

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: B200426035

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

抑制剂对酪氨酸酶的效应及其对黑色素生成调控的研究

**Effects of Inhibitors on Tyrosinase and their Regulation on  
melanogenesis**

宋康康

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: 2007 年 5 月 25 日

论文答辩时间: 2007 年 6 月 30 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 刘波

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2007年7月2日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在            年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：2007年7月3日

导师签名：

日期：2007年7月3日

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
<b>1 前言</b>	
<b>1.1 酪氨酸酶的研究概况.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 酪氨酸酶的晶体结构.....	5
1.1.2 酪氨酸酶的活性中心结构的研究概况.....	7
1.1.3 酪氨酸酶的催化活性.....	8
<b>1.2 酪氨酸酶抑制剂的研究概况.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 含酚羟基的化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	10
1.2.2 芪类及其类似物对酪氨酸酶的抑制作用.....	10
1.2.3 黄酮类化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	12
1.2.4 醛类化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	14
1.2.5 羧基化合物作为酪氨酸酶抑制剂的抑制机理及其构效关系.....	14
1.2.6 氨基酸及其衍生物作为酪氨酸酶抑制剂的抑制机理及其构效关系.....	15
1.2.7 含硫化合物作为酪氨酸酶抑制剂的抑制机理及其构效关系.....	16
1.2.8 杂环类化合物.....	17
1.2.9 卤代化合物.....	18
1.2.10 天然提取的生物活性物质.....	19
<b>1.3 酪氨酸酶抑制剂的应用.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 黑色素细胞中黑色素合成调控因子的研究概况.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 黑色素细胞中黑色素合成的相关蛋白.....	21
1.4.2 调控黑色素形成的相关细胞因子与信号途径.....	23
<b>1.5 本课题的研究内容与研究意义.....</b>	<b>25</b>
<b>2 实验试剂与仪器</b>	
<b>2.1 实验试剂.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 仪器设备.....</b>	<b>29</b>

### 3 实验方法

<b>3.1 酪氨酸酶抑制剂的合成</b> .....	30
3.1.1 半胱氨酸席夫碱的合成方法.....	30
3.1.2 缩氨基硫脲类化合物的合成方法.....	30
<b>3.2 效应物对酪氨酸酶的抑制作用机理的测定</b> .....	30
3.2.1 效应物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	30
3.2.2 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的研究.....	31
3.2.3 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制类型和抑制常数的测定.....	31
3.2.4 效应物对酶抑制作用动力学常数的测定.....	31
<b>3.3 采用紫外可见光谱分析效应物对酪氨酸酶的抑制作用机理</b> .....	32
3.3.1 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶催化L-DOPA氧化反应光谱的影响.....	32
3.3.2 效应物对高碘酸钠氧化 L-DOPA 反应光谱的影响.....	32
<b>3.4 采用DPPH法测定化合物清除氧自由基的能力</b> .....	32
<b>3.5 效应物对粗提的小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶二酚酶活力的影响</b> .....	32
3.5.1 小鼠B16细胞中酪氨酸酶粗提液的制备.....	32
3.5.2 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.....	32
<b>3.6 效应物对小鼠 B16 黑色素瘤细胞产黑色素相关指标的影响</b> .....	33
3.6.1 小鼠B16黑色素瘤细胞增殖率的测定方法.....	33
3.6.2 小鼠B16黑色素瘤细胞中酪氨酸酶活性的测定方法.....	33
3.6.3 小鼠B16黑色素瘤细胞中黑色素生成量的测定方法.....	33
3.6.4 效应物对小鼠B16细胞中酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2转录水平的影响.....	34
3.6.5 效应物对小鼠B16细胞中酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2蛋白质表达水平的影响...	35

### 4 实验结果

<b>4.1 酪氨酸酶抑制剂的筛选及其抑制机理</b> .....	36
4.1.1 烷基苯甲醛类化合物对酪氨酸酶的抑制作用及抑制机理.....	36
4.1.1.1 烷基取代苯甲醛类化合物对酪氨酸酶二酚酶活力的影响.....	36
4.1.1.2 烷基取代苯甲醛类化合物对酪氨酸酶的抑制作用表现为可逆效应.....	37

