

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620131152628

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

三唑衍生物的合成及其对蘑菇酪氨酸酶
抑制作用的研究

The synthesis of triazole derivatives on mushroom
tyrosinase and their mechanisms

喻枫

指导教师姓名: 石艳 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月 20 日

论文答辩时间: 2016 年 5 月 14 日

学位授予日期: 2016 年 月 日

答辩委员会主席: 陈清西

评 阅 人: _____

2016 年 5 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）：

年 月 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

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。）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目录

摘要	1
Abstract.....	3
1 前言	5
1.1 酪氨酸酶的生理功能	5
1.2 酪氨酸酶结构.....	6
1.2.1 酪氨酸酶的蛋白结构	6
1.2.2 酪氨酸酶活性中心结构	8
1.2.3 酪氨酸酶的催化活性	10
1.3 酪氨酸酶抑制剂	12
1.3.1 抑制黑色素合成途径	12
1.3.2 酪氨酸酶抑制的类型	13
1.3.3 酪氨酸酶抑制剂的发展	15
1.4 本课题的研究内容及意义	17
2 实验试剂与仪器	19
2.1 主要实验试剂.....	19
2.2 主要仪器设备.....	20
3 实验方法	21
3.1 化合物母核的筛选.....	21
3.2 三唑衍生物的合成.....	21
3.3 化合物的结构鉴定.....	22
3.3.1 红外光谱分析.....	22
3.3.2 质谱分析.....	22
3.3.3 核磁分析.....	22
3.4 酶学实验.....	23
3.4.1 抑制剂的筛选.....	23
3.4.1.1 二酚酶筛选	23
3.4.1.2 单酚酶筛选	23
3.4.2 酪氨酸酶的酶动力学	23

3.4.2.1 酪氨酸酶二酚酶抑制机理测定.....	23
3.4.2.2 酪氨酸酶二酚酶的抑制类型及抑制常数的测定.....	24
3.4.3 全波长扫描.....	24
3.5 化合物抑制作用的探究.....	24
3.5.1 铜离子结合实验.....	24
3.5.2 荧光淬灭实验.....	24
3.5.3 分子对接.....	25
3.6 抗氧化实验.....	25
3.7 细胞毒理实验.....	25
3.8 化合物对 B16 细胞中酪氨酸酶的作用探究.....	26
3.8.1 化合物对 B16 细胞内酪氨酸酶的抑制情况.....	26
3.8.2 蛋白样品的制备.....	26
3.8.3 电泳分析.....	26
4 实验结果.....	27
4.1 母核的筛选.....	27
4.2 三唑衍生物的合成及结构鉴定.....	28
4.2.1 化合物 Y ₁ 的合成及鉴定.....	28
4.2.2 化合物 Y ₂ 的合成及鉴定.....	30
4.2.3 化合物 Y ₃ 的合成及鉴定.....	32
4.2.4 化合物 Y ₄ 的合成及鉴定.....	34
4.2.5 化合物 Y ₅ 的合成及鉴定.....	36
4.2.6 化合物 Y ₆ 的合成及鉴定.....	38
4.2.7 化合物 Y ₇ 的合成及鉴定.....	40
4.3 化合物对蘑菇酪氨酸酶作用.....	42
4.3.1 化合物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用.....	42
4.3.2 化合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用.....	44
4.4 化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制动力学.....	46
4.4.1 酪氨酸酶二酚酶的抑制机理.....	46
4.4.2 化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型及抑制常数测定.....	47

4.4.2.1 化合物 Y ₁ 的抑制类型及抑制常数	47
4.4.2.2 化合物 Y ₂ 的抑制类型及抑制常数的测定	48
4.4.2.3 化合物 Y ₃ 的抑制类型及抑制常数的测定	49
4.4.2.4 化合物 Y ₄ 的抑制类型及抑制常数的测定	50
4.4.3 产物累积全波长扫描	51
4.5 抑制剂与酶的作用	53
4.5.1 铜离子结合实验	53
4.5.2 荧光淬灭实验	54
4.5.3 分子对接实验	56
4.6 抗氧化实验	58
4.7 细胞毒理实验	59
4.8 化合物对 B16 细胞中酪氨酸酶的作用	61
4.8.1 化合物对 B16 细胞中酪氨酸酶的抑制作用	61
4.8.2 化合物 Y ₃ 对 B16 细胞的酪氨酸酶表达影响	62
5 讨论	64
5.1 化合物结构的设计	64
5.2 化合物的抑制效果与结构关系	65
5.3 化合物的抑制动力学	66
5.4 化合物抑制作用的探究	66
5.5 化合物的抗氧化作用	67
5.6 化合物的细胞毒理	67
5.7 化合物对 B16 细胞中黑色素生产的影响	67
6 展望	69
参考文献	70
硕士期间发表的文章	80
致谢	81

