

藜麦皂苷的提取及其酪氨酸酶抑制活性

李萍¹, 罗强², 金鑫¹, 李强³, 蒋云¹, 黎青¹, 李健伟¹, 熊川¹

(1. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 四川成都 610061)

(2. 重庆医科大学附属第二医院感染病分子重点实验室肝炎研究所, 重庆 400010)

(3. 成都大学食品与生物工程学院农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川成都 610106)

摘要: 探究藜麦“陇藜1号”籽粒中皂苷的最佳提取条件并验证其酪氨酸酶抑制活性。设计三因素三水平正交实验, 探索料液比, 乙醇浓度及超声时间对藜麦皂苷提取得率的影响。构建L-多巴诱导的B16细胞模型, 测定藜麦皂苷对细胞活性及酪氨酸酶活性的影响, 最终通过免疫印迹法(Western blot)探索藜麦皂苷影响酪氨酸酶活性的作用通路。结果显示: 藜麦皂苷最佳提取条件为料液比1:40, 70%浓度的乙醇下超声60 min, 得率为17.85 mg/g。当藜麦皂苷的浓度低于200 μg/mL时, 其对B16细胞无显著抑制作用, 但能显著抑制酪氨酸酶的活性和黑色素的形成, 200 μg/mL藜麦皂苷处理B16细胞72 h, 黑色素相对含量降至73.85%, 酪氨酸酶活性降至53.31%。藜麦皂苷通过抑制小眼畸形相关转录因子(MITF)及酪氨酸酶(TYR)蛋白表达来抑制黑色素形成。藜麦皂苷可以作为一种具有美白活性的组分在化妆品或药品中应用。

关键词: 藜麦籽粒; 皂苷; 酪氨酸酶

文章编号: 1673-9078(2021)05-196-202

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0931

Separation of Saponins from *Chenopodium quinoa* and Its Tyrosinase Inhibitory Activities

LI Ping¹, LUO Qiang², JIN Xin¹, LI Qiang³, JIANG Yun¹, LI Qing¹, LI Jian-wei¹, XIONG Chuan¹

(1. Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China) (2. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases (Ministry of Education), Institute for Viral Hepatitis, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China) (3. Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: In order to explore the optimal extraction conditions of saponins from quinoa (Longli No.1) grains and to verify their tyrosinase inhibitory activity, three factors and three levels orthogonal experiments were designed to explore the optimum extraction conditions of the ratio of material to solution, ethanol concentration and ultrasonic time. L-dopa induced B16 cell model was established and the effects of quinoa saponin on cell activity and tyrosinase activity were measured. Finally, Western blot was used to explore the pathway of quinoa saponins affecting the activity of tyrosinase. The results showed that the best extraction conditions for quinoa saponins were 1:40 ratio of material to liquid, 70% ethanol under ultrasound for 60 min, and the yield was 17.85±0.88 mg/g. When the concentration of quinoa saponin was lower than 200 μg/mL, it had no significant inhibitory effect on B16 cells, but could significantly inhibit tyrosinase activity and melanin formation. When B16 cells were treated with 200 μg/mL chenopodin for 72 h, the relative content of melanin decreased to 73.85%, and the activity of tyrosinase decreased to 53.31%. Quinoa saponins inhibited the formation of melanin by inhibiting the expression of microphthalmia-associated transcription

引文格式:

李萍, 罗强, 金鑫, 等. 藜麦皂苷的提取及其酪氨酸酶抑制活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 196-202, +129

LI Ping, LUO Qiang, JIN Xin, et al. Separation of saponins from *Chenopodium quinoa* and its tyrosinase inhibitory activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 196-202, +129

收稿日期: 2020-10-10

基金项目: 农业农村部杂粮加工重点实验室国家杂粮加工技术研发分中心开放基金项目(2019cc09); 四川省农业科学院高新领域扩展工程(2018GXZT-001)

作者简介: 李萍(1990-), 女, 研究实习生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 熊川(1990-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 大型珍稀食药菌栽培及功效评价

factor (MITF) and tyrosinase (TYR) proteins. Quinoa saponins can be used in cosmetics or medicines as a component with whitening activity.