4.1.1.3 烷基取代苯甲醛类化合物对酪氨酸酶二酚酶的抑制机理.....	38
4.1.2 苯甲醛羟基取代物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用.....	41
4.1.2.1 3,4-二羟基苯甲醛( <b>B<sub>3</sub></b> )对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的影响.....	41
4.1.2.2 苯甲醛羟基取代化合物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用测定.....	42
4.1.2.3 苯甲醛的羟基取代物对二酚酶的抑制作用机理的判断.....	43
4.1.3 其它类型苯甲醛化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用.....	45
4.1.3.1 苯甲醛类化合物对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	45
4.1.3.2 苯甲醛类化合物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用.....	47
4.1.3.3 化合物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用机理.....	49
4.1.4 4-乙烯苯甲醛和4-乙烯苯甲酸对酪氨酸酶的抑制作用.....	51
4.1.4.1 4-乙烯苯甲醛和4-乙烯苯甲酸对单酚酶活力的影响.....	51
4.1.4.2 4-乙烯苯甲醛和4-乙烯苯甲酸对二酚酶抑制作用的测定.....	53
4.1.4.3 4-乙烯苯甲醛和4-乙烯苯甲酸抑制二酚酶机理的测定.....	54
4.1.5 4-烷氧基取代苯甲酸类化合物对酪氨酸酶的抑制作用.....	56
4.1.5.1 4-烷氧基取代苯甲酸类化合物对二酚酶活力的影响.....	56
4.1.5.2 4-烷氧基取代苯甲酸类化合物对二酚酶活力的抑制作用.....	57
4.1.5.3 4-烷氧基取代苯甲酸类化合物对二酚酶活力的抑制作用机理.....	58
4.1.6 熊果甙对酪氨酸酶的抑制作用及抑制机理.....	61
4.1.6.1 熊果甙( <b>F<sub>1</sub></b> )对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	61
4.1.6.2 熊果甙( <b>F<sub>1</sub></b> )对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用.....	62
4.1.6.3 熊果甙( <b>F<sub>1</sub></b> )对二酚酶的抑制机理及抑制常数的测定.....	63
4.1.7 巯基化合物对酪氨酸酶的抑制机理.....	64
4.1.7.1 N-乙酰半胱氨酸( <b>G<sub>2</sub></b> )对酪氨酸酶单酚酶的抑制机理.....	64
4.1.7.2 巯基化合物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用.....	65
4.1.8 脲类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理.....	67
4.1.8.1 烯丙基硫脲对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的活力的影响.....	67
4.1.8.2 脲类化合物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用.....	68
4.1.8.3 硫脲、氨基硫脲和烯丙基硫脲对酪氨酸酶的抑制作用机理.....	70
4.1.8.4 苯基硫脲( <b>H<sub>5</sub></b> )对酶的抑制动力学.....	71
4.2 酪氨酸酶抑制剂的合成及其对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理.....	76

4.2.1 半胱氨酸席夫碱类化合物的合成.....	76
4.2.1.1 苯甲醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>1</sub> )的合成.....	77
4.2.1.2 2-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>2</sub> )的合成.....	78
4.2.1.3 4-甲氧基苯甲醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>3</sub> )的制备.....	79
4.2.1.4 3-甲氧基-4-羟基苯甲醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>4</sub> )的制备.....	80
4.2.2 半胱氨酸席夫碱化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理.....	81
4.2.2.1 半胱氨酸席夫碱化合物对酪氨酸酶单酚酶活性的影响.....	81
4.2.2.2 半胱氨酸席夫碱化合物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用.....	84
4.2.2.3 半胱氨酸席夫碱化合物对二酚酶的抑制机理.....	85
4.2.3 缩氨基硫脲类化合物的合成.....	87
4.2.3.1 苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>1</sub> )的合成.....	88
4.2.3.2 2-羟基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>2</sub> )的合成.....	89
4.2.3.3 4-羟基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>3</sub> )的合成.....	90
4.2.3.4 4-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>4</sub> )的合成.....	91
4.2.3.5 3,5-二甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>5</sub> )的合成.....	92
4.2.3.6 3-甲氧基-4-羟基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>6</sub> )的合成.....	92
4.2.3.7 4-二甲氨基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>7</sub> )的合成.....	94
4.2.3.8 肉桂醛缩氨基硫脲(J <sub>8</sub> )的合成.....	95
4.2.3.9 2-氯苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>9</sub> )的合成.....	96
4.2.3.10 2,4-二氯苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>10</sub> )的合成.....	96
4.2.4 缩氨基硫脲类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理的研究.....	97
4.2.4.1 缩氨基硫脲类化合物对单酚酶活力的影响.....	97
4.2.4.2 缩氨基硫脲类化合物对蘑菇二酚酶的抑制作用.....	101
4.2.4.3 缩氨基硫脲类化合物对二酚酶的抑制机理.....	103
<b>4.3 巯基化合物对酪氨酸酶作用的光谱学研究(紫外可见光谱).....</b>	<b>105</b>
4.3.1 半胱氨酸(G <sub>1</sub> )对酪氨酸酶作用的光谱学研究.....	107
4.3.2 苯甲醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>1</sub> )对酪氨酸酶作用的光谱学研究.....	108
4.3.3 水杨醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>2</sub> )对酪氨酸酶作用的光谱学研究.....	109
4.3.4 茴香醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>3</sub> )对酪氨酸酶作用的光谱学研究.....	111
4.3.5 香草醛半胱氨酸席夫碱(I <sub>4</sub> )对酪氨酸酶作用的光谱学研究.....	112

