

对氰基苯酚对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

王勤, 邱凌, 宋康康, 郭华云, 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: 报道了对氰基苯酚对蘑菇酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活力的抑制效应. 结果表明, 对氰基苯酚对酪氨酸酶活性的抑制作用表现为可逆抑制作用, 对酪氨酸酶的单酚酶的效应主要表现为迟滞时间有明显的延长, 对稳态酶活力有显著抑制作用. 0.50 mmol/L 对氰基苯酚使得单酚酶的迟滞时间从 18 s 延长到 80 s, 增大 4.4 倍, 稳态酶活力下降 80%. 对氰基苯酚对二酚酶的抑制作用显示浓度关系, 测定导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为 0.80 mmol/L, 其抑制作用为竞争性类型, 抑制常数 K_I 为 0.31 mmol/L. 通过研究对氰基苯酚对酪氨酸酶的抑制作用机理, 试图寻找新型的有增白作用的化妆品添加剂.

关键词: 酪氨酸酶; 对氰基苯酚; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

酪氨酸酶 (EC. 1.14.18.1) 又称多酚氧化酶, 其活性中心含有金属铜离子, 它广泛存在于动植物体和人体内, 是生物体合成黑色素等色素的关键酶^[1~3], 抑制其活力即可抑制黑色素的生成. 目前已有一些酪氨酸酶抑制剂作为化妆品添加剂投放市场, 如曲酸、果酸、熊果甙、维生素 C、动物胎盘提取液、芦荟提取液等, 它们可以保护皮肤, 消除黑斑, 具有增白效果. 熊果甙化学名为 4-羟基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷, 是从植物中分离得天然活性物质^[4]. 以对氰基苯酚 (结构式见图 1) 作为效应物, 研究其对酪氨酸酶活力的影响及抑制作用机理, 提出抑制剂和酶分子间结合作用的分子模型, 以期对酪氨酸酶抑制剂的分子设计和抑制剂的实际应用提供理论依据, 为新型高效酪氨酸酶抑制剂的开发提供新的途径.

1 材料与方法

1.1 材料

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. 对氰基苯酚和二甲亚砜 (DMSO) 均为 Sigma 化学公司产品. L-酪氨酸

(Tyr), L-3,4-二羟基苯氨酸 (L-DOPA) 为 Aldrich 化学公司产品. 其它试剂为国产分析纯, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水.

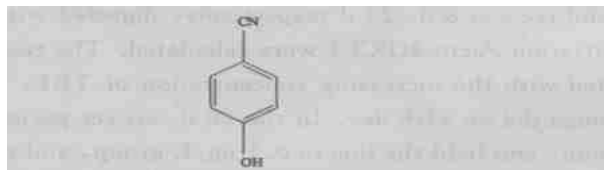


图 1 对氰基苯酚的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of 4-cyanophenol

1.2 方法

酪氨酸酶的酶活力测定见参考文献[5]. 测定单酚酶活力所用的底物为 0.5 mmol/L Tyr, 酶的终浓度为 33.3 μ g/mL. 二酚酶所用底物为 0.5 mmol/L L-DOPA, 酶的终浓度为 6.67 μ g/mL. 所用 DMSO 终浓度均为 3.33%. 测定仪器 UV-650 分光光度计. 对氰基苯酚对酶的抑制作用的机理是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化反应的动力学参数, 包括表观米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 的变化来判断的^[6,7].

2 实验结果

2.1 对氰基苯酚对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响

收稿日期: 2004-01-08

基金项目: 福建省自然科学基金 (B0110002) 和教育部留学回国人员科研启动基金资助

作者简介: 王勤 (1969-), 女, 在站博士后.

* Corresponding author, Tel/Fax: 0592-2185487

E-mail: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

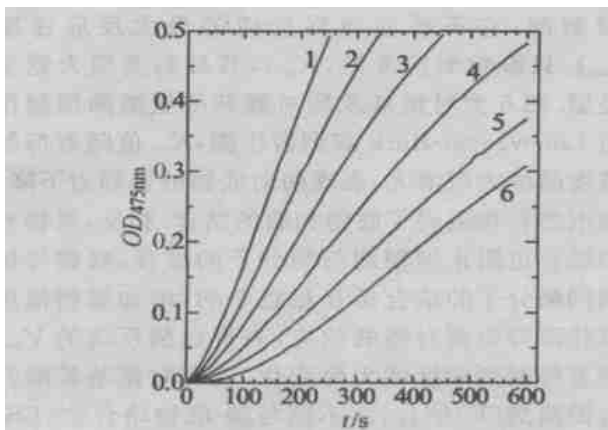


图 2 对氰基苯酚对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线

曲线 1~ 6 对氰基苯酚的浓度分别为: 0、0.067、0.16、0.25、0.40 和 0.50 mmol/L

Fig.2 Progress curves for the inhibition of monophenolase of mushroom tyrosinase by 4-cyanophenol

