

学校编码: 10384

分类号___密级___

学号: 21720061152231

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

缩氨基硫脲的合成与生物学效应研究

Study on the Synthesis and Bioactivity of
Thiosemicarbazones

李 智 聪

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 4 月 29 日

论文答辩时间: 2009 年 5 月 30 日

学位授予日期: 2009 年 月 日

答辩委员会主席: 林河通

评 阅 人: _____

2009 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ 酶 学 ）
课题（组）的研究成果，获得（ 酶 学 ）课题（组）
经费或实验室的资助，在（ 酶 学 ）实验室完成。

（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，
未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：李智聪

2009 年 6 月 22 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：李智聪

2009 年 6 月 22 日

目录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
1. 前言	5
1.1 缩氨基硫脲类化合物.....	5
1.1.1 缩氨基硫脲类化合物研究概况.....	5
1.1.2 缩氨基硫脲类化合物的应用.....	5
1.2 酪氨酸酶.....	6
1.2.1 酪氨酸酶的概述.....	6
1.2.2 酪氨酸酶的结构.....	6
1.2.3 酪氨酸酶的催化机制.....	8
1.2.3 酪氨酸酶与黑色素形成.....	8
1.2.5 酪氨酸酶活力的研究方法.....	10
1.3 酪氨酸酶抑制剂研究进展.....	11
1.3.1 酪氨酸酶抑制剂的研究概述.....	12
1.3.2 苯甲醛与苯甲酸类化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	12
1.3.3 多羟基化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	13
1.3.4 天然活性产物对酪氨酸酶的抑制作用.....	15
1.3.5 杂环化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	16
1.3.6 含硫化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	16
1.3.7 酪氨酸酶抑制剂的应用.....	17
1.4 本研究的内容与意义.....	18
2. 实验材料	19
2.1 实验试剂.....	20
2.2 实验仪器.....	21
3. 实验方法	22
3.1 缩氨基硫脲类化合物的合成.....	22
3.2 效应物对酪氨酸酶的抑制作用机理的测定.....	22
3.2.1 效应物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	22
3.2.2 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶作用作用的研究.....	22

3.2.3 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型和抑制常数的测定.....	23
3.3 效应物对粗提的小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶活力的影响.....	23
3.3.1 小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶粗提液的制备.....	23
3.3.2 效应物对小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶粗提液二酚酶活力的影响.....	23
3.4 效应物对菜青虫酚氧化酶活力的影响.....	23
3.4.1 菜青虫酚氧化酶粗提液的制备.....	23
3.4.2 效应物对菜青虫酚氧化酶活力的影响.....	23
3.4 效应物对小鼠 B16 黑色素瘤细胞细胞学效应.....	23
3.4.1 小鼠 B16 黑色素瘤细胞增殖率的测定方法.....	24
3.4.2 小鼠 B16 黑色素瘤细胞中酪氨酸酶活性的测定方法.....	24
3.4.3 小鼠 B16 黑色素瘤细胞中黑色素生成量的测定方法.....	24
3.4.4 效应物对小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2 蛋白 mRNA 转录水平的影响.....	24
4. 实验结果	26
4.1 缩氨基硫脲类化合物的合成.....	26
4.1.1 糠醛缩氨基硫脲.....	27
4.1.2 对氰基苯甲醛缩氨基硫脲.....	28
4.1.3 对氯苯甲醛缩氨基硫脲.....	29
4.1.4 4-甲氧基肉桂醛缩氨基硫脲.....	30
4.1.5 2,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲.....	31
4.1.6 3,4-二羟基苯甲醛(A6)缩氨基硫脲.....	32
4.1.7 3-溴-4-羟基-5-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲.....	33
4.2 缩苯基氨基硫脲化合物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	34
4.2.1 糠醛缩氨基硫脲.....	35
4.2.2 对氰基苯甲醛缩氨基硫脲.....	36
4.2.3 对氯苯甲醛缩氨基硫脲.....	37
4.2.4 4-甲氧基肉桂醛缩氨基硫脲.....	38
4.2.5 2,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲.....	39
4.2.6 3,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲.....	40
4.2.7 3-溴-4-羟基-5-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲.....	41

