中国药科大学学报 目次 CONTENTS
1956年创刊 双月刊 2020 03 第51卷

药学前沿

249 靶向cGAS-STING信号通路药物的研究进展 …… 梅家豪/洪　泽/王　琛
260 小分子ERK抑制剂的研究进展 …… 梁停停/王文杰/郝思远/何光超/徐云根
270 基于黑磷的药物递送系统在肿瘤诊疗中的研究进展 …… 杨慧珍/牟伟伟/刘永军/张　娜
277 LncRNA调控肝脏疾病中信号转导通路的研究进展 …… 刘　丽/张倩文/农　程/张　曦/徐小婷/Mohammed Ismail/肖　莉/江振洲/张陆勇/孙丽新

论　文

287 作用于polo-box结构域的拟肽类polo样激酶1抑制剂的设计、合成及其生物活性 …… 李芝艳/刘　婕/李冰艳/江　程
295 黄绵马酸AB的合成 …… 石培琪/蓝晓茹/林铮华/陈创发/黎旭彬/叶连宝
299 阿奇霉素口服微球的制备及其评价 …… 苏日娜/樊万君/张自强/何淑旺/姚　静
305 SPE-UPLC-MS/MS同时检测污水中多种滥用药物及其代谢物 …… 王婧媛/侯臣之/花镇东/张婷婷/苏梦翔/徐　慧/王优美/狄　斌
313 色谱-质谱联用技术鉴定盐酸咪达唑仑的有关物质 …… 金　瑞/闫若凝/陆宇婷/宋　敏/杭太俊
327 银杏叶提取物对4种口服抗凝药抗凝活性的影响 …… 刘志双/郑玉粉/孙红娜/于　锋
333 β-榄香烯对血管内皮细胞功能紊乱和血管平滑肌细胞异常增殖的影响 …… 段兰兰/董　菁/范香成/朱俊艺/张逸凡/韩吉春/尚　靖
340 断裂内含肽C片段在大肠埃希菌表达系统中酶解稳定性的改良 …… 陈　浩/曹　津/张　静/朱建伟/陈俊升
349 PD-L1疫苗中引入不同免疫原性氨基酸对T细胞亚群分化的影响 …… 陈红梅/康彦良/刘　利/姚文兵/田　浤

综　述

357 构象限制策略在药物设计中的应用 …… 吴国丽/卢晓林/许晋芳
368 蛋白质组学在糖尿病及其并发症中的应用 …… 陶颖君/吴　洁/刘　畅
374 环状RNA与2型糖尿病关系及其临床应用 …… 穆金铭/刘　悦/张方方/金　亮

信　息

本刊讯

本刊副主编孔令义教授及编委郝海平教授受邀参加江苏省科学技术奖励大会接受颁奖(294)
《中国药科大学学报》再次入选中国科学引文数据库(CSCD)核心库(312)
本刊副主编孔令义教授喜获第二届全国创新争先奖(373)

校园信息

中国药科大学10位专家入选国家药品监督管理局药品审评中心第一批外聘专家名单(348)

【期刊基本参数】 CN 32-1157/R*1956*b*A4*130*zh*P*40.00*2000*16*2020-06
责任编辑：顾 凯　陈 玲　邹 栩　　绘 图：巢静妍　　英文审校：史志祥

(Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao)
JOURNAL OF CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY
Volume 51 June 2020 03
ISSN 1001-5948

CONTENTS

Forward Pharmaceutical Sciences

249 Advances of drugs in targeting cGAS-STING signaling pathway ····· *MEI Jiahao/HONG Ze/WANG Chen*

260 Research progress of ERK small molecule inhibitors ····· *LIANG Tingting/WANG Wenjie/HAO Siyuan/HE Guangchao/XU Yungen*

270 Research progress of drug delivery system based on black phosphorus in tumor diagnosis and treatment ····· *YANG Huizhen/MU Weiwei/LIU Yongjun/ZHANG Na*

277 Research progress of lncRNA regulating signal transduction pathway in liver diseases ····· *LIU Li/ZHANG Qianwen/NONG Cheng/ZHANG Xi/XU Xiaoting/Ismail Mohammed/XIAO Li/JIANG Zhenzhou/ZHANG Luyong/SUN Lixin*

Original Articles

287 Design, synthesis and evaluation of peptidomimetics targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1 ····· *LI Zhiyan/LIU Jie/LI Bingyan/JIANG Cheng*

295 Synthesis of flavaspidic acid AB ····· *SHI Peiqi/LAN Xiaoru/LIN Zhenghua/CHEN Chuangfa/LI Xubin/YE Lianbao*

299 Preparation and evaluation of azithromycin-loaded microspheres for oral administration ····· *SU Rina/FAN Wanjun/ZHANG Ziqiang/HE Shuwang/YAO Jing*

305 Simultaneous determination of illicit drugs and their metabolites in wastewater by SPE-UPLC-MS/MS ····· *WANG Jingyuan/HOU Chenzhi/HUA Zhendong/ZHANG Tingting/SU Mengxiang/XU Hui/WANG Youmei/DI Bin*

313 Identification of related substances of midazolam hydrochloride by LC-MS ····· *JIN Rui/YAN Ruoning/LU Yuting/SONG Min/HANG Taijun*

327 Effect of *Ginkgo biloba* extract on anticoagulation of 4 new oral anticoagulants ····· *LIU Zhishuang/ZHENG Yufen/SUN Hongna/YU Feng*

333 β-Elemene improves endothelial cells dysfunction, and abnormal proliferation and migration of vascular smooth muscle cells ····· *DUAN Lanlan/DONG Jing/FAN Xiangcheng/ZHU Junyi/ZHANG Yifan/HAN Jichun/SHANG Jing*

340 Improving proteolytic stability of *Npu* DnaE C-fragment in *Escherichia coli* expression system ····· *CHEN Hao/CAO Jin/ZHANG Jing/ZHU Jianwei/CHEN Junsheng*

349 Effects of different immunogenic amino acids in PD-L1 vaccine on the differentiation of T cell subsets ····· *CHEN Hongmei/KANG Yanliang/LIU Li/YAO Wenbing/TIAN Hong*

Reviews

357 Application of a conformational restriction strategy in drug design ····· *WU Guoli/LU Xiaolin/XU Jinfang*

368 Application of proteomics in diabetes and its complications ····· *TAO Yingjun/WU Jie/LIU Chang*

374 Relationship between circular RNA and type 2 diabetes and its clinical application ····· *MU Jinming/LIU Yue/ZHANG Fangfang/JIN Liang*

Edited by GU Kai, CHEN Ling and ZOU Xu

·药学前沿·

靶向cGAS-STING信号通路药物的研究进展

梅家豪,洪 泽,王 琛*

(中国药科大学生命科学与技术学院 中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室,南京 210009)

摘 要 病原微生物的入侵和细胞受损导致细胞质中DNA异常聚集,环化核苷酸合成酶(cGAS)通过识别细胞质中的DNA,催化生成第二信使2′,3′-cGAMP,将信号传递给下游干扰素基因刺激因子(STING),诱导转录因子IRF3和NF-κB入核,表达和分泌Ⅰ型干扰素等炎症因子,进而激活机体固有免疫和适应性免疫反应。cGAS-STING信号通路调控紊乱将导致病原体感染,以及肿瘤和自身免疫疾病等多种疾病发生和发展,因此靶向cGAS和STING蛋白进行的药物开发具有十分重要的临床价值。本文讨论cGAS-STING信号通路的最新研究进展以及其在不同疾病中发挥的功能,并总结目前已报道的调节cGAS和STING的小分子化合物,为后续相关的药物研发提供理论参考。

关键词 cGAS;STING;小分子化合物;固有免疫;药物研发;进展

中图分类号 R392;R914.2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0249-11

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200301

引用本文 梅家豪,洪泽,王琛.靶向cGAS-STING信号通路药物的研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(3):249-259.

Cite this article as: MEI Jiahao, HONG Ze, WANG Chen. Advances of drugs in targeting cGAS-STING signaling pathway[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 249-259.

Advances of drugs in targeting cGAS-STING signaling pathway

MEI Jiahao, HONG Ze, WANG Chen*

State Key Laboratory of Natural Medicines, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Invasion of pathogenic microorganisms and cell damage lead to abnormal accumulation of DNA in the cytoplasm. Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) catalyzes the generation of second messenger 2′, 3′-cGAMP by recognizing DNA in the cytoplasm, transmitting signals to downstream stimulators of interferon gene (STING). STING induces the translocation of transcription factors IRF3 and NF-κB into the nucleus to express and secrete inflammatory factors such as type I interferon, which activate the body's innate and adaptive immune responses. Many studies have indicated that disturbance of cGAS-STING pathway regulation leads to the occurrence and development of various diseases such as microbial infection, tumor and autoimmune diseases. Therefore, the development of drugs targeting cGAS and STING proteins is of great clinical value. This paper reviews the latest research progress of cGAS-STING pathway and its roles in different diseases, and summarizes the small-molecule compounds that have been reported to regulate cGAS and STING, in order to provide theoretical reference for future cGAS-STING pathway-related drug discovery.

Key words cGAS; STING; small-molecule compounds; innate immunity; drug discovery; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81672029)

收稿日期 2019-11-24 *通信作者 Tel: 025-86185395 E-mail: cwang1971@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81672029)

固有免疫系统是人体免疫系统的第一道防线,可以迅速识别外源病原体入侵,并且诱导巨噬细胞和自然杀伤细胞对病原体进行吞噬和降解,同时释放大量干扰素和炎症因子,促进树突状细胞对抗原的递呈作用,进而激活适应性免疫,形成长期的免疫记忆[1]。在固有免疫系统中,机体能通过细胞上存在的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),比如Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs),RIG-I样受体(RIG-I-like receptors, RLRs),NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs),DNA感受器等,特异性识别微生物表达的病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),比如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),单链核糖核苷酸(single strand ribonucleic acid, ssRNA),双链脱氧核糖核酸(double strand deoxyribonucleic acid, dsDNA)等,调控下游细胞因子的表达和释放[1]。

环化核苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)就是一种位于细胞质中的dsDNA识别受体,和下游主要调节蛋白干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)介导了细胞质DNA引起的固有免疫反应。DNA-cGAS-STING信号通路的激活促进细胞内Ⅰ型干扰素(interferons, IFNs)与肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor, TNF-α)和白介素6(interleukin 6, IL-6)等炎症因子的表达和分泌[2]。越来越多的研究表明,cGAS-STING信号通路在病原体感染、肿瘤和自身免疫疾病等疾病中充当重要角色。本文将对近年来cGAS-STING信号通路的最新研究进展和靶向cGAS和STING蛋白的激动剂和抑制剂开发进行综述,为后续研究提供理论参考。

1 cGAS-STING信号通路

人源cGAS由522个氨基酸组成,相对分子质量大小为60 kD,位于N末端的130-155 aa为非保守序列,功能研究尚不明确,而155-522 aa构成了cGAS的C末端核酸转移酶结构域,含有一个位于中心的催化区域和分散在两侧的阳离子表面区域[3]。cGAS通过上述区域与双链DNA螺旋中的脱氧核糖磷酸骨架以2:2的形式结合成多聚体。此外,cGAS上的锌指区域通过离子键进一步稳定其与DNA的结合[4]。DNA的结合能诱导cGAS核酸转移酶催化区域的结构重排,进而以ATP和GTP为底物催化形成2′-5′和3′-5′环状GAMP分子(cyclic GMP-AMP),即2′,3′-cGAMP(图1-A)[3]。值得注意的是cGAS对DNA的识别并不依赖于

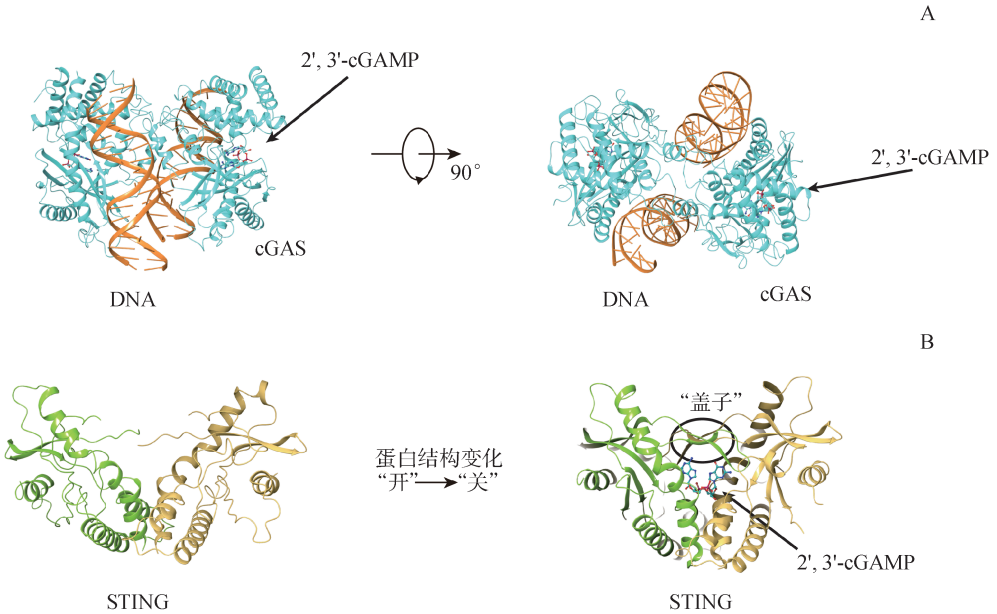


图1 环化核苷酸合成酶(cGAS)和干扰素基因刺激因子(STING)的蛋白结构

A: cGAS-dsDNA-2′,3′-cGAMP复合物结构(PDB code: 4LEZ); B: 左边为静息状态下STING C末端结构域(CTD区域)的蛋白结构(PDB code: 4EMU),右边是STING结合2′,3′-cGAMP的蛋白结构(PDB code: 4KSY),结合2′,3′-cGAMP后,STING CTD区域发生构象变化,形成特殊的"盖子"结构