以对氰基苯酚为效应物, 研究其对酪氨酸酶单酚氧化酶活力的影响(图 2), 表明酶反应的迟滞时间(曲线的直线部分交于横轴的值)随着抑制剂浓度的增大而显著地延长, 稳态的酶活力(直线部分的斜率)也随着抑制剂浓度的增大而有所下降, 说明对氰基苯酚对酪氨酸酶的单酚酶活性有抑制作用. 图 3 显示对氰基苯酚对酪氨酸酶催化酪氨酸的迟滞时间和稳态酶活力的影响. 随着抑制剂浓度的增大, 酶反应的迟滞时间呈指数上升趋势, 没有抑制剂存在时, 酶反应的迟滞时间为 18 s, 当对氰基苯酚浓度为 0.50 mmol/L 时, 迟滞时间延长到 80 s, 迟滞时间增

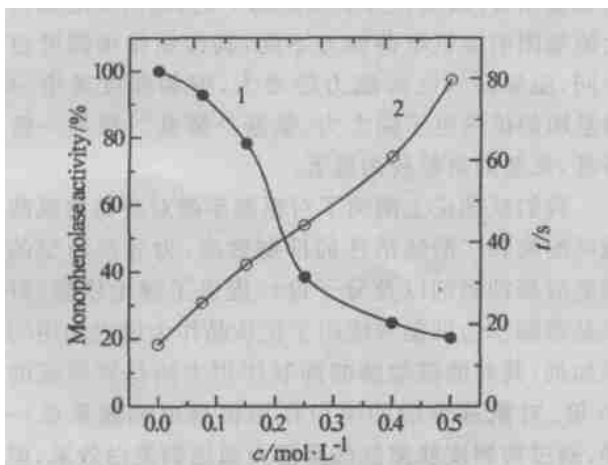


图 3 对氰基苯酚对酪氨酸酶单酚酶的影响

(1) 稳态酶活力, (2) 迟滞时间

Fig.3 Effect of 4-cyanophenol on the steady-state activity

大 4.4 倍. 稳定态的酶活力则随着对氰基苯酚浓度的增大迅速下降, 当对氰基苯酚浓度达 0.50 mmol/L 时, 酶活力下降 82%.

2.2 对氰基苯酚对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

二酚酶催化 L-DOPA 氧化不存在迟滞过程. 在反应体系中加入对氰基苯酚后, 酶作用的进行曲线为直线关系, 其直线的斜率随着加入的对氰基苯酚浓度增大而下降, 说明对氰基苯酚对酪氨酸酶的二酚酶活力也有抑制作用. 对氰基苯酚对酪氨酸酶的二酚酶活力的抑制作用的曲线见图 4, 随着抑制剂浓度的增大, 酶活力呈指数下降, 导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度(IC_{50})为 0.80 mmol/L. 进一步探讨对氰基苯酚对酶的抑制作用机理, 在固定一系列的抑制剂浓度的测活体系中, 改变进入的酶浓度, 测定酶促反应的初速度, 以剩余的酶活力对加入的酶量作图, 结果见图 5, 酶活力对酶量作图得到 1 组通过原点的直线, 随着抑制剂浓度的增大, 直线的斜率降低. 对氰基苯酚是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低, 而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降, 说明对氰基苯酚对酶的抑制作用属于可逆过程. 因为不可逆的抑制剂将会导致有效酶量下降而产生 1 组平行线, 横轴的截距将随着不可逆抑制剂浓度的增大而增大.

