

人参皂苷 Rb₁ 美白功效的初步研究^{*}

宋文刚¹, 孙立伟¹, 李 玉^{2**}

1. 北华大学基础医学院, 吉林 132013; 2. 吉林农业大学, 长春 130118

摘 要: 通过体外蘑菇酪氨酸酶活性的检测,研究了人参皂苷 Rb₁ 对体外蘑菇酪氨酸酶的影响;通过细胞增殖率的测定,研究了人参皂苷 Rb₁ 对 B16 黑色素细胞增殖的影响。结果表明:不同浓度 Rb₁ 样品对于体外蘑菇酪氨酸酶的抑制率明显低于熊果苷 ($P > 0.1$),抑制率均在 $\pm 5\%$,说明人参皂苷 Rb₁ 对于体外蘑菇酪氨酸酶活性没有明显作用;人参皂苷 Rb₁ 对 B16 黑色素细胞增殖的影响随着浓度的变化而变化,当 Rb₁ 质量浓度 $< 125 \mu\text{g/mL}$ 时对 B16 黑色素细胞增殖有促进作用, $> 125 \mu\text{g/mL}$ 时对 B16 黑色素细胞增殖有抑制作用。

关键词: 人参皂苷 Rb₁; 酪氨酸酶; 黑色素细胞; 美白功效

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5684(2010)05-0498-02

A Preliminary Research on the Whitening Effect of Ginsenoside Rb₁

SONG Wen-gang¹, SUN Li-wei¹, LI Yu²

1. College of Basic Medicine, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: The effect of ginsenoside Rb₁ on mushroom tyrosinase in vitro was studied through the testing of mushroom tyrosinase activity in vitro, and the effect of ginsenoside Rb₁ on B16 Melanoma cells was studied through the determination of cell proliferation rate. The results show that the inhibition rate of samples for different concentrations of Rb₁ to mushroom tyrosinase in vitro is significantly lower than arbutin ($P > 0.1$), and the inhibition rate is between $\pm 5\%$, indicating that ginsenoside Rb₁ has no apparent effect on mushroom tyrosinase activity in vitro. The effect of ginsenoside Rb₁ on proliferation of B16 melanoma cells varies with the concentration. When it is $< 125 \mu\text{g/mL}$, it has promotion effect on B16 cell proliferation. When the concentration is $> 125 \mu\text{g/mL}$, it has inhibition effect on B16 cell proliferation.

Key words: ginsenoside Rb₁; tyrosinase; melanoma cell; whitening effect

近年来,随着人们生活水平的提高,对生活质
量的要求也不断提高,以各种天然植物提取物为
美白添加剂的化妆品越来越受到人们的青睐。人
参系五加科植物,具有较好的美白嫩肤作用,其提
取物常作为美白成分添加在很多化妆品中,但其
美白作用机制尚不明确。已有研究表明,人参提
取物的主要活性成分为人参皂苷,其中人参皂苷
Rb₁ 的含量较高,故笔者以人参皂苷 Rb₁ 为试验
对象,研究其美白作用。

在黑色素细胞中,黑色素是由酪氨酸经酪氨
酸酶催化形成多巴,再由酪氨酸酶继续催化形成
多巴醌,然后重新排列成 5,6-醌吡啶,其发生聚合
后与黑素体内的结构蛋白结合形成黑素蛋白即黑
色素。黑色素合成后,从黑色素细胞输送到角朊
细胞,并随角朊细胞的成熟而弥散到表皮各层,最
后随表皮脱落而消失。由此可见,酪氨酸酶在黑
色素合成过程中起着关键作用^[1]。

笔者通过人参皂苷 Rb₁ 对体外酪氨酸酶活性

^{*} 基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAI 38B02-1)