4.3 缩苯基氨基硫脲化合物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制效应.....	42
4.4 缩苯基氨基硫脲化合物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制机理.....	43
4.5 缩苯基氨基硫脲化合物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制动力学.....	44
4.5.1 糠醛缩氨基硫脲.....	44
4.5.2 对氰基苯甲醛缩氨基硫脲.....	45
4.5.3 对氯苯甲醛缩氨基硫脲.....	45
4.5.4 4-甲氧基肉桂醛缩氨基硫脲.....	46
4.5.5 2,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲.....	46
4.5.6 3,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲.....	47
4.5.7 3-溴-4-羟基-5-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲.....	48
4.6 缩氨基硫脲对小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶活性的影响.....	50
4.7 缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶活性的影响.....	51
4.8 缩氨基硫脲化合物对小鼠 B16 细胞效应.....	52
4.8.1 对氯苯甲醛缩氨基硫脲.....	52
4.8.2 3-溴-4-羟基-5-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲.....	52
4.8.3 3-溴-4-羟基-5-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲对酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2 转录水平的影 响.....	54
5. 讨论	55
5.1 缩氨基硫脲类化合物的合成.....	55
5.2 缩氨基硫脲对蘑菇酪氨酸酶的抑制效应.....	55
5.3 缩氨基硫脲对 B16 细胞酪氨酸酶的抑制效应.....	55
5.4 缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶的抑制效应.....	56
5.5 缩氨基硫脲对 B16 细胞的细胞学效应.....	56
6. 结论	57
6.1 缩氨基硫脲与缩苯基氨基硫脲的合成.....	57
6.2 缩氨基硫脲类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制效应.....	57
6.3 缩氨基硫脲类化合物对 B16 细胞酪氨酸酶的抑制效应.....	57
6.3 缩氨基硫脲类化合物对菜青虫酚氧化酶的抑制效应.....	57
6.4 缩氨基硫脲类化合物对 B16 细胞的细胞学效应.....	58
7. 参考文献	59

8.已发表论文.....	69
9.致谢.....	70

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Chinese Abstract	1
English Abstract	3
1. Introduction	5
1.1 Thiosemicarbazone.....	5
1.1.1 Research on Thiosemicarbazone.....	5
1.1.2 Application of Thiosemicarbazone.....	5
1.2 Tyrosinase.....	6
1.2.1 Overview.....	6
1.2.2 Structure of tyrosinase.....	6
1.2.3 Catalytic Mechanism of tyrosinase.....	8
1.2.4 Tyrosinase and Melanogenesis.....	8
1.2.4 Research on Tyrosinase Activity.....	10
1.3 Progress in Tyrosinase Ihibitors.....	11
1.3.1 Overview.....	12
1.3.2 Benzaldehydes and Benzoin acids as Tyrosinase inhibitors.....	13
1.3.3 Tyrosinase inhibitor with Hydroxy Groups.....	15
1.3.4 Tyrosinase inhibitor from natural products.....	16
1.3.5 Tyrosinase inhibitor with Hetercyclotic ring compounds	16
1.3.6 Tyrosinase inhibitor with sulfur.....	16
1.3.7 Applications of tyrosinase inhibitor.....	17
1.4 Significance and Contents of The Research.....	18
2. Materials	19
2.1 Reagents.....	20
2.2 Instructions.....	21
3. Methods	22
3.1 Synthesis of thiosemicarbazones.....	22
3.2 Inhibitor effects of thiosemicarbazones on tyrosinase.....	22
3.2.1 Assay of Inhibitor effects of thiosemicarbazones.....	22
3.2.2 Assay of Inhibitory mechanism of thiosemicarbazones.....	22

