

Study on the Interaction Mode of Glycyrrhizin and Tyrosinase

Juan Sun¹, Yongan Yang¹, Hailiang Zhu², Hui Zhong¹

¹Jiangsu Nature Bioengineering Technology Co., Ltd., Zhenjiang Jiangsu

²Nanjing University Lianyungang High-tech Research Institute, Lianyungang Jiangsu

Email: sunreiyi86@163.com

Received: Oct. 25th, 2018; accepted: Nov. 8th, 2018; published: Nov. 16th, 2018

Abstract

Evaluating the effect and mechanism of Glycyrrhizin on Tyrosinase activity in human melanoma cells is in order to provide theoretical basis for the application of Glycyrrhizin in the field of whitening. The theoretical simulation was carried out by computer-assisted drug design software, and the melanoma cells (A375) were used as the model to determine the whitening effect by MTT assay. Furthermore, we evaluated the Tyrosinase activity by human Tyrosinase enzyme-linked immunoassay kit. The results exhibited that Glycyrrhizin has a significant inhibitory effect on Tyrosinase and melanoma cells. The mechanism may be due to the interaction with Histidine and Phenylalanine in the active center of Tyrosinase, therefore, Glycyrrhizin could be perfectly chimeric at the enzyme active site to exert an inhibitory activity.

Keywords

Glycyrrhizin, Tyrosinase, Melanoma Cells, Computational Simulation

光甘草定与酪氨酸酶的相互作用模式研究

孙娟¹, 杨永安¹, 朱海亮², 钟慧¹

¹江苏耐雀生物工程技术有限公司, 江苏 镇江

²南京大学连云港高新技术研究院, 江苏 连云港

Email: sunreiyi86@163.com

收稿日期: 2018年10月25日; 录用日期: 2018年11月8日; 发布日期: 2018年11月16日

摘要

评价光甘草定对人黑色素瘤细胞内酪氨酸酶活性的影响及探讨其机理, 为光甘草定在美白领域的应用提供理论依据。实验借助计算机辅助药物设计软件对光甘草定与酪氨酸酶作用模式进行理论模拟计算, 以人黑色素瘤细胞(A375)为模型, 采用MTT法测定光甘草定对黑色素细胞活力的影响, 基于人酪氨酸酶联免疫试剂盒测定细

胞内酪氨酸酶活性。实验结果显示,光甘草定有显著抑制酪氨酸酶活性及抑制黑色素细胞的作用,其作用机制可能是由于与酶活性中心的组氨酸及苯丙氨酸形成相互作用力,从而完美的嵌合在酶活性位点发挥抑制作用。

关键词

光甘草定, 酪氨酸酶, 黑色素瘤细胞, 计算模拟

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

光甘草定是甘草黄酮的一种[1], 是世界上最昂贵的天然祛斑美白成分, 也是世界上公认的最安全的祛斑美白成分。黑色素是一种生物色素, 人类皮肤的颜色主要取决于黑色素的含量与分布[2]。酪氨酸酶是黑色素生成过程中的关键限速酶。研究表明, 通过抑制机体中酪氨酸酶的活性, 能显著减少黑色素的生成, 从而达到淡斑美白的效果[3]。光甘草定能显著抑制酪氨酸酶活性, Yokota T.等通过研究发现, 光甘草定在 0.1 到 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 对小鼠 B16 黑色素瘤细胞中的酪氨酸酶有抑制作用, 并通过实验证明这种抑制作用是由于降低了酪氨酸酶 T1 和 T3 的活性实现的[4]。郑秋生等过体外和体内模型研究光甘草定对小鼠黑色素瘤细胞增殖的抑制作用及其分子机制, 并发现其诱导细胞凋亡的机制可能与调控糖酵解相关基因的表达有关[5]。另有报道, 陈文等以单酚酶和二酚酶为底物, 测定光甘草定对酪氨酸酶活性的影响及体外抗氧化作用。他们认为光甘草定通过抑制酪氨酸酶和清除自由基来达到美白肌肤的作用[6]。