DNA 序列的特异性，长链 DNA（>45 bp）能更高效地激活 cGAS 酶活，且病原体入侵、线粒体受损或基因组不稳定性导致的细胞质中 DNA 聚集都能导致 cGAS 激活[5]。

2′，3′-cGAMP 在与下游受体蛋白 STING 结合后完成信号的传递[6]。人源 STING 蛋白由 379 个氨基酸组成，包含 N 端 4 次跨膜区（N terminal transmembrane domain，NTD，1-137 aa），环化核苷酸结合区域（cyclic dinucleotides binding domain，CBD，138-340 aa）和 C 末端尾巴（C terminal tail，CTT，341-379 aa）[7]。静息状态下 STING 蛋白以同源二聚体形式存在，两个分子的 NTD 相互交错将蛋白锚定在内质网膜内，CBD 区域在细胞质中形成“V”形口袋用于识别 2′，3′-cGAMP。2′，3′-cGAMP 的结合诱导 STING 蛋白的空间构象由“V 形”向“U”形口袋转变，且口袋顶部的开口处形成帽子结构促进 STING 二聚体形成四聚体和多聚复合物（图 1-B），多聚化的 STING 蛋白脱离内质网向高尔基体转移并在此过程中以其 CTT 区域招募 TANK 结合激酶（TANK-binding kinase，TBK1），TBK1 在与 STING 多聚体结合后发生自磷酸化（172 位丝氨酸发生磷酸化，S172），激活其激酶活性后催化 STING 蛋白的磷酸化（366 位丝氨酸发生磷酸化，S366），磷酸化后的 STING 蛋白进一步以其 CTT 区域招募转录因子干扰素调节因子 3（interferon regulatory factors 3，IRF3），促进 IRF3 磷酸化（396 位丝氨酸发生磷酸化，S396）和二聚化入核，激活 Ⅰ 型 IFNs 相关基因的表达[8-9]。同时 STING 将信号传给肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6（TNF receptor associated factor 6，TRAF6），激活经典核因子 κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）信号通路，诱导 TNF-α 和 IL-6 等炎症因子释放[2]。与 2′，3′-cGAMP 类似，细菌的代谢产物环鸟苷二磷酸（cyclic diguanylate monophosphate，c-di-GMP）和环腺苷二磷酸（cyclic diadenylate monophosphate，c-di-AMP）分子也能结合到 STING 的 CBD 区域，诱导信号通路的激活[10]。cGAS-STING 信号通路的信号传递过程见图 2。

2　cGAS-STING 信号通路紊乱与疾病

在机体的抗病毒、抗细菌方面，cGAS-STING 信号通路发挥着重要作用。但是细菌和病毒已经进化出一系列逃逸机制，抑制了固有免疫信号通路的激活。Su 等[11]发现，2 型人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus-2，HIV-2）的毒力蛋白 X（viral protein X，Vpx）可以和 STING 结合，选择性抑制 cGAS-STING 信号通路介导的下游经典 NF-κB 信号通路，减少 TNF-α 和 IL-6 等炎症因子释放。Aguirre 等[12]发现登革热病毒的非结构蛋白 2B（non-structural protein 2B，NS2B）可以靶向并引起 cGAS 溶酶体降解，使其不能识别感染过程中泄露的线粒体 DNA，抑制了 Ⅰ 型 IFNs 表达和释放。正是因为 cGAS-STING 信号通路在抗病原微生物中可以发挥重要作用，所以开发靶向 STING 的免疫佐剂已逐渐成为研究热点。

cGAS-STING 信号通路通过促进 Ⅰ 型 IFNs，TNF-α 和 IL-6 等炎症因子表达，一方面能诱导细胞产生大量干扰素刺激基因（interferon-stimulated genes，ISGs），而另一方面能促进树突细胞向 T 细胞呈递抗原，加强抗肿瘤免疫[13]。但是肿瘤细胞能从多个层面抑制 cGAS-STING 信号通路从而逃避免疫监察。通过生物信息学研究发现，在肾癌、乳腺癌、肺癌、肝癌等多种人肿瘤细胞系中，cGAS 和 STING 的基因通过表观遗传学降低了翻译效率，而且在蛋白水平通常是以不能行使正常功能的突变体形式存在[14]。而且 Wu 等[15]发现肿瘤细胞中人上皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）可以招募 RAC-β 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（RAC-beta serine/threonine-protein kinase，AKT），抑制 STING 信号通路，促进了肿瘤发展。同时也有研究发现如果 NF-κB 信号通路过度激活，炎症反应会参与肿瘤的发生、转移、免疫逃逸以及肿瘤微环境中的血管生成，促进肿瘤的恶化[16]。比如致癌物二羟甲基丁酸（dimethylolbutanoic acid［2，2-bis（hydroxymethyl）butyric acid］，DMBA）会导致表皮角质细胞核 DNA 发生损伤，并使其释放到细胞质，从而激活细胞内的 cGAS-STING 信号，促进皮肤的癌变[17]。还有在肺癌细胞的脑转移模型中，在转移到脑部的肺癌细胞中，细胞质中的 DNA 可以激活 cGAS，而生成的 2′，3′-cGAMP 能通过 Gap Junction 向大脑部的星形胶质细胞转移，进一步激活 cGAS-STING 信号通路，诱导 Ⅰ 型 IFNs 和 TNF-α 等炎症因子表达和释放，而释放的炎症因子会通过旁分泌的方式，

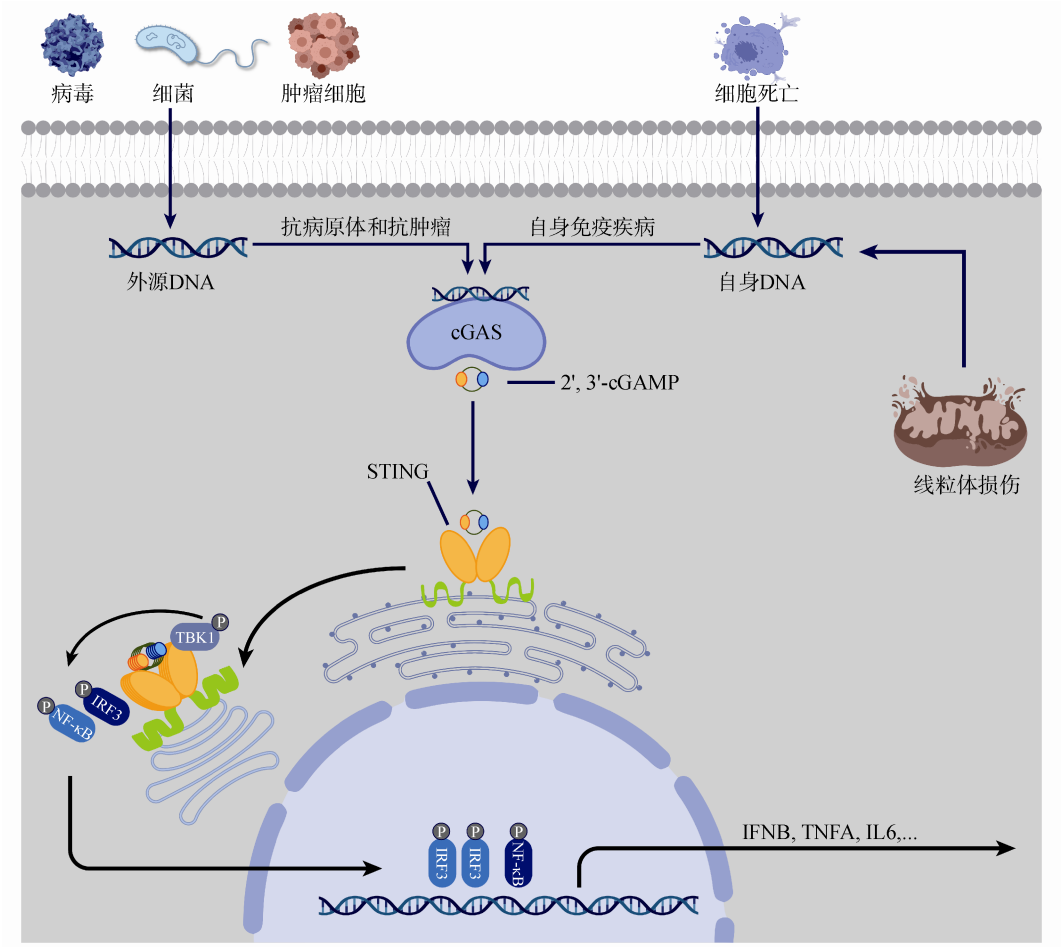


图2 cGAS-STING信号通路示意图

外源DNA和内源DNA激活cGAS,生成第二信使2′,3′-cGAMP。2′,3′-cGAMP与下游受体蛋白STING结合后,引起STING向高尔基体转移,并发生多聚化,招募TBK1,转录因子IRF3和NF-κB,促进IRF3和NF-κB磷酸化和二聚化入核,激活炎症因子相关基因转录。TBK1: TANK结合激酶; IRF3: 干扰素调节因子3; NF-κB: 核因子κB; *IFNB*: 干扰素β基因; *TNFA*: 肿瘤坏死因子α基因; *IL6*: 白介素6基因

作用于肿瘤细胞上,促进了肿瘤细胞的生长[18]。综上,cGAS-STING信号通路在肿瘤发生、发展和转移过程中发挥重要作用,而且在大部分的肿瘤模型中,在细胞和动物水平已经证实cGAS-STING信号通路能够发挥很好的抗肿瘤免疫作用,但是不同肿瘤中STING激动剂的安全性和有效性需要谨慎评价。

机体内STING信号通路的持续异常激活能导致多种自身免疫疾病。第一类是因基因突变导致细胞内核酸代谢酶功能异常,比如*TREX1*, *RNASEH2A*, *SAMHD1*等基因发生突变,促进DNA在细胞质中的聚集,诱导炎症细胞因子的持续释放,导致自身免疫疾病发生[19-21]。此类疾病包括AGS综合征(Aicardi-Goutieres syndrome, AGS)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)等[22]。另一类是由编码STING蛋白发生V147L, N154S和V155M等点突变(第147位缬氨酸突变成亮氨酸,第154位天冬酰胺突变成丝氨酸,第155位缬氨酸突变成甲硫氨酸),导致STING蛋白不依赖上游2′,3′-cGAMP即可持续激活,促进炎症因子持续表达和释放,导致组织损伤[23]。在临床上发现此类患者早发于婴儿时期,主要表现为皮肤红疹和呼吸急促,发热,外周血管病变,肺部炎症和血液中存在自身抗核抗体等,此类疾病也被统一命名为诱发于婴儿时期的STING相关血管病变(STING-associated vasculopathy with onset in infancy, SAVI)。

除了上述疾病外,近年来人们发现越来越多的代谢与炎症疾病与cGAS-STING信号通路调控密切相关。在急性胰腺炎模型中,坏死组织泄露

的外源DNA会诱导胰腺中的巨噬细胞分泌大量炎症因子，造成组织损伤，而这一现象在cGAS和STING基因敲除小鼠中均有改善[24]。在*DNASE2*双等位基因突变的患者中，研究人员发现Ⅰ型IFNs过度表达，有核红细胞数量增加，同样在cGAS和STING基因敲除小鼠中疾病症状得到缓减，也说明了由cGAS-STING介导的Ⅰ型IFNs分泌可能参与了血液生成[25]。在帕金森病小鼠模型中，人们发现由于缺少E3泛素连接酶parkin（E3 ubiquitin-protein ligase parkin，PRKN）和蛋白激酶PINK1（serine/threonine-protein kinase PINK1），受损线粒体中渗露的DNA可能诱导炎症因子释放，而在小鼠模型中将STING蛋白进行基因敲除，可以减慢疾病发展[26]。目前已与cGAS-STING信号通路相关的疾病见表1。

表1　与cGAS-STING信号通路相关的疾病

疾病	疾病模型或临床特征	cGAS/STING KO是否改善疾病	异常DNA来源	参考文献
肿瘤	DMBA诱发的皮肤癌小鼠模型	STING KO改善	细胞核DNA	[17]
肿瘤转移	不同的肿瘤转移小鼠模型	STING KO改善	细胞核DNA	[18,27]
系统性红斑狼疮	患者外周血单核细胞中2′,3′-cGAMP含量上升	NA	NA	[28]
SAVI	患者Ⅰ型IFNs表达量增加	NA	NA	[23]
AGS综合征	*Trex1*$^{-/-}$, *RnaseH2*$^{-/-}$, *Samhd1*$^{-/-}$小鼠模型;患者Ⅰ型IFNs表达量增加	cGAS/STING KO改善	细胞核DNA	[20]
急性胰腺炎	雨蛙素小鼠模型	cGAS/STING KO改善	NA	[24]
帕金森症	*Prkn*$^{-/-}$, *Pink1*$^{-/-}$运动耗竭小鼠模型	STING KO改善	线粒体DNA	[26]
多发性关节炎/新生儿贫血	*Dnase2a*$^{-/-}$小鼠模型;患者*DNASE2A*双等位基因突变	cGAS/STING KO改善	细胞外和细胞核DNA	[19,25,29]
年龄相关性黄斑变性	Alu转录本诱发的RPE死亡	cGAS/STING KO改善	线粒体DNA	[30]
酒精性肝疾病	慢性ALD小鼠模型	STING KO改善	NA	[31]
肝纤维化	CCl_4注射小鼠模型	STING KO改善	NA	[32]
心肌梗死	结扎小鼠模型	cGAS/STING KO改善	细胞外DNA	[33]
非酒精性脂肪肝	MCD小鼠模型, HFD小鼠模型	STING KO改善	线粒体DNA	[34]
败血症	内毒素休克小鼠模型;盲肠结扎穿孔小鼠模型	STING KO改善	NA	[35]

KO: 基因敲除; NA: 无法获取; DMBA: 二羟甲基丁酸; SAVI: 诱发于婴儿时期的STING相关血管病变; RPE: 视网膜色素上皮细胞; ALD: 酒精性肝疾病; MCD: 蛋氨酸胆碱缺乏饮食; HFD: 高脂饮食

