

某些药物对酪氨酸酶的抑制和对 O_2^- 自由基的清除

高秀蕊 石双群 宋秀芹

(河北师范大学化学系, 石家庄 050016)

关键词 酪氨酸酶, 超氧自由基, 抑制, 清除.

酪氨酸酶, 又称多酚氧化酶, 是一种重要的铜酶. 酪氨酸经复杂的氧化、聚合最后生成黑色素的反应是由该酶催化, 由 O_2^- 自由基引发的过程^[1]. 酶促反应的抑制、受阻, 酪氨酸酶的缺乏或失活, 均导致色素脱失. 因此从酶动力学抑制和对 O_2^- 自由基的清除两个角度进行研究, 必将对临床、美容化妆、皮肤抗衰老以及防止食品褐变等方面提供有益信息. 本文采用 NBT (氮蓝四唑) 光还原法^[2]和酶促动力学的研究手段^[3], 研究了抗坏血酸、铜试剂、甘露醇、苯基硫脲对酪氨酸酶的抑制率和对 O_2^- 自由基的清除率.

1 材料和方法

1.1 磷酸盐缓冲液 (I) pH 6.8, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 15.6g, NaOH 1.9g 溶于 1000ml 双蒸水中.

1.2 磷酸盐缓冲液 (II) pH 6.8, 含 0.1mol/L NaF 的磷酸缓冲液 (I)

1.3 DL-DOPA (3,4-二羟基苯丙氨酸) 用缓冲液 (I) 配成浓度是 0.02mol/L 的溶液.

1.4 苯基硫脲-乙醇溶液 在 50ml 95% 的乙醇中加入约 2g 苯基硫脲至饱和, 该试剂用于终止酶促反应.

1.5 酪氨酸酶粗提液 取冷冻去皮土豆 8g 匀浆, 以 15ml 冷冻缓冲液 (II) 萃取, 脱脂棉过滤, 1500r/min 离心 5—6min (最好低温), 取上清液在 0—3℃ 保存备用 (且在 1h 之内用完).

1.6 4种药剂 抗坏血酸 8.5×10^{-4} mol/L, 甘露醇 0.02mol/L, 铜试剂 1×10^{-3} mol/L, 苯基硫脲 1×10^{-3} mol/L. 均为分析纯试剂, 用双蒸水配制.

1.7 磷酸盐缓冲液 (III) pH 7.8, 5×10^{-1} mol/L.

1.8 蛋氨酸 (甲硫氨酸) 13×10^{-2} mol/L, 核黄素 2×10^{-3} mol/L, NBT 75×10^{-3} mol/L, 双蒸水配制.

1.9 酶促动力学抑制率测定 在数支干燥的比色管中各加入 1ml 0.02mol/L DOPA 溶液, 再加抑制剂 (加入量按表所列体积), 最后以缓冲液 (I) 加至 5ml, 摇匀, 25℃ 恒温 10min 后, 加入 0.4ml 酶提取液, 立即计时并迅速置于恒温槽内, 待反应 1min, 迅速滴入 3 滴苯基硫脲-乙醇液终止反应, 用 721 分光光度计在

波长 475nm 以双蒸水为参比, 1cm 比色池测消光值. 根据 DOPA 红摩尔消光系数 $\epsilon = 3700$, 求各体系反应速度. 把无抑制剂存在时速度定为 100%, 求出在抑制剂存在时酶的相对活性以及不同浓度抑制剂对酶的抑制率.

$$\text{抑制率} = \frac{V_{\text{空白}} - V_{\text{抑制}}}{V_{\text{空白}}} \times 100\%$$

V 表示反应的初速度.

1.10 各药物对 O_2^- 自由基的清除率实验

向干燥比色管内依次加入缓冲液 (III)、蛋氨酸、核黄素、NBT 各 0.5ml, 清除剂加入量按表中数据, 最后以双蒸水定容至 5ml. 混合液在 35℃ 恒温, 4000lux 下光照 25min 进行光还原. NBT 形成蓝甲腈, 以黑暗终止反应. 在 560nm 以双蒸水为参比测消光值 F^{L47} , 以直接测定 F 求清除率. 清除率用 $S\%$ 表示. 以同样的方法

$$\text{清除率 } S\% = \frac{F_{\text{空白}} - F_{\text{清除}}}{F_{\text{空白}}} \times 100\%$$

测得不同药物在各自浓度时的清除率.

2 结果与讨论

4 种药物对酪氨酸酶的抑制率以及对 O_2^- 自由基的清除率见表 1. 实验结果表明: 抗坏血酸、甘露醇、铜试剂、苯基硫脲对酪氨酸酶均有较强抑制作用, 抑制率在一定浓度范围内随各抑制剂浓度增大而增强. 据资料报道抗坏血酸、甘露醇对该酶的抑制动力学上属于不可逆抑制^[4,5]; 苯基硫脲、铜试剂属于可逆抑制类型中的竞争性抑制^[6]. 4 种药物对引发该酶促反应的 O_2^- 自由基均具有明显清除作用. 清除率在一定浓度范围内也随各药物各自浓度增大而增强.

