

木犀草素对酪氨酸酶活性抑制及构象诱导作用

刘华¹, 李仕祥², 钟业俊^{1,3}, 吴丹²

(1. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西南昌 330047) (2. 江西省食品药品监督管理局, 江西南昌 330029)
(3. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330013)

摘要: 在 37 °C、pH 6.8 的磷酸盐 (100 mmol/L) 缓冲体系中, 采用酶抑制动力学方法, 研究了木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用、抑制类型和抑制动力学常数, 并探讨了木犀草素对酪氨酸酶表面疏水性和二级结构的影响。结果表明, 木犀草素是一种可逆的非竞争型酪氨酸酶抑制剂 (半抑制率 IC₅₀ 为 55.35±1.51 μg/m, 抑制常数 Ki 为 63.57±2.12 μg/mL); 失活动力学时间进程分析表明木犀草素能快速与酪氨酸酶发生作用并迅速降低酶的活性; 荧光光谱分析显示木犀草素能显著增强酪氨酸酶的表面疏水性; 圆二色谱分析表明木犀草素诱导酪氨酸酶的构象伸展和解折叠, 随着木犀草素浓度的增加, α-螺旋含量由 31.3% 逐渐增加到 41.6%, 由此可见木犀草素能够诱导酪氨酸酶的构象发生部分改变, 使酶结构变化而不利于其形成活性中心, 进而降低酪氨酸酶的活力。

关键词: 木犀草素; 酪氨酸酶; 抑制作用; 表面疏水性; 二级结构

文章编号: 1673-9078(2014)7-51-55

Effect of Luteolin on Activity and Conformation of Tyrosinase

LIU Hua¹, LI Shi-xiang², ZHONG Ye-jun^{1,3}, WU Dan²

(1. School of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330047, China)

(2. The Food and Drug Administration of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China)

(3. The National Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330013, China)

Abstract: The effects of luteolin on inhibitory action, inhibitory type and inhibitory kinetics of tyrosinase were investigated using the method of enzyme inhibition kinetics in 37 °C, pH 6.8 sodium phosphate buffer (100 mmol/L) system, the changes of surface hydrophobicity and secondary structure of tyrosinase were also probed. The results showed that luteolin was a reversible and noncompetitive inhibitor (the half inhibition concentration (IC₅₀) and inhibition constant (Ki) were obtained to be 55.35 μg/mL and 63.57 μg/mL, respectively). The time-courses analysis of inactivation kinetics indicated that luteolin interacted with tyrosinase quickly and inhibited the activity of enzyme rapidly. Fluorescence spectrum analysis showed that luteolin significantly increased the surface hydrophobicity of tyrosinase. Circular dichroism spectra analysis showed the binding of luteolin to tyrosinase induced the unfolding of conformation and the gradual increase of α-helix content of tyrosinase (from 31.3% to 41.6%). The results of spectra analysis indicated that the binding of luteolin to tyrosinase altered the conformation of tyrosinase which was not conducive to the formation of active center, thereby reducing the activity of tyrosinase.

Key words: Luteolin; Tyrosinase; inhibitory action; surface hydrophobicity; secondary structure

酪氨酸酶 (EC, 1.14.18.1, Tyrosinase) 又称多酚氧化酶, 是一种铜结合蛋白, 其活性中心的双核铜离子 (铜A位点和铜B位点) 在酶催化中起重要作用, 一个位点的铜结合可以促进另一个位点的铜结合, 组氨酸在铜B位点协调结合, 而酪氨酸酶多肽链的适当折叠对铜结合及其催化活性具有调节作用。酪氨酸酶是黑色素生成的关键酶^[1], 广泛存在于微生物、动植物及人

体中^[2~4]。黑色素过度积累与哺乳动物皮肤、毛发的色素沉积及果蔬褐变有着重要的关系^[5], 其异常过量表达可导致人体的色素沉着性疾病; 因此, 酪氨酸酶抑制剂受到了国内外学者的广泛关注, 寻找具有特异的、高效的酪氨酸酶抑制剂, 研究抑制作用机理、抑制动力学、以及抑制剂的应用是迫切需要的。