3　靶向cGAS-STING信号通路的药物研发

鉴于cGAS-STING信号通路在疾病的发生发展中发挥的重要作用，而且一些免疫佐剂如铝盐、明矾和壳聚糖等能够通过诱导细胞死亡或线粒体损伤导致细胞质内的DNA聚集进而激活cGAS-STING信号通路，促进机体的免疫功能[36-37]，所以靶向cGAS和STING蛋白的药物开发也逐渐成为研究热点。

3.1　cGAS抑制剂

目前，直接靶向cGAS的激动剂还没有报道，虽然一些金属离子（例如锰离子、锌离子等）可以增加cGAS的酶活，但其所需的有效浓度过高且易在体内产生毒性不利于后续药物研发[38]。因此，有关抑制剂的研究较多。Vincent等[39]通过建立体外cGAS酶活检测方法，高通量筛选出的化合物RU. 521能高效且特异性地抑制cGAS酶活。在小鼠单核巨噬细胞（RAW 264. 7）的体外模型中RU. 521对下游Ⅰ型IFNs表达的半数抑制率（IC_{50}）为700 nmol/L。共结晶结构表明，RU. 521通过占据cGAS的催化位点影响2′,3′-cGAMP合成，从而发挥抑制作用。进一步的研究表明RU. 521对鼠源cGAS酶活性的抑制要显著高于人源cGAS蛋白，所以该研究团队用新的实验方法筛选出了高效抑制人源cGAS酶活性的先导化合物G140和G150，且在人原代巨噬细胞体外模型中，G150表现出良好的生物学活性（IC_{50}为600 nmol/L）[40]。此外，Hall等[41]以荧光法检测2′,3′-cGAMP的产生为依据进行高通量筛选，筛选出的化合物PF-06928215与人源cGAS蛋白的亲和力为0. 2 μmol/L，对外源

cGAS酶活的半数抑制率为4.9 μmol/L。但是在细胞实验中,PF-06928215并不能抑制DNA诱导细胞内IFN-β表达,这可能与化合物细胞透膜能力和与血浆蛋白结合能力有关。

除了全新发现的小分子抑制剂,一些已经上市的药物也被发现有类似的功能。An等[42]通过cGAS和DNA的结构数据,进行计算机模拟筛选,发现了一系列抗疟疾药物,比如喹吖因(quinacrine, QC)、羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)等,可以阻碍cGAS和DNA相互结合,抑制Ⅰ型IFNs表达。但是在后续实验中发现,这些化合物可能会插入DNA中,并在10 μmol/L浓度下就会出现明显细胞死亡,所以抗疟疾药物用于抑制Ⅰ型IFNs的安全性还有待考虑。在QC和HCQ的基础上,该研究团队优化一系列抗疟疾药物衍生物并筛选出具有高效生物活性和细胞安全性化合物X6。实验证明,化合物X6在*Trex1*$^{-/-}$小鼠的骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM)和SLE患者的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中能显著下调ISGs表达[43]。由于没有具体的结构学和药理学数据,利用抗疟疾药物用于治疗自身免疫性疾病的具体机制,有待进一步实验研究。Liu等[44]发现,茶多酚中的表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)可以通过抑制GTP酶激活蛋白1(GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1, G3BP1)蛋白活性,间接抑制cGAS和DNA结合。同一团队的Dai等[45]发现,乙酰水杨酸可以直接乙酰化cGAS,抑制下游Ⅰ型IFNs生成,并且在*Trex1*$^{-/-}$小鼠体内和AGS患者来源的成纤维细胞中都有明显的抑制炎症效果。

综上,现有针对cGAS酶活区域的结构或者cGAS/DNA复合物的结构进行设计筛选的化合物具有较弱的生物活性,所以建立起一个具有高通量、高灵敏度的检测平台,获得更加全面的蛋白质结构数据,将极大促进靶向cGAS的小分子研究进程。而且,越来越多的数据证明,通过影响蛋白质翻译后修饰过程,可以有效调控蛋白质介导的信号转导,所以开发靶向蛋白翻译后修饰的化合物也是未来的研究方向。

3.2 STING激动剂

由于STING信号通路的激活促进下游Ⅰ型IFNs的表达在抗病毒免疫和抗肿瘤免疫中发挥着重要的作用,所以靶向STING蛋白激动剂开发一直是该领域的研究热点。STING激动剂的研究主要集中在环化核苷酸(cyclic dinucleotides, CDNs)类似物的优化和新型小分子激动剂的筛选。CDNs最早在细菌中发现,是由腺嘌呤核糖核苷酸(adenosine monophosphate, AMP)和鸟嘌呤核糖核苷酸(guanosine monophosphate, GMP)通过经典磷酸二脂键连接形成的环化二鸟嘌呤c-di-GMP和环化二腺嘌呤c-di-AMP或者cGAMP。由cGAS催化生成的2′,3′-cGAMP是哺乳动物体内唯一已知的CDNs。相对于3′,3′-cGAMP和其他的CDNs,2′,3′-cGAMP和STING具有更强的亲和力,在解离常数(K_d)方面,比c-di-GMP,3′,2′-cGAMP和3′,3′-cGAMP低99%,比2′,2′-cGAMP低98%[46]。2′,3′-cGAMP以非共价的形式结合到STING二聚体形成的口袋内,诱导STING蛋白的变构激活。天然存在的环化核苷酸化学结构式见图3。

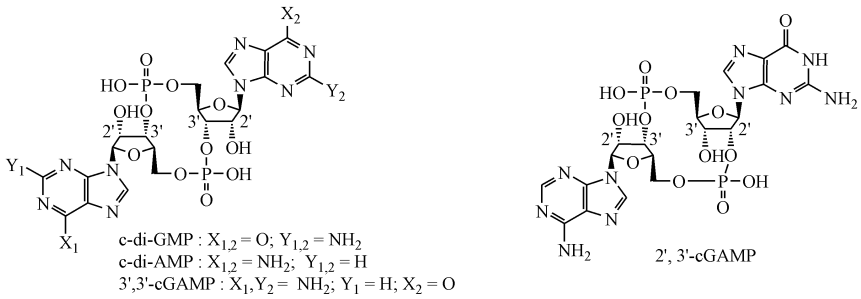


图3 天然环化核苷酸化学结构式

CDNs可以在肿瘤微环境中促进CD8$^+$ T细胞活化,产生持续的杀伤肿瘤效果,是一类十分具有临床潜力的抗肿瘤化合物[47-48]。目前已经有多种CDNs进入临床前或临床研究(表2)。有关STING

激动剂的药物化学性质和生物学效应在其他综述中已详细讨论，在这里不再赘述[49]。

表 2　处于临床前和临床研究阶段的新颖 STING 激动剂

化合物	研发公司	靶点	给药方式	参考文献或临床编号
ADU-S100/MIW815	Aduro Biotech	STING	it	NCT02675439
ADU-S100/WIW815+PDR001	Aduro Biotech	STING + PD-1	it + iv	NCT03172936
MK-1454	Merck	STING	it	NCT03010176
GSK3745417	GSK	STING	iv	NCT03843359
BMS986301	BMS	STING	it	SITC 2018 P525
ExoSTING	Codiak BioSciences	STING	it	SITC 2018 P618
MV-626	Mavupharma	ENPP1	ip	SITC 2018 P410
STACT-TREX1	Actym Therapeutics	TREX1	it, iv	SITC 2018 P235
SYN-STING	Synlogic	STING	iv	SITC 2018 P624
SB11285	Spring Bank Pharmaceuticals	STING	ip, it, iv	AACR 2017 P-A25
CRD-100	Curadev Pharma	STING	it	[50]
GSK532	GSK	STING	iv	[51]
Liposomal cGAMP-NP	UNC-Chapel Hill	STING	iv	[52]
SRCB-0001	GSK	STING	*po*	[51]

it:瘤内注射; iv: 静脉注射; ip: 腹腔注射; *po*:口服;SITC 2018:肿瘤免疫治疗学会 2018 年度会议; AACR 2017:美国肿瘤研究协会 2017 年肿瘤免疫和免疫治疗会议; PD-1:程序性死亡蛋白 1; ENPP1:核苷酸内焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1; TREX1:脱氧核糖核酸酶 3

3.3　STING 抑制剂

近年来研究发现 STING 的异常激活导致的免疫功能紊乱能诱发 AGS、SLE 和 SAVI 等自身免疫疾病，这也使得研究者开始重视 STING 抑制剂的开发。Merck 公司的 Siu 等[53]通过 ALIS（automated ligand identification system，ALIS）系统筛选出了靶向 STING 蛋白的小分子抑制剂 Compound **18**。共结晶结构表明 Compound **18** 结合在 STING 的 CBD 口袋内，并竞争性抑制 2′，3′-cGAMP 与蛋白的结合。在人单核细胞（THP-1）内，Compound 18 抑制 2′，3′-cGAMP 诱导细胞 IFN-β 基因表达的 IC_{50} 为 11 μmol/L。此外在植物环肽化合物库中筛选发现紫菀根茎的天然提取物 Astin C 能通过阻止 STING 对下游转录因子 IRF3 的招募，抑制多种刺激物诱导的 STING 信号通路的激活[54]。在小鼠胚胎成纤维细胞（MEFs）和人源肺部成纤维细胞（IMR90）中 Astin C 对 IFN-β 基因表达的 IC_{50} 为分别为 4 和 10 μmol/L，且在自身免疫疾病模型 *Trex1*$^{-/-}$ 小鼠体内注射 Astin C 分子能显著改善小鼠多组织器官的免疫损伤。

除了上述靶向 STING 蛋白 CBD 区域的小分子抑制剂外，靶向抑制 STING N 端跨膜区内半胱氨酸的棕榈酰化修饰的小分子抑制剂也逐渐成为研究热点。Mukai 等[55]报道，STING 蛋白 N 端结构域的 88 位和 91 位半胱氨酸（后面分别缩写为 Cys88 和 Cys91）的棕榈酰化修饰为 STING 蛋白激活所必须，且其在细胞抗病毒免疫过程中发挥着重要作用。随后 Hansen 等[56]报道在病毒入侵细胞时产生的内源硝基脂肪酸（NO_2-FAs）能与 Cys88 和 Cys91 共价结合，阻止 STING 蛋白棕榈酰化，抑制 STING 信号通路激活。在 SAVI 患者来源的成纤维细胞中，NO_2-FAs 能显著抑制疾病伴随的 Ⅰ 型 IFNs 及相关炎症因子表达。此外，Haag 等[57]在体外筛选化合物发现硝基呋喃衍生物 C-178 和 C-176 可以共价结合鼠源 STING 蛋白的中 Cys91 位点，抑制 STING 棕榈酰化，阻断下游信号传递。进一步他们筛选出化合物 H-151，以相同的方式共价结合人源 STING，抑制 Ⅰ 型 IFNs 表达，上述化合物在 *Trex1*$^{-/-}$ 小鼠中都能显著改善自身免疫疾病的进展。靶向 cGAS 和 STING 蛋白的抑制剂见表 3 和图 4。

表3 cGAS-STING信号通路抑制剂的炎症抑制活性

化合物	靶点	实验对象	参考文献
RU.521	鼠源cGAS	*Trex1*$^{-/-}$小鼠	[39]
G150	人源cGAS	*Trex1*$^{-/-}$小鼠	[40]
PF-06928215	人源cGAS	无体内抑制活性	[41]
HCQ	cGAS分子对接	无体内验证数据	[42]
X6	cGAS分子对接	*Trex1*$^{-/-}$小鼠	[43]
EGCG	G3BP1-cGAS相互作用	*Trex1*$^{-/-}$小鼠和AGS患者	[44]
Aspirin	cGAS乙酰化	*Trex1*$^{-/-}$小鼠和AGS患者	[45]
Compound **18**	STING CBD结合口袋	无数据	[53]
Astin C	STING-IRF3相互作用	*Trex1*$^{-/-}$小鼠	[54]
NO_2-FAs	STING棕榈酰化	*Trex1*$^{-/-}$小鼠和来源于SAVI患者的细胞	[56]
C-176, C-178	鼠源STING棕榈酰化	*Trex1*$^{-/-}$小鼠	[57]
H-151	人源STING棕榈酰化	*Trex1*$^{-/-}$小鼠	[57]

