

• 研究简报 •

4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理研究

邱 凌¹, 庄江兴¹, 刘凤娇¹, 杨美花¹, 周晶晶¹, 李智聪¹, 陈清西^{1,2*}

(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: 报道了 4-氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid)对蘑菇酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活力的影响和抑制效应. 结果表明, 4-氨基苯甲酸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 0.35 和 0.30 mmol/L. 4-氨基苯甲酸对单酚酶的迟滞时间有明显的延长效应, 1.0 mmol/L 可使单酚酶的迟滞时间从 30.5 s 延长到 155.1 s, 增加了 4.4 倍. 4-氨基苯甲酸对二酚酶的抑制作用表现为混合型可逆抑制作用, 抑制常数(K_I 和 K_{IS})分别为 0.259 和 1.46 mmol/L.

关键词: 酪氨酸酶; 单酚酶活性; 二酚酶活性; 4-氨基苯甲酸; 抑制机理

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)02-0302-03

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)是一种广泛存在于自然界中含铜的金属氧化酶,是生物黑色素合成的关键酶.它具有单酚酶活性,可以将酪氨酸羟化形成 L-多巴(L-DOPA),也具有二酚酶活力,将 L-多巴氧化成多巴醌^[1].酪氨酸酶的异常表达引起了各种各样的皮肤病,如老年斑及光照损伤等,它还与人脑中的神经黑色素形成及神经退行性病变相关的帕金森病有关^[2],也与果蔬的褐变有关.因此,酪氨酸酶的抑制剂研究目前在国内外已引起了重视,该研究领域十分活跃.酪氨酸酶抑制剂目前已应用作为皮肤色素障碍性疾病的辅助治疗^[3]、化妆品美白添加剂^[4-5]、果蔬的保鲜剂^[6]、生物杀虫剂^[7].作者在筛选酪氨酸酶抑制剂过程中,发现 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶有较强的抑制作用.4-氨基苯甲酸无毒性作用,主要用于染料和医药中间体,生产活性红 M-80, M-10B, 活性红紫 X-2R 等染料以及制取氨基苯甲酸生产药物对羧基苯胺.此外 4-氨基苯甲酸亦用作防晒剂,本文报道了 4-氨基苯甲酸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,批号:

124K7038,比活力为 6 680 U/mg;二甲亚砜(DMSO)为 Sigma 化学公司产品;L-酪氨酸(L-Tyr)和 L-3,4-二羟基苯氨酸(L-DOPA)为 Aldrich 化学公司产品;4-氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid)购于中国药品生物制品检定所;其它试剂为国产分析纯.

1.2 方法

单酚酶活力测定参考文献[8].

4-氨基苯甲酸对酶活力的影响以及抑制作用类型的判断参考文献[9].

2 实验结果

2.1 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力影响

以 4-氨基苯甲酸为效应物,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).结果表明,随着 4-氨基苯甲酸浓度的增大,恒定态斜率下降,迟滞时间则延长,说明 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶活性有显著的抑制作用.另外,随着 4-氨基苯甲酸的浓度增大,酶稳定态活力呈直线下降(图 1(b)),测定 IC_{50} 为 0.35 mmol/L,而酶反应的迟滞时间成直线增大(图 1(c)).在没有加入 4-氨基苯甲酸时,酶反应的迟滞时间为 30.5 s,当 4-氨基苯甲酸浓度为 1.0 mmol/L 时,迟滞时间增大到 155.1 s,迟滞时间增加了 4.4 倍.以上结果表明,4-氨基苯甲酸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 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

收稿日期: 2008-08-01

基金项目: 国家科技支撑计划专项(2007BAD07B06),福建省自然科学基金(2007N0051),化学生物学福建省重点实验室开放课题资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

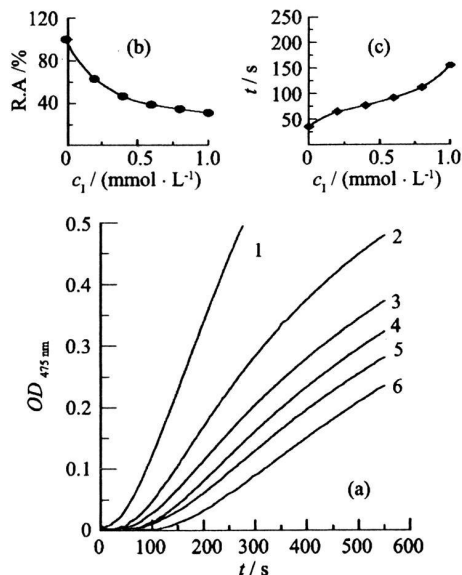


图 1 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶效应

Fig. 1 Effect of 4-aminobenzoic acid on monophenolase activity of mushroom tyrosinase