光甘草定美白的功效虽然很早就被发现, 但在国内外研究中, 结合计算机辅助药物设计软件来探讨光甘草定对酪氨酸酶抑制活性机制的研究却很少。因此, 本实验中, 首先利用 Discovery studio 3.5 软件与人酪氨酸酶 (PDB:5m8t) 进行模拟对接, 发现潜在作用结合模式。并利用本公司分离得到的光甘草定评价其对黑色素瘤细胞及酪氨酸酶的抑制作用, 从而对其美白效果和安全性进行综合性的评价, 为进一步的开发和应用提供参考。

2. 材料和仪器

2.1. 主要药品与试剂

光甘草定(江苏耐雀生物工程有限公司, 纯度为: 40%, 90%); 人黑色素瘤细胞 A375 (南京大学友情提供); PRMI 1640 培养基(GIBCO 公司); 胰蛋白酶(Sigma 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 人酪氨酸酶 ELISA 酶联免疫试剂盒(Bio-Swamp 公司); 噻唑蓝 MTT (江苏晶美生物科技有限公司); 二甲基亚砜(阿拉丁试剂公司)。

2.2. 主要仪器

Spectra Max190 全波长酶标仪, Thermo3131 二氧化碳培养箱; 奥林巴斯 GX51 倒置显微镜; 上海智诚 ZHJH1112B 超净工作台。

3. 实验方法

3.1. 计算机辅助药物设计

本研究选用的计算机模拟软件为 DS 3.5 (Discovery Studio 3.5, Accelrys, Inc., San Diego, CA)。用画图软

件 ChemBioDraw 画出光甘草定的结构, 保存其为 cdx 格式文件, 利用 ChemBio 3D 中的 MMFF94 力场对小分子的三维构象和能量进行优化, 保存为 mol 格式文件。从蛋白数据库(简称 PDB)下载人酪氨酸酶蛋白(PDB: 5m8t; <https://www.rcsb.org>), 进行去水加氢操作, 准备蛋白分子。设置对接区域的中心坐标为 120.892, 277.987, 217.11 (X, Y, Z), 区域半径为 12Å。使用 DS3.5 软件中的 CDOCKER 板块[7], CDOCKER 是一个基于 CHARMM 的半柔性分子对接工具, 进行小分子与蛋白活性中心进行对接。具体操作步骤如下:

1) 采用高温分子动力学与不同的随机种子产生一系列配套构象。

2) 通过配体指向到受体活性位点的指定位置并进行一系列的随机旋转, 产生随机构象。直至获得所需数目的低能量构象。

3) 对每个最终构象, 它们的 CHARMM 能量以及单独的相互作用能力被计算出来, 根据能量值对构象进行排序和保留。定义整个靶点蛋白结构域为受体, 根据原配体的结合位置选择位点球体所在的位置, 除去原配体并将需要结合的配体填充进去, 以此来进行分子对接的过程。根据分子对接的得分情况进行排序, 保留每个配体前十位的分子对接构象, 具有最大的负 CDocker 能量的构象被选为最佳构象。

3.2. 细胞培养

人黑色素瘤细胞培养于 1640 培养液中, 放置于 37℃、5%二氧化碳培养箱, 待细胞长满培养瓶底后在无菌的环境下先倒掉原培养液, 再用 PBS 缓冲液冲洗几次, 最后用配制好的胰蛋白酶消化。待消化好弃去胰酶液体, 加入少许新鲜培养液终止消化, 轻轻吹打, 使得细胞处于单个分散的状态。收集细胞离心, 弃去上层液体, 再加入一定量的培养液, 轻轻吹打使细胞呈单个分散状, 并使用细胞计数板计数。用培养基将细胞调整至适当浓度, 接种于细胞板放入培养箱培养[8][9], 每一次实验应采用同一传代细胞。

3.3. 药物处理

光甘草定和 Vc 首先用 DMSO 助溶, 然后用蒸馏水稀释, 要保证 DMSO 的最终加入浓度低于 0.1%。现配现用, 待测药物浓度和 Vc 浓度分别为: 12.50, 25.00, 50.00, 100, 150, 200 μM。