Content

Chinses abstract	1
English Abstract	3
1 Introduction	5
1.1 The physiological functions of tyrosinase	5
1.2 The structure tyrosinase.....	6
1.2.1 The protein structure of tyrosinase.....	6
1.2.2 The active center of tyrosinase.....	8
1.2.3 The catalytic activity of tyrosinase	10
1.3 Tyrosinase inhibitor	12
1.3.1 The inhibitroy pathway of melanin biosynthesis	12
1.3.2 The type of tyrosinase inhibitor	13
1.3.3 The development of tyrosinase inhibitor.....	15
1.4 The sinificance and contents of this research	17
2 Reagents and instruments	19
2.1 Main reagents	19
2.2 Main instruments	20
3 Methods	21
3.1 Screening the parent nucleus	21
3.2 The synthesis of triazole derivatives	21
3.3 The identification of the compounds structures	22
3.3.1 Infrared spectrum analysis	22
3.3.2 Mass spectrometry analysis.....	22
3.3.3 Analysis of ¹ H NMR	22
3.4 Enzymology experiments	23
3.4.1 Screening of inhibitors	23
3.4.1.1 The screening on diphenolase.....	23
3.4.1.2 The screening on monophenolase.....	23
3.4.2 The kinetics of tyrosinase.....	23

3.4.2.1	The inhibitory mechanism determination of diphenolase.....	23
3.4.2.2	The inhibitory type and constant determination of diphenolase.....	24
3.4.3	The wavelength scanning	24
3.5	The exploration of inhibition process of compounds	24
3.5.1	Copper interactions	24
3.5.2	Fluorescence quenching	24
3.5.3	Molecular docking	25
3.6	Antioxidant assay	25
3.7	Cells toxicology experiment.....	25
3.8	The effect of compound on tyrosinase in B16 cells	26
3.8.1	The inhibitory of compound on tyrosinase	26
3.8.2	The preparation of protein samples.....	26
3.8.3	Electrophoretic analysis	26
4	Results	27
4.1	Screening of the parent nucleus.....	27
4.2	Synthesis and structure identification of triazole derivatives.....	28
4.2.1	The synthesis and identification of compound Y ₁	28
4.2.2	The synthesis and identification of compound Y ₂	30
4.2.3	The synthesis and identification of compound Y ₃	32
4.2.4	The synthesis and identification of compound Y ₄	34
4.2.5	The synthesis and identification of compound Y ₅	36
4.2.6	The synthesis and identification of compound Y ₆	38
4.2.7	The synthesis and identification of compound Y ₇	40
4.3	The effects of compounds on mushroom tyrosinase	42
4.3.1	The effect of compounds on diphenolase of mushroom tyrosinase.....	42
4.3.2	The effect of compounds on monophenolase of mushroom tyrosinase.....	44
4.4	The inhibitory kinetics of compounds of mushroom tyrosinase	46
4.4.1	The inhibitory mechanism of diphenolase	46
4.4.2	The determination of mushroom tyrosinase inhibitory types and inhibit constants.....	47

4.4.2.1 The inhibitory type and constant of compound Y ₁	47
4.4.2.2 The inhibitory type and constant of compound Y ₂	48
4.4.2.3 The inhibitory type and constant of compound Y ₃	49
4.4.2.4 The inhibitory type and constant of compound Y ₄	50
4.4.3 The wavelength scanning of product accumulating	51
4.5 The inhibitory on enzyme	53
4.5.1 Copper interacting	53
4.5.2 Fluorescence quenching	54
4.5.3 Molecular docking	56
4.6 Antioxidant experiment	58
4.7 Cells toxicology	59
4.8 The effect of compound on tyrosinase in B16 cells	61
4.8.1 The inhibitory of compound on tyrosinase of B16 cells	61
4.8.2 The effect on tyrosinase expression of B16 cells of compound	62
5 Discuss	64
5.1 The design of the compound structure	64
5.2 The relationship between inhibition effects and the structures	65
5.3 The inhibitory kinetics of compounds	66
5.4 The inhibitory research of compounds	66
5.5 The antioxidant effect of compounds	67
5.6 Cell toxicity of compounds	67
5.7 The influence of melanin production of B16 cells	67
6 Outlook	69
Reference	70
published articles	80
Acknowledgement	81

