

对羟基肉桂酸对酪氨酸酶催化反应的抑制机理

孙晓梅¹, 穆燕², 李琳¹, 胡松青¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 深圳职业技术学院, 广东深圳 518055)

摘要: 本文研究了对羟基肉桂酸(HCA)对酪氨酸酶催化单酚底物 L-酪氨酸和催化二酚底物 L-多巴的抑制能力, 并利用紫外-可见光谱、荧光光谱以及分子对接技术探究了其抑制机理。结果表明对羟基肉桂酸对酪氨酸酶催化单酚底物 L-酪氨酸比催化二酚底物 L-多巴具有更强的抑制作用, 半抑制浓度分别为 0.096 mmol/L 和 0.500 mmol/L; 紫外-可见分析发现对羟基肉桂酸能与 Cu^{2+} 发生螯合, 使光谱发生明显红移。进一步通过荧光光谱分析得到, 对羟基肉桂酸在酪氨酸酶溶液中并没有出现荧光淬灭反而随着对羟基肉桂酸浓度的增大荧光强度变强, 说明对羟基肉桂酸被酪氨酸酶催化氧化成对应的醌类物质。利用分子对接技术揭示了对羟基肉桂酸通过氢键和疏水作用竞争性地占据了单酚和二酚底物的空间位置, 并与酪氨酸酶中双核铜离子螯合, 从而抑制酪氨酸酶催化 L-酪氨酸和 L-多巴氧化的活性机理。

关键词: 酪氨酸酶; 对羟基肉桂酸; 抑制机理; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2015)2-76-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.014

Inhibition Mechanism of 4-Hydroxycinnamic Acid on Reactions Catalyzed by Tyrosinase

SUN Xiao-mei¹, MU Yan², LI Lin¹, HU Song-qing¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the inhibition effect of 4-hydroxycinnamic acid (HCA) on the catalytic activity of tyrosinase on the monophenol substrate L-tyrosine and diphenol substrate L-dopa. The mechanism of inhibition was studied using UV-vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. The results showed that HCA was more effective at inhibiting the catalytic activity of tyrosinase on the diphenol substrate L-tyrosine than on the monophenol substrate L-dopa; their IC_{50} values were 0.096 and 0.500 mmol/L, respectively. The UV-visible spectrum showed a red shift in the characteristic absorption peak of HCA because of the formation of a Cu^{2+} chelate complex. Furthermore, fluorescence quenching of HCA in tyrosinase solution did not occur and instead, the fluorescence intensity increased with increasing HCA concentration, indicating that HCA was catalytically oxidized to the corresponding quinone by tyrosinase. Molecular docking demonstrated that HCA could competitively occupy the positions of both monophenol and diphenol substrates in the active site of tyrosinase by hydrogen bonds and hydrophobic interaction, and could coordinate to Cu^{2+} in tyrosinase, thus inhibiting the catalytic activity of tyrosinase on L-tyrosine and L-dopa oxidation.

Key words: tyrosinase; 4-hydroxycinnamic acid; inhibition mechanism; molecular docking

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)是一种多功能、含有铜离子的多酚氧化酶,广泛存在于微生物、动植物及人体中^[1]。研究发现,酪氨酸酶在黑色素的合成方面有重要作用,是黑色素合成过程中的限速酶。该酶参与

收稿日期: 2014-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31130042, 31171630); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(博导类)(20130172110018)

作者简介: 孙晓梅(1989-),女,硕士研究生,主要从事天然产物化学及蛋白质结构生物学研究

通讯作者: 胡松青(1972-),男,博士,教授,主要从事天然产物化学及蛋白质结构生物学研究

黑色素合成的前两步反应,分别是催化单酚底物酪氨酸羟基化(酪氨酸酶的单酚酶活性)生成二酚 L-多巴、催化氧化二酚 L-多巴(酪氨酸酶的二酚酶活性)为相应的醌类物质,催化机理见图 1^[2]。随后,醌类物质经过一系列的非酶促反应,生成黑色素。尽管黑色素有效的吸收紫外线,保护皮肤免受紫外线的伤害,但是酪氨酸酶的异常过量表达也可导致色素沉积类疾病,如雀斑、黄褐斑、老年斑等皮肤病。此外,酪氨酸酶和果蔬的酶促褐变有关,虽然在极少数的食品加工过程中,酶促褐变能改善食品色泽风味,但是,在大多数食品贮藏和加工过程中,酶促褐变会导致新

