

# 曲酸衍生物 KAD3 的合成及其抑制黑色素形成的作用机制

陈艳梅, 胡昱, 黄玲珑, 温梓杰, 张豪杰, 杨春燕, 王勤\*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 曲酸是酪氨酸酶的有效抑制剂, 然而不稳定、易分解和毒副作用等问题限制了其在美白化妆品中的应用。本研究合成了一种新型的曲酸衍生物 KAD3, 通过酶学实验、黑色素瘤 B16F10 细胞模型实验和斑马鱼模型实验, 分析了 KAD3 对酪氨酸酶的抑制作用以及对黑色素形成的抑制作用机制。结果表明: KAD3 是蘑菇酪氨酸酶的混合型可逆抑制剂, 能够显著抑制二酚酶活力 (半数抑制浓度  $IC_{50}=10.00 \mu\text{mol/L}$ ); KAD3 还能够有效抑制小鼠 B16F10 细胞内酪氨酸酶活性以及黑色素合成相关蛋白 MITF、TYR、TYRP1 和 TYRP2 的表达, 最终抑制黑色素的形成; 此外, KAD3 可以抑制斑马鱼胚胎黑色素的生成, 且效果优于同等浓度的曲酸。上述结果可为曲酸衍生物 KAD3 在化妆品和医药等领域的应用提供理论参考。

**关键词:** KAD3; 合成; 黑色素; 酪氨酸酶; 作用机制

中图分类号: Q 936

文献标志码: A

随着时代变迁, 人们审美潮流随之改变, 逐渐不满足于化妆产品带来的表面暂时性美白, 开始追求皮肤自然透出的白皙, 因而市面上各种所谓天然美白产品层出不穷<sup>[1]</sup>。目前, 广泛使用的美白剂有胎盘提取物、氢醌、熊果苷 (对苯二酚葡糖苷)、果酸、曲酸及其衍生物、维生素 C 及其衍生物等<sup>[2]</sup>。这些物质都已被证实有一定的美白效果, 但是用于人体时可能出现过敏、脱皮, 甚至引发疾病。已有研究发现氢醌在淡化肤色的同时也产生了许多副作用, 长期使用氢醌还会引发外源性白斑病和褐黄病<sup>[3]</sup>。

黑色素和动物的肤色、毛色以及虹膜的颜色密切相关, 黑素细胞是一种能够特异性产生色素的细胞, 常见于皮肤、毛囊以及眼睛等黑色素累积较多的部位<sup>[4]</sup>。黑色素能够抵御紫外线从而起到保护皮肤和眼睛的作用。此外, 黑色素还具有防止内部组织过热的作用<sup>[5]</sup>。哺乳动物的黑色素细胞中酪氨酸酶 (TYR) 含量丰富, TYR 在黑色素合成过程中起关键作用,

收稿日期: 2019-08-27 录用日期: 2020-01-03

基金项目: 国家自然科学基金 (31870780); 福建省自然科学基金 (2019J01021)

\*通信作者: qwang@xmu.edu.cn

TYR 的异常表达会引发一系列的皮肤疾病<sup>[6]</sup>。若 TYR 过量表达, 会造成色素累积从而导致雀斑、黄褐斑和黑色素瘤等皮肤性疾病<sup>[7]</sup>, 这些疾病多发于亚洲女性中<sup>[8]</sup>; 若 TYR 表达不足或功能缺失, 则会造成眼球、皮肤和毛发的色素缺乏而导致白化病<sup>[9]</sup>。此外, TYR 家族基因还和某些染色体疾病相关<sup>[10]</sup>。

曲酸因能够有效抑制酪氨酸酶的活力而闻名, 可作为紫外线保护剂, 抑制皮肤色素沉着, 抑制黑色素形成, 过去常作为美白化妆品的重要成分。然而, 近些年来报道称曲酸不稳定易分解还有副作用等问题, 而被禁止用于化妆品中<sup>[11]</sup>。基于此, 大量的曲酸衍生物被设计合成, 大多数通过改变 C-7 羟基, 合成了多种新型的曲酸衍生物, 被认为是化妆品、食品、医药等领域的有效的 TYR 抑制剂。Xie 等<sup>[12]</sup>设计合成了 14 种曲酸唑类衍生物, 对 TYR 均有明显的抑制作用并且效果显著优于曲酸本身, 最好的化合物的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 能够达到  $1.5 \mu\text{mol/L}$ , 抑制效果比曲酸提高了十几倍; Zhao 等<sup>[13]</sup>以曲酸为母环合成了 8 种羟基吡啶酮衍生物, 并测定了其对 TYR 活力的抑制作用以及和铜离子结合的能力, 结果表明化合物与铜离子螯合的能力越强则抑制效果越好, 并能够有效地延长新鲜切片苹果的货架期。Ashooriha 等<sup>[14]</sup>以曲酸为主要醇基设计了一系列含有芳氧基甲基-1 氢-1,2,3-三唑-1-酰基的曲酸衍生物, 该类化合物能够有效地抑制 mTYR 的活性 ( $IC_{50} = 0.06\sim 6.80 \mu\text{mol/L}$ ), 显著优于参考药物曲酸, 特别是两个环烷氧基类似物被发现比曲酸强 31~155 倍。然而, 目前有些曲酸衍生物由于其易被空气氧化、原料不易获取或者制备方法复杂等没有被商业化使用<sup>[15]</sup>。本课题组前期也尝试对曲酸进行结构改造, 先后合成了一系列曲酸衍生物<sup>[16]</sup>。

本研究选取其中一种曲酸衍生物 KAD3 作为研究对象, 从酶学角度探究其对 TYR 的抑制作用机理, 基于黑色素瘤细胞模型探究其对黑色素形成的抑制效果和抑制机制, 并在斑马鱼模型上进一步验证 KAD3 对斑马鱼黑色素形成的抑制作用, 以期 KAD3 在美白化妆品和医药方面的应用提供理论依据和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

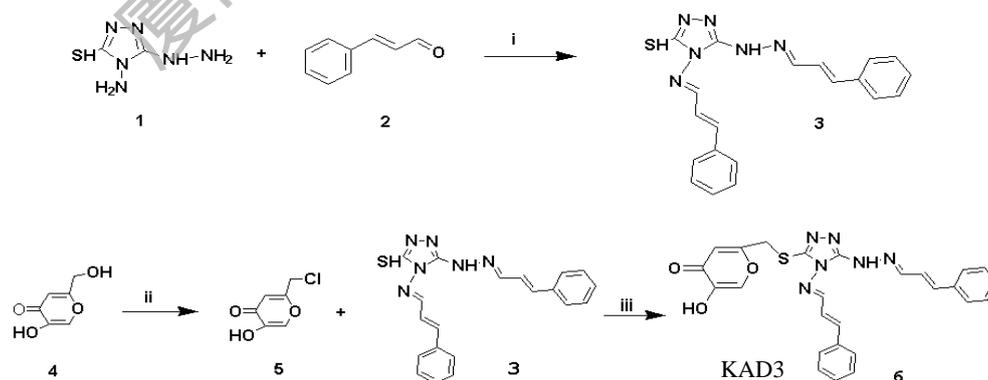
实验所用的人源肝细胞 LO2 由厦门大学医学院胡天惠教授实验室惠赠; 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 购自上海生物化学与细胞所; 斑马鱼 (*Barchydanio rerio*) 胚胎由厦门大学