缩略语中英文对照表

简称	英文全称	中文全称
AHMT	4-amino-3-hydrazino-5-mercapto- 1,2,4-triazol	4-氨基-3-胍基-5- 巯基-1,2,4-三唑
ABTS	2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid	2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻 唑-6-磺酸)二铵盐
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	改良杜氏伊格尔培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
¹ H NMR	Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance	氢原子核磁共振
LC-MS	liquid chromatograph-mass spectrometer	液相色谱仪-质谱仪
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanine	多巴
L-Tyr	L-tyrosine	L-酪氨酸
MTT	Methyl Thiazolylerazolium	噻唑蓝
PBS	Phosphate buffer	磷酸缓冲液
PPO	polyphenol oxidase	多酚氧化酶
K _i	Inhibition constant	抑制常数
Vc	Vitamin C	维生素 C
TRP-1	tyrosinase related protein 1	酪氨酸酶相关蛋白 1
TRP-2	tyrosinase related protein 2	酪氨酸酶相关蛋白 2
Y ₁	(Z)-4-amino-5-(2-(3-fluorobenzylidene)hydrazinyl)-4 H-1,2,4-triazole-3-thiol	4-氨基-3 胍基-5-巯-1,2,4- 三唑-3-氟苯甲醛席夫碱
Y ₂	(Z)-3-((2-(4-amino-5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-yl) hydrazono)methyl)phenol	4-氨基-3 胍基-5-巯基-1,2, 4- 三唑-3-羟基苯甲醛席夫碱
Y ₃	(Z)-2-((2-(4-amino-5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-yl) hydrazono)methyl)phenol	4-氨基-3 胍基-5-巯基-1,2,4-三 唑-2-羟基苯甲醛席夫碱
Y ₄	(Z)-4-(2-(4-amino-5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-yl)h	4-氨基-3 胍基-5-巯基-1,2, 4-

	ydrazono)methyl)phenol	三唑-4-羟基苯甲醛席夫碱
Y ₅	3-(E-(2-(4-(Z-3-hydroxybenzylidene-amino)-5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-yl)hydrazono) methyl) phenol	4-氨基-3-胂基-5-巯基-1,2,4-三唑-2 (3-羟基苯甲醛席夫碱)
Y ₆	4-(E-(2-(4-(Z-4-hydroxybenzylidene-amino)-5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-hydrazono) methyl) phenol	4-氨基-3-胂基-5-巯基-1,2,4-三唑-4 (2-羟基苯甲醛席夫碱)
Y ₇	5-(E-(2-(4-(Z-3-hydroxy-4-methoxy-benzylidene-amino)-5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-yl)hydrazono)methyl)-2-methoxyphenol	4-氨基-3-胂基-5-巯基-1,2,4-三唑- (3-羟基-4-甲氧基苯甲醛席夫碱)

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

酪氨酸酶广泛的存在于各生物体内,其产物多巴醌能与氨基酸或者蛋白质聚合黑色素,该酶是合成黑色素的关键酶。然而黑色素的过量合成会引起雀斑、黄褐斑、老年斑等色素沉积性皮肤病,此外研究表明,酪氨酸酶还与帕金森综合症、昆虫蜕皮、果蔬褐变有密切关系。因此,控制酪氨酸酶活性的研究在农业、制药业及化妆品行业有重要开发价值。

4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑(AHMT)为五元氮杂环,是酰胺键的电子等排物,也具有潜在的配位键,而苯甲醛类衍生物为酪氨酸酶底物的类似物,可以竞争性抑制酶失活性。本文以AHMT为母核与苯甲醛衍生物反应,合成了一系列的抑制剂。反应在乙醇溶液中进行,回流3 h,抽滤,重结晶,烘干得到的固体粉末。再经过红外光谱、LC-MS及 $^1\text{H NMR}$ 实验方法鉴定其分子结构。

