DOI:10.16016/j.2097-0927.202204145

苯氧乙酸类化合物对人谷胱甘肽-S-转移酶 Mu 抑制性能表征

许榜田[1],方大树[1],谢雨晴[1],杨晓兰[2] 401331 重庆,重庆医科大学附属大学城医院药学部[1];400016 重庆,重庆医科大学检验医学院,临床检验诊断学教育部重点实验室[2]

[摘要] **目的** 设计合成 4 个苯氧乙酸类化合物,通过不同方法表征其对人谷胱甘肽-S-转移酶 Mu(glutathione-S-transferase Mu, GSTM)的抑制性能,考察苯氧乙酸类化合物与 GSTM 之间的构效关系。**方法** 设计合成含 α,β-不饱和酮结构的 4-丙烯酰苯氧乙酰乙胺(Ⅰa)、N,N'-(4-(丙烯酰基)苯氧乙酰基)丁二胺(Ⅱa)和不含 α,β-不饱和酮结构的 4-丙酰苯氧乙酰乙胺(Ⅰb)、N,N'-(4-(丙酰基)苯氧乙酰基)丁二胺(Ⅱb),利用初速度法表征 4 个化合物对 GSTM 的半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC_{50})和表观抑制常数(inhibition constant, K_i),利用荧光光谱法表征 4 个化合物对 GSTM 的解离常数(dissociation constant, K_d)。**结果** 含 α,β-不饱和酮结构的Ⅰa、Ⅱa 可与谷胱甘肽(glutathione, GSH)发生亲电加成反应,与酶和 GSH 孵育原位生成产物后,其对 GSTM 的 IC_{50} 分别为(67±6) μmol/L、(0.10±0.02) μmol/L (n=2);不含 α,β-不饱和酮结构的Ⅰb、Ⅱb 对 GSTM 无明显抑制作用。Ⅰa 相对 GSH 的 K_i 为(19.9±1.6) μmol/L,相对 CDNB 的 K_i 为(9.1±0.7) μmol/L (n=3);Ⅱa 相对 GSH 的 K_i 为(0.063±0.005) μmol/L,相对 CDNB 的 K_i 为(0.079±0.006) μmol/L (n=3);可见Ⅱa 较Ⅰa 的 K_i 低(P<0.05)。荧光光谱法测得Ⅰa、Ⅰb、Ⅱa、Ⅱb 的 K_d 分别为(41.5±1.8) μmol/L、(38.9±1.7) μmol/L、(18.0±0.9) μmol/L、(19.5±1.0) μmol (n=2);可见Ⅰa 与Ⅰb、Ⅱa 与Ⅱb 之间的 K_d 无显著差异(P>0.05),而Ⅱa 较Ⅰa、Ⅱb 较Ⅰb 的 K_d 低(P<0.05)。**结论** α,β-不饱和酮结构是苯氧乙酸类化合物抑制作用的必须官能团;二价抑制剂Ⅱa、Ⅱb 较单价抑制剂Ⅰa、Ⅰb 对 GSTM 具有更高亲和力,Ⅱa 的产物较Ⅰa 的产物抑制作用更强。

[关键词] 苯氧乙酸类化合物;谷胱甘肽-S-转移酶 Mu;抑制性能;表征
[中图法分类号] R345; R914.4; R962 [文献标志码] A

Characterization of phenoxyacetic acid compounds in inhibition of human glutathione-S-transferase Mu

XU Bangtian[1], FANG Dashu[1], XIE Yuqing[1], YANG Xiaolan[2] [1]Department of Pharmaceutics, University-Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401331; [2]Key Laboratory of Clinical Laboratory and Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To design and synthesize 4 phenoxyacetic acid compounds, characterize their inhibitory potencies on human glutathione-S-transferase Mu (glutathione-S-transferase Mu, GSTM) by different methods, and investigate the structure-activity relationship between phenoxyacetic acid compounds and GSTM. **Methods** Four phenoxyacetic acid compounds were designed and synthesized, and they are ethyl 2-(4-acryloylphenoxy) acetate (Ⅰa) and N, N'-(butane-1, 4-diyl)-bis-(4-acryloyl phenoxyacetic amide) (Ⅱa) containing α, β-unsaturated ketone structure, and ethyl 2-(4-propionylphenoxy) acetate (Ⅰb), N, N'-(butane-1, 4-diyl)-bis-(4-propionyl phenoxyacetic amide) (Ⅱb) not containing α, β-unsaturated ketone structure. They were characterized by the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50})

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31570862);重庆市自然科学基金资助项目(cstc2019jcyj-msxmX0166);重庆医科大学附属大学城医院科研青苗培育项目(2021JC03)
[通信作者] 杨晓兰,E-mail: xiaolanyang666@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and apparent inhibition constant (K_i) using initial velocity method, and the dissociation constants (K_d) for GSTM utilizing fluorescence analysis. **Results** Ⅰa and Ⅱa contained α,β-unsaturated ketone structure that undergoes electrophilic addition reaction with GSH. After incubation with enzyme and GSH, Ⅰa and Ⅱa generated products in situ, with a IC_{50} value of 67.00±6.00 and 0.10±0.02 μmol/L for GSTM respectively (n=2). Ⅰb and Ⅱb without α, β -unsaturated ketone structures had no inhibitory potencies for GSTM. The K_i of Ⅰa against GSH was 19.9±1.6 μmol/L, and the K_i against CDNB was 9.1±0.7 μmol/L (n=3). The K_i of Ⅱa against GSH was 0.063±0.005 μmol/L, and against CDNB was 0.079±0.006 μmol/L (n=3). The K_i of Ⅱa was lower than that of Ⅰa (P<0.05). The K_d of Ⅰa, Ⅰb, Ⅱa, and Ⅱb measured by fluorescence analysis were 41.5±1.8, 38.9±1.7, 18.0±0.9, and 19.5±1.0 μmol/L, respectively (n=2). The K_d between Ⅰa and Ⅰb, and between Ⅱa and Ⅱb had no significant differences(P>0.05). The K_d of Ⅱa was lower than that of Ⅰa ,and the K_d of Ⅱb was lower than that of Ⅰb (P<0.05). **Conclusion** α,β-unsaturated ketone structure is the essential functional group of phenoxyacetic acid compounds for inhibition on GSTM. Comparing with monovalent Ⅰa and Ⅰb, divalent Ⅱa and Ⅱb have higher affinity for GSTM. The product of Ⅱa has inhibitory potency significantly higher than that of Ⅰa.