生命科学学院左正宏教授实验室惠赠。蘑菇酪氨酸酶 (mTYR) 和 *L*-3,4-二羟基苯丙氨酸 (*L*-多巴) 为 Sigma-Aldrich 公司产品, 酶活力为 1000 U/mg; 其他试剂均为国产分析纯试剂; 使用的蒸馏水为去离子重蒸水。黑色素合成相关蛋白 MITF、TYR、TYRP1、TYRP2、 $\alpha$ -MSH、Akt/p-Akt、CREB/p-CREB 等主要抗体均买自 abcam 公司, 兔二抗和鼠二抗买自 Abclonal 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 曲酸衍生物 KAD3 的合成

曲酸衍生物 KAD3 (5-hydroxy-2-(((4-(((1*Z*,2*Z*)-3-phenylallylidene)amino)-5-(2-((*E*)-3-phenylallylidene)hydrazinyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)methyl)-4*H*-pyran-4-one) 合成反应过程如图 1 所示: 第一步, 参考文献[13]的方法将曲酸 (5 mmol/L) 加入 30 mL 氯化亚砷溶液中, 在冰浴条件下搅拌反应 12 h, 反应结束后用二氯甲烷抽滤洗涤沉淀, 得到白色粉末状的曲酸氯化物 (反应 (i)); 第二步, 以 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑 (5.5 mmol/L) 与肉桂醛 (10 mmol/L) 为反应物, 两者分别用无水乙醇溶解后在玻璃反应瓶中混合, 加入少量对甲苯磺酸做为催化剂, 反应体系在 80 °C 下油浴搅拌加热并冷凝回流, 约 1.5 h 后, 用无水乙醇抽滤, 洗涤沉淀得到席夫碱类产物, 为淡黄色粉末 (反应 (ii)); 第三步, 第二步合成的席夫碱 (3 mmol/L) 溶解在 10 mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中并缓慢滴加三乙胺 (3.3 mmol/L), 然后将第一步合成的曲酸衍生物 (3 mmol/L) 溶解在 5 mL DMF 中后缓慢滴加到上述反应瓶中, 80 °C 油浴搅拌加热并冷凝回流, 反应 12 h (反应 (iii))。反应结束后, 加入大量的双蒸水沉淀析出, 0.1 mol/L 稀盐酸洗涤沉淀 3 遍, 抽滤得到棕色沉淀。最终产物用质谱、核磁和红外光谱进行鉴定。



(i) 合成席夫碱; (ii) 曲酸卤化; (iii) 合成曲酸衍生物。

图 1 曲酸衍生物 KAD3 的合成路线

Fig. 1 The synthetic routes of KAD3

### 1.2.2 KAD3 对 mTYR 的抑制作用分析

参考文献[17]的方法,以 *L*-多巴作为底物测定二酚酶活性。在 3 mL 反应体系中,依次加入 1.65 mL 双蒸水、0.75 mL 浓度为 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8)、0.5 mL *L*-多巴溶液、0.1 mL 不同浓度的 KAD3,最后加入 0.1 mL 酶液,迅速混匀在 30 °C 恒温条件下测定 475 nm 处的吸光度。消光系数按照  $\epsilon=3700 \text{ (mol/L}\cdot\text{cm)}^{-1}$  计算,直线斜率即为酶活力。以酶的相对剩余活力对抑制剂浓度作图,通过 SPSS 软件计算得效应物的  $IC_{50}$  值。

### 1.2.3 KAD3 对 mTYR 的抑制机理分析

以 0.5 mmol/L *L*-多巴为底物,通过改变 mTYR 的浓度,探究不同浓度的 KAD3 对不同浓度的 mTYR 催化 *L*-多巴氧化的影响。以 KAD3 作用后的剩余酶活力对加入的 mTYR 浓度作图,由此判断效应物对 mTYR 二酚酶的抑制机理。

### 1.2.4 抑制类型以及抑制常数的测定

在确定 KAD3 是可逆抑制的基础上,进一步探究化合物的抑制类型。在 3 mL 测活体系内,固定酶浓度改变 *L*-多巴的量,检测不同浓度 KAD3 影响 mTYR 催化 *L*-多巴氧化的活力。用双倒数作图法,求得抑制常数  $K_I$  和  $K_{IS}$ 。

### 1.2.5 KAD3 与 TYR 的分子对接分析

采用 MOE (2008) 软件将 KAD3 与 TYR 进行分子对接,得到 TYR-KAD3 复合物的模拟结构,根据结构从分子水平上分析 KAD3 与 TYR 的相互作用机理。从 PDB 数据库下载 mTYR (PDB: 2Y9W) 的晶体结构并去除其外源蛋白、水分子及聚乙二醇,只保留一个含铜亚基作为 TYR 的蛋白模型。在进行对接前,先将蛋白及 KAD3 分子进行能量最小化,随后选择距离铜离子的活性中心最近的区域作为结合位点进行 KAD3 最优折叠构象的搜索,根据软件给出的评分标准和 KAD3 的最终构象,选择最优的复合物结构进行 TYR 和 KAD3 的相互作用分析。

### 1.2.6 KAD3 对人正常肝脏细胞 LO2 和小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 增殖的影响分析

采用噻唑兰 (MTT) 法测定 KAD3 对 LO2 细胞和 B16F10 细胞增殖的影响。用 DMEM 高糖培养基培养 LO2 细胞和 B16F10 细胞。控制细胞培养箱温度 37 °C、CO<sub>2</sub> 浓度 5% (体积分数)、饱和湿度的条件下培养。待细胞长至融合状态,用 0.25% (质量分数) 胰蛋白酶进行细胞消化,迅速转移至 96 孔板培养。每孔加 20  $\mu\text{L}$  单细胞悬液,过液生长贴壁后吸掉原有的培养基,分别加入 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的 KAD3,每个浓度 6 个重复。继续培养 24 或 48 h 后吸去旧培养液。于结束前 4 h,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 3 次,每孔细胞加入 20  $\mu\text{L}$  的 0.5 mg/mL MTT 和 180  $\mu\text{L}$  新鲜的 DMEM

高糖培养液，于细胞培养箱中培养细胞 4 h 后弃去培养基。再向每孔加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO。在室温条件下，震荡 10 min，使蓝紫色结晶甲贲充分溶解，立即用酶标仪测定其在波长 570 nm 处的吸光度。根据以下公式计算细胞存活率：

$$\text{细胞存活率} = (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

### 1.2.7 KAD3 对小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 黑色素合成的抑制作用分析

细胞培养方法同 1.2.6 小节，在 MTT 实验的基础上，在不影响其增殖的浓度范围内设置 0, 8, 15, 30, 60, 120  $\mu\text{mol/L}$  6 个浓度，探究 KAD3 对 B16F10 细胞内 TYR 活力以及黑色素合成的影响，以曲酸作为阳性对照。

