

文章编号: 1673-1689(2011)04-0632-04

# 白藜芦醇对酪氨酸酶体外抑制活性的动力学研究

杨阳<sup>1</sup>, 鲁军<sup>2</sup>, 孙冰洁<sup>1</sup>, 王丹, 尹晓燕<sup>1</sup>, 任迪峰\*<sup>1</sup>

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100027)

**摘要:** 在 30 ℃, pH 6.8 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的缓冲体系中, 采用酶促动力学方法, 研究了白藜芦醇对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的抑制作用。结果表明, 白藜芦醇对酪氨酸酶、单酚酶和二酚酶均有抑制作用, 对单酚酶抑制活性的  $\text{IC}_{50}$  值(抑制率达到 50% 时的白藜芦醇质量浓度)约为 5.1 mg/mL, 对二酚酶抑制活性的  $\text{IC}_{50}$  值约为 5.6 mg/mL。此外, 白藜芦醇可延长单酚酶的迟滞效应, 8 mg/mL 的白藜芦醇能使迟滞时间从 22 s 延长至 62 s, 而对二酚酶则无此迟滞作用。Lineweaver-Burk 图分析表明, 白藜芦醇对酪氨酸酶的抑制作用为混合型抑制, 对游离酶的抑制常数( $K_i$ )和对酶-底物络合物的抑制常数( $K_{is}$ )分别为 3.4 mg/mL 和 35.98 mg/mL。

**关键词:** 白藜芦醇; 酪氨酸酶; 抑制活性; 酶促动力学

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

## Inhibitory Kinetics Study of Resveratrol on Tyrosinase Activity in Vitro

YANG Yang<sup>1</sup>, LU Jun<sup>2</sup>, SUN Bing-jie<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>,  
YIN Xiao-yan<sup>1</sup>, REN Di-feng\*<sup>1</sup>

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

**Abstract:** The inhibitory effect of resveratrol on the activity of monophenolase and diphenolase existing in tyrosinase was investigated by the enzymatic kinetic method at 30 ℃ in a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer system (pH 6.8). The results indicated that resveratrol could inhibit both the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase, and the  $\text{IC}_{50}$  values (resveratrol concentration corresponding to 50% inhibitory rate) were 5.1 mg/mL and 5.6 mg/mL, respectively. Furthermore, resveratrol could extent the lag time of monophenolase for oxidation of L-tyrosine, of which 8 mg/mL of resveratrol prolonged the lag time from 22 s to 62 s, while no such effect was observed on diphenolase. According to the Lineweaver-Burk plot, resveratrol was found to be a mixed inhibitor for the oxidation of L-DOPA, and the equilibrium constants for binding with free enzyme  $K_i$  and with enzyme-substrate complex  $K_{is}$  were 3.4 mg/mL and 35.98 mg/mL, respectively.

**Key words:** resveratrol, tyrosinase, inhibitory activity, enzymatic kinetics

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(T D2010-3、BLYX200935)、第 38 批留学回国人员科研启动基金。

\* 通信作者: 任迪峰(1973-), 女, 湖南岳阳人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品生物技术与营养研究。Email: rendifeng@163.com

酪氨酸酶(Tyrosinase)是由二价铜离子与酶蛋白结合的金属酶,是生物体合成黑色素的关键酶<sup>[1,2]</sup>,可催化含酚基化合物(如酪氨酸、酚类化合物等)氧化成多巴醌,经一系列中间反应后形成黑色素,而黑色素的合成、分布与哺乳动物皮肤、毛发的色素沉积直接相关<sup>[3,4]</sup>,与果蔬褐变也有着重要的关系<sup>[5]</sup>。因此,通过筛选合成酪氨酸酶抑制剂,抑制酪氨酸酶的活性来控制黑色素的合成,已成为防止果蔬褐变、色斑治疗及美白化妆品研制的一种重要途径。