Key words: quinoa grain; saponin; tyrosinase

藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.), 又称南美藜、藜谷、奎奴亚藜等, 为一年生藜科草本作物。藜麦原产于南美洲安第斯山脉高海拔 (2800~4200 m) 地区, 在当地有超过 5000 年的种植历史, 因其丰富的营养和多样的保健功能而被称为“谷物之母”^[1]。现代研究确认, 藜麦中蛋白质含量高, 富含淀粉、矿物质及维生素, 且氨基酸组成均衡, 能够满足人体所必需的营养元素^[2], 长期食用藜麦, 不仅对高血糖、高血脂、心脏病等疾病具有良好的辅助治疗作用, 而且可以增强体力、提高免疫力、完善营养结构^[3]。

藜麦的功能成分包括多酚, 皂苷, 黄酮及多糖等^[4], 藜麦总多酚中含有酚酸、香草酸、阿魏酸及其衍生物、槲皮素、山奈酚及其苷类等, 藜麦总多酚具有较强的抗氧化活性^[5]。藜麦中含有种类丰富的皂甙, 近年来研究确认, 皂苷对人体健康有益, 许多传统中药材的有效成分都是皂苷, 皂苷具有降低胆固醇、抑菌、抗肿瘤等多种活性^[6]。

随着经济发展和生活品质的提升, 亚洲女性对美白的需求日益增加。目前研发的具有美白效果的护肤品多通过添加具有美白功效的化学合成物质来实现。如氢醌, 熊果苷, 曲酸和 BHT (2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚) 等^[7], 但是在使用过程中发现, 伴随快速的美白效果而来的是一系列的副作用, 如细胞毒性等^[8]。因此, 化妆品的安全性日益受到重视, 来源于植物中的天然美白物质因其较低的副作用而愈受关注。黑色素形成是一个复杂的过程, 其中酪氨酸酶作为黑色素合成中的关键酶异常重要^[9]。已有研究确认, 藜麦麸皮皂苷能够抑制酪氨酸酶活性, 是一种有待开发的天然美白物质^[10], 但对其作用机制缺乏研究。

基于以上分析, 本研究收集藜麦, 通过超声辅助提取结合正交实验探索藜麦皂苷的最佳提取方法, 在此基础上, 培养 B16 细胞, 验证藜麦皂苷对 B16 细胞黑色素合成的影响, 进一步测定细胞内酪氨酸酶的活性, 并探究藜麦皂苷对 B16 细胞黑色素合成的影响机制。获得的数据能够为藜麦皂苷作为一种美白成分在化妆品上的应用提供支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藜麦采集自四川省农业科学院阿坝州理县栽培试验基地, 品种为“陇藜 1 号”。中药材粉碎机粉碎后过

60 目筛, 置于通风阴凉处保存备用; B16 小鼠黑色素瘤细胞, 购买自中国科学院细胞库。

磷酸盐缓冲液 (PBS) 购买自上海麦克林生化科技有限公司; 细胞培养相关试剂 (包括 DMEM 培养基、胎牛血清), 购自美国 Gibco 公司; 聚乙二醇辛基苯基醚溶液 (Triton X-100)、左旋多巴溶液 (Levodopa, L-DOPA)、 α -黑色素细胞刺激素 (α -MSH) 购自 Sigma 公司; 小眼畸型相关转录因子 (MITF) 一抗、酪氨酸酶一抗、内参 GAPDH 一抗及对应的二抗, 购于 Abcam 公司。

石油醚、甲醇、高氯酸等试剂购于成都市科龙化工试剂厂; 其余试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱, 日本 SANYO 公司; Spectra max plus 384 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; LSC plus 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; IX73 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; N1200-B 旋转蒸发仪, 日本东京理化公司; VOSHIN-1000W 超声波清洗器, 无锡沃信仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 藜麦皂苷的提取