(a) The concentrations of 4-aminobenzoic acid for curves 1~ 6 were 0, 0. 2, 0. 4, 0. 6, 0. 8 and 1. 0 mmol/L, respectively; (b) The dependence of the steady-state rate; (c) The dependence of the lag time

以 L-DOPA 为底物, 测定蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活性, 4-氨基苯甲酸对二酚酶活力的浓度效应分析结果见图 2, 测定其 IC_{50} 为 0. 30 mmol/L. 并且其对酶的抑制作用属于可逆过程, 说明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 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶抑制类型及抑制常数的测定

以 4-氨基苯甲酸为抑制剂, 测定其对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型, 结果见图 3 (a). 随着 4-氨基苯甲酸浓度的改变其直线的斜率和截距也相应改变, 但相交于第二象限, 表明以 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理为混合-iv型, 说明 4-氨基苯甲酸不仅能与游离酶 (E) 结合, 而且与酶-底物络合物 (ES) 结合. 同时通过作图 (图 3 (b)) 可以求得底物对游离酶 (E) 抑制常数 K_I 为 0. 259 mmol/L, 底物对酶-底物络合物 (ES) 抑制常数 K_{IS} 为 1. 46 mmol/L (图 3 (c)).

3 讨论

酪氨酸酶具有单酚加羟酶活性和二酚加氧酶活性^[6]. 在催化作用过程中酶的存在形式有 3 种: 还原型 (E_{met}), 氧化型 (E_{oxy}) 和脱氧型 (E_{deoxy}). E_{oxy} 型酶具有单

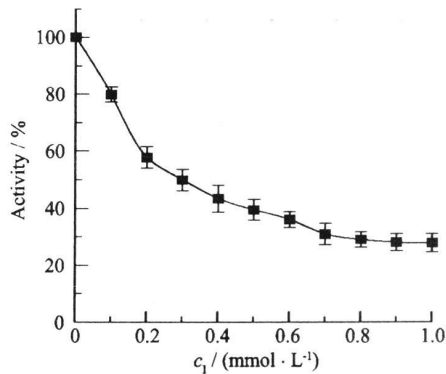


图 2 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶活力的影响

Fig. 2 Effect of 4-aminobenzoic acid on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

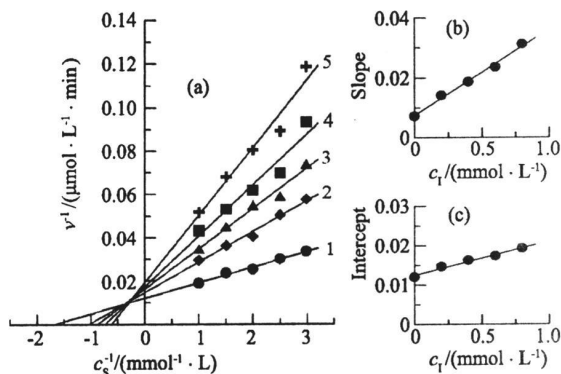


图 3 4-氨基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制类型和抑制常数的测定

Fig. 3 Determination of the inhibitory type and inhibition constants of 4-aminobenzoic acid on the diphenolase

(a) Lineweaver-Burk plots. The concentrations of 4-aminobenzoic acid for curves 1~ 5 were 0, 0. 2, 0. 4, 0. 6 and 0. 8 mmol/L, respectively; (b) and (c) represent the plot of slope and intercept versus the concentration of 4-aminobenzoic acid, respectively

酚加羟酶活性和二酚氧化酶活性; 而 E_{met} 仅有二酚氧化酶活性, 不具有单酚酶活性, E_{met} 与单酚结合形成失去活性的复合物, 使酶催化进入死循环, 因此, 酪氨酸酶催化单酚酶具有迟滞时间; E_{deoxy} 型的酶能够结合氧分子^[10]. 对于酪氨酸酶活力的调控, 抑制该酶活力, 可以从单酚酶的迟滞时间延长和稳定态活力的变化来考虑, 也可以从对二酚酶的活力来判断. 对单酚酶和二酚酶均有抑制作用的抑制剂可以用于减少黑褐色素的生成、促进皮肤美白. 而仅对二酚酶有抑制作用, 对单酚酶没有抑制作用抑制剂可以应用于作为治疗因多巴缺