酪氨酸酶抑制剂可以治疗常见的色素沉着性皮肤病如雀斑、黄褐斑、老年斑。目前市场上流行的美白化妆品中的维生素C、曲酸及其衍生物等均为酪氨酸酶抑制剂, 主要是通过抑制酪氨酸酶的活性而达到抑制黑色素合成, 进而发挥美白的作用。然而, 曲酸等虽对酪氨酸酶具有较强的抑制效果, 但容易引起部份人群皮肤过敏, 因而开发无毒副作用的天然酪氨酸酶抑

收稿日期: 2014-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360205)

作者简介: 刘华 (1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事天然活性物质的研究与开发

通讯作者: 钟业俊 (1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事食物资源的开发与利用研究

制剂尤为重要。木犀草素 (Luteolin, 图1) 是一种黄酮类化合物, 通常以糖基化的形式存在于芹菜、紫苏叶、绿胡椒及紫菀茶中, 而在紫苏子和荷兰芹中却以苷元的形式存在^[6]。木犀草素具有抗诱变、抗肿瘤、抗感染、抗过敏等药理活性, 并被认为是羟基的自由基清除剂及蛋白激酶C的抑制剂。最近研究表明, 木犀草素还具有抑制恶性肿瘤细胞和抑制人肥大细胞活化的作用^[7-8]。因此, 本文以木犀草素为抑制剂, 研究了木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用、抑制类型和抑制动力学常数, 探讨了木犀草素诱导下酪氨酸酶的构象变化, 为木犀草素在食品、医药及化妆品等领域的开发和应用提供基础数据。

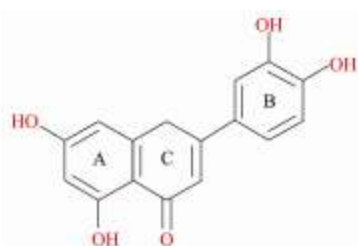


图1 木犀草素的分子结构式

Fig.1 Structure of luteolin

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: F-4500 型荧光光度计, 日本日立公司; UV-2450 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; pH S-3C 型酸度计, 上海雷磁仪器厂; MOS 450 型圆二色谱仪, 法国 Bio-Logic 公司。

试剂: 木犀草素、L-多巴、曲酸 (分析纯), 阿拉丁试剂; 8-苯胺基-1-萘磺酸 (ANS)、酪氨酸酶 (3610 U/mg), Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用

酪氨酸酶活性的测定是基于酶催化底物 L-多巴产生多巴醌在 475 nm 处有特征吸收峰^[9], 通过关系式: 相对活性 (%) = $(R/R_0) \times 100\%$ 测定木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用, 式中 R_0 为无抑制剂时的吸光度变化的斜率, R 为在含有不同浓度木犀草素的体系中的吸光度变化的斜率。在本实验中, 我们利用紫外分光光度计的动力学/时间软件, 把木犀草素和酪氨酸酶在 37 °C 下, pH 6.8 的磷酸盐 (100 mmol/L) 缓冲体系中下孵化 3 h 后, 加入底物 L-多巴, 测定在 475 nm 处的吸光度的变化, 来计算木犀草素对酪氨酸酶的抑制活性; 在测定体系中, 固定底物 L-多巴的浓度, 测

定不同浓度酪氨酸酶和木犀草素浓度下, 根据酶浓度对酶促反应速度的影响来判断木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用类型。

1.2.2 木犀草素对酪氨酸酶的抑制动力学研究

在测木犀草素抑制酪氨酸酶活体系中, 固定加入酶量, 改变底物 L-多巴的浓度, 测定酪氨酸酶在木犀草素浓度下的催化活力。以酶反应的最大初速度的倒数对底物浓度的倒数作图, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 可以判断儿茶素对该酶的抑制作用类型。

1.2.3 木犀草素对酪氨酸酶的表面疏水性的影响

酪氨酸酶和疏水性荧光探针 ANS 在在 37 °C, 相同的缓冲体系中混合 30 min 后, 激发波长 390 nm, 400~600 nm 扫描, 测定不同浓度的木犀草素存在下对 ANS-酪氨酸酶体系的荧光光谱的影响。

1.2.4 圆二色光谱的测定

将不同浓度的木犀草素加入到酪氨酸酶的溶液中, 混合均匀, 以 pH 6.8 的磷酸盐 (100 mmol/L) 缓冲液做空白, 在 37 °C 下测定样品溶液的圆二色光谱。

