

复合抑制剂对酪氨酸酶活性的相互作用研究*

王庆华¹, 黄演婷¹, 舒锦华²

(1. 广东药学院基础学院//广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东 广州 510006;
2. 广州雅纯化妆品制造有限公司, 广东 广州 510425)

摘要: 研究苯甲酸、肉桂酸和曲酸复合使用对酪氨酸酶活性的抑制以及抑制剂间的相互作用。采用酪氨酸酶L-多巴速率氧化法, 观测不同比例的复合抑制剂对酪氨酸酶二酚酶的活性影响, 以研究药物相互作用的等效线分析法和相互作用指数评价复合抑制剂的相互作用效应。结果显示在等效于酶活性抑制50%的条件下, 苯甲酸与曲酸质量比为7.5:1, 相互作用指数为0.42; 肉桂酸与曲酸质量比为3.8:1, 相互作用指数为0.56; 苯甲酸、肉桂酸和曲酸质量比为7.5:3.8:1, 相互作用指数为0.18。说明苯甲酸、肉桂酸和曲酸复合使用对酪氨酸酶二酚酶活性抑制的相互作用主要表现为协同效应, 协同程度与复合抑制剂质量浓度和比例有关。

关键词: 酪氨酸酶; 复合抑制剂; 相互作用; 等效线图

中图分类号: TQ658 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2011)04-0091-05

The Interaction Effects of Combination Inhibitor on Tyrosinase

WANG Qinghua¹, HUANG Yanting¹, SHU Jinhua²

(1. The School of Basic Courses of Guangdong Pharmaceutical University//
Guangdong Key Laboratory of Bioactive Drugs, Guangzhou 510006, China;

2. Grandway International Base Clean Cosmetics Manufacturer, Guangzhou 510425, China)

Abstract: In order to study the inhibitive effects of combination of Benzoic Acid, Cinnamic Acid and Kojic Acid on tyrosinase of mushroom, the effects of combination inhibitor on diphenolase activity were observed by measuring the oxidation rate of L-dopa. Isobolographic plot and interaction index were employed to evaluate the inhibitors synergistic effects. The results show that in 50% inhibitory rate of enzyme activity the interaction index was 0.42 when combined with Benzoic Acid and Kojic Acid at the ratio 7.5:1, the index was 0.56 when combined with Cinnamic Acid and Kojic Acid at the ratio 3.8:1, and the interaction index was 0.18 when combined with Benzoic Acid, Cinnamic Acid and Kojic Acid at the ratio 7.5:3.8:1. Inhibitive effects of the combination of Benzoic Acid, Cinnamic Acid and Kojic Acid mainly produce synergism, the mixture concentration and mixing ratio have a great influence on the synergistic effects.

Key words: tyrosinase; combination inhibitor; interaction; isobolographic plot

皮肤的颜色深浅与表皮细胞黑色素浓度成正比, 而酪氨酸酶在黑色素生成的系列反应中发挥了关键酶的作用。曲酸及其衍生物、熊果苷、氢醌和一些植物提取物常作为酪氨酸酶抑制剂用于美白化

妆品^[1-3]。目前对酪氨酸酶活性的抑制机理研究大多集中在单一抑制剂的作用^[4-7], 而且酪氨酸酶抑制剂在实际应用中也多是单独添加到化妆品中, 多种抑制剂复合使用则较为少见。为了追求最佳的酪

* 收稿日期: 2010-11-17

基金项目: 广东省科技计划工业攻关资助项目(2008B011000002)

作者简介: 王庆华(1969年生), 男, 副教授; E-mail: wqhwj@163.com

氨酸酶活性抑制效果, 研发人员开始尝试在化妆品中同时添加多种抑制剂成分。但多种抑制剂间的相互作用不一定是所期望的协同效应, 也可能是拮抗或互不影响的简单相加效应。此外, 在酪氨酸酶抑制剂与其它化妆品配方成分之间, 如防腐剂、抗氧化剂、乳化剂等, 对酪氨酸酶的抑制亦有可能产生相互影响, 如何评价这些物质之间的相互作用是产品开发人员所必须考虑的问题。曲酸是目前美白化妆品中常用酪氨酸酶抑制剂型的美白成分; 苯甲酸、肉桂酸具有防腐抗菌作用, 而且两者对酪氨酸酶抑制作用动力学研究已较为清晰, 是潜在的化妆品添加剂成分^[5-7]。作者采用近年来常用的研究药物相互作用的等效线评价方法^[8-11], 研究苯甲酸、肉桂酸和曲酸 3 种抑制剂复合使用时对酪氨酸酶活性的影响, 为今后美白化妆品的研发探索一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