[**Key words**] phenoxyacetic acid compound; glutathione-S-transferase Mu; inhibitory property; characterization

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31570862), the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0166) and the Scientific Young Seedling Cultivation Project of the University-Town Hospital of Chongqing Medical University (2021JC03).
Corresponding author: YANG Xiaolan, Email: xiaolanyang666@cqmu.edu.cn

肿瘤细胞多药耐药性是化疗失败的主要原因,细胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)系统是造成细胞毒性药物作用失效的主要因素[1-2]。谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)是利用 GSH 对各种内源性和外源性非营养物质(包括细胞毒性抗肿瘤药物)进行生物转化的关键二相代谢酶,当其活性增强时药物的代谢和排泄也随之增加从而引发耐药性[3]。人胞质 GSTs 有多种同工酶,分为 π、μ(Mu)、α、ω、θ、ζ 6 大类。GSTs 已被证明在化疗耐药肿瘤细胞中过表达,其中谷胱甘肽 S-转移酶 Mu(Glutathione-S-transferase Mu, GSTM)与卵巢癌、肺癌等耐药密切相关[4]。GSTs 作为肿瘤耐药逆转药物的作用靶点,其抑制剂可逆转肿瘤耐药而提高肿瘤化疗药物治疗指数[5-6]。

已报道多种 GST 抑制剂,如依他尼酸、肉桂醛、谷胱甘肽类似物等[7-9]。HANSSON 等[10]发现在耐苯丙酸氮芥的人黑色素瘤细胞中 GST 水平升高,依他尼酸可以逆转对苯丙酸氮芥的耐药。黄玲萍等[11]研究证实依他尼酸可通过抑制 GST 活性和 β-catenin 水平,发挥抑制肺癌 A549 细胞球增殖和干性,促进其凋亡。依他尼酸与替塞派合用治疗晚期肿瘤曾进入Ⅰ期临床,因其严重的耳毒性,并伴随高血糖、低钙和低镁血症等副作用,制约了其临床应用[12]。GST 是具有 2 个亚基的同二聚体结构,每个亚基含有 1 个活性中心,由可结合还原型谷胱甘肽的 G 位点和结合疏水底物的 H 位点组成[13];2 个 H 位点通过狭缝相连。GST 的 G 位点只能结合 GSH,H 位点可结合多种疏水底物或配体[14]。当 1 个化合物与酶的 1 个活性中心相结合发挥抑制作用,称为单价抑制剂,若同时与二聚体酶两个活性中心结合发挥抑制作用,则为二价抑制剂;理论上二价抑制剂亲和力比单价抑制剂高。同样,当一个疏水底物可与 GSH 反应且生成的产物能同时结合到 G 位点和 H 位点时,产物的亲和力比疏水底物的亲和力高,此时疏水底物称为潜抑制剂,而产物称为抑制剂。因此,针对 GST 二聚体,设计潜抑制剂和二价抑制剂是提高抑制剂亲和力的有效策略,同时也要尽可能降低化合物的细胞毒性。前期本课题组利用依他尼酸合成的 GST 抑制剂双依他尼酰丁二胺、双依他尼酸乙醇胺等,对 GSTM 的抑制常数可达到纳摩尔(nmol/L)级[15-16]。细胞实验显示,双依他尼酰己二胺对耐顺铂卵巢癌有明显逆转作用,但对正常细胞有较大毒性,该毒性可能来自于依他尼酸的 α,β-不饱和酮结构及其 2,3-二氯苯酚结构[17-18]。因此,本研究以依他尼酸为先导化合物,保留或不保留 α,β-不饱和酮结构、去掉氯取代基,设计合成苯氧乙酸类系列化合物,通过表征其对 GSTM 的抑制能力,揭示其与 GSTM 之间的构效关系,为肿瘤化疗药物增敏剂的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

苯氧乙酸、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinim-

ide, NHS)、N,N'-二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、70%乙胺水溶液、1,4-丁二胺、丙酰氯、丙烯酰氯、无水三氯化铝购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;还原型 GSH 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, CDNB)购自美国 ICN Biomedicals 公司。Esquire 6000 型液相色谱/质谱联用仪(德国,Bruker 公司);Avance DRX-500MHz 型核磁谱仪(德国,Bruker 公司);UV-1600 型紫外可见分光光度计(日本,岛津公司);Agilent Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国,安捷伦公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国,安捷伦公司)。

1.2 苯氧乙酸类系列化合物的合成

按照图 1 路线合成对丙烯酰苯氧乙酰乙胺(Ⅰa)、对丙酰苯氧乙酰乙胺(Ⅰb)、N,N'-(4-(丙烯酰基)苯氧乙酰基)丁二胺(Ⅱa)、N,N'-(4-(丙酰基)苯氧乙酰基)丁二胺(Ⅱb),对化合物结构进行鉴定。使用高效液相色谱法测定化合物纯度,色谱柱:Thermo Sycronis C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);保护柱:Agilent Zorbax C18 填料(12.5 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A:纯化水,流动相 B:甲醇;A∶B = 10∶90;检测波长:265 nm;柱温:30 ℃。