1) 对胞内 TYR 活力的抑制参考文献[18]的方法，加药处理 60 h 后弃去原培养基，用 PBS 洗涤一次，用 PBS 冲洗 6 孔板，收集细胞于 4 mL 离心管中，10 000 r/min 常温离心后弃上清，保留细胞沉淀。在细胞沉淀中加入 200  $\mu\text{L}$  0.01 mol/L 含有 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 1% (体积分数) TritonX-100 的 PBS，悬浮细胞后，于 -80  $^{\circ}\text{C}$  中冷冻，反复冻融 3 次。4  $^{\circ}\text{C}$  离心 30 min，上清即为粗酶液。用 Bradford 试剂盒测定蛋白浓度，所有处理组调至蛋白浓度一样。取干净的 96 孔板，在 200  $\mu\text{L}$  的测定活力体系中加入 150  $\mu\text{L}$  溶于 pH 6.8 PBS 的 L-DOPA，再加入 50  $\mu\text{L}$  提取的粗酶液。暗室 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min，测定 475 nm 处的吸光度，即视为酪氨酸酶活性。

2) 对胞内黑色素合成的影响待细胞加药处理 60 h 后，10 000 r/min 常温离心收集细胞沉淀。用 PBS 洗涤沉淀 3 次，10,000 r/min 常温离心去掉上清，沉淀加入 200  $\mu\text{L}$  1 mol/L NaOH 于 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min，使细胞破碎色素溶解，冷却后于 405 nm 处测得的吸光度即视为黑色素含量。每一浓度处理设 3 个重复，取平均值。

### 1.2.8 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测黑色素合成相关蛋白表达量的影响

细胞培养方法同 1.2.6 小节，选择 4 个浓度分别为 0、15、45 和 60  $\mu\text{mol/L}$ 。加药处理 72 h 后吸去原有培养基，用 PBS 洗涤 2 次后收集细胞至 4 mL 离心管中，10 000 r/min 常温离心弃去上清，用 PBS 洗涤 3 次，收集细胞后加入 200  $\mu\text{L}$  含有 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液，充分悬浮细胞，放置在冰上裂解 1 h，10 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 0.5 h，取上清液检测蛋白浓度，分装，加入 4 $\times$ 上样缓冲液，100  $^{\circ}\text{C}$  热变性 30 min 保护蛋白不被分解。将所得样品用 Western blot 方法分析 MITF、TYR、TYRP1、TYRP2、 $\alpha$ -MSH、Akt/p-Akt、CREB/p-CREB 和  $\beta$ -actin 蛋白的表达水平，具体参照文献[19]的方法。

### 1.2.9 斑马鱼胚胎收集及培养

参考文献[20]的方法，采用野生型斑马鱼，收集胚胎前一晚按 2: 1 的比例挑选健康的性成熟雄鱼和雌鱼用于交配。水温和 pH 分别保持在 (28.5 $\pm$ 0.5)  $^{\circ}\text{C}$  和 7.5~8.5，每天光照

14 h, 每天喂食 2 次。取卵前一晚, 将雌、雄野生型斑马鱼喂饱后放入交配缸中, 插入隔板; 次日清晨拨开挡板使雌、雄鱼交配, 斑马鱼胚胎在受精后 30 min 左右收集, 并培养于 28 °C 恒温培养箱中, 用新鲜的胚胎培养液洗涤 3 次, 去除死胎转移至培养皿中再加入新鲜的培养液放置鱼房培养, 在体式镜下挑选发育正常胚胎, 用于实验。以 6 孔板作为实验容器, 每孔 40 个胚胎, KAD3 先溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中, DMSO 终体积分数为 0.5%, KAD3 质量浓度设置为 0, 10, 20, 40 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.2.10 KAD3 对斑马鱼酪氨酸酶活性和黑色素形成的影响分析

药物处理 48 h 之后, 取各浓度下的斑马鱼于体式镜 (德国 Leica 公司, Leica-M165FC) 下观察斑马鱼形态和黑色素分布并拍照。药物处理 48 h (受精 72 h) 后收集胚胎置于 -80 °C 处死, 然后蒸馏水洗涤 3 次, 加入冰浴的含 1 mmol/L PMSF 的 1% (体积分数) Triton X-100 超声处理 5 min 后, 于 4 °C 下 10 000 r/min 离心 30 min, 转移上清为粗酶液, 用 BCA 法进行蛋白定量。然后在 6 孔板中加入 150  $\mu\text{L}$  L-DOPA (1 mg/mL) 和 50  $\mu\text{L}$  粗酶液, 暗室 37 °C 孵育 30 min, 于 475 nm 处测量吸光度, 即视为酪氨酸酶活性。沉淀用 1 mol/L NaOH 重悬, 于 95 °C 金属浴 30 min。冷却后在 405 nm 处测量吸光度, 即视为黑色素含量。

### 1.2.11 数据分析与处理

数据以平均值  $\pm$  标准差表示; 通过 SPSS19.0 软件对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 采用邓肯检验法进行两两比较,  $p < 0.05$  表示差异显著; 用 Graphad 软件作图。