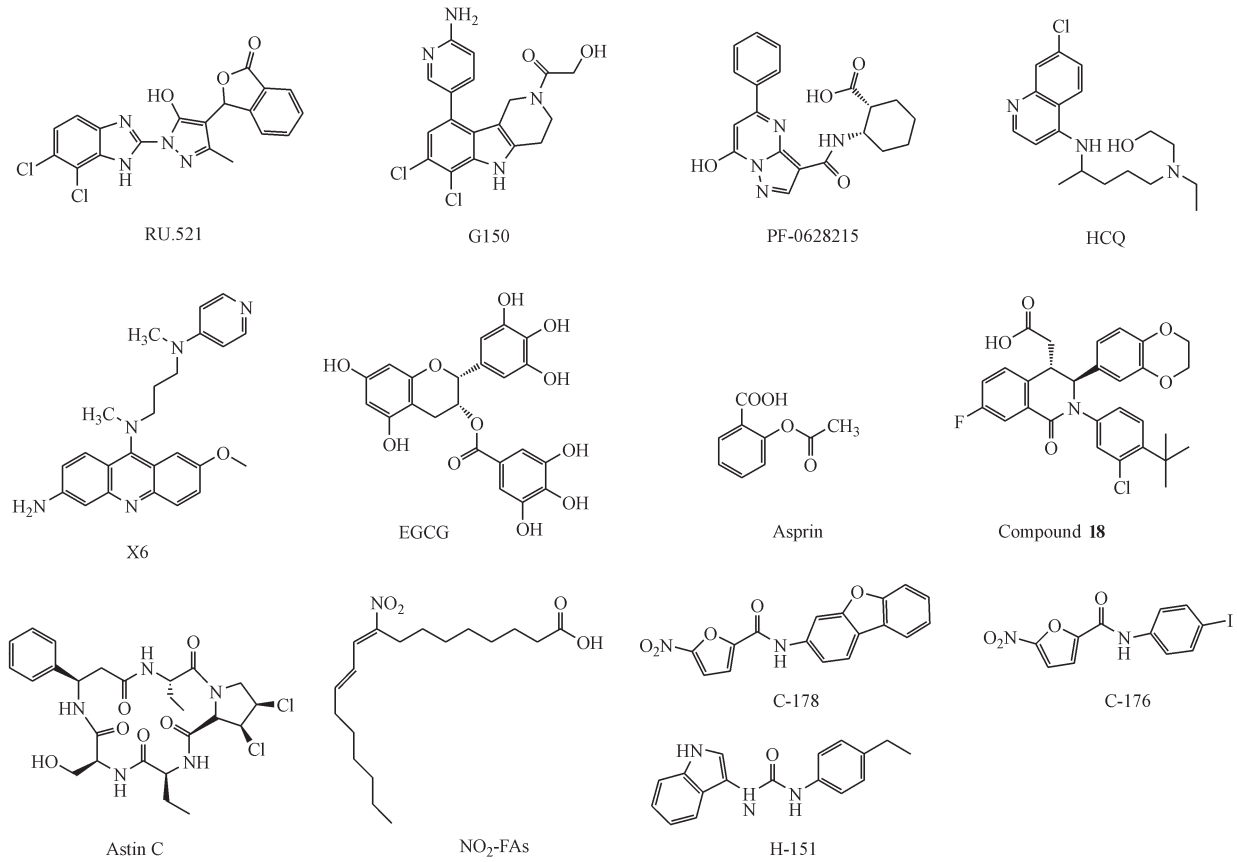


图4 cGAS-STING信号通路抑制剂

4 总结和展望

作为固有免疫系统的重要组成部分,cGAS-STING信号通路在维持机体的稳态过程中发挥着重要作用。相应的cGAS-STING功能的紊乱导致机体免疫功能的异常会诱发包括肿瘤、自身免疫疾病在内的多种疾病。迄今为止,研究人员通过多种筛选方法发现了多种新型的靶向调控cGAS或STING蛋白功能的小分子激动剂或抑制剂,且这些化合物在临床前的研究中也表现出很好的生物学活性。但是,研究者也发现了现有小分子中存在的一些问题,例如cGAS的抑制剂抗疟疾药物

衍生物的细胞毒性，STING 激动剂 CDNs 类似物的细胞通透性差且易被降解，靶向 STING 蛋白半胱氨酸的共价抑制剂具有脱靶作用以及在筛选化合物过程中发现的种属特异性问题等。因此，靶向 cGAS 和 STING 的新颖激动剂和抑制剂依然有待开发，筛选出具有更好生物活性的先导化合物，为临床研究提供更多的候选分子。

靶向调控 cGAS-STING 信号通路的小分子化合物在多种疾病的治疗中都具有显著疗效。比如在小鼠多种肿瘤模型中，STING 激动剂与 PD-1（programmed cell death protein 1，PD-1）或者 PD-L1（programmed cell death 1 ligand 1，PD-L1）抑制剂联用能协同促进机体的抗肿瘤免疫且在体内能形成长期的免疫记忆，有效地控制肿瘤复发；在自身免疫疾病治疗中，AGS 和 SAVI 等罕见病并没有有效的治疗药物，临床上目前以使用 Janus 激酶抑制剂为主控制疾病进展，与其相比靶向 cGAS 或 STING 的抑制剂不仅能控制 Ⅰ 型 IFNs 诱导的组织损伤，还能控制 TNF-α 和 IL-6 等炎症因子导致的组织炎症。此外靶向 STING 蛋白的抑制剂也能改善 STING 异常激活导致的 T，B 细胞和内皮细胞等多种细胞死亡[58]。

此外，在开发调控 cGAS-STING 信号通路的激动剂或抑制剂时，其潜在的药物不良反应值得关注。比如在利用 STING 激动剂进行肿瘤免疫治疗，很可能爆发“免疫风暴”，过度激活的免疫系统导致机体损伤甚至死亡[2]。在使用抑制剂治疗自身免疫疾病时，过度抑制 STING 信号通路抑制剂将导致机体免疫系统低下，使病原体感染和肿瘤发生的风险显著增加。因此，在药物开发中还应注意给药的剂量和周期，尽量避免潜在的药物不良反应发生。

越来越多的研究表明，除了发挥固有免疫功能外，cGAS 和 STING 蛋白还能在疾病中独立发挥作用。比如：当 DNA 发生损伤时，cGAS 可以入核干扰 DNA 同源重组修复过程，促进肿瘤生长，而这一过程不依赖于 STING；在白血病中，激活 STING 将通过 IRF3，p53 或线粒体介导的细胞凋亡信号通路，促进肿瘤细胞凋亡[58-60]。同时，Caspase 蛋白家族以及 microRNA 都可以和固有免疫信号通路发生相互作用，暗示它们也可能影响 DNA 识别信号的转导[61-62]。所以在不同疾病的发展中对 cGAS 和 STING 蛋白功能进行更加深入研究，将有助于更好地指导靶向药物开发。

参 考 文 献

[1] Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, **32**(1): 461-488.

[2] Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: expanding roles in immunity and inflammation[J]. *Science*, 2019, **363**(6431): eaat8657.

[3] Civril F, Deimling T, De CC, *et al*. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS [J]. *Nature*, 2013, **498**(7454): 332-337.

[4] Zhang X, Wu J, Du F, *et al*. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop [J]. *Cell Rep*, 2014, **6**(3): 421-430.

[5] Andreeva L, Hiller B, Kostrewa D, *et al*. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders[J]. *Nature*, 2017, **549**(7672): 394-398.

[6] Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, *et al*. cGAS produces a 2′-5′-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING[J]. *Nature*, 2013, **498**(7454): 380 - 384.

[7] Shang G, Zhu D, Li N, *et al*. Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(7): 725-727.

[8] Zhao B, Du F, Xu P, *et al*. A conserved PLPLRT/SD motif of STING mediates the recruitment and activation of TBK1 [J]. *Nature*, 2019, **569**(7758): 718-722.

[9] Zhao B, Shu C, Gao X, *et al*. Structural basis for concerted recruitment and activation of IRF-3 by innate immune adaptor proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2016, **113**(24): E3403-E3412.

[10] Burdette DL, Monroe KM, Sotelo TK, *et al*. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP[J]. *Nature*, 2011, **478**(7370): 515-518.

[11] Su J, Rui Y, Lou M, *et al*. HIV-2/SIV Vpx targets a novel functional domain of STING to selectively inhibit cGAS-STING-mediated NF-κB signalling[J]. *Nat Microbiol*, 2019, **4**(12): 2552-2564.

[12] Aguirre S, Luthra P, Sanchez MT, *et al*. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection[J]. *Nat Microbiol*, 2017, **2**(5): 17037.

[13] Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, *et al*. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors[J]. *Immunity*, 2014, **41**(5): 830-842.

[14] Konno H, Yamauchi S, Berglund A, *et al*. Suppression of STING signaling through epigenetic silencing and missense

mutation impedes DNA damage mediated cytokine production [J]. *Oncogene*, 2018, **37**(15): 2037 - 2051.

[15] Wu S, Zhang Q, Zhang F, *et al*. HER2 recruits AKT1 to disrupt STING signalling and suppress antiviral defence and antitumour immunity [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, **21** (8): 1027-1040.

[16] Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, *et al*. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, **13**(11): 759-771.

[17] Ahn J, Xia T, Konno H, *et al*. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING [J]. *Nat Commun*, 2014, **5** (1): 5166.

[18] Chen Q, Boire A, Jin X, *et al*. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer[J]. *Nature*, 2016, **533**(7604): 493-498.

[19] Gao D, Li T, Li XD, *et al*. Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, **112**(42): E5699-E5705.

[20] Crow YJ, Chase DS, Lowenstein SJ, *et al*. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1[J]. *Am J Med Genet Part A*, 2015, **167**(2): 296-312.

[21] Coquel F, Silva MJ, Técher H, *et al*. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction [J]. *Nature*, 2018, **557**(7703): 57-61.

[22] Crow YJ, Manel N. Aicardi - Goutières syndrome and the type I interferonopathies [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, **15** (7): 429-440.

[23] Liu Y, Jesus AA, Marrero B, *et al*. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2014, **371** (6): 507-518.

[24] Zhao Q, Wei Y, Pandol SJ, *et al*. STING signaling promotes inflammation in experimental acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2018, **154**(6): 1822-1835.

[25] Rodero MP, Tesser A, Bartok E, *et al*. Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 2176.

[26] Sliter DA, Martinez J, Hao L, *et al*. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation [J]. *Nature*, 2018, **561** (7722): 258-262.

[27] Bakhoum SF, Ngo B, Laughney AM, *et al*. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response[J]. *Nature*, 2018, **553**(7689): 467-472.

[28] An J, Durcan L, Karr RM, *et al*. Expression of cyclic GMP-AMP synthase in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, **69**(4): 800-807.

[29] Ahn J, Gutman D, Saijo S, *et al*. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, **109**(47): 19386-19391.

[30] Kerur N, Fukuda S, Banerjee D, *et al*. cGAS drives noncanonical-inflammasome activation in age-related macular degeneration[J]. *Nat Med*, 2018, **24**(1): 50 - 61.

[31] Petrasek J, Iracheta VA, Csak T, *et al*. STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, **110** (41): 16544 - 16549.

[32] Iracheta VA, Petrasek J, Gyongyosi B, *et al*. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatocellular death pathways mediate liver injury and fibrosis via stimulator of interferon genes[J]. *J Biol Chem*, 2016, **291**(52): 26794 - 26805.

[33] King KR, Aguirre AD, Ye YX, *et al*. IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction[J]. *Nat Med*, 2017, **23**(12): 1481 - 1487.

[34] Yu Y, Liu Y, An W, *et al*. STING-mediated inflammation in Kupffer cells contributes to progression of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J. Clin Invest*, 2018, **129**(2): 546 - 555.

[35] Zeng L, Kang R, Zhu S, *et al*. ALK is a therapeutic target for lethal sepsis[J]. *Sci Transl Med*, 2017, **9**(412): eaan5689.

[36] Marichal T, Ohata K, Bedoret D, *et al*. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity [J]. *Nat Med*, 2011, **17**(8): 996 - 1002.

[37] Carroll EC, Jin L, Mori A, *et al*. The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons[J]. *Immunity*, 2016, **44**(3): 597-608.

[38] Wang C, Guan Y, Lv M, *et al*. Manganese increases the sensitivity of the cGAS-STING Pathway for double-stranded DNA and is required for the host defense against DNA viruses [J]. *Immunity*, 2018, **48**(4): 675-687.

[39] Vincent J, Adura C, Gao P, *et al*. Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 1-12.

[40] Lama L, Adura C, Xie W, *et al*. Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression[J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2261.

[41] Hall J, Brault A, Vincent F, *et al*. Discovery of PF-06928215 as a high affinity inhibitor of cGAS enabled by a novel fluorescence polarization assay [J]. *PLoS One*, 2017, **12** (9): e0184843.

[42] An J, Woodward JJ, Sasaki T, *et al*. Cutting Edge: Antimalarial drugs inhibit IFN-β production through blockade of cyclic GMP-AMP synthase-DNA interaction [J]. *J Immunol*, 2015, **194**(9): 4089-4093.

[43] An J, Woodward JJ, Lai W, *et al*. Inhibition of cyclic GMP-AMP synthase using a novel antimalarial drug derivative in Trex1-deficient mice[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, **70**(11): 1807-1819.

[44] Liu ZS, Cai H, Xue W, *et al*. G3BP1 promotes DNA binding

and activation of cGAS [J]. *Nat Immunol*, 2019, **20** (1): 18-28.

[45] Dai J, Huang YJ, He X, *et al*. Acetylation blocks cGAS activity and inhibits self-DNA-induced autoimmunity [J]. *Cell*, 2019, **176**(6): 1447-1460.

[46] Zhang X, Shi H, Wu J, *et al*. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING [J]. *Mol Cell*, 2013, **51**(2): 226-235.

[47] Nakamura T, Miyabe H, Hyodo M, *et al*. Liposomes loaded with a STING pathway ligand, cyclic di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma [J]. *J Control Release*, 2015, **216**: 149-157.

[48] Smith TT, Moffett HF, Stephan SB, *et al*. Biopolymers codelivering engineered T cells and STING agonists can eliminate heterogeneous tumors [J]. *J Clin Invest*, 2017, **127**(6): 2176-2191.

[49] Ji LY, Hao J, Wang GC, *et al*. Recent research advances in STING agonists for cancer immunotherapy [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2020, **51**(1): 1-9.

[50] Banerjee M, Middya S, Basu S, *et al*. Abstract B43: novel small-molecule human STING agonists generate robust type I interferon responses in tumors [C]. Tumor Microenvironment: American Association for Cancer Research, 2018: B43-B43.

[51] Ramanjulu JM, Pesiridis GS, Yang J, *et al*. Design of amidobenzimidazole STING receptor agonists with systemic activity [J]. *Nature*, 2018, **564**(7736): 439-443.

[52] Cheng N, Watkins SR, Junkins RD, *et al*. A nanoparticle-incorporated STING activator enhances antitumor immunity in PD-L1 - insensitive models of triple-negative breast cancer [J]. *JCI Insight*, 2018, **3**(22): e120638.

[53] Siu T, Altman MD, Baltus GA, *et al*. Discovery of a novel cGAMP competitive ligand of the inactive form of STING [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, **10**(1): 92-97.

[54] Li S, Hong Z, Wang Z, *et al*. The cyclopeptide Astin C specifically inhibits the innate immune CDN sensor STING [J]. *Cell Rep*, 2018, **25**(12): 3405-3421.

[55] Mukai K, Konno H, Akiba T, *et al*. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi [J]. *Nat Commun*, 2016, **7** (1): 11932.

[56] Hansen L, Buchan GJ, Rühl M, *et al*. Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, **115**(33): E7768-E7775.