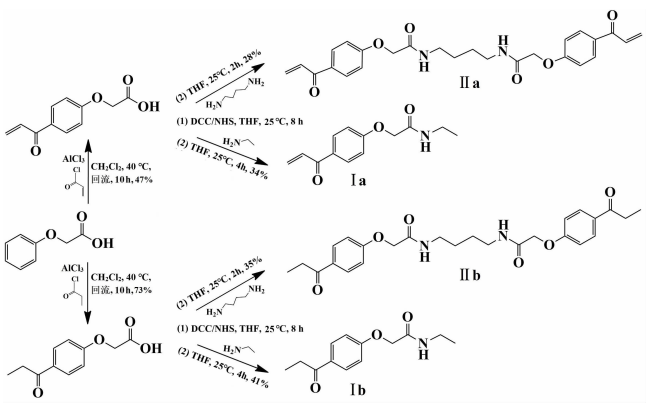


图 1 苯氧乙酸系列化合物的合成路线

1.2.1 化合物Ⅰa、Ⅰb 的合成 将丙烯酰基苯氧乙酸(0.70 g, 3.3 mmol)和 NHS(0.40 g, 3.4 mmol)溶于四氢呋喃(70 mL),冰浴下滴加完含有 DCC(0.75 g, 3.5 mmol)的四氢呋喃(10 mL)后室温搅拌过夜,滤去不溶物后缓慢鼓入过量的干燥乙胺气体(乙胺水溶液加热,过氢氧化钠干燥管),反应 4 h 后真空旋干溶剂得白色固体。用 30 mL 二氯甲烷溶解后依次用 5%碳酸氢钠溶液(2 次)、0.5 mol/L 盐酸溶液(2 次)和饱和食盐水洗涤,真空浓缩后得粗品 0.56 g。用硅胶柱(乙酸乙酯∶石油醚 = 3∶2)纯化,得到浅黄色固体Ⅰa 0.31 g(34%),纯度为 94.5%。用对丙酰基苯氧乙酸为原料同法可得化合物Ⅰb(41%),纯度为 98.6%。化合物Ⅰa:^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8.19 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 16.9, 10.4 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.31 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 5.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.15 (p, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ 188.17, 166.86, 161.83, 132.18, 130.95, 130.16, 129.58, 114.94, 67.04, 33.35, 14.79. HRMS[M+H]$^+$: $C_{13}H_{16}NO_3$,理论分子量为 234.1130, 实测分子量为 234.1133。化合物Ⅰb: ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8.15 (s, 1H), 7.99-7.83(m, 2H), 7.10-6.88 (m, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.95 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.02 (dt, *J* = 10.2, 7.2 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*6) δ 199.29, 167.18, 161.76, 130.43, 114.96, 67.34, 33.63, 31.26, 15.18, 8.69. HRMS[M+H]$^+$: $C_{13}H_{18}NO_3$, 理论分子量为 236.1287, 实测分子量为 236.1282。

1.2.2 化合物Ⅱa、Ⅱb 的合成 将对丙烯酰基苯氧乙酸(0.70 g, 3.3 mmol)和 NHS(0.40 g, 3.4 mmol)溶于四氢呋喃(10 mL),冰浴下滴加完含有 DCC(0.70 g, 3.4 mmol)的四氢呋喃(10 mL)后室温搅拌过夜,滤去不溶物后室温下慢速逐滴加入已用四氢呋喃(5 mL)稀释的 1,4-丁二胺(0.16 g, 1.8 mmol),期间用薄层色谱板监测。室温反应完后,旋转蒸发除去溶剂,得浅黄色固体。用二氯甲烷溶解此固体后依次用 5%碳酸氢钠水溶液、0.5 mol/L 盐酸水溶液和饱和食盐水反复洗涤,无水硫酸钠干燥,减压旋干,得到白色固体用硅胶柱(乙酸乙酯∶三乙胺 = 20∶1)纯化即得Ⅱa 0.43 g(28%),纯度为 95.5%。用对丙酰基苯氧乙酸为原料同法可得化合物Ⅱb(35%),纯度为 97.2%。化合物Ⅱa:^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8.18 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H), 7.41 (dd, *J* = 16.9, 10.4 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H), 6.31 (d, *J* = 16.9 Hz, 2H), 5.92 (s, 2H), 4.59 (s, 4H), 3.13 (q, *J* = 5.7 Hz, 4H), 1.42 (s, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ 187.96, 166.87, 161.76, 132.10, 130.83, 130.05, 129.39, 114.82, 66.95, 38.02, 26.50. HRMS [M+H]$^+$: $C_{26}H_{29}N_2O_6$, 理论分子量为 465.2026, 实测分子量为 465.2014。化合物Ⅱb:^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8.15 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.00-7.83 (m, 4H), 7.11-6.94 (m, 4H), 4.53 (s, 4H), 3.09 (d, *J* = 5.7 Hz, 4H), 2.95 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H);

13C NMR (100 MHz, DMSO-*d*6) δ 199.30, 167.38, 161.77, 130.43, 114.96, 67.32, 38.43, 31.27, 26.95, 8.70. HRMS $[M+H]^+$: $C_{26}H_{33}N_2O_6$, 理论分子量为 469.233 9, 实测分子量为 469.234 5。

1.3 紫外光谱法表征苯氧乙酸系列化合物对 GSTM 的抑制能力

1.3.1 GSTM 的表达纯化及表征 根据之前的方法[15]进行 GSTM 的制备。用 Bradford 法[19]测定蛋白含量。按照 Habig 法[20]连续跟踪 GSTM 催化显色底物 CDNB 和 GSH 反应测定活性。初速度法[21]测定 GSTM 对底物 CDNB 和 GSH 的米氏常数(Michaelis constant, K_m)。

1.3.2 监测化合物Ⅰa、Ⅱa 与 GSH 反应生成产物过程 在 1.0 mL 反应体系中,加入终浓度为 60.0 μmol/L 的化合物Ⅱa 和 150.0 μmol/L 的 GSH,每间隔 1.5 min 扫描 200~500 nm 波长范围内的吸收光谱变化。在最大吸收峰 272 nm 波长下监测 60.0 μmol/L 的Ⅱa 与 150.0 μmol/L 的 GSH 分别同 0、50.0、100.0 nmol/L 3 个浓度 GSTM 作用下吸光度随时间的变化。用Ⅰa 与过量 GSH 反应,经处理后得到 GSH 加合物,利用高分辨质谱验证 GSH 加合物结构。

1.3.3 初速度法表征苯氧乙酸类系列化合物对 GSTM 的半数抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC_{50}) 直接测定苯氧乙酸类系列化合物 IC_{50}:在 1.2 mL 的反应体系中,先加入终浓度为 4.0 nmol/L GSTM、1.0 mmol/L CDNB 和不同浓度梯度的苯氧乙酸类化合物到反应体系中,然后加入终浓度为 1.0 mmol/L GSH 启动反应,测定在 340 nm 波长下紫外光吸收随时间的变化曲线。苯氧乙酸类系列化合物与 GSH 预孵育测定产物 IC_{50}:在 1.2 mL 的反应体系中,将终浓度为 4.0 nmol/L GSTM、1.0 mmol/L GSH 和不同浓度梯度的苯氧乙酸类化合物孵育 10 min,再加入终浓度为 1.0 mmol/L CDNB 到反应体系中,测定 340 nm 波长下紫外光吸收随时间的变化曲线。设不加抑制剂为对照组。根据初速度确定抑制率,公式为 IC_{50}=(对照组-处理组)/(对照组)×100%。

