

第1章 酪氨酸酶与酪氨酸酶抑制剂

众所周知,酪氨酸酶是生物合成黑色素的关键酶,包括决定哺乳类动物皮肤和头发的颜色。不同的皮肤病,像黄黑斑、老年斑都是因为表皮色素过度积累的结果。另外,酪氨酸酶引起褐变导致营养降低,质量变差和经济损失。当前,传统的技术不足以防止酪氨酸酶的作用,鼓励大家寻找新的有效的酪氨酸酶抑制剂。

黑色素是一种分布最广泛的色素之一,在细菌、真菌、植物、动物中都有发现。它是不同酚类的生物高聚物,有着复杂的结构,颜色从黄色到黑色间变化。哺乳动物的皮肤和毛发的颜色是由许多因素共同决定的,其中最重要的因素是色素的含量、种类和分布。黑色素充当着保护皮肤的角色,吸收紫外线,消除活性氧。各种各样的皮肤病导致皮肤色素的过度积累,影响皮肤的美容。黑色素恶性肿瘤,特别是威胁生命的皮肤肿瘤,引起人们的极大关注。黑色素通过一系列氧化反应形成,包括酪氨酸酶参与的氧化酪氨酸的反应。

酪氨酸酶是一种含铜离子酶,催化黑色素合成的两步关键反应:酪氨酸的羟基化和将多巴氧化成多巴醌的反应。酪氨酸酶在植物和动物中广泛存在,并参与到黑色素的形成之中。在食品工业当中,酪氨酸酶是一种非常重要的酶,在控制蔬菜和水果的质量和经济学价值中^[1],酪氨酸酶催化酚类化合物的氧化来形成相应的醌和引起水果和蔬菜的酶促褐变。另外,醌类化合物同带有氨基和巯基官能团的蛋白质反应,生产不可逆的褐变色素,形成令人不愉快的颜色和气味。这种醌和蛋白质的反应降低了蛋白质的可消化性和必要氨基酸的利用率,包括赖氨酸和半胱氨酸。因此,高活性的酪氨酸酶抑制的发展在农业和食品工业领域有很大的需求。

酪氨酸酶在昆虫的生长和防御作用方面发挥着重要的作用。它参与到昆虫体内黑色素元的生成,伤口的愈合、蜕皮等^[2]。酪氨酸酶抑制剂的发展在控制虫害方面已经变成一种积极的可选择的方式。另外,酪氨酸酶抑制剂已经变成医药和化妆品中的重要组成部分,它用于防止黑色素过度积累^[3]。

1.1 酪氨酸酶的生化反应特征和反应机理

1.1.1 酪氨酸酶的分类和活性

酪氨酸酶是研究最充分多铜加氧酶之一,它含有两个铜离子的活性中心酶。酪氨酸酶催化单酚的羟基化和二酚到邻苯醌。后者的反应速度比前者快很多,因此,这酪氨酸的羟基化到 L-多巴被认为是反应的决速步骤。分类研究证明了被纳入到酚的底物氧分子来源于氧气^[4]。

最有特征的酪氨酸酶是来源于链霉菌、脉孢菌和蘑菇。前面两种是单体蛋白,最后一种是两种不同亚基的四聚体。酪氨酸酶已经从许多的植物和动物资源中被分离,纯化,但是只有很少一部分已经明确了特征。不像真菌的酪氨酸酶,人酪氨酸酶是膜束缚的糖蛋白(13%糖类)^[5]。这些酶中的大部分基因已经测序。在人酪氨酸酶基因中各种突变都与褪色缺失的眼皮肤白化病有关。在真菌和脊椎动物中,酪氨酸酶催化酪氨酸是黑色素形成基本步骤。在植物当中,酪氨酸酶催化的底物是不同的酚类物质。当病原体和昆虫的组织受伤时,酪氨酸酶在褐变途径中氧化酚类物质对伤口进行保护。^[4]

1.1.2 酪氨酸酶催化机理

酪氨酸酶单酚酶活性的机理与它的三种形态紧密相关。三种亚型分别是还原形态、氧化形态和脱氧形态。在单酚酶的反应周期中,单酚酶只能同氧化形态反应和束缚一个氧化形式铜离子的轴向位置。靠束缚过氧化物穿过一个三角形双锥体的中间体重排实现单酚的羟基化。这样产生一个邻苯二酚分子,邻苯二酚被氧化成邻苯二醌,结果在脱氧形态形成中进一步束缚氧分子。^[5]

邻苯二酚能与酪氨酸酶的静止形态反应,形成结合的邻苯二酚。在二酚酶周期中,氧化和还原两种形态形式同邻苯二酚反应,氧化成为邻苯二醌。然而,单酚能同二酚竞争束缚静止亚型的活性位点,抑制二酚的减少。比较单酚底物和二酚底物的动力学常数,在苯环上较大体积取代物显著降低单酚酶的活性,但不是二酚酶的活性^[6]。这些暗示了当单酚底对羟基化物要求轴向赤道的重排,邻苯二酚底物不需要经过重排,在铜离子位置简单的电子转移就能完成羟基化。

稳定状态途径的动力学研究表明酪氨酸酶催化单酚比苯邻苯二酚的效率低。单酚酶的活性有一个明显的延迟时间的特征^[7]。这个延迟时间取决于这些

因素,像底物和酶的浓度和氢供体的参与。在动力学研究中,延迟时间是要求静止态通过还原剂被卷入到脱氧态,这段时间出现少量氧化态通常地伴随有静止态亚型的活动。在还原剂的出现认为是辅助因子,特别是邻苯二酚衍生物像 L-DOPA 和(+) - 儿茶酸,酪氨酸酶是活跃的,并且这延迟时间被缩短或消失。L-DOPA 在非常低的浓度是最有效的消除延迟时间的化合物。

1.1.3 在哺乳动物中黑色素生物合成的途径

哺乳动物的黑色素细胞能产生两种类型的黑色素:真黑色素和褐黑色素。真黑色素的颜色是黑色或褐色,褐黑色素的颜色是红色或黄色。野生型刺鼠毛发变色就是在毛囊黑色素细胞中这两种黑色素的转变的结果。几十年来,黑色素生物合成已经被研究和表征,特别是那些所需要的真黑色素。^[4]

褐黑色素的合成的开始阶段是通过酪氨酸酶催化 L-DOPA 到与它相应的多巴醌,再到多巴色素。初期的多巴醌能经过两种不同的反应类型:分子内的 1,4-加成到这苯环上,或与水加成反应。一个邻多巴醌侧链的氨基首先经历分子内的 1,4-加成到苯环上,这导致它催化成白色多巴素。白色多巴色素迅速通过另一个邻多巴醌参与,被氧化成多巴色素。水加成到醌上形成三羟基酚。2,4,5-三羟基苯丙氨酸被化学法氧化成间羟基多巴醌通过另外一个邻位多巴醌^[8]。这间羟基多巴醌参与,通过一系列缓慢反应成为多巴色素,这是开始阶段的最终产物。