经对上述浓度范围内各药物抑制率、清除率对浓度进行线性回归分析, 相关系数均在 0.90 以上. 在抑制率 = 50% 时, 各药物浓度分别是铜试剂 9.24×10^{-2} mol/L, 抗坏血酸 1.34×10^{-4} mol/L, 苯基硫脲 5.58×10^{-4} mol/L, 甘露醇 7.81×10^{-3} mol/L; 当清除率 $S\% = 50\%$ 时, 抗坏血酸浓度为 1.09×10^{-4} mol/L, 甘

露醇浓度为 $9.66 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 铜试剂 $4.62 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 苯基硫脲浓度为 $1.23 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

表 1 4 种药物对酪氨酸酶抑制率和对 O_2^- 自由基的清除率

药物	5ml 反应液中的浓度	加入量 (ml)	酶的相对活性 (%)	对酶的抑制率 (%)	对 O_2^- 自由基清除率 (%)
抗坏血酸	0	0	100	0	0
	3.4×10^{-4}	0.2	91	9	25
	6.8×10^{-4}	0.4	82	18	43
	8.5×10^{-4}	0.5	65	35	45
	1.7×10^{-3}	1.0	36	64	68
	2.0×10^{-3}	1.25	23	77	72
甘露醇	0	0	100	0	0
	8.0×10^{-4}	0.2	99	1	4
	2.4×10^{-3}	0.6	76	24	21
	5.6×10^{-3}	1.4	69	31	36
	7.2×10^{-3}	1.8	56	44	38
	9.6×10^{-3}	2.4	36	64	47
铜试剂	0	0	100	0	0
	1.0×10^{-4}	0.5	47	53	17
	2.0×10^{-4}	1.0	35	65	30
	3.0×10^{-4}	1.5	33	67	40
	5.0×10^{-4}	2.5	30	70	51
苯基硫脲	0	0	100	0	0
	4.0×10^{-5}	0.2	29	71	29
	8.0×10^{-5}	0.4	28	72	38
	1.2×10^{-4}	0.6	26	74	44
	1.6×10^{-4}	0.8	25	75	64
	2.0×10^{-4}	1.0	未做	未做	70

静息态时的酪氨酸酶主要是二价态铜, 含有两个反铁磁性偶合的 Cu(II) 原子、甘露醇、抗坏血酸对该酶抑制是由于与酶的活性中心 $\text{Cu}^{2+}-\text{Cu}^{2+}$ 发生氧化-

还原反应的结果, 这可从具有双核结构的乙酸铜有效催化抗坏血酸氧化加以证实。

O_2^- 自由基既可失去电子, 又可获得电子。甘露醇、抗坏血酸对 O_2^- 自由基的清除可能是发生了 $\text{A} + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{A}^+ + \text{H}_2\text{O}$, 反应, 而且抗坏血酸与 O_2^- 的反应速度常数也是较大的。苯基硫脲、铜试剂与底物 DOPA 竞争酶的活性中心, 以 S 原子或 N 原子与铜配位。苯基硫脲与底物 DOPA 是类似物, 铜试剂对酶的活性中心有强络合能力。二者对 O_2^- 自由基的清除与二者结构中存在 $\text{C}=\text{S}$ 基团有关, 遇 O_2^- 自由基产生单电子转移, 形成新的有机负离子自由基, 进而形成二聚体, 致使自由基链反应受阻。这方面的 ESR 研究尚待进一步证实。

酪氨酸酶促反应的抑制与引发该反应的 O_2^- 自由基的清除是一个问题的两个方面。对酶有抑制作用的药物是否一定对自由基链引发有阻止作用(对 O_2^- 自由基有清除作用)? 两者的相关性需进一步探讨。在体内许多酶促反应都可产生 O_2^- , 许多低分子化合物和蛋白质自动氧化也可产生 O_2^- 。 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\text{OH}^\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ 统称活性氧, 探讨终止 O_2^- 引发过程的诸因素具有理论和现实意义。

参 考 文 献

- 1 Roger C. Sealy. In: D Armstrong *et al.* eds, *Free radicals in molecular biology, aging and disease*, New York: Raven Press, 1984: 67-74
- 2 Stewart R C, J D Bewley. *Plant physiol*, 1980; 65: 245
- 3 Michael E Friedman, Harlaw H Daron. *J Chem Educ*. 1977; 54: 256
- 4 鲁纯素等. 北京医科大学学报, 1988; 26(6): 451
- 5 高秀蕊等. 河北师范大学学报(自然科学版), 1990; (1): 36
- 6 高秀蕊等. 河北师范大学学报(自然科学版), 1990; (2): 4
- 7 朱筠琴等. 化学通报, 1987; (5): 49

(上接第 79 页)

酶活力及四种物质终点法的对比测定。

由表 3 可见北京中生公司试剂与进口试剂的 10 项对比测定值均呈非常显著相关, $P < 0.01$ 。

3. 稳定性与可靠性观察

方法为每日复溶一瓶控制血清, 并在该仪器上用国产试剂连续测定。表 4 是 12 项生化检验 30 天内的实验结果。

由表 4 可见, 在 30 天内所有 12 项测定的数值是

稳定可靠的, 其中 9 项的 $\text{CV} < 3\%$ 。

上述实验表明, 国产试剂应用于该仪器时, 精密度良好, 与国外试剂对比测定呈非常显著相关, 对 12 项试验进行了 30 天连续测定, 其结果表明是比较稳定可靠的。经过近 10 个月临床应用, 证实中生公司生产的试剂适合用于此类型的自动生化分析仪。但与国外试剂相比, 国产试剂中有的复溶后保存时间较短, 这是今后需要改进提高的。