

银杏外种皮提取物对酪氨酸酶的抑制作用

王勤, 钟雪, 邱凌, 庄江兴, 陈清西*

(厦门大学生命科学学院 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以银杏外种皮为材料, 采用水、乙醇和乙醇-乙醚三种不同的方法分离提取其中的活性物质(分别命名为1#, 2#, 3#), 研究它们对蘑菇酪氨酸酶催化L-多巴(L-DOPA)氧化活力的影响。结果表明, 这3种提取物均对蘑菇酪氨酸酶有抑制作用, 1#, 2#和3#对酶抑制作用的 IC_{50} 分别为2.25、1.75和0.32 mg/mL。抑制作用动力学结果表明: 三种提取物对酶的抑制作用均表现为混合型, 相应的抑制常数 K_I 依次为2.11、1.62和0.29 mg/mL; K_{IS} 依次为2.80、2.33和0.45 mg/mL。结果显示, 采用乙醇-乙醚提取的银杏外种皮提取物对酪氨酸酶抑制作用最强。

关键词: 银杏外种皮; 提取方法; 酪氨酸酶; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q945.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)03-0379-03

Inhibitory mechanism of extracts from *Ginkgo bioloba sarcotesta* on mushroom tyrosinase

WANG Qin, ZHONG Xue, QIU Ling, ZHUANG Jiang-Xing, CHEN Qing-Xi*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Three extractants(water, ethanol and ethanol-aether mixture)were isolated from *Ginkgo bioloba sarcotesta*, and then three kinds of extracts were used to test the inhibition on the activity of mushroom tyrosinase. The results showed that three extracts could inhibit the activity of tyrosinase obviously. The inhibitor's concentration leading to 50% enzyme activity lost, IC_{50} was estimated to be 2.25, 1.75 and 0.32 mg/mL, respectively. Their inhibition mechanisms were analyzed. All of three extracts showed reversibly inhibitors to tyrosinase and the type of inhibition belonged to be mixed-type. The inhibition constants, K_I and K_{IS} , of each extract were determined respectively and compared. The value of K_I was determined to be 2.11, 1.62 and 0.29 mg/mL, respectively; the value of K_{IS} was determined to be 2.80, 2.33 and 0.45 mg/mL, respectively. The ethanol-aether extracts showed the best inhibition on tyrosinase.

Key words: *Ginkgo bioloba sarcotesta*; extractive method; tyrosinase; inhibitory mechanism; kinetics

酪氨酸酶(EC. 1.14.18.1)广泛存在于动植物和人体内, 在动植物体酶促褐变、体内色素合成的过程中起了关键的作用(Sánchez-Ferrer等, 1995)。它能将酪氨酸羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸(L-多巴)(单酚酶活性), 然后再将多巴氧化成多巴醌(二

酚酶活性), 进而生成一系列引起褐化的色素物质。因此, 目前国内外研究了大量化学物质对酪氨酸酶的抑制作用, 以期寻找高效的抑制剂作为食品加工中的保鲜剂, 化妆品添加剂(宋康康等, 2003)及杀虫剂(徐汉虹, 2001)等。长期以来, 银杏一直是中草药

收稿日期: 2007-03-27 修回日期: 2007-08-11

基金项目: 福建省自然科学基金(B0510001); 国家自然科学基金(30570408)[Supported by Natural Science Foundation of Fujian Province(B0510001); the National Natural Science Foundation of China(30570408)]

作者简介: 王勤(1969-), 女, 山东济宁市人, 博士, 副教授, 主要从事生物化学研究, (E-mail)qwang@xmu.edu.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: chenqx@xmu.edu.cn)

