

银杏酸 GA₁ 对酪氨酸酶和黑色素瘤细胞的作用

庄江兴¹, 邱 凌¹, 钟 雪¹, 柯红梅¹, 彭思远¹, 陈清西^{1,2}, 王 勤^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 2. 化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 对银杏外种皮提取的银杏酸通过制备型 HPLC 进行分离纯化, 得到同系物单体 GA₁. 研究 GA₁ 对酪氨酸酶的作用机理和对黑色素瘤细胞 B16 的作用. 结果表明 GA₁ 可抑制酪氨酸酶单酚酶活力, 对酪氨酸酶双酚酶具有较强的竞争性可逆抑制作用. 低浓度 GA₁ 对黑色素细胞没有明显的杀伤作用, 能明显降低细胞中黑色素的表达, 是良好的酪氨酸酶抑制剂.

关键词: 银杏酸; 酪氨酸酶; 黑色素细胞; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)01-0103-04

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)广泛存在于动植物体, 在动植物体酶促褐变、体内色素合成的过程中起了关键的作用. 它具有单酚酶的活性, 能将酪氨酸羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸(L-多巴), 也具有二酚酶的活性, 能将 L-多巴氧化成多巴醌, 多巴醌很不稳定, 可以经一系列的非酶促反应后, 形成由 5,6-二羟吲哚和 5,6-二羟吲哚-2-羧酸单元构成的异聚体-黑色素^[1]. 因此, 对酪氨酸酶的抑制剂的^[2]多用于保鲜剂^[3]、化妆品添加剂^[4]及杀虫剂^[5]等领域. 银杏酸是银杏中一类重要的活性成分, 具有杀菌、抗病虫害以及抗肿瘤的作用, 近年来国内外又掀起了对银杏酸的生物活性再发现和利用的热潮^[6]. 本研究通过 HPLC 分离纯化, 得到银杏酸的同系物单体 GA₁, 研究了它对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理及抑制作用动力学, 并进一步研究对黑色素瘤细胞 B16 的作用效果, 以期从中得到高效、安全的酪氨酸酶抑制剂.

1 材料与方法

1.1 材料、仪器

福建长汀银杏(*Ginkgo biloba*)的外种皮, 收集烘干后备用. 小鼠黑色素瘤 B16 细胞购于上海生物化学与细胞所. 酪氨酸酶为 Sigma 化学公司的蘑菇酪氨酸酶, 比活力为 6 680 U/mg. 二甲亚砜(DMSO)、L-酪氨酸(L-Tyr)、L-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)为 Aldrich 化学公司产品; 胰酶、双抗、RPMI1640 培养

基为 GIBCO 产品; DEPC、Triton X-100、MTT 为 Amresco 产品; 色谱流动相甲醇为色谱纯; 其它试剂为分析纯; 使用的蒸馏水为去离子重蒸水.

1.2 样品制备

干燥的外种皮经组织破碎、70%乙醇浸提、热回流提取及乙醚分级萃取的方法得到银杏酸类物质(GA)^[7], 进一步通过瓦立安制备型高效液相色谱仪(PrepStar-218)分离得到银杏酸的同系物单体 GA₁^[8]. 制备条件: 色谱柱, 流动相 V(1%醋酸): V(甲醇) = 1:9, 体积流量 12 mL/min, 进样量 500 μL, 检测波长 310 nm.

1.3 效应物对酪氨酸酶的抑制作用机理的测定

酪氨酸酶活力测定参考文献[4]. 在 3 mL 反应体系中, 含有 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8), 分别以 0.5 mmol/L L-Tyr 和 L-DOPA 作为单酚酶和二酚酶的测活底物, 酶的终浓度为 6.67 μg/mL. BECKMAN UV-650 分光光度计检测波长 475 nm 处的光密度值随着反应时间的变化, 从直线的斜率换算酶活力, 消光系数为 3 700 (mol/L·cm)⁻¹. 效应物对酶活力的影响实验是在上述反应体系中, 加入不同浓度的效应物, 研究其对酶活力的效应^[9]; 效应物对二酚酶的作用机理是通过测定不同酶量的酶活力关系加以判断; 效应物对二酚酶的抑制作用类型实验是改变反应体系的底物浓度, 通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 并通过比较酶催化反应的动力学参数 K_m 和 V_m 的变化加以判断^[3].

