

苯甲醛及其类似物对酪氨酸酶抑制作用的研究^{*}

乔 薇, 巫晓琴, 黎 峰, 崔 强, 闫素君, 马 林
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 酪氨酸酶是一种金属铜蛋白, 广泛存在于自然界中, 在生物体合成黑色素过程中起着关键作用。分别以多巴和以邻苯二酚作为酪氨酸酶催化底物, 对苯甲醛及其类似物对酪氨酸酶抑制作用机理进行了详细的研究, 并利用 CD (圆二色谱) 研究了苯甲醛类化合物对酪氨酸酶的构象影响, 提出苯甲醛及其同系物与酶分子相互作用的可能机理。

关键词: 酪氨酸酶; 抑制; 苯甲醛; 圆二色谱

中图分类号: TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 05-0041-04

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1) 是一种活性中心具有双铜离子的氧化还原酶, 参与黑色素合成的头两步反应, 是黑色素合成的限速酶^[1]。它广泛存在于微生物、动物和人体, 是生物体合成黑色素等产生色斑的关键酶。酪氨酸酶是结构复杂的多亚基的含铜氧化还原酶, 它先将酪氨酸羟化, 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物^[2]。近年来, 除对该酶进行结构功能的基础研究外, 由于色素障碍性疾病、恶性黑色素瘤、白化病和老年性痴呆的发生与治疗, 均与酪氨酸酶直接相关, 国内外对该酶的研究主要集中在医药方面^[3-5]。对于该酶抑制剂的研究, 国内研究较少且不够深入, 主要是一些用于皮肤保健和治疗的常规抑制剂的研究^[6-8]。

文献[9]报道, 苯甲醛类化合物对酪氨酸酶的抑制作用是通过与酶分子中氨基酸侧链的氨基反应, 形成席夫碱而导致酶催化活性降低。如果以上结论成立, 底物 *L*-DOPA 分子中也含有一个氨基, 那么, 苯甲醛应该先与底物 *L*-DOPA 发生反应。由于酪氨酸酶也可以催化邻苯二酚发生反应, 并且邻苯二酚分子中不含有氨基, 为了证明以上观点, 本论文分别以多巴和邻苯二酚作为酪氨酸酶催化底物, 对苯甲醛及其类似物对酪氨酸酶抑制作用机理进行了详细的研究, 并利用 CD (圆二色谱) 研究了苯甲醛类化合物对酪氨酸酶的构象影响, 提出苯甲醛及其同系物与酶分子相互作用的可能机理, 为后续酪氨酸酶抑制剂的分子设计及实际应用提供了

理论基础。

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, *L*-3,4-二羟基苯丙氨酸 (*L*-DOPA) 为 Aldrich 化学公司产品。苯甲醛, 对羟基苯甲醛, 对苯二甲醛, 肉桂醛, 乙醇等试剂均为国产分析纯试剂, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水。

1.2 方 法

1.2.1 苯甲醛与 *L*-DOPA 的相互作用的测定 在 1 mL 样品管中, 加入 10 μ L 苯甲醛溶液 (1 mmol/L 无水乙醇配), 50 μ L *L*-DOPA (0.05 mmol/L, 磷酸缓冲溶液配), 940 μ L 磷酸缓冲溶液 (pH = 6.8), 在紫外吸收波长在 220~400 nm 下扫描吸收曲线, 并扣除乙醇的影响。同样方法分别扫描 *L*-DOPA 及苯甲醛的紫外吸收曲线进行对照。

1.2.2 以 *L*-DOPA 为底物的酪氨酸酶活力测定 酪氨酸酶的酶活力测定参考文献[10]: 先加入 50 μ L 含不同浓度的抑制剂 (无水乙醇配) 于 900 μ L 含有 6.67 μ g 酪氨酸酶的磷酸缓冲溶液 (pH = 6.8) 中, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温 15 min, 然后加入 50 μ L *L*-DOPA (0.05 mmol/L) 溶液启动反应, 迅速充分混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温条件下测定波长为 475 nm 的光密度值, 由其随时间的增长直线的斜率计算出酶的活力。所用乙醇浓度均为 3.33%, 并用对照扣除乙醇对本试验的影响。测定仪器为岛

