

- [19] Wang X M, Su S J, Mei S J, *et al.* The protection effect of *Rhodiola saccharinensis* on mice after exposure to X-rays [J]. *Chin J Radiol Med Prot* (中华放射医学与防护杂志), 1996, 6(2): 80-82.
- [20] Zu Y G, Yan T F, Zhou F J. A preliminary study on genetic variation and endangered mechanism of *Rhodiola saccharinensis* natural population [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 1998, 18(3): 304-310.
- [21] Zu Y G, Tang Y. Ecological analysis on sexual reproductive produce and endangered reason of *Rhodiola saccharinensis* [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 1998, 18(3): 336-340.
- [22] Yan X F, Wang Y, Yang Y, *et al.* The difference of salidroside content in the root of *Rhodiola saccharinensis* at different habit in Dahailin region [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 2000, 20(2): 173-179.
- [23] Xu J F, Zhao Y, Han A M, *et al.* Induction and culture of calli from *Rhodiola saccharinensis* A. Bor. [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1995, 1(1): 19-25.
- [24] Xu J F, Han A M, Feng P S. Growth, nutrient uptake and stoichiometry in suspension culture of *Rhodiola saccharinensis* A. Bor. [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1997, 3(2): 100-105.
- [25] Xu J F, Su Z G, Feng P S. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola saccharinensis* for improved salidroside production [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 23(1-2): 20-27.
- [26] Xu J F, Su Z G, Feng P S. Activity of tyrosol glucosyl-transferase and improved salidroside production through bio-transformation of tyrosol in *Rhodiola saccharinensis* cell cultures [J]. *J Biotechnol*, 1998, 61(1): 69-73.

植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展

邹先伟, 蒋志胜*

(南开大学 元素有机化学国家重点实验室, 元素有机化学研究所, 天津 300071)

摘要: 酪氨酸酶是黑色素生物合成途径中的主要限速酶, 其活性与某些色素障碍性皮肤病及昆虫表皮鞣化和蜕皮有关。研究天然植物源酪氨酸酶抑制剂, 不仅对于色素型皮肤病的治疗, 增白美容化妆品配方及食品添加剂具有重要意义, 而且还可能发现新型的昆虫生命活动干扰剂。现对酪氨酸酶及植物性酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用和抑制机制进行综述, 并简述了其应用前景。

关键词: 酪氨酸酶; 抑制剂; 黑色素; 抑制作用

中图分类号: R 284.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2760(2004)06-0702-04

Advances in studies on botanical inhibitors of tyrosinase

ZOU Xian-wei, JIANG Zhi-sheng

(State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Research Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Key words: tyrosinase; inhibitor; melanin; inhibitory effect

酪氨酸酶(tyrosinase, EC1.14.18.1)具有多种特征性催化活性, 既可以作为酪氨酸羟化酶、多巴氧化酶, 又可以作为5, 6-二羟基吲哚氧化酶, 在黑色素生成过程中起着至关重要的作用^[1]。它不但用于色素增加性皮肤病(黄褐斑、雀斑等)的临床治疗, 而且可用于化妆品使肤色增白, 还有可能应用于农业生产上作为一种害虫调控剂和食品工业上作为食品添加剂。本文就天然植物源酪氨酸酶抑制剂的研究进展及其应用前景作一综述。

1 酪氨酸酶及其抑制剂概况

酪氨酸酶广泛存在于人、动物、植物和微生物中, 是一种以 Cu^{2+} 为辅助因子的金属酶, 每一个亚基含2个金属铜离子, 2个铜离子分别与蛋白质分子中2个平展的组氨酸和1个弱的直立组氨酸配体结合, 另有1个内源桥基将2个铜离