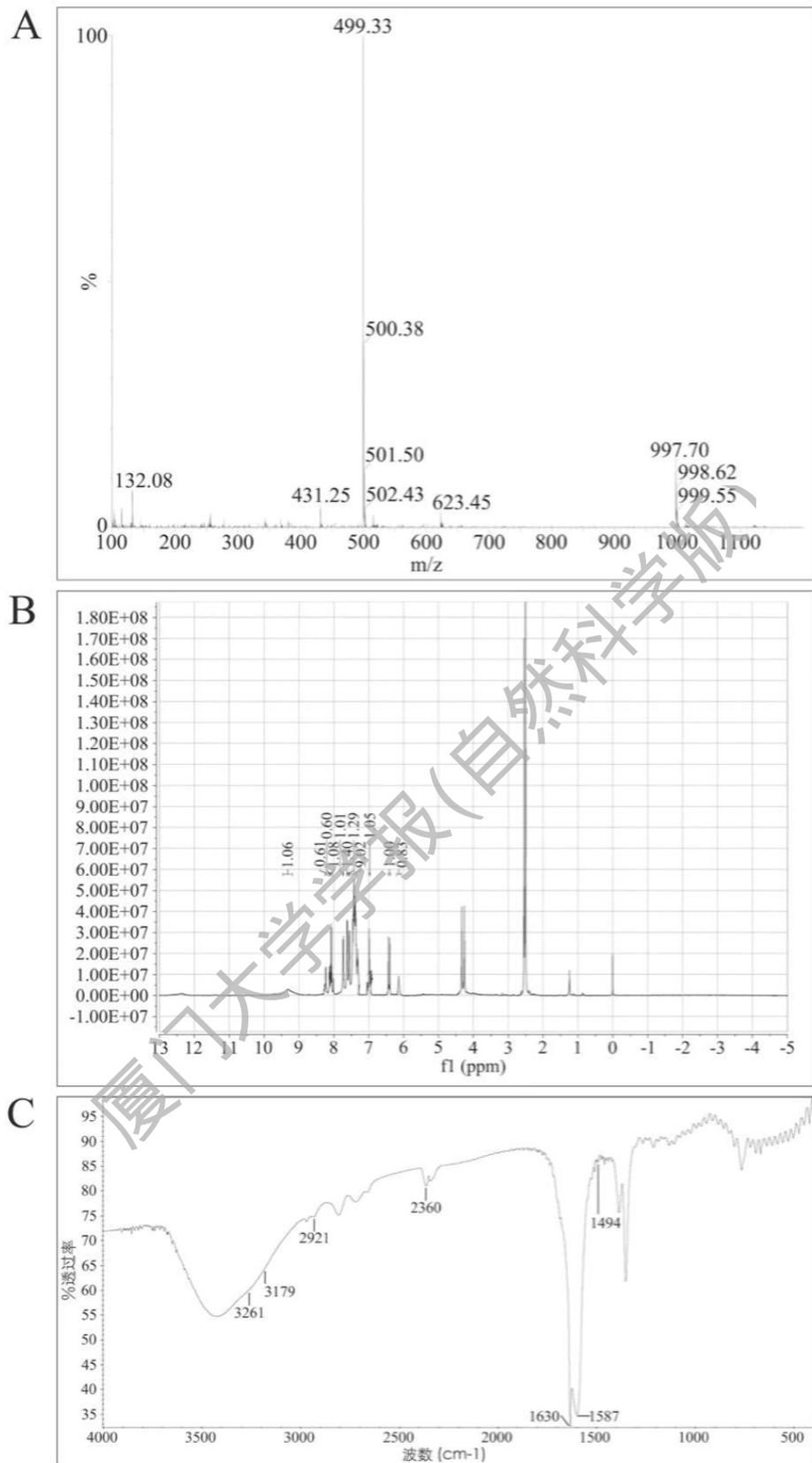
## 2 结果与分析

### 2.1 KAD3 的合成及鉴定

肉桂醛和 3-氨基-4-胍基-5-巯基-1,2,4-三氮唑 (2: 1) 合成中间产物, 再和曲酸反应得到目标产物 KAD3 粗产品。经 LC-MS 提纯 (0.035% 三氟乙酸水: 甲醇梯度洗脱, 流速 20 mL/min)、旋转蒸发得到棕色固体粉末, 产率为 60%, 纯度超过 90%。产物溶于醇类有机溶剂, 易溶于甲醇, 难溶于水。利用质谱、核磁以及红外光谱鉴定其结构 (图 2)。LC-MS ( $m/z$ ) 测得分子量为 499.52  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 实际计算为 498.60  $[\text{M}]^+$ 。

核磁氢谱数据分析结果如下:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.32 (s, 1H, OH), 8.32~8.20 (m, 1H, pyrone-CH), 8.10 (dd,  $J = 31.5, 11.4$  Hz, 2H, N=CH), 7.74 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, phH), 7.59 (dd,  $J = 34.9, 7.4$  Hz, 3H, phH), 7.46~7.34 (m, 6H, phH), 7.17~7.13 (m, 1H, =CH), 7.00~6.96 (m, 1H, =CH), 6.92 (dd,  $J = 16.1, 9.4$  Hz, 1H, =CH), 6.45~6.38 (m, 1H, pyrone-CH), 6.14 (s, 1H, =CH), 4.30~4.20 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>)。

红外光谱数据分析如下: (KBr,  $\nu$  max,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3261, 3179, 2921, 2360, 1630, 1587, 1494。