3.2.3 Assay of Inhibitory type of thiocarbazones.....	23
3.3 Assay the diphenolase activity of cell-free tyrosinase from B16 by compounds.....	23
3.3.1 Preparation of cell-free tyrosinase from B16.....	23
3.3.2 Assay the diphenolase activity of cell-free tyrosinase from B16 by compounds.....	23
3.4 Assay the diphenolase activity of phenol oxidase from Cabbage Butterfly.....	23
3.4.1 Preparation of phenol oxidase from Cabbage Butterfly.....	23
3.4.2 Assay the diphenolase activity of phenol oxidase from Cabbage Butterfly by compounds.....	23
3.5 Effect of compounds on melanogenesis in B16.....	24
3.5.1 Assay the change of cell vability in B16 by compounds.....	24
3.5.2 Assay the change of tyrosinase activity in B16 by compounds.....	24
3.5.3 Assay the change of melanin content in B16 by compounds.....	24
3.5.4 mRNA level of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 in B16 by compounds.....	24
4. Results	26
4.1 Sythesis of thiosemicarbazones.....	26
4.1.1 Furaldehydethiosemicarbazone.....	26
4.1.2 4-cyanobenzaldehydethiosemicarbazone.....	27
4.1.3 4-chlorobenzaldehydethiosemicarbazone.....	28
4.1.4 4-methoxycinnamaldehydethiosemicarbazone.....	29
4.1.5 2,4-dihydroxybezaldehydethiosemicarbazone.....	30
4.1.6 3,4-dihydroxybezaldehydethiosemicarbazone.....	32
4.1.7 3-bromo-4hydroxy-5-methoxybenzaldehydethiosemicarbazone.....	33
4.2 Effects of thiosemicarbazones on mushroom tyrosinase monophenolase.....	34
4.2.1 Furaldehydethiosemicarbazone.....	35
4.2.2 4-cyanobenzaldehydethiosemicarbazone.....	36
4.2.3 4-chlorobenzaldehydethiosemicarbazone.....	37
4.2.4 4-methoxycinnamaldehydethiosemicarbazone.....	38
4.2.5 2,4-dihydroxybezaldehydethiosemicarbazone.....	39
4.2.6 3,4-dihydroxybezaldehydethiosemicarbazone.....	40
4.2.7 3-bromo-4hydroxy-5-methoxybenzaldehydethiosemicarbazone.....	41

4.3 Effects of thiosemicarbazones on mushroom tyrosinase diphenolase.....	42
4.4 Inhibitory Mechanism of thiosemicarbazones.....	43
4.5 Inhibitory Kinetics of thiosemicarbazones.....	44
4.5.1 Furaldehydethiosemicarbazone	44
4.5.2 4-cyanobenzaldehydethiosemicarbazone	45
4.5.3 4-chlorobenzaldehydethiosemicarbazone.....	45
4.5.4 4-methoxycinnamaldehydethiosemicarbazone	46
4.5.5 2,4- dihydroxybezaldehydethiosemicarbazone	46
4.5.6 3,4- dihydroxybezaldehydethiosemicarbazone	47
4.5.7 3-bromo-4hydroxy-5-methoxybenzaldehydethiosemicarbazone	48
4.6 Effects of thiosemicarbazones on tyrosinase from free B 16 cell.....	50
4.7Effects of thiosemicarbazones on phenol oxidase from Cabbage Buterfly	51
4.8 Effect of compounds on melonagenesis in B16.....	52
4.8.1 4-chlorobenzaldehydethiosemicarbazone.....	52
4.8.2 3-bromo-4hydroxy-5-methoxybenzaldehydethiosemicarbazone	52
4.8.3 Effects of 3-bromo-4hydroxy-5-methoxybenzaldehydethiosemicarbazone on tyrosinase, trp-1 and trp-2 in mRNA level.....	54
5. Discussion.....	55
5.1 Synthesis of thiosemicarbazones.....	55
5.2 Effects of thiosemicarbazones on tyrosinase.....	55
5.3 Inhibitory Kinetics of thiosemicarbazones on tyrosinase.....	55
5.4 Effects of thiosemicarbazone on tyrosinase from free B16 cell.....	55
5.5Effects of thiosemicarbazones on phenol oxidase from Cabbage Buterfly	56
5.6 Effects of thiosemicarbazones on B16cell.....	56
6. Conclusion.....	57
6.1 Synthesis of thiosemicarbazones.....	57
6.2 Inhibitory kinetics of thiosemicarbazones on tyrosinase.....	57
6.3 Effects of thiosemicarbazone on tyrosinase from free B16 cell.....	57
6.4Effects of thiosemicarbazones on phenol oxidase from Cabbage Buterfly.....	57
6.5 Effects of thiosemicarbazones on B16cell.....	58