子联系在一起, 构成酪氨酸酶催化氧化反应活性中心, 酪氨酸等底物与酶形成过渡态络合物时, 主要是羟基与酶的活性中心上的原子键合而发生作用^[2]。

酪氨酸酶兼有加氧酶和氧化酶的双重功能, 在黑色素合成过程中起关键作用。它能够催化单酚羟化成二酚, 并把二酚氧化成醌; 醌在非酶促条件下形成最终的反应产物黑色素。酪氨酸酶抑制剂就是通过抑制酪氨酸酶活性从而抑制黑色素生成, 因而可用来预防和治疗色素沉着和黑色素瘤等, 从而在医药、化妆品和食品工业等领域有着广阔的应用前景。1988年, Akiu等从杜鹃花科植物熊果 *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. 的叶中分离到一种具有脱色作用的单体物质熊果苷(arbutin)。自此从植物和微生物中分离天然酪氨酸酶抑制剂引起了人们的兴趣。近年来, 从植物^[3-7]中

* 收稿日期: 2003-10-06

作者简介: 邹先伟(1980—), 男, 湖北宜都人, 在读硕士, 主要从事天然有机化学和农药生物学研究。

Tel: (022) 23504355 E-mail: zouxw@nankai.edu.cn

* 通讯作者

分离天然酪氨酸酶抑制剂已得到人们的普遍关注。

2 植物源酪氨酸酶抑制剂

2.1 植物源物质对酪氨酸酶的抑制作用: 熊果苷是氢醌的一种天然存在形式, 氢醌- β D-葡萄糖吡喃糖苷(hydroquinone- β D-glycopyranoside)的脱色作用推测可能与分子结构中存在的氢醌基团有关。通过比较观察18 α -甘草酸双胺盐、熊果苷及氢醌对体外培养B16F10鼠黑色素瘤细胞形态、酪氨酸酶活性、黑色素含量和细胞增殖率的影响, 结果发现3种化合物均显示有抑制黑色素生成的作用, 其中以50 μ mol/L熊果苷对酪氨酸酶活性和黑色素含量抑制作用最为明显, 其次是100 μ mol/L 18 α -甘草酸双胺盐, 但二者并无统计学上的差异^[8]。

Kubo等^[3]从漆树科植物腰果 *Anacardium occidentale* L. 的果实中提取了漆树酸(anacardic acid)、2-甲基腰果二酚(2-methylcardols)和腰果二酚(cardols)。其中2类主要的活性物质: 5-[8(Z), 11(Z), 14-pentadecatrienyl]和6-[8(Z), 11(Z), 14-pentadecatrienyl]都竞争性抑制蘑菇酪氨酸酶对L-DOPA的氧化。后来, Kubo等^[4]又从玻利维亚的3种药用植物马钱科醉鱼草 *Buddleia coriacea* Ramy、菊科 *Gnaphalium cbeirantifolium* Lam. 和棕榈科 *Scheelea princeps* (Mart.) Karst. 中分离出几种酪氨酸酶抑制剂, 其中化合物buddlenoid A和buddnoid B的 D_{50} 分别为0.39和0.44 mmol/L。五羟黄酮类化合物槲皮素是酪氨酸酶的竞争性抑制剂, D_{50} 为0.07 mmol/L。而仙鹤草素(agrimoniin)对酪氨酸酶的 D_{50} 为0.061 mmol/L。又从非洲产的萝藦科植物 *Mondia whitei* (Hook. f.) Skeels 和漆树科掌漆树 *Rhus vulgaris* Meile 等中分离出一个高效酪氨酸酶抑制剂: 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛, 其抑制左旋多巴氧化的 D_{50} 仅需4.3 μ g/mL (0.3 mmol/L)^[5]。

银杏提取物是天然的抗氧化剂和自由基清除剂。宫霞等^[6]用L-酪氨酸作底物, 测定了银杏叶提取物(总黄酮含量为59%)对酪氨酸酶的非竞争性抑制作用, 其抑制常数 K_i 为34 mg/mL, 银杏叶提取物浓度为0.16 mg/mL时, 最大抑制率为52.8%, 银杏叶提取物有望成为预防和治疗黑色素疾病的药物。