[57] Haag SM, Gulen MF, Reymond L, *et al*. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors [J]. *Nature*, 2018, **559** (7713): 269-273.

[58] Gulen MF, Koch U, Haag SM, *et al*. Signalling strength determines proapoptotic functions of STING [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 427.

[59] Liu H, ZhangH, Wu X, *et al*. Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis [J]. *Nature*, 2018, **563** (7729): 131-136.

[60] Tang CH, Zundell JA, Ranatunga S, *et al*. Agonist-mediated activation of STING induces apoptosis in malignant B cells [J]. *Cancer Res*, 2016, **76**(8): 2137-2152.

[61] Yu YH, Xu ZM, Zeng H, *et al*. Advances in the study of relationship between Caspases and innate immunity [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2019, **50**(5): 622-630.

[62] Yang RC, Duan FP, Chao JH, *et al*. Advances of microRNA activity in innate immunity [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2017, **48**(4): 396-406.

中国药科大学学报
Journal of China Pharmaceutical University 2020,51(3):260 – 269

小分子ERK抑制剂的研究进展

梁停停[1,2],王文杰[1],郝思远[1],何光超[1,2],徐云根[1,2*]

([1]中国药科大学药物化学系,南京 211198;[2]江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室,南京 211198)

摘　要　细胞外信号调节激酶(ERK)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶。作为RAS-RAF-MEK-ERK信号通路中关键的下游蛋白,其异常活化在肿瘤的发生发展中起着重要作用。选择性ERK1/2抑制剂能够阻断ERK信号通路,同时克服上游靶点突变而导致的耐药性。本文概述了MAPK信号通路的组成、ERK的结构与功能以及ERK信号通路在肿瘤发生发展中的作用,并重点介绍一些具有代表性的处于临床和临床前研究阶段的ERK抑制剂。

关键词　细胞外信号调节激酶;细胞外信号调节激酶抑制剂;抗肿瘤;耐药性;进展

中图分类号　R914.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1000 –5048(2020)03 –0260 –10

doi:10.11665/j.issn.1000 –5048.20200302

引用本文 梁停停,王文杰,郝思远,等.小分子ERK抑制剂的研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(3):260 – 269.

Cite this article as: LIANG Tingting, WANG Wenjie, HAO Siyuan, *et al*. Research progress of ERK small molecule inhibitors[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 260 – 269.

Research progress of ERK small molecule inhibitors

LIANG Tingting[1,2], WANG Wenjie[1], HAO Siyuan[1], HE Guangchao[1,2], XU Yungen[1,2*]

[1]*Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;*

[2]*Jiangsu Key Laboratory of Drug Molecular Design and Optimization, Nanjing 211198, China*

Abstract　Extracellular signal-regulated kinase (ERK) is a kind of serine/threonine protein kinase. As a key downstream protein in RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway, its abnormal activation plays an important role in the development of tumors. Selective ERK1/2 inhibitors can block ERK signaling pathway while overcoming drug resistance caused by upstream target mutation. In this paper, the components of MAPK signaling pathway, the structure and functions of ERK and the role of ERK signaling pathway in tumor development are summarized, and some representative ERK inhibitors in clinical or preclinical studies are emphasized.

Key words　extracellular signal-regulated kinase (ERK); ERK inhibitors; antitumor; drug resistance; progress

This study was supported by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of China Pharmaceutical University (No. 201910316099)

RAS-RAF-MEK-ERK信号通路是一条广泛存在于哺乳动物细胞中的信号级联通路,在细胞的分化、存活、衰老和凋亡等细胞活动中发挥着极其重要的作用[1-2]。大量研究表明,在肿瘤的发展进程中,该信号通路处于持续异常激活状态。因此,以RAS-RAF-MEK-ERK信号通路各成员蛋白为靶点的抗肿瘤药物的研发受到了人们的广泛重视[3]。目前,虽然尚无ERK抑制剂成功上市,但是随着人们对ERK结构与功能的深入研究,ERK逐渐成为抗肿瘤药物研究的十分重要的靶点[4]。

1　MAPK信号通路

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路可以将细胞外信号转导至细胞内,从而调节各种生物学功能[5]。在生长因子、氧化应激、炎症因子等细胞外信号的刺激

收稿日期　2019-11-12　　*通信作者　Tel:13505155520　E-mail: xyg64@126.com

基金项目　中国药科大学大学生创新创业训练计划资助项目(No. 201910316099)

下，该信号通路被激活，通过三级激酶级联的形式（MAPKKK→MAPKK→MAPK）传导细胞信号，调节哺乳动物细胞内相关基因的转录和表达，从而调控细胞的增殖、分化、凋亡、炎症反应[6]以及血管发育[7]等生物学功能。目前，在哺乳动物中，已经发现了 5 种不同的 MAPKs，分别为细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK）、C-Jun N 末端激酶（C-Jun N-terminal kinase，JNK）、p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinase，p38MAPK）、ERK3/4 和 ERK5[8]（图 1）。

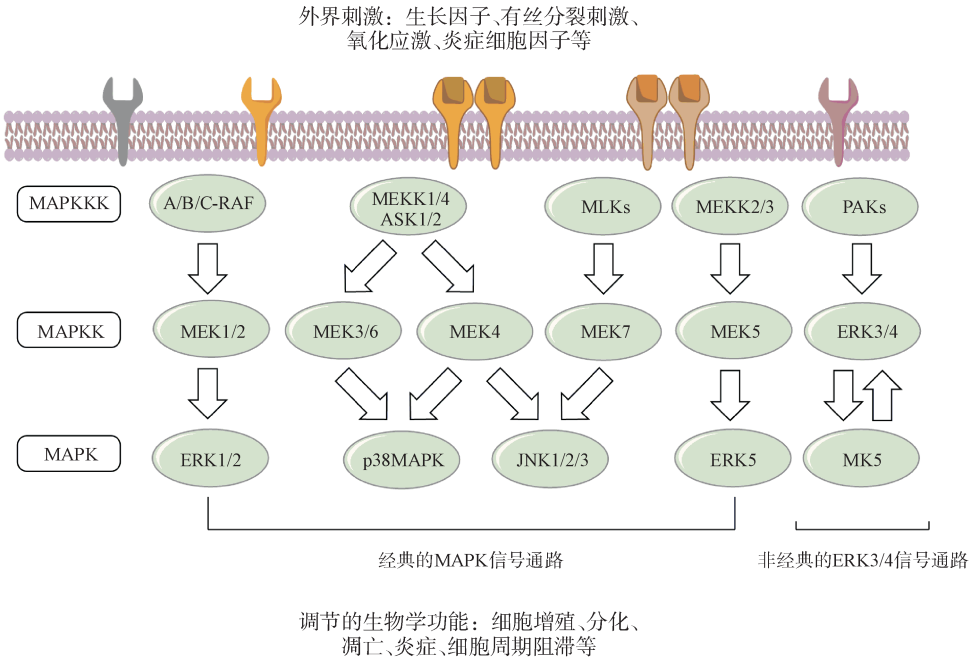


图 1　哺乳动物体内的 MAPKs 信号传导通路

ASK: 凋亡信号调节激酶(apoptosis signal-regulation kinase); MAPKKK: 丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase); MAPKK: 丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase); MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase); MLKs: 混合谱系激酶(mixed lineage kinases); MK: 丝裂原活化蛋白激酶激活蛋白激酶(MAPK-activated protein kinase); PAKs: p21 活化的激酶(p21-activated kinases)

RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路具有高度的保守性[9]，其激活过程如下：首先，具有 GTPase 活性的 RAS 蛋白被上游的受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinase，RTK）、细胞因子受体（cytokine receptor，CKR）和 G 蛋白偶联受体（G protein coupled receptor，GPCR）等细胞表面受体激活[10]，通过鸟苷酸交换因子（guanine nucleotide exchange factors，GEFs）使 RAS 发生构象变化[11]，从 GDP 结合的非活化状态变为 GTP 结合的活化状态[12]。然后，活化的 RAS 通过与 RAF 的 N 端结构域结合，将 RAF 从细胞质招募到细胞膜上使其二聚化并激活[13]。RAF 是一个丝/苏氨酸蛋白激酶[14]，活化的 RAF 能够进一步与下游的 MEK 蛋白结合，使其丝/苏氨酸残基磷酸化而导致 MEK 的激活[10]。MEK1/2 是丝/苏氨酸和酪氨酸的双重特异性蛋白激酶，它能够磷酸化其下游的唯一底物 *erk*1/2 的苏氨酸和酪氨酸残基使其活化。活化的 ERK 进入细胞核，对其他激酶和转录因子等多种底物如 RSK、CREB、Elk-1、NF-κB 等进行磷酸化修饰[15]，改变相关基因的表达，最终引起细胞周期进展以及细胞增殖、分化、代谢、凋亡等细胞行为的变化[16]（图 2）。

2　细胞外信号调节激酶（ERK）

2.1　ERK 的结构与功能

与其他蛋白激酶类似，ERK 蛋白也具有由 N 端和 C 端卷曲形成的双叶结构。其 N 端由 5 股反向平行的 β 片层结构（β1 ~ β5）、1 个 αC 螺旋结构和一个甘氨酸富集环结构组成，C 端则由 6 个保守

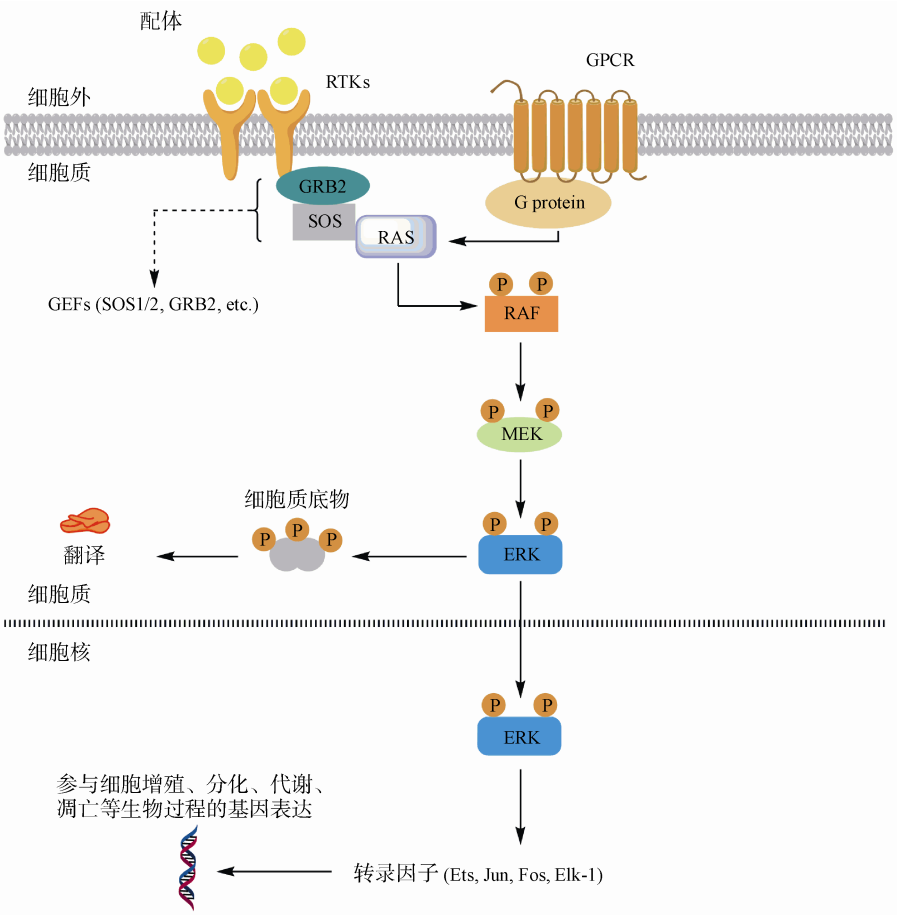


图2 RAS-RAF-MEK-ERK信号通路

GEFs: 鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors); GPCR: G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor); GRB2: 生长因子受体结合蛋白2 (growth factor receptor bound protein 2); RTK: 受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase); SOS:son of sevenless homolog

的α螺旋结构和4股较短的β片层结构(β6～β9)组成[17](图3)。

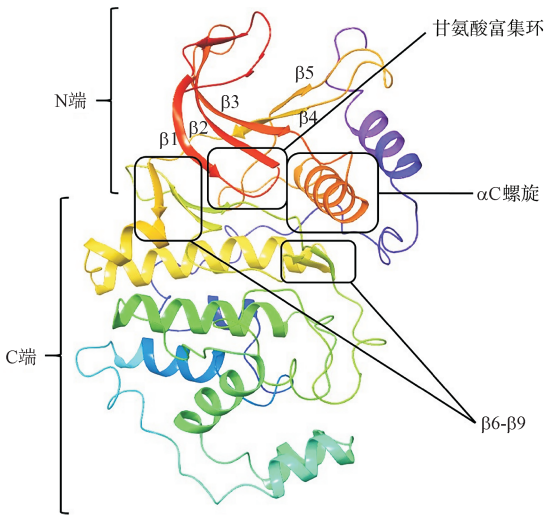


图3 ERK2的二级结构 (PDB:2OJJ)

几乎所有的哺乳动物体内都有ERK蛋白的表达。到目前为止,ERK蛋白被鉴定出有两个亚型:ERK1和ERK2[18],二者在氨基酸序列上同源性高达84%[19]。以人源ERK为例,ERK1由379个氨基酸残基组成,而ERK2则由360个氨基酸残基组成[20]。对于ERK1和ERK2的功能差异,目前主流的观点是ERK1和ERK2的生物学功能类似,只是两个亚型在整个ERK蛋白活性中的贡献度不同[21]。但是Buscà等[18]发现,在ERK1/2基因破坏的小鼠中,ERK1/2表现出显著的表型差异:*erk1*$^{-/-}$小鼠能够存活和正常繁殖,而ERK2被破坏则导致早期胚胎死亡。在对ERK1和ERK2之间的功能差异作进一步研究时,仅有少数实验揭示了ERK1和ERK2在功能上的微小差异,其具体的生物学机制仍有待探究。