1.3 数据分析

实验重复三次 (n=3), 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 木犀草素对酪氨酸酶活性的抑制作用

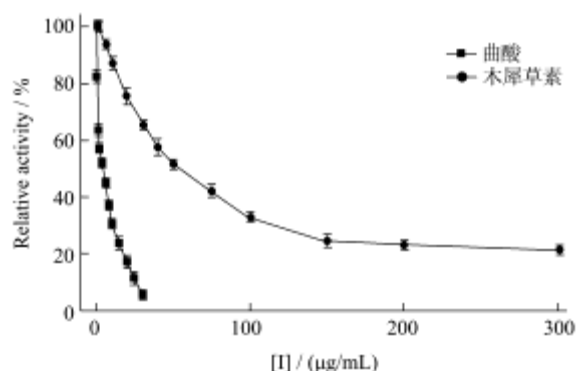


图2 木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用

Fig.2 Effect of luteolin on the inhibition of tyrosinase

注: c (酪氨酸酶) = 1 μg/mL, c (L-多巴) = 2×10^{-3} mol/L, (n=3)。

图2所示, 随着木犀草素浓度的增加, 酪氨酸酶的活性不断下降, 直到木犀草素的浓度达到 150 μg/mL 后, 酪氨酸酶的相对活性趋于平缓, 表明木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用具有浓度依赖性。解析显示木犀草素的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 55.35 ± 1.51

μg/mL, 表明木犀草素对酪氨酸酶有一定的抑制作用, 这与文献报道一致^[10]。通过对比, 不难发现木犀草素的抑制能力不如曲酸 (IC₅₀ 为 4.53±0.22 μg/mL), 但这并不妨碍其作为天然无毒酪氨酸酶抑制剂的研究前景, 类似研究早有报道, 如韦星船等^[11]研究表明姜黄素和熊果苷 IC₅₀ 是曲酸 IC₅₀ 的 3.3 倍和 142.7 倍, 金一琼等^[12]报道阿魏酸的 IC₅₀ 是曲酸的 461.0 倍; 此外, 一些植物提取物的抑制活性也没有达到曲酸的抑制水平, 如夏枯草总黄酮 IC₅₀ 是曲酸的 18.3 倍^[13], 红旱莲总黄酮 IC₅₀ 是曲酸的 14.82 倍^[14], 但由于其安全无毒的优势仍具有很好的开发价值。

