

桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

陈桂霞, 邱 凌, 宋康康, 陈祥仁, 陈清西*

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究桑黄素(Morin)对蘑菇酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活力的影响和抑制效应的结果表明: 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活性均有抑制作用; 导致单酚酶活力和二酚酶活力下降 50% 的抑制剂浓度(IC_{50}) 分别为 0.08 和 1.02 mmol/L; 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶的迟滞时间有明显的延长效应, 0.175 mmol/L 桑黄素使得单酚酶的迟滞时间从 24 s 延长到 362 s, 迟滞时间增加了 14 倍, 酶的稳态活力下降了 61.9%; 桑黄素对二酚酶的抑制作用表现为竞争性可逆抑制作用, 抑制常数为 0.55 mmol/L.

关键词: 蘑菇酪氨酸酶; 单酚酶活性; 二酚酶活性; 桑黄素; 抑制机理

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)03-0424-04

酪氨酸酶(EC. 1.14.18.1)是一种含铜的多酚氧化酶,是生物体合成黑色素的关键酶^[1,2],具有单酚酶和二酚酶活性,能将酪氨酸羟化,产生邻位二羟基苯丙氨酸(L-多巴),然后再将多巴氧化成多巴醌,进而生成一系列引起褐化的色素类物质.抑制其活力即可抑制黑色素的生成,因此酪氨酸酶抑制剂具有重要的应用前景.它们可以应用于人体的色素障碍性疾病、恶性黑色素瘤和老年性痴呆等医药上^[3],也被应用于水果蔬菜的保鲜^[4]和生物杀虫作用^[5].前文我们报告了黄酮类物质对酪氨酸酶二酚酶活力的影响和抑制作用动力学^[6],我们在此基础上,研究桑黄素对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶的抑制作用机理,提出该抑制剂和酶分子间结合的分子模型,为酪氨酸酶抑制剂的分子设计和改造奠定科学理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

蘑菇酪氨酸酶购于 Sigma 化学公司,比活力为 6 680 U/mg; 桑黄素(Morin)和二甲亚砜(DMSO)为 Sigma 化学公司产品; L-酪氨酸(Tyr)和 L-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)为 Aldrich 化学公司产品.其它试剂为国产分析纯,使用的蒸馏水为玻璃重蒸水.

1.2 方法

酪氨酸酶的酶活力测定参考文献[7].分别以 0.5 mmol/L L-酪氨酸和 L-DOPA 作为单酚酶和二酚酶的测活底物,酶的终浓度为 6.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$.在测定的比色杯中,先加入 0.1 mL DMSO 溶液含不同浓度的效应物(桑黄素),同时加入 2.8 mL 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)含 0.5 mmol/L 底物溶液,置于测定仪器 UV-650 分光光度计,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 5 min,达恒温后,加入 0.1 mL 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蘑菇酪氨酸酶水溶液,监测 475 nm 的光密度值随反应时间的增长直线,从直线的斜率求得酶活力.产物的消光系数按 3 700 ($\text{mol}/\text{L} \cdot \text{cm}$)⁻¹计算^[8].测定溶液中 DMSO 的终浓度为 3.33%,酶的终浓度为 6.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

桑黄素对酶活力的影响实验通过在测活体系中加入不同浓度的效应物,检测酶的剩余活力来判断,对照组的加入 3.33% DMSO 排除 DMSO 的影响.桑黄素对二酚酶的抑制作用通过改变加入的酶量,测定含不同浓度效应物下,酶活力与酶量的关系来判断.酶的抑制作用动力学通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数 K_m 和 V_m 的变化来判断抑制作用类型^[9].

2 实验结果

2.1 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力影响的浓度效应

以桑黄素为效应物,以 L-Tyr 为底物测定蘑菇酪氨酸酶单酚酶催化反应的动力学曲线(图 1).反应开始时,产物的形成量缓慢地上升,到一定时间后成直线上升,反应体系达到恒定的斜率,说明已达到稳态.直线部分外推得到横轴的截距为迟滞时间^[10].结果表

收稿日期: 2005-03-20

基金项目: 福建省科技攻关课题(2004N002),福建省自然科学基金(B0410003)和国家自然科学基金(30570408)资助

作者简介: 陈桂霞(1965-),女,硕士.现工作单位:厦门市妇幼保健院.