最后阶段是用化学和酶促反应来表示,它们发生在多巴色素生产后造成真黑素的合成。它从缓慢的化学生成的多巴色素的去羧基生成 5,6-二羟基吲哚开始,并且它的底物氧化成吲哚醌。多巴色素可以被多巴色素互变异构酶催化变成 5,6-二羟基吲哚-2-羧基酸。5,6-二羟基吲哚-2-羧基酸进一步被氧化,通过邻位多巴醌来形成吲哚,5,6-二醌羧酸的氧化还原反应。吲哚,5,6-二醌羧酸存在三种互变异构的形式,包括醌亚胺和相应的高反应活性的醌甲氧化物。5,6-二羟基吲哚和 5,6-二羟基吲哚-2-羧基酸的衍生的黑色素的功能是不同的,前者是黑色,羊毛状的,然而后者是黄棕褐色,高分散的状态^[9]。

在褐黑素生成时,像谷胱甘肽和半胱氨酸等硫氢基化合物的硫醇基亲核地进攻邻位多巴醌通过酪氨酸酶酶促地催化来生成半胱氨酸多巴或谷胱甘肽多巴。这些硫醇基能够加到苯环的不同位置,尽管这 5-位是有利的位置。半胱氨酸多巴或谷胱甘肽多巴的取代环合作用和聚合在一些列不典型的反应中,导致褐黑素和表面色素的产生。这真黑素和褐黑素之间的相互作用引起混合型黑色

素的不均匀分布。

1.1.4 植源性食物的酶促褐变

植源性食物和饮料,在刷洗、削皮和压碎等操作时,破坏细胞结构之后,酪氨酸酶和它们的多酚物被混合,在有氧的条件下发生酶促褐变。酶促褐变的基本步骤是邻苯二酚的氧化,像 L-DOPA 到相应的醌,醌进一步氧化变成褐色的黑色素。邻位醌是很强的亲电体,它能遭到亲核体进攻,如水、其它的酚、氨基酸、多肽和蛋白质等,生成迈克尔加成产物。这些酶促褐变能够通过半胱氨酸和抗坏血酸捕获邻位中间体来阻止^[10]。

绿原酸、植源性食物的主要酚类化合物,也被酪氨酸酶氧化成高反应活性的邻位醌中间体。邻位醌中间体能同赖氨酸的氨基,蛋氨酸的 SCH₃ 和色氨酸的吲哚环发生亲核加成和聚合反应,这就是所谓的褐变和绿变反应。这些转变毁坏了重要的氨基酸,降低了消化吸收度和营养质量,也可能导致毒性化合物的形成。

1.2 酪氨酸酶抑制剂

通过避开紫外线的照射,酪氨酸酶的抑制,黑色素细胞新陈代谢和分裂的抑制或黑色素消融等方法可以抑制黑色素的生成。色素沉着过度紊乱标准典型的治疗方法,像治疗黑斑和炎症后的色素沉着过度的方法,包括用对苯二酚,通过维生素 A 和酪氨酸酶抑制剂的使用来增白。

1.2.1 从植物中分离提取得到的黄酮类酪氨酸酶抑制剂

植物多酚通常被归类为不同基团的具有酚功能的混合物。这些化合物是高等植物的次级代谢产物,具有许多的生物活性。黄酮类化合物是发现量最大,研究最充分的植物酚的一类,它是苯并吡喃酮衍生物,由吡喃环和酚环组成。已经被鉴别的超过 4000 种黄酮广泛分布在植物的花、皮、叶子、种子里面。根据三碳键结构的氧化程度和 B 环的连接位置等特点,黄酮类化合物可分为:黄烷醇、黄酮、黄酮醇、异黄酮、黄烷酮醇、查耳酮、橙酮等,它们有不同的羟基、甲氧基、糖苷基在不同的位置,并在 A、B 环间发生共轭。Y. -J. Kim^[10]总结了从植物中分离出来的黄酮类酪氨酸酶抑制剂,见图 1-1。

最近,又报道了一些黄酮类酪氨酸酶抑制剂^[11-13]。Carole Dubois^[11]等研究

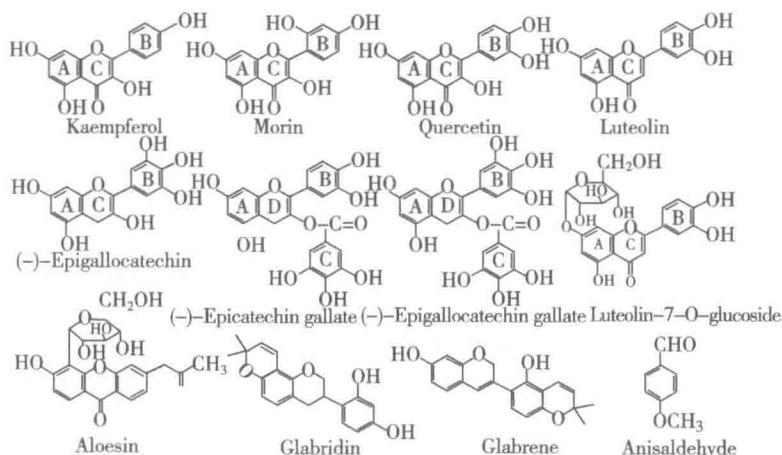


图 1-1

橙酮抑制酪氨酸酶活性,发现羟基在 A 环的对位, B 环没有取代,没有抑制作用,而在 B 环邻间对位上分别被羟基取代,具有提高酪氨酸酶催化活性的作用。将 B 环换成氧化 N-2-羟基吡啶后的杂环橙酮(结构式如图 1-2)表现出很强的酪氨酸酶抑制活性, $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol/L}$,其抑制表现为混合抑制的特征。说明了酪氨酸酶不止一个活性位点催化氧化橙酮,并且杂环酮和酪氨酸酶双铜的螯合,是发挥其抑制酪氨酸酶活性的重要原因。

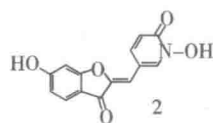


图 1-2

木菠萝的木材曾经用作抗炎、抗氧化、抗衰老剂,于是 Nhan Trung Nguye 等^[12]用甲醇溶液从中分离出了 4 个黄酮类化合物和 12 个查耳酮类化合物(图 1-3),它们中的大部分对酪氨酸酶的抑制作用,比现在化妆品中的增白剂曲酸强,特别是莫拉查耳酮 12,其 $IC_{50} = 0.013 \mu\text{mol/L}$ 。