作者简介: 宋文刚,男,博士,副教授,研究方向:长白山药用真菌的开发与利用。

收稿日期: 2010-07-10 修回日期: 2010-08-20

^{**} 通讯作者

和 B16 黑色素细胞增殖作用的影响试验,对人参皂苷 Rb₁ 的美白作用进行了研究,为进一步明确人参提取物的美白作用机理、研制天然美白剂提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人参皂苷 Rb₁ 由中国农业科学院特产研究所提供,B16 黑色素细胞株由中国科学院上海细胞研究所提供。DMEM 培养基、酪氨酸、蘑菇酪氨酸酶、胰蛋白酶、二甲基亚砜、MTT 试剂均为美国 Sigma 公司产品;新生牛血清 Gibco、熊果苷和胰酶为上海江莱生物科技有限公司品。酶标仪 DNM-9606 为北京普朗新技术有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 体外蘑菇酪氨酸酶活性的检测 在 96 孔板中加入 80 μL L-酪氨酸 (2.0 mmol/L) 和 20 μL 不同浓度梯度 (1 000,500,100,20 μg/mL) Rb₁ 样品及不同浓度的阳性对照熊果苷,然后加入 20 μL 蘑菇酪氨酸酶 (1 000 U/mL),加水至 200 μL。37 °C、0.5 h 后,酶标仪 490 nm 处测定 OD 值^[2]。抑制率 (CI) = (对照组 OD₄₉₀ - 样品组 OD₄₉₀) / 对照组 OD₄₉₀ × 100 %。

1.2.2 B16 黑色素细胞的培养 应用含 10 %新生牛血清的 DMEM 培养液,在 37 °C、5 %CO₂ 条件下培养 B16 细胞。细胞以 3 × 10⁵/mL 传代,根据细胞生长状况及时传代。

1.2.3 细胞增殖率的测定 用 0.25 %胰酶消化对数生长期的 B16 黑色素细胞,将细胞稀释成 3 × 10⁴/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL,置于 37 °C、5 %CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,吸弃旧培养基。空白组加入 100 μL 5 %的培养基;给药组加入不同浓度梯度 (1 000,500,250,125,25,5 μg/mL) 的 Rb₁ 样品,各组均为 3 个复孔。继续在 5 %CO₂ 培养 67 h 后,每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL,用 PBS 配置),继续培养 5 h。小心吸弃上清,每孔各加入 150 μL 的二甲基亚砜 (DMF-SO),振荡 10 min,酶标仪 570 nm 处测定 OD 值。1.2.4 统计分析 对数据均进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 Rb₁ 对体外蘑菇酪氨酸酶活性的影响

Rb₁ 和熊果苷对体外蘑菇酪氨酸酶活性的影响试验结果见图 1。不同浓度 Rb₁ 样品对于体外蘑菇酪氨酸酶的抑制率明显低于熊果苷 (P > 0.1),抑制率均在 ±5 %,随着浓度的增加,Rb₁ 对体外蘑菇酪氨酸酶的抑制率逐渐降低。所以,人参皂苷 Rb₁ 对体外蘑菇酪氨酸酶没有明显的抑制作用。

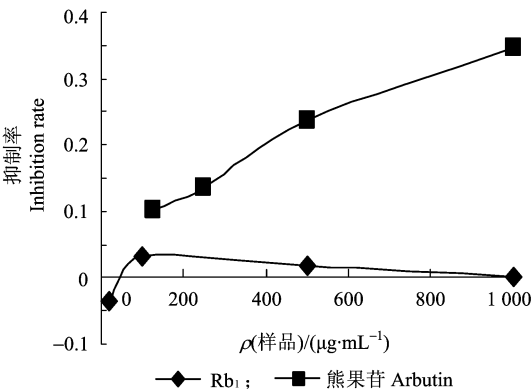


图 1 Rb₁ 对体外蘑菇酪氨酸酶活性的影响

Fig. 1. Effect of ginsenoside Rb₁ on mushroom tyrosinase

2.2 Rb₁ 对 B16 黑色素细胞增殖的影响

Rb₁ 对 B16 黑色素细胞增殖的影响试验结果见图 2。当 Rb₁ 浓度 < 125 μg/mL 时对 B16 黑色素细胞增殖有促进作用,> 125 μg/mL 时对 B16 黑色素细胞增殖有抑制作用。

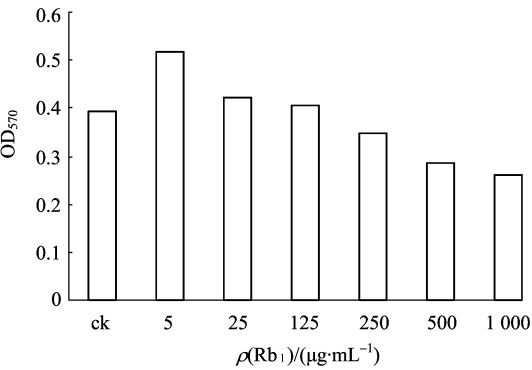


图 2 Rb₁ 对 B16 黑色素细胞增殖的影响

Fig. 2. Effect of ginsenoside Rb₁ on B16 melanoma cells

(下转第 504 页)

子生物学研究进展[J]. 植物学报, 2000, 42(6): 551-558.