蘑菇酪氨酸酶, 美国 Worthington 公司; L-多巴, 美国 Sigma 公司; 肉桂酸, 曲酸, 苯甲酸均为国产分析纯试剂; 721 分光光度计, 上海第三分析仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 酪氨酸酶活力测定 参见文献 [12], 酪氨酸酶活力以催化 L-多巴生成多巴醌的二酚酶活力衡量。试管中加入 L-多巴 0.4 mL (1.0 mg/mL), pH 6.8 磷酸缓冲液 2.4 mL, 30 °C 水浴保温 10 min 后, 加入酪氨酸酶 0.2 mL (250 U/mL) 混匀, 酶促反应将 L-多巴转化为红色产物多巴醌, 在 475 nm 处有最大吸收。读取从混匀开始 2 min 时在 475 nm 处的吸光度 A , 酶促反应的速度用每分钟 A_{475} 增加值来表示。

试管中加入底物 L-多巴 0.4 mL (1.0 mg/mL), 然后加入不同质量浓度的抑制剂, 抑制剂均以 DMSO 配制, 酪氨酸酶 0.2 mL (250 U/mL), 以磷酸缓冲液补足反应液总体积为 3.0 mL, 测定反应开始 2 min 时的吸光度, 按如下公式计算酶活性抑制率。文中抑制剂的质量浓度均为抑制剂在测试体系中的终质量浓度。

$$\text{酶抑制率} = \left(1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2}\right) \times 100\%$$

式中 A_1 为无抑制剂有底物时的吸光度; A_2 为无抑制剂无底物时的吸光度; A_3 为加抑制剂与底物时的吸光度; A_4 为加抑制剂无底物时的吸光度。

1.2.2 复合抑制剂的相互作用等效线图的绘制

A、B 两种抑制剂复合, 以抑制剂 A 的质量浓度为横坐标, 抑制剂 B 的质量浓度为纵坐标, 连接横坐标上 A 抑制剂和纵坐标上 B 抑制剂单独作用时酶活性抑制 50% 的抑制剂质量浓度 (IC_{50}) 得一直线, 即为两抑制剂具有简单相加性的 IC_{50} 等效线, A、B 单独作用的 IC_{50} 以及 95% 置信限可以通过各自的对数剂量-效应关系的线性回归方程求得。酶活性抑制 30% 和 70% 的等效线则以 IC_{30} 、 IC_{70} 的数据作图。在图上标示出实验测得的各复合抑制剂的 IC_{50} (IC_{30} 、 IC_{70}) 坐标点 (横坐标为复合物中 A 的质量浓度, 纵坐标为 B 的质量浓度), 根据各点坐标与等效线的位置关系可判断两种抑制剂相互作用的效果。若复合物等效应的坐标点在等效线置信区间内, 表示两抑制剂的抑制效果为相加; 在置信区间下方, 则为协同效应; 在上方则为拮抗效应。3 种抑制剂复合的等效线图是三维图形, 3 条坐标轴分别对应 3 种抑制剂的质量浓度, 等效线图形则为一平面, 作图方法与两种抑制剂的等效线图类似。

1.2.3 复合抑制剂相互作用的评价 A、B、C 3 种抑制剂复合相互作用的效应, 可以用相互作用指数 γ 来评价。 $\gamma = IC_a/IC_A + IC_b/IC_B + IC_c/IC_C$ (若为两种抑制剂复合, 则公式中只有其中两项相加), IC_A 、 IC_B 、 IC_C 分别代表 3 种抑制剂单独作用产生某一抑制率时的质量浓度, IC_a 、 IC_b 、 IC_c 分别表示复合时与单独作用产生同一抑制率 (等效线) 时的复合物中各自的质量浓度。 $\gamma = 1$, 表示相互各抑制剂独立作用的简单相加效应; $\gamma < 1$ 为相互协同效应, γ 值越小, 协同效应越强; $\gamma > 1$ 为相互拮抗效应, γ 值越大, 拮抗效应越大。