最近, Lee^[7]从白头翁属朝鲜白头翁 *Pulsatilla cernua* (Thunb.) Bercht. et Opiz. 根中分离到两种物质: 3, 4-二羟基肉桂酸和4-羟基-3-甲氧基肉桂酸, 它们对酪氨酸酶都有较强的抑制作用, D_{50} 分别为0.09和0.33 mmol/L, 且都为非竞争性抑制类型。

大黄蒽醌衍生物具有较强的抗菌、抗癌活性, 对小鼠接种黑色素瘤有显著的抑制作用。何冰芳等^[9]研究了大黄蒽醌衍生物对黑色素生物合成关键酶——酪氨酸酶的影响, 发现大黄素对酪氨酸酶有显著的竞争性抑制作用, K_i 为 1.51×10^{-4} mol/L, D_{50} 为36.6 μ g/mL, 而大黄酸对酪氨酸酶有较弱的抑制作用。大黄蒽醌衍生物对酪氨酸酶的抑制作用可能是大黄抗黑色素瘤的作用机制之一。

多羟基黄酮化合物是植物界分布最为广泛的黄酮类化

合物, 刘德育等^[10]报道杨梅黄素(myricetin, 3, 5, 7, 3', 4', 5'-六羟基黄酮)和白藜素(ampelopsin, 3, 5, 7, 3', 4', 5'-六羟基二氢黄酮)对酪氨酸酶有显著的抑制作用; 在2 mmol/L的L-DOPA浓度下, 其 K_i 是0.085 mmol/L; 而杨梅黄素对酪氨酸酶则是混合性抑制, 其 K_i 与 $K_{i'}$ 分别是0.026和0.072 mmol/L。黄芩素诱导体(SD)也是多羟基黄酮化合物, 对酪氨酸酶的抑制作用是竞争性抑制, 其 K_i 为0.058 mmol/L且报道其对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除和作为竞争性底物是SD竞争性抑制酪氨酸酶的两个重要机制^[11]。

2.2 单味中药对酪氨酸酶的抑制作用: 大量研究工作发现许多中药对酪氨酸酶有抑制作用。

尚靖等^[12]研究了7种常用增白中药对酪氨酸酶的抑制作用, 证明7种中药对酪氨酸酶均有不同程度的抑制作用, 其中茯苓、白鲜皮、蒺藜有显著抑制作用, 且茯苓、白鲜皮为竞争性抑制, 蒺藜为混合性抑制, 三者皆为可逆性抑制。王建华等^[13]测定了芦荟、熟地黄、当归、玉竹、白茅根等20味中药乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制活性, 除决明子外, 对酪氨酸酶均呈现不同的抑制作用, 其中以芦荟、熟地黄与当归的抑制作用较强。雷铁池等^[14]对中医治疗色素增加性皮肤病方剂69首进行计算机拆方排序, 选出高频次出现中药82味, 观察这些中药乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶和无细胞系统多巴色素自动氧化生成黑色素量的影响。结果显示白术、白僵蚕、藁本、白芨、白附子、沙苑子、苦参、六月雪、柿叶、柴胡、香附11味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性和黑色素生成量呈剂量依赖性抑制, 其中前9味对酪氨酸酶活性抑制率与单体化合物熊果苷无统计学差异($P > 0.05$)。还有部分中药对酪氨酸酶呈双向作用, 即对酶活性高浓度时抑制, 低浓度时激活的有10味: 茯苓、甘草、白芍、细辛、苍术、商陆、桂枝、北沙参、防风、芫花; 在低浓度时抑制, 高浓度时激活的有5味: 白芷、生地黄、骨碎补、乳香、紫草^[14, 15]。

