

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002211

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

许榜田¹, 赵 语¹, 龙友琦¹, 白书连², 杨晓兰²

(1. 重庆医科大学附属大学城医院药学部, 重庆 401331;

2. 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, 重庆 400016)

【摘要】目的:考察所设计依他尼酰乙胺、双依他尼酰丁二胺及对应产物对人类谷胱甘肽-S-转移酶 Mu (glutathione-S-transferase Mu, GSTM) 的抑制动力学。**方法:**重组表达 GSTM, 以 2,4-二硝基氯苯 (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) 和还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 为底物, 跟踪酶反应过程的紫外吸收变化, 测定酶活性。比较 GSTM 存在下依他尼酰乙胺、双依他尼酰丁二胺与 GSH 孵育前后对酶的半抑制浓度 (IC_{50})、抑制类型。**结果:**依他尼酰乙胺、双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的 IC_{50} 分别为 $(44.0 \pm 2.2) \mu\text{mol/L}$ 、 $(0.090 \pm 0.012) \mu\text{mol/L}$ ($n=3$), 两者相对 GSH 是反竞争性抑制剂、相对 CDNB 是竞争性抑制剂。与酶和 GSH 孵育原位生成产物后, 对 GSTM 的 IC_{50} 分别为 $(8.9 \pm 0.1) \mu\text{mol/L}$ 和 $(0.006 \pm 0.001) \mu\text{mol/L}$ ($n=3$); 依他尼酰乙胺与 GSH 孵育后相对 GSH 是竞争性抑制剂、相对 CDNB 是混合型抑制剂; 双依他尼酰丁二胺与 GSH 孵育后相对 GSH 和 CDNB 均为混合型抑制剂。两种依他尼酸衍生物与 GSH 孵育后产物 IC_{50} 明显降低, 双依他尼酰丁二胺及其 GSH 孵育产物 IC_{50} 较依他尼酰乙胺及其产物均明显降低。**结论:**依他尼酰乙胺、双依他尼酰丁二胺是潜抑制剂, 其产物对 GSTM 的抑制作用更强, 抑制类型发生明显改变; 双依他尼酰丁二胺及其产物较依他尼酰乙胺抑制作用更强。

【关键词】人类谷胱甘肽-S-转移酶 Mu; 依他尼酸衍生物; 潜抑制剂; 抑制动力学**【中图分类号】**Q555*.8**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-01-25

A study of the inhibition kinetics of human glutathione-S-transferase Mu by two ethacrynic acid derivatives

Xu Bangtian¹, Zhao Yu¹, Long Youqi¹, Bai Shulian², Yang Xiaolan²

(1. Pharmaceutical Department, University-Town Hospital of Chongqing Medical University;

2. Key Laboratory of Medical Laboratory Diagnostics of the Education Ministry,

College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the inhibition kinetics of human glutathione-S-transferase Mu (GSTM) by ethacrynic ethylamide, bis-ethacrynic succinimide, and their corresponding products. **Methods:** GSTM was recombinantly expressed, and enzyme activity was determined by tracking changes in ultraviolet absorption using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione (GSH) as substrates. Half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) and inhibition types were compared between ethacrynic ethylamide, bis-ethacrynic succinimide, and their corresponding products before and after incubation with GSH in the presence of GSTM. **Results:** IC_{50} values of ethacrynic ethylamide and bis-ethacrynic succinimide against GSTM were $(44.0 \pm 2.2) \mu\text{mol/L}$ and $(0.090 \pm 0.012) \mu\text{mol/L}$, respectively. They were uncompetitive inhibitors against GSH but competitive inhibitors against CDNB. After incubation with the enzyme and GSH, the IC_{50} values of these two agents against GSTM were $(8.9 \pm 0.1) \mu\text{mol/L}$ and $(0.006 \pm 0.001) \mu\text{mol/L}$, respectively ($n=3$). Ethacrynic ethylamide turned to be a competitive inhibitor against GSH but a mixed competitive inhibitor against CDNB after incubation with GSH, while bis-ethacrynic succinimide was a mixed competitive inhibitor against both GSH and CDNB after incubation. Both ethacrynic acid derivatives had significantly decreased IC_{50} values after incubation with GSH.

作者介绍: 许榜田, Email: xubangtian@cqmu.edu.cn,

研究方向: 药物筛选生物技术。

通信作者: 杨晓兰, Email: xiaolanyang666@cqmu.edu.cn。**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 31570862)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190604.1540.016.html>

(2019-06-05)

Furthermore, bis-ethacrynic succinimide and its GSH incubation products showed a reduction in IC_{50} value compared with ethacrynic ethylamide and its products. **Conclusion:** Ethacrynic ethylamide and bis-ethacrynic succinimide are pro-inhibitors, and their products have significant reduction in the IC_{50} values against GSTM after incubation with GSH. Meanwhile, their inhibitory types also change significantly. Bis-ethacrynic succinimide along with its products have significantly enhanced inhibition potencies compared with ethacrynic ethylamide.