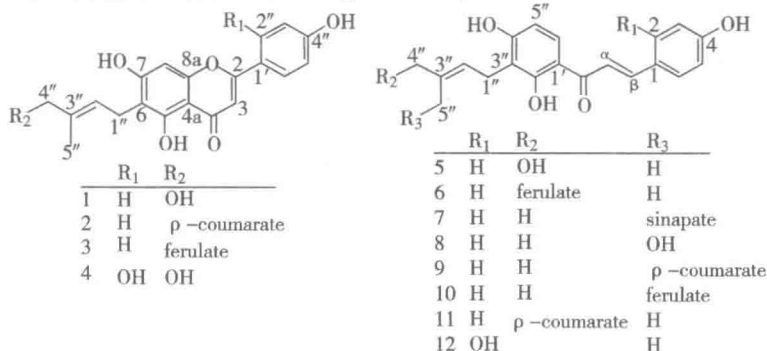


图 1-3

Ziaullah 等^[13]合成了两个系列不同不饱和度的长链根皮苷和异槲皮苷酯衍生物,根皮苷和异槲皮苷对酪氨酸酶的抑制活性都不是很强,但其长链酯化以后抑制酪氨酸酶的活性大大提高,如根皮苷的二十二碳六酸酯和异槲皮苷的 α -亚麻酸酯都对酪氨酸酶有很强的抑制活性。这些化合物都保留着抗氧化的能力,虽然酯化后的化合物清除自由基的能力减弱,但生物利用度和生物活性增强。

1.2.2 从植物中分离的酪氨酸酶抑制剂

自然界是一个巨大的宝库,很多植物的次级代谢产物有着广泛的生物活性。从药材中提取、分离出这些有效化合物,鉴定它们的结构,确定它们的生物活性是发现药物前体的重要手段。近两年,许多研究者从常见的植物和药材中,分离,提取,报道了许多结构新颖的酪氨酸酶抑制剂。

Horng - Huey Ko 等^[14]从木菠萝的木心中分离提取的化合物(图 1-4),具有酪氨酸酶抑制活性,其抑制活性比维生素 A 和熊果苷之间,还具有抗 ABTS + O_2^- 的作用。

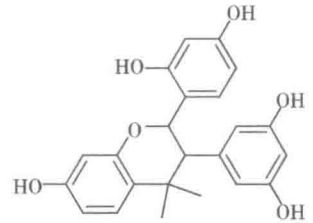
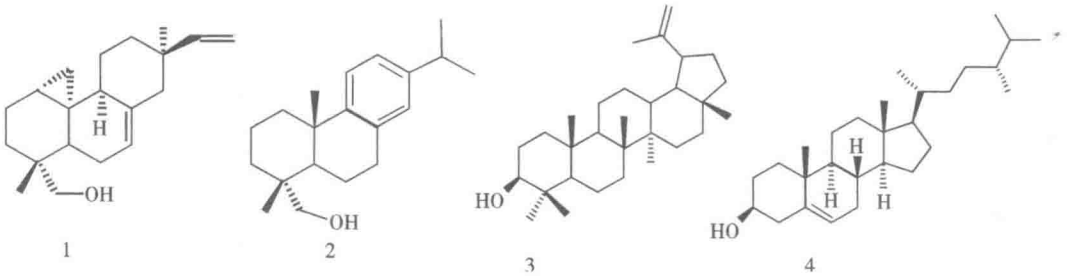


图 1-4

蒲包草具有抵御食草动物和昆虫的作用,因为在这草种中有天然特殊的生物杀虫混合物。Evelyn Muñoz 等^[15]用乙酸乙酯和正己烷从蒲包草中提取,分离出阿松香三稀 2、熊果酸 3 α -董尼酮 6、羽扇醇 4、谷甾醇 5、毛蕊花苷 8、马替诺皂苷 9 等具有抑制酪氨酸酶催化 L-多巴合成黑色素的活性,它们抑制酪氨酸酶的 IC_{50} 在 10.0 到 200PPM 之间,结构见图 1-5。这些次级代谢产物对昆虫的作用各不相同,它们在杀灭方面的机理还要深入的检测和研究。



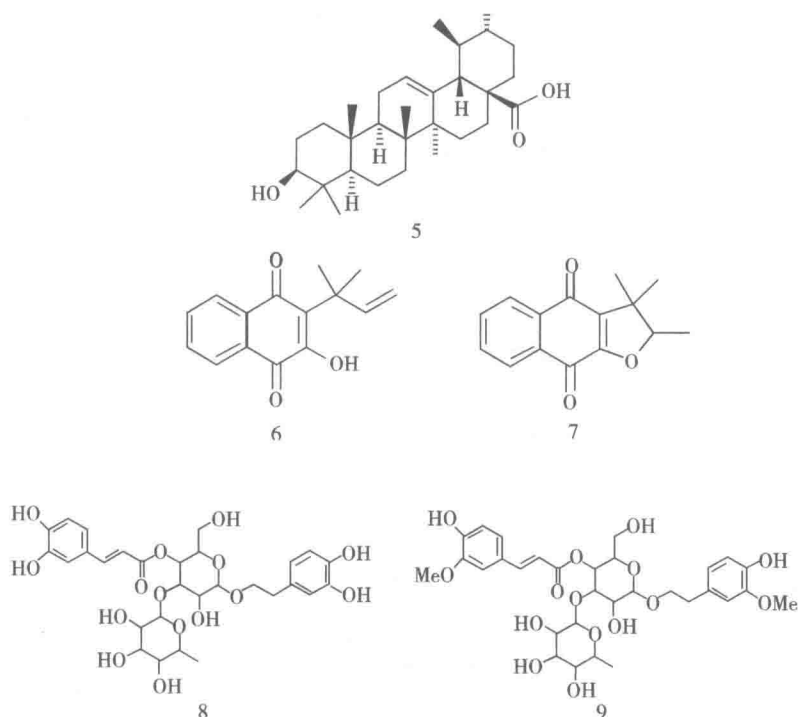


图 1-5

Xiaofang Wu 等^[16]从芦荟中提取的芦荟苦素对酪氨酸酶有比较强抑制作用,其 IC_{50} 为 $108.62\mu\text{g/mL}$,其结构如图 1-6。