乏而引起的帕金森综合症的辅助药物. 本文的实验结果显示, 4-氨基苯甲酸对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力均有抑制作用, 其抑制效应表现为可逆抑制机理. 4-氨基苯甲酸可以与酶分子可逆结合而导致酶活力受抑制. 4-氨基苯甲酸主要用于染料和医药中间体, 生产活性红 M-80, M-10B, 活性红紫 X-2R 等染料以及制取靛基苯甲酸生产药物对羧基苄胺. 此外 4-氨基苯甲酸亦用作防晒剂, 但目前其用作化妆品增白剂尚未见报导. 4-氨基苯甲酸与现有化妆品增白添加剂熊果苷比较, 4-氨基苯甲酸对酪氨酸酶二酚酶的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.35 mmol/L, 远低于熊果苷半抑制浓度 (IC_{50}) 为 5.30 mmol/L^[11]. 本文从理论上阐明了 4-氨基苯甲酸可高效抑制酪氨酸酶活性的机理, 为以 4-氨基苯甲酸为增白剂的特效化妆品开发提供了理论依据. 4-氨基苯甲酸产品便宜易得, 在作为防晒剂的同时又可通过抑制酪氨酸酶活力而达到增白效果, 因此用其作为美白添加剂可同时具有美白和防晒作用, 具有广阔的应用前景和较高的经济效益.

参考文献:

[1] Robb D A, Lontie R (Ed). Copper protein and copper enzyme[M]. FL: CRC Press Boca Raton, 1984: 207-241.
 [2] Xu Y, Stokes A H, Freeman W M, et al. Tyrosine mRNA is expressed in human substantia nigra[J]. Mol Brain Res, 1997, 45: 159-162.

[3] Palumbo A D, Ischia M, Misuraco G, et al. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone[J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1073: 85-90.
 [4] Maeda K, Fukuda M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes[J]. J Soc Cosmet Chem, 1991, 42: 361-368.
 [5] Ohyama Y, Mishima Y. Melanogenesis inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism[J]. Fragrance J, 1990, 6: 53.
 [6] 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.
 [7] 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.
 [8] 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.
 [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] Xie L P, Chen Q X, Huang H, et al. Inhibitory effects of cupferron on the monophenolase and diphenolase activity of mushroom tyrosinase[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35: 1658-1666.
 [11] 宋康康, 邱凌, 黄璜, 等. 熊果苷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 4-Aminobenzoic Acid on Mushroom Tyrosinase

QIU Ling¹, ZHUANG Jiang-xing¹, LIU Feng-jiao¹, YANG Ma-hua¹,
 ZHOU Jing-jing¹, LI Zhong¹, CHEN Qing-xi^{1,2*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University;

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

Abstract: Tyrosinase (EC 1.14.18.1) catalyzes both the hydroxylation of tyrosinase into σ -diphenols and the oxidation of σ -diphenols into σ -quinones that form brown or black pigments. In the present paper, the effects of 4-aminobenzoic acid on the activity of mushroom tyrosinase were studied. The results showed that 4-aminobenzoic acid could inhibit both monophenolase activity and diphenolase activity of the enzyme. For the monophenolase activity, 4-aminobenzoic acid lengthened the lag time and decreased the steady-state activity. With increasing inhibitor concentration, the lag time changed from 30.5 seconds in its absence to 155.1 seconds in the presence of 1.0 mmol/L and the IC_{50} value was estimated to be 0.35 mmol/L. For the diphenolase activity, the kinetic analysis showed that the inhibition of 4-aminobenzoic acid on the diphenolase activity of the enzyme was reversible and belonged to mix-type, and the inhibition constants (K_1 and K_{is}) were determined to be 0.259 and 1.46 mmol/L, respectively. The IC_{50} value was estimated to be 0.30 mmol/L. This research may offer some references for designing and synthesizing some novel and effective tyrosinase inhibitors. Furthermore, it may improve the use of 4-aminobenzoic acid on the field of depigmentation.

Key words: tyrosinase; monophenolase activity; diphenolase activity; 4-aminobenzoic acid; inhibition mechanism