2.3 复方中药对酪氨酸酶的抑制作用: 通过计算机排序选定应用频率较高的治疗白癜风中药方剂白驳片(紫草、降香、重楼、白药子、白薇、苍术、海螵蛸、红花、生首乌、龙胆草、蒺藜、甘草)、白癜风丸(补骨脂、当归、地肤子、蒺藜)、柴胡疏肝汤(川芎、当归、桃仁、赤芍、生地黄、柴胡、黄芩、山栀子、天花粉、防风、牛蒡子、连翘、甘草)、白蚀丸(红花、牡丹皮、紫草、苍术、蒺藜、龙胆草、甘草、补骨脂、何首乌、丹参、灵芝)、通窍活血汤(赤芍、川芎、桃仁、红花、生姜、老葱白、大枣、麝香)和黄褐斑方剂六味地黄丸、逍遥丸、桃红四物汤、金匱肾气丸、补中益气汤, 应用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定酪氨酸酶活性, 结果治疗黄褐斑方剂中六味地黄丸、补中益气汤可使酪氨酸酶活性降低^[16]。

3 酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用机制

酪氨酸酶抑制剂的作用机制至今尚未研究得十分清楚。黄芩素诱导体(SD)是一种多羟基黄酮化合物, 已研究证实具显著的紫外吸收、抑制酪氨酸酶和清除 $O_2^{\cdot-}$ 作用。经过对SD抑制酪氨酸酶作用的动力学研究后认为其抑制机制可能是: (1) 由于在酪氨酸酶催化氧化过程中, $O_2^{\cdot-}$ 既是引发剂又

是反应物,因此SD对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用既阻断了反应的引发,也削弱了酪氨酸酶的供氧作用,从而使酪氨酸氧化反应的强度减弱,即削弱了酪氨酸酶的作用。(2)由于SD的母体为5,6,7,4'-四羟基黄酮,其B环上的结构与酪氨酸相同,都是对位苯酚的结构,每一步氧化的产物在结构上也与酪氨酸极为相似,所以,SD也可被酪氨酸酶催化,是酪氨酸酶的竞争性底物。它们可与酪氨酸酶竞争性结合,从而削弱了酪氨酸酶对酪氨酸及其系列氧化产物的催化氧化作用。所以,清除 $O_2^{\cdot-}$ 和作为竞争性底物是SD抑制酪氨酸酶的两个主要作用机制。

其他多羟基黄酮化合物对酪氨酸酶也具有不同程度的抑制作用,虽然它们在结构上有一定差异,但对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用则是它们的共性,这说明所有 $O_2^{\cdot-}$ 的清除剂将都是酪氨酸酶的抑制剂。

非洲草药中的高效酪氨酸酶抑制剂——2-羟基-4-甲氧基苯甲醛抑制酪氨酸酶的机制虽尚未明确,但一个显见的原因可能是由于醛基一般易与和生理上起重要作用的亲核性基团,如巯基、氨基或羟基等结合,尤其能和伯胺形成希夫碱(schiff base)。若将其和正丁胺反应,能得到一个氮和其邻位羟基的氧经氢键连接的拟六元环,使之更加稳定,而失去其对酪氨酸酶的抑制作用。其次,也应注意到醛基化合物除还原外,还有螯合作用。尽管有些实验表明还原剂对酶的 Cu^{2+} 并无影响,但铜离子的半径可能较其他二价离子更有利于螯合,这也可能是抑制机制一方面。

银杏叶提取物主要成分为银杏黄酮和银杏内酯,其分子结构含有多个还原性羟基的功能团。研究表明,银杏叶提取物是有效、天然的多种自由基清除剂和强抗氧化剂,参与调节和提高SOD、GSH-Px等抗氧化酶活力,同时可直接清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、脂质过氧自由基等。通过研究银杏叶提取物对酪氨酸酶的非竞争性抑制作用,推断其抑制机制可能是:(1)银杏叶提取物及时清除了过氧自由基,从而终止了自由基链的引发,减弱了酪氨酸的氧化;(2)银杏叶提取物作为强抗氧化剂可拮抗氧对酪氨酸酶的激活;(3)银杏叶提取物结构中的还原性羟基具有孤对电子可与酪氨酸酶分子中的 Cu^{2+} 络合影响酶的活性。

