

芥子酸及其衍生物对酪氨酸酶抑制作用的电化学研究

张冬梅¹, 周楠迪¹, 周 卉¹, 陈 亭², 李根喜¹

(1. 南京大学生物化学系, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093;
2. 上海大学生命科学学院, 上海市能源作物育种及应用重点实验室, 上海 200444)

摘要 采用电化学方法研究了芥子酸、芥子酸甲酯及芥子碱对酪氨酸酶的抑制作用. 结果发现, 酪氨酸酶电极对其底物邻苯二酚有良好的电催化作用, 电流响应在底物 $1.0 \times 10^{-7} \sim 6.0 \times 10^{-5}$ mol/L 的浓度范围内呈线性关系, 并具有较高的灵敏度 ($60.93 \text{ nA} \cdot \text{L}/\mu\text{mol}$); 芥子酸及其衍生物都对酪氨酸酶的活性有抑制作用, 抑制能力大小的顺序为芥子酸 > 芥子酸甲酯 > 芥子碱. 通过对这 3 种物质的抑制参数的计算结果表明, 芥子碱是非竞争型抑制, 而芥子酸和芥子酸甲酯是混合型抑制. 这 3 种物质对酪氨酸酶可能的抑制机理一是抑制物与底物竞争酶的双铜活性中心; 二是抑制物具有抗氧化活性, 因而抑制酶对底物的催化反应.

关键词 酪氨酸酶; 化学修饰电极; 芥子酸; 芥子酸甲酯; 芥子碱

中图分类号 O657.1

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)02-0273-04

酪氨酸酶(Tyrosinase, Tyr), 也称多酚氧化酶(Poly-phenol oxidase, PPO), 具有将多种酚类化合物氧化为相应的邻苯醌的能力. 近年来, 关于植物中含有的天然物质, 如槲皮素、山奈酚和其它黄酮类化合物等对酪氨酸酶的抑制作用的研究已引起众多研究者的关注^[1-5]. 芥子酸在油菜籽自由酚类化合物中的含量中占到 73% 以上, 芥子碱则是芥子酸和胆碱形成的酯. 这两种物质都有非常强的抗氧化性和一些药用价值. 本研究发现, 芥子酸和芥子酸甲酯以及芥子碱(结构式见图 1) 都对酪氨酸酶的活性有一定的抑制作用. 相对于传统的酶学方法, 用电化学方法研究酶的抑制作用具有灵敏度高, 操作方便及过程简便等优点. 但由于蛋白被直接吸附在电极上以后容易变性, 而且酪氨酸酶的氧化活性中心在其高级结构中包埋较深, 所以在一般情况下, 将酪氨酸酶直接修饰在电极上往往难以得到有用的电化学反应. 因此, 一般采取将酪氨酸酶与其它支持物质共修饰在电极上, 制备成蛋白膜修饰电极来开展相关的研究^[6-11]. 本研究将酪氨酸酶与原硅酸四乙酯(TEOS)共修饰在热解石墨电极表面制成酶电极, 研究了芥子酸及其衍生物对酪氨酸酶抑制作用, 并获得了许多有益的实验结果.

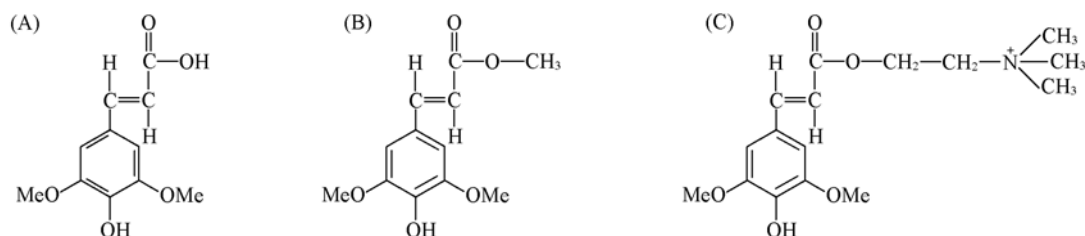


Fig. 1 Chemical structures of sinapic acid(A), sinapic-acid methyl ester(B) and sinapine(C)

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

二甲基二(十八烷基)溴化铵(Dimethyldioctadecyl-ammonium bromide, DOAB)以及从真菌中提取的

收稿日期: 2007-06-22.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 90406005, 20575028)资助.