[Key words] human glutathione-S-transferase Mu; ethacrynic acid derivatives; pro-inhibitor; inhibition kinetics

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferases, GST; EC 2.5.1.18)是一类可以催化还原型谷胱甘肽和亲电配体加合的Ⅱ相催化酶,广泛分布于各种生物体内细胞中。人胞质 GST 有多种同工酶,分为 π 、 μ 、 α 、 ω 、 θ 、 ζ 六大类。当 GST 活性增强时,化疗药物的代谢和排泄也随之增加,而相关凋亡信号途径被抑制,从而引发耐药性^[1]。GST 已成为肿瘤耐药逆转药物的作用靶点,其抑制剂能有效逆转肿瘤耐药性^[2-4]。GSTM 为同源二聚体,有 2 个轴对称的活性中心,每个活性中心有 2 个亚位点,分别结合还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH, 称 G 位点)和疏水底物(称 H 位点)^[5]。只结合 GST 亚基一个活性中心的抑制剂称为单价抑制剂,能同时结合 GST 二聚体 2 个活性中心的抑制剂称为二价抑制剂。为提高抑制剂亲和力由此增强逆转肿瘤耐药作用,设计二价抑制剂是有效策略^[6]。

依他尼酸是经典 GST 抑制剂,可结合 GST 亚基的 H 位点。依他尼酸的 α 、 β -不饱和酮结构可与 GSH 发生 Michael 加成反应,生成的 GSH 加合物可同时结合 GST 亚基的 G 位点和 H 位点,其抑制效力比依他尼酸本身更强,故依他尼酸是 GST 的单价潜抑制剂。用丁二胺将依他尼酸连接成对称双依他尼酸丁二胺,可与 2 分子 GSH 发生 Michael 加成,生成的加合物可结合到 GST 二聚体双活性中心,故双依他尼酸丁二胺是 GST 的二价潜抑制剂^[7]。经血吸虫 GST 表征,依他尼酰丁二胺原位生成产物,抑制常数从 $\mu\text{mol/L}$ 提高到 nmol/L ^[8-9]。目前此类抑制剂对 GSTM 的抑制动力学还鲜见报道。本文设计单价抑制剂依他尼酰乙胺及二价抑制剂双依他尼酰丁二胺,分别考察此类抑制剂及其产物对 GSTM 的抑制动力学常数及抑制类型,为后续抑制剂设计和筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

还原型谷胱甘肽(GSH)、卡那抗生素、蛋白分子量参考标准、二硫苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)、5,5'-Dithio bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)、 β -巯基乙醇购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司,2,4-二硝基氯苯(CDNB)购自 ICN 公司,Glutathione Sepharose 4B 购自 GE 公司,GSTM (GI:4504175)的基因合成及载体构建由中美泰和生物技术(北京)有限公司完成,依他尼酸购自 Sigma-Aldrich 公司,BL21(DE3)感受态细胞、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海生工,S-(2-chloro-4-nitrophenyl)-glutathione (GS-DNB)按本课题组方法合成与纯化^[10],其余试剂均为国产分析纯。

1.2 GSTM 的重组表达与纯化

将插入 GSTM 编码基因的 pET29a 质粒转入 *Escherichia coli* BL 21(DE3)感受态细胞,挑选阳性克隆菌株在 LB/Kana 培养基中 37 °C 培养至平台期,以 1:1 000 的稀释比例接种于 LB/Kana 培养基,在 37 °C 扩大培养至菌液 OD_{600} 接近 0.6,加入 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L,16 °C 低温诱导表达 20 h,4 °C 下 10 000 r/min 离心 20 min 收集菌体。菌体用预冷到 4 °C 的 10 mmol/L pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液洗涤,每 100 mL 新鲜菌液所得湿菌用 15 mL 细胞裂解液(10 mmol/L pH 7.8 Tris-HCl,1.0 mmol/L EDTA,1.0 mmol/L PMSF,1% β -巯基乙醇)重悬,用超声破碎细胞 30 min,4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min 收集裂解上清液。用 GSH-Sepharose 4B 柱亲和纯化,预平衡用 10 mmol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液,洗脱剂选用相同缓冲液加 5 mmol/L GS-DNB。收集浓缩透析后,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-PAGE, SDS-PAGE)检测 GSTM 纯度,并初步估测亚基分子量。

1.3 GSTM 活性及对 GSH、CDNB 的 K_m 测定

Bradford 方法测定蛋白含量。25 °C 测定酶活性。反应体系为 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5,含 0.50 mmol/L DETA-PA)1.20 mL,用 CDNB、GSH 终浓度为 1.0 mmol/L,加入 50 μL

适当稀释的 GSTM 启动反应,延迟 25 s 后每 10 s 间隔记录监测 340 nm 吸收变化,共记录 2 min。产物消光系数为 $10(\text{mmol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,每分钟生成 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 产物酶量为一个单位(U)。