鲜水果、饮料的营养价值和商业价值降低^[3~4]。另外,在昆虫中,酪氨酸酶与昆虫的生理功能关系密切,酪氨酸酶有助于角质层的形成、黑色素的沉积、昆虫外壳的硬化^[5]除此之外,酪氨酸酶还与昆虫表皮的愈伤和修复有关,可以杀死侵入的微生物和被感染的细胞,阻止其扩散^[6]。因此,酪氨酸酶抑制剂可以广泛应用于医药领域、农业领域、化妆品领域^[7];在临床上作为治疗和黑色素沉积过度相关的皮肤病;可以扰乱昆虫的生理功能从而达到防治昆虫的效果;也可以作为美白剂添加到化妆品中^[4]。

对羟基肉桂酸(HCA)具有抗氧化活性^[8]、抑制黑色素细胞活性^[9],可以作为美白剂添加到化妆品中。Shi^[10]等研究结果表明对羟基肉桂酸对酪氨酸酶有强烈的抑制作用,此抑制机理为竞争性抑制。

虽然前人关于对羟基肉桂酸对酪氨酸酶的抑制作用已经进行了相关研究,但是,他们都没有涉及对羟基肉桂酸和酪氨酸酶分子间相互作用的抑制机理,本文采用紫外-可见光谱法、荧光光谱法、分子模拟技术探讨了对羟基肉桂酸与酪氨酸酶相互作用的分子机制。

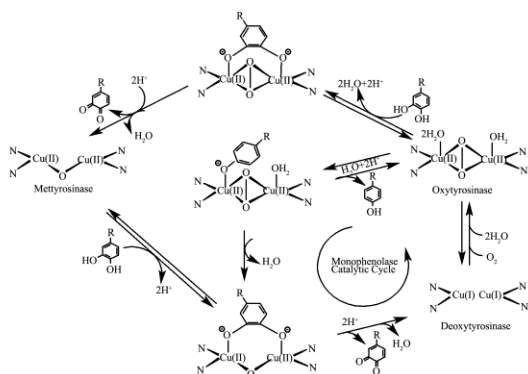


图1 酪氨酸酶催化酚类化合物的机理

Fig.1 Catalytic mechanism of tyrosinase on phenols

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

对羟基肉桂酸,实验室自制;L-多巴,美国西格玛-奥德里奇公司;L-酪氨酸,上海伯奥生物科技有限公司;酪氨酸酶(25 ku),美国西格玛-奥德里奇公司;二甲基亚砜,上海凌峰化学试剂有限公司;无水乙醇,广州化学试剂厂。

1.2 主要仪器设备

Sunrise 酶标仪,瑞士TECAN公司;UV-2102紫外-可见分光光度计,美国Unico公司;F-7000荧光光谱仪,日本日立公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酪氨酸酶活力的测定

参照文献^[11]的方法并适当修改,采用酶标仪进行测定,通过比较对羟基肉桂酸添加后酪氨酸酶的活性变化可以确定酪氨酸酶的抑制率。将110 μmol/L单酚底物L-酪氨酸溶液或2.0 mmol/L二酚底物L-多巴溶液分别加入96孔板的3个孔中,标记为1号、2号、3号,在1号孔中加入70 μL样品溶剂,在2、3号孔中加入70 μL 100 μg/mL对羟基肉桂酸溶液,然后在1、2号孔加入酪氨酸酶溶液30 μL,用pH 6.8的磷酸盐缓冲溶液将溶液体积补至210 μL,反应体系中酪氨酸酶的最终浓度为173 U/mL。将反应液于30 °C放置30 min后,在492 nm波长处测其吸光值,1~3号孔的吸光值分别记为D₁、D₂、D₃,然后按下式计算待测样品中对酪氨酸酶活性的抑制率:

$$I\% = [1 - (D_2 - D_3)/D_1] \times 100\%$$

实验重复三次,取平均值。

1.3.2 紫外可见光谱测定

向1、2、3号试管中分别加入1.8 mL去离子水,0.1 mL 100 μg/mL对羟基肉桂酸溶液,再向1号试管中加入0.1 mL酪氨酸酶溶液(173 U/mL),2号试管中加入0.1 mL 0.125 mmol/L CuSO₄溶液,3号试管中加入0.1 mL 50 mmol/L磷酸缓冲液,然后将各组反应液在30 °C下放置10 min后,在240~400 nm处扫描各组混合液的紫外-可见光谱^[12~13]。

1.3.3 荧光光谱测定

在1.5 mL离心管中,依次加入200 μL 0.1 mg/mL的酪氨酸酶溶液和一定量的100 μg/mL对羟基肉桂酸溶液,加入二甲基亚砜(DMSO)至体积为225 μL。设置荧光的激发波长为280 nm,激发狭缝宽度为5 nm,发射狭缝宽度为5 nm,扫描速度为1200 nm/s,电压为600 V,在200~380 nm波长范围内扫描各组样品的发射光谱^[14]。

1.3.4 分子对接

使用Rosette3.2对接软件, Linux运行系统进行分子对接。所用的酪氨酸酶晶体结构来自巨大芽孢杆菌^[15](TyrBm; PDB编号为3N91),除去双核铜离子和配体(曲酸)。采用文献^[16]描述的ROSETTALLGAND算法进行计算,采用PyMOL软件进行图形处理。

2 结果与分析

2.1 对羟基肉桂酸对酪氨酸酶的抑制作用

从图2可知,一定浓度的对羟基肉桂酸可以抑制

酪氨酸酶催化氧化单酚底物 L-酪氨酸和二酚底物 L-多巴的反应活性, 且均呈现浓度依赖性。

以对羟基肉桂酸浓度 (mmol/L) 为自变量, 抑制率为因变量, 对相关数据进行线性拟合, 分别得到单酚氧化抑制率与对羟基肉桂酸浓度关系式:

$$I = 363.9C + 14.95 \quad (R^2=0.99) \quad (1)$$

以及二酚氧化抑制率与对羟基肉桂酸浓度关系式:

$$I = 107.38C - 3.93 \quad (R^2=0.99) \quad (2)$$

由式 (1) 和 (2) 可以计算得到对羟基肉桂酸抑制酪氨酸酶催化氧化单酚底物和二酚底物的半抑制浓度分别为 0.096 mmol/L 和 0.500 mmol/L。由此可见, 对羟基肉桂酸对酪氨酸酶催化单酚底物的半抑制浓度比催化二酚底物的少一个数量级, 说明, 对羟基肉桂酸抑制酪氨酸酶催化氧化单酚底物的能力更强。Shi^[10]等报道对羟基肉桂酸对酪氨酸酶催化氧化二酚物质的半抑制浓度为 0.5 mmol/L, 作用机理为竞争性抑制。与本文的研究结果一致。