由于天然植物资源来源广泛、安全性高,从植物来源中分离提取正成为开发酪氨酸酶抑制剂的热点。国内外已有研究从多种植物中分离出效果显著的黄酮多酚类酪氨酸酶抑制剂,如山奈酚<sup>[6,7]</sup>、槲皮素<sup>[8,9]</sup>、花蜜粉提取物等<sup>[10]</sup>。白藜芦醇是一种二苯乙烯类化合物,在自然界分布广泛,其中以虎杖、葡萄、花生等植物中含量居多。作为一种天然产物,白藜芦醇对人体有着重要的生理和医疗保健功能,如抗癌、抗肿瘤、调节血脂代谢、保护心血管、抗氧化、消炎、保肝、雌激素调节等作用<sup>[11]</sup>。然而,目前仍未见有关其酪氨酸酶抑制活性的研究报告。作者对白藜芦醇的酪氨酸酶抑制活性进行测定,以白藜芦醇为效应物,研究其对酪氨酸酶催化活性的影响,从而为推进白藜芦醇在功能性食品和祛斑、美白化妆品等医药制剂上的进一步应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与仪器

蘑菇酪氨酸酶(比活力4276 U/mg)、3,4-二羟基苯胺(L-DOPA)、L-酪氨酸:购自美国Sigma化学公司;白藜芦醇:购自中国标准物质网;二甲基亚砜(DMSO)、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠:购自北京蓝弋化学试剂公司;蒸馏水:为去离子重蒸水。

752型紫外可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司产品;恒温箱:北京苏瑞试验设备有限公司产品。

### 1.2 单酚酶活力的测定

酪氨酸酶催化L-酪氨酸、L-DOPA的产物多巴色素在475 nm处有最大吸收。用酪氨酸酶多巴速度氧化法,通过测定酶催化反应体系的 $A_{475\text{ nm}}$ 随着时间的增长直线,从直线斜率即可求得酶活力。以1.5 mmol/L L-酪氨酸为底物。先将0.9 mL 5 mmol/L L-酪氨酸溶于磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8)于比色杯中,加入1.92 mL磷酸盐缓冲溶液

(pH 6.8),在30℃恒温箱中恒温10 min,然后加入0.12 mL不同浓度的白藜芦醇溶液(溶于DMSO)和0.06 mL 0.232 g/L酪氨酸酶水溶液,混匀,立即测定 $A_{475\text{ nm}}$ 。每个样品做3个平行样,以没有加酪氨酸酶的为空白样。在此测活体系中,酶的终质量浓度为4.64 mg/L。

### 1.3 二酚酶活力的测定

以1.5 mmol/L L-DOPA为底物。先将0.9 mL 5 mmol/L L-DOPA溶于磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8)于比色杯中,加入1.86 mL磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8),在30℃恒温箱中恒温10 min,然后加入0.12 mL不同质量浓度的白藜芦醇溶液(溶于DMSO)和0.12 mL 0.232 g/L酪氨酸酶水溶液,混匀,立即测定 $A_{475}$ 。每个样品做3个平行样,以没有加酪氨酸酶的为空白样。在此测活体系中,酶的终质量浓度为9.28 mg/L。

相对酶活力按式(1)进行计算:

$$\text{相对酶活力}(\%) = \frac{(A_1 - A_0)}{(A_2 - A_0)} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A_1$ 是含有底物、酪氨酸酶、白藜芦醇的测活体系反应4 min时的吸光度值; $A_2$ 是含有底物、酪氨酸酶,但不含白藜芦醇的测活体系反应4 min时的吸光度值; $A_0$ 是含有底物,但不含酪氨酸酶、白藜芦醇的测活体系反应4 min时的吸光度值。