初速度法测定 GSTM 对底物 GSH、CDNB 的 K_m 。固定反应体系 CDBN 的浓度时,GSH 终浓度为 $0.033 \sim 0.2 \text{ mmol/L}$;固定反应体系 GSH 的浓度时,CDNB 浓度为 $0.25 \sim 2.20 \text{ mmol/L}$;双倒数作图分别得 GSH 对 GSTM 和 CDBN 对 GSTM 的 K_m 。25 °C 条件下重复测定 3 次。

1.4 依他尼酸衍生物的合成与鉴定

按照图 1 路线合成依他尼酰乙胺、双依他尼酰丁二胺、依他尼酸 GSH 加合物,并对化合物结构进行鉴定。

1.4.1 依他尼酰乙胺的合成与鉴定 将依他尼酸 (100 mg , 0.33 mmol/L)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS, 40 mg , 0.35 mmol/L)和二环己基碳二亚胺(DCC, 71 mg , 0.35 mmol/L)置于四氢呋喃(THF, 30 mL),室温反应 10 h,过滤、减压蒸去四氢呋喃得白色固体,再用二氯甲烷(30 mL)复溶,冰浴下通入乙胺气体,室温下反应 0.5 h,反应液用 5% 碳酸氢钠溶液($2 \times$)、 0.5 mol/L 盐酸溶液($2 \times$)和水($1 \times$)洗涤,无水硫酸钠干燥、过滤、减压蒸去二氯甲烷得白色固体(98 mg , 90%)。HRMS: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{NO}_3$, 计算分子量为 330.206 4,实测分子量为 330.195 8。

1.4.2 双依他尼酰丁二胺的合成与鉴定 按照本课题组合成方法^[7]即得。HRMS: $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_6$, 计算分子量为 657.090 7,实测分子量为 657.091 4。

1.4.3 依他尼酸 GSH 加合物的合成 参照文献方法^[12]即得。HRMS: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$, 计算分子量为 610.350 1,实测分子量为

为 610.346 6。

1.5 GSTM 催化依他尼酰乙胺与 GSH 反应生成产物过程的监测

在 1.0 mL 反应体系中,加入终浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 的依他尼酰乙胺和 $110 \mu\text{mol/L}$ 的 GSH,25 °C 条件下分别监测不含酶与加入 100 nmol/L GSTM 时,每间隔 1.5 min 扫描 240~340 nm 波长范围内反应体系的吸收光谱变化。

1.6 依他尼酸衍生物与 GSH 孵育前后对 GSTM 的半抑制浓度

不加 GSH 预孵育测定依他尼酸衍生物 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 CDBN 和不同浓度梯度的依他尼酸衍生物到反应体系中,然后加入终浓度为 1.0 mmol/L GSH 启动反应,测定在 340 nm 波长下紫外吸收随时间的变化曲线;依他尼酸衍生物与 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 和不同浓度梯度的依他尼酸衍生物孵育 10 min,再加入终浓度为 1.0 mmol/L CDBN 到反应体系中,测定 340 nm 波长下紫外吸收随时间的变化曲线。设不加抑制剂为对照组。测定不同浓度抑制剂下初速度对无抑制剂时初速度的比值为剩余活性比例,其与 1.0 之差为抑制率。对数浓度线性拟合抑制率为 35%~65%,计算抑制剂的 IC_{50} 。25 °C 条件下重复测定 3 次,取其均值。

1.7 测定依他尼酰乙胺与双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的抑制类型

配制不同梯度浓度依他尼酸衍生物的 N,N-二甲基亚酰胺(DMF)储备液,为减少有机试剂的干扰,应使 DMF 在反应体系的终浓度低于 2%。不加 GSH 预孵育测定依他尼酸衍