标准品选用齐墩果酸, 称取齐墩果酸标准品 5 mg, 溶解于无水甲醇中, 定容至 25 mL 容量瓶中, 最终获得标准品溶液, 浓度为 0.2 mg/mL。依次准确吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 的标准品溶液于具塞试管中, 水浴挥干液体并静置冷却。加入显色剂 5% 的香草醛-冰乙酸 0.2 mL 和 0.8 mL 的高氯酸, 并通过漩涡震荡混匀。70 °C 水浴 15 min, 静置冷却后加入 5 mL 冰醋酸, 反应 20 min, 测定波长 545 nm 处的吸光值, 以吸光值为纵坐标, 以标品浓度 (mg/mL) 为横坐标, 绘制标准曲线。总皂苷含量计算公式如下:

$$\text{总皂苷含量}(\text{mg/g}) = \frac{CV}{m}$$

式中: C: 总皂苷浓度 (mg/mL), 基于标准曲线计算得出; V: 提取液的总体积 (mL); m: 样品质量 (g)。

称取粉碎后过 60 目筛的藜麦 1 g, 加入 40 倍体积的石油醚过夜脱脂。抽滤并烘干收集藜麦。选取对藜麦种子皂苷提取量影响较为显著的料液比、乙醇浓度、超声时间 3 个因素, 设计三因素三水平正交实验, 如表 1 所示。测定藜麦皂苷的得率。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test			
水平	A: 料液比 (g/mL)	B: 乙醇 浓度/%	C: 超声 时间/min
1	1:20	60	50
2	1:30	70	60
3	1:40	80	70

1.3.2 B16 细胞活性测定

取对数期生长的 B16 细胞, 按照 3×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L 培养液。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 环境中培养 24 h。弃去上清液, 每孔添加含有不同浓度藜麦皂苷 (12.5、25、50、100、200、400 和 800 μ g/mL) 的完全平培养液 100 μ L, 对照组设定为不含藜麦皂苷样品的同体积培养液, 空白孔不接种细胞只加 100 μ L 培养基, 每组设定 3 个重复。采用 CCK8 法测定细胞活性。上述细胞于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 环境中继续培养 24 h、48 h、72 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 培养 4 h 后, 测定 450 nm 处的吸光值, 用空白孔调零, 测定并计算细胞活力^[11]。细胞活力的计算公式如下:

$$\text{细胞活力} / \% = \frac{\text{样品组吸光值}}{\text{对照组吸光值}} \times 100\%$$

1.3.3 藜麦皂苷对 B16 细胞黑色素含量的影响

采用 NaOH 溶解法测定 B16 细胞的黑色素含量^[12]。取对数期生长的 B16 细胞, 调整细胞浓度接种于 6 孔板 (3×10^4 个/孔)。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 环境中培养 24 h。吸弃培养液, 加入不同浓度的藜麦皂苷, 处理同 1.3.2, 每孔加入 1 mL。上述细胞于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 环境中继续培养 24 h、48 h、72 h, 后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次。之后加入 2 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液, 80 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 彻底溶解细胞团块。测定 492 nm 处的吸光值, 黑色素相对含量计算公式如下:

$$\text{黑色素相对含量} / \% = \frac{\text{样品组吸光值}}{\text{对照组吸光值}} \times 100$$

1.3.4 藜麦皂苷对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

细胞培养及处理方法同 1.3.2。藜麦皂苷处理后的细胞继续培养 24 h、48 h、72 h, 吸弃培养液, 后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次。加入 50 μ L 细胞裂解液 1% Triton X-100, 低温冷冻 1 h, 取出后室温融化。37 $^{\circ}$ C 孵育并加入 10 μ L 浓度为 1% 的 L-DOPA 溶液, 反应 1 h^[13]。测定 492 nm 处的吸光值, 酪氨酸酶相对活力计算公式如下:

$$\text{酪氨酸酶抑制率} / \% = 1 - \frac{\text{实验组平均吸光值}}{\text{空白组吸光值}} \times 100\%$$

1.3.5 黑色素形成作用通路探索

采用免疫印迹法 (Western blot) 测定 B16 细胞黑色素形成过程中关键蛋白表达情况^[14]。B16 细胞接种于 6 孔板, 用含有浓度为 10 nmol/L 的 α -MSH 和藜麦皂苷共处理 48 h。空白组只添加培养液, 模型组为包含 10 nmol/L α -MSH 的培养液。处理 48 h 后, 操作依次包括 RIPA 裂解 B16 细胞, 采用 Lowry 法定量蛋白, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 之后转膜并进行免疫反应, 一抗的稀释浓度参考说明书, 选择 GADPH 做二抗, 最后通过 ECL 显色并于凝胶成像系统中观察。

1.3.6 统计方法

所有实验重复三次, 所得数据均用 SPSS 17.0 软件分析, 采用 mean \pm SD 表示, 差异的显著性用 t-test 检验, 以 $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 藜麦皂苷最适提取条件

