

黄芩素诱导体抑制酪氨酸酶作用的动力学研究

汕头大学医学院化学教研室(515031) 方 冶*

摘 要 黄芩素诱导体对酪氨酸酶的抑制作用是竞争性抑制,其 k_i 为 0.058 mmol/L。对 O_2^- 的清除作用和作为竞争性底物是黄芩素诱导体竞争性抑制酪氨酸酶的两个重要机制。提示通过清除 O_2^- 而抑制酪氨酸酶是多羟基黄酮的共性, O_2^- 的清除剂也将都是酪氨酸酶的抑制剂。

关键词 黄芩素诱导体(SD) 酪氨酸酶抑制作用 动力学

多羟基黄酮化合物是植物界分布最广泛的黄酮类化合物,近年来对其抗自由基、抗氧化、抗癌、防癌、抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏、抗糖尿病并发病等多种生物活性及药理作用已有较多研究^[1],对酪氨酸酶的抑制作用也有了一些报道^[2],但未见有其抑制作用机制的报道。黄芩素诱导体(SD)也是多羟基黄酮化合物,已研究证实具显著的紫外吸收、抑制酪氨酸酶和清除 O_2^- 作用^[3]。笔者就其抑制酪氨酸酶的作用进行了动力学考察和机制探讨。

1 材料

UV-120 紫外可见分光光度计(日本岛津),酪氨酸酶(EC 1.1.4.1,8.1,Sigma),左旋多巴(Sigma),黄芩素诱导体(从市售黄芩提取,重结晶法纯化后为淡黄褐色粉末);其它试剂均为 AR 级。

SD、酪氨酸酶和左旋多巴分别以 pH6.8 的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液配成所需浓度溶液。

2 方法

2.1 反应速度测定:在试管中先加入一定量的 SD 溶液和左旋多巴溶液,再用缓冲溶液补充至混合液总体积为 4.50 mL,25℃温育 5 min 后,加入 0.50 mL 酪氨酸酶溶液(0.10 g/L),立即用分光光度计在 475 nm 处测吸光度(A)。连续记录 10 min,取 0~3.0 min 间的吸光度平均变化率作为初始反应速度。

2.2 抑制类型及动力学参数的确定:分别作 Lineweaver-Burk 曲线及 Dixon 曲线,判别抑制类型、确定米氏常数(k_m)及抑制常数(k_i)的值。

3 结果和讨论

3.1 SD 抑制酪氨酸酶的动力学考察:在不同浓度的左旋多巴底液中,分别测定不同浓度的 SD 抑制酪氨酸酶的反应初速度,作 Lineweaver-Burk 曲线及 Dixon 曲线。结果见表 1 及图 1、2。

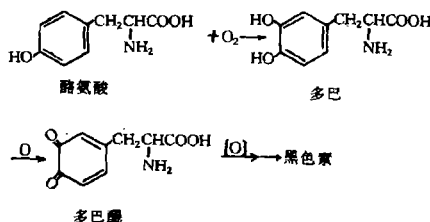
表 1 SD 和多巴的浓度对反应初速度的影响(n=3)

C(mmol/L)	S(mmol/L)	$\Delta A/t$	$(\Delta A/t)^{-1}$
0	0.20	0.0334	29.9
	0.25	0.0404	24.7
	0.33	0.0499	20.0
	0.50	0.0628	15.9
	1.00	0.0952	10.5
	2.00	0.125	8.0
0.10	0.20	0.0183	54.6
	0.25	0.0212	47.2
	0.33	0.0278	36.0
	0.50	0.0383	25.8
	1.00	0.0621	16.1
	2.00	0.0986	10.1
0.20	0.20	0.0116	86.2
	0.25	0.0134	74.6
	0.33	0.0186	53.7
	0.50	0.0273	37.0
	1.00	0.0436	22.9
	2.00	0.0690	14.5