联系人简介: 李根喜, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事生物电化学研究. E-mail: genxili@nju.edu.cn

酪氨酸酶(3320 units/mg)均购自 Sigma 公司; TEOS 购自 Fluka 公司. 邻苯二酚购自上海化学试剂厂, 每次使用前配制新鲜溶液. 芥子碱氢硫酸盐标准品及芥子碱硫氰酸盐均由中国药科大学药物分析教研组刘丽芳实验组从 *Semen sinapis Albae* 中提取, HPLC 分析纯度大于 99%. 芥子酸和芥子酸甲酯也由该实验室提供. 其它试剂均为分析纯, 实验用水为双蒸水.

电化学实验使用 PARC 263 Potentiostat/Galvanostat (EG & G, USA), 采用三电极系统, 以酪氨酸酶与原硅酸四乙酯共修饰的热解石墨电极作为工作电极, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE), 对电极为铂电极.

1.2 实验方法

1.2.1 酶电极的制备 TEOS 储备液根据文献[12]报道方法配制. 利用表面活性剂 DOAB 来防止溶胶-凝胶在干燥过程中的龟裂.

酶储备液的制备: 将 2 mg 的酪氨酸酶溶解于 100 μL pH = 7.0 的 PBS 缓冲溶液中. 将自制的热解石墨电极作为溶胶-凝胶酶电极的基底电极.

酶电极对底物的最灵敏安培响应出现在酶与溶胶-凝胶按 1:1 (体积比)混合时, 所以后续实验都在此条件下进行. 将 7 μL 的酶溶液与 7 μL 的溶胶溶液共混和后均匀地滴加到基底电极的表面. 在室温条件下干燥, 等待 TEOS 聚合形成溶胶凝胶^[13]. 干燥后的酶电极用双蒸水彻底冲洗, 然后保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液中(pH 7.0).

1.2.2 电化学测定 温度对酪氨酸酶电极影响的研究结果表明, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 左右的室温下酶的活力较好, 并且不会引起酶的热变性, 同时还能保持底物和抑制物的稳定性^[14]. 酶电极的 pH 影响结果表明, pH = 7.0 是最适宜的条件^[14]. 因此, 电化学实验选择在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 的磷酸缓冲液中进行, 工作电位为 -100 mV. 测定抑制剂对酶电极催化的影响时, 应先加入底物邻苯二酚, 待电流达到稳定后, 再加入不同种类的抑制剂并记录电流的变化.

2 结果与讨论

图 2 为电化学实验结果, 由图 2 可见, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、使用 pH = 7.0 的磷酸缓冲液时, 酶的催化活力非常稳定, 可以进行酶动力学研究. 在底物邻苯二酚浓度为 1.0×10^{-7} 到 6.0×10^{-5} mol/L 的范围内, 峰电流和底物浓度呈现良好的线性关系, 灵敏度为 $60.93 \text{ nA} \cdot \text{L}/\mu\text{mol}$. 图 3 分别是加入芥子酸和它的两种衍生物芥子酸甲酯和芥子碱后, 酶电极对底物催化的安培响应的影响. 可以看到, 芥子酸引起的酶电极的电流减少最大, 显示出其较强的酶活抑制作用, 而芥子碱和芥子酸甲酯的酶抑制作用稍弱.

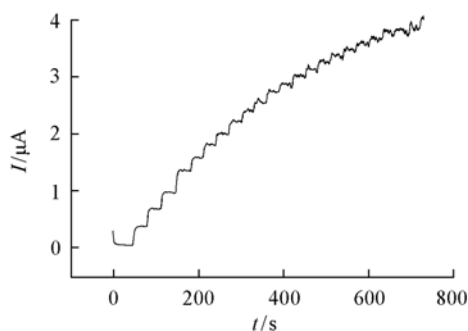


Fig. 2 Current-time curves recorded at tyrosinase/sol-gel modified electrode after adding 4 $\mu\text{mol/L}$ catechol in steps

Applied potential: -100 mV;
buffer solution: PBS with pH = 7.0.