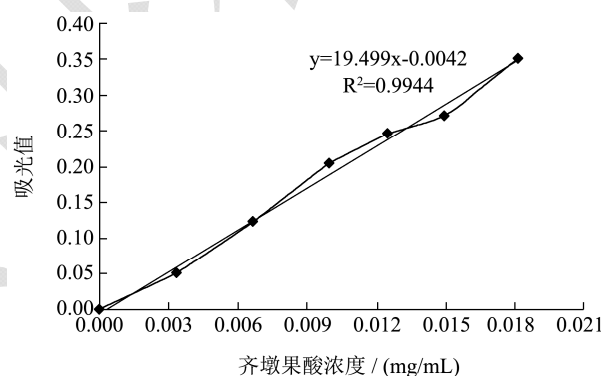


图1 齐墩果酸标准曲线

Fig.1 The standard curve of oleanolic acid

以齐墩果酸标准品浓度 (mg/mL) 为横坐标 X, 以对应的吸光值为纵坐标 Y, 绘制标准曲线如图 1 所示, 得到的标准方程为 $y = 19.449x - 0.0042$, $R^2 = 0.9944$ 。

通过不同料液比, 结合不同乙醇浓度和超声提取时间进行正交实验, 获得藜麦皂苷的得率如表 2。实验条件下藜麦皂苷的得率在 0.73%~1.72% 之间, 影响得率的主要因素为提取时的乙醇浓度(B), 最佳提取条件为 A₃B₂C₂, 即料液比设定为 1:40, 70% 浓度的乙醇下超声 60 min, 在此条件下, 进行实验, 最终获得的得率为 1.78%, 即 17.85 mg/g。

皂苷的提取方法有多种, 本实验采用超声波辅助提取法, 其操作简单, 易于控制; 相较于传统的溶剂提取法, 超声处理能够加快皂苷成分的浸出, 提高工作效率^[15]。

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

实验号	因素				得率/(mg/g)
	A 料液比/(g/mL)	B 乙醇浓度/%	C 超声时间/min	D	
	水平				
1	1	1	1	0	7.31±0.22
2	1	2	2	0	17.21±0.84
3	1	3	3	0	12.88±0.86
4	2	1	2	0	9.85±0.66
5	2	2	3	0	12.16±0.43
6	2	3	1	0	10.13±0.62
7	3	1	3	0	11.95±0.58
8	3	2	1	0	15.57±0.91
9	3	3	2	0	11.09±0.81
k1	12.47	9.70	11.00	0	
k2	10.71	14.98	12.72	0	
k3	12.87	11.37	12.33	0	
R	2.16	5.28	1.72	0	
主次因素					B>A>C
最佳组合					A ₃ B ₂ C ₂

表3 藜麦皂苷对 B16 细胞细胞活力的影响

Table 3 Effects of Quinoa saponins on cell viability of B16 cells

样品	浓度/($\mu\text{g/mL}$)	细胞活力/%		
		24 h	48 h	72 h
对照组	-	100	100	100
藜麦皂苷	12.5	97.61±1.47	96.01±2.82	95.36±1.76
	25	95.53±2.02	94.78±1.88	94.76±1.62
	50	96.62±1.27	96.02±1.03	95.54±0.96
	100	96.52±1.85	95.68±1.51	94.79±1.32
	200	95.42±1.76	94.98±1.62	94.52±1.59
	400	92.32±1.01*	91.05±0.96*	91.03±1.12*
	800	90.35±1.21*	89.92±0.85*	87.51±0.78**
熊果苷	100	84.49±1.52**	82.32±1.61**	78.84±1.98**

注: 与对照组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

2.2 藜麦皂苷对 B16 细胞活性的影响

藜麦皂苷作用 B16 细胞后, 细胞活性如表 3 所示。作用浓度和处理时间会影响藜麦皂苷对 B16 细胞增殖的抑制作用。低浓度的藜麦皂苷对 B16 细胞的活性无显著抑制作用, 藜麦皂苷浓度介于 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 最长 72 h 的处理时间内, B16 细胞活力未见明显下降。随着浓度的增加, 藜麦皂苷对 B16 细胞表现出一定的抑制作用。400 $\mu\text{g/mL}$ 的藜麦皂苷会显著抑制 B16 细胞的活性, 该浓度下处理 24 h, B16 细胞的活力降低至 92.32%, 而 800 $\mu\text{g/mL}$ 的藜麦皂苷会呈现极显著的