目前,已知的ERK底物数量多达上百种,主要

分布在细胞膜、细胞质以及细胞核。ERK1/2 在细胞质底物包括 RSK 家族蛋白激酶、磷蛋白磷酸酶、cAMP 磷酸二酯酶、胞浆磷脂酶 A_2、细胞骨架蛋白等[22-25]，而 ERK1/2 在细胞核内的底物大多是转录因子，主要是转录因子 TCF 家族[26]。ERK 通过对不同底物的调节，从而发挥不同的生物学作用。

2.2　ERK 信号通路在肿瘤发生发展中的作用

在约 30% 的肿瘤中，RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路均处于异常激活状态。该信号通路中各成员蛋白的突变和异常表达在多种恶性肿瘤的发生发展过程中都发挥了重要作用。例如：在约 1/3 的肿瘤中存在 RAS 的突变激活，其中 KRAS 的突变比率最高，占人类肿瘤总数的 20% 以上，在前列腺癌中的突变比率更是高达 90%[27]；在 7% 的肿瘤中含有 BRAF 突变[28]，其中最常见的突变为 BRAF-V600E 突变，在黑色素瘤中的突变比率高达 63%，在甲状腺乳头状癌中突变比率也有 50% 以上[29]；在胃癌[30]、黑色素瘤[31]、结直肠癌[32]和肺癌[33]中均表现出 MEK 突变。

因此，针对 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路研发的小分子靶向药物无疑在抗肿瘤药物研究领域占有突出地位[34]。

2.3　ERK 抑制剂的优势

目前，已有多个 BRAF 抑制剂和 MEK 抑制剂被美国 FDA 批准上市，用于治疗各种实体瘤，在临床治疗中取得了良好的效果。如：BRAF 抑制剂索拉非尼（sorafenib）、维罗非尼（vemurafenib）和达拉非尼（dabrafenib）；MEK 抑制剂曲美替尼（trametinib）、司美替尼（selumetinib）和考比替尼（cobimetinib）。虽然在患者接受治疗的初期，肿瘤的发展进程得到了有效控制，但是在长时间服用该类靶向药物后，肿瘤细胞不可避免的产生了获得性耐药。与 RAS、BRAF 等在肿瘤细胞中的高突变率不同，到目前为止，ERK1/2 的获得性突变在肿瘤细胞中几乎没有出现[35]。其原因可能是细胞中 ERK1/2 能够调控激酶与转录因子等多种底物，一旦 ERK1/2 发生耐药性突变，将会失去对这些底物的有效调控，影响正常细胞活动，无法保证细胞的存活。而且，越来越多的临床前研究结果显示，ERK 抑制剂比 RAF 和 MEK 抑制剂具有更好的效果。Qin 等[36]发现，选择性敲除 ERK1/2 能够有效杀死 A375 黑色素瘤细胞，同时增强 A375 细胞对 BRAF 抑制剂维罗替尼的敏感性；Hatzivassiliou 等[37]发现，MEK 抑制剂耐药的细胞持续保持对 MAPK 信号通路的依赖，其对选择性 ERK1/2 抑制剂敏感，应用 ERK 抑制剂能够有效阻断细胞增殖。

因此，与抑制 MAPK 信号通路中的上游靶点相比，抑制下游的 ERK 同样能够起到阻断细胞信号转导的作用。更为重要的是，ERK 抑制剂能够克服肿瘤细胞对 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂的耐药性，在临床上具有更广泛的应用前景。

3　小分子 ERK 抑制剂的研究进展

鉴于在肿瘤的发生发展过程中，MAPK 信号通路发挥了重要作用，而 ERK 激酶又是 MAPK 信号通路中十分关键的下游靶点。因此，选择性抑制 ERK 能够阻断 MAPK 信号通路，同时逆转上游靶点突变产生的耐药性。虽然目前尚无 ERK1/2 抑制剂被正式批准上市，但是已经有一些小分子 ERK 抑制剂处于临床或临床前研究阶段，下面将重点介绍小分子 ERK 抑制剂的研究进展。

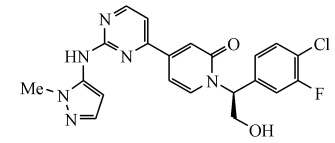
3.1　处于临床研究阶段的 ERK 抑制剂

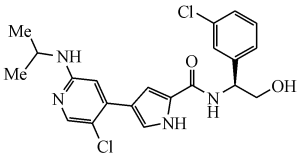
近年来，已有多个 ERK 抑制剂进入临床研究，包括 GDC-0994（**1**）、Ulixertinib（BVD-523）（**2**）、KO-947（**3**）、LY3214996（**4**）、MK-8353（**5**）、CC-90003（**6**）、LTT462 等。

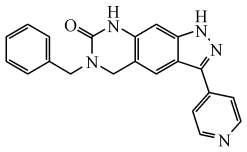
3.1.1　GDC-0994

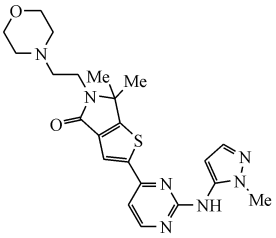
GDC-0994（**1**）是由 Genentech 公司研发的口服的选择性 ERK1/2 抑制剂，其对 ERK1 和 ERK2 的 IC_{50} 分别为 6.1 和 3.1 nmol/L。

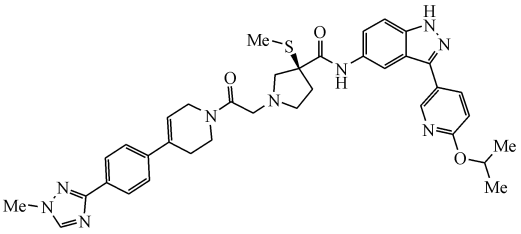
2014 年，Genentech 公司通过高通量筛选得到四氢吡啶并嘧啶类化合物 **7**，其对 ERK2 的 IC_{50} 为 106 nmol/L。以化合物 **7** 为先导化合物，经过结构优化得到化合物 **8**，其对 ERK2 的 IC_{50} 提高到 2 nmol/L，并且在人 HCT116 结直肠癌的裸鼠移植模型中表现出较好的抗肿瘤效果[38]。但是，化合物 **8** 的药代动力学性质不佳，在动物体内清除率较高，口服生物利用度较低。为了改善化合物 **8** 的药代动力学性质，对其结构进行进一步优化，得到了化合物 **9**[39]。但是，由于化合物 **9** 中的四氢吡喃环在体内可以被代谢为羟基酸产物 **10**，使得化合物 **9** 的预测给药量过大（>1 g/d）。为了进一步提高化合物 **9** 的活性和代谢稳定性，将结构优化集中在四氢吡喃环的改造上，最终得到化合物 GDC-0994[40]。

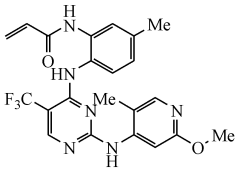

GDC-0994 (**1**)

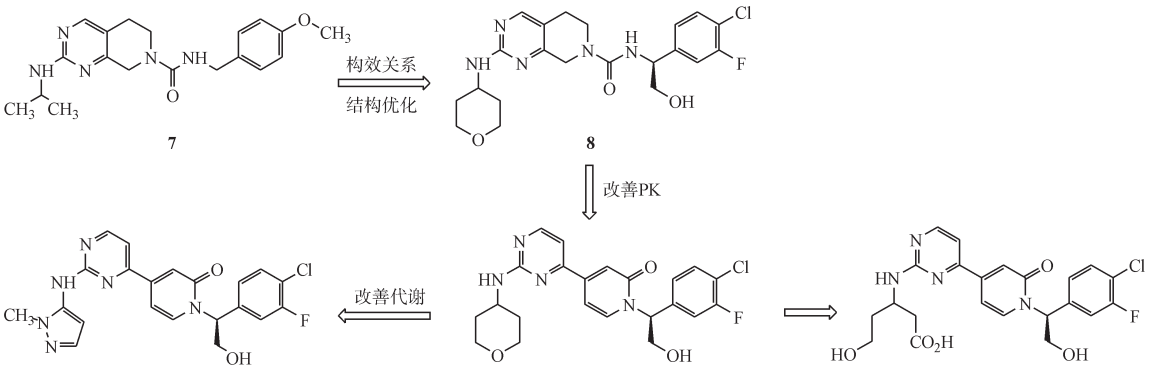

Ulixertinib (BVD-523, **2**)


KO-947 (**3**)


LY3214996 (**4**)


MK-8353 (**5**)


CC-90003 (**6**)



7 **8** **9** GDC-0994 (**1**) **10**, 代谢物

分析GDC-0994与ERK2的共晶复合物(图4),可以发现2-氨基嘧啶结构能够与铰链区的Met108、Leu107形成氢键作用,吡啶酮羰基能够通过水分子与门控残基Gln105和催化残基Lys54形成相互作用,羟甲基部分可以同时与Asp167和Asn154形成氢键作用,氟氯取代的苯基能够结合到甘氨酸富集环结构下方的疏水口袋。此外,5-氨基吡唑结构也能够与Lys114形成氢键相互作用。

动物实验结果表明,在HCT116小鼠移植瘤模型中,GDC-0994能够显著降低p90RSK的磷酸化水平,抑制肿瘤组织的生长。在临床前的安全性评价试验中,与其他MEK和ERK抑制剂类似,GDC-0994也表现出一些不良反应,包括大鼠体内由磷失调引发的软组织矿化、白蛋白水平下调和皮肤毒性、以及犬的胃肠道毒性等[40]。

目前,GDC-0994用于治疗局部晚期或转移性实体瘤的Ⅰ期临床试验已经结束,进一步的临床研究暂无报道。

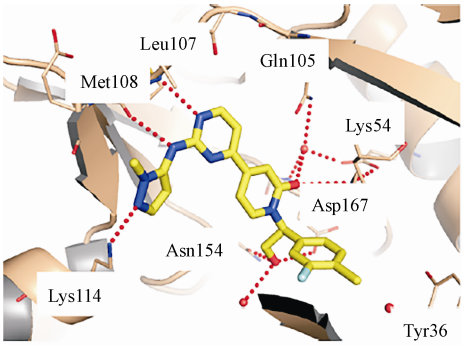


图4 化合物GDC-0994与ERK2的共晶复合物[40] (PDB:5K4I)

3.1.2 Ulixertinib Ulixertinib (BVD-523, VRT752271, **2**)是由BioMed Valley Discoveries公司研发的可逆型ATP竞争性ERK1/2抑制剂,其对ERK1的 K_i < 0.3 nmol/L,对ERK2的 K_i = 0.04 nmol/L。无论是对活化的ERK2(pERK2)还是非活化的ERK2,Ulixertinib均表现出强亲和力,但是对pERK2的亲和力要强于非活化的ERK2。

体外细胞实验结果显示,在$BRAF^{V600E}$突变的UACC-62黑色素瘤细胞中,Ulixertinib浓度依赖性

地抑制 ERK1/2 的活性，使细胞周期被阻滞在 G_1 期，从而发挥其抗增殖作用。此外，Ulixertinib 还能诱导 caspase-3/7 依赖性细胞凋亡通路的激活，促进肿瘤细胞的凋亡。动物实验结果表明，Ulixertinib 可以剂量依赖性抑制肿瘤的生长，同时对裸鼠体重基本没有影响[41]。更重要的是，在其他 MAPK 信号通路抑制剂耐药的模型中，Ulixertinib 仍然表现出抗增殖活性[42]。

目前，Ulixertinib 单独用药治疗晚期恶性肿瘤正处于Ⅱ期临床研究阶段（NCT01781429），用于治疗急性骨髓性白血病和骨髓增生异常综合征正处于Ⅰ/Ⅱ期临床研究阶段（NCT02296242）。在药物联用方面，Ulixertinib 与白蛋白结合型紫杉醇（nab-paclitaxel）和吉西他滨（gemcitabine）联合应用治疗转移性胰腺癌正处于Ⅰ期临床研究阶段（NCT02608229），与 CDK4/6 抑制剂哌柏西利（palbociclib）联合应用治疗晚期胰腺癌和其他实体瘤正处于Ⅰ期临床研究阶段（NCT03454035）。

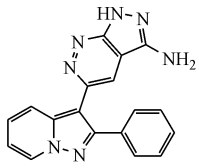
3.1.3　LY3214996　LY3214996（**4**）是由礼来公司研发的口服的 ERK1/2 抑制剂（IC_{50} = 5 nmol/L），在 BRAF 和 RAS 突变的肿瘤细胞中可以抑制 RSK1 的磷酸化水平。2016 年作为治疗晚期实体瘤的药物进入Ⅰ期临床研究。其除了可以单独用药外，还可以与其他抗肿瘤药物联合使用，比如与 CDK4/6 抑制剂、PI3K/mTOR 抑制剂联用治疗 RAS 突变的非小细胞型肺癌[43]。

3.1.4　MK-8353　MK-8353（**5**）是通过改善 SCH772984 的 PK 而优化得到的（ERK1：IC_{50} = 20 nmol/L；ERK2：IC_{50} = 7 nmol/L）。SCH772984 是由 Merck 公司通过基于亲和力的质谱高通量平台筛选、鉴定并通过结构优化得到的 ATP 竞争性的 ERK1/2 抑制剂。分析共晶结构，发现吲唑环与铰链区的 Asp104 与 Met106 形成至关重要的氢键作用，吡咯烷与 Lys52 形成另一个关键的氢键，同时 P-loop 结构中的 Tyr34 残基翻转到 ATP 位点并堆叠到吡咯烷环的上方，导致 P-loop 结构发生扭曲，P-loop 结合口袋被打开产生一个可以被甲基取代的三唑环占据的空腔。这些结论也表明，MK-8353 对 ERK 的高选择性主要是通过变构抑制的方式实现的[44]。因此，MK-8353 不仅能够 ATP 竞争性地抑制 ERK1/2 的催化活性，还能够诱导或稳定 ERK 的构象，阻止其被 MEK 激活[45]。到目前为止 MK-8353 与帕姆单抗联用治疗晚期实体瘤已经进入Ⅰ期临床研究阶段[46]。2018 年，MK-8353 与司美替尼联用治疗晚期或转移性实体瘤也进入Ⅰ期临床研究[47]。