1.3.4 测定苯氧乙酸类系列化合物对 GSTM 的抑制常数(inhibition constant, K_i) 初速度法测定在不同浓度抑制剂下 GSTM 对底物 GSH、CDNB 的表观 K_m。配制不同梯度浓度苯氧乙酸类系列化合物的 N,N-二甲基亚酰胺储备液,为减少有机试剂的干扰,应使 N,N-二甲基亚酰胺在反应体系的终浓度<2%。在 25 ℃条件下将 GSTM、GSH 和苯氧乙酸类化合物孵育 10 min 后加入 CDNB 启动反应,延迟 15 s 后每 10 秒间隔记录监测 340 nm 吸收变化,共记录 2 min。固定 GSH 浓度为 1.0 mmol/L,变化 CDNB 浓度(变化范围是此抑制剂浓度作用下表观 $K_{m(CDNB)}$ 的 0.4~2.5 倍),双倒数作图得到在不同抑制剂浓度下的 K_m 和最大反应速率 V_m。以抑制剂浓度为横坐标,分别以 $1/K_m$、$1/V_m$ 为纵坐标作图,计算截距与斜率的比值即得抑制剂对 GSTM 的 $K_{ik(CDNB)}$ 和 $K_{iv(CDNB)}$;固定 CDNB 浓度为 1.0 mmol/L,变化 GSH 浓度(变化范围是此抑制剂浓度作用下表观 $K_{m(GSH)}$ 的 0.4~2.5 倍),双倒数作图后,利用上述方法判断抑制剂相对于底物 GSH 对 GSTM 的 $K_{ik(GSH)}$ 和 $K_{iv(GSH)}$。通过 K_{ik} 与 K_{iv} 比值可判断抑制剂对 GSTM 的抑制类型[22]:当比值<2 时判定为反竞争性抑制剂,当比值介于 2~5 时判定为混合性抑制剂,当比值>5 时判定为竞争性或非竞争性抑制剂。

1.4 荧光光谱法表征目标化合物对 GSTM 的亲和力

采用 Agilent 荧光分光光度计扫描发射光谱图:在 3.0 mL pH 7.4 浓度为 100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中,固定 GSTM 浓度为 0.5 μmol/L,加入不同浓度梯度的Ⅱa,280 nm 激发,扫描发射光谱图,观察荧光信号的变化,其中激发和发射狭缝/带宽设置为 10 nm,光电倍增管的电压调节到“中”;在同样狭缝、电压条件下,280 nm 激发测定 340 nm 荧光信号:固定 GSTM 浓度为 0.5 μmol/L,分别加入不同浓度梯度的苯氧乙酸类系列化合物,测定各化合物的荧光滴定曲线,按静态荧光猝灭模型公式 Eq.1 计算化合物与 GSTM 的结合常数 K_a 及解离常数(dissociation constant, K_d)。Eq.1 推导如下:GST 酶(E)与抑制剂(I)之间形成不发光的基态配合物可表示为 $E+I \rightleftharpoons EI$;配合物的结合常数 $K_a=[EI]/[E][I]$,解离常数 $K_d=1/K_a$;荧光强度和抑制剂浓度之间的关系:$[E]_0=[E]+[EI]$,$(F_0-F)/F=([E]_0-[E])/[E]=[EI]/[E]=K_a[I]$,Eq.1 即 $F_0/F=1+K_a[I]$。

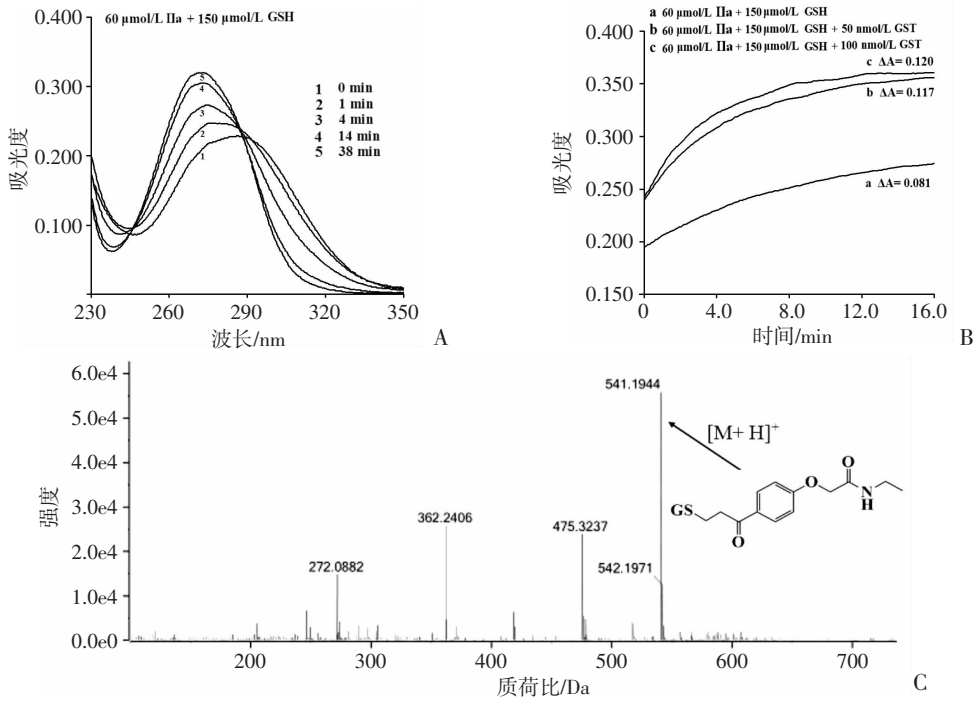
1.5 数据处理方法

每个实验重复≥2 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;采用 GraphPad Prism 8.0 非配对 t 检验行统计学差异分析,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 苯氧乙酸类化合物与 GSH 反应形成加合物的过程监测

苯氧乙酸类化合物Ⅰa、Ⅱa 均含有烯酮式结构,可自发地与 GSH 的巯基发生麦克尔加成反应。通过紫外分光光度法可监测Ⅱa 与 GSH 形成加合物的反应



A:化合物Ⅱa(60 μmol/L)与 GSH(150 μmol/L)反应光谱变化图;B:在 272 nm 波长下监测化合物Ⅱa(60 μmol/L) 与 GSH(150 μmol/L)被梯度浓度 GSTM(0、50、100 nmol/L)催化的吸收变化;C:化合物Ⅰa 与 GSH 形成加合物的高分辨质谱图