^{*} 收稿日期: 2007-01-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20032020)

作者简介: 乔薇 (1983年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 马林; E-mail: cesma@mail.sysu.edu.cn

津 UV2501分光光度计。

抑制剂对酶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。

1.2.3 以邻苯二酚为底物的酪氨酸酶活力测定
邻苯二酚浓度为 0.05 mmol/L , 测定波长为 490 nm 的光密度值, 由其随时间的增长直线的斜率计算出酶的活力, 其余方法同 1.2.1。

1.2.4 CD (圆二色谱) 的测定 依次在 1 mL 的离心管中加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 含不同浓度的抑制剂的乙醇溶液和 $40\text{ }\mu\text{L}$ 酪氨酸酶水溶液 (0.66 g/L), $950\text{ }\mu\text{L}$ $\text{pH}=6.8$ 磷酸缓冲溶液, 摇匀, 放置 15 min 。圆二色谱在 Jasco810 型 CD 光谱仪上进行测定, 采用 1 mm 液池, 在 $180\sim260\text{ nm}$ 范围内扫描, 累加 10 次, 按照 chei 的计算方法求各二级结构的比例。

2 结果与讨论

2.1 苯甲醛与底物 L -DOPA 的相互作用

由图 1 可以明显的看出, 在本试验条件下混合苯甲醛与多巴放置一段时间后, 测出的紫外吸收曲线并没有出现新的峰, 只是两种物质紫外吸收的简单相加, 这说明没有新的席夫碱生成。而底物多巴的浓度比酶的浓度要大得多, 氨基也更加活泼, 苯甲醛没有和多巴发生反应, 也不会和酪氨酸酶上的氨基残基发生反应。由此我们可以得出苯甲醛对酪氨酸酶的抑制作用不是通过与氨基残基发生反应生成席夫碱而发生作用的, 而是通过其他方式作用于酶的。

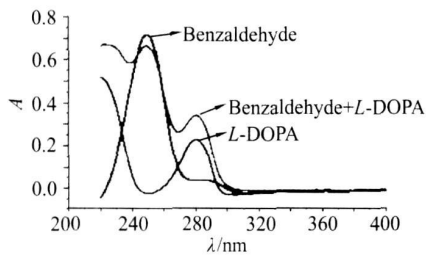


图 1 苯甲醛与多巴的相互作用

Fig. 1 Interaction between benzaldehyde and L -DOPA

2.2 苯甲醛类化合物对酪氨酸酶活力的影响

以 L -DOPA 为底物, 在测活体系中, 加入不同浓度的苯甲醛乙醇溶液, 研究其对酶活力的影响, 酶活力随着苯甲醛浓度增大而呈指数下降, 见图 2 (a), 有图可计算得到其半抑制率 (IC_{50}) 为 $1.17\text{ }\mu\text{mol/L}$; 以邻苯二酚为底物, 用相同方法测定, 由图 2 (b) 可得其 IC_{50} 为 $224\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。采用相同

的测活方法, 测定了对羟基苯甲醛、对苯二甲醛和肉桂醛的 IC_{50} 值, 结果见表 1。

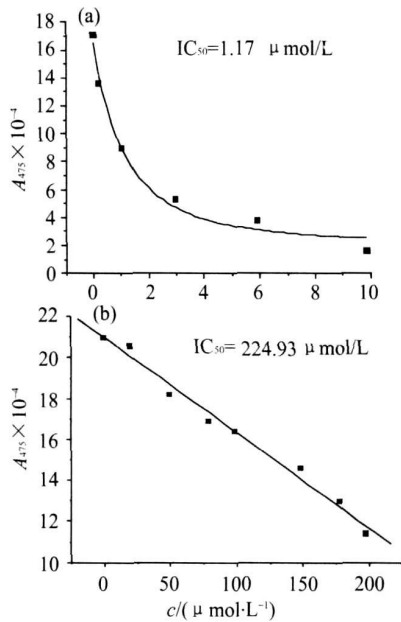


图 2 以多巴 (a) 和邻苯二酚 (b) 为底物
苯甲醛对酪氨酸酶的抑制

Fig. 2 Inhibitory effect of benzaldehyde on tyrosinase
on the oxidation of L -DOPA (a) and
 o -dihydroxybenzene (b)