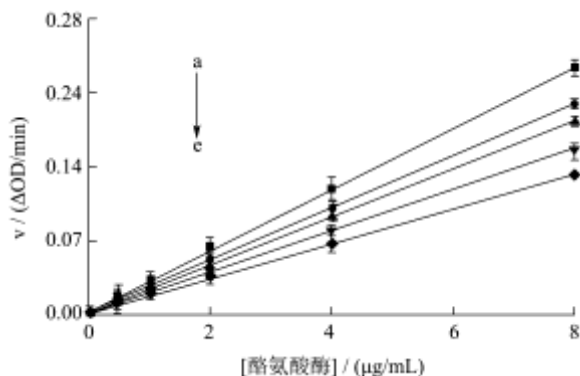


图3 木犀草素对酪氨酸酶的抑制类型

Fig.3 Inhibitory type of luteolin on tyrosinase

注: c (L-多巴) = 2×10⁻³ mol/L, c (木犀草素) / (μg/mL),

a-e: 0, 5, 10, 25, 50 (n=3)。

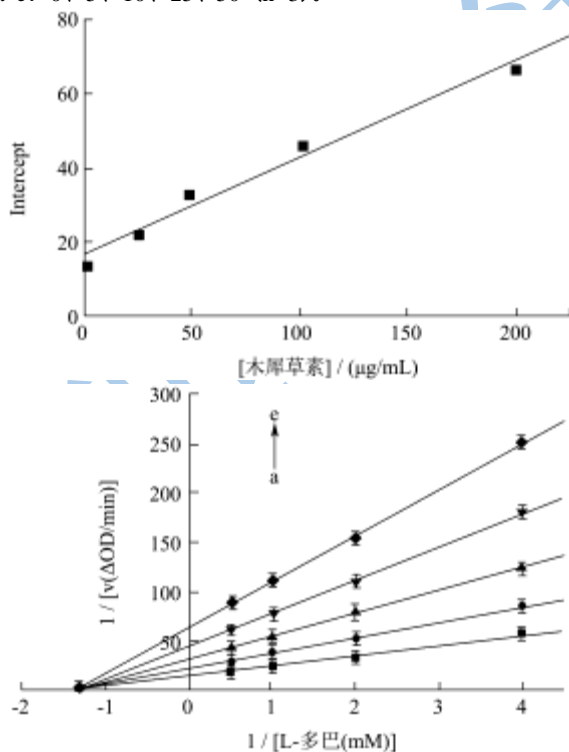


图4 木犀草素抑制酪氨酸酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.4 Lineweaver-Burk plot for inhibition of luteolin on tyrosinase

注: c (酪氨酸酶) = 1 μg/mL, c (木犀草素) / (μg/mL),

a-e: 0, 25, 50, 100, 200 (n=3)。

图3显示了酪氨酸酶的活力与加入的酶量之间的关系, 在含不同浓度的木犀草素的测活体系中, 酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线, 且随着木犀草素浓度的增加直线的斜率不断降低, 也就是说增加木犀草素的浓度是由于酪氨酸酶活力受到抑制, 而不是通过减少有效酶量引起酶活力下降, 这表明木犀草素对酪氨酸酶的抑制作用类型属于可逆的过程^[15]。

2.2 木犀草素对酪氨酸酶抑制动力学研究

在相同实验条件下, 研究不同底物浓度对木犀草素的酪氨酸酶抑制作用的影响, 并通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图, 求得和比较酶催化反应的动力学参数表观米氏常数 (K_{mapp}) 和最大反应速率 (V_{max}), 由图4可以看出, Lineweaver-Burk 双倒数图是相交于横坐标的一组直线, 这表明体系中 K_{mapp} 保持不变, 而 V_{max} 逐渐增大, 这是典型的非竞争性抑制作用类型^[16]。这表明木犀草素可能不会结合到酪氨酸酶的活性中心铜离子上, 不会和底物去竞争活性位点, 但很有可能会结合在铜离子周围的氨基酸残基阻碍酶催化过程中的递电子作用。在此基础上, 通过 Y 轴的截距对不同浓度的木犀草素作图, 求得抑制常数 K_i = 63.57 ± 2.12 μg/mL。

2.3 木犀草素对酪氨酸酶的抑制时间进程的

测定

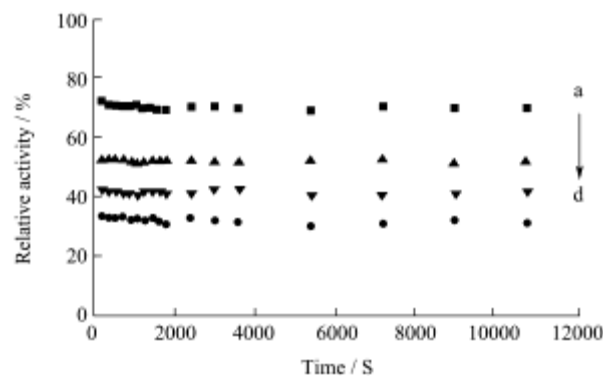


图5 木犀草素对酪氨酸酶的抑制时间进程

Fig.5 Time-course of tyrosinase inhibition in the presence of luteolin

注: c (酪氨酸酶) = 12 μg/mL, c (ANS) = 6×10⁻⁶ mol/L, c (木犀草素) / (μg/mL), a~d: 0, 25, 50, 75, 100。

在相同的缓冲体系下, 每隔 180 s 从不同浓度的木犀草素-酶中取出相同体积的孵化液后, 加入 L-多巴, 测定酶的失活的时间进程。由图5可以看出, 在不同的木犀草素浓度下, 随着孵化时间的增加酶的相

对活性没有发生变化, 这表明木犀草素能轻松的与酪氨酸酶发生相互作用, 并快速的改变酶的生理结构和性质, 最终使酶在短时间内得到抑制, 且相对活性不再随着孵化时间发生变化^[17]。