7.References	59
8.Papers	69
9.Acknowledgements	70

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

酪氨酸酶 (EC. 1. 14. 18. 1) 是一种含铜的氧化还原酶, 广泛存在于微生物、动植物以及人体内, 能将酪氨酸转化成多巴醌, 进而形成黑色素; 过量的黑色素形成能产生色素沉着性疾病以及能使果蔬褐变, 因此, 研究酪氨酸酶抑制剂具有十分重要的意义。

本论文设计合成了7种缩氨基硫脲类化合物, 并且研究了合成抑制剂对单酚酶和二酚酶的抑制作用机理。再以粗提的小鼠B16细胞的酪氨酸酶为研究对象, 筛选该酶的抑制剂。以小鼠B16黑色素瘤细胞为研究对象, 研究了合成的缩氨基硫脲类化合物对细胞增殖率、酪氨酸酶活性、黑色素含量以及酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2蛋白的mRNA转录水平的影响。研究结果和内容如下:

采用乙醇与水作为溶剂, 冰醋酸作为催化剂, 在加热回流的条件下成功的合成了7种缩氨基硫脲类化合物, 并采用质谱和核磁共振对结构进行了鉴定。

选择糠醛缩氨基硫脲(A₁)、对氰基苯甲醛缩氨基硫脲(A₂)、对氯苯甲醛缩氨基硫脲(A₃)、4-甲氧基肉桂醛缩氨基硫脲(A₄)、2,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲(A₅)、3,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲(A₆)、3-溴-4-羟基-5-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲(A₇)作为效应物, 研究了它们对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响, 结果表明, 所有化合物均具有较好的酪氨酸酶二酚酶抑制活性。

选择(A₁)~(A₇)作为效应物, 研究了它们对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响, 结果表明, 除了3,4-二羟基苯甲醛缩氨基硫脲(A₆)外, 所有化合物均具有不同程度的酪氨酸酶单酚酶抑制活性, 并对其对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理和抑制类型进行了深入的研究。

选择(A₁)~(A₇)作为效应物, 研究了它们对 B16 细胞酪氨酸酶粗提液活力的影响, 研究表明, 效应物都对蘑菇酪氨酸酶有较好的抑制效应, 由于其苯环上的取代基不同, 其抑制效应也有差异。

选择(A₁)~(A₇)作为效应物, 研究了它们对菜青虫酚氧化酶粗提液活力的影响, 研究表明, 效应物都对蘑菇酪氨酸酶有良好的抑制效应, 由于其苯环上的取代基与取代位置不同, 其抑制效应也有差异。

分别以化合物对氯苯甲醛缩氨基硫脲(A₃)与3-溴-4-羟基-5-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲(A₇)作为效应物, 研究了其对黑色素生成量、体内酪氨酸酶活力与细胞

毒性进行了评估,结果表明,这两种化合物对 B16 细胞均表现出一定的效应。进一步研究了(A₇)对 TYR、TRP-1、TRP-2 在转录水平的影响,结果表明,当化合物(A₇)的浓度为 40 μmol/L 时,对酪氨酸酶、TRP-1 与 TRP-2 的转录均下降了 40%左右。

关键字: 缩氨基硫脲; 生物学效应; 酪氨酸酶; B16 细胞

Abstract

Tyrosinase (EC. 1. 14. 18. 1), a copper-containing redoxidase enzyme, is widely distributed in microorganisms, animals, plants and human beings. It is responsible for transforming of L-tyrosine to DOPAquinine, which can produce melanin in a series steps. The abnormal formation of melanin may bring out serious diseases in human beings and browning in fruits and vegetables, so, it's of great interest to inhibit the activity of tyrosinase.

