

## 二硫代氨基甲酸类化合物对酪氨酸酶的抑制作用\*

刘兆明 刘正卿 崔柏宁 刘超群 孔晓青 王慧云<sup>△</sup>

(济宁医学院药学院,日照 276826)

**摘要** 目的 考察 8 种二硫代氨基甲酸类化合物对酪氨酸酶活力的抑制作用。方法 以酪氨酸或左旋多巴为底物,利用分光光度法对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活性进行定量。结果 其中 6 种化合物对酪氨酸酶表现出较强的抑制作用,对单酚酶抑制效应最强的是化合物 3,其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.06 μmol/L,对二酚酶抑制效应最强的是化合物 1(IC<sub>50</sub> = 5.4 μmol/L)。酶动力学法显示对单酚酶的抑制作用均为可逆过程,抑制类型表现为竞争型。金属离子络合实验表明,Cu<sup>2+</sup> 对化合物的抑制效应强度存在较为明显的影响,而 Zn<sup>2+</sup> 的影响较弱,Fe<sup>3+</sup> 基本没有影响。结论 二硫代氨基甲酸类化合物是酪氨酸酶的强效抑制剂。

**关键词** 二硫代氨基甲酸;酪氨酸酶;抑制;金属离子;分光光度法

中图分类号:O622.7 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2019)10-336-05

### Potent inhibitory effects of dithiocarbamates on tyrosinase activity

LIU Zhaoming, LIU Zhengqing, CUI Baining, LIU Chaoqun, KONG Xiaoqing, WANG Huiyun

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract: Objective** To investigate the inhibitory effect of eight dithiocarbamic acid compounds on tyrosinase activity. **Methods** The tyrosinase monophenolase and diphenolase activities were measured by the spectrophotometry using tyrosine or levodopa as a substrate. **Results** Six compounds showed strong the inhibitory effect on tyrosinase. The most inhibitory effect on monophenolase was compound 3, and its half-inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was 0.06 μmol/L. The strongest inhibitory effect towards diphenolase activities was compound 1 (IC<sub>50</sub> = 5.4 μmol/L). Enzymatic kinetics showed that the inhibition of monophenolase was a reversible process, and the inhibition type was competitive. Metal ion complexation experiments showed that Cu<sup>2+</sup> had the significant effect on the inhibitory effect of the compound, while the effect of Zn<sup>2+</sup> was weak, and Fe<sup>3+</sup> had no effect. **Conclusion** Dithiocarbamic acid compounds are potent inhibitors of tyrosinase.

**Keywords:** Dithiocarbamates; Tyrosinase; Inhibition; Metal ions; Spectrophotometry

酪氨酸酶是含铜原子的多功能氧化酶,主要介导黑色素前体多巴醌的合成<sup>[1]</sup>。酪氨酸酶催化活性的异常升高会诱发雀斑、黄褐斑等色素沉着症状<sup>[2]</sup>。通过抑制酪氨酸酶活性可有效减轻色素沉着。目前,应用较广泛的酪氨酸酶抑制剂有曲酸、氢醌、熊果苷等<sup>[3-6]</sup>,但由于存在稳定性差、安全性低及抑制强度弱等问题,寻找新型结构抑制剂已成为该领域的研究热点。

二乙基二硫代氨基甲酸钠(sodium diethyldithiocarbamate, DDTC),与铜离子络合显色,可用于可溶性铜的定量<sup>[7]</sup>,其金属螯合物能阻止癌细胞转移和细胞外基质降解<sup>[8-9]</sup>。本文以 L-酪氨酸和左旋多巴为底物,测定了 8 种二硫代氨基甲酸类化合物对酪氨酸酶的抑制作用,初步探究了此类化合物的抑制机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器

酪氨酸酶(Worthington 化学有限公司);3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脲盐酸盐合物(MBTH)和曲

\* [基金项目] 山东省自然科学基金(2016ZRB14161);济宁医学院大学生科研项目(JYXS2017KJ021);济宁医学院科研扶持基金(JYFC2018KJ044)