Hiroki Satooka 等^[17]从冬凌草山茶中分离出了 4 个贝壳杉稀二萜化合物结构(见图 1-7),它们有很强的抑制黑色素生产的作用,但对小鼠 B16-F10 黑素瘤细胞表现出很强的细胞毒性。冬凌草素和 nodosin 对黑素瘤细胞毒性的 IC_{50} 分别为 $1.1\mu\text{mol/L}$ 和 $1.3\mu\text{mol/L}$,当其浓度为 $4.0\mu\text{mol/L}$ 和 $8\mu\text{mol/L}$ 时,差不多全部黑素瘤细胞被杀死。Dihydronosin 对 B16-F10 的细胞毒性大大降低,而对黑色合成有比较强的抑制作用,所以 dihydronosin 是一个很有潜力的黑色合成的抑制剂。

Seikou Nakamura 等^[18]从睡莲的花芽和叶子的甲醇容易对 B16 黑素瘤细胞合成黑色素有抑制作用,其 $IC_{50} = 35.7\mu\text{g/mL}$,并从中分离出 11 种苯基异喹啉生物碱。N-甲氧基-阿朴啡莲碱 2 和 N-甲基阿婆碱 5 抑制黑色素合成的 IC_{50} 分别为 $15.8\mu\text{mol/L}$ 和 $14.5\mu\text{mol/L}$ 。他们对黑素瘤细胞的细胞毒性不是很强。在

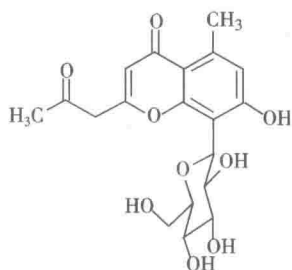


图 1-6

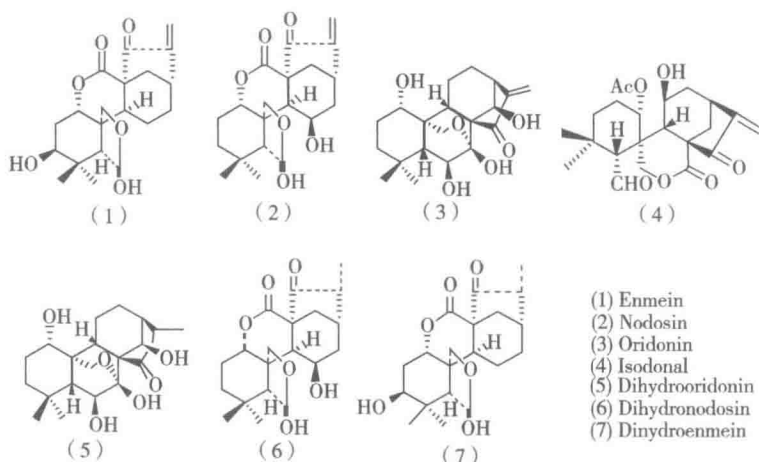


图 1-7

30 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞的生存能力超过 86%。这两个化合物抑制黑色素生成的机理不是抑制酪氨酸酶的活性,而是调节酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1、酪氨酸酶相关蛋白-2 的 mRNA 的表达,来达到抑制黑色素在黑素瘤细胞中的合成。Haroon Khan 等^[19]从黄精茎中分离出了两个长链的酯,正十五羧酸丙酯和正十五羧酸甘油酯。它们是有效的酪氨酸酶抑制剂, IC_{50} 分别为 22.34 和 9.45 $\mu\text{mol/L}$ 。白芷在古代就开始用于治疗疾病, Fusheng Jiang 等^[20]用氯仿提取白芷根中的有效成分。它的提取物有很强的清除自由基、抑制酪氨酸酶的能力, IC_{50} 分别为 0.848 mg/L 和 4.3 mg/L, 比熊果苷强。

1.2.3 根据自然酪氨酸酶的结构合成的酪氨酸酶抑制剂

采用合成的手段,寻找药物,讨论它的构效关系是最基本的方法之一。研究者根据作用靶点的结构特征,作用机理和现有的活性结构,设计并合成新型的酪氨酸酶抑制剂。像根据白藜芦醇设计的偶氮白藜芦醇等具有很强的酪氨酸酶抑制活性。

Lyubomir Georgiev^[21]合成了一些列含苯乙烯基和羟基肉桂酰胺的化合物,骨架见图 1-8,酪氨酸酶抑制活性检测,发现羟基或甲氧基在苯环上对位对酪氨酸酶的活性有很大的影响,增加一个取代在同一个苯环的另一个位置,明显减弱对酪氨酸酶的抑制作用。

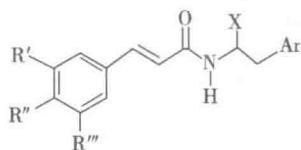


图 1-8

Young Mi Ha 等^[22]模仿白藜芦醇的结构,设计合

成了一系列 1,6-二取代苯基-1,3,5-己三烯化合物。在苯环的对位被羟基取代得到的化合物 1 对酪氨酸酶有很强的抑制作用, IC_{50} 为 $1.63\mu\text{mol/L}$, 比曲酸的抑制作用强 30 倍。但再在苯环的邻位置引入羟基、甲氧基、乙氧基就会减弱酪氨酸酶的抑制活性。或将对位的羟基甲基化, 同样大大减弱其抑制酪氨酸酶的活性。而 2,4-位同时被羟基取代 2 和 2-位被羟基, 3-位被甲氧基取代 3 后的化合物, 对酪氨酸酶的抑制活性略有减弱, 但都比曲酸的强。它们的抑制类型都属于竞争型抑制。

Sung Jin BAE 等^[23] 同样模仿白藜芦醇的结构, 合成了偶氮-白藜芦醇, 得到了三个有效的酪氨酸酶抑制剂。抑制效果最好的 IC_{50} 为 $17.85\mu\text{mol/L}$, 结构如图 1-9。它们不仅对 B16F10 细胞没有细胞毒性, 还对酪氨酸酶和黑色素的合成都有抑制作用。抑制动力学分析, 这些化合物是竞争型抑制剂。分子对接研究表明这些化合物与酪氨酸酶之间氢键作用比曲酸同酪氨酸酶的作用还高。曲酸只同酪氨酸酶的 Asp262 残基有氢键作用, 而偶氮-白藜芦醇可以预料到与酪氨酸酶的 Glu258, His261 和 Asp276 残基有氢键作用。药效团模型表明这些化合物有一个氢键供体和三个氢键受体。偶氮-白藜芦醇类似物可考虑为很好的抗黑色素合成的治疗剂。