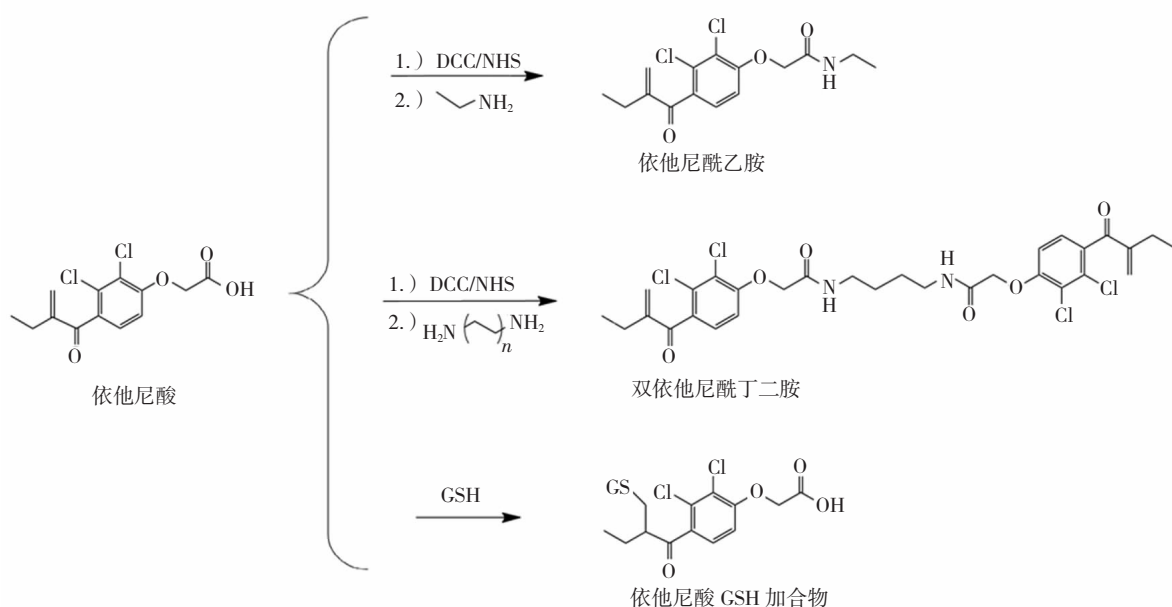


图 1 依他尼酸衍生物的合成

生物的抑制类型;25℃条件下首先将 GSH、CDNB 和依他尼酸衍生物加入 1.2 mL 体系中,最后加入 GSTM 启动反应,延迟 15 s 后每 10 s 间隔记录监测 340 nm 吸收变化,共记录 2 min,此法测定的是依他尼酸衍生物未形成或极少形成 GSH 加合物时的抑制常数;依他尼酸衍生物与 GSH 预孵育所得产物抑制类型;25℃条件下将 GST、GSH 和依他尼酸衍生物孵育 10 min 后加入 CDBN 启动反应,延迟 15 s 后每 10 s 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 CDBN 浓度(变化范围是此抑制剂浓度作用下表观 $K_{m(CDBN)}$ 的 0.4~2.5 倍),双倒数作图得到在不同抑制剂浓度下的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_m 。以抑制剂浓度为横坐标, $1/K_m$ 为纵坐标作图,计算截距与斜率的比值即得 $K_{ik(CDBN)}$;以抑制剂浓度为横坐标, $1/V_m$ 为纵坐标作图,计算截距与斜率的比值即得 $K_{iv(CDBN)}$ 。用本课题组建立的方法^[13]判断抑制剂相对于底物 CDBN 对 GSTM 的抑制类型。

固定 CDBN 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 的抑制类型。

1.8 统计学处理

用双倒数分析法确定米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)且对应回归分析相关系数都大于 0.99;分析表观动力学参数随抑制剂浓度变化确定抑制常数(K_i)时,至少有 4 个表观动力学参数供分析且回归分析的相关系数都大于 0.99。结果为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),采用 GraphPad Prism 8.0 非配对 t 检验进行统计学差异分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 GSTM 的表达和纯化、比活及对 GSH、CDNB 的 K_m 测定

大肠杆菌 BL21(DE3)用带有 GSTM 基因片段的载体转化并培养后,细胞裂解液中 GSTM 含量超过 1 400 mg/L。粗酶比活超过 60 U/mg,纯化后的比活最高达到 290 U/mg,SDS-PAGE 结果显示得到了纯度较高的 GSTM(图 2A)。SDS-PAGE 检测到蛋白质的分子量约为 26 kD,与 GSTM 的实际分子量为 25.7 kD 相一致。GSTM 米氏常数测定结果如图 2B 所示。

2.2 依他尼酰乙胺与 GSH 反应的光谱变化

依他尼酰乙胺在 267 nm 处有最大吸收峰,随着加合物的生成,吸收峰蓝移,吸收值随之增大(图 3)。反应体系不含酶时,依他尼酰乙胺与 GSH 混合物的吸收光谱在 1 h 的监测范围内基本无变化,当反应体系含有 GSTM,反应体系的吸收光谱发生了明显变化。