1.2.4 抑制剂复合比例的选取 曲酸、苯甲酸、肉桂酸分别取不同剂量, 测出各自的酪氨酸酶二酚酶抑制率, 由对数质量浓度-抑制率图求得单一抑制剂的 IC_{50} , 以各抑制剂的 IC_{50} 的比值为基准作适当的倍数调整, 从而确定一系列的复合比例, 测定该比例的苯甲酸与曲酸、肉桂酸与曲酸以及这 3 种抑制剂同时复合的酶活性抑制率。

2 结果与讨论

2.1 肉桂酸、曲酸、苯甲酸单独作用对酪氨酸酶活性的抑制

肉桂酸、曲酸、苯甲酸单独作用时对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制作用呈对数剂量依赖关系, 其对数剂量-抑制效应线性回归曲线如图 1 所示。曲酸的 IC_{30} 、 IC_{50} 、 IC_{70} 值分别为 4.97、11.6、27.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对数量效回归方程: $i/\% = 53.4\text{Log}i - 6.98$, R

=0.993 2; 苯甲酸的 IC₃₀、IC₅₀、IC₇₀ 值分别为 11.5、42.7、158 μg/mL, 对数量效回归方程: $i/\% = 34.5 \text{ Log}p - 5.89$, 相关系数 $R = 0.989 0$; 肉桂酸的 IC₃₀、IC₅₀、IC₇₀ 值分别为 21.8、87.0、350 μg/mL, 对数量效回归方程: $i/\% = 32.9 \text{ Log}p - 13.9$, $R = 0.995 4$ 。三者中以曲酸的抑制作用最强, 其次为苯甲酸, 肉桂酸最弱。

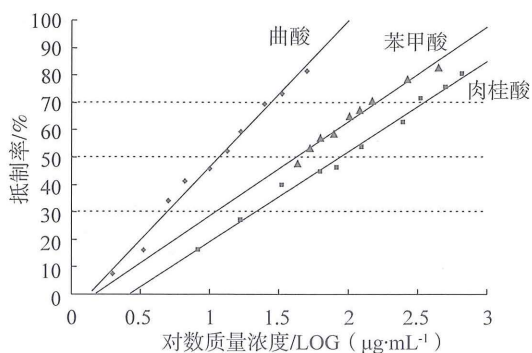


图 1 各抑制剂单独作用的量效关系图

Fig. 1 Dose-response curves for inhibitors to tyrosinase activity

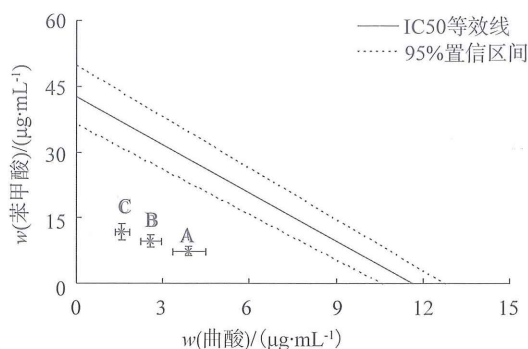


图 2 苯甲酸、曲酸复合的 IC₅₀ 等效线图

Fig. 2 IC₅₀ isobolographic plot of benzoic acid and kojic acid (苯甲酸与曲酸质量比: A. 1.9:1; B. 3.8:1; C. 7.5:1)

2.2 苯甲酸和曲酸复合对酪氨酸酶活性的抑制作用

由苯甲酸、曲酸单独作用得到的 IC₅₀ 值, 定出苯甲酸、曲酸质量比为 3.8:1, 分别取此比值的 0.5、1.0、2.0 倍, 得到苯甲酸、曲酸质量比为 1.9:1; 3.8:1; 7.5:1 的 3 种复合比例, 测定这 3 种比例的苯甲酸和曲酸复合物对酪氨酸酶活性的抑制作用, 作酶活性抑制 50% 的等效线图。表 1 结果显示 3 种比例的复合抑制剂对酪氨酸酶二酚酶的抑制均有显著的对数剂量-抑制效应线性关系, 图 2 等效线图中显示 3 种比例的复合抑制剂的坐标点均位于远离等效区间的下方, 说明此条件下对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用表现为较强的且具有统计学

意义的相互协同效应。3 种比例的复合抑制剂相互作用系数 $\gamma_{1.9:1} = 0.51$; $\gamma_{3.8:1} = 0.45$; $\gamma_{7.5:1} = 0.42$, 可见协同效应的强度与苯甲酸和曲酸的比例相关, 实验条件下苯甲酸与曲酸按质量比为 7.5:1 复合时的协同效应最强。