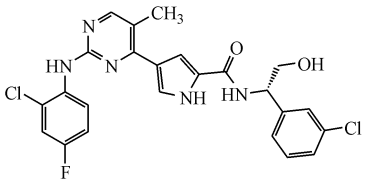
3.1.5　CC-90003　CC-90003（**6**）是不可逆的共价结合的选择性 ERK1/2 抑制剂，主要用于治疗 KRAS 突变的肿瘤，2015 年进入Ⅰ期临床研究。但是由于在Ⅰ期临床试验中，其最大耐受剂量（MTD）结果不令人满意，目前已经暂停了其临床试验[48]。经过分析共晶复合物，发现 2-氨基嘧啶与铰链区形成至关重要的氢键作用，而丙烯酰胺基团则与 Cys（ERK1：Cys183；ERK2：Cys164）形成不可逆的共价结合作用[49]。

3.2　尚处于临床前研究阶段的 ERK 抑制剂

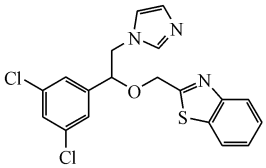
除了上述介绍的已经进入临床的化合物，目前还有很多的 ERK 抑制剂处于临床前阶段或生物活性评价阶段。这些化合物主要包括 FR180204（**11**）、VTX-11e（**12**）、BL-EI-001（**13**）。



FR180204（**11**）



VTX-11e（**12**）



BL-EI-001（**13**）

3.2.1　FR180204　Ohori 等[50]通过高通量筛选得到了 ATP 竞争性的 ERK1/2 抑制剂 FR180204（**11**），对 ERK1 和 ERK2 的 IC_{50} 分别为 0.51 μmol/L 和 0.33 μmol/L。

通过分析 FR180204 与 ERK2 的共晶复合物（图 5），发现 FR180204 占据了 ERK2 的 ATP 结合口袋。FR180204 结构中的吡唑并哒嗪环 2′位的氮原子与 Met108 形成氢键相互作用，3′位的氨基与 Gln105 和 Asp106 形成氢键作用，吡唑并吡啶环 3 位的氮原子与 Lys54 形成氢键作用。同时，FR180204 结构中吡唑并哒嗪环与 Leu156 存在 CH-π 型相互作用，吡唑并吡啶环与 Cys166 存在 SH-π

型相互作用。此外,在共晶复合物中还观察到,甘氨酸富集环采取了一种有利于与FR180204结合的优势构象。这些独特的相互作用模式增强了FR180204对ERK2的选择性抑制,使其对p38α的选择性高达30倍,对MEK1、MKK4、IKKα等其他激酶的选择性高100倍以上。

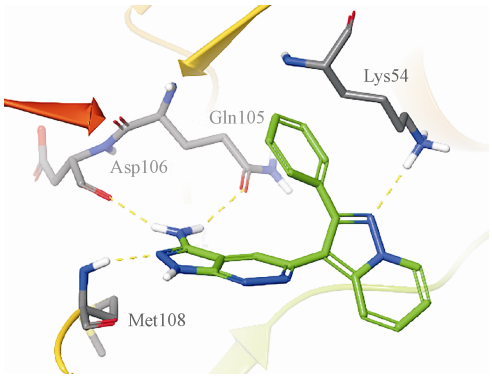


图5 FR180204与ERK2的共晶复合物(PDB:1TVO)

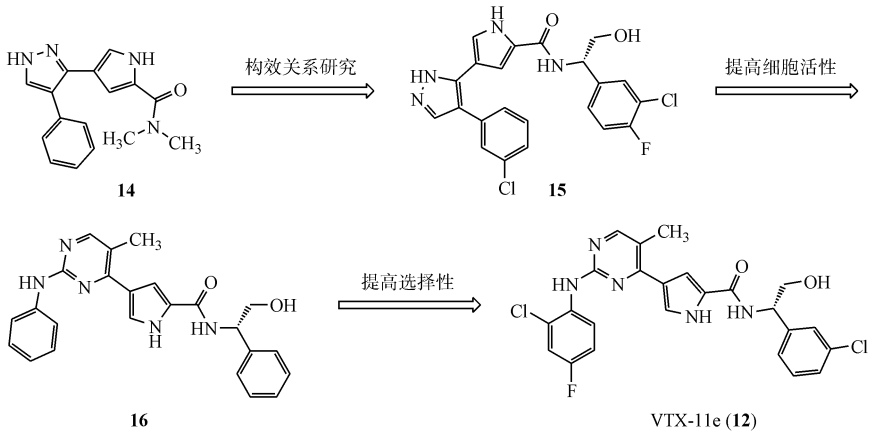
在Mv1Lu貂肺上皮细胞中,FR180204能够剂量依赖性地抑制TGFβ诱导的AP-1的激活,其IC_{50}为3.1 μmol/L。动物实验结果表明,在CIA小鼠模型中,FR180204能够明显改善关节炎症状并恢复体重损失[51]。在登革病毒(DENV)感染的小鼠模型中,FR180204通过抑制ERK1/2的磷酸化,抑制肝细胞凋亡,减轻登革病毒诱导的肝损伤[52]。

目前,FR180204仍处于临床前的研究阶段,未见相关的临床试验报道。

3.2.2 VTX-11e Vertex制药公司[53]通过高通量筛选得到具有吡唑并吡咯结构的化合物**14**,其对ERK的K_i为2.3 μmol/L。通过对化合物**14**与ERK共晶结构的分析(图6-A),发现化合物**14**结构中的吡唑环能够与ERK铰链区的Met106、Asp104形成至关重要的氢键作用。同时,酰胺键上的羰基能够与Lys52形成氢键作用,吡咯环上的NH能够与门控残基Gln103形成氢键作用,苯基能够与甘氨酸富集环结构中的Val37形成疏水作用。根据以上晶体结构信息,研究人员对化合物进行结构优化,发现具有(*S*)-苯基甘氨醇结构的化合物**15**不仅增加了与Lys52的疏水相互作用,羟甲基的引入还能与Asn152、Asp165形成氢键作用,从而有利于化合物与ERK结合构象的稳定。此外,(*S*)-苯基甘氨醇结构上的卤素取代能够填充疏水空腔并与glycine-rich loop结构形成相互作用(图6-B)。这些结合上的优势,使得化合物**15**表现出较好的ERK抑制活性(K_i = 0.002 μmol/L)和选择性。但是,化合物**15**的细胞活性不够理想,在Colo205人结肠癌细胞增殖测试中,其IC_{50}仅为0.54 μmol/L。

为了提高化合物的细胞活性,将化合物**15**结构中与铰链区有相互作用的吡唑环替换为氨基嘧啶环,增强了化合物与铰链区的氢键作用,得到了先导化合物**16**。但是通过分析共晶结构(图6-C),发现与化合物**15**相比,化合物**16**吡咯环翻转了将近180°,导致了化合物对激酶的选择性大大降低。与化合物**15**相比,先导化合物**16**对GSK3、AuroraA和CDK2的抑制活性提高了250倍以上[54]。

为了提高先导化合物**16**对ERK的选择性,研究人员对苯胺部分和苯基甘氨醇部分进行结构优化,最终得到化合物VTX-11e(**12**)。VTX-11e是有效的高选择性ERK2抑制剂,其对ERK2的K_i小于2.0 nmol/L,对GSK3、AuroraA和CDK2有200倍以上的选择性,对受测的其他激酶的选择性更是大于500倍[54]。



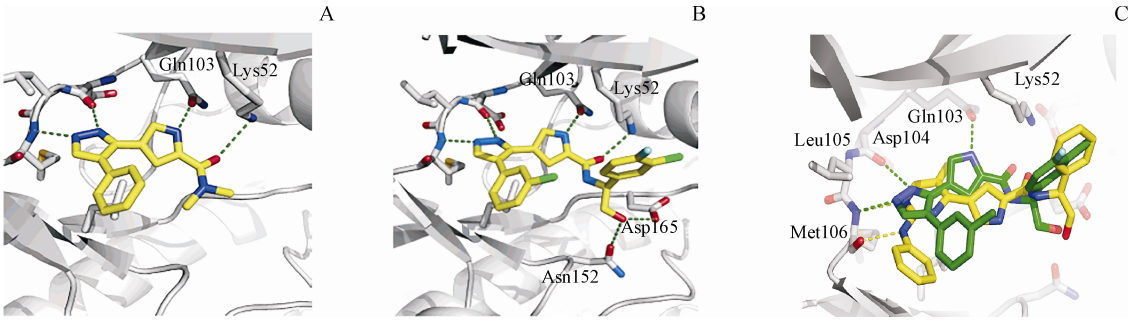


图 6　化合物与 ERK2 的共晶复合物和叠合图

A: 化合物 **14** 与 ERK2 的共晶复合物[53] (PDB:2OJG); B: 化合物 **15** 与 ERK2 的共晶复合物[53] (PDB:2OJJ); C: 化合物 **15**（绿色）和 **16**（黄色）空间取向的比较[54] (PDB:3I5Z)

体外细胞研究结果显示，在 HT29 人结肠癌细胞增殖测试中，VX-11e 的 IC_{50} 为 48 nmol/L。体内研究结果显示，在大鼠和小鼠中，VX-11e 表现出较好的口服生物利用度。在对 BRAF/MEK 抑制剂联合治疗和 PI3K 抑制剂单独治疗均有耐药性的人黑色素瘤移植的 NSG 小鼠模型中，单独使用 VX-11e 能够抑制肿瘤组织生长；当与 PI3K 抑制剂 BKM120 联用时，能够明显抑制肿瘤生长[55]。

目前，VX-11e 仍处于临床前的生物活性测试阶段。

3.2.3　BL-EI-001　BL-EI-001（**13**）是由清华大学、四川大学、沈阳药科大学联合开发的 ERK 抑制剂，其设计策略是基于结构的药物设计，通过分子对接筛选 DrugBank 和 ZINC 得到了打分最高的 11 个化合物，然后通过生物活性测试确定先导化合物后再进行结构优化从而发现了 BL-EI-001。通过对接发现疏水基团苯环与氨基酸残基 Ile48、Val56、Ala69 和 Met125 形成疏水作用，同时 BL-EI-001 可以与 Lys71 形成两个氢键作用，与 Tyr53 形成两个 π-π 作用。然而 BL-EI-001 对肿瘤的抑制作用不是通过 Ras/Raf/MEK1/2 通路，而是通过线粒体通路来发挥抗肿瘤作用[56]。

4　总结与展望

到目前为止，已有多个 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂应用于临床并取得了较好的肿瘤治疗效果。但是，在长期服用该类药物治疗肿瘤的过程中，不可避免的产生了耐药性问题。在对肿瘤耐药机制的研究中发现，原本被抑制的 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路被重新激活，其主要原因是 RAF 和 MEK 的突变导致其对现有药物治疗的不敏感，从而引起患者肿瘤复发，治疗失败。本课题组通过骨架跃迁的药物设计策略，发现了一类异吲哚-1-酮类化合物对 ERK 具有较好的抑制作用，在 KRAS 和 BRAF 突变的肿瘤中体现出良好的抗增殖活性[57]。因此，通过靶向抑制 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路中关键的下游蛋白 ERK，能够再次抑制重新活化的该信号通路，达到治疗耐药性肿瘤的目的。

虽然与 RAF 和 MEK 抑制剂深入的研究进展相比，ERK 抑制剂的研发较为滞后，但是以 ERK 为靶点来特异性阻断 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路的药物研发策略正越来越受到人们的重视。目前，已有多个 ERK 抑制剂处于临床或临床前研究阶段。

随着 ERK 抑制剂的不断研发以及临床研究的逐步深入，ERK 抑制剂有望成为继 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂之后的新一代 MAPK 信号通路相关药物，克服 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂的耐药性问题，并在肿瘤的临床治疗方面产生积极而深远的影响。

参 考 文 献

[1]　Liu QH, Shi ML, Sun C, *et al*. Role of the ERK1/2 pathway in tumor chemoresistance and tumor therapy [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25**(2): 192-197.

[2]　Wang X, Zhang PH. Advances in research on the modulation of autophagy by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *J China Pharm Univ*（中国药科大学学报）, 2017, **48**(1): 110-116.

[3]　Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(12): 928-942.

[4] Yu ZT, Ye SQ, Hu GY, *et al*. The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy [J]. *Future Med Chem*, 2015, **7**(3): 269-289.

[5] Uehling DE, Harris PA. Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25**(19): 4047-4056.

[6] Menon MB, Gaestel M. TPL2 meets p38MAPK: emergence of a novel positive feedback loop in inflammation [J]. *Biochem J*, 2016, **473**(19): 2995-2999.

[7] Lei ZY, van Mil A, Brandt MM, *et al*. MicroRNA-132/212 family enhances arteriogenesis after hindlimb ischaemia through modulation of the Ras-MAPK pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, **19**(8): 1994-2005.

[8] Kim EK, Choi EJ. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2015, **89**(6): 867-882.

[9] Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, **109**: 314-341.

[10] Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, *et al*. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, **15**(10): 577-592.

[11] Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease [J]. *Cell*, 2017, **170**(1): 17-33.

[12] Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors [J]. *Pharmacol Res*, 2015, **100**: 1-23.

[13] Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, **16**(5): 281-298.

[14] An S, Yang Y, Ward R, *et al*. Raf-interactome in tuning the complexity and diversity of Raf function [J]. *FEBS J*, 2015, **282**(1): 32-53.

[15] Cseh B, Doma E, Baccarini M. "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway [J]. *FEBS Lett*, 2014, **588**(15): 2398-2406.

[16] Okumura S, Jänne PA. Molecular pathways: the basis for rational combination using MEK inhibitors in KRAS-mutant cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, **20**(16): 4193-4199.

[17] Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, **36**(2): 65-77.