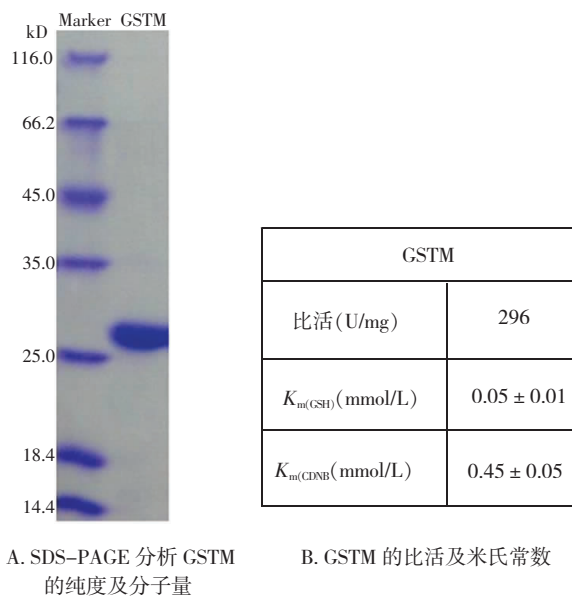


图 2 GSTM 的 SDS-PAGE 电泳分析及活性与 K_m 的测定

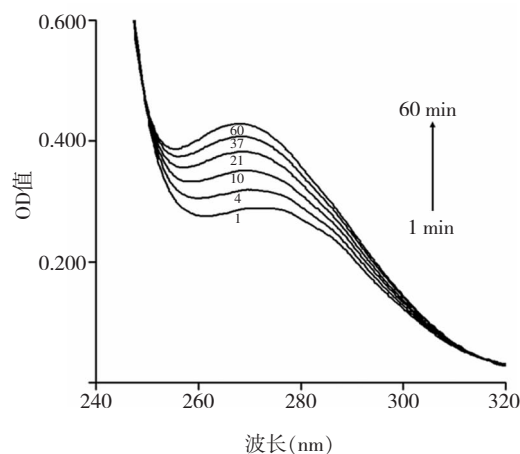


图 3 紫外光谱法跟踪 GSTM 催化依他尼酰乙胺与 GSH 反应过程

2.3 依他尼酸及其衍生物对 GSTM 半抑制浓度测定结果

从表 1 的结果可知,经 GSH 预孵育前后,测得依他尼酸、依他尼酰乙胺、双依他尼酰丁二胺的 IC_{50} 值存在统计学差异 ($P=0.000$)。

表 1 各化合物对 GSTM 的 IC_{50} (μmol/L, $n=3$)

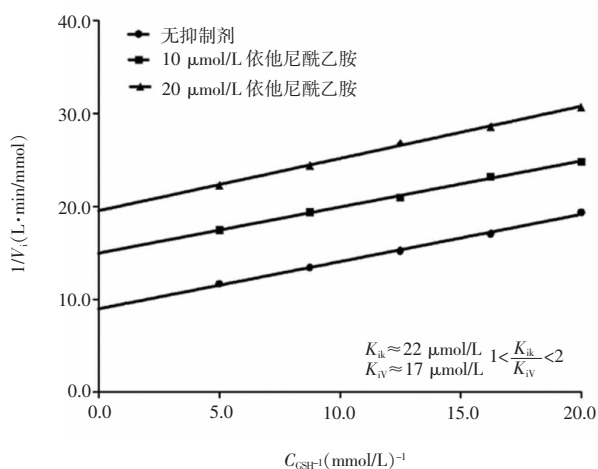
化合物	GSTM 浓度为 4.0 nmol/L	
	未孵育直接测定	GSH 预孵育测定
依他尼酸	48.0 ± 1.5	6.2 ± 0.3^a
依他尼酰乙胺	44.0 ± 2.2	8.9 ± 0.1^a
依他尼酸 GSH 加合物	9.5 ± 0.5	9.8 ± 0.2^b
双依他尼酰丁二胺	0.090 ± 0.012	0.006 ± 0.001^a

注:a,与未孵育组比较, $P=0.000$;b,与未孵育组比较, $P=0.389$

2.4 依他尼酰乙胺对 GSTM 的抑制类型

如图 4 所示,依他尼酰乙胺未加 GSH 孵育直接测定。固定 CDNB 浓度、变化 GSH 浓度时依他尼酰乙胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 22 $\mu\text{mol/L}$ 和 17 $\mu\text{mol/L}$, K_{ik}/K_{iv} 值为 1~2, 相对于 GSH 表现出反竞争抑制剂性质^[14]; 固定 GSH 浓度、变化 CDNB 浓度时依他尼酰乙胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 8.1 $\mu\text{mol/L}$ 和超过 100 $\mu\text{mol/L}$, K_{ik}/K_{iv} 大于 5, 相对于 CDNB 表现出竞争抑制剂性质。

如图 5 所示,孵育 10 min 后,固定 CDNB 浓度、变化 GSH 浓度时依他尼酰乙胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 11 $\mu\text{mol/L}$, K_{ik}/K_{iv} 值大于 5, 相对于 GSH 表现出竞争抑制剂性质; 固定 GSH 浓度、变化 CDNB 浓度时依他尼酰乙胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 4.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 11 $\mu\text{mol/L}$ (K_{ik}), K_{ik}/K_{iv} 值为 2~5, 相对于 CDNB 表现出混合型竞争抑制剂性质。



2.5 双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的抑制类型

如图 6 所示,双依他尼酰丁二胺未加 GSH 孵育直接测定。固定 CDNB 浓度、变化 GSH 浓度时双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 55 nmol/L 和 55 nmol/L, K_{ik}/K_{iv} 值等于 1, 相对于 GSH 表现出反竞争抑制剂性质; 固定 GSH 浓度、变化 CDNB 浓度时双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 60 nmol/L 和超过 1 $\mu\text{mol/L}$, K_{ik}/K_{iv} 值大于 5, 相对于 CDNB 表现出竞争抑制剂性质。