* 通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

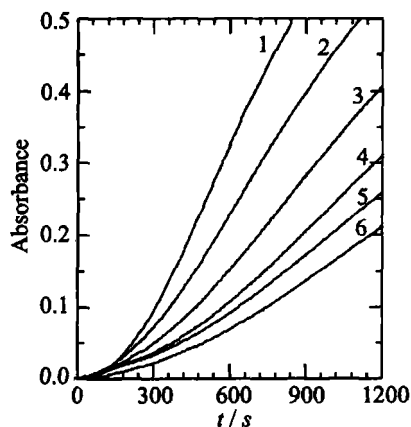


图 1 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶效应
曲线 1~ 6 桑黄素浓度分别为: 0、0.025、0.050、
0.075、0.135、0.175 mmol/L

Fig. 1 Effect of Morin on the monophenolase activity of mushroom tyrosinase for the oxidation of L-tyrosine

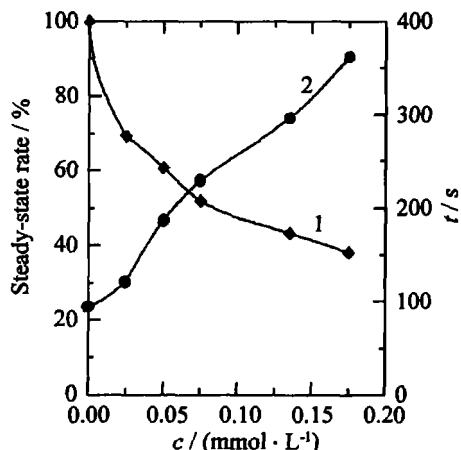


图 2 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶的稳定态 (1) 和迟滞时间(2)的影响

Fig. 2 Effects of Morin on the steady-state activity (1) and the lag time (2) of monophenolase of mushroom tyrosinase

明, 恒定态的斜率(代表单酚酶稳定态活力)随着桑黄素的浓度增大而下降, 迟滞时间则随着桑黄素浓度的增大而延长, 说明桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶活性有显著的抑制作用. 为了显示桑黄素对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的效应强度, 以酶稳定态活力和迟滞时间对桑黄素浓度作图, 结果见图 2. 随着桑黄素的浓度增大, 酶稳定态活力呈指数下降(图 2 曲线 1), 测定导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为 0.080 mmol/L, 而酶反应的迟滞时间成直线增大(图 2 曲线 2). 没有加入桑黄素时, 酶反应的迟滞时间为 24 s, 当桑黄素浓度为 0.175 mmol/L 时, 迟滞时间增大到 362 s, 迟滞时间增加了 14 倍. 实验结果表明桑黄素对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用是降低酶的稳定态活力和延长迟滞时间而影响酶的催化作用.

2.2 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

以 L-DOPA 为底物, 测定蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活性, 酶反应的进行曲线为通过原点的一直线, 产物的形成量与反应时间成正比关系, 直线的斜率即为酶活力, 表明酶催化 L-DOPA 氧化不存在迟滞过程. 而在反应体系中加入桑黄素后, 直线的斜率下降, 说明桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活力也有抑制作用. 桑黄素对二酚酶活力的浓度效应分析结果见图 3. 测定导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为 1.02 mmol/L. 研究桑黄素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用机理. 在固定底物浓度的测活体系中, 改变加入的酶量, 测定不同浓度效应物对该酶催化 L-DOPA 氧化活力的影响. 酶经桑黄素作用后的酶活力对酶量作图

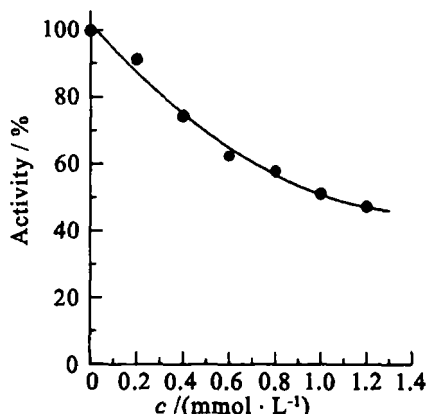


图 3 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活力影响的浓度效应

Fig. 3 Effect of Morin on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

得到一组通过原点的直线, 随着效应物浓度的增大, 直线的斜率降低. 此结果说明桑黄素对酶的抑制作用属于可逆过程, 增加抑制剂浓度导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制, 催化效率降低. 而不是通过导致有效的酶量减少, 而引起酶活力的下降.