1.4 效应物对小鼠 B16 黑色素瘤细胞产黑色素相关指标的影响

MTT 法测定加药培养 72 h 内效应物对小鼠 B16

收稿日期: 2008-03-07

基金项目: 国家基础科学人才培养基金(J0630649), 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划和福建省自然科学基金(B0510001)资助

*通讯作者: qwang@xmu.edu.cn

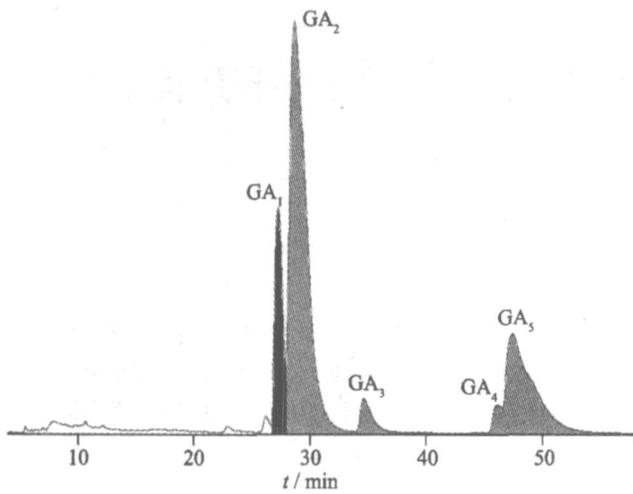


图1 制备型高效液相色谱分离银杏酸色谱图

Fig. 1 Chromatogram of ginkgolic acids by prepared HPLC

细胞增殖率的影响^[10],得 570 nm 处光吸收值,每隔 24 h 测定一次.对培养 72 h 的细胞加入磷酸缓冲液和底物 *L*-DOPA,于 475 nm 处测定黑色素瘤细胞中酪氨酸酶活性^[11].加药培养 72 h 的细胞加入含 DMSO 和 NaOH 溶液的终止剂,离心取上清,于 475 nm 处测定黑色素瘤细胞中黑色素生成量^[11].每一次实验均取同一传代细胞,每一浓度做 3 个平行,取平均值.

2 结果与讨论

2.1 银杏酸的分离

干燥的银杏外种皮经组织破碎、70%乙醇浸提、热回流提取及乙醚分级萃取的方法得到银杏酸类物质的粗制品,进一步通过高效液相色谱(HPLC)纯化,HPLC洗脱的分离效果见图1,获得5个主要组分,其中第一尖峰(GA₁,银杏酸 C13:0)对酪氨酸酶有较强的抑制作用,为本文的研究对象.经过对15批上样得到的 GA₁ 峰,收集合并,并用旋转蒸发去除甲醇浓缩成干品,经分析型 HPLC 检测纯度为 99.6%(图2).以此作为酶学效应和细胞生物学效应的样品.

2.2 GA₁ 对酪氨酸酶单酚酶活力的影响

以 *L*-Tyr 为底物,探讨银杏酸同系物单体对蘑菇酪氨酸酶催化反应的动力学曲线影响.单酚酶的催化反应开始时,产物的形成量缓慢地上升,到一定时间后呈直线上升,反应体系达到恒定的斜率,说明已达到稳态(图3曲线1).直线部分外推得到横轴的截距为迟滞时间,直线部分的斜率就是酪氨酸酶单酚酶的稳态反应速度.改变效应物的浓度,便可以得到一组反应曲线,从中可以看出效应物对单酚酶的作用效果.以稳态酶活力对效应物浓度作图,随着 GA₁ 浓度的增大,

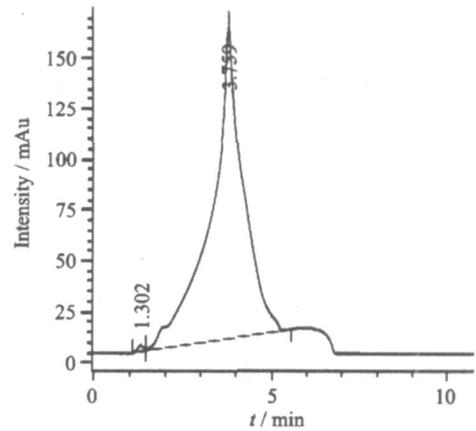


图2 GA₁ 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of GA₁ by analysis HPLC