表 1 苯甲酸和曲酸复合对酪氨酸酶活性抑制 IC₅₀
Table 1 IC₅₀ of benzoic acid and kojic acid

m (苯甲酸) : m (曲酸)	回归方程	相关 系数 R	w (复合 IC ₅₀) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1.9:1	$i/\% = 41.0 \text{ Log}p + 7.27$	0.990 3	11.1
3.8:1	$i/\% = 33.6 \text{ Log}p + 13.5$	0.992 0	12.2
7.5:1	$i/\% = 21.2 \text{ Log}p + 26.2$	0.991 7	13.3

2.3 肉桂酸和曲酸复合对酪氨酸酶活性的抑制作用

肉桂酸和曲酸复合对酪氨酸酶活性的抑制作用见表 2。由肉桂酸、曲酸单独作用求得的 IC₅₀, 确定酶活性抑制 50% 的肉桂酸和曲酸质量比为 7.5:1, 按此比值的 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、6.0 倍, 确定肉桂酸、曲酸质量比为 3.8:1、7.5:1、10.8:1、15:1、22.5:1、45:1 共六种比例进行复合。六种混合物的抑制对数量效关系直线回归方程见表 2, 结果显示六种比例的复合抑制剂对酪氨酸酶二酚酶的抑制均有显著的对数剂量-抑制效应线性关系, 由对数回归直线方程可求得不同比例的复合抑制剂中肉桂酸和曲酸复合的 IC₃₀、IC₅₀、IC₇₀ 值。

肉桂酸、曲酸复合作用的等效线见图 3, 图 3b、图 3c 显示实验中所采用六种比例的复合抑制剂在 IC₅₀、IC₇₀ 等效线图上的坐标点均位于等效线下方, 说明此条件下对酪氨酸酶二酚酶的抑制表现为较强的且具有统计学意义的相互协同效应。而在图 3a 的 IC₃₀ 等效线图中, C、D、E、F 四点落在等效线的置信区间内, 显示此条件下该 4 种比例的肉桂酸和曲酸复合为简单相加效应。

上述不同比例复合的抑制剂, 由酶活性抑制 30%、50% 和 70% 得出的 γ 值并不相同。表 3 显示同一比例下 IC₃₀ 的 γ 值均较 IC₅₀、IC₇₀ 要大, 说明使酶活性抑制 30% 时复合抑制剂的协同效应比酶活性抑制 50% 和 70% 时要弱, 其中 10.8:1、15:1、22.5:1、45:1 四种比例复合的为简单相加效应, 此结果可能与复合抑制剂的质量浓度有密切关系, 因为抑制酶活性 30% 所需的复合抑制剂质量浓度较低, 低质量浓度条件下两种抑制剂可能互不影响, 各自独立对酪氨酸酶发挥抑制作用, 总体抑制效应表现为简单相加, 随着抑制剂质量浓度增大, 相互间的影响逐渐显著, 协同效应逐渐明显。

以酶活性抑制 30% 和 50% 的等效评价, 肉桂酸与曲酸按 3.8:1 配比时协同效应最强; 而以酶活性抑制 70% 的等效评价, 肉桂酸与曲酸按 22.5:1

配比时协同效应最强。可见协同的程度不仅与复合物中两组分的比例、复合抑制剂的质量浓度有关, 还与评价的角度有关。

表 2 肉桂酸和曲酸复合对酪氨酸酶活性抑制的 IC₃₀、IC₅₀、IC₇₀
Table 2 IC₃₀, IC₅₀, IC₇₀ of cinnamic acid and kojic acid

m (肉桂酸) : m (曲酸)	回归方程	相关系数 R	w (复合 IC ₃₀)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	w (复合 IC ₅₀)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	w (复合 IC ₇₀)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
3.8:1	$i/\% = 44.7 \text{Log}p - 8.90$	0.996 1	7.42	20.8	58.3
7.5:1	$i/\% = 41.6 \text{Log}p - 10.1$	0.991 1	9.19	27.8	84.3
10.8:1	$i/\% = 41.5 \text{Log}p - 16.8$	0.992 5	13.5	40.9	124
15:1	$i/\% = 48.7 \text{Log}p - 28.1$	0.993 8	15.6	40.3	104
22.5:1	$i/\% = 49.1 \text{Log}p - 30.7$	0.988 7	17.3	44.2	113
45:1	$i/\% = 47.3 \text{Log}p - 31.9$	0.990 0	20.4	54.1	143

