

槟榔花沸水提取物对酪氨酸酶抑制作用的研究

程芳芳^{1,2}, 海洪^{1*}, 黄玉林², 张春梅³, 陈卫军^{2*}

1 桂林理工大学, 化学与生物工程学院, 广西桂林 541004

2 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339

3 湖南农业大学, 园林园艺学院, 湖南长沙 410128

摘要 在 pH=6.8 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲体系中, 采用酶动力学方法研究了槟榔花沸水提取物(BWE)对酪氨酸酶活力的抑制作用。结果表明, BWE 对酪氨酸酶的活性有良好的抑制作用, 其 IC_{50} 值为 0.77 mg/mL。BWE 对酪氨酸酶的抑制作用表现为非竞争性抑制, 表观米氏常数(K_m)为 0.35 mM, 抑制常数(K_i)为 0.13 mg/mL。

关键词 槟榔花沸水提取物; 酪氨酸酶; 抑制作用; 动力学

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2010.11.11

中图分类号 S59

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1, tyrosinase)又称为多酚氧化酶、儿茶酚氧化酶等, 是结构复杂的多亚基含铜氧化还原酶^[1], 也是生物体合成黑色素的关键酶和限速酶, 在合成过程的多个反应步骤中起关键作用, 广泛存在于微生物^[2-3]、动植物^[4-5]及人体中^[6-7]。在人体中, 酪氨酸酶活性与黑色素合成量呈正相关关系, 酪氨酸酶的活性不仅决定黑色素合成的速率, 还是黑色素细胞分化成熟的特征性标志。在植物中, 酪氨酸酶对类黄酮、紫胶、鞣酸、酚类、生物碱等的生物合成起重要作用, 且在植物的新陈代谢, 如呼吸系统、中间物质的代谢、氧化还原电位的调整和植物的伤口愈合中发挥着重要的作用^[8-9]。在微生物体内, 由于酪氨酸酶的存在, 很多微生物才能以单酚、二元酚以及联苯酚作为自己的能量物质^[10]。因此, 微生物中的酪氨酸酶可用来降解酚类废物和处理含酚废水。目前, 酪氨酸酶抑制剂已被广泛用于果蔬保鲜、化妆品添加剂^[11]和生物农药的杀虫剂添加物^[12]等, 因此, 对酪氨酸酶抑制剂的研究已引起国内外的广泛重视。

槟榔居中国四大南药之首, 果实中含有多种人体所需的营养元素和有益物质, 如槟榔油、生物碱、儿茶素和胆碱等成分。槟榔花是槟榔的一种副产物, 一般在夏季采集、晒干、去梗后保存。槟榔花的花期长、开花多、粉源丰富, 泌蜜芳香、味淡、性凉, 化学成分比均衡。《中药志》记载: 槟榔花可增加机体 SOD 酶的活性、调节免疫系统, 对人体新陈代谢、生长发育有着重要的营养和调节作用, 具有独特的食疗和保健功效, 素以“微型营养品”、“长寿食品”著称。而在海南民间常用来作保健食品原料, 广受人们喜爱。然而, 目前有关槟榔花生物活性的研究较少, 尤其以槟榔花提取物作为酪氨酸酶的抑制剂, 国内外尚未见报道。本文以槟榔花沸水提取物为效应物, 研究了其对酪氨酸酶催化反应的影响及抑制作用动力学特征, 以为开发槟榔花的各种功能性产品提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 材 料 槟榔花由中国热带农业科学院椰子研究所提供。

基金项目: 海南省重点科技资助项目(No. 090138); 海南省自然科学基金(No. 310101)资助

第一作者简介: 程芳芳, 男, 1986 年生, 硕士研究生。研究方向: 生物化学 E-mail: cff19851009@yeah.net

* 通讯作者, 海洪, 男, 1978 年生, 副教授, 硕士。研究方向: 天然产物化学。E-mail: honghai@glute.edu.cn; 陈卫军, 男, 1975 年生, 副研究员, E-mail: chenwj@nwu.edu.cn

收稿日期: 2010-07-27

修回日期: 2010-09-30

1.1.2 试剂 酪氨酸酶为 Sigma 化学公司的蘑菇酪氨酸酶, 比活力为 3 320 U/mg。3, 4-二羟基苯氨酸 (L-DOPA) 为 sigma 化学公司生产的分析纯试剂。磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为国产分析纯试剂。实验用水均为去离子水。