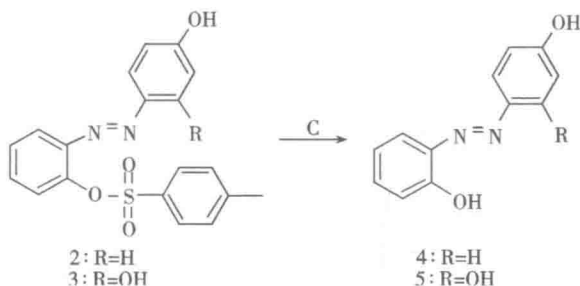


图 1-9

Yu Min Song 等^[24] 也合成了一系列偶氮-白藜芦醇和偶氮-氧化白藜芦醇, 但其中对酪氨酸酶抑制最好的化合物, $IC_{50} = 36.28\mu\text{mol/L}$, 接近天然的白藜芦醇的抑制活性。Sung Jin Bae 等^[25] 也得到了一系列偶氮-白藜芦醇衍生物, 4-甲氧基或 4-羟基取代的化合物表现出比较好的抑制活性, 其中 E-4-羟基苯亚胺-1', 2'-二羟基苯甲烯, 对蘑菇酪氨酸酶的抑制最好, IC_{50} 为 $17.22\mu\text{mol/L}$, 其抑制类型属于非竞争型抑制。

Larissa Lavorato Lima 等^[26] 由白藜芦醇的结构, 设计合成了氮杂茛类似物。氮杂茛两个苯环的邻位引入羟基后的化合物, 对酪氨酸酶的抑制活性最强, IC_{50}

$= 65.67 \mu\text{g/mL}$, 比天然的化合物白藜芦醇 ($\text{IC}_{50} = 87.1 \mu\text{g/mL}$) 要好。

RameshL 等^[27]合成了一些列 2,5 - 二取代 - 1,3,4 - 恶二唑化合物类酪氨酸酶抑制剂。通过抑制活性检测, 3D QSAR 和分子对接研究发现 2,5 - 二取代 - 1,3,4 - 恶二唑化合物的正电基团对酪氨酸酶的抑制起决定性的作用。并预测较小体积和更多正电荷基团的 1,3,4 - 恶二唑化合物对酪氨酸酶具有更好的抑制作用。

芦笋常用作药物, 作为利尿剂和净化剂, Alessandro Venditti 等^[28]简化芦笋的活性物质芦笋酸的结构, 得到二氢芦笋酸 (图 1-10)。他有很强的清除自由基和抑制酪氨酸酶的能力。其抑制酪氨酸酶的 IC_{50} 为 0.13 mmol/L , 抑制类型属于竞争型抑制。虽然其抑制酪氨酸酶的能力没有曲酸强, 但它们的抑制机理不完全一样。由于其含有两个巯基, 增加它在食品工业、农业、化妆品行业和药品中的用途。

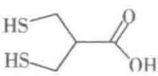


图 1-10

Dong - Fang Li 等^[29]根据曲酸的结构, 设计合成了一系列羟吡啶酮 - L - 苯基丙氨酸类酪氨酸酶抑制剂。其中最有效的抑制剂对酪氨酸酶单酚酶和双酚酶的抑制活性的 IC_{50} 分别为 12.6 和 $4 \mu\text{mol/L}$ 。它属于混合抑制类型, 既能结合自由的酪氨酸酶, 又能结合底物作用的酪氨酸酶, 而且它的细胞毒性比曲酸还低。

银杏酚酸是天然的在水杨酸邻位被烷基或链烯基取代的衍生物, 在不同的植物中广泛存在。Yuanqing Fu 等^[30]用化学法合成了一系列的银杏酚酸, 虽然它的抗酪氨酸酶的活性 ($\text{IC}_{50} = 2.8 \text{ mg/mL}$) 不及曲酸, 但采用化学的方法合成银杏酚酸为银杏酚酸的结构改造及生物活性筛选提供可能。

姜黄素是从姜黄茎中发现的多酚抗氧化物, 具有预防癌症、抗炎、抗氧化、抗菌活性。它已经被批准用于化妆品色素和抗氧化剂, 还能够治疗一些皮肤病。它的同类物四氢姜黄素已经被推荐用于化妆品中的增亮剂。Yongfu Jiang 等^[31]也合成了一系列姜黄素类似物 (图 1-11)。在他们之中, 如下图 1,2,3,4, 其抑制酪氨酸酶的 IC_{50} 分别为 $1.74 \mu\text{mol/L}$, $7.78 \mu\text{mol/L}$, $16.74 \mu\text{mol/L}$, $2.78 \mu\text{mol/L}$, 都比正丁基间苯二酚和曲酸都强。4 - 羟基官能团在酪氨酸酶的抑制活性中发挥着关键的作用。2 和 4 做小鼠急性毒性试验表明化合物在 1200 mg/Kg 没有毒性。双倒数作图法的动力学分析表明 1,3 属于混合竞争型类型, 而 2,4 属于竞争型抑制类型。

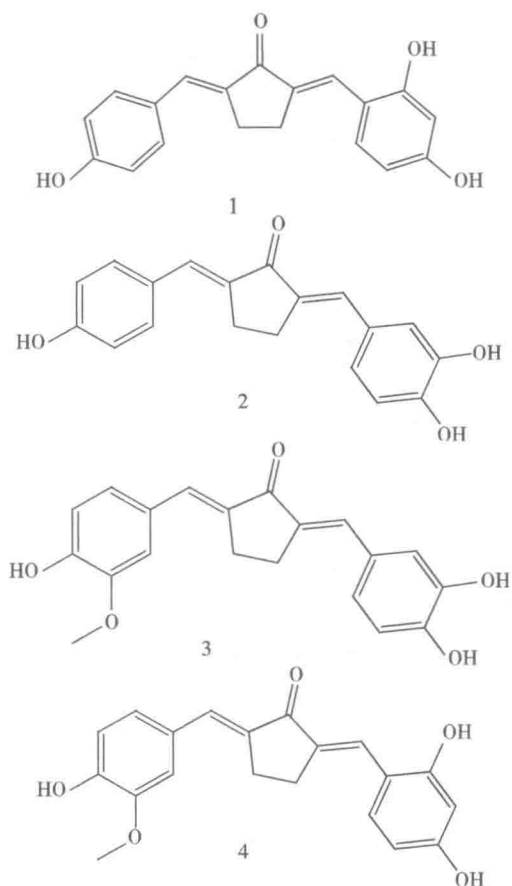


图 1-11

呋喃-1,3,4-恶二唑类化合物也具有抑制酪氨酸酶的抑制作用。^[32]