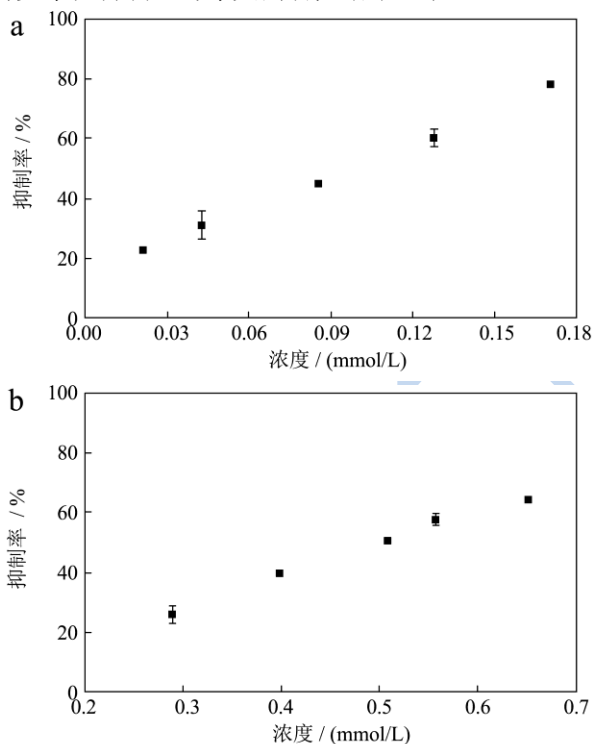


图 2 对羟基肉桂酸对酪氨酸酶的抑制作用

Fig.2 The inhibitory effect of HCA on the catalytic activity of tyrosinase

注: a: 对羟基肉桂酸对酪氨酸酶催化单酚底物的抑制作用, b对羟基肉桂酸对酪氨酸酶催化二酚底物的抑制作用。

2.2 紫外可见光谱分析

在酪氨酸酶催化氧化酚类物质的过程中, 其活性中心的双核铜离子发挥了至关重要的作用, 本实验通

过对比对羟基肉桂酸溶液、含有过量 Cu²⁺的对羟基肉桂酸溶液的紫外-可见光谱的变化, 探讨了对羟基肉桂酸通过结合 Cu²⁺抑制酪氨酸酶活性的可能性。由图 3 可以看出, 含有过量 Cu²⁺的对羟基肉桂酸溶液的紫外-可见光谱发生了明显的红移, 这表明 Cu²⁺和对羟基肉桂酸发生了螯合作用, 使得对羟基肉桂酸共轭效应增大, 从而发生了红移。说明对羟基肉桂酸之所以能抑制酪氨酸酶的活性可能是因为对羟基肉桂酸和酪氨酸酶活性中心的 Cu²⁺发生了螯合作用。

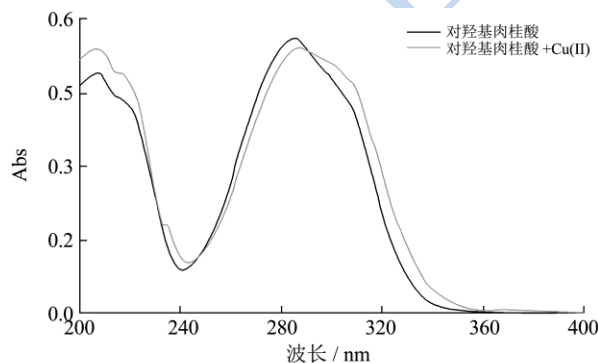


图 3 铜离子对对羟基肉桂酸紫外-可见光谱的影响

Fig.3 The influence of Cu²⁺ on the UV-visible spectrum of HCA

2.3 对羟基肉桂酸对酪氨酸酶荧光光谱的影响

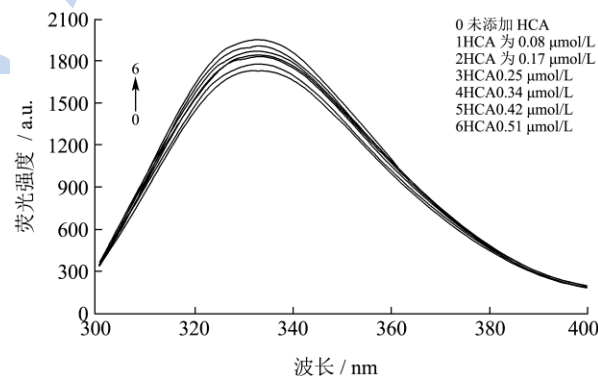


图 4 同浓度的对羟基肉桂酸存在下酪氨酸酶的荧光光谱

Fig.4 Fluorescence spectra of tyrosinase in the presence of HCA at different concentrations