1.1.3 仪器 Schott Uviline 9400 紫外可见分光光度计(德国)。

1.2 样品制备

将采摘的槟榔花放入 60 °C 烘箱中干燥 48 h。干燥后的槟榔花与沸水按照 1:10(W/W) 的比例充分混合后 100 °C 水浴提取 30 min, 真空抽滤, 合并三次滤液。常温下将混合物以 12 000 r/min 离心 30 min, 再于 50 °C、50 Mpa 下旋转蒸发至恒重后置于 4 °C 冰箱中保存备用。准确称量样品 0.16 g, 用去离子水溶解后定溶于 100 mL 的容量瓶中, 质量浓度为 1.6 mg/mL。

1.3 样品对酪氨酸酶活性的抑制

在酪氨酸酶反应生成黑色素的过程中, 酪氨酸酶的催化作用主要发生在酪氨酸转化为多巴以及多巴转化为多巴醌这两个反应中。多巴醌是有色物质, 可用分光光度计(475 nm)测定^[13]。酪氨酸酶反应活性 (ACT) 定义: 以每分钟多巴色素在 475 nm 波长的吸光度 (OD_{475}) 增加 0.001 为一个酶活力单位, 即 1 U/min。因此, 通过测定酶催化反应体系的 OD_{475} 变化的时间增长直线, 从直线斜率即可求得酶活力。

1.3.1 酪氨酸酶活力的测定 以终浓度为 0.5 mmol/L 的 L-DOPA 为底物。先将 0.5 mL 初始浓度为 5 mmol/L 的 L-DOPA (溶于 pH=6.8 的磷酸盐缓冲溶液) 分别置于比色管中, 向其中加入一定体积的 BWE, 最后用 pH=6.8 的磷酸盐缓冲溶液定容至 4.9 mL, 在 30 °C 恒温水浴中恒温 3 min, 加入 0.1 mL 0.15 g/L 酪氨酸酶水溶液, 反应液的终体积为 5.0 mL, 酶的终质量浓度为 3 mg/L, 在 8 min 内每隔 1 min 测定反应液 OD_{475} 值。

1.3.2 不同浓度 BWE 对酪氨酸酶活力的影响 按照对酪氨酸酶活力的测定方法, 向各体系中加入 BWE 的体积依次为 0、0.5、1.0、1.5 mL, 其终浓度依次为 0、0.16、0.32、0.48 mg/mL, 分别测定各反应液的 OD_{475} 值。

1.3.3 BWE 对酪氨酸酶的相对抑制率 (I%) 的测定 根据酶反应活性的定义, 在一定的抑制剂浓度下, 酶反应活性表示为 ACT_i , 在没有抑制剂时酶反应活性表示为 ACT_0 , 则 BWE 对酪氨酸酶的相对抑制率 (I%) 可以定义为式(1):

$$I(\%) = (1 - ACT/ACT_0) \times 100\% = [1 - (OD_A - OD_B)/(OD_C - OD_D)] \times 100\% \quad (1)$$

其中, 组分 A 有底物 L-DOPA、酪氨酸酶, 无 BWE; 组分 B 有底物 L-DOPA, 无底物酪氨酸酶、BWE; 组分 C 有底物 L-DOPA、酪氨酸酶和 BWE; 组分 D 有底物 L-DOPA、BWE, 无酪氨酸酶。

按照测定酪氨酸酶活力的实验步骤, 在 475 nm 下依次测定 OD_A 、 OD_B 、 OD_C 和 OD_D 的值, 其中 A、B 两组分中不添加 BWE, B、D 两组分中没有酪氨酸酶, C、D 两组分中添加 BWE 的浓度梯度均为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL。总体方法设计见表 1。

1.4 BWE 抑制酪氨酸酶的动力学

酶抑制动力学参数, 包括表观米氏常数 (K_m)、最大反应速率 (v_m) 和抑制常数 (K_i), 可通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程作图和 Dixon 图获得^[14-15]。本实验在测活体系中, 固定酶的质量浓度为 3 mg/L。改变底物 (L-DOPA) 浓度, 测定不同 BWE 浓度 (C_i) 下的反应初始速率 (v)。在单底物酶促反应中, 酶反应速度 (v) 与底物浓度 (C_s) 之间的关系可用米氏方程表示, 单底物酶促反应的反应速度与底物浓度呈双曲线关系, 通常用双倒数法进行参数估计, 即将米氏方程取倒数: $1/v = 1/v_m + (K_m/v_m) \cdot 1/C_s$, 通过实验将 $1/v$ 对 $1/C_s$ 作图, 可得到一条直线, 即为 Lineweaver-Burk 双倒数图。它在 $1/v$ 轴上的截距是 $1/v_m$, 在 $1/C_s$ 轴上的截距是 $-1/K_m$ 。再以 $1/v$ 为纵坐标, C_i 为横坐标可作出 Dixon 图, 它在 C_i 轴上的截距为 $-K_i$ 。