如图 7 所示,孵育 10 min 后,固定 CDNB 浓度、变化 GSH 浓度时双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 3.1 nmol/L 和 8.2 nmol/L, K_{iv}/K_{ik} 值为 2~5, 相对于 GSH 表现出混合型竞争抑制剂性质; 固定 GSH 浓度、变化 CDNB 浓度时双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的 K_{ik} 和 K_{iv} 分别为 5.0 nmol/L 和 10.5 nmol/L, K_{ik}/K_{iv} 值为 2~5, 相对于 CDNB 同样表现出混合型竞争抑制剂性质。

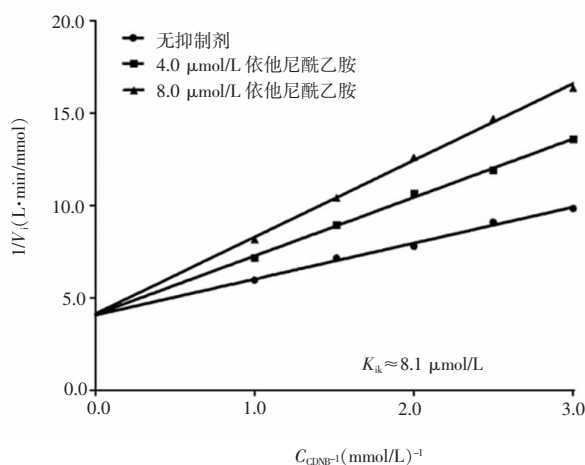


图 4 孵育前,依他尼酰乙胺对 GSTM 的抑制类型

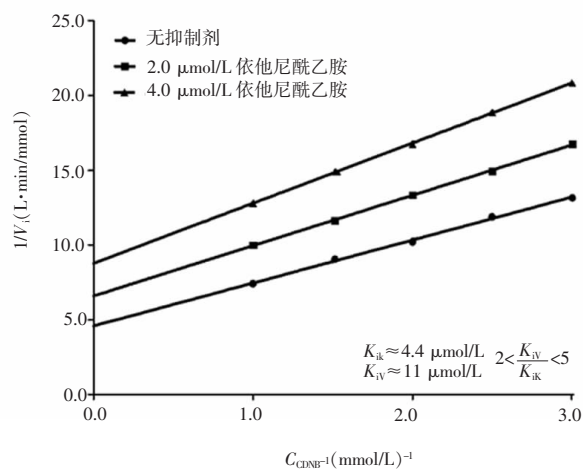
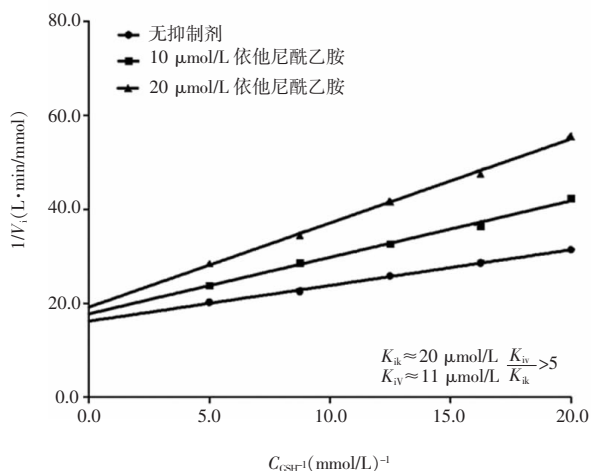