3.4. MTT 法检测黑色素瘤细胞 A357 的增值

在 96 孔细胞板每孔中分别加入 90 μL 含有人黑色素瘤细胞的培养液, 待细胞稳定生长并占每孔底部面积 80%左右时加入待测药液。每个待测药物的浓度设 3 个平行, 三次重复实验。实验组分为: 空白对照组(90 μL 培养液)、阴性对照组(90 μL 含细胞的培养液)、阳性对照组(90 μL 含细胞的培养液和 10 μL 不同浓度的 Vc 溶液)待测药物实验组(90 μL 含细胞的培养液和 10 μL 不同浓度的光甘草定)。将加药后的细胞板放置二氧化碳培养箱(温度为 37℃, CO₂ 浓度为 5%)进行培养。培养 24 h 后, 向待测 96 孔板每孔各加入配好的 MTT 液 10 μL, 轻轻振荡混匀, 继续在特定条件的培养箱中进行培养 4 h。随后弃去 96 孔板上清液, 每孔再加入 150 μL 的 DMSO, 充分震荡数分钟, 于酶标仪 570 nm 波长处测定各孔的光吸收(OD 值)[10]。根据所测的各孔 OD 值使用 SPSS 软件[11]计算待测药物的 IC₅₀ (IC₅₀ 为半数抑制浓度)。

3.5. 人黑色素瘤细胞中酪氨酸酶活性测定

实验具体操作步骤参照人酪氨酸酶 ELISA 酶联免疫分析试剂盒使用说明书。

4. 实验结果

4.1. 光甘草定与酪氨酸酶计算模拟对接结果

我们利用 DS3.5 软件进行了光甘草定与人酪氨酸酶活性位点的模拟对接, 其理论活性值很高, CDOCKER_INTERACTION_ENERGY 值为-32.6878。然后我们用软件计算了光甘草定的 ADMET 活性。

良好的药物小分子，无论是应用于食品、药品还是化妆品领域，不仅需要具有较高的功效，并且还需要有良好的药代动力学特征。从图 1 中我们可以看出，光甘草定的点位于所有圆圈的内部，说明它具有良好的药代动力学特征。图 2 为光甘草定与酪氨酸酶相互作用的二维平面图，图 3 为光甘草定与酪氨酸酶相互作用的三维立体图。从图中可以看出，光甘草定分子非常完美的嵌合进入酪氨酸酶的活性穴槽空腔中，光甘草定含有双羟基的苯环与酪氨酸酶的氨基酸残基 HIS 38 及 HIS377 形成了两个 π -cation 键，另外一个苯环与氨基酸残基 Phe 362 形成了一个 π - π 相互作用力。 π 键是最常见也是最重要的分子间相互作用力，对稳定生物大分子的构型十分重要，在生物分子中有着重要的意义和作用。通过计算模拟结果及结合模型图我们可以推断，光甘草定美白的作用机制可能是通过与酪氨酸酶活性位点组氨酸与苯丙氨酸相互作用从而抑制酪氨酸酶产生的。