脱氧安息香和二氢芪衍生物,通过化学方法被合成。但脱氧安息香对酪氨酸酶的抑制活性不大,可能是2-位的羟基与羰基形成分子内的氢键造成的;而二氢芪就表现出很好的酪氨酸酶抑制活性,其中2,4,4'-三羟基-二氢芪的活性最好, $IC_{50} = 8.44 \mu\text{mol/L}$ 。2,4,4'-三羟基-二氢芪分子对接模型研究表明2-位的羟基 Asn260 残基形成氢键,4-位的羟基与 Val1283 残基作用,4'-位的羟基与 His244 残基作用,其中4'-羟基的作用,对酪氨酸酶的活性起到了关键的作用。这为进一步设计酪氨酸酶抑制提供了依据。^[33]

羟基肉桂酸衍生物和苯丙氨酸异羟基肟(图1-12),脯氨酸异羟基肟形成的化合物,既有抗氧化的作用,又有抑制酪氨酸酶的活性,而且它们的抗氧化活性比肉桂酸好。1,2-二羟基肉桂酸苯丙氨酸异羟基肟抑制酪氨酸酶的活性

(IC_{50} 为 $4.9\mu\text{mol/L}$) 比 1,2-二羟基肉桂酸脯氨酸异羟肟基胍要好一点,但对 Mel-Ab 细胞黑色素合成的影响不大。^[34] 综合来看,1,2-二羟基肉桂酸脯氨酸异羟肟基胍是有希望的活性化合物,它在亲水和疏水环境中都能表现出较好的抗氧化活性和较好的酪氨酸酶抑制活性。

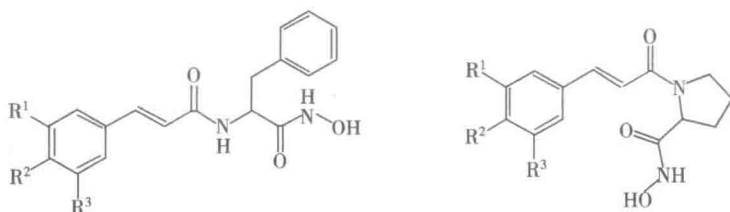


图 1-12

4-(6,7-二氢-茚噻唑基)-1,3-苯二酚是全化学合成的酪氨酸酶抑制剂^[35],其 $IC_{50} = 0.5\mu\text{mol/L}$,比曲酸的抑制活性高了 108 倍。它在 1,3-位的羟基同酪氨酸酶的残基 GLY281 形成氢键,占据酪氨酸酶的活性位置,抑制酪氨酸酶的活性。在 B16F10 黑色素细胞毒性测试中,它没有表现出细胞毒性。说明它是一个很有潜力的增白剂。

So Hee Kim 等^[36]合成的(Z)-5-(2,4-二羟基苯甲基)-2',4'-二酮四氢噻唑 1,能够抑制酪氨酸酶活性和黑色素的合成。它是通过清除一氧化碳和抑制诱导 NO 信号通路的活性,来降低酪氨酸酶活性的表达。对于它用于治疗剂和增白剂,还需要深入的研究。

Young Mi Ha^[37]也合成了 11 个 2,4-二酮四氢噻唑-取代苯甲亚衍生物(图 1-13)其中(Z)-5-(4-羟基苯甲基)-2',4'-二酮四氢噻唑 2 和(Z)-5-(3,4-二羟基苯甲基)-2',4'-二酮四氢噻唑 3 对酪氨酸酶的抑制活性的 IC_{50} 分别为 13.36 和 $9.87\mu\text{mol/L}$,它们都属于竞争型抑制剂。不仅对酪氨酸酶有很强的抑制作用,而且对 B16 黑色素细胞黑色素的生成有抑制作用。分子对接研究表明它们对土豆二酚氧化酶的活性位点的束缚作用很强。说明它们有比较强的褪色能力,且没有明显的细胞毒性。

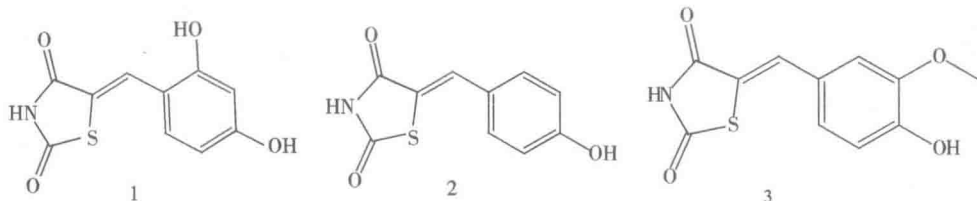


图 1-13

芪是一类天然的化合物,在植物中扮演着植物抗毒素的角色,抵抗真菌病原体。像白藜芦醇、康普立停等活性化合物都属于芪类。Mitko Miliovsy 等^[38]用一锅法合成了6个顺式多羟基芪。其中最具前景的活性化合物是E-2-(1-羧基-2-苯亚甲基)-4,5-二羟基安息香酸(图1-14),它有很强的清除 DPPH 自由基的能力($IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol/L}$),抑制 *Fusarium gramine arum* 真菌($0.17 \mu\text{mol/mL}$ 抑制 89%),对酪氨酸酶的抑制的 IC_{50} 为 $23 \mu\text{m}$ 。

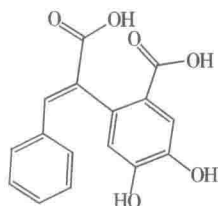


图 1-14

Babasaheb P. Bandgar 等^[39]合成了咪唑衍生物(图1-15)。其中大部分具有很好的抑制黄嘌呤氧化酶($IC_{50} = 4.3 - 5.6 \mu\text{mol/L}$)和抑制酪氨酸酶的活性。7a 对酪氨酸酶的活性最好,分别用酪氨酸和 L-多巴作为底物,其抑制的 IC_{50} 值分别为 $14.01 \mu\text{mol/L}$ 和 $15.15 \mu\text{mol/L}$,它同 L-多巴竞争酪氨酸酶的活性位点,其 K_i 值为 $11.8 \mu\text{mol/L}$ 。老鼠黑素瘤细胞的抑制黑色素和细胞毒性的测试中,在 $20 \mu\text{g/mL}$ 浓度下,7a 和 7g 抑制了 42.5% 和 40.5% 的黑色素的合成,没有表现出明显的细胞毒性。

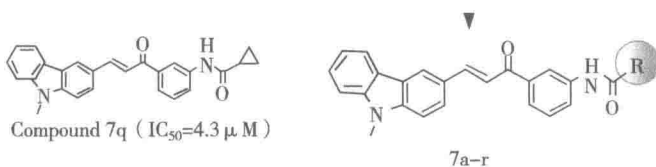


图 1-15

Shrikant S. Gawande 等^[40]合成了一些列具有噻唑啉酮骨架的酪氨酸酶抑制剂,部分化合物相比于酪氨酸酶是有效的酪氨酸酶抑制剂。其中,1 对酪氨酸酶的抑制活性最高, $IC_{50} = 34.12 \mu\text{mol/L}$ 。1 的抑制是可逆的竞争型抑制。从构效关系分析,氯苯基部分在酪氨酸酶的抑制活性中发挥着重要的作用。原因可能是氯原子绑定的酪氨酸酶的活性位置,使酪氨酸酶失去它的催化能力。