中的常见药材,为我国特产,具有较高的药用价值。银杏叶能活血止痛、降低胆固醇、治疗心绞痛、改善心脑血管循环等,其果实白果具有润肺定喘、涩精止带等作用,可治疗肺结核、支气管哮喘等。然而在采收的季节,银杏外种皮经常被弃去,造成环境污染。银杏外种皮中含有大量的糖类、黄酮和酚酸类成分,有实验表明该类物质是酪氨酸酶的抑制剂(刘林刚等,2005;刘森,2004),如能将外种皮中的有效物质提取出来作为生物农药用于杀虫(石启田,2004),将具有良好的应用前景。我们采用不同的方法提取银杏外种皮中的活性物质,比较了不同提取物对酪氨酸酶的抑制作用机理及抑制作用动力学,以期从中得到高效、安全的酪氨酸酶抑制剂用于生物杀虫剂。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

收集银杏外种皮,烘干、粉碎。酪氨酸酶为 Sigma 化学公司的蘑菇酪氨酸酶,比活力为 6680 U/mg。二甲亚砜(DMSO)、L-3,4-二羟基苯氨酸(L-DOPA)为 Aldrich 化学公司产品。其它试剂为国产分析纯试剂,使用的蒸馏水为去离子重蒸水。

1.2 方 法

1.2.1 样品制备 1# 样品:银杏外种皮与水 1:5 (W/V)充分混合,组织捣碎后热回流提取 2 h,离心取上清,减压浓缩至干。2# 样品:银杏外种皮与 50%乙醇 1:5(W/V)充分混合,组织捣碎后热回流提取 2 h,滤液抽滤,旋转蒸发浓缩后,冷冻干燥。3# 样品:银杏外种皮与 50%乙醇 1:5(W/V)充分混合,组织捣碎后热回流提取 2 h,滤液抽滤,旋转蒸发浓缩后,用乙醚萃取,醚层经 Na_2CO_3 溶液和 NaOH 溶液充分洗涤后,浓缩至干。分别称取三种提取物,1#、2# 样品用水溶解,3# 样品用 DMSO 溶解,分别计算提取物浓度。

1.2.2 酪氨酸酶活力测定 参考 Chen 等(2003)的方法,先加入 0.1 mL 提取物(溶于 DMSO 溶液)于比色杯中,再加入 2.8 mL 预先在 30 °C 恒温水浴中保温的底物溶液,然后加入 0.1 mL 酪氨酸酶水溶液,迅速充分混匀,在 30 °C 恒温条件下跟踪测定 475 nm 的光密度值随时间的增长直线,从直线的斜率求得酶活力。测定酶所用底物为 0.5 mmol/L L-DOPA,酶的终浓度为 6.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$,所用 DMSO 终浓度均为 3.33%,并用对照扣除 DMSO 本底的影

响。测定仪器为 DU 650 分光光度计。抑制剂对酶的抑制作用的机理是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数,包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)的变化来判断的(黄璜等,2003;柯莉娜等,2004)。提取物浓度以反应体系中的终浓度计算。

1.2.3 提取物对酪氨酸酶活力抑制效果的评价 在正常测活体系中,加入不同量的银杏外种皮提取物,测得其抑制曲线,比较导致酶活力下降 50%的抑制剂浓度(IC_{50}),根据 IC_{50} 值阐明其抑制强度。应用酶动力学研究方法,测定各抑制剂的抑制常数(K_i 或 K_{is}),比较其值来判断抑制强度。

2 结 果

2.1 银杏外种皮提取物对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

依次以 1#~3# 样品为效应物,测定它们对蘑菇酪氨酸酶催化底物 L-DOPA 氧化反应的酶活力的影响(图 1),结果表明,随着三种效应物浓度的增大,酶活力均呈指数下降, IC_{50} 分别为 2.25、1.75 和 0.32 mg/mL。乙醇-乙醚提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用最为明显。