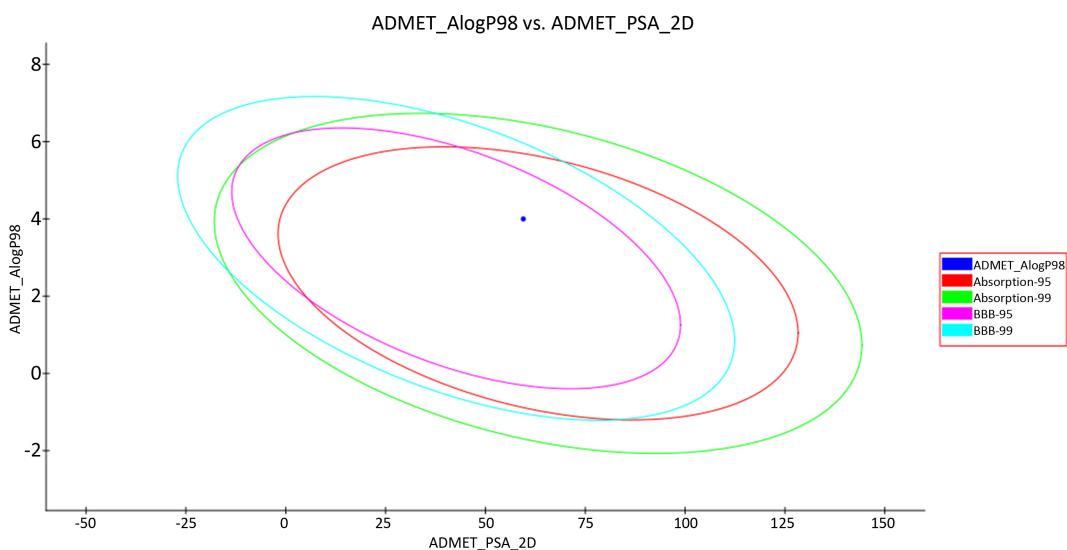


Figure 1. ADMET properties predicted for Glycyrrhizin
图 1. 光甘草定 AEMET 预测图

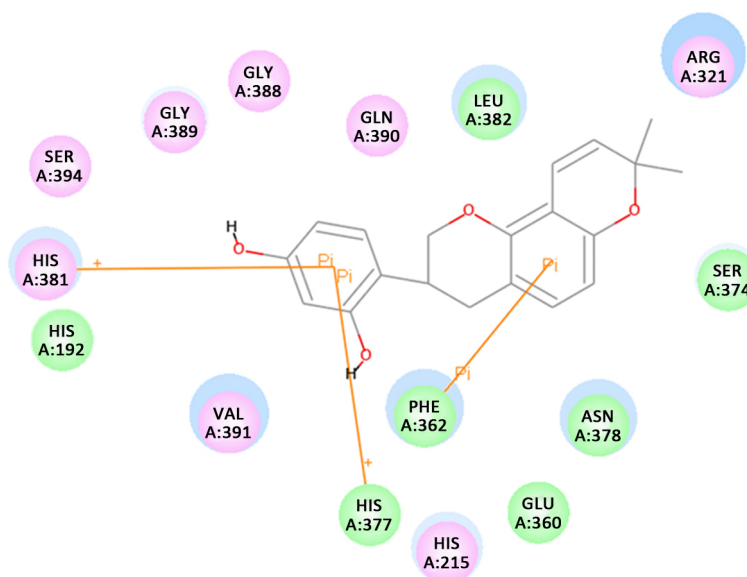


Figure 2. 2D molecular docking model of Glycyrrhizin with Tyrosinase
图 2. 光甘草定与酪氨酸酶相互作用的二维平面图

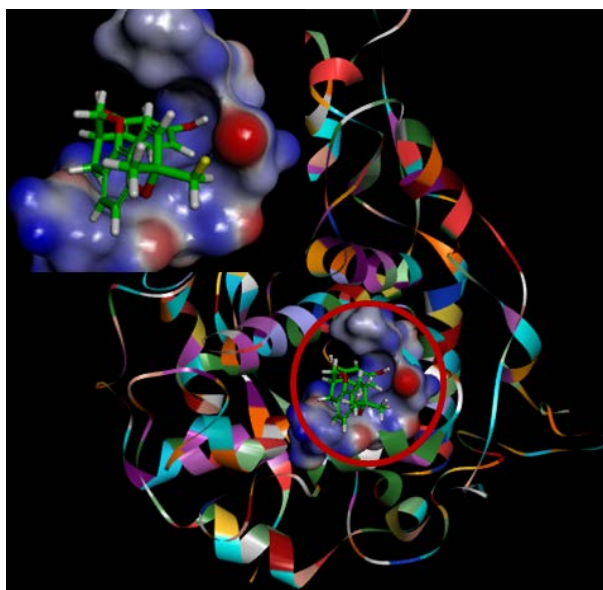


Figure 3. 3D interaction map of Glycyrrhizin with Tyrosinase
图 3. 光甘草定与酪氨酸酶相互作用的三维立体图

4.2. 光甘草定对黑色素瘤细胞 A357 的增殖抑制活性

实验通过 MTT 法测定光甘草定对 A357 细胞的增殖抑制作用, 实验结果如表 1 所示。从表 1 我们可以看出, 细胞抑制率跟光甘草定的纯度有很大关系, IC_{50} 值分别为 $126 \mu\text{M}$ 和 $66 \mu\text{M}$ 。

Table 1. *In vitro* inhibitory activities against human A357 cell lines.

表 1. 光甘草定对 A357 细胞的增殖抑制实验

物质名称	纯度	$IC_{50} \pm SD (\mu\text{M})$
光甘草定	40%	126 ± 23.11
光甘草定	90%	66 ± 9.86
Vc	标准品	105 ± 10.03

4.3. 光甘草定对酪氨酸酶的增殖抑制活性

实验通过 ELISA 酶联免疫试剂盒测定光甘草定对人酪氨酸酶的增殖抑制作用, 实验结果如表 2 所示。从表 2 我们可以看出, 酶抑制率同样跟光甘草定的纯度有很大关系, IC_{50} 值分别为 $263 \mu\text{M}$ 和 $155 \mu\text{M}$ 。

Table 2. *In vitro* inhibitory activities against Tyrosinase.

