

维生素 B₁ 对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究

陈桂霞, 胡泳华, 王伟*, 邱凌, 宋康康, 陈清西**

(厦门大学 生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 报道了维生素 B₁ 对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力的影响以及抑制作用机理. 研究结果表明, 维生素 B₁ (Vit B₁) 对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活性均有抑制作用. 测定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 15 和 20 mmol/L. Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶的迟滞时间有明显的延长效应, 21 mmol/L Vit B₁ 使得单酚酶的迟滞时间从 52 s 延长到 277 s. Vit B₁ 对二酚酶的抑制作用表现为竞争性抑制类型, 测定抑制常数 (K_i) 为 11.7 mmol/L.

关键词: 酪氨酸酶; 单酚酶活性; 二酚酶活性; 维生素 B₁; 抑制机理

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)04-0558-03

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1) 是生物体合成黑色素等色素的关键酶^[1,2], 抑制其活力即可抑制黑色素的生成, 具有重要的应用前景. 我们在研究该酶抑制剂过程中发现, 维生素 B₁(Vit B₁) 对该酶的单酚酶活性与二酚酶活性均有明显的抑制作用. Vit B₁ 即硫胺素是参与体内糖及能量代谢的重要维生素, 具有抗氧化作用, 除了保护心、肝、肾外, 还有减轻色素沉着的增白作用^[3]. 其缺乏可导致消化、神经和心血管诸系统的功能紊乱. 关于 Vit B₁ 在抗酪氨酸酶活性方面, 国内外尚未有报告, 我们实验中发现 Vit B₁ 具有新的生物学功能. 本文报道了 Vit B₁ 对酪氨酸酶抑制效应及其作用机理, 提出了抑制剂和酶分子间结合作用的分子模型, 为酪氨酸酶抑制剂的设计和预防皮肤褐变的分子机理提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

Vit B₁ 和二甲亚砜(DMSO) 为 Sigma 化学公司产品; *L*-多巴 (*L*-DOPA) 和 *L*-酪氨酸 (*L*-Tyr) 为 Aldrich 化学公司产品; 蘑菇酪氨酸酶购于 Sigma 化学公司, 酶的比活力为 6 680 U/mg.

收稿日期: 2009-12-06

基金项目: 国家自然科学基金(30570408); 滨海湿地生态系统教育部重点实验室(厦门大学) 开放基金; 福建省重点科技项目(2007N0051)

* 现工作单位: 漳州师范学院生物科学与技术系

** 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

1.2 方法

蘑菇酪氨酸酶的活力测定参考文献[4], 单酚酶活力测定以 2.0 mmol/L *L*-酪氨酸为底物, 二酚酶活力测定是以 0.5 mmol/L *L*-DOPA 为底物, 酶的终质量浓度为 6.67 μg/mL. 测定仪器为 UV-650 分光光度计, 在 30 °C 恒温下, 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 L/(mol·cm) 计算.

Vit B₁ 对酶活力的效应通过测定加入不同浓度的效应物后酶的剩余活力来判断, 对照组加入 3.33% (体积比) DMSO 以排除 DMSO 对实验结果的影响. Vit B₁ 对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. 酶的抑制作用类型采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 通过比较酶催化反应的动力学参数 K_m 和 V_m 的变化进行判断^[5].

2 实验结果

2.1 Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响

以 Vit B₁ 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进程曲线(图 1). 反应初始时, 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, 说明反应已达到稳定态. 直线部分外推得到横轴的截距为迟滞时间^[6]. 结果表明, 随着 Vit B₁ 的浓度增大, 单酚酶稳定态活力下降, 迟滞时间则明显延长, 说明 Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶活性有显著的抑制作用. 分别以酶稳定态

活力和迟滞时间对 Vit B₁ 浓度作图, 结果见图 2. 随着 Vit B₁ 的浓度增大, 酶稳定态活力呈指数下降(图 2 线 1), 测定导致酶稳定态活力下降至 50% 时的抑制剂浓度 (IC₅₀) 为 15 mmol/L. 而随着 Vit B₁ 浓度的增大, 酶反应的迟滞时间指数增大(图 2 线 2). 当 Vit B₁ 浓度为 21 mmol/L 时, 迟滞时间由 52 s 增大到 277 s. 说明 Vit B₁ 通过降低酶的稳定态活力和延长迟滞时间而抑制酪氨酸酶单酚酶的活力.