Kubo等^[17]报道槲皮素(quercetin)和茨非醇(kaempferol)等是酪氨酸酶的竞争性抑制剂,且认为前者的抑制机制是因为槲皮素与该酶的底物L-DOPA存在结构上的相似性(structural similarity)。

总之,酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶抑制作用的可能机制归纳如下:(1)清除了过氧自由基,终止了自由基链的引发,削弱了酪氨酸酶的供氧作用,即削弱了酪氨酸酶的作用。(2)结构与酶底物相似,作为酪氨酸酶的竞争性底物,从而削弱了酪氨酸酶对酪氨酸及其系列氧化产物的催化氧化作用。(3)络合了酪氨酸酶中的 Cu^{2+} ,影响了酶活力。(4)作为强抗氧化剂拮抗了氧对酪氨酸酶的激活。

4 尚待进一步研究的问题

用蘑菇酪氨酸酶和无细胞色素自动氧化成黑色素体系大

规模筛选酪氨酸酶抑制剂,方法简单可靠。但蘑菇酪氨酸酶与哺乳动物细胞来源的酪氨酸酶毕竟存有差异^[4],且不同昆虫体内该酶的酶学特性也有不同表现。因此,有必要用体外培养的人黑色素细胞或B16F10鼠黑色素瘤细胞进一步确认酪氨酸酶抑制剂对黑色素生成的影响。另外,针对专一物种的酪氨酸酶研究也可作为定向抑制剂开发提供理论依据。除此以外,在植物提取过程特别是中药处理过程中不同程度地使用了乙醇,而乙醇对酪氨酸酶催化氧化左旋多巴反应呈可逆性抑制^[18],可能影响实验结果,因而应推进这方面的研究。

天然的酪氨酸酶抑制剂可能是一种替代目前应用的非天然酪氨酸酶抑制剂的先导化合物的良好来源,从植物中寻找天然抑制剂的研究将随着医药、化工和食品工业等领域的发展而不断深入,同时也应加强植物活性物质的纯化、鉴定及药理学研究。

5 植物源酪氨酸酶抑制剂的应用及其发展前景

酪氨酸酶的化学本质是铜蛋白,在黑色素生成过程的最初两步中起着催化作用,对昆虫蜕皮、色素沉着过度、防止皮肤黑色素沉着和食品酶促褐变反应等都有一定影响,故在控制虫灾、化妆品配方、食品添加剂和抗黑色素沉着等方面都有其应用价值。目前已有苯二酚和对苯二酚-苄醚2个酪氨酸酶抑制剂进入了临床应用。

5.1 在医药、化妆品领域的应用:大多数能使皮肤脱色的物质都通过抑制酪氨酸酶活性来阻滞皮肤黑色素生成,属酪氨酸酶抑制剂型皮肤脱色剂(depigmenting agent)。由于自然环境的破坏,大气中的臭氧层减少,紫外线辐射日益加剧,促使酪氨酸酶合成及催化活力升高,催化酪氨酸氧化成多巴醌,多巴醌再经一系列化学变化,最后产生黑色素,若体内黑色素合成过多,则表现为色斑及黑色素瘤的形成。国内外学者常利用抑制酪氨酸酶活性试验,研究筛选治疗皮肤色素沉着症的药物,并将一些酪氨酸酶抑制剂应用到增白美容化妆品中。酪氨酸酶抑制剂正日益成为化妆品中的一个重要组成部分,以控制黑色素过量生成而用作增白产品。因此,寻找有效且对人体无不良反应的天然酪氨酸酶抑制剂已成为药学和化妆品行业研究的趋势。

5.2 在食品工业领域的应用:在食品工业方面,酪氨酸酶主要在酶促褐变反应中起作用,这类反应主要在处理 and 运输过程中发生。酶促褐变反应由酪氨酸酶催化含两个邻二酚基团的多酚化合物氧化成相应的邻二醌,再进一步氧化聚合成黑色素,严重影响食品的营养、风味及外观品质。不同品种的褐变程度是不一样的,因为不同品种中酚含量和酪氨酸酶活性是不同的^[19],酶促褐变的防止和控制也已有报道^[20]。