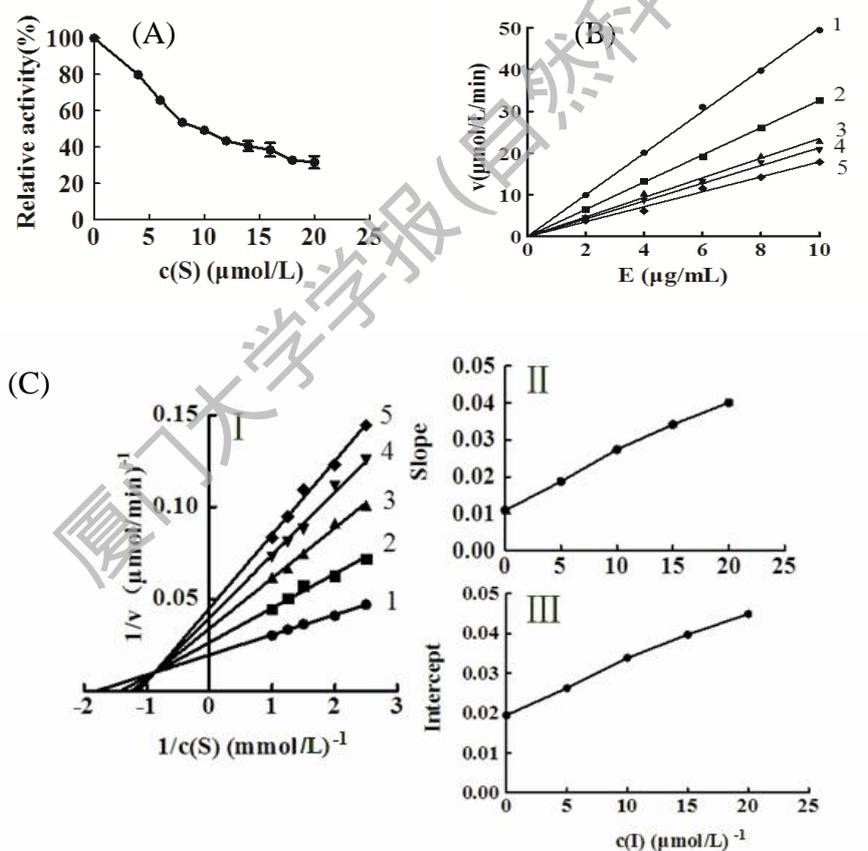
(A) 质谱图；(B) 氢谱图；(C) 红外光谱图。

图 2 KAD3 的结构鉴定图

Fig. 2 The Structural identification maps of KAD3

## 2.2 KAD3 对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制作用

以 *L*-DOPA 为底物，在 3 mL 反应体系中，研究 KAD3 对 mTYR 催化多巴反应的影响，即 KAD3 对二酚酶活性的抑制作用。结果如图 3A 所示，酶活力随着 KAD3 浓度的增加而逐渐降低。通过 SPSS 计算得到  $IC_{50}$  为  $10.00 \mu\text{mol/L}$ ，优于曲酸  $19.50 \mu\text{mol/L}$ <sup>[21]</sup>，对二酚酶活性抑制效果显著。通过控制底物多巴浓度不变，只改变酶浓度，测定不同 KAD3 浓度下二酚酶的酶活力改变情况，进一步研究 KAD3 抑制 mTYR 催化多巴的机理。结果如图 3B 所示，以酶的剩余活力作图，KAD3 的浓度越大，直线的斜率越小，说明 KAD3 对二酚酶活性的抑制作用是一个可逆过程，KAD3 不能使酶永久失去活性，只能降低酶催化氧化 *L*-DOPA 的速率。进一步通过图 3C-I 可以看出 KAD3 的双倒数法作图 ( $1/v$  对  $1/c(S)$ ) 是一组相交于第二象限的直线，说明 KAD3 确实能够抑制多巴的氧化，并且随着  $K_m$  值的增大  $V_m$  值下降，表现为混合型抑制类型。二次作图，求出 KAD3 对游离酶的抑制常数 ( $K_I$ ) (图 3C-II) 为  $7.50 \mu\text{mol/L}$ ；对酶-底物络合物的抑制常数 ( $K_{IS}$ ) (图 3C-III) 为  $15.80 \mu\text{mol/L}$ 。



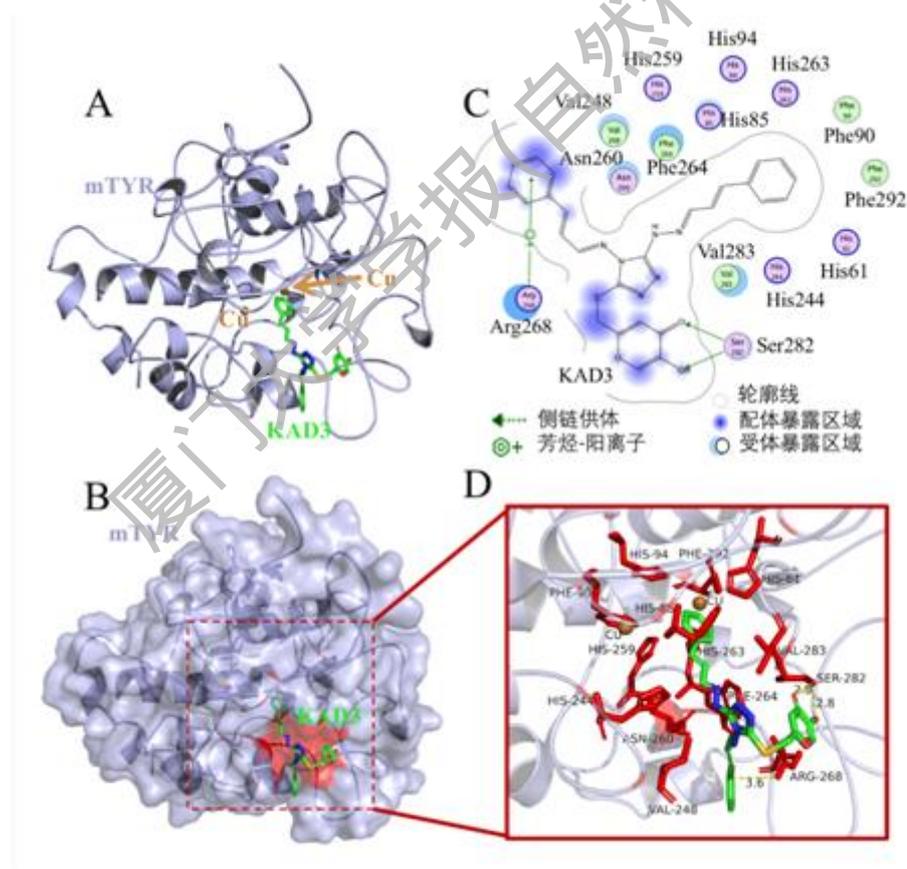
(A) KAD3 对 mTYR 二酚酶活性的抑制作用； (B) KAD3 对 mTYR 二酚酶催化氧化多巴的抑制机理；  
(C) KAD3 对 mTYR 二酚酶的抑制类型； 1-5 代表 KAD3 的终浓度 0, 5, 10, 15 和 20  $\mu\text{mol/L}$ 。

图 3 KAD3 对 mTYR 二酚酶活性的抑制作用

Fig. 3 Effect of KAD3 on diphenolase activity of mTYR

## 2.3 KAD3 与酶的相互作用

为了进一步研究 KAD3 与 mTYR 的相互作用机理，本课题组通过 MOE 软件进行了模拟对接，得到 mTYR-KAD3 的复合物结构，分析 mTYR 和 KAD3 的相互作用，阐明 KAD3 对 mTYR 的抑制机制。用 Pymol 和 MOE 软件作图，mTYR-KAD3 复合物整体结构如图 4(A) 和 4(B)所示，KAD3 占据了 mTYR 的催化活性中心（铜离子所在的空腔），因此能够抑制 mTYR 的酶活性。对 mTYR 和 KAD3 的结合区域进行相互作用分析，可以看到 KAD3 和 mTYR 形成了 3 个氢键：一个是 KAD3 的苯基部分与 mTYR 的 Arg268 形成的氢键；另外 2 个分别是 mTYR 的 Ser82 侧链与 KAD3 酮基上的氧原子和羟基的氧原子形成的氢键。此外，KAD3 还与酶活性中心的 His259、His263、Phe284、Ser282、Phe264、Val248、Ala283、His94 和 Glu256 有较弱的相互作用，即范德华力或疏水相互作用（图 4(C)和(D)）。



(A) mTYR-KAD3 复合物的整体结构 (pymol 作图, mTYR 用 cartoon 模型显示, KAD3 用 sticks 模型显示, C 绿色, O 红色, N 蓝色); (B) mTYR-KAD3 复合物的整体结构的表面图 (pymol 作图, mTYR 用

surface 和 cartoon 模型显示, 其中 surface 透明度为 40%, KAD3 用 sticks 模型显示), 表面红色区域为 KAD3 的结合区域; (C) mTYR-KAD3 的相互作用二维图 (moe 作图); (D) mTYR 和 KAD3 相互作用区域的三维放大图, mTYR 上和 KAD3 有发生相互作用的氨基酸用红色 sticks 模型显示出来, 并进行标注, 其余无相互作用的区域则用 60%透明度的 cartoon 模型显示, 氢键相互作用以黄色虚线标出并标明形成氢键相互作用的原子间的距离, 单位为 Å。

图 4 mTYR-KAD3 复合物结构及相互作用的 MOE 对接分析

Fig. 4 The complex structure and interaction of KAD3 with mTYR by MOE docking

## 2.4 KAD3 对胞内黑色素合成的抑制作用

### 2.4.1 KAD3 的细胞毒性检测

利用 MTT 法检测药物处理后人正常肝细胞 LO2 细胞和小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 的存活率, 结果如图 5 所示, KAD3 在 0~200  $\mu\text{mol/L}$  范围内对两种细胞的增殖活性均无明显影响, 表明在此范围内 KAD3 对这两种细胞均无毒性, 因此下一步实验在此浓度范围内进行。

