

金露梅在酪氨酸酶催化中的抑制机理

李晓雯，王春丽*

(华东理工大学药学院，制药工程与过程化学教育部工程研究中心，上海市新药设计重点实验室，上海200237)

摘要：目的 考察金露梅 *Potentilla fruticosa* L. 在酪氨酸酶催化中的抑制机理。方法 研究金露梅 50% 乙醇提取物对酪氨酸酶单酚酶、二酚酶活性的影响，并分析其动力学原理。结果 提取物能大大降低单酚酶、二酚酶活性， IC_{50} 分别为 3.74、4.31 g/L；对游离酶的抑制常数 (K_f) 为 3.76 g/L，而对酶-底物络合物的抑制常数 (K_{IS}) 为 8.65 g/L。结论 金露梅对二酚酶具有混合型抑制作用，可作为美白产品进行开发应用。

关键词：金露梅；酪氨酸酶；抑制机理

中图分类号：TQ658 文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2020)06-1585-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.037

酪氨酸酶即多酚氧化酶，常见于人体和动、植物体内，微生物中也能见到^[1]，对黑色素代谢、儿茶酚胺有很大影响，能在一定程度上限制其代谢速度^[2]。在酪氨酸酶单酚酶的刺激下，酪氨酸会发生羟化反应，生成邻位二羟基苯丙氨酸 (L-多巴)，而在二酚酶作用下后者会发生氧化反应，生成多巴醌，继续发生反应后就会形成黑色素^[3]。因此，只要在酪氨酸酶发生反应的过程中抑制其活性，就可减少黑色素的形成，从而达到美白效果。

金露梅 *Potentilla fruticosa* L. 是薔薇科委陵菜属灌木类植物^[4]，为西藏常见药物，因其生长环境的温差较大、海拔较高、日照时间较长，其成分组成多样，活性极强^[5]，包括黄酮类、三萜类、多糖类、鞣质、醌类等^[6]。多酚作为一种广泛应用于美白产品的酪氨酸酶抑制剂，既可与底物竞争，结合酪氨酸酶，也可抑制酶反应活性，从而减少黑色素生成以达到美白祛斑的作用^[7]。目前，对金露梅总多酚含有量及其抑制酪氨酸酶活性的报道较少^[8]，故本实验考察该植物在酪氨酸酶催化中的抑制机理，以期为相关美白产品的研发提供科学根据。

1 材料

1.1 试剂与药物 金露梅采自西藏，经华东理工大学马磊副教授鉴定为正品。酪氨酸酶（美国 Worthington 公司，1 080 U/mg）；L-多巴、L-酪氨酸对照品〔阿拉丁试剂（上海）有限公司〕。无水乙醇、氢氧化钠、磷酸二氢钾均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

1.2 仪器 JY5002 电子天平（上海复平仪器仪表有限公司）；WK-400B 高速药物粉碎机（山东精诚机械有限公司）；SHZ-3 循环水多用真空泵、HH-WO 电子恒温水浴锅（上海予华仪器有限公司）；PS-30AL 超声波清洗仪（深圳

市洁康有限公司）；UV1900 紫外分光光度计（上海奥谱勒仪器有限公司）。

2 方法

2.1 总多酚制备与含有量测定

2.1.1 提取 称取金露梅全株 5.0 g，粉碎处理后以 30 目筛进行筛选，置于锥形瓶中，加入 100 mL 50% 乙醇，50 ℃ 下超声提取 30 min，得到粗提物，60 ℃ 下减压蒸馏除去乙醇，置于 100 mL 量瓶中定容，即得金露梅总多酚提取物，质量浓度为 50 g/L^[9]。

2.1.2 分离纯化 采用 HZ-828 大孔树脂，5 g/L 提取液以 1.0 mL/min 体积流量上样 50 mL，进行动态吸附，50 mL 70% 乙醇进行动态洗脱，洗脱液减压蒸馏浓缩，即得纯化物^[10]。

2.1.3 定量测定 采用福林酚测定法^[11]。精密称取 10 mg 没食子酸对照品，离子水溶解并定容至 100 mL，得 0.1 mg/mL 溶液，取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 于 25 mL 量瓶中（终质量浓度分别为 4、6、8、10、12、14、16 μg/mL），加入 1 mL 福林酚试剂、2 mL 10% Na₂CO₃ 试剂，摇匀定容，25 ℃ 下反应 1 h 后，测定其在最大吸收波长 765 nm 波长处的吸光度 (A_{765})。以溶液质量浓度为横坐标 (X)，吸光度为纵坐标 (A) 进行回归，得到方程为 $A = 0.1313X - 0.0084$ ($R^2 = 0.9991$)，在 0~16 μg/mL 范围内线性关系良好。