因为芳香族氨基酸色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸都是荧光生色团, 所以蛋白质有内源荧光特性^[17], 而酶抑制剂可以靠近蛋白质表面或浅的沟槽中的荧光发色团, 导致其发生荧光淬灭。通常情况下, 抑制剂可以作为酪氨酸酶的淬灭剂, 即抑制剂与酪氨酸酶分子结合后酪氨酸酶的荧光强度下降。图 4 是在酪氨酸酶溶液中加入不同浓度的对羟基肉桂酸后在激发波长为 280 nm 时的荧光发射光谱。出人意料的是, 酪氨酸酶在最大发射波长处的荧光强度随着对羟基肉桂酸浓度

的增加单调性增大。但是,对照实验表明,对羟基肉桂酸在此条件下并没有荧光性,所以说,酪氨酸酶荧光强度增大可能是因为对羟基肉桂酸被酪氨酸酶催化氧化为具有荧光行为的醌类物质。已有研究表明酪氨酸酶可以把对羟基肉桂酸催化氧化为为相应的醌类物质^[9-10]。

2.4 对羟基肉桂酸与酪氨酸酶的分子对接

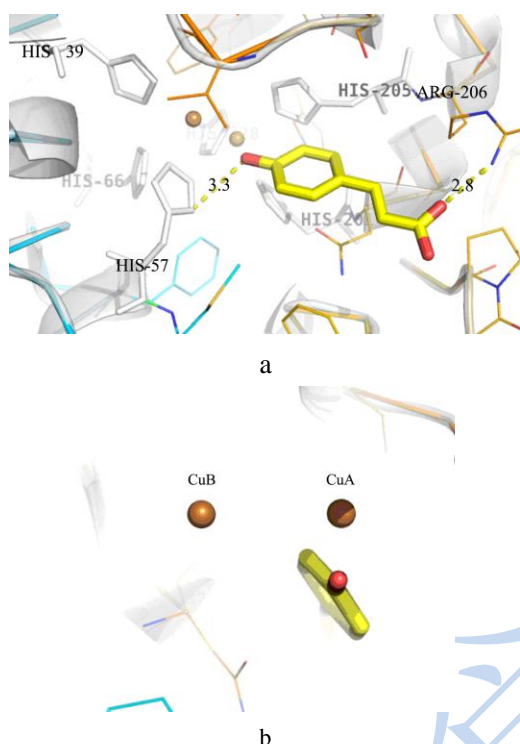


图5 对羟基肉桂酸与酪氨酸酶的分子对接模型

Fig.5 Molecular docking model of HCA and tyrosinase

注: a: 对羟基肉桂酸与酪氨酸酶相互作用模型, b: 酪氨酸酶和对羟基肉桂酸的活性中心。

用分子对接方法模拟了对羟基肉桂酸与酪氨酸酶的相互作用。根据能量最低原则,分子对接见图5(a)。对接结果表明,酪氨酸酶的氨基酸残基 Arg-206、His-57 和对羟基肉桂酸在其活性中心形成氢键。除此之外,对羟基肉桂酸和酪氨酸酶相互作用过程中还可能存在疏水相互作用,因为对羟基肉桂酸的对接位置附近有疏水性氨基酸残基如 Phe-62 和 Phe-194。

根据分子对接模型,对羟基肉桂酸与酪氨酸酶活性中心的双核铜离子的空间位置如图5(b)所示。可以看出,在酪氨酸酶活性中心,CuA 明显离对羟基肉桂酸更近。而且,对羟基肉桂酸和其附近的 His-57 之间有氢键作用。Sendovski 等报道^[15]与 CuA 相连的 His-57 参与单酚底物的去质子化过程,说明对羟基肉桂酸可以更有效地催化单酚底物,该模型从结构的角

度证实了对羟基肉桂酸对酪氨酸酶催化单酚底物有更

强的抑制作用。
对羟基肉桂酸和单酚底物 L-酪氨酸苯环都具有的酚羟基结构是酪氨酸酶催化氧化对羟基肉桂酸的结构基础。基于本文紫外-可见光谱、荧光光谱和分子对接的结果,再结合前人相关研究结果^[9-10]推测,对羟基肉桂酸与酪氨酸酶活性中心的双核铜离子螯合,进一步被催化氧化为相应的醌类物质,可能的反应途径如图6所示。醌类物质往往能产生荧光,这也解释了在对羟基肉桂酸中加入铜离子后,其紫外-可见光谱会发生红移以及对羟基肉桂酸与酪氨酸酶结合后混合物的荧光强度增加的原因。