柠檬酸在抑制酶促褐变方面具有双重功能,不但可以作为酸味剂降低体系pH,而且还可以作为络合剂,与从酪氨酸酶上解离下来的铜离子作用形成络合物,降低酶活性。因而柠檬酸在抑制芦荟制品酶促褐变方面具有较为显著的功效,其有量一般为0.5%~1%。曲酸(kojic acid)也是较理想的酪氨酸酶抑制剂,对水果、蔬菜有着显著的护色效果,且不影响食品的口味、香味及质感。另外,曲酸有很好的保鲜防腐作

用。因此,曲酸被广泛应用于化妆品和作为食品添加剂^[21]。自然界的天然植物中存在许多生理活性物质,从植物中寻找纯天然的酪氨酸酶抑制剂将随着食品工业的发展而不断深入进行。

5.3 在农业抗虫领域的应用:在昆虫方面,酪氨酸酶对邻二酚和邻二醌形成的作用已有报道,如形成色素,伤口愈合,对寄生虫包裹(parasite encapsulation)和表皮硬化(sclerotization)等^[22,23]。在较高等的无脊椎动物如节肢动物中,酪氨酸酶具有多种功能,它不仅参与黑色素形成、角质的硬化和伤口的愈合,而且在宿主的防御反应中还作为非自身识别系统发挥功能。酪氨酸酶是黑色素形成的关键酶,为黑化反应形成的色素沉着对有机体起到保护作用。此外,酪氨酸酶还通过硬化反应来硬化角质,它是唯一参加角质硬化的酶。硬化对所有昆虫的成活都是至关重要的,因为它为柔软的无脊椎动物身体提供保护。在硬化过程中,酪氨酸酶产生的醌与角蛋白及甲壳质相互作用,最终交联形成角质,高度硬化的角质能阻断微生物和异物的入侵。

在节肢动物中,酪氨酸酶还参与其他两种重要的生理过程——防御反应(节肢动物免疫)和伤口愈合。对于小颗粒异物如细菌,宿主可通过吞噬作用来消灭它。当入侵的异物太大(如寄生虫),宿主便通过黑色素包被作用来抵抗和消灭寄生虫,而酪氨酸酶在这个过程中起重要作用。酪氨酸酶在伤口处催化产生黑色素沉淀以防止血淋巴丢失,并阻止入侵的微生物乘机进入,由此对机体产生保护作用。通过抑制酪氨酸酶活力,使害虫丧失防御能力从而间接达到合理控制虫害的目的。由于这些过程可能是害虫形成防御体系的重要反应,因此酪氨酸酶有可能作为害虫控制中的一个作用靶标,天然酪氨酸酶抑制剂就有可能成为继几丁质抑制剂后一类新的对环境友好的害虫生物调控剂。谢桂英等^[24]研究了曲酸对小菜蛾酚氧化酶的抑制活性和类型,为研究开发新型的“昆虫生命活动干扰剂”进行了有益探索。

5.4 植物源酪氨酸酶抑制剂的应用发展前景:近年来,对酪氨酸酶的研究已转向色素障碍性疾病,黑色素瘤、白化病及阿尔茨海默病的应用上。开发利用植物性物质,将酪氨酸酶抑制剂应用于医药、化妆品、食品工业和农业生产之中,充分利用大自然赐予的天然产物对于保护人类的健康和生态环境,对防控害虫是十分有益的,而且也是大有潜力的。同时,随着对酪氨酸酶了解的不断深入,从植物中寻找高效、安全的酪氨酸酶抑制剂,其生物活性和作用也将越来越受到人们的重视,其应用也将越来越广泛,尤其在医药、化妆品和食品等领域有着非常广阔的应用前景。

致谢:承蒙山东农业大学罗万春教授审阅初稿,并提出诸多宝贵意见和建议。

References

[1] Lei T C. Tyrosinase gene family and skin melanin biosynthesis [J]. *Foreign Med Sci—Sec Dermatol* (国外医学·皮肤性病学分册), 1998, 24(2): 81.