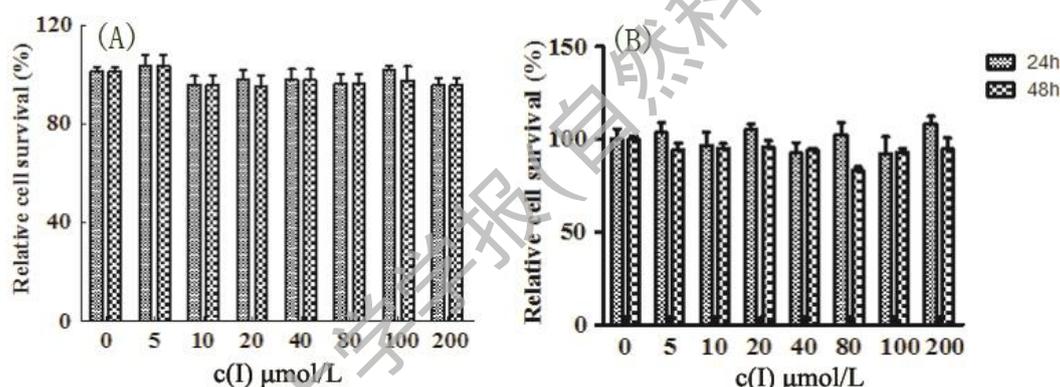


图 5 MTT 法检测 KAD3 对 LO2 (A) 和 B16F10 (B) 细胞增殖活性的影响

Fig. 5 Proliferation ability of LO2 (A) and B16F10 cells measured by MTT assay

### 2.4.2 KAD3 对胞内 TYR 活力和黑色素含量的影响

研究不同浓度 (0, 8, 15, 30, 60 和 120  $\mu\text{mol/L}$ ) KAD3 对 B16F10 细胞内 TYR 活力的影响。结果如图 6(A)所示, 随着 KAD3 浓度提高, 酶活力明显下降, 当浓度为 120  $\mu\text{mol/L}$  时, 酶活力下降到仅剩 2%。从收集的细胞沉淀表面观 (图 6(B)上方照片图) 可以看出, 细胞的颜色由深变浅, 空白组细胞颜色较深而高浓度处理组细胞颜色接近透明。用细胞提取物在可见光范围 405 nm 的吸光值表征黑色素含量, 结果如图 6(B)下方统计图所示, B16F10 细胞经过 KAD3 处理后, 黑色素含量显著减少, 并且呈现浓度效应, 当浓度为 120  $\mu\text{mol/L}$  时, 黑色素含量仅为对照组的 19%。

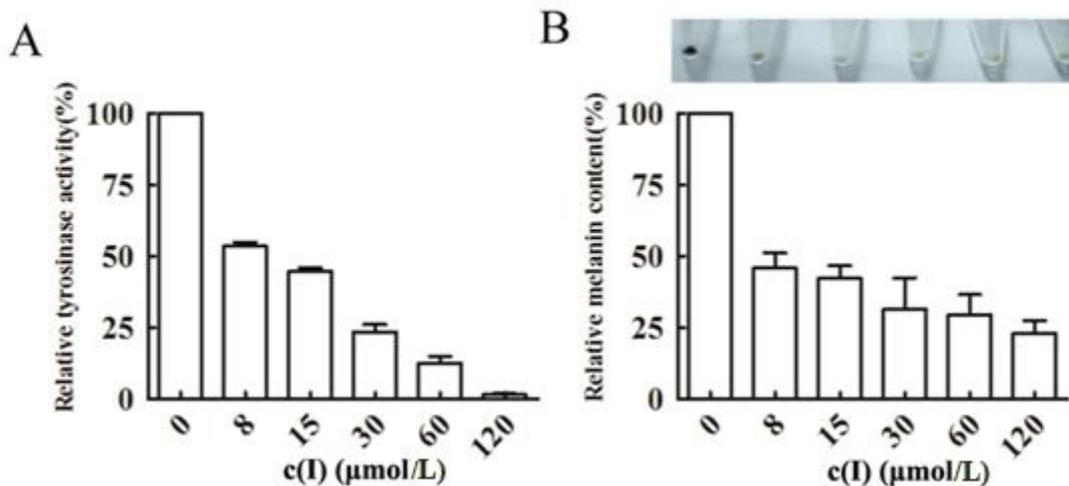


图 6 KAD3 对 B16F10 细胞内 TYR 活力 (A) 和黑色素含量 (B) 的影响

Fig. 6 Effects of KAD3 on the cellular TYR activity (A) and melanin contents (B) of B16F10 cells

### 2.4.3 KAD3 对细胞黑色素合成相关蛋白的影响

进一步通过 Western blot 检测 KAD3 对 B16F10 细胞黑色素合成相关蛋白表达量的影响，从蛋白水平探究 KAD3 抑制黑色素合成的机制。以 0, 15, 45, 60 μmol/L 的 KAD3 处理 B16F10 细胞，检测 MITF、TYR、TYRP-1、TYRP-2 和 α-MSH 蛋白表达量的差异，以 β-actin 为内参。从图 7 可以看出 KAD3 对 MITF、TYR、TYRP-1、TYRP-2 和 α-MSH 的表达均有明显抑制作用。

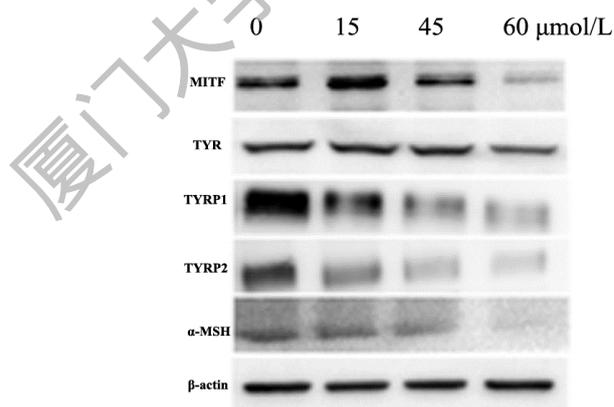


图 7 KAD3 对黑色素瘤细胞 B16F10 黑色素合成相关蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of KAD3 on the expression of melanogenesis-related proteins in B16F10 cells

### 2.4.4 KAD3 对黑色素合成信号通路的影响

黑色素的合成是一个复杂的代谢过程，涉及很多信号通路。为此，深入探究 KAD3 对

Akt 和 CREB 两条黑色素经典信号通路的调控。Western blot 实验结果如图 8 所示，随着抑制剂浓度的升高，磷酸化的 Akt 显著上调，磷酸化的 CREB 下调明显。