表 1 苯甲醛类化合物对酪氨酸酶活力的抑制作用

Tab. 1 Inhibitory effects of benzaldehyde and
analogs on tyrosinase

化合物	$\text{IC}_{50} (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	
	以多巴为底物	以邻苯二酚为底物
苯甲醛	1.17	224
对羟基苯甲醛	1310	4130
对苯二甲醛	37.8	>15000
肉桂醛	403	61.3

由实验结果 (表 1) 很明显的看到, 苯甲醛对酪氨酸酶的抑制作用明显远远强于其他的类似物: 对羟基苯甲醛在苯环上比苯甲醛多了一个羟基, 而 IC_{50} 值是苯甲醛的 103 倍; 由于对苯二甲醛的对称结构, 使得苯环上的醛基电子云密度减弱, 抑制作用也小于苯甲醛; 肉桂醛的醛基没有直接连在苯环上, 其间拥有一个双键, 作用明显弱于苯甲醛和对苯二甲醛, 说明醛基是否直接连于苯环对酪氨酸酶抑制作用的大小起直接的关系, 但由于双键仍使苯环与醛基有一定的共轭作用, 仍对酪氨酸酶起到一定的抑制作用。

而分别以多巴和邻苯二酚为底物测定的 IC_{50} 值也是相差甚远, 由实验结果得到, 苯甲醛、对苯二甲醛和对羟基苯甲醛以邻苯二酚为底物时测定的

IC_{50} 值是以多巴为底物时的 4 ~ 500 倍, 而只有肉桂醛以邻苯二酚为底物时测定的 IC_{50} 值小于以多巴为底物时的值。这个结果引起了我们的兴趣, 并猜想这些化合物可能与酪氨酸酶的相互作用机理各不相同。

2.3 苯甲醛类化合物对酪氨酸酶抑制机制及抑制常数的测定

酪氨酸酶催化氧化是遵循 Michaelis-Menten 动力学方程^[10]。以苯甲醛为效应物, 以多巴为底物, 研究对酶促反应初速度的影响。结果 Lineweaver-Burk 双倒数作图得到一组交于 X 轴的直线 (图 3 (a)), 说明苯甲醛不改变 K_m , 仅 V_m 随抑制剂浓度增大而增大, 其效应为非竞争性抑制类型。求出以多巴为底物时苯甲醛对酪氨酸酶抑制常数 (K_I) 为 $1.55 \mu\text{mol/L}$ 。

以邻苯二酚为底物, 以苯甲醛为效应物, 研究对酶促反应初速度的影响, 结果 Lineweaver-Burk 双倒数作图得到一组交于 Y 轴的直线 (图 3 (b)), 说明苯甲醛不改变 V_m , 仅 K_m 随抑制剂浓度增大而增大, 其效应为竞争型抑制剂, 可以求出以邻苯二酚为底物时苯甲醛对酪氨酸酶抑制常数 (K_I) 为 $126 \mu\text{mol/L}$ 。

由结果我们发现, 苯甲醛在以多巴和邻苯二酚为底物测定抑制类型的结果是不同的, 我们猜想酪氨酸酶催化多巴和邻苯二酚反应时的酶产生两种不同的构象, 而导致苯甲醛与酶接合的位点不同。以多巴为底物时, 测定的是非竞争型抑制剂, 苯甲醛不影响酶与多巴结合; 多巴也不影响酶与苯甲醛的结合; 苯甲醛和多巴都可可逆独立地结合于酶的不同部位上, 苯甲醛结合到酶非活性位点的其他部位上。以邻苯二酚为底物时, 测定的是竞争型抑制剂, 苯甲醛与邻苯二酚对酶的结合有竞争作用, 互相排斥, 这时苯甲醛应作用在酶的活性位点上。而对羟基苯甲醛和肉桂醛都表现为竞争型抑制剂, 与底物有竞争作用。我们利用圆二色谱进一步讨论苯甲醛类抑制剂对酪氨酸酶二级结构的影响。