2.4 木犀草素对酪氨酸酶表面疏水性的影响

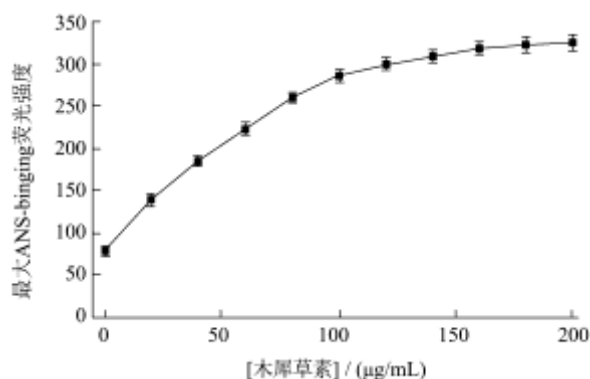


图6 木犀草素对ANS-酪氨酸酶荧光的影响

Fig.6 Effect of luteolin on ANS-binding fluorescence

注: $c(\text{酪氨酸酶})=12 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{ANS})=6 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, ($n=3$)。

进一步探讨木犀草素对酪氨酸酶的抑制机理, 我们初步测定了木犀草素对酪氨酸酶表面疏水性的影响, 图6显示了酪氨酸酶表面疏水体系的荧光光谱, 随着木犀草素浓度的不断增加, 最大ANS-binding荧光强度由 78.6 ± 2.33 增加到 324.8 ± 4.21 , 这表明木犀草素能够明显的增加酪氨酸酶的表面疏水性^[18], 会有更多的ANS结合到酪氨酸酶的疏水性区域; 当木犀草素加入浓度逐渐增大时, 当大于 $150 \mu\text{g/mL}$, 最大ANS-binding荧光强度的增加趋于平缓, 和酶失活测定相比(图2), 木犀草素对酪氨酸酶表面疏水性的影响也存在浓度依赖关系, 这可能表明酪氨酸酶疏水性的增加会使自身的酶活降低, 并且使接近于酪氨酸酶活性位点的内部疏水性区域暴露出来, 诱发了酪氨酸酶的解折叠^[18]。

2.5 木犀草素对酪氨酸酶二级结构的影响

木犀草素会增大酪氨酸酶表面疏水性, 这可能会引起酶的结构发生变化, 这可能也是木犀草素使酪氨酸酶活性降低的重要原因; 应用在线Dichroweb软件计算出酪氨酸酶与木犀草素结合前后的二级结构含量, 所得结果列于表1中。从表中可以看出游离酪氨酸酶的 α -螺旋含量为31.3%, β -折叠t含量为17.1%, 当向酪氨酸酶中加入木犀草素的浓度达到 $160 \mu\text{g/mL}$ 时, α -螺旋含量增加到44.6%, β -折叠含量减小到9.8%, 这表明木犀草素诱导酪氨酸酶构象发生了部分变化, 并且随着 α -螺旋含量的不断增加, 酪氨酸酶的

结构变得紧密而不利于酶形成活性中心, 致使酪氨酸酶的活力下降^[19], 从而起到抑制的效果。

表1 木犀草素对酪氨酸酶的二级结构的影响

Table 1 The contents of different secondary structures of tyrosinase in the presence of luteolin

[木犀草素]	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
0	31.3±1.1	17.1±0.7	20.2±0.5	31.4±1.2
20	34.5±0.6	15.3±2.3	20.7±0.7	29.5±1.0
40	38.3±1.1	12.1±1.5	21.7±1.1	27.9±1.0
80	42.7±0.5	10.4±1.2	21.8±1.3	25.1±0.7
160	44.6±1.2	9.8±0.7	22.1±1.2	23.5±1.3

3 结论

研究表明, 木犀草素是一种可逆的非竞争性酪氨酸酶抑制剂, 其半抑制率 $IC_{50}=55.35 \pm 1.51 \mu\text{g/mL}$, 抑制常数 $K_i=63.57 \pm 2.12 \mu\text{g/mL}$ 。与阳性对照曲酸相比具有一定的酪氨酸酶抑制作用。木犀草素能增加酪氨酸酶的表面疏水性, 诱发酪氨酸酶的伸展和解折叠, 并且能够诱导酪氨酸酶的构象发生部分变化, 使酶结构紧密而不利于其形成活性中心, 进而降低酶的活力。