差异, 72 h 后细胞活力仅为 87.51%。浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的熊果苷(阳性对照)同样极显著的抑制 B16 细胞的活性, 处理 24 h 后, 细胞活力降至 84.49%。上述结果表明, 低浓度的藜麦皂苷($\leq 200 \mu\text{g/mL}$)对 B16 细胞的细胞活性无显著影响。

2.3 藜麦皂苷对 B16 细胞黑色素含量的影响

藜麦皂苷作用 B16 细胞后对其黑色素含量的影响如表 4 所示。基于藜麦皂苷对 B16 细胞活力的测定, 选定藜麦皂苷浓度为 12.5、25、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 进行黑色素含量的测定, 在此设定浓度下, B16 细胞

的活性不会受到明显抑制。实验设定的最低浓度的藜麦皂苷对 B16 细胞黑色素合成没有明显的抑制作用。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的藜麦皂苷只在培养 72 h 时表现出抑制作用。随着藜麦皂苷浓度的增加,抑制作用逐渐加强,

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的藜麦皂苷处理 B16 细胞 72 h,使得细胞内黑色素含量为 73.85%,即藜麦皂苷对黑色素生成量的抑制率达 26.15%。因此,藜麦皂苷是一种潜在的黑色素合成抑制剂。

表 4 藜麦皂苷对 B16 细胞黑色素合成的影响

Table 4 Effect of Quinoa saponins on melanin synthesis in B16 melanoma cells

样品	浓度/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	黑色素相对含量/%		
		24 h	48 h	72 h
对照组	-	100 ^a	100 ^a	100 ^a
藜麦皂苷	12.5	97.85 \pm 1.81 ^a	97.02 \pm 1.79 ^a	97.36 \pm 1.64 ^a
	25	97.53 \pm 1.74 ^a	97.78 \pm 1.23 ^a	95.09 \pm 1.74 ^b
	50	94.48 \pm 1.35 ^b	94.09 \pm 1.81 ^b	93.78 \pm 0.82 ^c
	100	90.17 \pm 1.31 ^c	89.92 \pm 1.05 ^c	90.02 \pm 1.12 ^d
	200	85.25 \pm 0.88 ^d	78.36 \pm 1.14 ^d	73.85 \pm 1.07 ^e

注:数值为 3 个重复的平均值 \pm 标准误,同列中不同小写字母表示 5% 差异显著性水平,下同。

表 5 藜麦皂苷对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

Table 5 Effect of Quinoa saponins on cellular tyrosinase activity in B16 melanoma cells

样品	浓度/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	酪氨酸酶活力/%		
		24 h	48 h	72 h
对照组	-	100 ^a	100 ^a	100 ^a
藜麦皂苷	12.5	93.31 \pm 0.71 ^b	92.02 \pm 0.89 ^b	91.18 \pm 1.15 ^b
	25	90.47 \pm 0.62 ^c	87.56 \pm 0.91 ^c	85.52 \pm 0.77 ^c
	50	86.69 \pm 0.67 ^d	83.15 \pm 0.72 ^d	80.43 \pm 0.93 ^d
	100	70.06 \pm 0.74 ^e	68.83 \pm 0.72 ^e	65.55 \pm 0.64 ^e
	200	64.43 \pm 0.61 ^f	58.84 \pm 0.69 ^f	53.31 \pm 0.77 ^f

2.4 藜麦皂苷对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

如表 5 所示,与对照组相比,藜麦皂苷对 B16 细胞酪氨酸酶活性具有显著的抑制作用。在实验设定的浓度范围内,12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的藜麦皂苷处理 24 h,酪氨酸酶活力降低至 93.31%,与对照组呈现显著差异 ($p < 0.05$)。随着藜麦皂苷浓度的增大及处理时间的增长,B16 细胞酪氨酸酶活性逐步降低,呈现剂量依赖关系。实验设定范围内,藜麦皂苷对 B16 细胞酪氨酸酶活性抑制率为 6.69%~46.69%。

