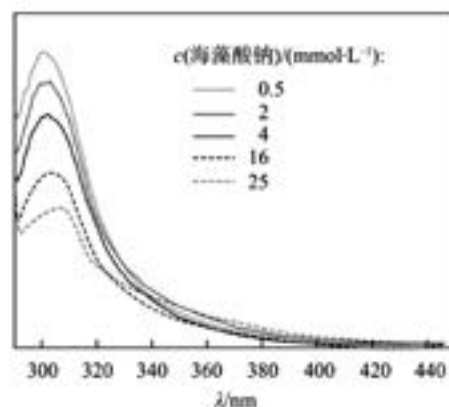


图3 不同浓度海藻酸钠下海藻酸钠内源性荧光变化图

2.5 海藻酸钠细胞毒性分析 探讨海藻酸钠使用过程中的毒性,当前该材料已经被广泛应用于生物医用相关产品之中,成为了一种较为常见的制备药物载体材料,在创伤敷料、组织工程支架等领域中均广泛应用。在使用过程中能够与其他相关材料有效融合,生物相容性较为良好。在已知具有以上作用机理的同时,分析海藻酸钠的使用是否会造成不良影响,对人体组织细胞是否具有毒性。海藻酸钠对黑素细胞毒性的实验研究结果显示,在实验中所设置的浓度之内,海藻酸钠对黑素细胞细胞活性超过90%,未产生明显毒性,见图4。

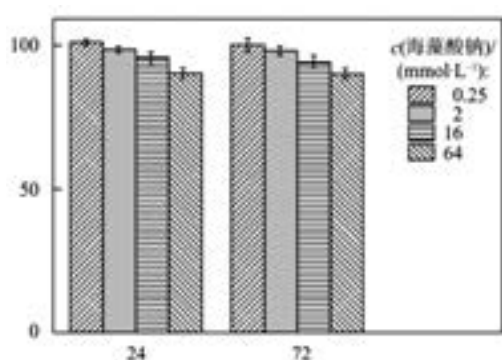


图4 海藻酸钠细胞毒性分析

3 讨论

海藻酸钠来源广泛,价格低廉,是一种优良的天然产物^[6]。同时,海藻酸钠已广泛应用于食品工业和医药工业,表明其具有良好的生物安全性^[7]。更重要的是海藻酸钠中含有丰富的羟基、羧基和羰基,有可能对酪氨酸酶形成混合型抑制作用^[8]。此外,酪氨酸酶活性还与环境中铜离子含量相关,海藻酸钠吸附铜离子的能力较强,同样可从这条途径抑制酪氨酸酶活性^[9]。由此可见,海藻酸钠极有可能成为天然、高效、安全、经济的酪氨酸酶抑制剂,从而防止黑色素的过度沉积^[10,11]。但目前未见文献报道海藻酸钠对酪氨酸酶活性抑制方面的研究。因此,本研究拟通过实验证实海藻酸钠的酪氨酸酶抑制作用,并阐明其抑制机制,同时评价海藻酸钠的生物相容性,为其在美白化妆品中的应用提供理论基础和实验数据。

本研究开展了酶抑制动力学实验,从多个层面证明了海藻酸钠对酪氨酸酶的活性抑制效果。同时对黑素细胞活性同样能够起到一定的抑制效果。在使用过程中能够有效抑制黑素细胞内黑色素生成,一般随着海藻酸钠浓度的增加抑制效果逐渐增强^[12,13]。荧光光谱可见酪氨酸酶与海藻酸钠的联合作用减弱了酪氨酸酶内源性荧光,能够在一定程度上破坏氨基酸残基疏水性环境,同时也存在着混合性抑制。通过黑素细胞毒性实验可见海藻酸钠的生物相容性良好^[14]。

综上所述,海藻酸钠是一种较为良好的

酪氨酸酶活性抑制剂,能够有效抑制黑色素生成,可应用于皮肤相关疾病治疗药剂及美白化妆品之中。

参考文献:

- [1]左立,孙亦农,李俊.桃红四物汤对黄褐斑小鼠血酪氨酸酶含量和皮肤形态的影响[C]/2015年中华中医药学会美容分会学术年会论文集.2015.
- [2]迟玉明,赵晞瑛,郭济贤.天然产物在新药开发中的应用--HMG-CoA还原酶抑制剂新药的发现对天然产物研究与开发的启示[J].天然产物研究与开发,2006,18(1):134-137.
- [3]杨宇,宋孟霜,陈婕,等.白鲜皮抑制酪氨酸酶作用研究及其美白面膜制备[J].广州化工,2021,49(12):88-89,124.
- [4]袁庆兰,李锐扬,宋欢,等.海藻酸钠/壳聚糖/海藻酸钙微胶囊机械强度的研究[J].广州化工,2021,49(14):55-58.
- [5]Aguero L,Zaldivar-Silva D,Pena L,et al.Alginate microparticles as oral colon drug delivery device:A review[J].Carbohydrate Polymer,2017,168:32-24.
- [6]刘欢,陈胜军,杨贤庆.海藻多糖的提取、分离纯化与应用研究进展[J].食品工业科技,2018,39(12):341-346.
- [7]任壮.酶解提取海带多糖及应用研究[D].天津:天津科技大学,2017.
- [8]Reakasame S,Boccaccini A.Oxidized alginate-based hydrogels for tissue engineering applications:A review[J].Biomacromolecules,2018,19(1):3-21.
- [9]刘冰月,刘学,邬凤娟,等.羊栖菜岩藻多糖的提取工艺优化及保湿性能[J].日用化学工业,2017,47(7):398-402.
- [10]Zhou Q,Kang H,Bielec M,et al.Influence of different divalent ions cross-linking sodium alginate-polyacrylamide hydrogels on antibacterial properties and wound healing[J].Carbohydrate Polymers,2018,197:292-304.
- [11]缪志刚.草叶马尾藻多糖的分离纯化及生物活性研究[D].上海:上海海洋大学,2016.
- [12]霍彦雄,任亚梅,袁春龙,等.根皮苷豆蔻酸酯的抗氧化活性[J].食品科学,2017,38(9):119-125.
- [13]郑阿萍.Keggin型多金属氧酸盐的抑酶活性及果蔬保鲜应用[J].内蒙古民族大学学报,2018,33(3):204-207.
- [14]何善生.螺旋藻中活性物质的提取、性能及应用[D].厦门:集美大学,2018.