[2] Nwlsin D, Maria A R, Alessandro D A, et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31: 907-931.

[3] Kubo I, Kinst-Hor I, Yokakawa Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57: 545-551.

[4] Kubo I, Yokakawa Y, Kinst-Hor I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58: 739-743.

[5] Kubo I. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. A potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants [J]. *Planta Med*, 1999, 65(1): 19-22.

[6] Gong X, Li Q Y. Inhibitory effect of EGb on tyrosinase [J]. *Food Sci* (食品科学), 2001, 22(12): 25-27.

[7] Lee H S. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 1400-1403.

[8] Lei T C, Zhu W Y, Xia M Y, et al. Comparative studies on effect of arbutin and hydroquinone on B16F10 murine melanoma cells melanin biosynthesis [J]. *J Clin Dermatol* (临床皮肤科杂志), 2000, 29(2): 69-71.

[9] He B F, Chen Q H. Inhibitory effect of anthraquinone derivatives from *Rheum officinale* Baill on tyrosinase [J]. *Chin Biochem J* (生物化学杂志), 1989, 5(2): 154-158.

[10] Liu D Y, Lei H Q. Inhibitory effects of myricetin and ampelopsin on tyrosinase [J]. *Chin Biochem J* (生物化学杂志), 1996, 12(5): 618-620.

[11] Fang Y. Kinetic research of inhibitory effect of SD on tyrosinase [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(7): 525-528.

[12] Shang J, Ao B C, Liu W L, et al. The effect of seven white-masking traditional Chinese medicines on tyrosinase [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1995, 30(11): 653-655.

[13] Wang J H, Lei F, Cui J R. Inhibitory effect of 20 Chinese crude drugs on tyrosinase [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2000, 35(1): 232-234.

[14] Lei T C, Zhu W Y, Xia M Y, et al. Studies on the effect of TCM on melanin biosynthesis I. Inhibitory actions of ethanolic extracts of 82 different Chinese crude drugs on tyrosinase activity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 336-339.

[15] Yan J. Effects of TCM on tyrosinase activity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(4): 378-380.

[16] Lei T, Zhu W Y, Xia M Y, et al. Studies on upregulation of 89 Chinese medicinal plant extracts on melanin biosynthesis [J]. *J Clin Dermatol* (临床皮肤科杂志), 1999, 28(3): 147-149.

[17] Kubo I, Kinst-Hori I, Ishiguro K, et al. Tyrosinase inhibitory favonoids from *Heterolthea inuloids* and their structural functions [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1994, 4(12): 1443-1446.

[18] Zeng W C, Chen Z X, Zheng N W. The effect of ethanol on tyrosinase activity [J]. *Strait Pharm J* (海峡药理学), 2000, 12(4): 36-37.

[19] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez J N, Garcia-Canovas F, et al. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1247: 1-11.

[20] Qian H, Liu C H, Zhang T. Enzymatic browning and controlling measure of A loe product [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2002, 23(10): 36-38.

[21] Tao W X, Shun W, Xu Z H, et al. Application of kojic acid in food [J]. *Chin Food Add* (中国食品添加剂), 2000(2): 26-31.

[22] Kramer K J, Hopkins T L. Tyrosine metabolism for insect cuticle tanning [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1987, 6: 279-301.

[23] Sugumaran M. Molecular mechanism for cuticular sclerotization [J]. *Adv Insect Physiol*, 1988, 21: 179-231.

[24] Xie G Y, Luo W C, Ma C. Effect of kojic acid on phenoloxidase activity in *Diamondback Moth* [J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2003, 5(1): 68-72.