人体皮肤中的黑色素是由黑色素细胞产生,可以通过细胞的树突结构转移至角质形成细胞中,并且能够重新排列分布,因此,伴随角质形成细胞的分化,黑色素可以向上迁移,最终迁移至皮肤角质层,在皮肤表面形成了色素沉积^[16]。目前,已有学者探索了黑色素的合成过程,首先,黑色素细胞中的酪氨酸在酪氨酸酶 (TYR) 的催化作用下与多巴反应,氧化生成多巴醌,多巴醌异构化形成多巴色素,多巴色素进一

步通过 2 条通路反应。其一,多巴色素脱羧并在 TYR 的作用下生成 5,6-吲哚醌;其二,多巴色素在 TRP-2 的作用下,形成 5,6-二羟基吲哚羧酸,进一步在 TRP-1 的催化下生成 5,6-吲哚醌羧酸,5,6-吲哚醌和 5,6-吲哚醌羧酸最终形成真色素。因此,酪氨酸酶在整个反应中作用重大,抑制酪氨酸酶的活性就能够有效抑制黑色素的形成^[17]。在本实验中,12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的藜麦皂苷对酪氨酸酶活性的抑制率为 6.69%,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的藜麦皂苷处理 72 h 后,抑制率达到 46.69%,具有较好的抑制作用。

2.5 藜麦皂苷对小眼畸型相关转录因子

(MITF) 及酪氨酸酶 (TYR) 蛋白表达的影响

如图 2 所示, α -黑色素细胞刺激素 (α -MSH) 作用后,细胞内 (模型组) MITF 和 TYR 的蛋白表达明显增加,分别为空白组的 123% 和 112%。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 藜麦皂苷处理后,MITF 的相对表达量为模型组的 59%,TYR 则为 74%。随着藜麦皂苷浓度的增加,细胞内 MITF 和 TYR 的表达量明显降低,当藜麦皂苷浓度达

到 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, MITF 和 TYR 的蛋白表达降至 44% 和 49%, 与模型组呈现极显著差异。



图2 藜麦皂苷对 B16 细胞 TYR 及 MITF 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of quinoa saponins on the expression of TYR and MITF proteins in B16 cells

表6 藜麦皂苷对 B16 细胞 TYR 及 MITF 蛋白表达的影响 (mean \pm SD)

Table 6 Effects of quinoa saponins on the expression of TYR and MITF proteins in B16 cells (mean \pm SD)

组别	TYR	MITF
空白组	0.76 \pm 0.08	0.82 \pm 0.10
模型组	1.12 \pm 0.11*	1.23 \pm 0.09*
25 $\mu\text{g/mL}$ 藜麦皂苷	0.74 \pm 0.07 Δ	0.59 \pm 0.06 Δ
50 $\mu\text{g/mL}$ 藜麦皂苷	0.76 \pm 0.21	0.61 \pm 0.09 Δ
100 $\mu\text{g/mL}$ 藜麦皂苷	0.72 \pm 0.14 Δ	0.62 \pm 0.10 Δ
200 $\mu\text{g/mL}$ 藜麦皂苷	0.49 \pm 0.06 $\Delta\Delta$	0.44 \pm 0.07 $\Delta\Delta$

注: 与对照组相比, * p <0.05; 与模型组相比, Δ p <0.05, $\Delta\Delta$ p <0.01。

相关研究表明, 植物源天然产物, 如酚类、多糖类、黄酮类、有机酸、挥发油、三萜皂苷类等都具有酪氨酸酶 (TYR) 抑制活性, 是天然美白剂的理想原材料^[18]。Lee 等的研究表明, 人参皂苷能够显著抑制 B16 细胞的黑色素生成, 起作用通路涉及抑制 MITF 和 TYR 的表达, 作用通路与本研究一致^[19]。Kim 等学者获得了裂叶月见草甲醚提取物, 测定发现提取物浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞黑色素含量下降了近 35.50%, 酪氨酸酶活力下降 22.60%^[20], 其剂量的作用效果与本实验藜麦皂苷相当。文冠果壳皂苷^[21], 蒺藜皂苷^[13], 海参水煮液皂苷^[22]等都发现酪氨酸酶抑制活性, 从天然动植物中提取皂苷用作美白成分, 既符合当前以天然药物为美容成分的发展趋势, 同时又能有效提高农产品的经济价值。