其中 $\Delta A/t$ 表示反应初速度,S 和 C 分别为底物左旋多巴和抑制剂 SD 在反应介质中的浓度。

* Address:Fang Ye, Medical College of Shantou University, Shantou

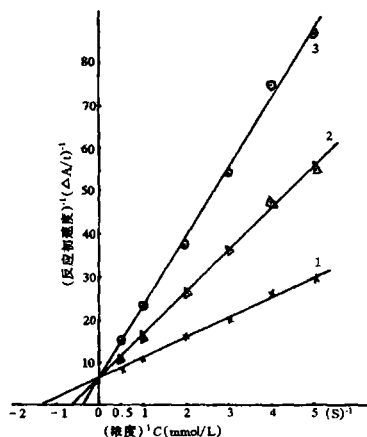
3.2 SD 抑制酪氨酸酶的机制探讨:酪氨酸酶催化酪氨酸氧化为多巴并继而氧化为多巴醌,最终形成黑色素(皮肤色素)。其反应过程可简示如下:



在此过程中,酪氨酸酶可提供 O_2^- [5], 并通过 O_2^- 的引发 [6] 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, SD 对酪氨酸酶的抑制作用机制可推断如下: (1) 由于在酪氨酸酶的催化氧化过程中, O_2^- 既是引发剂又是反应物, 因此 SD 对 O_2^- 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。所以, SD 对 O_2^- 的清除作用是其对酪氨酸酶的竞争性抑制的一个重要方面; (2) 由于 SD 的母体为 5, 6, 7, 4'-四羟基黄酮, 其 B 环上的结构与酪氨酸相同, 都是对位苯酚的结构, 每一步氧化的产物在结构上也与酪氨酸的极为相似, 所以, SD 也可被酪氨酸酶催化, 是酪氨酸酶的竞争性底物。它们可与酪氨酸酶竞争性地结合, 从而削弱了酪氨酸酶对酪氨酸及其系列氧化产物的催化氧化作用。因此, 作为竞争性底物是 SD 抑制酪氨酸酶的另一重要方面。

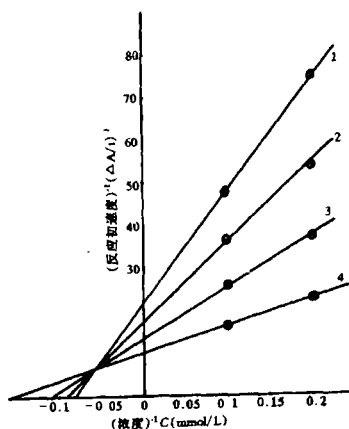
清除 O_2^- 和作为竞争性底物是 SD 抑制酪氨酸酶的两个重要机制。其它多羟基黄酮化合物对酪氨酸酶也具有不同程度的抑制作用^[2]。虽不同的多羟基黄酮化合物在结构上有一定差异,但对 O_2^- 清除作用则是它们的共性,故推断清除 O_2^- 是多羟基黄酮化合物抑制酪氨酸酶普遍存在的过程。提示所有 O_2^- 的清除剂将都是酪氨酸酶的抑制剂。

酪氨酸酶普遍存在于人和动植物体内，



1-无抑制剂 2-0.10 mmol/L SD
3-0.20 mmol/L SD

图1 SD抑制酪氨酸酶的Lineweaver-Burk曲线($n=3$)



1-0.25 mmol/L 多巴 2-0.33 mmol/L
多巴 3-0.50 mmol/L 多巴 4-1.00
mmol/L 多巴

图 2 SD 抑制酪氨酸酶的 Dixon 曲线 ($n=3$)

从图 1 可看出,SD 对酪氨酸酶的抑制是竞争性的;从图 1、2 上的横轴截距可分别得出 k_m 值和 k_i 值^[4],结果见表 2。

表 2 不同浓度 SD 抑制酪氨酸酶的动力学参数

	C(mmol/L)		
	0	0.10	0.20
k_m (mmol/L)	0.787	1.45	2.63
k_i (mmol/L)		0.058	

是黑色素合成的关键酶,色素障碍性疾病及恶性黑色素瘤的发生和治疗也与酪氨酸酶有直接关系^[7]。SD 抑制酪氨酸酶机制的探讨,对色素障碍性疾病及恶性黑色素瘤的防治将有一定的指导意义。