2.3 对氰基苯酚对酪氨酸酶的抑制类型及抑制常数的测定

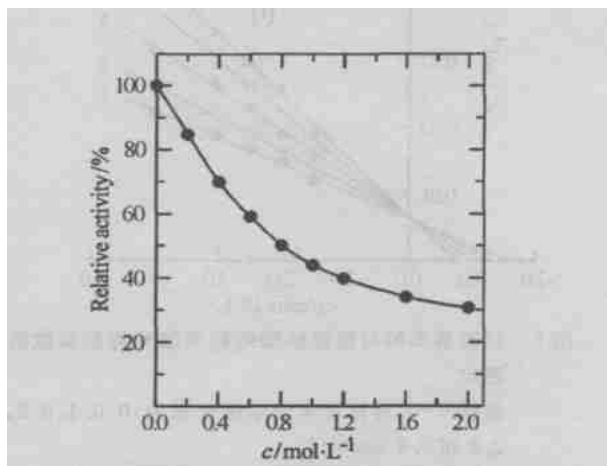


图 4 对氰基苯酚对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

Fig.4 Effect of 4-cyanophenol on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

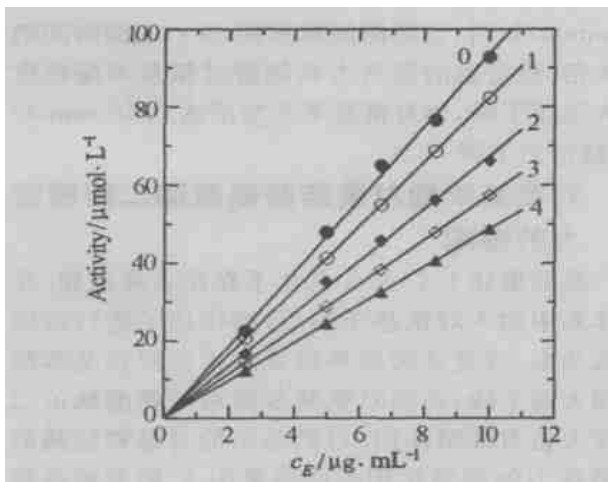


图5 对氰基苯酚对酪氨酸酶抑制机理的判断
曲线 0~ 4 对氰基苯酚浓度分别为: 0、0. 1、0. 2、
0. 3 和 0. 4 mmol/L

Fig. 5 Determination of the inhibitory mechanism of 4-
cyanophenol on mushroom tyrosinase

研究对氰基苯酚对酪氨酸酶二酚酶抑制作用类型,在测活体系中,固定酶的浓度,改变 L-DOPA 浓度,测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,判断抑制剂的抑制类型^[6].由 Lineweaver-Burk 双倒数作图得到 1 组纵轴截距不变的直线,说明对氰基苯酚作为酪氨酸酶抑

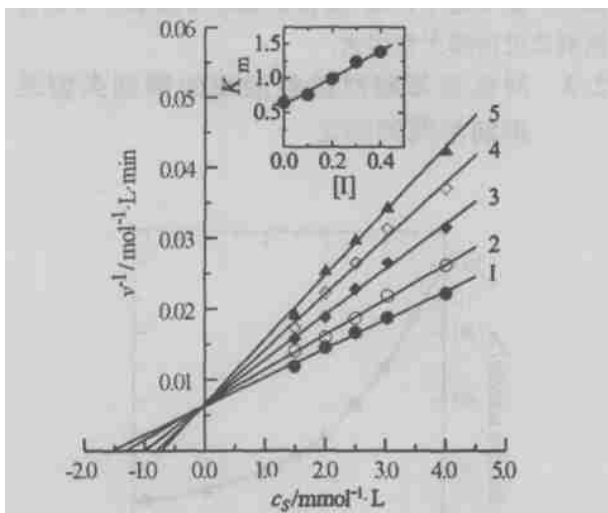


图6 对氰基苯酚对酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定
曲线 0~ 4 对氰基苯酚浓度分别为: 0、0. 1、0. 2、
0. 3 和 0. 4 mmol/L

Fig. 6 Determination of the inhibitory type and inhibition
constant of 4-cyanophenol on mushroom tyrosinase

制剂,它不改变酶促反应的最大反应速度(V_{max}),只影响米氏常数(K_m),其抑制类型为竞争性类型.图6为对氰基苯酚对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图, K_m 值随着抑制剂浓度的增大而增大,表现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.相反,底物和酶的结合也阻止抑制剂与酶分子的结合,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,表现出酶反应的 V_{max} 不随着抑制剂浓度增大而变化.说明对氰基苯酚只能与游离酶(E)结合,而不能与酶-底物络合物(ES)结合.以不同浓度对氰基苯酚下测定的 K_m 对抑制剂浓度作图(图6内插图)为1条直线,从直线的斜率可以求得抑制常数(K_i)为0.31 mmol/L.