小眼畸形相关转录因子 (MITF) 是一种含有碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链结构的转录因子, 作为一种色素沉积的主要调节因子而存在^[23]。MITF 可以调控 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 等与细胞黑色素的形成相关基因的转录。本实验中用到的 α -黑色素细胞刺激素 (α -MSH) 是一种由 13 个氨基酸组成的神经内分泌激素, 其生理功能主要是促黑色素细胞分裂。通常情

况, 黑色素细胞在 α -MSH 作用下与受体黑素皮质激素受体 1 (melanocortin 1 receptor, MC1R) 结合, 启动下游腺苷酸环化酶途径和蛋白脂酶 C 途径, 介导黑色素合成的信号转导过程。因此, 黑色素生成过程中, 除了 TYR 的活性, 一般也会监控 MITF 的表达。本实验确认, 高浓度的藜麦皂苷 (200 $\mu\text{g/mL}$) 能显著抑制 MITF 的表达, 阻断黑色素的合成。

近年来, 亚洲女性对于美白的需求持续增长, 此外, 对于功效专注于美白的化妆品及药品的安全性要求也不断增高。相较于曲酸、氢醌等具有细胞毒性需严格控制用量的快速美白的物质, 多糖类、三萜皂苷类等温和、绿色的天然美白剂也广受欢迎。目前, 许多国内外研究都表明化妆品中的大部分美白成分都具有酪氨酸酶抑制活性或/和黑色素合成抑制活性, 通过抑制酪氨酸酶活性, 阻断或减缓真黑色的形成, 从而实现美白功能。因此, 寻找安全的酪氨酸酶抑制剂, 将成为今后美白化妆品研发过程中的一种新潮流。

3 结论

本实验分离提取藜麦皂苷并验证其酪氨酸酶抑制活性。采用超声波辅助提取法, 获得最佳提取条件为料液比 1:40 (g/mL), 70%浓度的乙醇下超声 60 min, 在此条件下, 获得得率为 17.85 mg/g。低浓度的藜麦皂苷对于 B16 细胞没有明显的杀伤作用, 但却能显著抑制酪氨酸酶活性, 最强抑制率为 46.69%, 并减少细胞黑色素的形成, 最强抑制率为 26.15%, 藜麦皂苷抑制黑色素形成的作用通路涉及 TYR-MITF, 能显著抑制 TYR 和 MITF 的表达。因此, 藜麦皂苷能够作为一种美白成分应用于化妆品中。

参考文献

- [1] 王黎明, 马宁, 李颂, 等. 藜麦的营养价值及其应用前景[J]. 食品工业科技, 2014, 35(1): 381-384, 389
WANG Li-ming, MA Ning, LI Song, et al. Nutritional properties of quinoa and its application prospects [J]. Sci Tech Food Ind, 2014, 35(1): 381-384, 389
- [2] Oshodi A A, Ogunbenle H N, Oladimeji M O. Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamum radiatum*), pearl millet (*Peraraisetum typhoides*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) flours [J]. Int J Food Sci Nutr, 1999, 50(5): 325-331
- [3] Comai S, Bertazzo A, Bailoni L, et al. The content of proteic and non-proteic (free and protein-bound) typtophan in quinoa and cereal flours [J]. Food Chem, 2007, 100(4): 1350-1355
- [4] Ogunbenle H N. Nutritional evaluation and functional

- properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour [J]. Int J Food Sci Nutr, 2003, 54(2): 153-158
- [5] 阙淼琳,蒋玉蓉,曹美丽,等.响应面法优化藜麦种子多酚提取工艺及其品种差异[J].食品科学,2016,37(4):7-12
- QUE Miao-lin, JIANG Yu-rong, CAO Mei-li, et al. Optimization of polyphenols extraction from quinoa grains by response surface methodology and differences in polyphenol content among different varieties [J]. Food Sci, 2016, 37(4): 7-12
- [6] 黄金,秦礼康,石庆楠,等.藜麦皂苷提取及萌芽对皂苷含量的影响[J].中国粮油学报,2017,32(11):34-39,46
- HUANG Jin, QIN Li-kang, SHI Qing-nan, et al. Effect of quinoa saponins extraction and sprouting on saponins content [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2017, 32(11): 34-39, 46
- [7] Nico S, Jana V, Stan P. The hunt for natural skin whitening agents [J]. Int J MolSci, 2009, 10: 5326-5349
- [8] 杜国英.孜然提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用及对 B16 黑色素瘤细胞内黑色素生成的影响[D].兰州:兰州理工大学,2018
- DU Guo-ying. Inhibitory effects of extracts from *Cuminum cyminum* L. on tyrosinase and melanogenesis in B16 melanoma cells [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2018
- [9] Chen M J, Hung C C, Chen Y R, et al. Novel synthetic kojic acid-methimazole derivatives inhibit mushroom tyrosinase and melanogenesis [J]. J Biosci Bioeng, 2016, 122(6): 666-672
- [10] Medina-Meza I G, Aluwi N A, Saunders S R, et al. Profiling of triterpenoid saponins from 28 quinoa varieties (*Chenopodium quinoa* Willd) grown in Washington state by GC-MS [J]. J Agr Food Chem, 2016, 64(45): 8583-8591
- [11] Satooka H, Cerda P, Kim H J, et al. Effects of matsutake mushroom scent compounds on tyrosinase and murine B16-F10 melanoma cells [J]. Biochem Bioph Res Co, 2017: 487(4): 840-846
- [12] Lee S C, Chen C H, Yu C W, et al. Inhibitory effect of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira ethanol extracts on melanin synthesis via repression of tyrosinase expression [J]. J Biosci Bioeng, 2016, 122(3): 263-269
- [13] 张丽宏,安丽凤,黄敬文,等.蒺藜皂苷对人黑素瘤 A375 细胞酪氨酸酶和小眼相关转录因子表达的影响[J].中医药信息, 2017,34(2):18-21
- ZHANG Li-hong, AN Li-feng, HUANG Jing-wen, et al. Effect of Thistle saponins on TYR and MITF mRNA expressions of A375 cells [J]. Inform Tredit Chin Med, 2017, 34(2): 18-21
- [14] 杜斌,许冬梅,张亚玲,等.miR-146a 抑制酪氨酸酶基因家族在小鼠黑色素细胞中表达[J].中国生物化学与分子生物学报,2017,33(1):81-87
- DU Bin, XU Dong-mei, ZHANG Ya-ling, et al. miR-146a inhibits the expression of tyrosinase gene family in mouse melanocytes cells [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2017, 33(1): 81-87
- [15] 房焱.藜麦种子皂苷的提取、纯化及其体外抑菌、抗癌活性研究[D].长春:吉林农业大学,2019
- FANG Yao. Extraction and purification of saponins from quinoa seeds and its antimicrobial, anticancer activities *in vitro* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019
- [16] 叶希韵,朱萍亚.黑色素的合成与美白产品的研究进展[J].华东师范大学学报(自然科学版),2016,2016(2):1-8
- YE Xi-yun, ZHU Ping-ya. A review of the studies on melanin synthesis and whitening products [J]. J East Chin Norm Univ (Nat Sci), 2016, 2016(2): 1-8
- [17] Wang Z J, Xu W, Liang J W, et al. Effect of fucoidan on B16 murine melanoma cell melanin formation and apoptosis [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017, 14(4): 149-155
- [18] 王小燕.传统中药及植物美白成分作用机理及其在化妆品中的应用[J].轻工标准与质量,2019,4:104,110
- WANG Xiao-yan. Action mechanism of traditional Chinese medicine and plant whitening ingredients and their application in cosmetics [J]. Stand Qual Light Ind, 2019, 4: 104, 110
- [19] Lee S J, Lee W J, Chang S E, et al. Antimelanogenic effect of ginsenoside Rg3 through extracellular signal-regulated kinase-mediated inhibition of microphthalmia-associated transcription factor [J]. J Ginseng Res, 2015, 39(3): 238-242
- [20] Kim S E, Lee C M, Kim Y C. Anti-melanogenic effect of *Oenothera laciniata* methanol extract in melan-a cells [J]. Toxicol Res, 2017, 33(1): 55-62
- [21] 张洪梅,周泉城.文冠果壳皂苷提取物抑制酪氨酸酶活性的研究[J].中国粮油学报,2013,28(5):53-56
- ZHANG Hong-mei, ZHOU Quan-cheng. Inhibitory effect of saponin constituents from *Xanthoceras* nutshell on tyrosinase activity [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2013, 28(5): 53-56