将“2.1.2”项下纯化物在 60 ℃ 下通过减压蒸馏除去乙醇，去离子水定容至 5 g/L，取 1.0 mL，去离子水定容于 10 mL 量瓶中，再量取 0.5 mL 于 25 mL 量瓶中，依次加入 1 mL 福林酚试剂、2 mL 10% Na₂CO₃ 溶液，混匀，定容，25 ℃ 下反应 1 h 后，测定 A_{765} 。

收稿日期：2019-05-07

作者简介：李晓雯（1994—），女，硕士生，研究方向为天然药物筛选和评价。Tel: 13616221786, E-mail: iwmylead@163.com

*通信作者：王春丽（1971—），女，博士，副教授，研究方向为天然抗氧化剂的发现与应用。Tel: 13801951663, E-mail: wangchunli1990@aliyun.com

结果, 金露梅纯化后总多酚含有量为 171.13 mg/g, 终药液浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 酶活性测定 对酪氨酸酶活性进行检测的前提是多巴色素最大吸收峰在 475 nm 波长处, 而多巴色素来自于酪氨酸、L-多巴的酶催化氧化反应^[12]。酪氨酸酶反应活性定义^[13]为以每 1 min 多巴色素在 475 nm 波长处的吸光度 (A_{475}) 增加 0.001, 为 1 个酶活性单位, 即 1 U/min, 可依据酶催化反应系统 A_{475} 伴随时间的增长, 得到对应的酶活性值。

2.2.1 单酚酶活性 参考文献^[14] 报道。以 1.5 mmol/L L-酪氨酸为底物, 在反应系统内依次加入 3.1 mL 磷酸缓冲液 (pH=6.8)、1.5 mL 5.0 mmol/L L-酪氨酸 (溶于 pH=6.8 磷酸盐缓冲液中), 在 28 °C 恒温水浴锅中恒温 10 min, 依次加入 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 g/L 金露梅提取物各 0.2 mL 及酪氨酸酶溶液 0.2 mL, 摆晃均匀后迅速置于紫外分光光度计中, 在 475 nm 波长处每 30 s 读取 1 次吸光度, 连续 15 min。在该反应体系中, 酶终质量浓度为 20 mg/L。

2.2.2 二酚酶活性 参考文献^[15] 报道。以 1.0 mmol/L L-多巴为底物, 在此反应体系内依次加入 3.6 mL 磷酸缓冲液 (pH=6.8)、1.0 mL 5.0 mmol/L L-多巴 (溶于 pH=6.8 磷酸盐缓冲液中), 在 28 °C 恒温水浴锅中恒温 10 min, 依次加入 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 g/L 金露梅提取物各 0.2 mL 及酪氨酸酶溶液 0.2 mL, 摆晃均匀后迅速置于紫外分光光度计中, 在 475 nm 波长处每 30 s 读取 1 次吸光度, 连续 15 min。在该反应体系中, 酶终质量浓度为 4.0 mg/L。

2.2.3 计算方法 公式为相对酶活性 = $[(A_2 - A_1) / (A_4 - A_3)] \times 100\%$, 其中 A_1 、 A_2 分别为底物、酪氨酸酶与金露梅提取物溶液在一定时间段内 (单酚酶活性 5~10 min, 二酚酶活性 0~6 min) 对应的吸光度; A_3 、 A_4 表示存在前 2 种物质, 但不存在金露梅提取物体系在 1 个时间间隔内的前后吸光度, 时间段选择一致^[16]。

2.3 金露梅对酪氨酸酶二酚酶活性抑制机理的分析 固定酪氨酸酶活性为 66 U/mL, 在反应体系内依次加入磷酸盐缓冲液 (pH=6.8)、L-多巴溶液、金露梅 50% 乙醇提取物各 1 mL, 置于水浴锅中, 28 °C 下恒温 10 min, 再加入 1 mL 酪氨酸酶溶液, 摆晃均匀迅速置于紫外分光光度计中进行检测。改变 L-多巴溶液浓度为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L, 测定 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 g/L 金露梅提取物 A_{475} , 计算初速度 V_0 , 绘制浓度-初速度曲线。再利用 Lineweaver-Burk 双倒数方程, 由底物 L-多巴溶液浓度、 V_0 倒数为指标作图, 测得米氏常数 K_m 、酶促反应最大速率 V_m , 用来判断其抑制种类^[17]。