图 2 化合物Ⅰa、Ⅱa 与 GSH 形成加合物的反应监测

过程。Ⅱa 在 286 nm 处有最大吸收峰,随着反应的进行,最大吸收峰蓝移至 272 nm 处,吸收增大(图 2A)。虽然Ⅱa 与 GSH 可自发反应,但 GSTM 可催化该反应。272 nm 波长下自发反应 16 min 内的吸光度变化为,0.081 在 100 nmol/L GSTM 催化下吸光度变化达到 0.120(图 2B)。然而 Ⅱb 与 GSH 孵育,未监测到吸收光谱的变化。同样,Ⅰa 也可与 GSH 发生反应,最终形成 GSH 加合物,HRMS[M+H]$^+$: $C_{23}H_{33}N_4O_9S$, 理论分子量为 541.196 8,实测分子量为 541.194 4 (图 2C)。

2.2 苯氧乙酸类系列化合物对 GSTM 的 IC_{50} 值

在 GSTM 催化下,不同浓度化合物Ⅰa、Ⅱa 与过量 GSH 10 min 内可基本反应完全(图 2B)。如图 3 所示,经 GSH 预孵育前后,测得Ⅱa 的 IC_{50} 值分别为(0.21±0.03) μmol/L、(0.10±0.02) μmol/L,结果存在明显的差异(P<0.05),即初步说明 GSH 预孵育后生成的产物有较强的抑制作用,所以Ⅰa 和Ⅱa 是潜抑制剂。但因 GSH 也是 GSTM 的底物,可与Ⅰa 和Ⅱa 形成加合物,所以未孵育直接测定Ⅰa、Ⅱa 自身对 GSTM 的 IC_{50} 值会被产物所干扰。为消除干扰,我们测定了不含烯酮式结构的Ⅰb、Ⅱb 对 GSTM 的 IC_{50} 值,结果如表 1 所示,在可溶解范围内Ⅰb、Ⅱb 对 GSTM 无明显抑制作用。

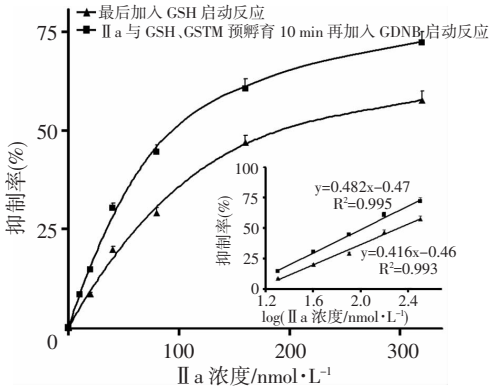


图 3 化合物Ⅱa 与 GSH 孵育前后对 GSTM 半抑制浓度比较

2.3 苯氧乙酸类系列化合物对 GSTM 的 K_i 值

由于Ⅰa、Ⅱa 是具有烯醇式结构的潜抑制剂,与 GSH 形成加合物之后才具有更强抑制作用,因此在测定抑制常数时采用了将Ⅰa、Ⅱa 与 GSH、GSTM 预孵育 10 min 再加入 CDNB 启动反应的方法。如图 4 所示,固定 CDNB 浓度、改变 GSH 浓度时,Ⅰa 对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为(19.9±1.6) μmol/L 和超过 150 μmol/L,K_{iv}/K_{ik} 值>5,相对于 GSH 为竞争性抑制剂[22];Ⅱa 对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为(0.063±0.005) μmol/L 和(0.028±0.002) μmol/L,K_{ik}/K_{iv} 值介于 2~5,相对于 GSH 为混合性抑制剂。固定 GSH 浓度、改变 CDNB 浓

度时,Ⅰa 对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为(9.1±0.7) μmol/L 和超过 100 μmol/L,K_{iv}/K_{ik} 值>5,相对 CDNB 为竞争性抑制剂;Ⅱa 对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为(0.079±0.006) μmol/L 和超过 0.5 μmol/L,K_{iv}/K_{ik} 值>5,相对 CDNB 为竞争性抑制剂。可见Ⅱa 较Ⅰa 的 K_i 值低(P<0.05)。同法测定了Ⅰb、Ⅱb 对 GSTM 的抑制常数,在化合物可溶解范围内无法测出。

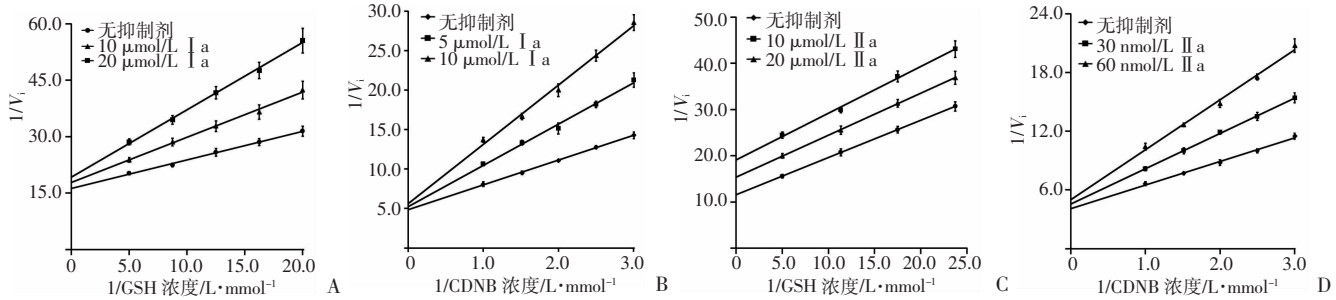
2.4　苯氧乙酸类系列化合物对 GSTM 的 K_d 值

当化合物结合到 GSTM 的活性位点,可静态猝灭 GSTM 中色氨酸在 340 nm 荧光[11]。如图 5A 所示,在 280 nm 激发下,随着Ⅱa 浓度增加,GSTM 的荧光响应曲线逐渐下降。为考察各化合物对 GSTM 的荧光猝灭能力,我们检测了Ⅰa、Ⅰb、Ⅱa、Ⅱb、CDNB、GSH 对 GSTM 在 340 nm 的猝灭作用。根据结果(图 5B)可知,除 GSH 无猝灭作用外,其他疏水化合物均能不同程度猝灭 GSTM 的荧光。对各化合物的荧光滴定曲线按静态荧光猝灭模型公式 Eq.1 作图(图 5C),可得各化合物对 GSTM 的解离常数 K_d[23]。计算可知Ⅰa、Ⅰb、Ⅱa、Ⅱb、CDNB 的 K_d 分别为(41.5±1.8) μmol/L、(38.9±1.7) μmol/L、(18.0±0.9) μmol/L、(19.5±1.0) μmol/L、(67.6±2.9) μmol/L。可见Ⅰa 与Ⅰb、Ⅱa 与Ⅱb 之间的 K_d 无显著差异(P>0.05),而Ⅱa 较Ⅰa、Ⅱb 较Ⅰb 的 K_d 低(P<0.05)。