In this study, seven compounds containing sulfur were designed and synthesized. The inhibitory effects and mechanism of these synthetical compounds had been elucidated. Then, some tyrosinase inhibitors were screened out through studying their inhibitory capacities on prepared cell-free tyrosinase from B16 melanoma cell line. the B16 cell viability, tyrosinase activity, melanin content and mRNA levels of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 were assayed in presence of different concentrations of thiosemicarbazones. The contents and results listed as follows:

Choose ethanol and water as solvent, acetic acid as catalyst, 7 thiosemicarzones compounds were successfully synthesized, and their chemical structures were elucidated by ESI-MS and NMR.

The inhibitory mechanisms of the all 7 synthetical compounds on mushroom tyrosinase diphenolase were studied, and results showed that all of them were potential tyrosinase inhibitors. Furthermore, the inhibitory mechanism of these compounds was studied. And corresponding inhibition constants were measured.

The inhibitory effect of all 7 synthetical compounds on mushroom tyrosinase monophenolase were studied, results showed that all of them except 3,4-dihydroxy-benzaldehydesemithiocarzone can decrease the tyrosinase monophenylase activity.

The inhibitory effect of semithiocarboznes on prepared cell-free tyrosinase from B16 melanoma cell line and from Cabbage Butterfly were investigated, results showed

that these compounds can inhibit the tyrosinase activity in different extent.

In the end, the inhibition of melanogenesis by compound A3 and A7 were investigated, which provide a foundation of these compounds' usage as skin-whitening agents.

Key Words: thiosemicarbazone, bioactivity, tyrosinase, B16 Melanoma Cell Line.

1.前言

1.1 缩氨基硫脲类化合物

1.1.1 缩氨基硫脲类化合物研究概况

缩氨基硫脲类化合物是由氨基硫脲与相应的醛或酮缩合形成的一类席夫碱类化合物^[1]，其结构式如下图所示：

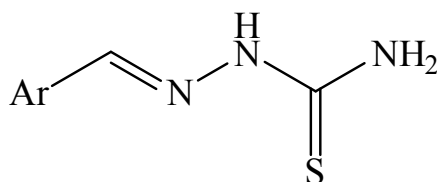


图 I 缩氨基硫脲类化合物的结构式
Fig I Chemical structure of thiosemicarbazone

缩氨基硫脲类物质具有广泛生物活性^[2-4]，在医药和农药界备受关注。当它带上不同的取代基团，它可具有抗菌性，抗真菌，抗病毒，抗肿瘤，抗寄生虫等生物活性。许多芳香醛（酮）和杂环醛（酮）缩氨基硫脲均具有很好的抗菌和抗癌活性，并且它们的抗菌和抗癌作用广，还可以通过在芳香杂环醛（酮）的环上引入不同的取代基使它们的抗菌和抗癌活性得到改善。因此，取代苯甲醛缩氨基硫脲类化合物已引起广大药学和化学工作者研究的兴趣。

1.1.2 缩氨基硫脲类化合物的应用

目前，缩氨基硫脲类化合物在医药学与分析化学领域有着广泛的应用。在医药学领域，人们主要关注此类化合物的抗菌与抗肿瘤活性等领域。

1998年，毕思玮等用联苯乙酮与氨基硫脲合成了联苯乙酮缩氨基硫脲，该化合物具有一定的杀菌活性^[5]。2005年，李锦州等报道了呋喃甲酰基吡啶啉酮缩氨基硫脲对金黄葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、白菜软腐病菌、菜豆菘疫菌等具有一定的抗菌活性^[6]。2006年，Joseph M等合成了2-吡啶苯甲酰缩N-4-苯基氨基硫脲及其铜配合物，经测试它们的杀菌活性，取得了较好的效果^[7]。李清寒等将杂环吗啉、哌嗪或N-单取代哌嗪引入到芳香醛（酮）缩氨基硫脲化合物，其中吗啉类化合物有较强的抑菌活性，哌嗪类化合物有较强的抗癌作用^[8]。2007年，另有报道偶氮芳基水杨醛缩氨基硫脲衍生物在不同的浓度下对植物的生长调节表现出一定的规律性^[9]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库