### 1.4 酶促动力学分析

研究白藜芦醇对酪氨酸酶的抑制作用类型,以L-DOPA为底物,在测活体系中,固定酶的质量浓度,通过改变底物L-DOPA的浓度,测定不同质量浓度白藜芦醇对酪氨酸酶活力的影响,并采用Lineweaver-Burk双倒数作图法进行酶促动力学分析。在4 mL的比色皿中,加入浓度分别为0.25、0.5、1、2 mmol/L的L-DOPA溶于磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8)0.9 mL,再加1.86 mL的磷酸缓冲液,在30℃恒温箱中恒温10 min,白藜芦醇(溶于DMSO)以不同浓度(0、2、4、6和8 mg/mL)各取0.12 mL放入比色皿中,最后加入酪氨酸酶水溶液,立即混匀,连续记录6 min内的吸光度值。以反应速度倒数( $1/v$ )对底物浓度的倒数( $1/C_s$ )作图,得到Lineweaver-Burk图,对白藜芦醇的抑制类型进行分析,比较酶催化反应动力学参数,包括米氏常数( $K_m$ )、最大反应速率( $V_m$ )。并以Lineweaver-Burk图中各直线斜率和纵轴截距分别对白藜芦醇浓度二次作图,进而求得白藜芦醇对游离酶和对酶-底物络合物的抑制常数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 白藜芦醇对酪氨酸酶单酚酶活力的影响

图1为不同质量浓度的白藜芦醇对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线,反应刚开始时产物生成缓慢,此为迟滞期,到一定时间后,反应速度直线上升达到恒定的速率,到达稳定态,稳定态即为直线部分,迟滞时间为直线部分交于横轴的截距。

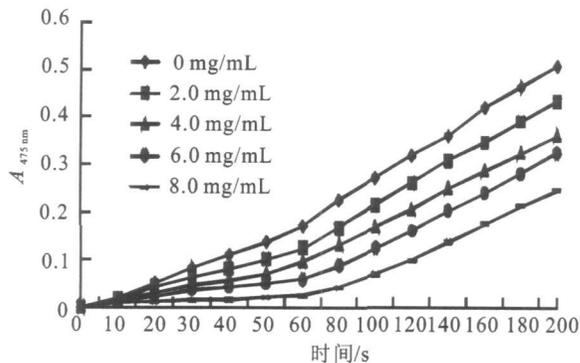


图1 白藜芦醇对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线  
Fig. 1 Time course curve for inhibitory effect of resveratrol on the monophenolase activity of tyrosinase

图1结果表明,白藜芦醇对酪氨酸酶的单酚酶活性有抑制作用,能延长单酚酶反应的迟滞时间,并随白藜芦醇浓度的增大,迟滞时间延长,稳态酶活力下降。迟滞效应是酪氨酸酶催化氧化酪氨酸的典型特征。有研究表明,迟滞时间的长短取决于反应溶液中酶和底物的浓度,另外,加入过度金属离子或者二酚可缩短甚至消除迟滞效应<sup>[12]</sup>。

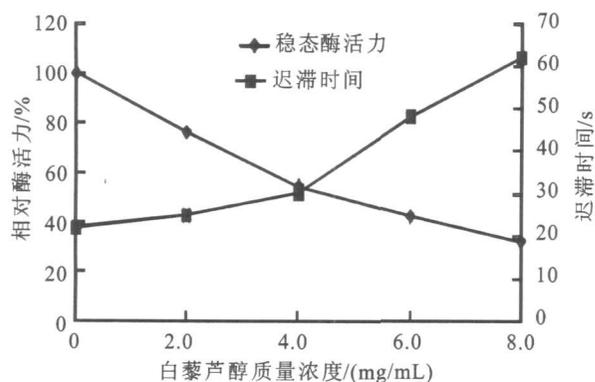


图2 白藜芦醇对酪氨酸酶单酚酶相对酶活力的影响  
Fig. 2 Effects of resveratrol on the relative monophenolase activity of tyrosinase

图2为不同质量浓度的白藜芦醇对稳态酶活力和迟滞时间的影响,结果表明,随着白藜芦醇质量浓度的增大,迟滞时间明显延长:未加白藜芦醇时,迟滞时间为22 s;当加入8 mg/mL的白藜芦醇时,迟滞时间延长至62 s,迟滞时间几乎增加至原来