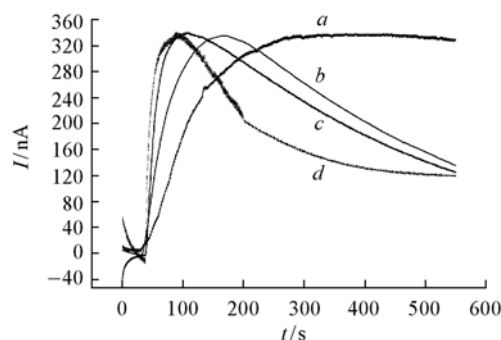


Fig. 3 Amperometric response to 56 $\mu\text{mol/L}$ catechol recorded for the tyrosinase-based electrode in the presence of different inhibitors with 5 $\mu\text{mol/L}$

a. SO_4^{2-} ; b. sinapine; c. sinapic acid methyl ester;
d. sinapic acid. Others are the same as in Fig. 2.

为考察它们抑制作用的类型和机理, 利用 Lineweaver-Burk 方程^[15], 即 $1/I_{ss} = 1/I_m + k(1/[S])$, 分别绘制了有抑制剂芥子碱(浓度为 10.0, 16.0 和 20.0 mmol/L)、芥子酸(浓度为 8.3, 13.3 和 16.6 mmol/L)或芥子酸甲酯(浓度为 9.3, 14.8 和 18.5 mmol/L)存在时的 L-B 图(图 4, I_{ss} 表示特定底物浓

度 $[S]$ 下稳态的电流值, I_m 表示最大电流强度). 如果将每张图中的3条直线外推至纵坐标为零处, 将会发现, 芥子碱图[图4(A)]中的3条线在横坐标上相交于同一点, 说明抑制剂的浓度不影响酶的米氏常数, 只是使最大反应速度减小, 这是典型的非竞争性抑制的特征; 而芥子酸和芥子酸甲酯的动力学曲线既不是典型的竞争性抑制, 也不是典型的非竞争性抑制. 因此, 芥子酸和芥子酸甲酯具有相似的抑制类型和机理, 而芥子碱表现出不同的抑制类型. 表1显示了L-B图的线性方程以及对应的参数和这3种抑制剂可能的抑制类型. 抑制参数中的抑制常数(K_i)和达到50%抑制的半抑制浓度(I_{50})可以通过制作L-B曲线的二次曲线计算获得, 如表2所示. 显而易见, 芥子碱的抑制常数 K_i 与其 I_{50} 是接近的, 这是非竞争型抑制类型的特征.

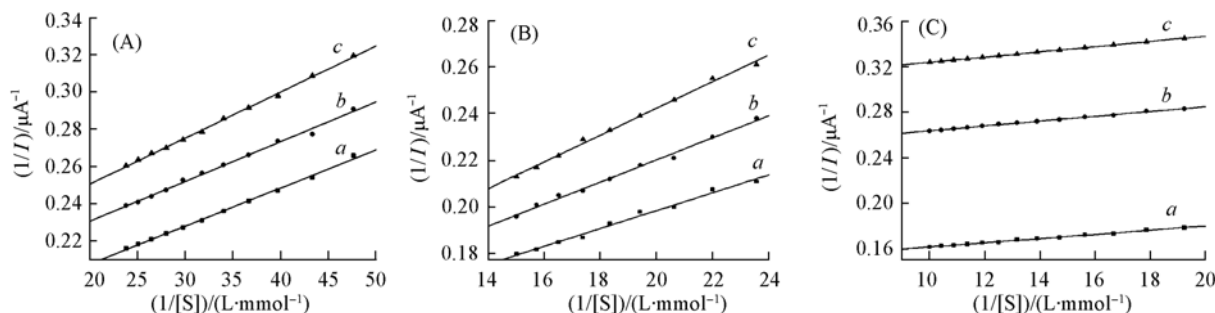


Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for the tyrosinase-based bioelectrode, obtained in the presence of different concentrations of sinapine(A), sinapic acid(B) and sinapic-acid methyl ester(C)

(A) $c(\text{Sinapine})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a. 10.0, b. 16.0, c. 20.0; (B) $c(\text{sinapic acid})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a. 8.3, b. 13.3, c. 16.6; (C) $c(\text{sinapic-acid methyl ester})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a. 9.3, b. 14.8, c. 18.5.