图 5 孵育 10 min 后,依他尼酰乙胺对 GSTM 的抑制类型

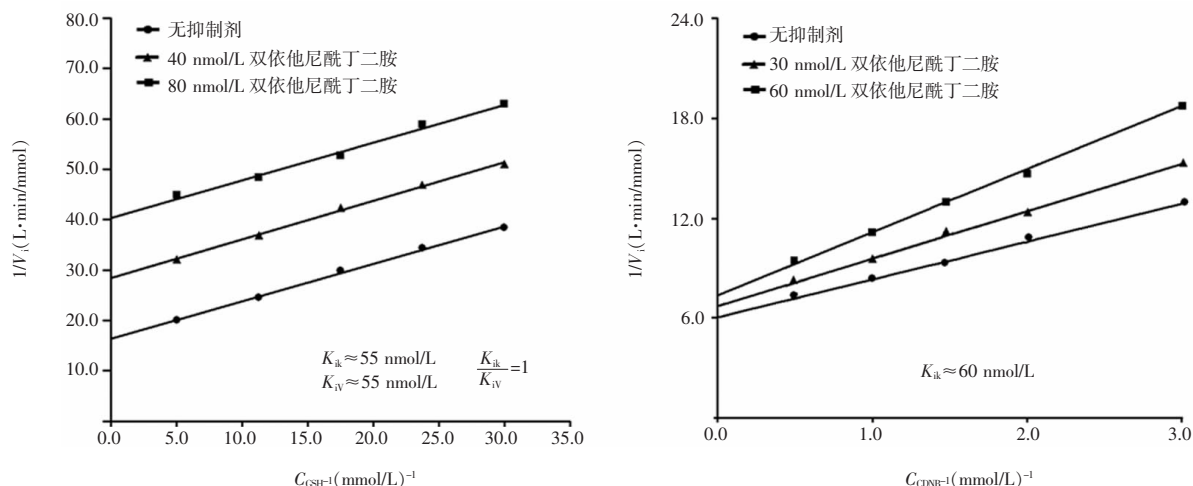


图6 孵育前,双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的抑制类型

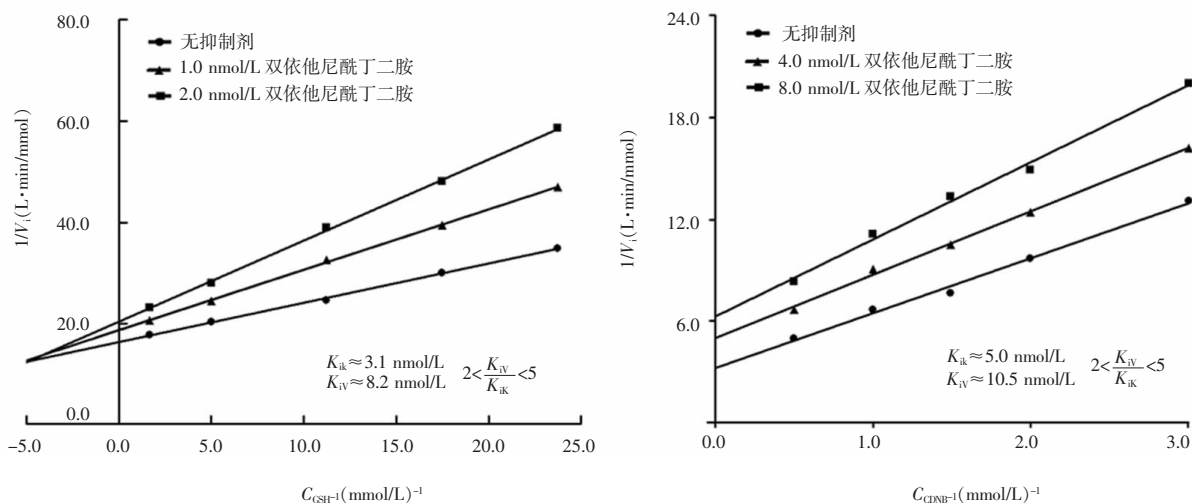


图7 孵育 10 min 后,双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的抑制类型

3 讨论

依他尼酰乙胺结构中的 α, β -不饱和酮可与 GSH 在 GSTM 催化作用下发生亲电加成反应,通过紫外吸收光谱变化监测此反应过程。在低浓度 GSH 相对于依他尼酰乙胺稍微过量的条件下,最初 10 min 的吸收变化值超过 50%。其次,依他尼酰衍生物的 IC_{50} 数据显示:①GSH 预孵育测定组(孵育组)测得依他尼酰的 IC_{50} 值为 $(6.2 \pm 0.3) \mu\text{mol/L}$,甚至低于依他尼酰 GSH 加合物的 IC_{50} 值,表明在 GSH 绝对过量的条件下,10 min 的孵育时间可使绝大多数依他尼酰形成加合物;②孵育组测得的 IC_{50} 值明显低

于未孵育直接测定组(未孵育组),可见形成的加合物比本身的抑制作用更强;③依他尼酰 GSH 加合物作为产物型抑制剂,2 种方法测得对 GSTM 的 IC_{50} 值为 $9.5 \sim 9.8 \mu\text{mol/L}$,差异无统计学意义($P > 0.05$);④未孵育组和孵育组测得双依他尼酰丁二胺对 GSTM 的 IC_{50} 值较依他尼酰乙胺低 3 个数量级,说明二价抑制剂对 GSTM 显示出更强的抑制能力。

从抑制类型分析,依他尼酰乙胺在形成 GSH 加合物之前作为潜抑制剂与 CDNB 竞争 GSTM 的 H 位点。因此,固定 GSH 浓度时依他尼酰乙胺相对于 CDNB 是竞争性抑制剂。反竞争性抑制是指抑制剂只与酶-底物复合物结合,而不与游离酶结合的一种酶促反应抑制作用^[14]。固定 CDNB 浓度时依他尼