以蘑菇酪氨酸酶为模型,对这系列化合物进行活性筛选,结果证明AHMT分别与3-氟苯甲醛、3-羟基苯甲醛、2-羟基苯甲醛及4-羟基苯甲醛合成了四个化合物 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 的具有很强的抑酶活性,其抑制蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的 IC_{50} 分别为12.0、7.0、1.5和1.45 $\mu\text{mol/L}$ 。进一步探究抑制机理,发现这四个化合物为可逆抑制剂,且其抑制动力学的双倒数直线相交于二象限或三象限的,表明四个化合物为混合型竞争抑制剂,其 K_I 和 K_{IS} 值分别为6.67和4 $\mu\text{mol/L}$, 7.94和27.8 $\mu\text{mol/L}$, 15.47和21.04 $\mu\text{mol/L}$, 17.34和23.42 $\mu\text{mol/L}$ 。酶学实验结果表明化合物具有很好的酪氨酸酶抑制效果,且其活性与分子结构有关,二酚酶实验表明苯环上羟基取代优于氟取代,4位取代>2位取代>3位取代,且AHMT与一分子的苯甲醛衍生物缩合成分子时会发挥较强的抑酶活性,与两分子的苯甲醛衍生物反应生成化合物时,会形成较大的空间位阻,从而降低化合物对酪氨酸酶的抑制作用。

通过铜离子结合实验、荧光淬灭、分子对接实验研究抑制剂分子与酪氨酸酶的抑制机理。实验结果表明,化合物可能与酪氨酸酶的活性中心氨基酸残基形成氢键,生成复合物,通过改变酶的构象从而影响酶的活力,此外化合物 Y_3 还可以与酪氨酸酶活性中心的铜离子螯合来进一步抑制酶的活力。

化合物 Y_1 、 Y_2 及 Y_3 对人正常的肝细胞及小鼠的黑色素瘤细胞的增值都没抑

制作用，这表明化合物没有细胞毒性，且其化合物 Y₃ 对 B16 细胞中酪氨酸酶的表达具有下调作用。此外，化合物因有较强的还原基团，使之具有很强的清除氧自由基的能力，是潜在的抗氧化剂。综合表明化合物是潜在的酪氨酸酶抑制，但还需要对其安全性，稳定性等做更深入的研究。

关键词：有机合成；酪氨酸酶抑制剂；酶动力学；抑制机理

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Tyrosinase is the key enzyme for the synthesis of melanin and widely exists in various organisms, the dopaquinone, the product of enzyme, can aggregate melanin with amino acids or proteins. However, excess melanin could cause sedimentary pigment diseases such as, freckles, chloasma, age spots. Besides the tyrosinase is close relationship to parkinson's disease, insect molting and fruit browning. Therefore, the research of control of tyrosinase activity in agricultural, pharmaceutical and cosmetics industry has great development value.

4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (AHMT), a electronic equivalent of amide linkage, is the nitrogenous heterocyclic and also the potential coordination bond compound. The benzaldehyde derivatives were the substrate analogues of tyrosinase, and it can be competitive inhibition enzyme activity. A series of synthesis inhibitors were based on AHMT and benzaldehyde derivatives. The reaction in the ethanol solution refluxed and lasted three hours, then filter and recrystallize the solid powder. The experimental methods of infrared spectrum, LC-MS and ^1H NMR were used to identify its molecular structures.

Mushroom tyrosinase as the model to screen the compounds, the results proved that the compound Y_1 , Y_2 , Y_3 and Y_4 , synthesized by AHMT reacting with 3-fluoro benzaldehyde, 3-hydroxy benzaldehyde, 2-hydroxy benzaldehyde and 4-hydroxy benzaldehyde respectively, have strongly inhibitory effective on tyrosinase. The IC_{50} of diphenolase of mushroom tyrosinase was 12.5, 7.0, 1.5 and 1.45 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Further research on inhibitory mechanisms found that the compounds were all reversible inhibitors. In addition all the inhibitors were mixed competitive for their enzyme kinetics lines all passing through the second quadrant or third quadrant, and its K_I and K_{IS} values were 6.67 and 4 $\mu\text{mol/L}$, 7.94 and 27.8 $\mu\text{mol/L}$, 15.47 and 21.04 $\mu\text{mol/L}$, 17.34 and 23.42 $\mu\text{mol/L}$. The enzymology experiments results showed that the compounds have good inhibitory effective on tyrosinase, and its activity were related to the molecular structures, hydroxyl groups on the benzene ring was superior to that of fluorine, 4-substituted on the benzene ring was better than

that of 2-substituted and 3-substituted, and two benzene rings connecting to the triazole ring would produce larger steric hindrance, and affect the bonding between tyrosinase and inhibitors to decrease the inhibitory effects.