表 2 苯甲醛类化合物对酪氨酸酶的抑制类型
Tab. 2 Inhibitory types of benzaldehyde and analogs on tyrosinase

化合物	抑制类型	
	以多巴为底物	以邻苯二酚为底物
苯甲醛	非竞争型	竞争型
对羟基苯甲醛	竞争型	竞争型
肉桂醛	竞争型	竞争型

2.4 苯甲醛类化合物对酪氨酸酶二级结构的影响

由结果 (见表 3) 得到, 随着苯甲醛浓度的增加, 当浓度较小时, 酪氨酸酶的二级结构中的 α -螺旋的含量明显增加, 当达到一定浓度时, α -螺旋的含量显著降低, Loop (β -TURN) 的含量呈先减小后增大的趋势。由表 3 还可以看出对羟基苯甲醛和肉桂醛对酪氨酸酶二级结构的影响表现大致相同, 当抑制剂浓度逐渐增大时, α -螺旋的含量逐渐降低, 而 Loop (β -TURN) 的含量逐渐增大。

表 3 苯甲醛类化合物对酪氨酸酶二级结构的影响
Tab. 3 The influence of benzaldehyde on the secondary structure of tyrosinase

化合物	c ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$w \%$			
		α -HELIX	β -SHEET	β -TURN	RANDOM
苯甲醛	0	22.9	0.0	36.2	40.9
	0.5	27.0	0.0	36.1	36.9
	1.0	33.1	0.0	34.2	33.1
	5.0	6.2	0.0	49.1	44.7
	10	5.0	0.0	58.1	36.9
对羟基	400	19.1	0.0	40.9	40.0
苯甲醛	1000	13.0	0.0	66.4	20.6
肉桂醛	50	15.1	0.0	43.7	28.6
	100	13.4	0.0	54.2	32.4
	500	5.0	0.0	62.6	32.4

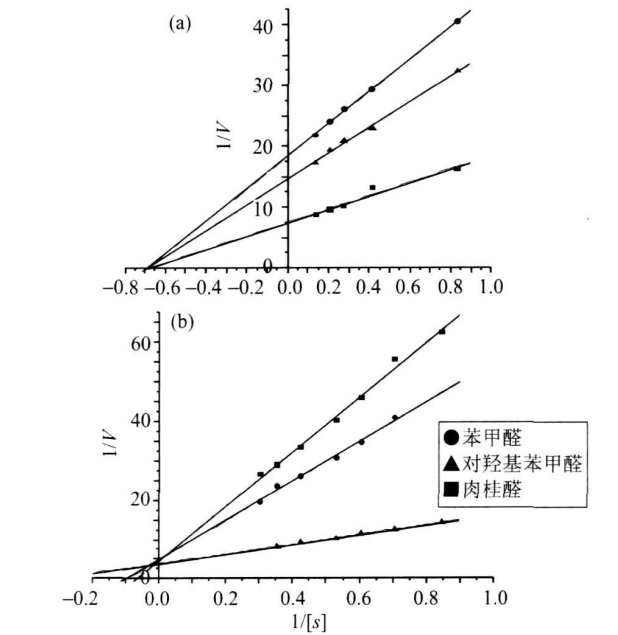


图 3 以多巴 (a) 和以邻苯二酚 (b) 为底物苯甲醛对酪氨酸酶抑制类型的测定

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots for inhibition of benzaldehyde on the oxidation of *L*-DOPA (a) and *o*-dihydroxybenzene by tyrosinase

以同样的方法, 测定了对羟基苯甲醛以及肉桂醛分别以多巴和邻苯二酚为底物的酪氨酸酶抑制类型见表 2, 均为竞争型抑制剂。

酪氨酸酶是全 α 结构模体的酶, 因此合适的 α -螺旋以及 Loop 的含量与酶的特定的功能域的形成以及酶的构象变化是相关的, 而酶的天然构象以及酶的特定的功能域对酶保持其活性是十分重要的^[11-12]。酶失去活性有以下几个原因: ①由于 α -螺旋结构紧密地特殊性, 过大的 α -螺旋度的构象, 使其结构紧密而不利酶形成活性中心, 从而使底物不能与之结合, 使酶假象失去活性; 过小的 α -螺旋构象, 就会彻底破坏酶蛋白质的氢键结构和其他结构而产生酶结构的不可逆破坏。②由于 Loop 是一个柔性极强的构象, Loop 越多, 它就有越多的机会运动到活性中心或是键合位点的上面, 从而覆盖这些有可能与底物结合的位点, 导致底物与酶结合的失败, 从而使酶失去活性。