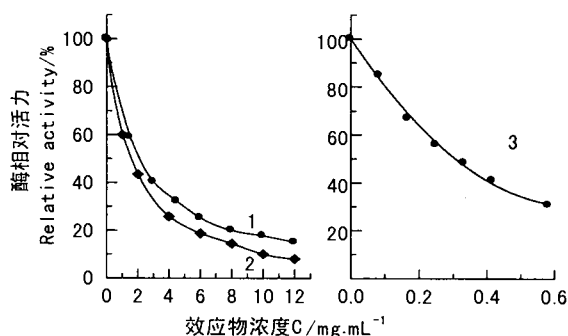


图 1 1#~3# 样品对蘑菇酪氨酸酶活力的影响

Fig.1 Effects of 1#-3# samples on the activity of mushroom tyrosinase

2.2 银杏外种皮提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用均表现为可逆效应

在含不同浓度的效应物的测活体系中,固定底物 L-DOPA 浓度为 0.5 mmol/L,测定不同酶量的反应初速度。图 2 表示在含 1# 样品的测活体系中酶的剩余活力与加入的酶量的关系,由图可知,酶活力对酶量作图为一组通过原点的直线,图中的 0 线代表无效应物时的酶活力,随着效应物浓度的增大,直线的斜率降低。该结果表明,1# 样品对酶的抑制

作用属于可逆过程,随着抑制剂浓度的增大,催化效率显著降低,说明效应物和酶的结合导致酶活力受抑制,并不导致酶的分子构象的永久变化而失活。2# 和 3# 样品亦表现出相类似的可逆抑制过程。

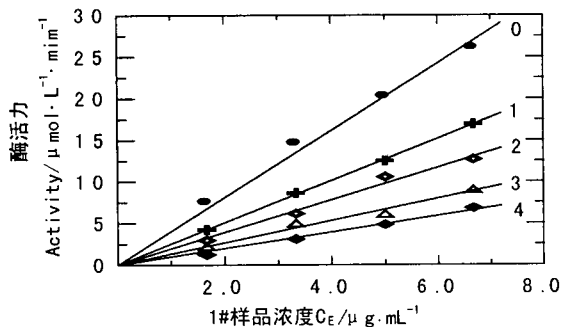


图 2 1# 样品对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的判断
Fig. 2 Determination of the inhibitory mechanism of 1# sample on mushroom tyrosinase

直线 0~4 浓度分别为 0、1.6、3.2、6.4 和 9.6 mg/mL。

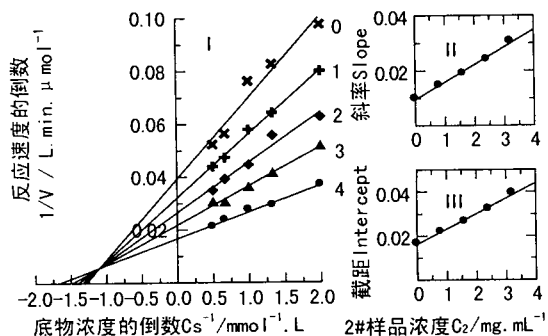


图 3 2# 样品对蘑菇酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定
Fig. 3 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of 2# sample on tyrosinase

曲线 0~4 分别代表测活体系中加入的 2# 样品的浓度分别为 0、0.8、1.6、2.4 和 3.2 mg/mL。

2.3 银杏外种皮提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理

在含不同浓度样品的测活体系中,改变底物浓度,测定酶促反应的初速度,Lineweaver-Burk 双倒数作图,可以判断效应物对该酶的抑制作用机理。3 种提取方法得到的银杏外种皮提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用具有相同的机理,其 Lineweaver-Burk 双倒数作图均得到一组交于第二象限的直线,斜率和截距都因样品的浓度变化而改变,米氏常数 (K_m) 随着样品浓度的增大而增大,最大反应速度 (V_m) 随着样品浓度的增大而下降,其抑制机理表现为混合型。图 3 为样品 2# 提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图,二次