表 1 反应液的组成

反应液组分/mL	A	B	C	D
槟榔花沸水提取物溶液	—	—	0.5~2.5	0.5~2.5
pH=6.8 的磷酸缓冲液	4.4	4.5	3.9~1.9	4.0~2.0
5 mmol/L 多巴溶液	0.5	0.5	0.5	0.5
0.15 g/L 酪氨酸酶液	0.1	—	0.1	—
总体积	5.0	5.0	5.0	5.0

1.5 数据处理方法

所有数据均用 Excel 软件处理。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 BWE 对酪氨酸酶活力的影响

图 1 所示是以酪氨酸酶质量终浓度为 3 mg/L, L-DOPA 终浓度为 0.5 mmol/L, 不同浓度的 BWE(C_1) 对酪氨酸酶的抑制作用的进程曲线。结果表明, 酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化不存在迟滞效应。在同一反应时间下, 随着 BWE 浓度的增大, 反应液的吸光度不断下降, 即酪氨酸酶催化氧化 L-DOPA 的速率不断降低, 说明 BWE 具有抑制酪氨酸酶活性的能力。图 2 为不同浓度的 BWE (C_1) 对酪氨酸酶的相对抑制率 (K_1) 的影响曲线, 可以看出随着 BWE 浓度的增大, 对酪氨酸酶的相对抑制率升高, 当相对抑制率达到 50% 时 BWE 的当量浓度 (IC_{50}) 为 0.77 mg/mL。

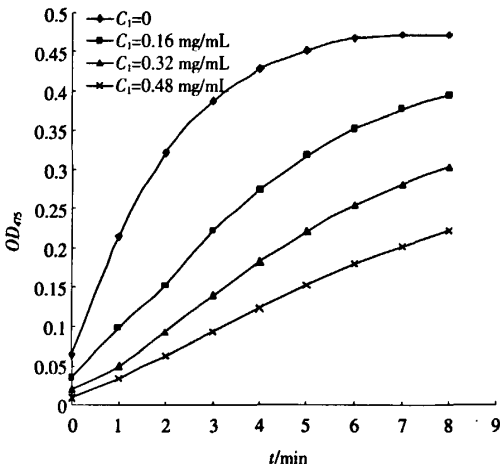


图 1 槟榔花提取物抑制酪氨酸酶进程曲线

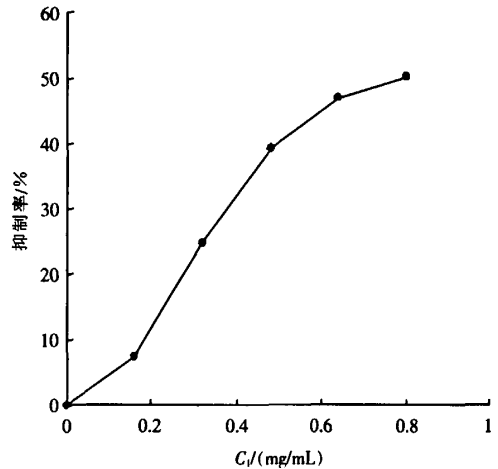


图 2 槟榔花提取物对酪氨酸酶催化反应的抑制率的影响

2.2 BWE 抑制酪氨酸酶的动力学

Lineweaver-Bufk 双倒数图和 Dixon 图分别如图 3 和图 4 所示。由图 3 可知, Lineweaver-Burk 取双倒数图为相交于横轴的一点的一组直线。随着 BWE 浓度的增大, 直线横轴截距基本不变, 而纵轴截距和直线斜率成相同比例增大, 即纵轴截距和直线斜率之比不变, 符合非竞争性可逆抑制类型的特征。根据图 3 可得到米氏方程、 K_m 和 v_m 。而由表 2 可知, 随着 BWE 浓度增大, K_m 值基本相同, v_m 则不断降低。根