的3倍,同时稳态酶活力下降了67.4%,可以看出,白藜芦醇具有较大的酪氨酸酶单酚酶抑制活性,IC<sub>50</sub>值约为5.1 mg/mL。

### 2.2 白藜芦醇对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

图3为不同质量浓度的白藜芦醇对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线。结果表明,酪氨酸酶催化氧化L-DOPA的进程曲线是通过原点的直线,不存在迟滞效应,随着加入的白藜芦醇质量浓度的增大,直线的斜率下降,即表明二酚酶催化氧化的速率降低,酶活力下降,白藜芦醇对酪氨酸酶二酚酶活性有抑制作用。

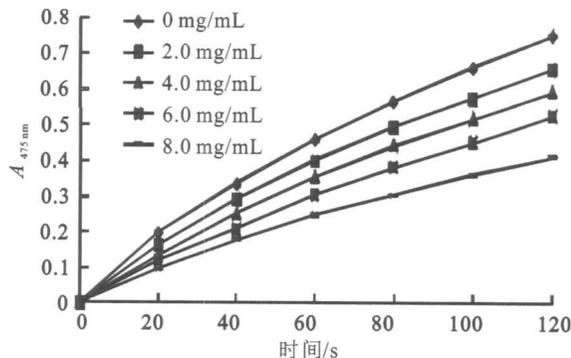


图3 白藜芦醇对酪氨酸酶二酚酶抑制作用的进程曲线  
Fig. 3 Time course curve for inhibitory effect of resveratrol on the diphenolase activity of tyrosinase

图4为不同质量浓度的白藜芦醇对酪氨酸酶二酚酶抑制效应的进程曲线,反应进程是通过原点的直线,二酚酶催化L-DOPA不存在迟滞效应,结果表明,随着白藜芦醇质量浓度的增大,相对酶活力下降,当加入8 mg/mL的白藜芦醇时,酶活力下降了66.1%,可以看出,白藜芦醇具有较大的酪氨酸酶二酚酶抑制活性,IC<sub>50</sub>值约为5.6 mg/mL。

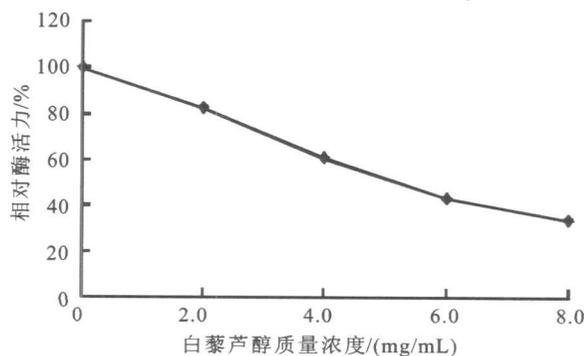


图4 白藜芦醇对酪氨酸酶二酚酶相对酶活力的影响  
Fig. 4 Effects of resveratrol on the relative diphenolase activity of tyrosinase

### 2.3 白藜芦醇对酪氨酸酶的抑制类型

根据Lineweaver-Burk双倒数作图法判断抑制类型,通过作图得到一组相交于第二象限的直线,

说明白藜芦醇作为抑制剂对酪氨酸酶的抑制类型为混合型抑制,即加入的白藜芦醇不仅可以影响酶促反应的最大反应速度( $V_m$ ),还可以影响米氏常数( $K_m$ ):随着白藜芦醇浓度的增大, $K_m$ 值增大 $V_m$ 值下降,说明白藜芦醇既能与游离酶( $E$ )结合,又能与酶-底物络合物( $ES$ )结合。

二次作图,分别以各直线斜率对白藜芦醇质量浓度作图及以各直线与纵轴截距对白藜芦醇质量浓度作图得到回归直线<sup>[13]</sup>,分别求得白藜芦醇对游离酶的抑制常数( $K_I$ )为3.35 mg/mL,对酶-底物络合物的抑制常数( $K_{IS}$ )为35.98 mg/mL。