表 1　苯氧乙酸系列化合物对 GSTM 的表征

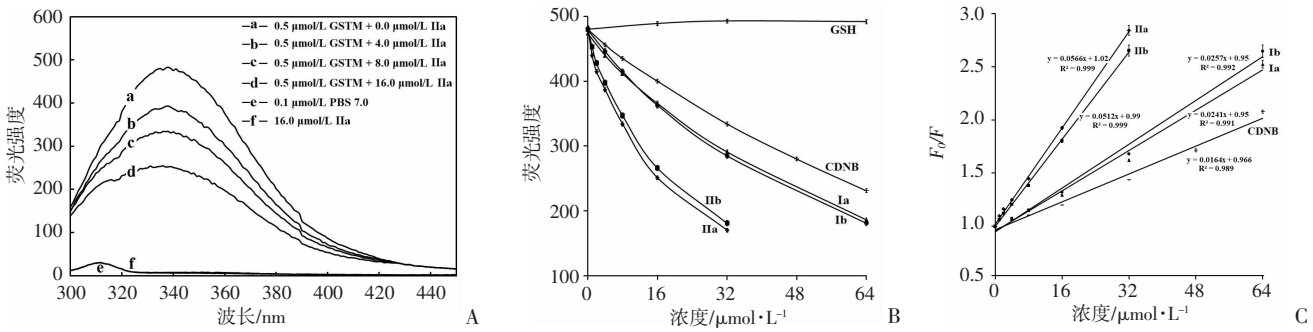
化合物	半数抑制浓度 IC_{50}(μmol/L)		抑制常数 K_i(μmol/L)		解离常数 K_d
	未孵育直接测定	GSH 预孵育	$K_{ik(GSH)}$	$K_{ik(CDNB)}$	(μmol/L)
Ⅰa	161±15	67±6[a]	19.9±1.6	9.1±0.7	41.5±1.8[e]
Ⅱa	0.21±0.03	0.10±0.02[b]	0.063±0.005[c]	0.079±0.006[d]	18.0±0.9[f,g]
Ⅰb	>500	>500	>500	>500	38.9±1.7
Ⅱb	>500	>500	>500	>500	19.5±1.0[h]
CDNB	/	/	/	/	67.6±2.9

a: P<0.05,与Ⅰa 的未孵育直接测定 IC_{50} 值比较; b: P<0.05,与Ⅱa 的未孵育直接测定 IC_{50} 值比较; c: P<0.05,与Ⅰa 的 $K_{ik(GSH)}$ 比较; d: P<0.05,与Ⅰa 的 $K_{ik(CDNB)}$ 比较; e: P>0.05,与Ⅰb 的 K_d 比较; f: P>0.05,与Ⅱb 的 K_d 比较; g: P<0.05,与Ⅰa 的 K_d 比较; h: P<0.05,与Ⅰb 的 K_d 比较



A:固定 CDNB 浓度,测定Ⅰa 相对 GSH 的 K_i;B:固定 GSH 浓度,测定Ⅰa 相对 CDNB 的 K_i;C:固定 CDNB 浓度,测定Ⅱa 相对 GSH 的 K_i;D:固定 GSH 浓度,测定Ⅱa 相对 CDNB 的 K_i

图 4　双倒数作图法测定化合物Ⅰa、Ⅱa 对 GSTM 的 K_i 值



A:在 280 nm 的激发光下扫描不同浓度梯度的Ⅱa 对 GSTM 的荧光发射光谱图;B:在 280 nm 激发光下滴定各化合物对 GSTM 在 340 nm 发射光的荧光淬灭信号;C:以化合物浓度为横坐标,F_0/F 为纵坐标作图,按 Eq.1 公式计算各化合物的 K_d

图 5　荧光光谱法表征化合物与 GSTM 的亲和力

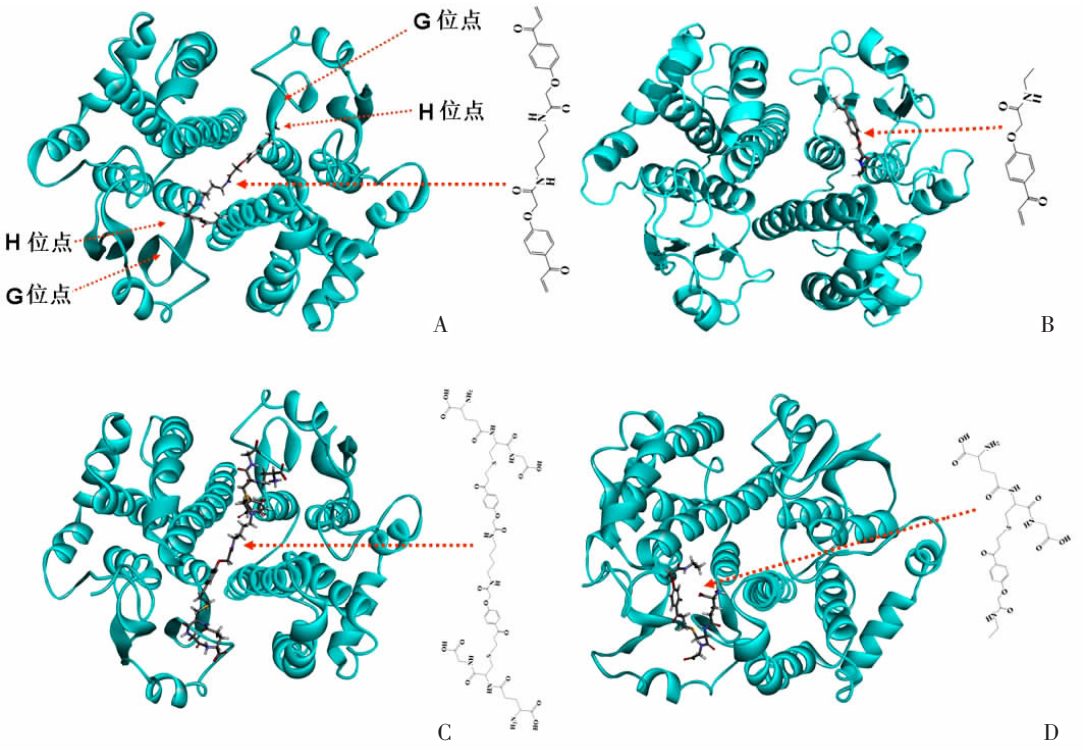
3 讨论

以依他尼酸为先导化合物、以苯氧乙酸为基本母核设计合成了 4 个化合物,主要考察丙烯酮结构对 GSTM 抑制作用的影响,以及单价抑制剂与二价抑制剂对酶抑制能力的差异。Ⅰa、Ⅱa 结构中的 α,β-不饱和酮可与 GSH 自发地发生亲电加成反应,并可被 GSTM 催化。事实上,依他尼酸也可在 GSTM 催化下与 GSH 发生亲电加成反应,但难以自发发生反应[10]。说明经过结构改造后,Ⅰa、Ⅱa 的丙烯酮结构受到的空间位阻较依他尼酸的更低,使得 Ⅰa、Ⅱa 的丙烯酮结构更加活泼。