3 讨论

采用对氰基苯酚作为效应物,我们还曾报道过化学结构与此相类似的其它效应物(对羧基苯酚、对醛基苯酚、熊果甙)对蘑菇酪氨酸酶活性的影响,它们的动力学参数总结于表1.从表1可以看出,导致酶活力下降50%所需的抑制剂浓度(IC_{50})4种效应物分别为0.80、1.30、1.15和5.30 mmol/L,对氰基苯酚对酶的抑制能力最强,约为对羧基苯酚和对醛基苯酚对酶的抑制能力的1.5倍,为熊果甙的7倍.4种效应物在分子结构上很相似,都含有1个苯酚,它们对酪氨酸酶的二酚酶均表现为竞争性抑制效应.在对位所含的基团不同(分别为氰基、羧基、醛基和葡萄糖苷)表现在抑制强度的不同,表明苯酚对位上的基团的提供电荷能力不同,其抑制作用强度也不同,随着提供电荷能力的增大,抑制强度递增.4种基团的提供电子能力为:氰基>醛基>羧基>糖苷基,氰基的贡献较为显著.

我们从理论上阐明了对氰基苯酚对蘑菇酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活性的抑制效应,为寻找新型的酪氨酸酶抑制剂以及分子设计提供了理论依据.对氰基苯酚作为抑制剂应用于化妆品作为增白作用的添加剂,其对酪氨酸酶的抑制作用大约是熊果甙的10倍.对氰基苯酚的增白作用机理也和熊果甙一样,通过抑制皮肤酪氨酸酶活力而达到美白效果,但其安全性还有待细胞实验进一步研究.

表1 对氰基苯酚、对羧基苯酚、对醛基苯酚和熊果甙对蘑菇酪氨酸酶抑制效应的比较
Tab.1 Comparison of the inhibitory effects of 4-cyanophenol, 4-carboxylphenol, 4-aldehydicphenol and arbutin on mushroom tyrosinase

常数	对氰基苯酚	对羧基苯酚 [#]	对醛基苯酚 ^{##}	熊果甙 ^{###}
$IC_{50}/(mmol \cdot L^{-1})$	0.80	1.30	1.15	5.30
抑制作用	可逆抑制	可逆抑制	可逆抑制	可逆抑制
抑制类型	竞争性	竞争性	竞争性	竞争性
$K_i/(mmol \cdot L^{-1})$	0.31	0.73	0.69	2.98

数据待发表; ## 数据引用文献[6]; ### 数据引用文献[7].

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] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J N, Garcia-Canovas F, et al. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism[J]. BBA-protein and Molecular Enzymology, 1995, 1247: 1-11.
- [3] Mosher D B, Patlak M A, Fitzpatrick T B. Vitiligo, etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. Dermatology in General Medicine[M]. New York: McGraw-Hill, 1983. 205-225.
- [4] 杨跃飞. 熊果甙及其衍生物在美白化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 1995, 1: 28-32.
- [5] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of Mushroom Tyrosinase by Some Alkylbenzaldehydes[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18(6): 491-496.
- [6] 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.
- [7] 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.

The Inhibitory Effect on Mushroom Tyrosinase by 4-cyanophenol

WANG Qin, QIU Ling, SONG Kang-kang, GUO Hua-yun, CHEN Qing-xi*
(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Tyrosinase (1.14.18.1) is a copper-containing oxidase that catalyzes two distinct reactions of melanin synthesis — the hydroxylation of a monophenol and the oxidation of *o*-diphenol to the corresponding *o*-quinone. 4-Cyanophenol was found to inhibit the monophenolase and *o*-diphenolase activity of mushroom tyrosinase. 4-Cyanophenol inhibited the monophenolase activity. The lag time of the enzyme for oxidation of L-tyrosine extended and the steady-state rate of monophenolase decreased. When the concentration of 4-cyanophenol reached 0.50 mmol/L, the steady-state rate of the enzyme dropped by 80% of the total activity, and the lag time extended from 18 sec to 80 sec. The inhibition kinetics and mechanism of the diphenolase activity of the enzyme by 4-cyanophenol were further studied. The results show that the inhibition of 4-cyanophenol is a reversible reaction with remaining enzyme activity. The inhibitor concentrations leading to 50% (IC_{50}) activity lost were estimated to be 0.80 mmol/L for diphenolase. The inhibition kinetics analyzed by Lineweaver-Burk plots was showed that 4-cyanophenol is a competitive inhibitor for the oxidation of L-DOPA, and the inhibition constants were determined to be 0.31 mmol/L for the free enzyme. Comparing with arbutin, 4-cyanophenol is a stronger inhibitor for the diphenolase activity. In this paper, we discuss the writing mechanism of 4-cyanophenol as cosmetic additive.

Key words: tyrosinase; 4-cyanophenol; inhibition; kinetics