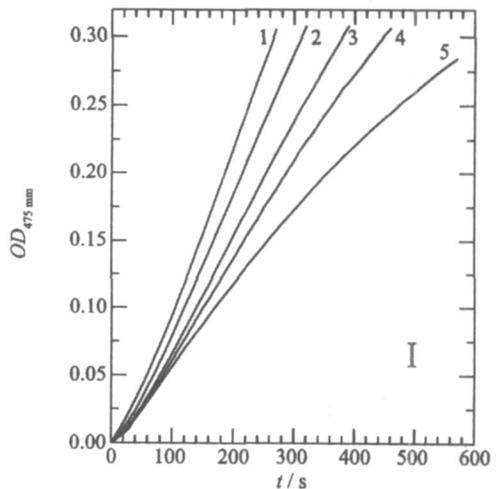
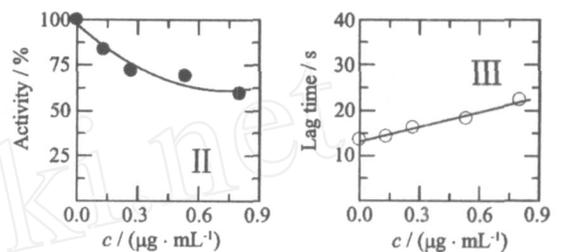


图3 GA₁ 对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线 I (曲线 1~5 的 GA₁ 浓度分别为 0, 0.13, 0.26, 0.53, 0.80 μg/mL), 稳态酶活力 II 和迟滞时间(III)

Fig. 3 Progress curves for the inhibition of monophenolase of mushroom tyrosinase by GA₁

单酚酶稳态活力均逐级下降,迟滞时间稳步上升,当 GA₁ 浓度达到 0.80 μg/mL 时,稳态酶活力下降了 25%,而迟滞时间从 14 s 延长到 22 s,说明 GA₁ 逐渐干扰着酪氨酸与还原态酶的结合.

2.3 GA₁ 对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

以 *L*-DOPA 为底物,测定酪氨酸酶的二酚酶活性,酶反应的进行曲线为通过原点的直线,产物的形成

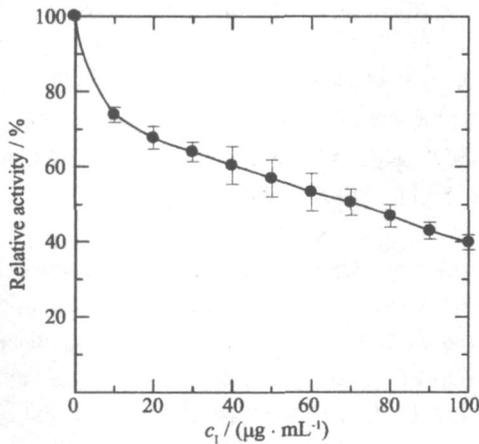


图 4 GA₁ 对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用

Fig. 4 Inhibition effect of GA₁ on the diphenolase activity of tyrosinase

量与反应时间成正比关系,直线的斜率即为酶活力.在测活体系中,加入不同浓度的银杏酸同系物单体(GA₁)为效应物,监测 GA₁ 对酪氨酸酶二酚酶活力的影响,结果见图 4.可以看出,随着 GA₁ 浓度的增大,酶活力不断下降.使酶活力下降一半时的抑制剂浓度(即 IC₅₀)为 60 μg/mL.说明银杏酸中的 GA₁ 是银杏外种皮中酪氨酸酶抑制剂的有效成分.

2.4 GA₁ 对酪氨酸酶的抑制机理和抑制动力学

在固定底物(L-DOPA)浓度的测活体系中,改变加入的酶量,测定不同含量 GA₁ 对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化活力的影响.以酶的剩余活力对加入的酶量作图,得到一组通过原点的直线,直线的斜率随着 GA₁ 浓度的增加而下降,说明酶的催化活力受到抑制,而有效的酶量并没有下降,GA₁ 对该酶的抑制效应表现为可逆抑制作用,因为不可逆的抑制作用将得到一组平行线,且在横轴截距随着效应物的浓度增大而增大.