我们用紫外光谱法分别测定了化合物对 GSTM 的 IC_{50} 值和表观抑制常数。数据显示不同的加样方法对 IC_{50} 值测定结果有显著的影响:将 Ⅰa、Ⅱa 与 GSTM、GSH 预孵后测得的 IC_{50} 值更低,表明 Ⅰa、Ⅱa 为潜抑制剂,与 GSH 形成加合物具有更强的抑制作用;而 Ⅰb、Ⅱb 在可溶解范围内对 GSTM 均无抑制作用,验证了丙烯酮结构是必须官能团。与 GSH 预孵育后 Ⅱa 的 IC_{50} 值较 Ⅰa 的 IC_{50} 值低约 670 倍,且表观抑制常数低三个数量级。所以二价抑制剂比单价抑制剂的抑制作用更强。在 GST 的活性中心,G 位点对 GSH 亲和力通常比 H 位点对其常见的疏水底物的亲和力更强,使潜抑制剂生成产物亲和力大大提高;二价抑制剂可结合两个活性位点使亲和力进一步提高。

为了进一步解释 Ⅰa 和 Ⅱa 的亲和力和抑制作用差异,参照文献[24],采用 Discovery Studio 2019 将靶蛋白 GSTM(PDB:1XW5)分别对 Ⅰa 和 Ⅱa 进行对接发现,Ⅱa 容易达到经二聚体狭缝与两个活性中心的 H 位点的结合状态(图 6A),而 Ⅰa 则在一个亚基的 H 位点但结合取向可变(图 6B)。当生成产物后,可以明显地看到 Ⅰa 和 Ⅱa 都存在 GS 部分与 G 位点的锚定结合,且 Ⅱa 是两个活性中心的结合(图 6C、D)。

由于紫外光谱法表征化合物抑制性能需要依赖底物,而 GSTM 的双底物模式和化合物的产物型抑制特点大大增加了紫外光谱法的表征难度和效率。因此,我们使用了不依赖底物的荧光光谱法对化合物进行表征。结果显示,结构类似的 Ⅰa、Ⅰb 以及 Ⅱa、Ⅱb 表现出对 GSTM 无差异的解离常数;二价的 Ⅱa、Ⅱb 较单价的 Ⅰa、Ⅰb 具有更低的解离常数。说明将丙烯酮结构取代为丙酮结构之后并不影响化合物与 GSTM 的亲和力,而对称的二价结构可以使亲和力明显提高。该方法可不依赖酶底物快速测定化合物对酶的亲和力,为潜抑制剂的亲和力表征提供方法。



A:对接在 GSTM 中的 Ⅱa 的结合模式;B:对接在 GSTM 中的 Ⅰa 的结合模式;C:对接在 GSTM 中的 Ⅱa 与 GSH 加合产物的结合模式;D:对接在 GSTM 中的 Ⅰa 与 GSH 加合产物的结合模式

图 6 Ⅰa、Ⅱa 及其 GSH 加合物与 GSTM 结合模式对比

本研究结果表明,针对 GSTM 的苯氧乙酸类二价潜抑制剂可经与 GSH 生成产物有效提高亲和力。然而该类抑制剂是否较依他尼酸类抑制剂具有更低的细胞毒性还需要进一步实验验证。

参考文献:

[1] AYBEK H, TEMEL Y, AHMEDB M, *et al*. Deciphering of the effect of chemotherapeutic agents on human glutathione S-transferase enzyme and MCF-7 cell line[J]. Protein Pept Lett, 2020, 27(9): 888-894. DOI: 10.2174/0929866527666200413101017.

[2] 刘芳, 宋玉芳, 张学辉, 等. 多药耐药基因表达与上皮性卵巢癌化疗耐药的相关性[J]. 中国医刊, 2021, 56(5): 561-564. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1070.2021.05.028.
LIU F, SONG Y F, ZHANG X H, *et al*. Correlation between multidrug resistance gene expression and chemoresistance in epithelial ovarian cancer[J]. Chin J Med, 2021, 56(5): 561-564. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1070.2021.05.028.

[3] WANG C H, WU H T, CHENG H M, *et al*. Inhibition of glutathione S-transferase M1 by new gabosine analogues is essential for overcoming cisplatin resistance in lung cancer cells[J]. J Med Chem, 2011, 54(24): 8574-8581. DOI: 10.1021/jm201131n.

[4] CARLSTEN C, SAGOO G S, FRODSHAM A J, *et al*. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis[J]. Am J Epidemiol, 2008, 167(7): 759-774. DOI: 10.1093/aje/kwm383.

[5] DI PAOLO V, FULCI C, ROTILI D, *et al*. Characterization of water-soluble esters of nitrobenzoxadiazole-based GSTP1-1 inhibitors for cancer treatment[J]. Biochem Pharmacol, 2020, 178: 114060. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114060.

[6] SINGH R R, REINDL K M. Glutathione S-transferases in cancer[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(5): 701. DOI: 10.3390/antiox10050701.

[7] IERSEL M L, PLOEMEN J P, STRUIK I, *et al*. Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by alpha, beta-unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal[J]. Chem Biol Interact, 1996, 102(2): 117-132. DOI: 10.1016/s0009-2797(96)03739-8.

[8] XIA C, LU J P, XU B T, *et al*. Design and characterization of a labeling reagent for covalent immobilization of glutathione-S-transferase[J]. Nanosci Nanotechnol Lett, 2019, 11(11): 1547-1560. DOI: 10.1166/nnl.2019.3044.