<sup>△</sup>[通信作者] 王慧云, E-mail: wang\_huiyun@126.com

酸(上海萨恩化学技术有限公司);3,4-二羟基-L-苯基丙氨酸和 L-酪氨酸(天津希恩思生化科技有限公司);二甲基二硫代氨基甲酸钠(1)、甲基哌啶二硫代甲酸甲基哌啶盐(2)、1-吡咯烷二硫代甲酸铵(3)、六甲烯二硫代氨基甲酸六甲基铵盐(4)、二苄基二硫代氨基甲酸钠(5)、一硫化四甲基秋兰姆(6)、二硫化四乙基秋兰姆(7)和二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDTC),均购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。实验所用试剂均为分析纯,实验用水为自制超纯水。结构式如图 1。

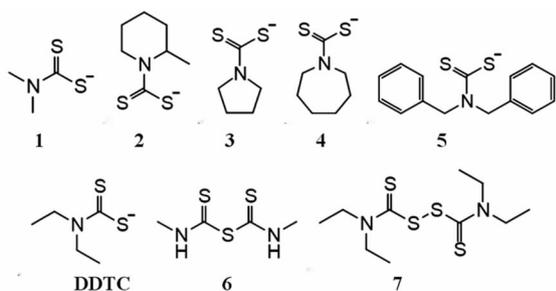


图 1 二硫代氨基甲酸类分子的化学结构

DNM-9602G 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);TB-215D 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);恒温振荡金属浴(上海一恒科学仪器有限公司);KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 化合物对酪氨酸酶活性的抑制作用检测

酪氨酸酶催化活性的测定方法在文献<sup>[10]</sup>的方法基础上做了少许调整,即在磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,以 1.0mmol/L 的 L-tyrosine 或 L-dopa 为底物,利用其反应生成的中间产物能与 MBTH 结合,生成的粉红色结合产物在 492nm 处有最大吸收,通过在酶标仪中测定 492nm 处的吸光度进行酪氨酸酶的活性定量。以 L-tyrosine 的羟化反应作为单酚酶活性,以 L-dopa 的氧化反应作为二酚酶活性。将 8 种化合物分别溶于 DMSO 中,配成 1.0mmol/L 的初始浓度,然后稀释成不同浓度(500.0、200.0、100.0、50.0、10.0、5.0、2.0、1.0 和 0.1 μmol/L)添加到反应体系中,于恒温振荡金属浴中(37℃)孵育 10min 后,移入 96 孔板并置于酶标仪中记录 492nm 波长处的吸光度 A。各化合物对酪氨酸酶的抑制作用通过下式计算:

$$\text{抑制率}\% = [(A_2 - A_4) - (A_1 - A_3)] / (A_2 - A_4) \times 100\%$$

式中,  $A_1$  为同时加化合物和酶的反应体系的吸光度,  $A_2$  为加酶不加化合物的吸光度,  $A_3$  为只加化合物不加酶的吸光度,  $A_4$  为未加化合物和酶的吸光度。数据经拟合后抑制率为 50% 时对应的化合物浓度即该样品的  $IC_{50}$  值。

### 1.2.2 抑制机理考察及单酚酶抑制类型判断

通过系列浓度化合物对 4 种不同浓度(5.4、10.7、16.1 及 21.4 μg/ml)酪氨酸酶催化底物氧化活力的影响来判断其抑制机理,即根据抑制剂分子与酶的反应活性中心以非共价或是共价方式结合,考察抑制作用是不可逆抑制(irreversible inhibition)还是可逆抑制(reversible inhibition)。当采用相对残余活性对酶浓度作图,如果得到一组均通过原点的直线,则为可逆抑制过程。另外,通过改变底物 L-dopa 的浓度和化合物浓度,并采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图对其单酚酶抑制类型进行判断。

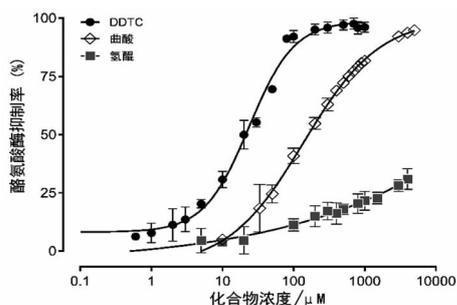
### 1.2.3 金属离子对抑制作用的影响检测

由于二硫代氨基甲酸类化合物能与铜离子等金属离子发生络合作用,考察金属离子与化合物共存时对其抑制作用的影响。采用去离子水配制硫酸铜、硫酸锌和三氯化铁溶液,浓度为 10.0mmol/L 和 2.0mmol/L,将其加入反应体系中与酶和化合物作用 5min,然后按照 1.2.1 酪氨酸酶活性评价部分进行余下操作。分别在 1:1、1:0.2 和 1:0 摩尔比条件下考察了金属离子对抑制活性的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DDTC 的抑制作用