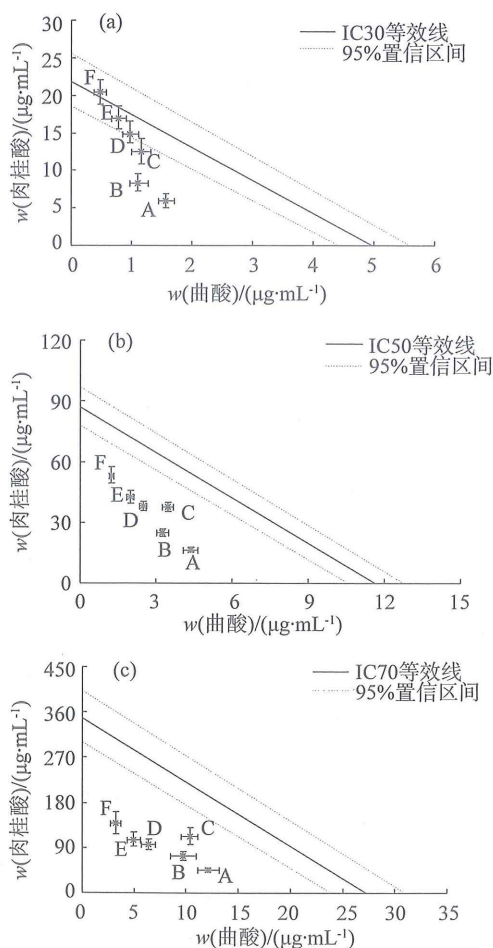


图 3 肉桂酸和曲酸复合作用的 IC₃₀ (a)、IC₅₀ (b) 和 IC₇₀ (c) 等效线图

Fig. 3 IC₃₀ (a)、IC₅₀ (b) and IC₇₀ (c) isobolographic plot of cinnamic acid and kojic acid

(肉桂酸与曲酸质量比: A. 3.8:1; B. 7.5:1; C. 10.8:1; D. 15:1; E. 22.5:1; F. 45:1)

表 3 肉桂酸和曲酸复合的相互作用指数

Table 3 The interaction index of cinnamic acid and kojic acid

m (肉桂酸) : m (曲酸)	γ_{30}	γ_{50}	γ_{70}
3.8:1	0.59	0.56	0.58
7.5:1	0.60	0.56	0.57
10.8:1	0.81 *	0.73	0.70
15:1	0.88 *	0.65	0.51
22.5:1	0.94 *	0.66	0.49
45:1	1.03 *	0.72	0.51

* 表示该复合比例的两组抑制剂为简单相加效应

2.4 肉桂酸、苯甲酸和曲酸 3 种抑制剂复合对酪氨酸酶活性的抑制作用

肉桂酸、苯甲酸、曲酸以质量比 7.5:3.8:1 复合, 复合抑制剂酶活性抑制 50% 的对数量效曲线方程为 $i/\% = 31.1 \text{Log}p + 23.0$, $R=0.990 0$, 复合 IC₅₀ 为 8.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由 3 种抑制剂单独作用的 IC₅₀ 作三维等效线图。图中 3 条坐标轴对应 3 种抑制剂的质量浓度, 中间的三角平面为相加效应的等效面, 上下两侧的三角平面所夹区域为等效区间, 靠近一角的坐标点为 3 抑制剂复合的等效质量浓度坐标点。三维视图显示复合抑制剂的 IC₅₀ 坐标点不在等效面区间内, 远低于等效面, 表明 3 种抑制剂的复合使用所产生的协同效应很明显。上述比例的复合抑制剂相互作用指数 γ 值为 0.18, 远小于 1, 也较前述两种抑制剂复合作用在酶活性抑制 50% 的 γ 值要小很多, 说明这 3 种抑制剂复合产生的协同效应比其中两种复合的协同效应更为显著。