在固定酶浓度的测活体系中,改变 L-DOPA 浓度,测定不同含量抑制剂对酶活力的影响,通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,判断抑制剂的抑制类型(图 5).实验结果表明,GA₁ 对酪氨酸酶的抑制图谱为一组相交于 Y 轴的直线,说明抑制剂仅改变酶促反应的米氏常数(K_m),而对最大反应速度(V_m)不构成影响.表明 GA₁ 通过与底物竞争酶的中心结合位点达到抑制酶活力的目的,为竞争性抑制作用,测得 GA₁ 对酪氨酸酶的抑制常数 K_i 为 44.1 μg/mL.

2.5 GA₁ 对小鼠 B16 黑色素瘤细胞的影响

在细胞培养液中加入不同浓度 GA₁,采用 MTT 法测定小鼠 B16 细胞经过培养 72 h 加药后的细胞增

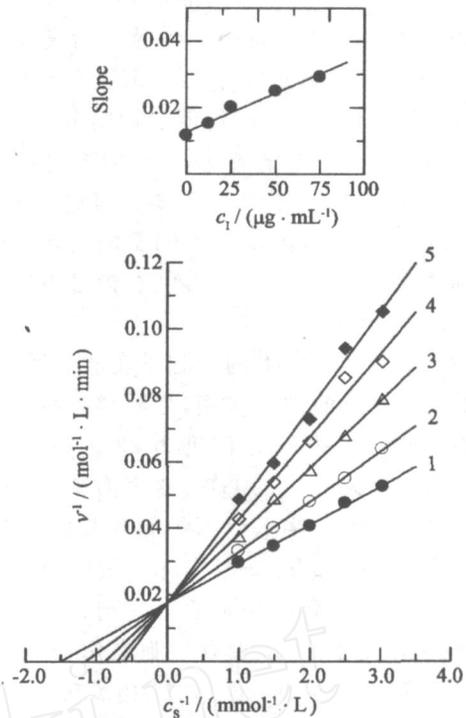


图 5 GA₁ 对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型和抑制常数的测定

直线 1~5 的抑制浓度为 0, 12.5, 25, 50, 75 μg/mL

Fig. 5 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of GA₁ on tyrosinase

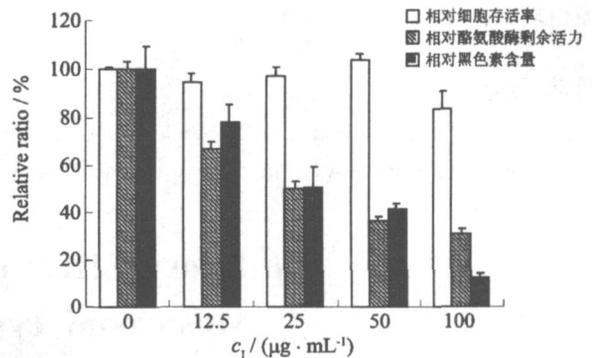


图 6 GA₁ 对小鼠 B16 细胞增殖率、细胞中的酪氨酸酶活力和黑色素含量的影响

Fig. 6 The effects of GA₁ on the cell viability, tyrosinase activity and melanin content of B16 cell

殖率,图 6 表示 GA₁ 作用于小鼠 B16 黑色素细胞 72 h 后酪氨酸酶活力和黑色素含量的变化情况. GA₁ 在 0 ~ 50 μg/mL 浓度范围内,相对细胞存活率基本上维持在 94% ~ 103% 之间,而 B16 细胞中酪氨酸酶活力随着效应物浓度的增高显著下降到 36.4%,细胞间黑色素含量随着 GA₁ 浓度的增加和酪氨酸酶活力的下降而减少到 41%.当 GA₁ 浓度达到 100 μg/mL 时,相

对细胞存活率下降到 83.8%, 细胞中酪氨酸酶相对活力继续下降到 30.9%, 而相对黑色素含量却下降到 12.2%, 其下降速度远远高于相对细胞存活率和细胞中酪氨酸酶活力, 说明 GA_1 能明显抑制 B16 细胞中酪氨酸酶的活力和黑色素的表达, 且对细胞的毒性较低. 用 logit 法计算求得其导致小鼠 B16 细胞数下降一半的剂量浓度为 1.57 mg/mL, 使酪氨酸酶活力下降一半的 IC_{50} 为 28.2 μ g/mL, 使黑色素含量下降一半的 IC_{50} 为 29.6 μ g/mL.