### 3 结 语

白藜芦醇对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶均有抑制作用,对单酚酶的抑制作用主要表现为酶催化反应迟滞时间的延长,80 mg/mL的白藜芦醇可使单

酚酶的迟滞时间几乎延长至原来的3倍,同时稳态酶活性也下降了80%;对酪氨酸酶的抑制作用表现为混合型抑制,对游离酶的抑制常数( $K_I$ )为3.35 mg/mL,对酶-底物络合物的抑制常数( $K_{IS}$ )为35.98 mg/mL。白藜芦醇对抑制单酚酶、二酚酶活性的 $IC_{50}$ 值分别约为5.1 mg/mL和5.6 mg/mL。

白藜芦醇对酪氨酸酶的抑制作用为白藜芦醇作为酪氨酸酶抑制剂提够了理论支持,为新型酪氨酸酶抑制剂的开发应用提供了新途径。此外,白藜芦醇作为天然产物,来源丰富、安全性高。它不但可用于色素增加性皮肤病(黄褐斑、雀斑等)的临床治疗,而且可用于化妆品使肤色增白,还有可能应用于农业生产上作为一种害虫调控剂和食品工业上作为食品添加剂<sup>[14]</sup>,成为预防果蔬褐变和治疗各种色素病的良好制剂<sup>[15]</sup>,具有广泛的应用价值和广阔的市场前景。

### 参考文献(References):

- [1] Fenol L G, Penalverm J, Rodriguez-Lopez J N, et al. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates[J]. **The International J of Biochem & Biology**, 2004, 36(2): 235-246.
- [2] Kubo I, Chen Q X, Nihei K, et al. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors[J]. **Food Chemistry**, 2003, 81(2): 241-247.
- [3] Seiberg M, Paine C, Sharlow et al. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening[J]. **Invest Dermatol**, 2000, 115: 162-167.
- [4] Schaffer J V, Bologna J L. The melanocortin-1-receptor: red hair and beyond[J]. **Arch Dermatol**, 2001, 137: 1477-1485.
- [5] Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, et al. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*[J]. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2005, 69(1): 197-201.
- [6] Kubo I, Yokokawa Y. Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*[J]. **Phytochemistry**, 1992, 31: 1075-1077.
- [7] Kubo I, Kinst-Hori I. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism[J]. **Agric Food Chem**, 1999, 47: 4121-4125.
- [8] Kubo I, Kinst-Hori I, Yokokawa Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits[J]. **Nat Prod**, 1994, 57: 545-551.
- [9] Chen Q X, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin[J]. **Agric Food Chem**, 2002, 50: 4108-4112.
- [10] 张红成, 李春阳, 董捷, 等. 8种蜂蜜粉醇提取物对酪氨酸酶的单酚酶氧化活性的抑制作用[J]. **食品与生物技术学报**, 2009, 1(28): 14-17.  
ZHANG Hong-cheng, LI Chun-yang, DONG Jie, et al. Inhibiting effect of ethanolic extracts of eight kinds of bee pollens on the activity of tyrosinase to oxidize monophenol[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 1(28): 14-17 (in Chinese).
- [11] Mokni M, Elkahoui S, Limam F, et al. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat[J]. **Neurochemical Research**, 2007, 32(6): 981-987.
- [12] Cabanes J, Garcia C F, Lozano J A, et al. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosinase and dopachrome[J]. **Biochem Biophys Acta**, 1987, (790): 101-107.
- [13] Robit C, Rouch C, Cadet F. Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids[J]. **Food Chemistry**, 1997, 59(3): 355-360.
- [14] 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.  
ZOU Xian-wei, JIANG Zhi-sheng. Advance in studies on botanical inhibitors of tyrosinase[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2004, 35(6): 702-705 (in Chinese).
- [15] 陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. **厦门大学学报: 自然科学版**, 2007, 46(2): 274-281.  
CHEN Qing-xi, LIN Jian-feng, SONG Kang-kang. Development of tyrosinase inhibitors[J]. **Journal of Xiamen University: Natural Science**, 2007, 46(2): 274-281 (in Chinese).