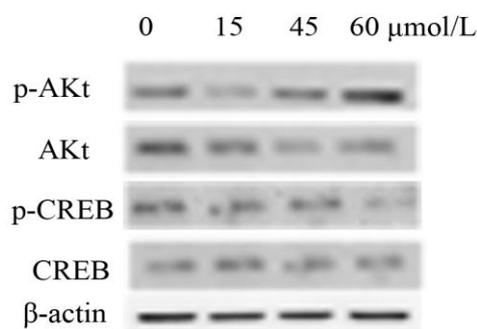


图 8 KAD3 对黑色素瘤细胞 B16F10 中 Akt 和 CREB 信号通路的影响

Fig. 8 Effects of KAD3 on the Akt and CREB signaling pathways in B16F10 cells

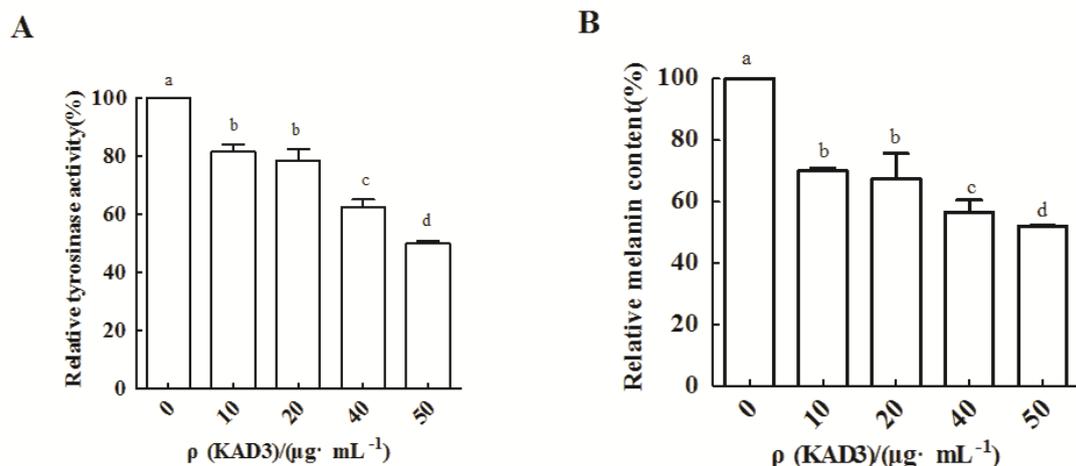
## 2.5 KAD3 对斑马鱼黑色素合成的影响

由于斑马鱼培养简单、黑色素容易观察，常被用来作为筛选黑色素抑制剂的动物模型。分别用不同浓度（0，10，20，40，50 μg/mL）KAD3 处理斑马鱼胚胎，以 50 μg/mL 曲酸作为阳性对照，观察 KAD3 对斑马鱼黑色素形成的影响。如图 9 所示，50 μg/mL 处理组的斑马鱼眼部、卵黄囊的颜色较浅、色素合成较少，而对照组颜色很深，并且分布密集。KAD3 处理后斑马鱼黑色素形成受到了明显抑制，且抑制效果优于同等浓度的曲酸阳性对照组。进一步的检测结果显示，随着 KAD3 浓度的增加，斑马鱼体内酪氨酸酶活力降低（图 10(A)）且黑色素含量减少（图 10(B)）。



图 9 KAD3 对斑马鱼黑色素形成的影响

Fig.9 Effects of KAD3 on the pigmentation in zebrafish



数据表示为平均值±标准误差 ( $n = 3$ )，上标字母不同的组间具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

图 10 KAD3 对斑马鱼 TYR 活力及黑色素含量的抑制作用

Fig. 10 Inhibitory effects of TYR activity and melanin contents in zebrafish by KAD3

### 3 讨论与结论

本研究选取的 KAD3 是以肉桂醛和 3-氨基-4-胍基-5-巯基-1,2,4 三氮唑 (2: 1) 为原料合成中间产物席夫碱，再和曲酸反应得到目标产物 KAD3 粗产品。经 LC-MS 提纯、旋蒸得到棕色固体粉末。此法相较于其他曲酸衍生物的制备方法更为简单易行，且产物不易被氧化。本研究结果表明化合物 KAD3 对 mTYR 二酚酶具有显著的抑制效果，并且优于曲酸。该化合物的抑制机理表现为可逆混合型抑制，而且  $K_{is}$  值大于  $K_i$ ，说明酶-底物复合物对游离酶的亲和力弱于抑制剂。

MOE 分子对接实验结果表明，KAD3 可以与 mTYR 活性位点的部分残基相互作用。侧链供体 Ser282 可以作用于酮基上的氧原子和羟基的氧原子，酮基的氧原子可以与残基 Ser282 和 Val283 形成两个氢键。除此之外，KAD3 还与活性中心的 His259、His263、Phe284、Ser282、Phe264、Val 248、Ala283、His94 和 Glu256 残基相互作用，从而抑制酶的活性。

进一步分析 KAD3 对 B16F10 细胞黑色素合成的抑制作用以及分子机制发现，在没有毒副作用的浓度范围内，该化合物表现出了很好的抑制黑色素合成的活性。在 120 μmol/L 处理下，其胞内 TYR 活力几乎被完全抑制，活力仅为对照组的 2%。而黑色素含量从表观看几乎看不见黑色，OD 值仅为对照组的 19%。黑色素的含量取决于 TYR 的表达和活性<sup>[22]</sup>。本研究中 Western blot 的结果表明，KAD3 可以抑制 TYR 家族相关蛋白 TYRP1、TYRP2 以及 TYR 的表达。这些蛋白的表达受到关键转录因子 MITF 的调控，MITF 能够与启动子的

M-box 结合, 被揭示其是细胞粘附分子表达的直接和积极的调控因子, 并随后增加了黑色素生成蛋白的转录<sup>[23]</sup>。KAD3 能够有效下调 MITF 的表达, 进而下调 TYR 家族蛋白的表达, 有效抑制 TYR 的活性, 最终抑制黑色素的合成。为了进一步探究曲酸衍生物抑制黑色素合成的分子机制, 本研究中还分析了 KAD3 对黑色素合成几个主要相关信号通路的调控。有报道表明, cAMP/PKA 和 MAPK 信号通路激活上调 CREB 磷酸化, 而 CREB 磷酸化正调控 MITF, PKA 可磷酸化和激活 CREB, 进而上调 MITF 表达水平<sup>[24]</sup>。此外, PI3K/Akt 信号通路也与黑色素生成相关。失活的 PI3K 和 Akt 通过 cAMP 诱导激活 GSK3 $\beta$ , 然后在丝氨酸 289 位点磷酸化 MITF 与启动子的 M-box 结合, 增强黑素原相关酶的表达<sup>[25]</sup>。本研究发现, 化合物 KAD3 可通过上调 p-Akt 和下调 p-CREB 的表达进而下调 MITF 的表达, 最终抑制黑色素的生成。