作图,以斜率(图 3:II)和纵轴截距(图 3:III)分别对效应物浓度作图,分别可以求得样品对游离酶(E)的抑制常数(K_I)和对酶底物络合物(ES)的抑制常数(K_{IS})。测定结果列于表 1,以供比较。

表 1 不同提取方法提取的银杏外种皮提取物对蘑菇酪氨酸酶抑制效应的比较
Table 1 Comparison of the inhibitory effects from *Gingo biolaba* on mushroom tyrosinase

效应物 Extracts	IC_{50} (mmol · L ⁻¹)	抑制类型 Inhibition types	抑制常数 Inhibition constants (mmol · L ⁻¹)	
			K_I	K_{IS}
1# (水提取) Extracted by water	2.25	混合型	2.11	2.80
2# (乙醇提取) Extracted by ethanol	1.75	混合型	1.62	2.33
3# (乙醇-乙醚提取) Extracted by ethanol-aether	0.32	混合型	0.29	0.45

3 讨论

银杏外种皮的水提法、乙醇提法及乙醇-乙醚萃取法所得的三种样品对蘑菇酪氨酸酶均具有显著的抑制作用。根据表 1,从 IC_{50} 值来看,三种提取物的抑制强度依次为 3# > 2# > 1#。乙醇-乙醚萃取法得到的银杏外种皮提取物的抑制强度是乙醇提取法得到的 5.5 倍,是采用水提取法得到的 7 倍。该法效果最好,其有效成分得到了分离。虽然三个样品均为混合型抑制类型,但它们的抑制常数 K_{IS} 与 K_I 之比(K_{IS}/K_I)并不完全相同,三种提取法得到的 K_{IS}/K_I 分别为 1.33、1.44 和 1.55。 K_{IS}/K_I 的比值均大于 1,说明银杏外种皮提取的效应物对酪氨酸酶的游离酶(E)的抑制作用较对酶-底物络合物(ES)的抑制作用强,显示底物对酪氨酸酶被银杏外种皮提取物的抑制有一定的保护作用。 K_{IS}/K_I 比值随着抑制效果增强而呈递增的趋势,说明样品在酪氨酸酶与底物结合前,就迅速抑制了酶活力,同时与酶-底物络合物相结合,从而表现出对酪氨酸酶高效的抑制力。

本文从酶学角度出发,获得了从银杏外种皮中提取酪氨酸酶抑制剂的有效方法,从理论上论证了银杏外种皮提取物对酪氨酸酶的抑制效果,开拓了银杏外种皮在果蔬保鲜、生物防治方面的应用价值。(下转第 401 页 Continue on page 401)

- II. Observation on the development of the tannin body in the upper epidermal cells of bluing petals[J]. *Cytologia*, **39**:107—112
- Zhang W, Franco C, Curtin C, et al. 2004. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study[J]. *J Biomed Biotech*, **5**:264—271
- Zhao C L, Guo W M, Chen J Y. 2004a. Cyanin substance of the flower color pigment and dynamic variations of the flower color of *Prunus mume* 'Fenpi Gongfen' (pink peeled palace pink)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, **24**(12): 2 237—2 242
- Zhao C L, Guo W M, Chen J Y. 2004b. Changes in coloration of the flower color pigment of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. 'Nanjing Hong' (Nanjing red) caused by physicochemical factors[J]. *Guihaia*, **24**(5): 471—477
- Zhao C L, Guo W M, Chen J Y. 2004c. Molecular structures of the anthocyanins from the flower color pigment of *Prunus mume* 'Nanjing Hong' (Nanjing red)[J]. *Acta Bot Yunnan*, **26**(5): 549—557
- Zhao C L, Guo W M, Chen J Y. 2006. Isolation and structural identification of the anthocyanins from the flower color pigment of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. 'Nanjing Hongxu' (Nanjing red-bearded)[J]. *Sci Silv Sin*, **42**(1): 29—36