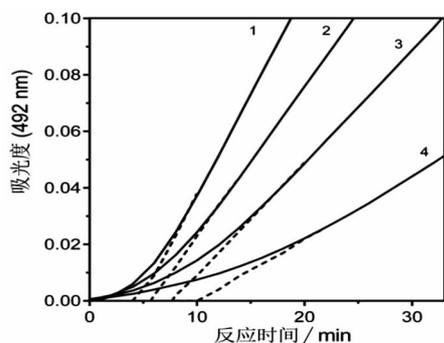
迄今为止,已报道的酪氨酸酶抑制剂分子中仅少数几种能够用于美白产品中,其中,曲酸和氢醌的应用最为广泛。我们将二硫代氨基甲酸类的代表性化合物 DDTC 与曲酸和氢醌对二酚酶的抑制作用做了比较(图 2)。结果发现 DDTC 具有较好的二酚酶抑制作用,随着剂量增加,残余酶活力逐渐下降,拟合得到的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )值为 23.7 μmol/L,当浓度 > 100.0 μmol/L 时可获得完全的酶抑制作用(抑制率 > 95%)。曲酸抑制效力约为 DDTC 的 1/6,其  $IC_{50}$  值约为 138.3 μmol/L,当曲酸浓度达到 5.2mmol/L 以上才可获得最大抑制率(94.8%)。在此条件下,氢醌是酪氨酸酶的不良抑制剂, $IC_{50}$  值比 DDTC 和曲酸高了 2~3 个数量级,约为 10.1mmol/L。



注:在不同浓度抑制剂分子存在的情况下,采用酪氨酸酶的 L-多巴氧化活性来计算 IC<sub>50</sub> 值,数据显示 3 次实验的平均值

图 2 DDTC 和曲酸、氢醌对酪氨酸酶的抑制作用

进一步考察不同浓度 DDTC 下蘑菇酪氨酸酶氧化 L-tyrosine 的进程,见图 3。L-tyrosine 作为底物测定酪氨酸酶的单酚酶活性时,492nm 下吸光度随时间变化存在一个显著的滞后期,这是单酚酶活性的特征。通过将产物积累曲线的线性部分外推至横坐标来估计滞后期。由横坐标截距可知,该滞后时间随 DDTC 浓度的增加而逐渐增大,从 0 μmol/L 的 4.7min 增加到 1.5 μmol/L 时的 10.1min。当反应体系达到稳定状态后,产物累加曲线随反应时间的增加呈线性增加,直线斜率表示稳态速率,由图 3 示稳态速率也受 DDTC 加入量的影响,随着抑制剂浓度的增加,稳态速率明显下降且呈剂量依赖性。通过将反应速率与抑制剂浓度非线性拟合,得其单酚酶抑制活性的 IC<sub>50</sub> 值为 1.1 μmol/L。此结果表明,DDTC 能够有效抑制酪氨酸的单酚酶活性,不仅可以降低酶的稳态速率,还可以有效延长产物生成的滞后时间。



注:反应体系包含 0.5mmol/L 的 L-酪氨酸,所用缓冲液为 20 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 曲线 1~4 分别表示添加的 DDTC 浓度为 0, 0.5, 1.0 和 1.5 μmol/L