2.3 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶表现为竞争性抑制机理及抑制常数的测定

研究桑黄素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用类型, 在测活体系中加入不同浓度的桑黄素, 固定酶的浓度, 改变底物 L-DOPA 浓度, 测定酶促反应当初速度. 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 结果见图 4. 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的 K_m 值随着抑制剂浓度的增大而增大, 而 V_{max} 不随着抑制剂浓度增大而变化. 表

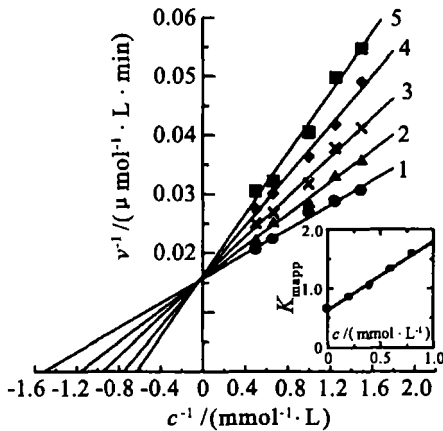


图4 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用
直线 1~ 5 桑黄素浓度分别为: 0、0. 2、0. 4、0. 6 和 0. 8 mmol · L⁻¹

Fig. 4 Inhibitory type and inhibition constant of Morin on the diphenolase activity

明酶对底物的亲和力下降, 抑制剂的存在阻碍了底物和酶的结合. 底物与抑制剂同酶分子的结合是互相竞争的, 增加底物浓度可以排除抑制剂对酶的效应, 说明桑黄素只能与游离酶(E)结合, 而不能与酶-底物络合物(ES)结合. 以不同浓度桑黄素下测定的 K_m 对抑制剂浓度作图(图4内插图)为一条直线, 从直线的斜率可以求得抑制常数 K_I 为 0.55 mmol/L.

3 讨论

蘑菇酪氨酸酶具有单酚羟化酶和二酚加氧酶活性, 可以先羟化酪氨酸产生邻位二羟基苯丙氨酸(单酚酶活性), 然后将其氧化成为相应的醌(二酚酶活力), 进而生成一系列引起褐化的色素类物质^[4], 可见, 酪氨酸酶是产生色素的关键酶. 通过对该酶活力的调控, 抑制该酶活力, 可以减少黑褐色素的生成, 促进增白. 实验结果表明, 桑黄素对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力均有的抑制作用, 其抑制效应表现为可逆机理, 桑黄素和酶的结合导致酶活力受抑制. 桑黄素对酪氨酸酶的单酚酶抑制作用显著大于对二酚酶的抑制作用, IC_{50} 分别为 0.08 和 1.02 mmol/L.

目前, 用作化妆品增白作用的添加剂主要有曲酸^[11]和熊果甙^[12]. 它们都是通过抑制酪氨酸酶活力而达到增白效果. 与曲酸、熊果甙相比较, 桑黄素对酪氨酸酶的抑制作用明显低于曲酸而高于熊果甙, 对于单酚酶活力, 0.06 mmol/L 的曲酸可以使迟滞时间延长 6.5 倍, 而同样浓度的桑黄素和熊果甙分别可以使单酚酶的迟滞时间延长 1.1 倍和 0.8 倍; 曲酸和桑黄素的 IC_{50} 分别为 0.031 和 0.08 mmol/L, 而 0.16 mmol/L

L 的熊果甙仅使单酚酶稳态活力下降 16%. 对单酚酶的抑制强度依次为: 曲酸 > 桑黄素 > 熊果甙. 对于二酚酶来说, 桑黄素和熊果甙的抑制作用类型属于竞争性, 而曲酸是混合型类型, 它们的 IC_{50} 分别为 1.02、5.30 和 0.02 mmol/L. 对二酚酶的抑制强度也是依次为: 曲酸 > 桑黄素 > 熊果甙.