<b>4.4 化合物的清除氧自由基的活性</b> .....	113
4.4.1 苯甲醛类化合物的清除氧自由基活性.....	113
4.4.2 硫脲类化合物的清除氧自由基活性.....	114
4.4.3 合成的缩氨基硫脲类化合物的清除氧自由基活性.....	115
<b>4.5 效应物对粗提的小鼠B16细胞中酪氨酸酶活性的影响</b> .....	115
4.5.1 熊果甙对粗提的小鼠 B16 酪氨酸酶活性的影响.....	115
4.5.2 维生素类化合物对小鼠 B16 酪氨酸酶活性的影响.....	116
4.5.3 苯甲酸类化合物对小鼠 B16 酪氨酸酶活性的影响.....	117
4.5.4 苯甲醛类化合物对粗提的小鼠 B16 酪氨酸酶活性的影响.....	118
4.5.5 硫脲类化合物对粗提的小鼠 B16 酪氨酸酶活性的影响.....	118
4.5.6 肉桂类化合物对小鼠 B16 酪氨酸酶活性的影响.....	119
4.5.7 合成的缩氨基硫脲类化合物对小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶的抑制作用.....	119
<b>4.6 化合物对小鼠 B16 细胞的细胞学效应的研究</b> .....	120
4.6.1 曲酸对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	120
4.6.2 苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>1</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	121
4.6.3 水杨醛缩氨基硫脲(J <sub>2</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	121
4.6.4 4-羟基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>3</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	122
4.6.5 茴香醛缩氨基硫脲(J <sub>4</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	123
4.6.6 3,5-二甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>5</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	123
4.6.7 香草醛缩氨基硫脲(J <sub>6</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	124
4.6.8 对二甲氨基苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>7</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	125
4.6.9 肉桂醛缩氨基硫脲(J <sub>8</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	125
4.6.10 2-氯苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>9</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	126
4.6.11 2,4-二氯苯甲醛缩氨基硫脲(J <sub>10</sub> )对小鼠 B16 细胞的细胞学效应.....	127
<b>4.7 合成的缩氨基硫脲类化合物对酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2 转录水平的影响</b> .....	127
<b>4.8 效应物对小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2 蛋白质表达水平的影响</b> .....	129
<b>5 讨论</b>	
<b>5.1 筛选出的化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理研究</b> .....	130
5.1.1 苯甲醛类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理研究.....	130