Table 1 Lineweaver-Burk equations and the related data

Inhibitor	Concentration/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	L-B equation/ $(\mu\text{A}^{-1} \text{ vs. } \mu\text{mol}^{-1})$	Inhibition mechanism
Sinapine	10.0	$y = 0.167 + 2.040x, R = 0.998$	Noncompetitive
	16.0	$y = 0.188 + 2.132x, R = 0.997$	
	20.0	$y = 0.201 + 2.490x, R = 0.999$	
Sinapic acid	8.3	$y = 0.123 + 3.802x, R = 0.9948$	Mixed
	13.3	$y = 0.126 + 4.711x, R = 0.9968$	
	16.6	$y = 0.128 + 5.707x, R = 0.9980$	
Sinapic-acid methyl ester	9.3	$y = 0.143 + 1.854x, R = 0.9915$	Mixed
	14.8	$y = 0.242 + 2.124x, R = 0.9980$	
	18.5	$y = 0.301 + 2.300x, R = 0.997$	

Table 2 Secondary linearization of the Lineweaver-Burk equations and the related data

Inhibitor	Slope vs. concentration/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_i/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$I_{50}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
Sinapine	$y = 1.5793 + 0.0400x, R = 0.9801$	39.50	37.20
Sinapic acid	$y = 1.8650 + 0.2264x, R = 0.9915$	8.24	3.39
Sinapic-acid methyl ester	$y = 1.4221 + 0.0473x, R = 0.9996$	30.10	15.70

芥子酸、芥子酸甲酯和芥子碱的母环结构是相近的, 都含有4-羟基-3,5-二甲氧基苯环结构. 根据文献报道, 酪氨酸酶的底物结合位点可以容纳2个左右的苯环结构^[16], 那么芥子酸及其衍生物都可能进入到酶的活性中心和底物竞争位点. 对于芥子酸和芥子酸甲酯来说, 它们进入活性中心可能有两种方式: 一种是酚羟基靠近双铜中心, 另一种是靠近丙烯酸基团. 从理论上讲, 这两个基团中的酚羟基氧和羧基氧都有可能和双铜中心结合, 这种活化的氧桥双铜中心是不能有效地催化底物的. 但由于酚羟基两个邻位上的甲氧基的空间位阻阻碍了前者的结合, 因此, 应是后者进入了活性中心和双铜形成氧桥, 抑制了酶对底物的催化. 而对于芥子碱来说, 其尾部的胆碱结构空间位阻比较大, 进入到酶的活性中心与双铜中心相互作用的程度应该比较弱.

另一方面, 根据文献对酪氨酸酶催化机理的研究报道^[17,18], 该酶的双铜活性中心可以 Mettyrosinase(E_{met}), Dexoytyrosinase(E_{deoxy})和 Oxytyrosinase(E_{oxy})3种不同形式存在, 这3种形式可以相互转化, 在催化循环中占据不同的位置. 而为了维持酪氨酸酶的催化活性, 将 E_{deoxy} 和 E_{met} 形式的酶转化成 E_{oxy}

形式的酶显得十分重要, 氧以及氧自由基的存在可以促进这种转化过程. 芥子碱和芥子酸等具有较强的抗氧化活性, 根据我们采用鲁米诺化学发光分析的结果显示, 芥子碱对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)的清除能力是抗坏血酸的 140 倍. 因此, 鉴于芥子酸类物质对自由基的清除能力, 可以推断, 它们对酶催化活力的抑制作用还有可能通过对氧化性物质的清除来实现.