酰乙胺相对于 GSH 的 K_{ik}/K_{iv} 值为 1~2, 属于反竞争性抑制剂。可能因为 H 位点体积较大, 并未完全占据 H 位点的依他尼酰乙胺可与占据了 G 位点的 GSH 结合, 形成酶-底物复合物。当孵育 10 min 后, 绝大部分依他尼酰乙胺形成 GSH 加合物, 此时测得的抑制类型如图 5 所示, 固定 CDNB 浓度时依他尼酰乙胺的 GSH 加合物相对于 GSH 的 K_{ik}/K_{iv} 值大于 5, 属于竞争性抑制剂, 说明 GSH 加合物已完全占据 GSH 位点。固定 GSH 浓度时依他尼酰乙胺相对于 CDNB 的 K_{ik}/K_{iv} 值为 2~5, 属于混合型抑制剂。由于 GST 的 H 位点较大, 当依他尼酰乙胺加合物同时结合 G 位点和 H 位点时, 其 GSH 端会优先占据特异性强的 G 位点, 依他尼酰乙胺部分可能部分结合到 H 位点。因此, 依他尼酰乙胺在形成加合物之后相对于 CDNB 的抑制类型呈现出混合型抑制。双依他尼酰丁二胺作为二价潜抑制剂, 与 GSTM 的 H 位点结合较单价更强, 其产物的 GSH 也很难完全占据二聚体的 2 个 G 位点, 产物抑制类型均为混合型, 亲和力提高了 3 个数量级。但如果延长连接臂, 则可能完全占据二聚体的 2 个 G 位点, 从而改变抑制类型并提高亲和力。

依他尼酸衍生物为底物型抑制剂, 在 GSTM 和 GSH 存在下可原位生成产物, 并增强抑制能力, 同时改变抑制类型, 为进一步研究 GST 抑制剂提供理论基础。GST 的产物型抑制剂虽然有更强的抑制效力, 但其极性大、不易透过细胞膜而限制了它的药用价值。因此, 根据 GST 的结构特点和催化机制设计和开发更强亲和力的潜抑制剂将是今后的重点策略。

参 考 文 献

- [1] Bulus H, Oguztuzun S, Güler Simsek G, et al. Expression of CYP and GST in human normal and colon tumor tissues[J]. Biotech Histochem, 2019, 94(1): 1-9.
- [2] Zou MY, Hu XL, Xu BT, et al. Glutathione S transferase isozyme alpha 1 is predominantly involved in the cisplatin resistance of common types of solid cancer[J]. Oncol Rep, 2019, 41(2): 989-998.
- [3] Alqarni MH, Muharram MM, Labrou NE. Ligand-induced glutathione transferase degradation as a therapeutic modality: investigation of a new metal-mediated affinity cleavage strategy for human GSTP1-1[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 116: 84-90.
- [4] Chen H, Chen FH, Wang XY, et al. Multifunctional Pt(IV) complexes containing a glutathione-S-transferase inhibitor lead to enhancing anticancer activity and preventing metastasis of osteosarcoma cells[J]. Metallomics, 2019, 11(2): 317-326.
- [5] Kinsley N, Sayed Y, Mosebi S, et al. Characterization of the binding of 8-anilinonaphthalene sulfonate to rat class Mu GST M1-1[J]. Biophys Chem, 2008, 137(2): 100-104.
- [6] Maeda DY, Mahajan SS, Atkins WM, et al. Bivalent inhibitors of glutathione S-transferase: the effect of spacer length on isozyme selectivity[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(14): 3780-3783.
- [7] 廖飞, 杨晓兰, 胡小蕾, 等. 双-(对-烷氧基苯丙烯酮)类谷胱甘肽-S-转硫酶潜抑制剂[P]. 中国, 201310591024. 2013-11-22 [2014-03-05].
- [8] 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.
- [9] Xu BT, Tan D, Yang XL, et al. Fluorometric titration assay of affinity of tight-binding nonfluorescent inhibitor of glutathione S-transferase[J]. J Fluoresc, 2015, 25(1): 1-8.
- [10] 张灵, 杨晓兰, 白婧, 等. 测定谷胱甘肽-S-转硫酶动力学参数的变化表征其抑制剂[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(10): 1218-1221.
- [11] Liao F, Li JC, Kang GF, et al. Measurement of mouse liver glutathione S-transferase activity by the integrated method[J]. J Med Coll PLA, 2003, 18(5): 295-300.
- [12] Lo WJ, Chiou YC, Hsu YT, et al. Enzymatic and nonenzymatic synthesis of glutathione conjugates: application to the understanding of a parasite's defense system and alternative to the discovery of potent glutathione S-transferase inhibitors[J]. Bioconjug Chem, 2007, 18(1): 109-120.
- [13] Yang XL, Du ZY, 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.
- [14] Boulton S, Selvaratnam R, Blondeau JP, et al. Mechanism of selective enzyme inhibition through uncompetitive regulation of an allosteric agonist[J]. J Am Chem Soc, 2018, 140(30): 9624-9637.

(责任编辑: 张辉洁)