5.1.2 4-乙烯苯甲醛和 4-乙烯苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理的比较.....	132
5.1.3 4-烷氧基取代苯甲酸类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理的比较.....	133
5.1.4 熊果甙(F <sub>1</sub> )对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理.....	133
5.1.5 巯基化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理的比较.....	134
5.1.6 脲类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理的比较.....	134
<b>5.2 合成的化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理的比较.....</b>	<b>136</b>
5.2.1 合成的半胱氨酸席夫碱类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理的比较.....	136
5.2.2 合成的缩氨基硫脲类化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理的比较.....	138
<b>5.3 采用紫外可见光谱分析巯基化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理.....</b>	<b>139</b>
<b>5.4 采用 DPPH 法分析化合物的清除氧自由基的能力.....</b>	<b>140</b>
<b>5.5 化合物对粗提的小鼠 B16 细胞中酪氨酸酶活性的抑制作用比较.....</b>	<b>140</b>
<b>5.6 合成的缩氨基硫脲类化合物对小鼠 B16 细胞黑色素合成的影响.....</b>	<b>141</b>
<b>5.7 效应物对 B16 细胞中酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2 的 mRNA 和蛋白表达量的影响... </b>	<b>142</b>
<b>6 结论.....</b>	<b>143</b>
<b>7 参考文献.....</b>	<b>145</b>
<b>已发表论文.....</b>	<b>162</b>
<b>致谢.....</b>	<b>165</b>

## Contents

<b>Chinese Abstract</b> .....	1
<b>English Abstract</b> .....	3
<b>1 Introduction</b>	
<b>1.1 General Introduction of tyrosinase</b> .....	5
1.1.1 The crystal structure of tyrosinase.....	5
1.1.2 General introduction of the active site of tyrosinase.....	7
1.1.3 Catalysing activity of tyrosinase.....	8
<b>1.2 General introduction of tyrosinase inhibitors</b> .....	9
1.2.1 The inhibitory effects of compounds containing phenol on tyrosinase.....	10
1.2.2 The inhibitory effects of stilbenes and analogs on tyrosinase.....	10
1.2.3 The inhibitory effects of flavonoids on tyrosinase.....	12
1.2.4 The inhibitory effects of benzaldehydes on tyrosinase.....	14
1.2.5 The inhibitory effects of compounds containing -COOH on tyrosinase.....	14
1.2.6 The inhibitory effects of amino acids on tyrosinase.....	15
1.2.7 The inhibitory effects of compounds containing sulfur on tyrosinase.....	16
1.2.8 Heterocyclic compounds.....	17
1.2.9 Haloid.....	18
1.2.10 Active compounds extracted from plants and animals.....	19
<b>1.3 The application of tyrosinase inhibitors</b> .....	21
<b>1.4 General introduction of regulators for melanin biosynthesis</b> .....	21
1.4.1 The proteins related with melanin biosynthesis in melanocyte.....	21
1.4.2 The signal induction pathway for regulating the melaninogenesis.....	23
<b>1.5 Significance and Contents of The Research</b> .....	25
<b>2 Reagents and instruments</b>	
<b>2.1 Reagents</b> .....	27

<b>2.2 Instruments</b> .....	29
<b>3 Methods</b>	
<b>3.1 The synthesis of tyrosinase inhibitors</b> .....	30
3.1.1 The synthesis of cysteine schiff bases .....	30
3.1.2 The synthesis of thiosemicarbazone .....	30
<b>3.2 Assay of inhibitory mechanism of effects on mushroom tyrosinase</b> .....	30
3.2.1 Assay of effects on the monophenolase activity by compounds .....	30
3.2.2 Assay of effects on the diphenolase activity by compounds .....	31
<b>3.3 Inhibitory mechanism of compounds by UV-Vis spectrum</b> .....	32
3.3.1 Change of spectrum of the L-DOPA oxidation by enzyme in presence of inhibitors .....	32
3.3.2 Change of spectrum of the L-DOPA oxidation by NaIO <sub>4</sub> in presence of inhibitors .....	32
<b>3.4 Anti-oxidant assay through DPPH method</b> .....	32
<b>3.5 Assay the diphenolase activity of cell-free tyrosinase from B16</b> .....	32
3.5.1 Preparation of cell-free tyrosinase from B16 .....	32
3.5.2 Assay the diphenolase activity of cell-free tyrosinase from B16 by compounds .....	32
<b>3.6 Effect of compounds on melanogenesis in B16</b> .....	33
3.6.1 Assay the change of cell vability in B16 by compounds .....	33
3.6.2 Assay the change of tyrosinase activity in B16 by compounds .....	33
3.6.3 Assay the change of melanin content in B16 by compounds .....	33
3.6.4 mRNA level of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 in B16 by compounds .....	34
3.6.5 Protein level of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 in B16 by compounds .....	35
<b>4 Results</b>	
<b>4.1 Screening inhibitors and studying the inhibitory mechanism</b> .....	36
4.1.1 Inhibitory effects and mechanism of alkylbenzaldehydes .....	36
4.1.2 Inhibitory effects of hydroxy-substituted benzaldehydes .....	41
4.1.2.1 Inhibitory effect of 3,4-dihydroxybenzaldehyde on monophenolase activity .....	41
4.1.2.2 Inhibitory effect of hydroxy-substituted benzaldehydes on diphenolase activity .....	42
4.1.2.3 Inhibitory mechanism of hydroxy-substituted benzaldehydes .....	43