虽然曲酸对酪氨酸酶有较强的抑制作用, 但用作化妆品增白剂对人体皮肤有较强的刺激作用, 不受人们的欢迎. 熊果甙对皮肤没有刺激作用, 是较理想的化妆品增白剂, 但对酶的抑制作用很弱, 需要较高添加量才能达到效果. 因此, 寻找对皮肤没有刺激作用的更有效的酪氨酸酶抑制剂作为化妆品增白剂显得更为重要. 本文从理论上阐明了桑黄素能较高效抑制酪氨酸酶活性的增白机理, 为以桑黄素为抗氧化剂和增白剂的特效化妆品开发提供了理论依据. 桑黄素是一种可从蜂胶、桑叶提取的天然活性物质, 具有更广阔的市场前景, 由此可以获得较高的经济效益和社会效益.

参考文献:

- [1] 赵会全, 刘望夷. 酪氨酸酶的分子生物学研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册, 1999, 13(6): 273- 292.
- [2] Wu T W, Zeng L H, Wu J, et al. Morin: a wood pigment that protects three types of human cells in the cardiovascular system against oxyradical damage [J]. Biochem. Pharmacol, 1994, 47(6): 1099- 1103.
- [3] Wu T W, Fung K P, Wu J, et al. Morin hydrate inhibits azo-initiator induced oxidation of human low density lipoprotein [J]. Life Sci., 1996, 58(2): 17- 23.
- [4] Chen Q X, Ke L N, song K K, et al. Inhibitory effects of hexylresorcinol and dodecylresorcinol on mushroom tyrosinase [J]. The Protein Journal, 2004, 23(2): 135- 141.
- [5] 吴向阳, 仰榴青, 陈钧, 等. 银杏外种皮综合利用的研究现状与发展[J]. 农业机械学报, 2003, 34(6): 164- 166.
- [6] Xie L P, Chen Q X, Huang H, et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Biochem. (Moscow), 2003, 68(4): 487- 491.
- [7] Chen Q X, song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. J. Enzy. Inhibit. Med. Chem., 2003, 18(6): 491- 496.
- [8] Jimenez M, Chazarra S, Escribano J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes [J]. J. Agric. Food Chem., 2001, 49: 4060 - 4063.
- [9] 黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(1): 98- 101.
- [10] 刘晓丹, 黄璜, 陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用

- 机理的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42 (1): 102-106.
- [11] 黄璜, 宋康康, 陈清西. 曲酸作为化妆品添加剂的增白作用机理研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42 (5): 652-656.
- [12] 宋康康, 邱凌, 黄璜, 等. 熊果甙作为化妆品添加剂对酪氨酸酶抑制作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42 (6): 791-794.

Inhibitory Effects of Morin on Mushroom Tyrosinase

CHEN Gui-xia, QIU Ling, SONG Kang-kang,

CHEN Xiang-ren, CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Tyrosinase (1.14.18.1) is a metalloenzyme oxidase which catalyzes two distinct reactions of melanin synthesis: the hydroxylation of a monophenol and the oxidation of σ -diphenol to the corresponding σ -quinone. In this paper, we find that Morin has potent inhibitory effects on the monophenolase and σ -diphenolase activity of mushroom tyrosinase. The inhibition kinetics and mechanism of this compound on the enzyme were further studied. The results showed that the inhibition of Morin was a reversible reaction with remaining enzyme activity. The inhibitor concentrations leading to 50% (IC_{50}) activity lost were estimated to be 0.08 mmol/L for monophenolase activity and 1.02 mmol/L for diphenolase, respectively. Morin can extend the lag time of mushroom tyrosinase for oxidation of L-tyrosine, and it led to extending the lag time from 24 s to 362 s when its concentration was at 0.175 mmol/L. The inhibition kinetics analyzed by Lineweaver-Burk plots showed that Morin was a competitive inhibitor to the enzyme for the oxidation of L-DOPA, and the inhibition constant was determined to be 0.55 mmol/L.

Key words: mushroom tyrosinase; monophenolase activity; σ -diphenolase activity; Morin; Inhibitory mechanism