图 3 DDTC 对蘑菇单酚酶的抑制时间曲线

## 2.2 二硫代氨基甲酸类化合物的抑制作用

通过对酶残余活性和抑制剂浓度的非线性拟合,得到二硫代氨基甲酸类分子对酪氨酸酶的单酚

酶和二酚酶活性抑制作用的 IC<sub>50</sub> 值(图 4 和表 1)。以 L-tyrosine 和 L-dopa 作为测定单酚酶和二酚酶活性的底物。所有二硫代氨基甲酸分子对单酚酶和二酚酶活性均显示抑制作用,且呈剂量依赖性。其中化合物 1~5 对双酚酶活性 IC<sub>50</sub> 值分别为 5.4、67.7、12.7、6.9 和 178.0 μmol/L; 化合物 1、3、4 和 DDTC 对单酚酶活性 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.2、0.06、0.2 和 1.1 μmol/L(由于化合物 2 和 5 具有较差的二酚酶抑制活性,没有进一步进行其单酚酶抑制作用的考察)。

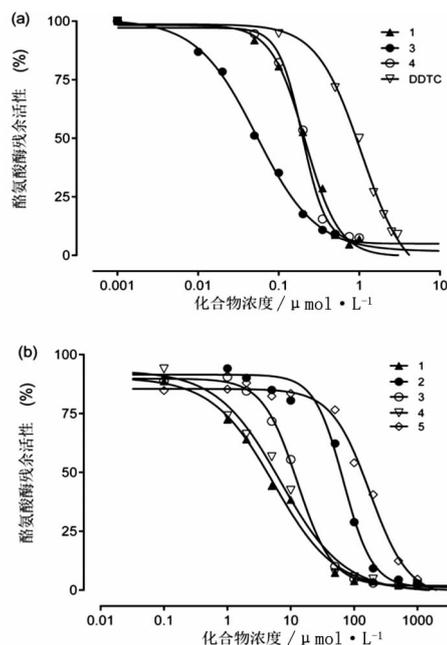


图 4 化合物 1~5 和 DDTC 对蘑菇酪氨酸酶单酚酶(a)和二酚酶(b)的抑制作用

表 1 化合物 1~7 和 DDTC 对蘑菇酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的抑制作用

化合物	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>		K <sub>i</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	抑制类型
	单酚酶	二酚酶		
DDTC	1.1 ± 0.4	23.7 ± 2.9	1.3	竞争型
1	0.2 ± 0.06	5.4 ± 1.9	0.4	竞争型
2	n. d.	67.7 ± 19.1	n. d.	n. d.
3	0.06 ± 0.02	12.7 ± 4.3	0.9	竞争型
4	0.2 ± 0.03	6.9 ± 1.9	0.6	竞争型
5	n. d.	178.0 ± 140.6	n. d.	n. d.
6	n. d.	>1000	n. d.	n. d.
7	n. d.	>1000	n. d.	n. d.

注:n. d. 表示未测定

化合物 1、3、4 显示出比其他化合物更强的酪氨酸酶抑制活性,而化合物 2 和 5 的抑制活性相对较差,这表明在硫原子周围引入的烷基或芳香基团所产生的空间位阻效应对抑制活性的提高是不利

的。此外,如果结构中带负电的硫原子形成类似酸酐的单硫化物(化合物 6)或通过二硫键形成二硫化物(化合物 7)也都展现出较差的抑制活性( $IC_{50} > 1000.0 \mu\text{mol/L}$ )。

### 2.3 抑制作用机制判断

考察 4 个浓度的化合物对不同浓度的酶催化活性的抑制作用,见图 5。图示,将 4 个浓度酶对应的催化活性相连可得到均过原点的直线。随着

添加酶浓度的增加,单位时间内产物的生成量随之增加,而相同酶浓度下加入的抑制剂分子的量越多,单位时间产物的生成量则越少。最终确定,化合物 1、3、4 和 DDTC 对酪氨酸酶的抑制作用均为可逆抑制。将不同抑制剂浓度下的反应速率和底物浓度进行双倒数作图,得到了数条相交于 y 轴的直线(图 6),表明化合物的抑制类型为竞争型抑制,拟合得到的抑制常数  $K_i$  值见表 1。