从化学性质分析, 肉桂酸、苯甲酸和曲酸混合时不发生化学反应, 不会影响彼此的质量浓度。酪氨酸酶是一种含铜的金属酶, Cu^{2+} 参与构成酪氨

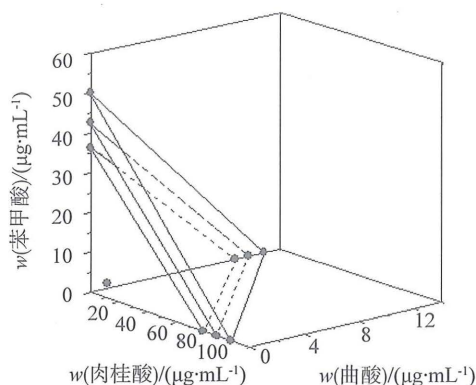


图4 肉桂酸、苯甲酸和曲酸复合的 IC_{50} 三维等效线图

Fig. 4 Isobolographic plot of cinnamic benzoic acid, acid and kojic acid

酪氨酸酶催化反应的活性中心。肉桂酸(苯丙烯酸)、苯甲酸的结构较为相似,均以羧基与铜原子形成复合物,是酪氨酸酶的非竞争性抑制剂;曲酸(5-羟基-2-羟甲基-1,4-吡喃酮)通过5位羟基和4位酮基与 Cu^{2+} 络合,是酪氨酸酶的混合型抑制剂^[5-7],由此可知3种抑制剂均是酪氨酸酶活性中心以外的部位结合。若这3种抑制剂都结合于酪氨酸酶活性中心外的同一部位,则它们之间存在“竞争”关系,共同存在时酪氨酸酶只能与其中一种抑制剂结合,抑制剂间发生协同作用的可能性较小。因此推测肉桂酸和曲酸或苯甲酸和曲酸可能结合于酪氨酸酶活性中心外的不同部位,其中一种抑制剂与酶结合以后,使酶的构象改变,导致其它抑制剂与酶的作用受到影响;或者多种抑制剂同时结合酶分子,共同影响酶的催化效应,从而表现出相互协同的效应。

3 结论

肉桂酸、苯甲酸、曲酸均是酪氨酸酶的抑制剂。苯甲酸和曲酸复合,对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制表现为明显相互协同效应,协同效应的程度与复合比例相关。肉桂酸和曲酸复合,在复合物质量浓度较低时,对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制多表现为各自独立的抑制作用,倾向于简单相加效应;随着复合抑制剂质量浓度增加,抑制率加大,呈现明显的协同效应,而且协同效应的大小与两组分的比例、质量浓度有关。苯甲酸、肉桂酸和曲酸3种抑制剂复合,表现出非常显著的协同效应,协同的程度比两种抑制剂复合的协同程度更强。苯甲酸、肉桂酸和曲酸协同效应的机制,需进一步研究探讨。

本研究提示:酪氨酸酶抑制剂的复合使用,有可能产生协同效应,达到同等抑制效果时所需抑制剂总量比抑制剂单独作用时要少,这为研发高性价比的美白化妆品提供了一条新思路。

参考文献:

- [1] 仲少敏,赵俊郁,朱学骏,等. Tri-Luma、曲酸和熊果苷对人体黑化模型的脱色效果分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2007, 21(6):321-323.
- [2] 宋琦如,金锡鹏,沈光祖. 几种皮肤美白剂的功效评价[J]. 日用化学工业, 2002, 32(2):47-49.
- [3] 焦晶晶,张英. 植物类黄酮作为护肤因子在化妆品领域的研究进展[J]. 精细化工, 2004, 21(增刊):98-102.
- [4] 乔薇,巫晓琴,黎峰,等. 苯甲醛及其类似物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2007, 46(5):41-44.
- [5] 龚盛昭,杨卓如,程江. 肉桂酸抑制酪氨酸酶催化反应的动力学研究[J]. 高校化学工程学报, 2007, 21(2):345-348.
- [6] 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.
- [7] 陆珊,胡源,刘鑫,等. 曲酸对马铃薯酪氨酸酶的抑制作用研究[J]. 化学研究与应用, 2005, 17(6):729-732.
- [8] TALLARIDA R J. Drug synergism: its detection and applications [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 298(3):865-872.
- [9] GESSNER P K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility [J]. Toxicology, 1995, 105(2/3):161-179.
- [10] LUSZCZKI J J, RATNARAJ N, PATSALOS P N, et al. Pharmacodynamic and/or pharmacokinetic characteristics of interactions between loreclezole and four conventional antiepileptic drugs in pentylenetetrazole-induced seizures in mice: an isobolographic analysis [J]. Epilepsy Behav, 2005, 7(4):639-651.
- [11] 宋杨,齐云,刘彬,等. 甘草桔梗皂苷对酪氨酸酶抑制的合并效应研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3):7-9.
- [12] 王庆华,邓志刚,刘山,等. 荔枝壳提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 日用化学工业, 2010, 40(1):31-34.