4.1.3 Inhibitory effect of other benzaldehydes. ....	45
4.1.3.1 Inhibitory effect of other benzaldehydes on monophenolase activity. ....	45
4.1.3.2 Inhibitory effect of other benzaldehydes on diphenolase activity. ....	47
4.1.3.3 Inhibitory mechanism of other benzaldehydes on diphenolase activity. ....	49
4.1.4 Inhibitory effect of 4-vinylbenzaldehyde and 4-vinylbenzoic acid. ....	51
4.1.5 Inhibitory effect of 4-alkoxy-substituted benzoic acid. ....	56
4.1.5.1 Inhibitory capacities of 4-alkoxy-substituted benzoic acid. ....	56
4.1.5.2 Inhibitory effects of 4-alkoxy-substituted benzoic acid. ....	57
4.1.5.3 Inhibitory mechanism of 4-alkoxy-substituted benzoic acid. ....	58
4.1.6 Inhibitory effect and mechanism of arbutin on mushroom tyrosinase. ....	61
4.1.6.1 Inhibitory effect of arbutin on monophenolase activity. ....	61
4.1.6.2 Inhibitory effect of arbutin on diphenolase activity. ....	62
4.1.6.3 Inhibitory mechanism of arbutin on diphenolase activity. ....	63
4.1.7 Inhibitory mechanism of thiols on mushroom tyrosinase. ....	64
4.1.7.1 Inhibitory effect of N-acetyl cysteine on monophenolase activity. ....	64
4.1.7.2 Inhibitory effect of thiols on diphenolase activity. ....	65
4.1.8 Inhibitory effects and mechanism of ureas on mushroom tyrosinase. ....	67
4.1.8.1 Inhibitory effect of allythiourea on monophenolase activity. ....	67
4.1.8.2 Inhibitory effect of thioureas on diphenolase activity. ....	68
4.1.8.3 Inhibitory mechanism of thioureas on diphenolase activity. ....	70
4.1.8.4 Inhibitory kinetics of thioureas on diphenolase activity. ....	71
<b>4.2 Synthesis and inhibitory effects of the synthetical compounds. ....</b>	<b>76</b>
4.2.1 Synthesis of cysteine schiff bases. ....	76
4.2.2 Inhibitory effects of cysteine schiff bases on mushroom tyrosinase. ....	81
4.2.2.1 Inhibitory effects of cysteine schiff bases on monophenolase activity ....	81
4.2.2.2 Inhibitory effects of cysteine schiff bases on diphenolase activity. ....	84
4.2.2.2 Inhibitory mechanism of cysteine schiff bases on diphenolase activity. ....	85
4.2.3 Synthesis of thiosemicarbazone. ....	87
4.2.4 Inhibitory effects of thiosemicarbazone on mushroom tyrosinase. ....	97
4.2.4.1 Inhibitory effects of thiosemicarbazone on monophenolase activity. ....	97