高等植物花色苷在液泡中的存在状态及其着色效应

赵昶灵, 张丽梅, 刘福翠

(云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘 要: 综述了花色苷被摄入液泡的原因、花色苷在液泡中的存在状态及其对植物细胞的着色效应。花色苷在植物细胞质中合成后转运到液泡里是为了解除其对蛋白质和 DNA 等细胞功能分子的毒性。花色苷的液泡区隔化是花色苷在植物细胞中发挥正常功能的前提。在大多数植物中, 花色苷在绝大多数情况下完全溶解在液泡里。但是, 花色苷也能在液泡里形成颗粒, 这些颗粒可以划分为花色苷体和花色苷液泡包涵体两类。花色苷体由膜包裹, 其形成是液泡中小的有色囊泡逐渐合并的结果, 发育完全的花色苷体为典型的球状、具比液泡更深的红色; 液泡里的花色苷体具高密度, 呈现为含高浓度花色苷的不溶性小球; 花色苷体的存在可导致液泡的强烈色彩。花色苷液泡包涵体可能具备蛋白质基质, 既无膜包裹又无内部结构, 其形成是转运进液泡的花色苷与蛋白质基质结合的结果; 液泡里的花色苷液泡包涵体形状不规则, 象果冻; 在花色苷液泡包涵体中, 花色苷可能通过氢键连接于蛋白质基质的一个有限空间位点; 花色苷液泡包涵体被认为是液泡中花色苷的“陷阱”, 优先摄取花色苷色素 3,5-二糖苷或酰化的花色苷; 花色苷液泡包涵体的存在可增加液泡色彩的强度并导致“蓝化”。

关键词: 花色苷; 存在状态; 着色效应; 花色苷体; 花色苷液泡包涵体

(上接第 381 页 Continue from page 381)

参考文献:

- 刘森. 2004. 中草药成分提取分离与制剂加工新技术新工艺新标准[M]. 北京: 中国教育出版社
- 徐汉虹. 2001. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社
- Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. 2003. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. *J Enzy Inhib Med Chem*, **18**: 491—496
- Huang H(黄璜), Liu XD(刘晓丹), Chen QX(陈清西). 2003. Studies on mushroom tyrosinase activity inhibited by benzaldehyde family compounds(苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究)[J]. *J Xiamen Univ(Nat Sci)*(厦门大学学报·自然科学版), **42**(1): 98—101
- Ke LN(柯莉娜), Wang Q(王勤), Chen QX(陈清西). 2004. Inhibition on mushroom tyrosinase activity by biphenylcarboaldehyde or biphenylcarboxylic acid(联苯基甲醛与联苯基甲酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用)[J]. *J Xiamen Univ(Nat Sci)*(厦门大学学报·自然科学版), **43**(2): 249—252
- Liu LG(刘林刚), Yan YJ(阎永建), Wu XZ(吴学忠), et al. 2005. Inhibitory effect of green tea polyphenols on tyrosinase(茶多酚、葛根对酪氨酸酶的抑制作用)[J]. *China J Leprosy and Skin Diseases*(中国麻风皮肤病杂志), **21**(2): 103—104
- Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F, et al. 1995. Tyrosinase, A comprehensive review of its mechanism[J]. *BBA-protein and Molecular Enzymology*, **1** **247**: 1—11
- Shi QT(石启田). 2004. Research on prevention and elimination of agricultural pests by ginkgo phenols and phenols acids(银杏酚酸类物质防治农业害虫的研究)[J]. *Chem & Ind Fore Prod*(林产化学与工业), **24**(2): 83—86
- Song KK(宋康康), Qiu L(邱凌), Huang H(黄璜), et al. 2003. Inhibitory effect of tyrosinase by arbutin as cosmetic additive(熊果甙作为化妆品添加剂对酪氨酸酶抑制作用)[J]. *J Xiamen Univ(Nat Sci)*(厦门大学学报·自然科学版), **42**(6): 791—794