参考文献

- [1] 金一琼, 赖富饶, 陈周潭, 等. 米曲霉发酵大米中抗氧化物质对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 796-800
JIN Yi-qiong, LAI Fu-rao, CHEN Zhou-tan, et al. Tyrosinase inhibitory activity of antioxidants in fermented rice by *Aspergillus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(7): 796-800
- [2] Matsuura R, Ukeda H, Sawamura M. Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(6): 2309-2313
- [3] Lu Y H, Lin T, Wang Z T, et al. Mechanism and inhibitory effect of galangin and its flavonoid mixture from alpinia officinarum on mushroom tyrosinase and B16 murine melanoma cells [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2007, 22(4): 433-438
- [4] Yokozawa T, Kim Y J. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(11): 2007-2011
- [5] Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, et al. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69(1): 197-201
- [6] 应景艳, 顾少君, 姚彤伟. 木犀草素(昔)与药物代谢酶相互作用

- 的研究进展[J].药学学报,2008,43(4):335-342
- YING Jing-yan, GU Shao-jun, YAO Tong-wei. Research progress on interactions between luteolin (glucosides) and drug-metabolizing enzyme [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2008, 43(4): 335-342
- [7] Ko W G, Kang T H, Lee S J, et al. Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells [J]. Phytotherapy Research, 2002, 16(3): 295-298
- [8] Kimata M, Shichijo M, Miura T, et al. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E mediated mediator release from human cultured mast cells [J]. Clinical and Experimental Allergy, 2000, 30(3): 501-508
- [9] Chen Q X, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by Quercetin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(14): 4108-4112
- [10] 陈清西,林建峰,宋康康.酪氨酸酶抑制剂的的研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版),2007,46(2):274-282
- CHEN Qing-xi, LIN Jian-feng, SONG Kang-kang. Development of tyrosinase inhibitors [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2007, 46(2): 274-282
- [11] 韦星船,叶海碧,霍梦月,等.吡啶基姜黄素类似物对酪氨酸酶的抑制活性[J].食品科技,2013,38(5):266-269
- WEI Xing-chuan, YE Hai-bi, HUO Meng-yue, et al. Tyrosinase inhibitory activity of pyridyl asymmetrical curcumin analogs [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(5): 266-269
- [12] 金一琼,陈周谭,赖富饶,等.曲酸与阿魏酸对酪氨酸酶的抑制作用研究[J].现代食品科技,2012,28(4):378-381
- JIN Yi-qiong, CHEN Zhou-tan, LAI Fu-rao, et al. Evaluation and applications of inhibitory effects of kojic acid and ferulic acid on tyrosinase [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(4): 378-381
- [13] 闫家凯,张国文,周佳.光谱法研究夏枯草黄酮对酪氨酸酶的抑制作用[J].分析试验室,2013,32(2):17-21
- YAN Jia-kai, ZHANG Guo-wen, ZHOU Jia. Spectroscopic studies of inhibitory effect on tyrosinase of *Prunella vulgaris* L. flavonoids [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2013, 32(2): 17-21
- [14] 张国文,周佳,刘钰红.红旱莲黄酮的色谱分析及酪氨酸酶抑制作用[J].南昌大学学报(理科版),2013,37(5):448-451
- ZHANG Guo-wen, ZHOU Jia, LIU Yu-hong. Chromatographic analysis of total flavonoids from *Hypericum ascyron* L. and its tyrosinase inhibitory effect [J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2013, 37(5): 448-451
- [15] Seong H J, Young B R, Marcus J C L, et al. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(4): 1195-1203
- [16] Lin C M, Chen C S, Chen C T, et al. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 294(1): 167-172
- [17] Lu Z R, Shi L, Wang J, et al. The Effect of trifluoroethanol on tyrosinase activity and conformation: Inhibition kinetics and computational simulations [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(7): 1896-1908
- [18] Si Y X, Wang Z J, Daeui Park, et al. Effect of hesperetin on tyrosinase: Inhibition kinetics integrated computational simulation study [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(1): 257-262
- [19] 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
- QIAO Wei, WUXiao-qin, LI Feng, et al. Tyrosinase inhibition by benzaldehyde and its Analogs [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(5): 41-44