表 2. 光甘草定对酪氨酸酶的增殖抑制实验

物质名称	纯度	$IC_{50} \pm SD (\mu\text{M})$
光甘草定	40%	263 ± 11.86
光甘草定	90%	155 ± 20.22
Vc	标准品	162 ± 10.17

5. 讨论与结论

光甘草定是从天然产物草本植物中提取的具有较好美白作用的生物活性成分, 本论文从计算机模拟、

细胞增殖抑制实验及酪氨酸酶活性抑制实验三方面探索光甘草定的美白机理。计算机辅助药物设计软件结果显示,光甘草定结构中的苯环与酪氨酸酶的氨基酸残基 HIS 和 PHE 形成 π -cation 键及 π - π 键,光甘草定分子因此可以完美地嵌合进入酪氨酸酶的活性穴槽空腔中发挥抑制作用。此外,纯度为 90% 的光甘草定在细胞水平对黑色素瘤细胞的抑制活性大约是 Vc 的 2 倍, IC_{50} 为 $66 \mu M$ 。而在酶水平,纯度为 90% 的光甘草定对酪氨酸酶的抑制活性跟 Vc 几乎一致, IC_{50} 为 $155 \mu M$ 。这表明,光甘草定中除主要成分外,有可能其他成分之间存在协同作用,对黑色素瘤细胞有很好的抑制活性,而其他成分的作用靶标不是酪氨酸酶。所有成分协同作用,有效地抑制黑色素的生成。

光甘草定对皮肤刺激性或过敏反应极少,应用相对安全可靠,其理化性质稳定,皮肤吸收能力强,用量少,光甘草定作为化妆品美白添加剂具有一定的应用前景,是一种有市场潜力的酪氨酸酶抑制剂。

基金项目

本论文在江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20160570)支持下完成。

参考文献

- [1] Vaya, J., Belinky, P.A. and Aviram, M. (1997) Antioxidant Constituents from Licorice Roots: Isolation, Structure Elucidation and Antioxidative Capacity toward LDL Oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, **23**, 302-313. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00089-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00089-0)
- [2] 张军玉. 黑色素代谢相关蛋白的研究进展[J]. 河南医学研究, 2009, 18(3): 257-261.
- [3] Kim, Y.J. and Uyama, H. (2005) Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources: Structure, Inhibition Mechanism and Perspective for the Future. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **62**, 1707-1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>
- [4] Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y., et al. (1998) The Inhibitory Effect of Glabridin from Licorice Extracts on Melanogenesis and Inflammation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, **11**, 355-361. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1998.tb00494.x>
- [5] 高彩霞, 王艳明, 李德芳, 唐晓峰, 郑秋生. 光甘草定诱导小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞凋亡的机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017(5): 836-842.
- [6] 骆从艳, 慕春海, 王园姬, 李超鹏, 陈文. 光甘草定抑制酪氨酸酶及体外抗氧化活性的研究[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1776-1780.
- [7] (2011) Discovery Studio 3.5. Accelrys Software Inc., San Diego.
- [8] Sun, J., Ren, S.Z., Lu, X.Y., Li, J.J., Shen, F.Q., Xu, C. and Zhu, H.L. (2017) Discovery of a Series of 1,3,4-Oxadiazole-2(3H)-Thione Derivatives Containing Piperazine Skeleton as Potential FAK Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **25**, 2593-2600. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.038>
- [9] Sun, J., Liu, H.Y., Xu, R.F. and Zhu, H.L. (2017) Identification of Nitroimidazole-Oxime Derivatives Targeting the Polo-Box Domain of Polo-Like Kinase 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **25**, 6581-6588. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.035>
- [10] 郑作文. 藤茶总黄酮在 2215 细胞培养中对乙型肝炎病毒 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制作用[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(9): 49-51.
- [11] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD50 [J]. 药学进展, 2003, 27(5): 314-316.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2160-441X，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：pi@hanspub.org