从实验结果我们探讨出, 苯甲醛对酪氨酸酶的作用, 先使酶的结构过于紧密, 不利于形成酶的活性中心, 使酪氨酸酶不能催化多巴发生反应, 而邻苯二酚的结构比多巴小很夺, 仍可被酪氨酸酶催化, 但当苯甲醛浓度超过一定时, 酶的结构趋于松散, 天然构象改变, 使酶的活性中心不能形成, 这时邻苯二酚也不能被酶催化反应。对羟基苯甲醛和肉桂醛都是酪氨酸酶的竞争型抑制剂, 使酶的构象 α -螺旋减小, Loop 增大, 不利于形成活性中心, 从而达到抑制效果。

由此我们推测, 酪氨酸酶的活性与其天然的构象有着重要的关系, 天然构型的改变预示着酶活性的改变, 而不同的构型改变也预示着抑制剂与酶的相互作用不同。苯甲醛对酪氨酸酶抑制机理与其类似化合物不同, 可能通过作用在酶的不同位点, 或是活性或非活性部位, 而导致酪氨酸酶的构象发生不同的变化。

参考文献:

[1] SÁNCHEZ FERRER A, RODRÍGUEZ-LÓPEZ J N, GAR-

CÍA-CÁNOVAS F et al Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. BBA-Protein and Molecular Enzymology 1995 1247: 8-11.

- [2] JIMENEZ M, CHAZARRA S, ESCRIBANO J et al Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4 substituted benzaldehydes[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 (8): 4060-4063.
- [3] 薛超彬, 陈清西, 王勤, 等. 菜青虫不同虫态及虫龄的多酚氧化酶性质比较[J]. 昆虫学报, 2004 47(3): 305-309.
- [4] 潘兴华. 黑素细胞及黑素的生成与调节[J]. 生理科学进展, 1998 29(2): 179-181.
- [5] 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): 91-94.
- [6] 罗少华, 李新荣. 玉竹对酪氨酸酶的激活作用[J]. 中国生化药物杂志, 1996 17(1): 25-26.
- [7] 潘兴华. 黑素细胞及黑素的生成与调节[J]. 生理科学进展, 1998 29(2): 179-181.
- [8] 高秀蕊, 石双群, 宋秀芹. 某些药物对酪氨酸酶的抑制和对氧自由基的清除[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992 19(1): 70-71.
- [9] 黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物抑制蘑菇酪氨酸酶活力的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003 42(1): 97-101.
- [10] CHEN Q X, KUBO I Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by Quercetin[J]. J Agricultural and Food Chemistry 2002 50(14): 4108-4112.
- [11] CHEN Y H, YANG J T, MARTNEZ H M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion[J]. Biochemistry 1972 11(22): 4120-4131.
- [12] ADLER A J, GERENFIELD N, FASMAN G D. Complexes of deoxyribonucleic acid with lysine rich (fl) histone phosphorylated at two separate sites: circular dichroism studies[J]. Arch Biochem Biophys 1972 153(2): 769-777.

Tyrosinase Inhibition by Benzaldehyde and Its Analogs

QIAO Wei, WU Xiao-qin, LIFeng, CUI Qiang, YAN Si-jun, MA Lin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Tyrosinase is a metalloenzyme oxidase which catalyzes two distinct reactions of *o*-quinone. In this paper, the inhibition kinetics and mechanism of benzaldehyde and its analogs on the enzyme were studied with the oxidation of *L*-DOPA and *o*-dihydroxybenzene respectively by UV-absorption, circular dichroism spectroscopy. The inhibitory mechanism of enzyme on tyrosinase was discussed.

Key words tyrosinase; circular dichroism; inhibition; benzaldehyde