以 Lineweaver-Burk 双倒数方程直线斜率、截距为纵坐标, 提取物溶液质量浓度为横坐标再绘图, 得到对应的抑制常数 K_1 、 K_{IS} ^[18]。 $V_0^{-1} = K_m^{-1} \cdot V_m^{-1} (1 + C_1 \cdot K_1^{-1})$ $C_s^{-1} + V_m^{-1} (1 + C_1 \cdot K_{IS}^{-1})$, 其中 V_0 为初速度, 单位 A/min; K_m 为米氏常数, 单位 mmol/L; V_m 为最大反应速率, 单位

A/min ; C_1 为金露梅提取物质量浓度, 单位 g/L; C_s 为底物浓度, 单位 mmol/L; K_1 为金露梅提取物与酶的反应常数, 单位 g/L; K_{IS} 为金露梅提取物和酶-底物络合物发生反应的常数, 单位 g/L^[19]。

3 结果

3.1 金露梅提取物对酪氨酸酶单酚酶活性的影响 在单酚酶活性测定时使用酪氨酸酶, 通常情况下能减缓其催化反应而出现迟滞时间, 同时在反应系统中酶、底物浓度能影响延迟时间^[20]。按“2.2”项下方法测定 A_{475} , 金露梅提取物对酪氨酸酶单酚酶作用的进程曲线见图 1。由此可知, 单酚酶活性存在迟滞时间 (曲线的直线部分交于横坐标的值)^[21], 在反应系统内提取物可让其活动延迟时间增加, 而且质量浓度越高, 延迟时间越长, 曲线斜率减小, 即稳态酶活性下降, 表明它可在一定程度上抑制酪氨酸酶单酚酶的活性, 缩减其效用。

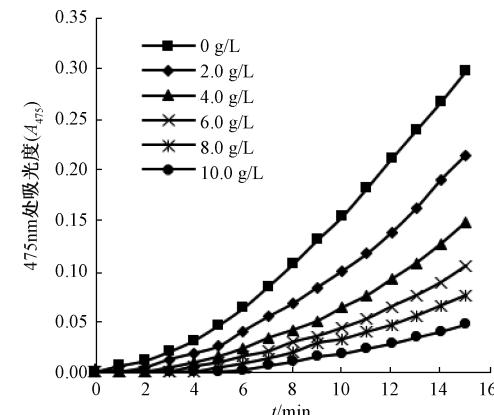


图 1 金露梅提取物对酪氨酸酶单酚酶作用的进程曲线

金露梅提取物存在浓度差异时, 会对酪氨酸酶催化氧化反应有影响, 从而改变其 L-酪氨酸的稳态酶活性 (即 5~10 min 的相对酶活性)。图 2 显示, 随着提取物溶液质量浓度升高, 稳态酶活性降低, IC_{50} 约为 3.74 g/L。

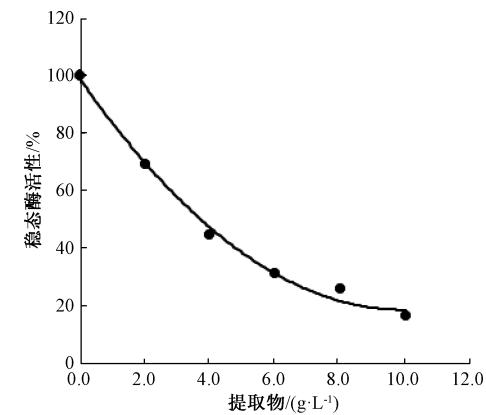


图 2 金露梅提取物对酪氨酸酶单酚酶稳态酶活性的影响

3.2 金露梅提取物对酪氨酸酶二酚酶活性的影响 按“2.2”项下方法测定 A_{475} , 结果见图 3。由此可知, 二酚酶催化氧化 L-多巴过程中无时间延迟, 随着提取物溶液质量浓度升高, 曲线斜率明显增长, 表明它可在一定程度上抑

制二酚酶反应；在提取物溶液质量浓度相同的反应体系中，吸光度会随着时间延长而增大，但速率逐渐下降，表明二酚酶对氧化反应的催化速度变小。

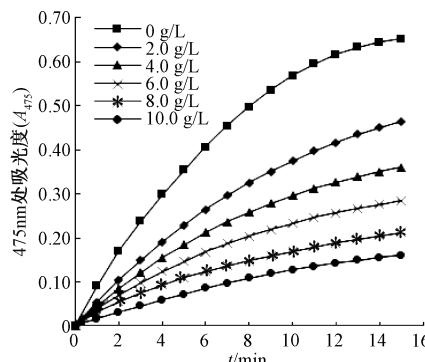


图3 金露梅提取物对酪氨酸酶二酚酶作用的进程曲线

金露梅提取物质量浓度存在差异时，会给酪氨酸酶催化氧化反应造成影响，改变其L-多巴的稳态酶活性（即0~6 min的相对酶活性）。图4显示，随着提取物溶液质量浓度不断升高，稳态酶活性降低， IC_{50} 约为4.31 g/L。