[7] Gual J C, González-Bosch C, Dopazo J, et al. Phylogenetic analysis of the thiolase family Implications for the evolutionary origin of peroxisomes[J]. Journal of Molecular Evolution, 1992, 35: 147-155.

[8] Luskey K L, Stevens B. Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260: 10271-10277.

[9] Basson M E, Thorsness M, Finer-More J, et al. Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis[J]. Molecular and Cellular Biology, 1988, 8: 3797-3808.

[10] 刘涤, 胡之璧. 植物类异戊二烯生物合成途径的调节[J]. 植物生物学通讯, 1998, 34(1): 1-9.

[11] 陈莉, 朱华, 等. 三七总 RNA 提取方法的对比研究[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(5): 528-530.

[12] 陈大华, 叶和春, 李国凤, 等. 马铃薯 HMGR 基因的克隆、序列分析及其表达特征[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 724-727.

[13] 李文全, 王子花, 申瑞玲. HMG CoA 还原酶的结构和调节[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2): 38-40.

[14] 陈建, 赵德刚. 植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究进展[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 757-764.

[15] 张福城, 陈守才. 巴西橡胶树天然橡胶生物合成中关键酶及相关基因研究进展[J]. 热带农业科学, 2006, 26(1): 42-48.

[16] Caelles C, Ferrer A, Balcells L, et al. Isolation and structural characterization of a cDNA encoding Arabidopsis thaliana 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. Plant Mol Biol, 1989, 13(6): 627-638.

[17] Chye M L, Tan C T, Chua N H. Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in Hevea brasiliensis: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed[J]. Plant Mol Biol, 1992, 19

(3): 473-484.

[18] Bostock R M, Avdiushko S, Hildebrand D F. Lipid-derived signals that discriminate wound and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L.[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(6): 2329-2333.

[19] Daraselia N D, Tarchevskaya S, Narita J O. The promoter for tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression[J]. Plant Physiol, 1996, 112(2): 727-733.

[20] Rodríguez-Concepción M, GUISSEM W. Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation[J]. Plant Physiol, 1999, 119(1): 41-48.

[21] 郝宏蕾, 朱旭芬, 曾云中. 类异戊二烯的生物合成及调控[J]. 浙江大学学报, 2002, 28(2): 224-230.

[22] Choi D. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to Phytophthora infestans and to its elicitor arachidonic acid[J]. Plant Cell, 1992, 4: 1333-1344.

[23] Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Suwanmanee P. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from the latex of *Hevea brasiliensis* [J]. Phytochemistry, 1990, 29(4): 1401-1403.

[24] Schaller H, Grausem B, Benveniste P, et al. Expression of the *Hevea brasiliensis* (H. B. K.) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction [J]. Plant Physiology, 1995, 109(3): 761-770.

[25] Chappell J, Nable R. Induction of sesquiterpene biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor [J]. Plant Physiol, 1987, 85: 469-473.

(上接第 499 页)

3 讨 论

目前对于人参皂苷美白作用的研究较为少见。杨亚军等^[3]试验得出人参皂苷 Rb 能促进黑色素细胞的生长,对于酪氨酸酶同样有促进作用。程基焱等^[4]研究认为人参皂苷 Rb₁ 浓度 < 50 μg/ mL 对黑色素细胞的生长增殖没有影响,但对培养黑色素细胞一氧化氮合酶的表达有抑制作用。本试验结果表明, Rb₁ 在小剂量时对 B16 黑色素细胞增殖有促进作用,大剂量时对 B16 黑色素细胞增殖有抑制作用;对于体外酪氨酸酶活性无影响。可见,在人参皂苷 Rb 家族中的各个成员对于黑色素细胞的增殖和酪氨酸酶活性的影响可能是不同的。Rb₁ 对于体外酪氨酸酶活性

没有影响,可能通过其他途径(一氧化氮合酶)参与黑色素合成代谢过程。在后续的试验中,需进一步确定 Rb₁ 对于黑色素细胞内酪氨酸酶活性及黑色素的影响。

参考文献:

[1] 董银卯,何聪芬. 现代化妆品生物技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2009.

[2] Learm-Teik Ng, Horng-Huey Ko, Tzy-Ming Lu. Potential antioxidants and tyrosinase inhibitors from synthetic polyphenolic deoxybenzoins [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17: 4360-4366.

[3] 杨亚军,林莉,丁家宜,等. 天然活性物美白功效的细胞生物学研究[J]. 日用化学工业, 2002, 32(3): 19-21.

[4] 程基焱,钟桂书,韩艺,等. 人参二醇皂苷及人参皂苷 Rb₁ 对体外培养黑色素细胞的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1916-1917.