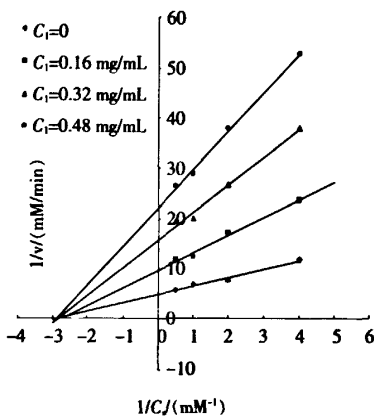


图 3 槟榔花提取物对酪氨酸酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

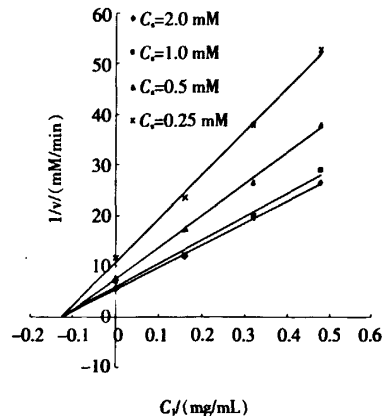


图 4 槟榔花提取物对酪氨酸酶抑制作用的 Dixon 曲线

表 2 槟榔花提取物对酪氨酸酶的抑制动力学参数

$C/(mg/mL)$	Michaelis-Menten 方程	K_m/mM	v_{max}/mM	$K_i/(mg/mL)$
0	$1/v=1.6586/C_s+4.9226$	0.34	0.045	
0.16	$1/v=3.5038/C_s+9.6678$	0.36	0.064	0.13
0.32	$1/v=5.4965/C_s+15.697$	0.35	0.103	
0.48	$1/v=7.6388/C_s+22.145$	0.34	0.203	

据图 4, 由直线在纵轴上的截距除以直线的斜率可以计算出非竞争性可逆抑制剂的抑制常数(K_i)^[16]。同时, 随着 BWE 浓度增大, K_i 值基本相同。

3 讨论与结论

酪氨酸酶的活性与黑色素的生成有密切关系。在机体内, 它能将 L-酪氨酸(L-Tyrosine, L-Tyr)羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸(L-多巴, L-DOPA), 再将多巴氧化成多巴醌, 进而生成一系列能引起褐化的色素类物质^[17]。在此过程中, 酪氨酸酶可提供氧负离子^[18], 并通过氧负离子的引发^[19]和酪氨酸酶的催化作用使酪氨酸逐步氧化, 最终形成黑色素。因此, BWE 对酪氨酸酶的抑制作用机制可推断如下: 在酪氨酸酶的催化氧化过程中, 氧负离子既是引发剂又是反应物, 因此 BWE 对氧负离子的清除作用既阻断了反应的引发, 也削弱了酪氨酸酶的供氧作用, 从而使酪氨酸氧化反应的强度减弱, 即削弱了酪氨酸酶的作用。

本研究结果表明, 槟榔花提取物对酪氨酸酶的抑制作用表现为非竞争性抑制类型, 抑制常数(K_i)为 0.13 mg/mL, 对酪氨酸酶的相对抑制率达到 50% 的槟榔花提取物的浓度(IC_{50})为 0.77 mg/mL, 比银杏外种皮水提取物($IC_{50}=2.25$ mg/mL)^[20]要低得多, 是一种有市场潜力的酪氨酸酶抑制剂。

酪氨酸酶抑制剂可用来预防和治疗色素沉着和黑色素瘤等疾病^[21]。目前, 氢醌、果酸、维生素 C、曲酸和熊果甙等酪氨酸酶抑制剂已作为美白剂应用于化妆品中, 但氢醌和果酸刺激性大, 而维生素 C 和曲酸易氧化, 因保质期短已逐渐被淘汰^[22]。而 BWE 不仅对酪氨酸酶活性具有抑制作用, 并且对酪氨酸酶活性的抑制效率呈剂量依赖性关系, 随着 BWE 含量的增加, 对酪氨酸酶活性的抑制效率也逐步增加。其原因可能在酪氨酸生成多巴继而生成多巴醌的过程中, BWE 抑制了酪氨酸酶的促进作用。因此, 槟榔花有望作为一种新型的天然植物源美白剂, 如将其活性成分添加到各种霜膏中, 制成护肤、抗衰老和祛斑的功能性化妆品, 在药用和化妆品行业将具有良好的开发应用前景。