对小鼠黑色素瘤 B16 的细胞学实验表明, GA_1 对细胞生长没有明显的抑制作用, 导致酪氨酸酶二酚酶相对活力下降一半的 GA_1 浓度为 28.2 μ g/mL, 使黑色素相对含量下降一半的 GA_1 浓度为 29.6 μ g/mL. 通过计算得到抑制一半黑色素细胞生长的 GA_1 浓度的理论值为 1.57 mg/mL. 但实际上效应物的浓度低于 100 μ g/mL 就对酪氨酸酶活力起到了良好的调节作用, 说明低浓度的 GA_1 没有细胞毒作用, 对细胞生长不构成破坏. 另一方面, 酪氨酸酶相对活力和黑色素相对含量的理论 IC_{50} 非常接近, 说明 GA_1 对黑色素细胞的调控几乎完全是通过调节酪氨酸酶活力实现的. GA_1 通过竞争性与酪氨酸酶实现可逆的结合, 达到抑制底物与酶结合, 从而实现黑色素含量的减少.

本文结果表明, 银杏酸主要成分 GA_1 在低浓度范围内对小鼠 B16 黑色素细胞无毒害作用, 且可抑制酪氨酸酶活力的表达和黑色素的生成, 可进一步探讨其美白功效.

参考文献:

[1] Sanchez Ferrer A, Rodrigucz Lopez J N, Gare ia Canovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mecha-

nism[J]. BBA-protein and Molecular Enzynology, 1995, 1247:1 - 11.

[2] 陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(2): 274 - 282.

[3] 林敏, 何群, 邱凌, 等. 没食子酸衍生物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(4): 567 - 569.

[4] Qiu Ling, Chen Qingxi, Wang Qin, et al. Irreversibly inhibitory kinetics of 3, 5-dihydroxyphenyl decanoate on mushroom (*A garicus bisporus*) tyrosinase[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13: 6206 - 6211.

[5] 王勤, 柯莉娜, 薛超彬, 等. 几种苯甲酸族化合物对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(3): 428 - 431.

[6] 石启田. 银杏酚酸类物质防治农业害虫的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 83 - 86.

[7] 王勤, 钟雪, 邱凌, 等. 银杏外种皮提取酪氨酸酶抑制剂方法的比较[J]. 广西植物, 2008, 28(3): 379 - 381.

[8] 张鉴, 王兰, 袁成凌, 等. RP-HPLC 法制备银杏酸的研究[J]. 中草药, 2004, 35(11): 1238 - 1239.

[9] Wang Qin, Qiu Ling, Chen Xiangren, et al. Inhibitory effects of phloridzin dihydrate on the activity of mushroom (*A garicus bisporus*) tyrosinase [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 15: 1568 - 1571.

[10] Mallicak S, Singh S K, Sarkar C, et al. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro[J]. Pigment Cell Res, 2004, 18: 25 - 33.

[11] Walker J R L, Wilson E L. Studies on the enzymatic browning of apples: inhibition of apple σ diphenol oxidase by phenolic acids [J]. J Sci Food Agric, 1975, 26: 1825 - 1831.

Inhibitory Effect of Ginkgolic Acids GA_1 on Mushroom Tyrosinase and B-16 Cell

ZHUANG Jiang-xing¹, QIU Ling¹, ZHONG Xue¹, KE Hong-mei¹,
PENG Si-yuan¹, CHEN Qing-xi^{1,2}, WANG Qin^{1*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University,

2. The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province (Xiamen University), Xiamen 361005, China)

Abstract: In this paper, GA_1 was purified from ginkgo episperm extraction's ginkgo acid by preparative HPLC. The effects of GA_1 on the activity of mushroom tyrosinase and the B16 melanoma cells were studied. Results indicated that GA_1 may inhibit both the monophenolase activity and diphenolase activity. The kinetic analyses showed that the strong inhibition of GA_1 on the diphenolase was reversible and competitive. GA_1 is harmless to the melanophore in low concentration. Tiny concentration of GA_1 was able to inhibit the melanin expression in B16 cell obviously. So GA_1 is one of promising tyrosinase inhibitors in the future.

Key words: ginkgolic acids; tyrosinase; B16 cell; inhibition; kinetics