Zhixuan Zhou 等^[41]合成了 3,5-二芳基-4,5-二氢-1H-吡唑类衍生物,他们中的大部分对酪氨酸酶都有很强的抑制作用。其中,抑制活性最好的是 1-3-(2,4-二羟基苯基)-5-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-4,5-二氢-乙酰基吡唑(图1-16),其抑制酪氨酸酶的 $IC_{50} = 0.301 \mu\text{mol/L}$ 。动力学研究,它属于竞争型抑制剂。

Hooshang Hamidian 等^[42]合成了6个包含偶氮 5(4H)-恶唑酮类化合物,它们对酪氨酸酶抑制的 IC_{50} 在 $1.44 \mu\text{mol/L}$ 和 $4.33 \mu\text{mol/L}$ 之间,远远比曲酸的抑

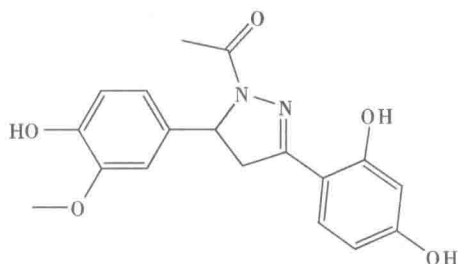


图 1-16

制活性要好,但他们对 A B16F10 的毒性都比曲酸大。所以,对这类化合物还需要进一步的设计、研究。构效关系表明恶唑酮环上 2 位和 4 位取代的芳基决定酪氨酸酶的活性。

苯甲醛缩氨基硫脲衍生物已经报道了有效的酪氨酸酶抑制剂。^[43-44] Mei - Hua Yang 等^[45]也合成了两个对酪氨酸酶有很强抑制作用的氨苯硫脲衍生物,对二甲氨基苯甲醛缩氨基硫脲希夫碱(DABT)和对二甲氨基苯甲醛缩氨基苯基硫脲希夫碱(DABPT),见图 1-17。DABT 对酪氨酸酶单酚酶和双酚酶都有抑制作用,其中抑制的 IC_{50} ,分别为 $1.54\mu\text{mol/L}$ 和 $2.02\mu\text{mol/L}$ 。DABPT 抑制酪氨酸酶单酚酶的 IC_{50} 的值为 $1.78\mu\text{mol/L}$,抑制二酚酶的 IC_{50} 值为 $0.8\mu\text{mol/L}$,它们的抑制机理都是可逆的。DABT 是既有竞争型抑制,也有非竞争型抑制,属于混合型抑制,其 KI 和 KIS 分别为 $1.77\mu\text{mol/L}$ 和 6.49mmol/L ;而 DABPT 是非竞争型抑制,其 $KI = KIS = 0.77\mu\text{mol/L}$ 。DABT 和 DABPT 表现出了比熊果苷和曲酸更强的抑制能力,说明氨基硫脲结构是设计酪氨酸酶抑制剂很好的选择。

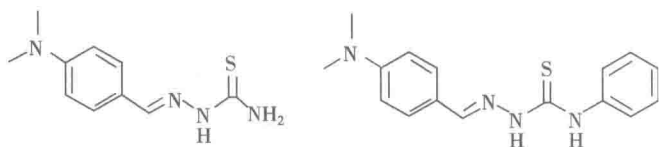
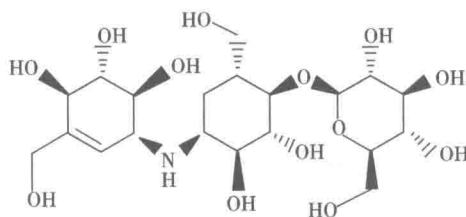


图 1-17

1.2.4 已有应用的化合物,作为酪氨酸酶抑制剂的研究

有效霉素 A^[46]是链霉菌的次级代谢产物,在稻子生长过程中用作生物杀虫剂,还报道了它具有抑制葡萄糖苷酶和海藻糖酶的作用。Zhi - Jiang Wang 发现有效霉素 A 对酪氨酸酶具有有效的抑制作用 ($IC_{50} = 19.23\text{mmol/L}$),并研究了它抑制酪氨酸酶的动力学和分子模型(图 1-18)。有效霉素 A 对酪氨酸酶的抑制是

可逆的,有效霉素 A 和酪氨酸酶非共价键分子间的相互作用降低酪氨酸酶的活性。它既能同自由的酪氨酸酶结合,又能同已经于底物发生作用的酪氨酸酶结合。通过分子对接模型,有效霉素 A 直接与酪氨酸酶活性位点的几个残基发生作用,包括 HIS85, HIS244, GLU256, HIS259 和 ASN260。



Chemical structure of validamycin A

图 1-18

呋喃甲醇常用作糊剂、电极材料、抗酸腐蚀材料等;糠醛来自于农产业和森林业的废弃物,用作火箭原料和溶剂等;呋喃甲酸已经用于药物中间体、杀菌剂等。最近报道,他们还是有效的酪氨酸酶抑制剂,其抑制能力糠醛 > 呋喃甲酸 > 呋喃甲醇,都属于可逆的抑制剂。糠醛和呋喃甲醇是混合抑制类型,呋喃甲酸是非竞争型^[47]。

乙酰水杨酸也是^[48]一个已经有广泛用途的化合物,如抗炎、头痛治疗、预防肿瘤,中风等。Zhi - Jiang Wang 等报道了它对酪氨酸酶也有抑制作用($IC_{50} = 28.35 \text{ mmol/L}$),抑制类型属于混合抑制,其 $K_i = 11.778 \pm 2.01 \text{ mmol/L}$ 。当乙酰水杨酸的浓度为 200 mmol/L 时,酪氨酸酶基本上完全被抑制。

4-丁雷锁辛^[49-50]是一个对局部着色过度治疗有效的酪氨酸酶抑制剂。L. Kolbe 等在黑种人皮肤细胞模型中,发现熊果苷和曲酸对黑色素合成的抑制率不高,它们的 IC_{50} 分别 $> 5000 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 和 $> 400 \text{ } \mu\text{mol/L}$,而 4-丁雷锁辛抑制黑色素生成的 IC_{50} 值为 $13.5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 。使用含 4-丁雷锁辛的产品涂抹前臂的老年斑每天 2 次,8 周内老年斑的外观明显改善。4-丁雷锁辛不仅对老年斑,还对黑斑和其它表面的着色过度有很好的效果。