斑马鱼是一种流行的脊椎动物模型, 其器官系统和基因序列与人类相似<sup>[26]</sup>。斑马鱼胚胎黑色素的形成是在受精 24 h 后, 其色素的累积肉眼可见, 易于观察。因此很多研究者利用斑马鱼进行体外筛选抑制剂。Adamantia 等<sup>[27]</sup>通过斑马鱼体外表型试验从山楂中鉴定出新的抗黑变抑制剂。在本研究中, 与对照组相比, 在表型上可以明显看出 KAD3 能够有效抑制斑马鱼色素的累积, 特别地眼睛和背部的颜色都比较浅, 色素成点状分布。而对照组的斑马鱼体色很黑, 色素累积明显, 成片分布。

综上所述, 本研究结果可为 KAD3 在化妆品和医药方面的应用提供理论参考。

## 参考文献:

- [1] Helen. TOP 品牌美白个性主张[J].中国新时代,2003(11):116-121.
- [2] 于歌. 防晒剂及美白护肤品市场趋势[J]. 日用化学品科学, 2013, 36 (7): 6-12.
- [3] 崔霞, 邹明强, 胡秀丽, 等. 皮肤美白剂中氢醌潜在毒性研究进展[J]. 中国公共卫生, 2008, 24 (7): 873-874.
- [4] SCALVINO S A, CHAPELLE A, HAJEM N, et al. Efficacy of an agonist of  $\alpha$ -MSH, the palmitoyl tetrapeptide-20, in hair pigmentation[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2018, 40(5): 516-524.
- [5] NIWANO T, TERAZAWA S, NAKAJIMA H, et al. The stem cell factor-stimulated melanogenesis in human melanocytes can be abrogated by interrupting the phosphorylation of MSK1: evidence for involvement of the p38/MSK1/CREB/MITF axis[J]. Archives of dermatological research, 2018, 310(3): 187-196.
- [6] LIANG Y, SUN L, SER W, et al. Classification of non-tumorous skin pigmentation disorders using voting based probabilistic linear discriminant analysis[J]. Computers in Biology and Medicine, 2018, 99: 123-132.
- [7] ENDO C, JOHNSON T A, MORINO R, et al. Genome-wide association study in Japanese females identifies fifteen novel skin-related trait associations[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 1-22.
- [8] PATEL S, RAUF A, KHAN H, et al. A holistic review on the autoimmune disease vitiligo with emphasis on the causal factors[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 92: 501-508.

- [9] NIU C, AISA H A. Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: potential agents for vitiligo[J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1-28.
- [10] RAMPRASAD V L, SRIPRIYA S, RONNIE G, et al. Genetic homogeneity for inherited congenital microcoria loci in an Asian Indian pedigree[J]. *Molecular Vision*, 2005, 11(111/112): 934-940.
- [11] MOHAMAD R, MOHAMED M S, SUHAILI N, et al. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production[J]. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 5(2): 24-37.
- [12] XIE W, ZHANG J, MA X, et al. Synthesis and biological evaluation of kojic acid derivatives containing 1,2,4-triazole as potent tyrosinase inhibitors[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2015, 86 (5): 1087-1092.
- [13] ZHAO D Y, ZHANG M X, DONG X W, et al. Design and synthesis of novel hydroxypyridinone derivatives as potential tyrosinase inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(13): 3103-3108.
- [14] ASHOORIHA M, KHOSHNEVISZADEH M, KHOSHNEVISZADEH M, et al. 1,2,3-Triazole-based kojic acid analogs as potent tyrosinase inhibitors: design, synthesis and biological evaluation[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 82: 414-22.
- [15] 芮斌, 蒋惠亮, 陶文沂. 曲酸衍生物的制备及在化妆品上的应用[J]. *广东化工*, 2002, 29 (2): 31-33.
- [16] CHEN Y M, SU W C, LI C, et al. Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 123: 723-731.
- [17] HU Y H, ZHUANG J X, YU F, et al. Inhibitory effects of cefotaxime on the activity of mushroom tyrosinase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 121(4): 385-389.
- [18] OH J, KIM J, JANG J H, et al. Novel (1E,3E,5E)-1,6-bis(substituted phenyl)hexa-1,3,5-triene analogs inhibit melanogenesis in B16F10 cells and zebrafish[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1-12.
- [19] HWANG K S, YANG J Y, LEE J, et al. A novel anti-melanogenic agent, KDZ-001, inhibits tyrosinase enzymatic activity [J]. *Journal of dermatological science*, 2018, 89(2): 165-171.
- [20] CHEN X X, LIANG G, CHAI W M, et al. Antioxidant and antityrosinase proanthocyanidins from *Polyalthia longifolia* leaves [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118 (5): 583-587.
- [21] MARTINEZ M V, WHITAKER J R. The biochemistry and control of enzymatic browning[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1995, 6(6): 195-200.
- [22] ZHENG J, ZHANG R J, CHEN Y M, et al. Synthesis of caffeic acid ester morpholines and their activation effects on tyrosinase[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 62: 92-98.
- [23] ULLRICH N, LOEFFEK S, HORN S, et al. MITF is a critical regulator of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) in malignant melanoma[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2015, 28(6): 736-740.
- [24] OTREBA M, ROK J, BUSZMAN E, et al. Regulation of melanogenesis: the role of cAMP and MITF[J]. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej*, 2012, 66:33-40.
- [25] WU P Y, YOU Y J, LIU Y J, et al. Sesamol inhibited melanogenesis by regulating melanin-related signal transduction in B16F10 cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018,19(4):1-14.
- [26] LOVE D R, PICHLER F B, DODD A, et al. Technology for high-throughput screens: the present and future using zebrafish [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(6): 564-571.
- [27] AGALOU A, THRAPSANIOTIS M, ANGELIS A, et al. Identification of novel melanin synthesis inhibitors from *Crataegus pycnoloba* using an *in vivo* zebrafish phenotypic assay [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 1-13.

# Synthesis of kojic acid derivative KAD3 and its mechanism of inhibiting melanin formation

CHEN Yanmei, HU Yu, HUANG Linglong, WEN Zijie, ZHANG Haojie,  
YANG Chunyan, WANG Qin\*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Kojic acid as a well-known antityrosinase agent, however it has been banned to use in cosmetic due to its instability and side effect. In this study, a novel kojic acid derivatives was synthesized and the inhibitory mechanism was evaluated by enzyme assay, cell assay and zebrafish assay. The results showed that KAD3 could effectively inhibit the diphenolase activity of mushroom tyrosinase with  $IC_{50}$  of 10.00  $\mu\text{mol/L}$ . Then, KAD3 could effectively inhibit melanogenesis by downregulating melanin related proteins MITF, TYR, TYRP1 and TYRP2 in the B16F10 cells. Otherwise, we found that KAD3 could inhibit the pigment formation of zebrafish embryo and the effect was stronger than kojic acid. Our study could lay the theoretical foundation for the application of kojic acid derivatives in the fields of cosmetics and medicine and provide new ideas for the development of new anti-melanogenesis agents.

**Keywords:** KAD3; synthesis; melanin; tyrosinase; mechanism