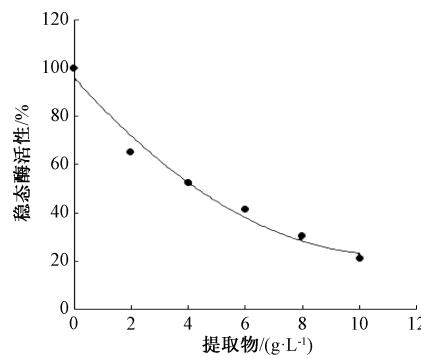


图4 金露梅提取物对酪氨酸酶二酚酶稳态酶活性的影响

3.3 金露梅抑制酪氨酸酶二酚酶活性的机理 按“2.2”项下方法测定 A_{475} ，计算初速度 V_0 ，绘制浓度-初速度曲线，结果见图5。由此可知，随着多巴溶液浓度升高， V_0 不断增长；金露梅提取物溶液质量浓度变化对酪氨酸酶二酚酶活性有不同程度的抑制作用，而且随着其质量浓度升高，与二酚酶的反应逐渐稳定，表明提取物会与底物竞争与酶结合，催化速率的下降是酶活性被抑制的后果，而不是因为酶丧失活性造成的。因此，可认为金露梅提取物对酪氨酸酶的作用为可逆性抑制^[22]。

以底物L-多巴溶液质量浓度、 V_0 倒数为指标，结合Lineweaver-Burk双倒数方程进行拟合，结果见图6，对比酶催化反应的相应动力学指数，通过表观米氏常数(K_m)、最大反应速度(V_m)来判断抑制类型^[23]。由图6A可知，双倒数图中的1组直线在第二象限内交叉于一点， K_m 、 V_m 都随提取物溶液质量浓度的升高而变化， K_m 增加， V_m 值减少，表明提取物对酪氨酸酶的抑制机理为混合型效应，即它与酶在不断作用的过程中可同时与游离酶和酶-底物的络合物结合，从而发生非竞争性抑制反应，并且与L-多巴在相互竞争中和酪氨酸酶发生反应而形成竞争性抑制。

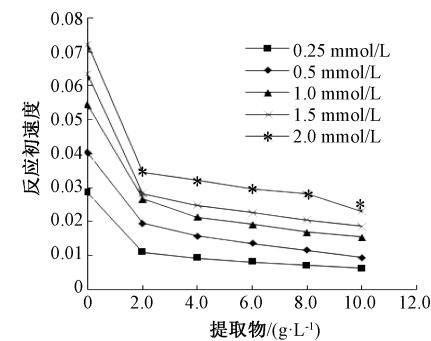


图5 金露梅提取物溶液质量浓度与其抑制作用的关系

根据Lineweaver-Burk双倒数方程的斜率、纵截距，结合金露梅提取物溶液质量浓度来制图，用于判断结合度，结果见图6B、6C。由此可知，提取物对游离酶的抑制常数(K_1)为3.76 g/L，而对酶-底物络合物的抑制常数(K_{is})为8.65 g/L，即它与游离酶的反应程度高于与酶-底物络合物的。