4.2.4.2 Inhibitory effects of thiosemicarbazone on diphenolase activity.....	101
4.2.4.3 Inhibitory mechanism of thiosemicarbazone on diphenolase activity.....	103
<b>4.3 Inhibitory mechanism of thiols by UV-Vis spectrum.....</b>	<b>105</b>
4.3.1 Inhibitory mechanism of compound( <b>G</b> <sub>1</sub> ) by UV-Vis spectrum.....	107
4.3.2 Inhibitory mechanism of compound( <b>I</b> <sub>1</sub> ) by UV-Vis spectrum.....	108
4.3.3 Inhibitory mechanism of compound( <b>I</b> <sub>2</sub> ) by UV-Vis spectrum.....	109
4.3.4 Inhibitory mechanism of compound( <b>I</b> <sub>3</sub> ) by UV-Vis spectrum.....	111
4.3.5 Inhibitory mechanism of compound( <b>I</b> <sub>4</sub> ) by UV-Vis spectrum.....	112
<b>4.4 The anti-oxidant activity of compounds.....</b>	<b>113</b>
4.4.1 The anti-oxidant activity of benzaldehydes.....	113
4.4.2 The anti-oxidant activity of thioureas.....	114
4.4.3 The anti-oxidant activity of thiosemicarbazone.....	115
<b>4.5 The inhibitory effects of compounds on cell-free tyrosinase from B16.....</b>	<b>115</b>
4.5.1 Inhibitory effects of arbutin on cell-free tyrosinase from B16.....	115
4.5.2 Inhibitory effects of vitamins on cell-free tyrosinase from B16.....	116
4.5.3 Inhibitory effects of benzoic acid on cell-free tyrosinase from B16.....	117
4.5.4 Inhibitory effects of benzaldehyde on cell-free tyrosinase from B16.....	118
4.5.5 Inhibitory effects of thioureas on cell-free tyrosinase from B16.....	118
4.5.6 Inhibitory effects of cinnamonic compounds on cell-free tyrosinase from B16....	119
4.5.7 Inhibitory effects of thiosemicarbazone on cell-free tyrosinase from B16 .....	119
<b>4.6 The effects of compounds on B16.....</b>	<b>120</b>
4.6.1 The effect of kojic acid on B16.....	120
4.6.2 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>1</sub> )on B16.....	121
4.6.3 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>2</sub> )on B16.....	121
4.6.4 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>3</sub> )on B16.....	122
4.6.5 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>4</sub> )on B16.....	123
4.6.6 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>5</sub> )on B16.....	123
4.6.7 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>6</sub> )on B16.....	124
4.6.8 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>7</sub> )on B16.....	125
4.6.9 The effect of compound ( <b>J</b> <sub>8</sub> )on B16.....	125

4.6.10 The effect of compound ( <b>J<sub>9</sub></b> )on B16. ....	126
4.6.11 The effect of compound ( <b>J<sub>10</sub></b> )on B16. ....	127
<b>4.7</b> Effect of effectors on the mRNA level of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 in B16. ....	127
<b>4.8</b> Effect of effectors on the protein level of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 in B16. ....	129
<b>5 Discussion</b>	
<b>5.1 Inhibitory mechanism of the screened compounds. ....</b>	<b>130</b>
5.1.1 Inhibitory mechanism of benzaldehydes on mushroom tyrosinase. ....	130
5.1.2 Inhibitory mechanism of 4-vinylbenzaldehyde and 4-vinylbenzoic acid. ....	132
5.1.3 Inhibitory mechanism of 4-alkoxy-substituted benzoic acids. ....	133
5.1.4 Inhibitory mechanism of arbutin. ....	133
5.1.5 Comparing inhibitory mechanism of thiols. ....	134
5.1.6 Comparing inhibitory mechanism of ureas. ....	134
<b>5.2 Inhibitory mechanism of the synthetical compounds. ....</b>	<b>136</b>
5.2.1 Comparing inhibitory mechanism of cysteine schiff bases. ....	136
5.2.2 Comparing inhibitory mechanism of thiosemicarbazones. ....	138
<b>5.3 Analysing the inhibitory mechanism of thiols through UV-Vis spectrum. ....</b>	<b>139</b>
<b>5.4 The study of anti-oxidant activity by DPPH method. ....</b>	<b>140</b>
<b>5.5 Inhibitory effects of compounds on cell-free tyrosinase from B16. ....</b>	<b>140</b>
<b>5.6 The effects of thiosemicarbazones on melanogenesis in B16. ....</b>	<b>141</b>
<b>5.7 Change of mRNA and protein levels of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 by inhibitors. .</b>	<b>142</b>
<b>6 Conclusions. ....</b>	<b>143</b>
<b>7 References. ....</b>	<b>145</b>
<b>Papers. ....</b>	<b>162</b>
<b>Acknowledgements. ....</b>	<b>165</b>