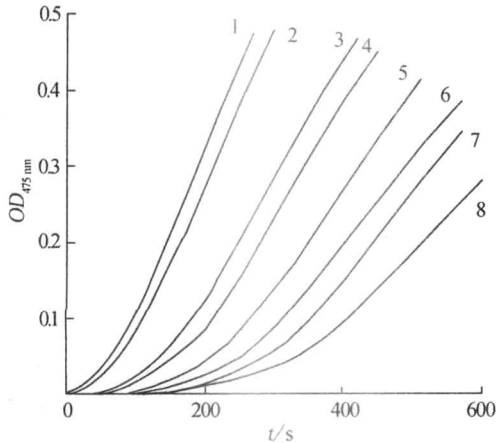


图 1 Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶作用的浓度效应
曲线 1~ 8 Vit B₁ 为 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 mmol/L
Fig. 1 Progress curves for the inhibition of monophenolase of mushroom tyrosinase by Vit B₁

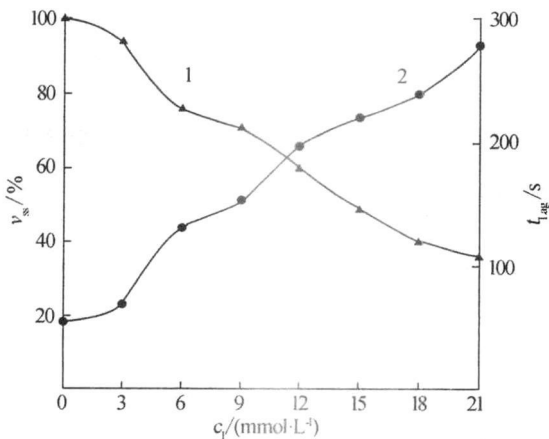


图 2 Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶的稳定态(1)和迟滞时间(2)的影响
Fig. 2 Effects of Vit B₁ on the steady state activity (1) and the lag time (2) of monophenolase of mushroom tyrosinase

2.2 Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

以 L-DOPA 为底物, 测定二酚酶活力, 酶反应的进程曲线为一条通过原点的直线, 直线的斜率即为酶活力. 在反应体系中加入 Vit B₁ 后, 直线的斜率下降,

说明 Vit B₁ 对二酚酶活力也有抑制作用, 其对二酚酶活力的浓度效应如图 3 所示, 测定导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度(IC₅₀)为 20 mmol/L.

2.3 Vit B₁ 对二酚酶的抑制动力学研究

在固定底物浓度的测活体系中, 改变酶量, 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 Vit B₁ 作用后的酶活力对酶量作图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. 说明 Vit B₁ 对酶的抑制作用属于可逆过程, 即抑制剂是通过抑制酶活力, 降低酶催化效率, 而非通过导致有效的酶量减少而导致酪氨酸酶二酚酶活力的下降.

在测活体系中固定酶量不变, 改变底物 L-DOPA 的浓度, 研究 Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用类型. 采用以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 得到一组相交于纵轴的直线(图 4a). 说明 Vit B₁ 不影响酶促反应的最大反应速度 V_m 值, 只影响酶促反应的米氏

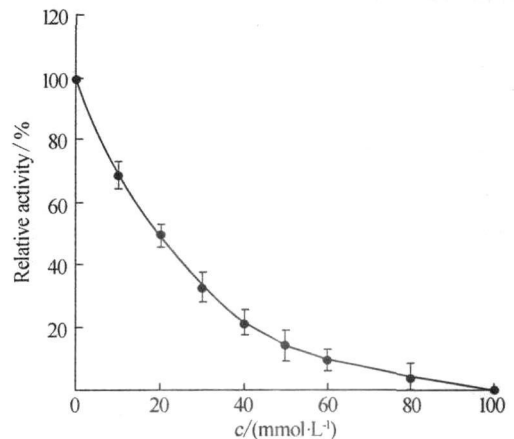


图 3 Vit B₁ 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制效应
Fig. 3 Inhibitory effects of Vit B₁ on the diphenolase activity of mushroom

常数(K_m), 使 K_m 值增大, 其抑制效应为竞争型抑制类型, Vit B₁ 同底物竞争地与游离酶(E) 结合. 二次作图(图 4b), 求得抑制常数 K_i 为 11.7 mmol/L.

3 讨论

酪氨酸酶能够催化单酚产生邻位二酚(单酚酶活性), 邻位二酚进一步氧化成为相应的醌(二酚酶活力), 进而生成一系列引起褐化的色素类物质^[6]. 因此, 对酪氨酸酶活力的抑制, 既可以通过单酚酶的迟滞时间延长和稳定态活力的降低, 也可以通过二酚酶的活力的抑制来实现. 本文的实验结果显示, Vit B₁ 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, Vit B₁ 可以可逆地和底物竞争与游离酶的结合, 抑制类型表现为竞争型.