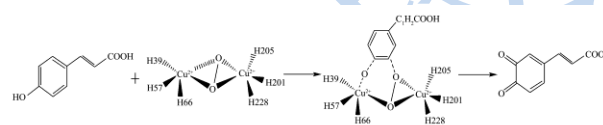


图6 酪氨酸酶催化氧化对羟基肉桂酸的可能反应途径

Fig.6 Suggested pathway for the tyrosinase-catalyzed oxidation of HCA

3 结论

对羟基肉桂酸抑制酪氨酸酶催化氧化 L-酪氨酸和 L-多巴的半抑制浓度分别为 0.096 mmol/L 和 0.500 mmol/L。应用分子对接解释了对羟基肉桂酸对酪氨酸酶的单酚底物催化活性抑制能力更强、对羟基肉桂酸与铜离子结合后紫外-可见光谱红移以及对羟基肉桂酸与酪氨酸酶结合后荧光强度增加的原因。研究认为,对羟基肉桂酸能竞争性地占据酪氨酸酶活性中心的位置,并与酪氨酸酶中双核铜离子螯合,从而抑制酪氨酸酶的活性。与此同时,部分对羟基肉桂酸同时被催化氧化成具有荧光行为的醌类物质。

参考文献

- [1] Kang Y S, Kim H R, Byun D S, et al. Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga eckloniastolonifera [J]. Archives of Pharmacal Research, 2004, 27(12): 1226-1232
- [2] Kim Y J, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(15): 1707-1723
- [3] Chang T S. An updated review of tyrosinase inhibitors [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(6): 2440-2475
- [4] Khan K M, Maharvi G H, Khan M et al. Tetraketones: a new class of tyrosinase inhibitors [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(2): 344-351

- [5] Sussman AS. The functions of tyrosinase in insects [J]. *The Quarterly Review of Biology*, 1949, 24(4): 328-341
- [6] 孟凤霞,高希武,张岚,等.昆虫酪氨酸酶的研究进展[J].*中国媒介生物学及控制杂志*,2004,15(6):496-499
MENG Feng-xia, GAO Xi-wu, ZHANG Lan, et al. Research progress of tyrosinase in insects [J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2004, 15(6): 496-499
- [7] Xue C B, Luo W C, Ding Q, et al. Quantitative structure-activity relationship studies of mushroom tyrosinase inhibitors [J]. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 2008, 22(5): 299-309
- [8] 赵春贵,张立伟,董建华,等.肉桂酸及其衍生物对活性氧 H_2O_2 清除作用[J].*化学研究与应用*,2004,16(5):685-687
ZHAO Chun-gui, ZHANG Li-wei, DONG Jian-hua, et al. Scavenging effects of the derivants of cinnamic acid on H_2O_2 [J]. *Chemical Research and Application*, 2004, 16(5): 685-687
- [9] Kubo I, Nihei K, Tsujimoto K. Methyl p-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12(20): 5349-5354
- [10] Shi YH, Chen QX, Wang Q, et al. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase [J]. *Food Chemistry*, 2005, 92(4): 707-712
- [11] Prasad KN, Yang B, Yang S, et al. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1): 1-7
- [12] Kubo I, Kinst-Hori I. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(10): 4121-4125
- [13] Kim D, Park J, Kim J, et al. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(3): 935-941
- [14] Wang H R, Zhu W J, Wang X Y. Mechanism of inhibition of arginine kinase by flavonoids consistent with thermodynamics of docking simulation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49(5): 985-991
- [15] Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef V S, et al. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 405(1): 227-237
- [16] Davis I W, Baker D. RosettaLigand docking with full ligand and receptor flexibility [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 385(2): 381-392
- [17] Lehrer SS. Solute perturbation of protein fluorescence. Quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion [J]. *Biochemistry*, 1971, 10(17): 3254-3263