[9] AYNA A, KHOSNAW L, TEMEL Y, *et al*. Antibiotics as inhibitor of glutathione S-transferase: biological evaluation and molecular structure studies[J]. Curr Drug Metab, 2021, 22(4): 308-314. DOI: 10.2174/1389200222666210118102700.

[10] HANSSON J, BERHANE K, CASTRO V M, *et al*. Sensitization of human melanoma cells to the cytotoxic effect of melphalan by the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid[J]. Cancer Res, 1991, 51(1): 94-98.

[11] 黄玲萍, 谢丽霞, 邱钰超, 等. 依他尼酸联合顺铂化疗促肺癌 A549 细胞凋亡的作用及机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(17): 1720-1727. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201701068.
HUANG L P, XIE L X, QIU Y C, *et al*. Ethacrynic acid promotes apoptosis in lung cancer A549 cells when combined with cisplatin chemotherapy[J]. J Third Mil Med Univ, 2017, 39(17): 1720-1727. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201701068.

[12] PLOEMEN J H, VAN OMMEN B, VAN BLADEREN P J. Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate[J]. Biochem Pharmacol, 1990, 40(7): 1631-1635. DOI: 10.1016/0006-2952(90)90465-w.

[13] TARS K, OLIN B, MANNERVIK B. Structural basis for featuring of steroid isomerase activity in alpha class glutathione transferases[J]. J Mol Biol, 2010, 397(1): 332-340. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.01.023.

[14] 杨宪峰, 张灵, 杨晓兰, 等. 融合标签谷胱甘肽 S-转硫酶高亲和配体的设计与筛选[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(9): 791-795. DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.011.
YANG X F, ZHANG L, YANG X L, *et al*. Design and screening of high-affinity ligands for glutathione S-transferase as fusion tag[J]. J Chongqing Med Univ, 2012, 37(9): 791-795. DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.011.

[15] 许榜田, 赵语, 龙友琦, 等. 两种依他尼酸衍生物对人类谷胱甘肽-S-转移酶 Mu 的抑制动力学研究[J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(8): 1144-1150. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002211.
XU B T, ZHAO Y, LONG Y Q, *et al*. A study of the inhibition kinetics of human glutathione-S-transferase Mu by two ethacrynic acid derivatives[J]. J Chongqing Med Univ, 2020, 45(8): 1144-1150. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002211.

[16] 同婷婷, 段昌园, 李欣蓬, 等. 双依他尼酸乙醇胺对谷胱甘肽 S-转硫酶 mu 的选择性抑制作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(1): 406-413. DOI: 10.13417/j.gab.040.000406.
TONG T T, DUAN C Y, LI X P, *et al*. Characterization of aminoethanol di-ethacrynic acid as a selective divalent potent inhibitor of glutathione S-transferase mu[J]. Genom Appl

Biol, 2021, 40(1): 406-413. DOI: 10.13417/j.gab.040.000406.

[17] 刘芳, 杨晓兰, 廖飞. GSTM 潜抑制剂双依他尼酰乙二胺对人耐顺铂卵巢癌细胞 COC1/DDP 的抗肿瘤活性[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(6): 1266-1271. DOI: 10.13417/j.gab.035.001266.
LIU F, YANG X L, LIAO F. Anti-tumor activity of short divalent ethacrynic amide on human ovarian cancer cell line COC_1/DDP[J]. Genom Appl Biol, 2016, 35(6): 1266-1271. DOI: 10.13417/j.gab.035.001266.

[18] HOU J F, LIU F X, WU N, *et al*. Efficient biodegradation of chlorophenols in aqueous phase by magnetically immobilized aniline-degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain[J]. J Nanobiotechnology, 2016, 14: 5. DOI: 10.1186/s12951-016-0158-0.

[19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

[20] HABIG W H, PABST M J, JAKOBY W B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation[J]. J Biol Chem, 1974, 249(22): 7130-7139.

[21] LIAO F, LI J C, KANG G F, *et al*. Measurement of mouse liver glutathione S-transferase activity by the integrated method[J]. J Med Coll PLA, 2003, 18(5): 295-300.

[22] YANG X L, DU Z Y, PU J, *et al*. Classification of difference between inhibition constants of an inhibitor to facilitate identifying the inhibition type[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2013, 28(1): 205-213. DOI: 10.3109/147563 66.2011.645240.

[23] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2006: 68-69.
XU J G, WANG Z B. Fluorescence analysis[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2006: 68-69.

[24] XU B T, TONG T T, WANG X, *et al*. Short divalent ethacrynic amides as pro-inhibitors of glutathione S-transferase isozyme Mu and potent sensitisers of cisplatin-resistant ovarian cancers[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2022, 37(1): 728-742. DOI: 10.1080/14756366.2022.2038591.

(收稿:2022-04-19;修回:2022-05-20)
(编辑 张艺霖)

(上接 1825 页)

[19] LIU Z P, XU S W, HUANG X Y, *et al*. Cryptotanshinone, an orally bioactive herbal compound from Danshen, attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: role of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(23): 5661-5675. DOI: 10.1111/bph.13068.

[20] LO S H, HSU C T, NIU H S, *et al*. Cryptotanshinone inhibits STAT3 signaling to alleviate cardiac fibrosis in type 1-like diabetic rats[J]. Phytother Res, 2017, 31(4): 638-646. DOI: 10.1002/ptr.5777.

[21] MA Y Z, LI H, YUE Z B, *et al*. Cryptotanshinone attenuates cardiac fibrosis *via* downregulation of COX-2, NOX-2, and NOX-4[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 64(1): 28-37. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000086.

[22] GOODMANR B, PUGIN J, LEE J S, *et al*. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(6): 523-535. DOI: 10.1016/S1359-6101(03)00059-5.

[23] ORFANOSS E, MAVROMMATI I, KOROVESI I, *et al*. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill[J]. Intens Care Med, 2004, 30(9): 1702-1714. DOI: 10.1007/s00134-004-2370-x.

[24] WIENER-KRONISHJ P, ALBERTINE K H, MATTHAY M A. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin[J]. J Clin Invest, 1991, 88(3): 864-875. DOI: 10.1172/JCI115388.

[25] HASHIMOTO N, PHANS H, IMAIZUMI K, *et al*. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(2): 161-172. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0031OC

[26] SOHALS S. Endothelial to mesenchymal transition (End-MT): an active process in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)?[J]. Respir Res, 2016, 17: 20. DOI: 10.1186/s12931-016-0337-4.

(收稿:2022-03-17;修回:2022-04-26)
(编辑 栾 嘉)