甲醛取代的吡啶,^[51]是常见的药物中间体,化工原料。最近报道了他们对酪氨酸酶有抑制作用。它们抑制能力 3-甲醛吡啶 > 2-甲醛吡啶 > 4-甲醛吡啶,抑制二酚酶的 IC_{50} 值,分别为 0.0225 mmol/L , 1.3 mmol/L , 5 mmol/L 。他们都是混合型酪氨酸酶抑制剂。

没食子酸丙酯^[52]是在脱水食品、脂肪、油中使用最广泛的酚类抗氧化剂之

一。它还具有清除自由基,抗褐变的能力。Yi - Fen Lin 等报道了没食子酸丙酯具有抑制酪氨酸酶活性的能力,其抑制酪氨酸酶的 IC_{50} 值为 0.685mmol/L 。动力学分析,没食子酸丙酯是可逆的混合型抑制剂,抑制常数 KIS 和 KI 分别为 2.135 和 0.66mmol/L 。没食子酸丙酯处理采摘的龙眼,发现延迟了龙眼外壳褐变的时间和程度,保持龙眼较高的酚含量和风味。使用没食子酸丙酯作为抗氧化剂和酪氨酸酶抑制剂,延长龙眼等水果的货架期,是一个很有希望的选择。

咖啡酸苯乙酯是在各种植物和蜂胶中发现的自然化合物,具有抗炎、免疫调节和细胞毒性剂。Ji - Yeon Lee 等^[53]研究咖啡酸苯乙酯抗黑色素合成的过程中,发现咖啡酸苯乙酯不是直接抑制酪氨酸酶的活性,而是通过抑制黑色素酶的表达,如酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1、酪氨酸酶相关蛋白-2,来有效地减少了 α -MSH 刺激黑色素的合成。另一方面,咖啡酸乙酯对酪氨酸酶调节黑色素生成的转录因子,转录因子(MITF)的表达和核转运没有影响。咖啡酸苯乙酯对糖原合成酶激酶-3 β 和 Akt 对 MITF 的激活和表达也没有影响。鉴于 MITF 在黑色素原合成中的重要角色,咖啡因苯乙酯对酪氨酸酶启动子的抑制,可能代表一种新型的治疗色素过度积累病的治疗方法。

1.3 抑制剂的重要性和应用

1.3.1 农业和食品领域

在食品储藏、销售过程中,酶催化有机胺、氨基酸、多肽和蛋白质与醌类的反应导致变质叫酶促褐变。重要氨基酸的破坏,消化吸收度的降低,蛋白水解酶和糖分解酶的抑制都会导致营养价值减少。抗营养物质和有毒化合物的生成可能进一步减少营养价值和出现可能的食品安全问题。因此,很有必要找到不同方法来阻止酪氨酸酶引起的酶促褐变。当前常规的避免褐变的技术是高压热汤的方法,食品侵入 $80 \sim 90^{\circ}\text{C}$ 的液体当中 $10 \sim 12\text{min}$ 或通过加压流动的蒸汽。这些传统的过程不可避免的造成重量和营养质量的损失。微波加热已经被提议为替代传统方法灭酶活的方法,但微波加热过程中在食品样品中产生温度梯度,对灭活程度不易控制。温度过热的地方,酶失去了活力,温度不够的地方,酶的活力还在。因此,严格控制微波加热对酶的灭活要样品均匀和绝对的温度控制。

已经报道了很多能够干扰酪氨酸酶中间的反应或减少二酚到醌抑制酶促褐变的化合物。然而,事实上报道的化合物受限于异味、变味、毒性和经济性,很少

能用于食品中抑制酶促褐变。亚硫酸盐已经广泛用于防止酶促褐变在农业和海鲜产品中。由于安全的考虑,亚硫酸添加剂在一些食品中已经禁止了。在食品工业中,大部分替代物是维生素 C 和柠檬酸,但他们都不及亚硫酸有效,因为维生素 C 在减少酪氨酸酶形成的醌的过程中很快就被消耗掉了。最近,4-己基间苯二酚由于安全,用于防止虾的黑变和鱼肉和水果片的褐变。

13.2 化妆品和药品领域

酪氨酸酶抑制剂在化妆品和药品行业中的使用是很重要的,因为他们有效的防治色素沉着病。酪氨酸酶抑制剂可以减少黑色素的合成和用于化妆品中退去雀斑等。酪氨酸酶和酪氨酸酶抑制剂也可能发展成治疗色素相关的疾病的治疗剂,像白化病和斑驳病。已经报道了很多酪氨酸酶抑制剂,但由于不同的安全考虑只有很少的几个抑制剂用于皮肤增白。

在皮肤增白剂之中,1,4-对苯二酚是最广泛被使用的增白剂之一。但它能引起突变,所以很多国家已经禁止 1,4-对苯二酚在化妆品中使用。所以迫切需要找到可替代的退色剂。

当前,熊果苷和芦荟苦素由于无毒,对酪氨酸酶有很强的抑制作用,而作为增白剂用于化妆品中。熊果苷和芦荟苦素对酪氨酸酶的抑制,前者是非竞争型的抑制剂,后者是竞争型抑制剂。两个同时使用,具有协同作用,增强多酪氨酸酶的抑制能力;从而用作试剂时,可以降低试剂的使用量。

酪氨酸酶催化氧化,导致植食性食物和饮料发生褐变,造成关键氨基酸的破坏、消化吸收度和营养质量降低、形成有毒物质。为了解决这些不适宜的褐变,需要找到有效的酪氨酸酶抑制剂。另外,在黑色素积累过度相关的皮肤病的治疗、化妆品的增白剂、晒斑的褪色中,酪氨酸酶抑制剂扮演着重要的角色。然而,当前只有很少几个抗黑色素剂,在商业上能够应用,如曲酸和熊果苷。大部分的酪氨酸酶抑制剂,由于高细胞毒性,在水和有氧条件下的低稳定性等限制了应用。

酪氨酸酶抑制剂的安全问题是首先被考虑的,特别是用在食品和化妆品中的产品。来自于自然资源的抑制剂具有较大的潜力应用到食品当中,但有报道来一些天然的抑制剂具有很强的诱变活性,如一些顺式烯烃结构的化合物。

新酪氨酸酶抑制剂的发现和特征描述对他们在提高食品质量和营养价值,控制昆虫类害虫,防治色素过度积累和其它人体与黑色素相关的健康问题等方面的应用是很有益的。另外,理解酪氨酸酶激活剂和抑制剂在找到新颖的抑制