参 考 文 献

- [1] Sánchez-Ferrera A, Rodríguez-López, García-Cánovas F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1995, 1247: 1-11.
- [2] Katz E, Thompson C J, Hopwood D A. Cloning and expression of the tyrosinase gene from streptomyces antibioticus in streptomyces lividans[J]. *Journal of General Microbiology*, 1983, 129: 2703-2714.
- [3] 彭方, 王伟, 彭珍荣. 高产黑色素微生物资源的研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 1996(4): 1-4.
- [4] 杨舒黎, 舒文, 毛华明, 等. 云南地区乌骨绵羊黑色素的初步研究[J]. *畜牧与兽医*, 2006(3): 17-20.
- [5] 谭兴杰, 李月标. 荔枝果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质[J]. *植物生理学报*, 1984(4): 339-345.
- [6] Van gelder C W G, Flurkey W H, Wichers H J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases[J]. *Phytochemistry*, 1997: 1309-1323.
- [7] 鲜军舫, 王振常, 燕飞, 等. 眼色素膜黑色素瘤的 CT 与 MRI 研究[J]. *中华放射学杂志*, 1998(03): 158-161.
- [8] Vaughn K C, Lax A R, Duke S O. Polyphenol oxidase: the chloroplastoxidase with no established function[J]. *Physiol plant*, 1988, 72: 659-665.
- [9] Mayer A M. Polyphenol oxidases in plants: recent progress[J]. *Phytochemistry*, 1987, 26: 11-20.
- [10] Lerch K, Ettlinger L. Purification and characterization of tyrosinase from streptomyces glaucescens[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1972, 31: 427-437.

- [11] 宋康康, 邱凌, 黄瑛, 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): 791-794.
- [12] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [13] 宁岭, 魏少敏, 王纪文, 等. 美白化妆品添加剂效能的实验研究[J]. 日用化学工业, 2000, 30(3): 12-13.
- [14] Chen Q X, Song K K, Wang Q, *et al.* Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. *J of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2003, 18(6): 491-496.
- [15] 吴坤, 闵航, 朱显峰, 等. 杂色云芝漆酶的分离、纯化和酶学特性研究[J]. 高校化学工程学报, 2003, 17(2): 173-179.
- [16] 臧荣春, 夏凤毅. 微生物动力学模型[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [17] 徐迪, 马林, 古练权, 等. 酪氨酸酶催化氧化羟基吡啶类化合物的反应研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002(41): 33-35.
- [18] 王夔. 生命科学中的微量元素[M]. 北京: 中国计量出版社, 1989.
- [19] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J N, Garcia-Canovas F, *et al.* Tyrosinase: a review of its mechanism[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1247(1): 1-11.
- [20] 王勤, 钟雪, 邱凌, 等. 银杏外种皮提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 广西植物, 2008, 28(3): 379-381.
- [21] 邹先伟, 蒋志胜. 植物源酪氨酸酶抑制剂研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(6): 702-705.
- [22] 汪吕国, 金抒, 李华山. 皮肤美白剂进展[J]. 日用化学工业, 2002, 32(4): 56-60.

Inhibitory Effect of Areca Inflorescence Boiling Water Extracts on Tyrosinase-catalyzing Reaction

Cheng Fangfang^{1,2}, Hai Hong¹, Huang Yulin², Zhang Chunmei³, Chen Weijun²

1 College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004;

2 Coconut Research Institute, CATAS, Wenchang, Hainan 571339;

3 College of Landscape and Horticulture, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128, China

Abstract The inhibitory effect of areca inflorescence boiling water extracts (BWE) on the activity of tyrosinase was studied via enzymological kinetic method with $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ as buffer solution (pH=6.8) at ambient temperature. It was found that BWE could effectively inhibit the activity of tyrosinase. The BWE concentrations corresponding to 50% inhibitory rate (IC_{50}) was 0.77 mg/mL for tyrosinase. The inhibition kinetics of BWE analyzed by Lineweaver-Burk plots demonstrated that the inhibition effect of BWE for the oxidation of L-DOPA expressed as what a noncompetitive inhibitor does. The apparent Michaelis constant K_m and the inhibition constant of noncompetitive reversible inhibitor K_i was determined to be 0.35 mmol/L and 0.13 mg/mL, respectively.

Keywords Areca inflorescence boiling water extract; Tyrosinase; Inhibitory effect; Kinetics

责任编辑: 叶庆亮