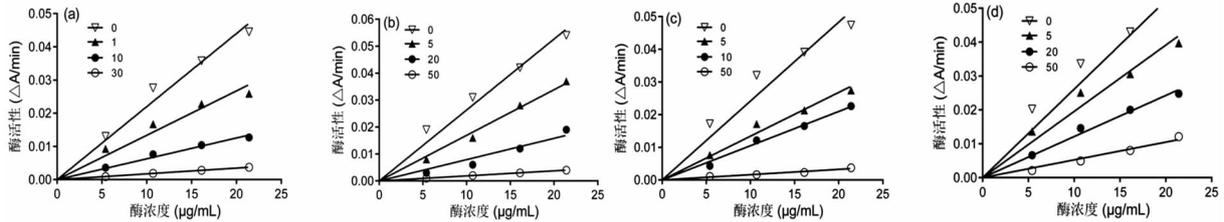


图 5 不同浓度化合物 1(a)、3(b)、4(c)和 DDTC(d)对酪氨酸酶抑制活性与酶浓度的关系

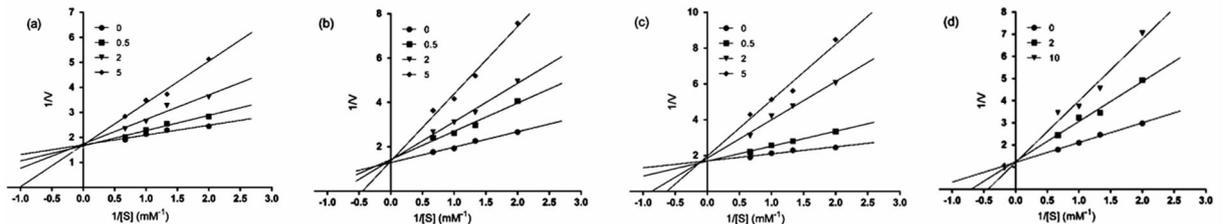


图 6 化合物 1(a)、3(b)、4(c)和 DDTC(d)对酪氨酸酶的抑制类型判断

### 2.4 金属离子整合对抑制作用的影响

二硫代氨基甲酸盐是一些金属离子的良好整合剂,有报道称这类分子与  $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  或  $Cu^{2+}$  等离子络合后可作为有效的杀虫剂,DDTC 与  $Cu^{2+}$  络合后在体内显示出更强的抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>。研究化合物 1、3、4 和 DDTC 与  $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  和  $Zn^{2+}$  等离子络合前后对酪氨酸酶抑制作用强度的变化。见图 7。发现  $Cu^{2+}$  与化合物达到 1:1 摩尔比时,对几种

化合物的抑制作用显示出较为明显的减弱效应,而  $Fe^{3+}$  无论在哪个浓度下对它们的抑制作用影响都不大, $Zn^{2+}$  在高浓度时对化合物 4 和 DDTC 的抑制效应减弱较为明显,而对化合物 1 和 3 的抑制作用影响不大。这可能与不同结构化合物与金属离子络合作用的强弱有关,同一种金属离子对化合物的弱化效应则受金属离子与化合物摩尔比的影响。

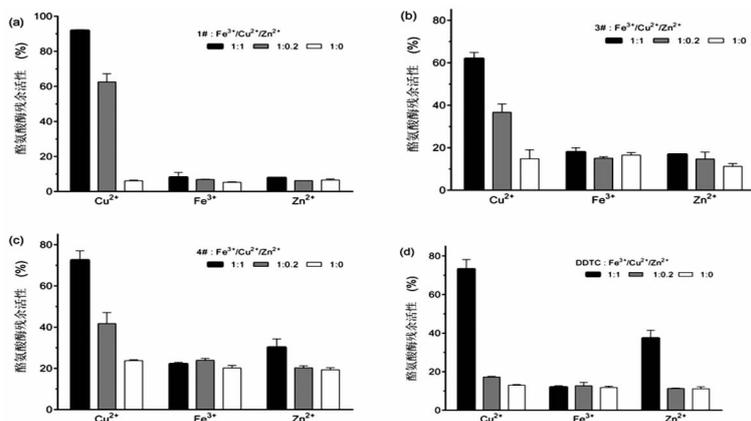


图 7  $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  和  $Zn^{2+}$  离子对化合物 1(a)、3(b)、4(c)和 DDTC(d)的抑制能力的影响