## 摘 要

酪氨酸酶 (EC.1.14.18.1) 是一种含铜的氧化还原酶, 广泛存在于生物体中, 是生物体合成黑色素的关键酶, 通过调控其活性可以调控黑色素的生成量。

本论文首先以蘑菇酪氨酸酶为研究对象, 筛选酶抑制剂并探讨其对单酚酶和二酚酶活性的抑制作用机理。在总结抑制剂构效关系的基础上, 设计合成了两大类含硫化合物。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。并通过可见紫外光谱和DPPH法分别研究了巯基化合物的抑酶机理, 以及效应物的抗氧化活性。最后以小鼠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和蛋白表达水平的影响。相关研究内容及结果如下:

- (1) 分别比较研究了烷基苯甲醛、羟基苯甲醛、卤代苯甲醛、4-乙烯苯甲醛和苯甲酸、烷氧基苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶活力的抑制作用。它们均对酪氨酸酶具有抑制作用, 但苯甲醛类化合物对酪氨酸酶的抑制活性明显比苯甲酸类化合物强。通过研究烷基苯甲醛和烷氧基苯甲酸对酶的抑制机理表明, 苯环的4-位的取代基团可以提高化合物的抑酶活性, 并且当4-取代基团碳链长度达到一定长度时, 促进化合物的抑酶活性增强。
- (2) 分别研究半胱氨酸及其衍生物、硫脲类化合物对酪氨酸酶的抑制机理。研究表明, 半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸、半胱氨酸乙酯均是酪氨酸酶高效的抑制剂, 并均是该酶的不可逆抑制剂。而硫脲类化合物对酪氨酸酶的抑制机理均表现为可逆的抑制, 并表现出不同的抑制类型: 硫脲和氨基硫脲均是非竞争型, 而烯丙基硫脲和苯基硫脲均是混合型抑制剂。并且, 通过底物反应动力学, 测定了苯基硫脲对酪氨酸酶反应抑制动力学的相关参数。
- (3) 设计合成两类含硫的酪氨酸酶抑制剂: 半胱氨酸席夫碱类化合物和缩氨基硫脲类化合物。
- (4) 研究合成化合物对酪氨酸酶活性的抑制机理。研究表明, 合成的化合物均可以高效的抑制酶的活性, 均为酶的可逆抑制剂。但随着化合物苯环取代基团的不同, 表现出不同的抑制类型。
- (5) 采用可见紫外光谱研究巯基化合物对酪氨酸酶的抑制机理。半胱氨酸和四个合成的

半胱氨酸席夫碱类化合物均可以不同程度的与L-DOPA的氧化产物形成无色复合物，导致产物特征峰吸收值的下降。

- (6) 通过DPPH方法研究了化合物的清除氧自由基的活性。研究表明，苯甲醛类化合物除了3,4-二羟基苯甲醛外，清除氧自由基的活性均很弱。而硫脲类化合物在浓度较高时，才有清除氧自由基的活性。但合成的缩氨基硫脲类化合物则表现出不同的清除氧自由基的能力。
- (7) 粗提得到小鼠B16黑色素瘤细胞的酪氨酸酶，以此为研究对象，筛选酶抑制剂。熊果甙、维生素类化合物（维生素B<sub>1</sub>、C、K<sub>1</sub>）、苯甲酸类化合物、苯甲醛类化合物、硫脲类化合物、合成的缩氨基硫脲类化合物均对酪氨酸酶有不同程度的抑制作用。其中烯丙基硫脲、苯基硫脲、缩氨基硫脲类化合物表现出高效的抑制酪氨酸酶的活性。
- (8) 以曲酸为阳性对照，研究合成的缩氨基硫脲类化合物对B16细胞增殖率、细胞内酪氨酸酶活性、黑色素含量的影响。根据这三方面因素，4-二甲氨基苯甲醛缩氨基硫脲具有最佳的降低黑色素合成的活性。其对细胞中酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2蛋白的mRNA表达水平影响不大，但可以显著降低三种蛋白的蛋白表达水平。

总之，通过本课题的研究，设计合成了新型的高效酪氨酸酶抑制剂，并总结了抑制剂的构效关系。研究了酶抑制剂在小鼠B16黑色素瘤细胞中的抑制黑色素形成的效果，为其应用于美白化妆品奠定了理论基础。

**关键词：**酪氨酸酶；抑制剂；作用机理；动力学；黑色素形成调控



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库