Copper interacting, fluorescence quenching and molecular docking experiments were used to reveal the inhibitory mechanism of tyrosinase inhibitors. The experimental results showed that the compounds and enzyme may generate new compounds through hydrogen bonds between inhibitors and amino acid residues of the active center of tyrosinase, and the interacting process may change the conformation of enzyme. Besides, compound Y₃ can also inhibit the enzyme by chelating the copper ion in tyrosinase active center.

Compound Y₁, Y₂, Y₃ have no impact on the proliferation of melanoma cells of mice and normal liver cells of human to prove that the compounds have no cytotoxicity. What's more, compound Y₃ could suppress the expression of tyrosinase in B16 cells. Because strong reductive groups on the compounds make it have a strong ability to eliminate free oxygen radicals, the compounds were potential antioxidants. In a word, the compounds are potential tyrosinase inhibitors, but further works such as security, stability should be researched.

Keywords: synthesis; inhibitor; enzyme kinetics; inhibitory mechanism

1 前言

1.1 酪氨酸酶的生理功能

酪氨酸酶的认识始于 1895 年，人们发现蘑菇暴露于空气中，颜色由白色慢慢转变成黑色，自此开始了酪氨酸酶的研究和探索过程。Sanchezferre 等^[1]表明酪氨酸酶（EC 1.14.1, tyrosinase）是一种含铜酶，其广泛的分布于微生物、动植物及人体中。酪氨酸酶具有的双重催化功能，是生物体内黑色素合成的关键酶。Liu X 等^[2]报道在生物体内，酪氨酸酶先将酪氨酸羟基化成多巴，再将多巴进一步氧化成多巴醌，Wakamatsu, Kavanagh 等^[3, 4, 5]表明多巴醌再经过一系列的酶促和非酶促反应与氨基酸或者蛋白质聚合成黑色素分优黑素 (Eumelanins) 和褐黑素 (Pheomelanins) 两种，前一种为棕黑色，后一种为红棕色，两种色素的比例不同造成毛发皮肤颜色的不同。Prota^[6]报道羽毛、毛发、眼睛、昆虫表皮、果实、种子等色素都是酪氨酸酶作用的结果。

据 Barsh 等^[7]报道，哺乳动物酪氨酸酶常见于黑素细胞的黑色素小体中，黑素细胞是胚胎发育过程中存在于神经嵴、皮肤基层层及发囊中产生色素的高度特异性的细胞。Wakamatsu, Zimmerman 等^[3, 8]报道，酪氨酸酶催化产生的黑色素被分泌进入到表皮和毛发的角质细胞中，使体表着色，从而起保护皮肤和眼睛、抵御紫外线的辐射，防止内部组织过热及除氧自由基等作用。在紫外的照射下，黑色素小体数量会增加以合成更多的黑色素来抵御紫外线的伤害，也会造成色素沉积的困扰，其过程如图 1 所示。Mapunya, Villareal 等^[9, 10]报道，

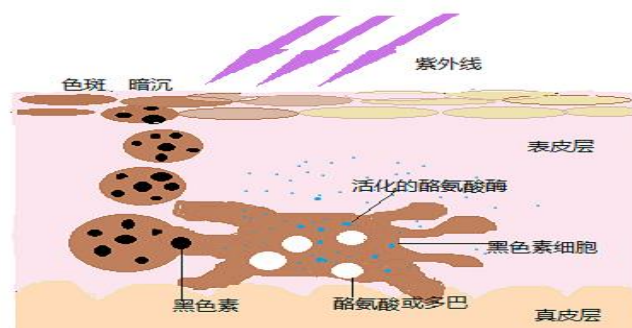


图 1. 人体表黑色素产生图解

Fig 1. The diagram of melanin formation of the human's skin

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.