### 3 结论

本文测定了 8 种二硫代氨基甲酸类化合物对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力的抑制作用,结果表明这类结构的分子是酪氨酸酶的良好抑制剂。对单酚酶抑制效应最强的化合物 3,  $IC_{50}$  为 0.06  $\mu\text{mol/L}$ , 对二酚酶抑制效应最强的化合物 1,  $IC_{50}$  为 5.4  $\mu\text{mol/L}$ 。其中,能与酶催化位点的铜原子发生络合作用的带电硫醇基团是发挥抑制效应的必需基团。当在硫原子周围引入甲基或苄基等具有明显空间位阻效应的官能团,或者当化合物与  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  络合后,抑制活性均有显著下降。总之,作为一类有效的酪氨酸酶抑制剂,二硫代氨基甲酸盐经进一步的分子结构优化后,可成为治疗色素沉着性皮肤病的潜在候选物。

### 参考文献:

- [1] 陈清西,宋康康.酪氨酸酶的研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版),2006,45(5):731-737. DOI:10.3321/j.issn:0438-0479.2006.05.033.
- [2] Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1247(1): 1-11.
- [3] Chen JS, Wei CI, Marshall MR. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase [J]. J Agric Food Chem, 1991, 39(11): 1897-1901. DOI: 10.1021/jf00011a001.
- [4] Funayama M, Arakawa H, Yamamoto R, et al. Effects of alpha-and beta-arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59(1): 143-144. DOI: 10.1271/bbb.59.143.
- [5] 刘兆明,李超,王萌,等.桑白皮提取物对酪氨酸酶活性抑制作用研究[J].济宁医学院学报,2017,40(4):264-267. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2017.04.007.
- [6] Yokota T, Nishio H, Kubota Y, et al. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation [J]. Pigment Cell Res, 1998, 11(6):355-361.
- [7] McFarlane WD. Application of the sodium diethyldithiocarbamate reaction to the micro-colorimetric determination of copper in organic substances [J]. Biochem J, 1932, 26(4):1022-1033. DOI:10.1042/bj0261022.
- [8] Cvek B, Dvorak Z. Targeting of nuclear factor-kappa B and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(30):3155-3167.
- [9] Buac D, Schmitt S, Ventro G, et al. Dithiocarbamate-based coordination compounds as potent proteasome inhibitors in human cancer cells [J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(12):1193-1201.
- [10] Kolbe L, Mann T, Gerwat W, et al. 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013, 27(Suppl 1):19-23. DOI:10.1111/jdv.12051.
- [11] Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4 [J]. Nature, 2017, 552(7684):194-199. DOI:10.1038/nature25016.
- (收稿日期 2019-03-01)  
(本文编辑:石俊强)
- 
- (上接第 335 页)
- [25] Shiomi T, Ogata D, Iwata M, et al. Pigmented mammary Paget's disease without underlying carcinoma [J]. J Dermatol, 2018, 45(11): e321-321e322. DOI: 10.1111/1346-8138.14461.
- [26] Nagakeerthana S, Rajesh G, Madhavi S, et al. Bowen's disease: Two case reports of a giant and dwarf lesions [J]. J Cancer Res Ther, 2017, 13(2):371-373. DOI: 10.4103/0973-1482.187237.
- [27] Elbendary A, Xue R, Valdebran M, et al. Diagnostic Criteria in Intraepithelial Pagetoid Neoplasms: A Histopathologic Study and Evaluation of Select Features in Paget Disease, Bowen Disease, and Melanoma In Situ [J]. Am J Dermatopathol, 2017, 39(6):419-427. DOI: 10.1097/DAD.0000000000000704.
- [28] 何宇,余育俊,贾曾荣,等.乳腺 Paget 病的临床诊断与治疗 [J]. 中国医师进修杂志, 2019, 42(8):697-700. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4904.2019.08.008.
- [29] Wu Q, Ding X, Li J, et al. Surgical treatment in Paget's disease with invasive ductal carcinoma: an observational study based on SEER [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45510. DOI:10.1038/srep45510.
- [30] Rzaca M, Tarkowski R. Paget's disease of the nipple treated successfully with cryosurgery: a series of cases report [J]. Cryobiology, 2013, 67(1):30-33. DOI:10.1016/j.cryobiol.2013.04.006.
- (收稿日期 2019-09-15)  
(本文编辑:石俊强)