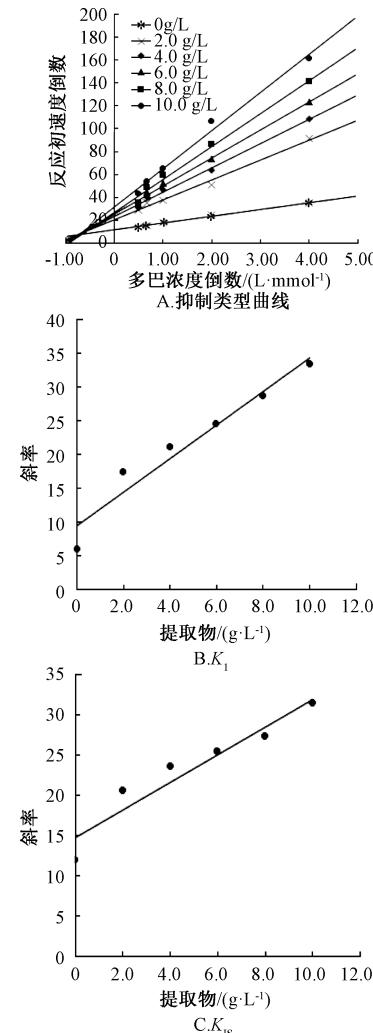


图6 金露梅提取物对酪氨酸酶催化氧化L-多巴抑制作用的Lineweaver-Burk双倒数方程

4 结论

金露梅50%乙醇提取物经大孔树脂纯化后，总多酚含有量为171.13 mg/g，可在一定程度上抑制酪氨酸酶活性，

并对单酚酶、二酚酶均存在显著的抑制作用, 它抑制单酚酶反应迟滞时间的延长是主要表现, 当后者活性降低到一半时其IC₅₀约为3.74 g/L, 而对二酚酶约为4.31 g/L。通过Lineweaver-Burk双倒数图发现, 提取物对二酚酶存在混合型抑制作用, 对游离酶、及酶-底物络合物的抑制常数分别为3.76、8.65 g/L, 表明它具有良好的美白活性, 今后可对其主要有效成分及细胞生物学方面进行深入研究。

参考文献:

- [1] 刘娜, 梁刚, 董新维, 等. 酪氨酸酶固定化碳材料对苯酚的生物降解性能[J]. 吉林大学学报(地球科学版), 2017, 47(2): 573-579.
- [2] Loizzo M R, Tundis R, Menichini F. Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2012, 11(4): 378-398.
- [3] Chang T S. An updated review of tyrosinase inhibitors[J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(6): 2440-2475.
- [4] 何佳亮, 董开茂, 郑健, 等. NaCl和PEG胁迫对金露梅种子萌发及幼苗的影响[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(4): 123-126; 197.
- [5] 卓玛拉毛. 浅谈藏医药对美容的认识及重要性[J]. 西藏科技, 2016(9): 19-20.
- [6] 许晓洁, 王伟, 王玉华. 蒙药材金露梅的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(10): 1367-1369.
- [7] 马雪颖, 朱毅. 植物多酚在化妆品领域中的应用[J]. 日用化学品科学, 2018, 41(9): 40-43; 46.
- [8] 许晓洁, 王秋桐, 石舵. 金露梅的药理作用、化学成分及含量测定方法[J]. 中国药房, 2017, 28(22): 3155-3156.
- [9] 王彪. 广西都安酿酒葡萄皮渣中化学成分的分离、活性分析及白藜芦醇的提纯工艺研究[D]. 南宁: 广西师范学院, 2013.
- [10] 王艳丽, 许惠芳, 郭瑜, 等. 大孔树脂纯化酸浆果实多酚及其生物活性研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 13-20.
- [11] ISO 14502-1, Determination of substances characteristic of green and black tea-Part 1: Content of total polyphenols in tea-Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent[S]. 2005.
- [12] 曾亮, 吴靓丽, 宫兴丽, 等. 儿茶素对马铃薯酪氨酸酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 310-313.
- [13] 龚盛昭, 尹美娟, 郁晓曦, 等. 阿魏酸异辛酯抑制酪氨酸酶活性的动力学研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(1): 101-104.
- [14] 龚盛昭, 张凯, 孙永, 等. 绿原酸对酪氨酸酶活性影响及动力学研究[J]. 日用化学工业, 2015, 45(3): 157-160.
- [15] 刘敏, 邵文祥, 张灵芝, 等. 异鼠李素对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的抑制机理[J]. 中国食品添加剂, 2016(12): 73-77.
- [16] 陈宇霞, 张凯, 龚盛昭. 茜草提取物对酪氨酸酶抑制动力学及刺激性研究[J]. 日用化学工业, 2017, 47(6): 317-321.
- [17] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. *J Enzym Inhib Med Ch*, 2003, 18(6): 491-496.
- [18] 李倩, 李晨阳, 詹羽娇, 等. 睡莲花提取物对酪氨酸酶的抑制作用及其动力学研究[J]. 日用化学工业, 2017, 47(4): 219-222.
- [19] 谢娟. 芳杂环缩氨基硫脲类似物的合成及其抑制酪氨酸酶活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [20] 孙培冬, 王小洪. 二氢杨梅素对酪氨酸酶抑制作用研究[J]. 化学研究与应用, 2013, 25(6): 871-874.
- [21] 肖飞, 赵曙辉. 鹰嘴豆异黄酮对酪氨酸酶的抑制动力学[J]. 日用化学工业, 2010, 40(6): 439-443.
- [22] 李航, 赵国华, 阚建全, 等. 天然产物对酪氨酸酶的抑制及抑制机理的研究进展[J]. 日用化学工业, 2003, 33(6): 383-386.
- [23] 刘杰超, 焦中高, 张春岭, 等. 苹果多酚提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 日用化学工业, 2013, 43(6): 414-417; 456.