参考文献

1 刘诗平,等. 中草药,1991,22(4):182
2 丁维功,等. 中国医学化学进展. 上海:百家出版社,

1996;72
3 方 冶. 中草药,1998,29(9):596
4 陈惠黎,等. 分子酶学. 北京:人民卫生出版社,1983;233
5 王 夔,等. 生命科学中的微量元素. 北京:中国计量出版社,1989:535
6 Sanchez-Ferrer A, *et al.* Biochem Biophy Acta, 1995, 1247:1
7 季文才. 生命的化学,1991,11(1):3
(1999-02-12 收稿)

墓头回总苷片治疗大肠癌的临床研究

河南省人民医院(郑州 450003) 陈金秀* 马培志
河南省肿瘤医院 王怀璋

摘 要 以墓头回(异叶败酱)总苷片结合手术、化疗治疗 50 例大肠癌患者,1 年、2 年、3 年的生存率为 79%、61%、40%。该制剂能增强患者体力状况,改善临床症状,显著降低癌胚抗原(CEA)水平;能够提高 T 细胞免疫功能,增强体内 NK 杀伤细胞活性。

关键词 肠肿瘤 中医药疗法 墓头回总苷片

墓头回为败酱科植物异叶败酱 *Patrinia heterophylla* Bge 及糙叶败酱 *P. scabra* Bge 的根,具有清热解毒、消痈排脓、祛瘀止痛等功能。近年来发现墓头回体外有较强的抗癌作用^[1]。我们将墓头回(异叶败酱)的主要化学成分进行提取分离,研制成墓头回总苷片,对大肠癌患者进行了临床观察和研究。

1 一般资料

所有病例均经病理检查证实为大肠恶性肿瘤,其中男 38 例,女 12 例。年龄 25~75 岁,平均 50 岁。病变部位位于直肠 24 例,乙状结肠 10 例,降结肠 5 例,横结肠 3 例,升结肠 7 例,回盲部 1 例。病变类型:腺癌 32 例,粘液腺癌 8 例,高分化腺癌 2 例,中分化腺癌 3 例,低分化腺癌 4 例,乳头状腺癌 1 例。按 Dukes' 分型,B 期 24 例,C 期 12 例,D 期 14 例。另随机选同期化疗患者 32 例为对照组。

2 治疗方法

所有病例一旦确诊,均先行手术治疗,B、C 期患者施行根治术(占 72%),D 期患者行姑息性手术(占 28%),术后 4 周开始化疗。

2.1 术后化疗组(对照组):5-氟脲嘧啶 0.5 g 静脉点滴,隔日 1 次,总量 10 g;丝裂霉素 6 mg 加入 0.9%生理盐水 20 mL 中静脉推注,每周 1 次。化疗前后均常规肌注胃复安 10 mg。上述两药合用 8 周为 1 疗程。全部患者均常规口服 VitB₆,以辅助治疗。

2.2 术后中药加化疗组(治疗组):除上述化疗外,加服墓头回总苷片,每次 3 片,每日 3 次,2 月为 1 疗程。

2.3 统计方法:计量资料均采用 *t* 检验。

3 治疗结果

3.1 体力状况:用 Karnofsky 评分法作治疗前后评分,接受中药治疗前大于或等于 60 分的

* Address:Chen Ginsio, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou
陈金秀 男,33 岁,1996 年 7 月毕业于河南中医学院中药专业,获中药学硕士学位。近年来在国家级和省级刊物上发表论文 9 篇,在国家级学术会议上交流论文 6 篇。1997 年 10 月出席首届世界中西医结合大会。参与编写著作 2 部,先后承担有中医药管理局及省科技攻关课题各 1 项。现供职于河南省人民医院药剂科,主要从事中、西药新制剂的研制与开发应用。