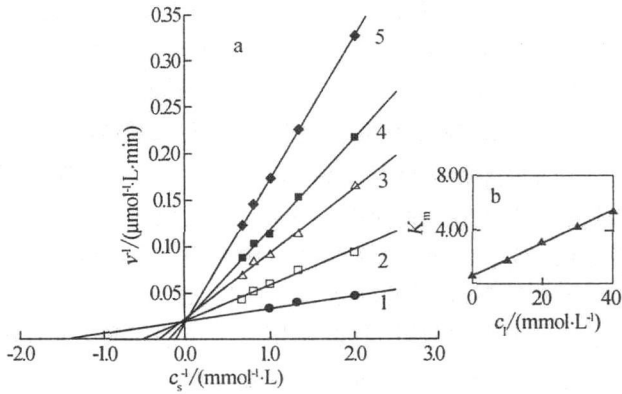


图4 Vit B₁ 对酪氨酸酶二酚酶抑制类型的判断
曲线 1~ 5 对应抑制剂浓度分别为 0, 10, 20, 30, 40 mmol/L

Fig. 4 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of Vit B₁ on the diphenolase activity

Vit B₁ 是人体必需的维生素之一。在体内, Vit B₁ 以辅酶形式参与糖的分解代谢, 有保护神经系统的作用, 还与保持神经传导心血管、消化等系统和皮肤的正常功能有关。Vit B₁ 的制剂常用来做为抗脚气病或抗神经炎症的药物使用, 本文的研究结果显示, Vit B₁ 还对酪氨酸酶有一定的抑制作用, 尽管其抑制效果较目前常用的美白添加剂熊果甙^[7] ($IC_{50} = 5.3 \text{ mmol/L}$) 与曲酸^[8] ($IC_{50} = 0.02 \text{ μmol/L}$) 相比较弱, 但由于 Vit B₁ 可以在体内正常代谢, 因此与熊果甙和曲酸相比, 使用更

为安全。本文从理论上阐述了 Vit B₁ 减轻色素沉积的机理, 对 Vit B₁ 作为美白药物的应用提供了理论基础。

参考文献:

[1] 陈清西, 宋康康. 酪氨酸酶研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(5): 731-737.
 [2] 陈桂霞, 邱凌, 宋康康, 等. 桑黄素对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(3): 424-427.
 [3] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1991: 317-318.
 [4] Zhuang J X, Li W G, Qiu L, et al. Inhibitory effects of cefazolin and cefodizime on the activity of mushroom tyrosinase[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2009, 24: 251-256.
 [5] Chen Q X, Song K K, Qiu L, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids[J]. Food Chem, 2005, 91: 269-274.
 [6] Zhu Y J, Song K K, Li Z C, et al. Antityrosinase and antimicrobial activities of trans cinnamaldehyde thiosemicarbazone[J]. J Agri Food Chem, 2009, 57: 5518-5523.
 [7] 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.
 [8] 黄璜, 宋康康, 陈清西. 曲酸作为化妆品添加剂的增白机理研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(5): 652-656.

Inhibitory Kinetics and Mechanism of Vitamin B₁ on the Activities of Mushroom Tyrosinase

CHEN Guǎxia, HU Yonghua, WANG Wei*, QIU Ling,
 SONG Kangkang, CHEN Qingxi**

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems,
 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005 China)

Abstract: In this study, the inhibitory mechanism of vitamin B₁ on the monophenolase and diphenolase activity of mushroom tyrosinase was investigated. Results showed that vitamin B₁ could inhibit both monophenolase activity and diphenolase activity of the enzyme, and the concentrations lead to 50% loss of activity were 15 and 20 mmol/L, respectively. For the monophenolase activity, vitamin B₁ lengthened the lag time and decreased the steady-state activity. With increasing inhibitor concentration, the lag time changed from 52 seconds in its absence to 277 seconds in the presence of 21 mmol/L inhibitor. For the diphenolase activity, the kinetic analysis showed that the inhibition of vitamin B₁ on the diphenolase activity of the enzyme was reversible and belonged to competitive type, and the inhibition constants (K_I) were determined to be 11.7 mmol/L.

Key words: tyrosinase; monophenolase activity; diphenolase activity; vitamin B₁; inhibition mechanism.