参 考 文 献

- [1] Chen Q. , Kubo I. . J. Agric. Food Chem. [J], 2002, **50**(14): 4108—4112
- [2] Gomez-Cordoves C. , Bartolome B. , Vieira W. , *et al.* . J. Agric. Food Chem. [J], 2001, **49**(3): 1620—1624
- [3] Lee H. S. . J. Agric. Food Chem. [J], 2002, **50**(6): 1400—1403
- [4] Kubo I. , Kinst-Hori I. . J. Agric. Food Chem. [J], 1999, **47**(10): 4121—4125
- [5] Kubo I. , Kinst-Hori I. . J. Agric. Food Chem. [J], 1999, **47**(11): 4574—4578
- [6] Streffer K. , Kaatz H. , Bauer C. G. , *et al.* . Anal. Chim. Acta[J], 1998, **362**(1): 81—90
- [7] Smit M. H. , Rechnitz G. A. . Electroanalysis[J], 1993, **5**(9/10): 747—751
- [8] Smit M. H. , Rechnitz G. A. . Anal. Chem. [J], 1993, **65**(4): 380—385
- [9] Stanca S. E. , Popescu I. C. . Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic[J], 2004, **27**(4—6): 221—225
- [10] Wang J. , Chen L. . Anal. Chem. [J], 1995, **67**: 3824—3827
- [11] Stancik L. , Macholan L. , Scheller F. . Electroanalysis[J], 1995, **7**(7): 649—651
- [12] Wang Q. , Lu G. , Yang B. . Langmuir[J], 2004, **20**(4): 1342—1347
- [13] Wang J. . Anal. Chim. Acta[J], 1999, **399**: 21—27
- [14] Wang B. , Zhang J. , Dong S. . Biosensors & Bioelectronics[J], 2000, **15**(7/8): 397—402
- [15] Roberts D. V. . Enzyme Kinetics[M], Cambridge: Cambridge University Press, 1977: 153
- [16] Xie L. , Chen Q. , Huang H. , *et al.* . Biochemistry(Moscow)[J], 2003, **68**(4): 487—491
- [17] Duran N. , Rosa M. A. , D'Annibale A. , *et al.* . Enzyme and Microbial Technology[J], 2002, **31**(7): 907—931
- [18] Decker H. , Dillinger R. , Tucek F. . Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2000, **39**(9): 1591—1595

Electrochemical Study of the Inhibitory Effect of Sinapic Acid and Its Derivatives on Tyrosinase Reactivity

ZHANG Dong-Mei¹, ZHOU Nan-Di¹, ZHOU Hui¹, CHEN Ting², LI Gen-Xi^{1*}

(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Biochemistry,
Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. Shanghai Key Laboratory of Bio-Energy Crops, School of Life Science,
Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract On the basis of the electrocatalytic response of tyrosinase to catechol, an enzyme electrode, which was prepared by immobilizing tyrosinase in silica sol-gel, was employed to investigate the inhibitory effect of sinapic acid and its derivatives, the components in the chinese traditional medicine, *Semen sinapis*. This electrode exhibited a fast and steady state response to catechol, with a linear range from 1.0×10^{-7} to 6.0×10^{-5} mol/L and a sensitivity of $60.93 \text{ nA} \cdot \text{L}/\mu\text{mol}$. The kinetic process of the chronoamperometric response to catechol, performed in the absence and in the presence of sinapine, sinapic acid and sinapic-acid methyl ester, was analyzed. Sinapic acid was known to show the highest inhibition ability, followed by sinapic-acid methyl ester and sinapine. Further studies reveal that the inhibition mechanism of sinapine corresponds to the noncompetitive one, while those of sinapic acid and sinapic-acid methylester can be modeled as the mixed one. Using the Lineweaver-Burk linearization and a secondary one, the inhibition parameters (inhibition constant and coefficient of 50% inhibition) were calculated.

Keywords Tyrosinase; Chemically modified electrode; Sinapic acid; Sinapic-acid methyl ester; Sinapine

(Ed. : A, G)