[18] Buscà R, Christen R, Lovern M, *et al*. ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1 [J]. *BMC Evol Biol*, 2015, **15**: 179.

[19] Kidger AM, Sipthorp J, Cook SJ. ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, **187**: 45-60.

[20] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, **66**(2): 105-143.

[21] Buscà R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK_1 and ERK_2 map kinases: specific roles or functional redundancy [J]? *Front Cell Dev Biol*, 2016, **4**: 53.

[22] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions [J]. *Growth Factors*, 2006, **24**(1): 21-44.

[23] Houles T, Roux PP. Defining the role of the RSK isoforms in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, **48**: 53-61.

[24] Casalvieri KA, Matheson CJ, Backos DS, *et al*. Selective targeting of RSK isoforms in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2017, **3**(4): 302-312.

[25] Asano E, Maeda M, Hasegawa H, *et al*. Role of palladin phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in cell migration [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(12): e29338.

[26] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, *et al*. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1813**(9): 1619-1633.

[27] Hobbs GA, der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2016, **129**(7): 1287-1292.

[28] Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, *et al*. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, **14**(7): 455--467.

[29] Jetschke K, Viehweger H, Freesmeyer M, *et al*. Primary pineal malignant melanoma with B-Raf V600E mutation: a case report and brief review of the literature [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2015, **157**(7): 1267-1270.

[30] Sogabe S, Togashi Y, Kato H, *et al*. MEK inhibitor for gastric cancer with MEK1 gene mutations [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, **13**(12): 3098-3106.

[31] Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, *et al*. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma [J]. *Nat Genet*, 2011, **44**(2): 133-139.

[32] Murugan AK, Dong JL, Xie JW, *et al*. MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas [J]. *Cell Cycle*, 2009, **8**(13): 2122-2124.

[33] Arcila ME, Drilon A, Sylvester BE, *et al*. MAP2K1 (MEK1) mutations define a distinct subset of lung adenocarcinoma associated with smoking [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, **21**(8): 1935-1943.

[34] Roskoski R Jr. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers [J]. *Pharmacol Res*, 2019, **142**: 151-168.

[35] Jaiswal BS, Durinck S, Stawiski EW, *et al*. ERK mutations and amplification confer resistance to ERK-inhibitor therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, **24**(16): 4044-4055.

[36] Qin JZ, Xin H, Nickoloff BJ. Specifically targeting ERK1 or

ERK2 kills melanoma cells[J]. *J Transl Med*, 2012, **10**: 15.

[37] Hatzivassiliou G, Liu B, O'Brien C, *et al*. ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, **11**(5): 1143-1154.

[38] Blake JF, Gaudino JJ, De Meese J, *et al*. Discovery of 5, 6, 7, 8-tetrahydropyrido[3, 4-d]pyrimidine inhibitors of Erk2 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, **24**(12): 2635-2639.

[39] Ren L, Grina J, Moreno D, *et al*. Discovery of highly potent, selective, and efficacious small molecule inhibitors of ERK1/2 [J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(4): 1976-1991.

[40] Blake JF, Burkard M, Chan J, *et al*. Discovery of (*S*)-1-(1-(4-Chloro-3-fluorophenyl)-2-hydroxyethyl)-4-(2-((1-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)amino)pyrimidin-4-yl)pyridin-2(1*H*)-one (GDC-0994), an extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) inhibitor in early clinical development[J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(12): 5650-5660.

[41] Germann UA, Furey BF, Markland W, *et al*. Targeting the MAPK signaling pathway in cancer: promising preclinical activity with the novel selective ERK1/2 inhibitor BVD-523 (ulixertinib)[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, **16**(11): 2351-2363.

[42] Germann U, Furey B, Roix J, *et al*. The selective ERK inhibitor BVD-523 is active in models of MAPK pathway-dependent cancers, including those with intrinsic and acquired drug resistance[J]. *Cancer Res*, 2015, **75**: 4693.

[43] U.S. National Library of Meidcine. A study of LYA3214996 administered alone or in combination with other agents in participants with advanced/metastatic cancer[EB/OL]. (2019-09-17) [2019-03-14]. https://clinicaltrials. gov/ct2/show/ NCT02857270.

[44] Chaikuad A, Tacconi EM, Zimmer J, *et al*. A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, **10**(10): 853-860.

[45] Boga SB, Deng YQ, Zhu L, *et al*. MK-8353: discovery of an orally bioavailable dual mechanism ERK inhibitor for oncology [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, **9**(7): 761-767.

[46] U.S. National Library of Meidcine. Study of MK-8353 in combination with pembrolizumab (MK-3475) in participants with advanced malignancies (MK-8353-013)[EB/OL]. (2019-07-23[2019-03-14].https://clinicaltrials.gov/ct2/show/ CT02972034.

[47] U.S. National Library of Meidcine. Study of MK-8353 + Selumetinib in Advanced/Metastatic Solid Tumors (MK-8353-014) [EB/OL]. (2019-07-22)[2019-03-14]. https://clinicaltrials. gov/ct2/show/ NCT03745 989.

[48] U.S. National Library of Meidcine. Safety and PK Study of CC-90003 in Relapsed/Refractory Solid Tumors[EB/OL]. (2016-08-22) [2019-03-14]. https://clinical trials. gov/ct2/show/ NCT02313012.

[49] Aronchik I, Dai YM, Labenski M, *et al*. Efficacy of a covalent ERK1/2 inhibitor, CC-90003, in KRAS-mutant cancer models reveals novel mechanisms of response and resistance[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, **17**(2): 642-654.

[50] Ohori M, Kinoshita T, Okubo M, *et al*. Identification of a selective ERK inhibitor and s tructural determination of the inhibitor-ERK2 complex[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **336**(1): 357-363.

[51] Ohori M, Takeuchi M, Maruki R, *et al*. FR180204, a novel and selective inhibitor of extracellular signal-regulated kinase, ameliorates collagen-induced arthritis in mice [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2007, **374**(4): 311-316.

[52] Sreekanth GP, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, *et al*. Role of ERK1/2 signaling in dengue virus-induced liver injury[J]. *Virus Res*, 2014, **188**: 15-26.

[53] Aronov AM, Baker C, Bemis GW, *et al*. Flipped out: structure-guided design of selective pyrazolylpyrrole ERK inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2007, **50**(6): 1280-1287.

[54] Aronov AM, Tang Q, Martinez-Botella G, *et al*. Structure-guided design of potent and selective pyrimidylpyrrole inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERK) using conformational control[J]. *J Med Chem*, 2009, **52**(20): 6362-6368.

[55] Krepler C, Xiao M, Sproesser K, *et al*. Personalized preclinical trials in BRAF inhibitor-resistant patient-derived xenograft models identify second-line combination therapies [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, **22**(7): 1592-1602.

[56] Liu B, Fu LL, Zhang C, *et al*. Computational design, chemical synthesis, and biological evaluation of a novel ERK inhibitor (BL-EI001) with apoptosis-inducing mechanisms in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(9): 6762-6775.

[57] Ji DZ, Zhang LZ, Zhu QH, *et al*. Discovery of potent, orally bioavailable ERK1/2 inhibitors with isoindolin-1-one structure by structure-based drug design[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **164**: 334-341.

中国药科大学学报
Journal of China Pharmaceutical University 2020,51(3):270 – 276

基于黑磷的药物递送系统在肿瘤诊疗中的研究进展

杨慧珍,牟伟伟,刘永军*,张 娜**

(山东大学药学院,天然产物化学生物学教育部重点实验室,济南 250012)

摘 要 黑磷作为二维材料的新成员,因具有良好的生物降解性、生物相容性、随层数可调的直接带隙、超大的比表面积等优良特性,在光声成像、光热光动力治疗、药物装载等领域中展现出良好的应用前景。由于黑磷具有易氧化、易降解的特点,利用相对稳定的脂质材料或聚合物材料对其进行包被,构建基于黑磷的药物递送系统,在肿瘤治疗和诊断中显示出较大的潜力,成为药物递送研究中的新热点。本文详细介绍了黑磷在肿瘤诊疗中的作用,并重点归纳了近年来基于黑磷的药物递送系统的设计及其在肿瘤诊疗中的研究进展,以期为黑磷的研究和应用提供参考和思路。

关键词 黑磷;药物递送;肿瘤诊疗;光声成像;光热和光动力治疗

中图分类号 R945 **文献标志码** A **文章编号** 1000 –5048(2020)03 –0270 –07

doi:10. 11665/j. issn. 1000 –5048. 20200303

引用本文 杨慧珍,牟伟伟,刘永军,等.基于黑磷的药物递送系统在肿瘤诊疗中的研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(3):270 – 276.

Cite this article as: YANG Huizhen, MU Weiwei, LIU Yongjun, *et al*. Research progress of drug delivery system based on black phosphorus in tumor diagnosis and treatment[J].*J China Pharm Univ*,2020,51(3):270 – 276.

Research progress of drug delivery system based on black phosphorus in tumor diagnosis and treatment

YANG Huizhen, MU Weiwei, LIU Yongjun*, ZHANG Na**

Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract As a new member of two-dimensional materials, black phosphorus has shown good application prospects in the fields of photoacoustic imaging, photothermal photodynamic therapy, and drug loading due to its excellent characteristics such as good biodegradability, biocompatibility, thickness-dependent tunable direct band-gap, and high surface-to-mass ratio. Because black phosphorus has the characteristics of easy oxidation and degradation, it is coated with relatively stable liposomes or polymeric materials to construct a black phosphorus-based drug delivery system, which shows great potential in tumor treatment and diagnosis and has become a new focus in drug delivery research. In this paper, we introduce the role of black phosphorus in tumor diagnosis and treatment in detail, and summarize the design of black phosphorus-based drug delivery system in recent years as well as its research progress in tumor diagnosis and treatment, in order to provide reference for the research and application of black phosphorus.

Key words black phosphorus; drug delivery; tumor diagnosis and treatment; photoacoustic imaging; photothermal and photodynamic therapy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773652) and the Young Scholar Program of Shandong University(No. 2017WLJH40)

收稿日期 2020-03-16
通信作者 *Tel:0531-88382015 E-mail:liuyongjun@sdu. edu. cn
**Tel:0531-88382015 E-mail:zhangnancy9@sdu. edu. cn
基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81773652);山东大学青年学者未来计划资助项目(No. 2017WLJH40)

黑磷（black phosphorus，BP）是一种非金属层状半导体，其于 1914 年被 Bridgman 首次发现[1]。BP 可以根据层数或形态进行分类：根据层数可分为单层 BP、双层 BP 和多层 BP；根据形态可分为 BP 量子点（BP quantum dots，BPQDs）、BP 纳米片（BP nanosheet，BPNSs）、BP 纳米颗粒等。BP 具有正交结构且是反应活性最低的磷同素异形体，其晶格是一个相互链接的六元环，如图 1-A 所示。二维 BP 在相互垂直的两个方向上分别呈锯齿状（zigzag direction）和扶手椅状（armchair direction）排布，导致其具有明显的结构各向异性[2]，如图 1-B 所示。这种独特的结构使 BP 形成诸多特殊性质，包括巨大的比表面积、良好的机械柔韧性、随层数可调的直接带隙、超高的光热转换效率等。此外，BP 还具备良好的生物相容性与生物可降解性。基于以上优势，BP 纳米材料在光声成像（photoacoustic imaging，PA）、光热治疗（photothermal therapy，PTT）、光动力治疗（photodynamic therapy，PDT）、药物装载等生物医学研究领域展现了良好的应用前景。然而，BP 的易氧化降解特性可导致 BP 光学性能迅速退化，限制了其应用。利用脂质或聚合物材料对其进行包被，构建基于 BP 的药物递送系统，提高 BP 的稳定性，同时实现其肿瘤部位定位递送，提高肿瘤的诊疗效果成为目前研究的热点。

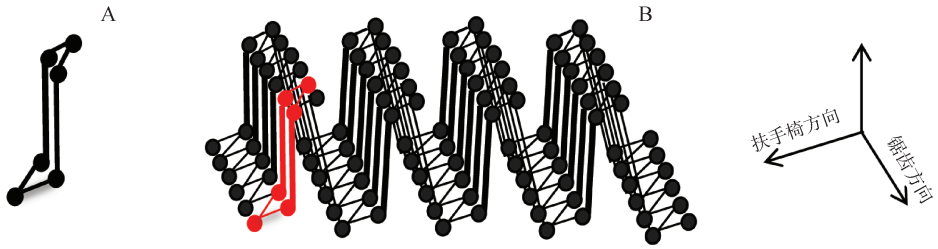


图 1　黑磷结构 (A)黑磷晶格结构图 (B)黑磷晶体结构图

1　黑磷在肿瘤诊疗中的作用

1.1　光声成像

PA 是一种在医学领域中迅速成熟的成像技术，它利用光声效应（光进来，声音输出）将光学成像和声学成像的对比度、特异性、高分辨率结合起来[3]。PA 为非侵入性生物医学成像技术，依靠生物组织对光的特异性吸收进行成像，能在 5~6 cm 深的组织获得高空间分辨率图像，可应用于肿瘤的鉴别[4]。而在肿瘤的早期阶段，许多疾病特征分子在可见光区（400~750 nm）和传统的近红外区（750~900 nm）下光吸收能力较弱，受到激光激发时无法产生足够的光声信号以达到理想的成像对比度[5]。因此，利用具有特异性光学吸收特性的纳米探针作为光声外源造影剂可以提高成像对比度，改善图像分辨率，对于 PA 的临床应用具有重要的意义。

BP 由于其独特的电子和光学特性在光检测能力上表现出巨大潜力，成为光声外源材料造影剂的新材料。单层 BP 具有从 0.3~2.0 eV 的可调谐带隙，多层 BP 可以允许在宽光谱区域上的光检测[6]。如 Sun 等[7]利用钛配体 TiL_4 稳定 BPQDs 得到 TiL4@BPQDs，TiL4@BPQDs 在 680 nm 处展现出最强 PA 信号。浓度为 22.0×10^{-6} mol/L 时，TiL4@BPQDs 的 PA 信号较金纳米棒高了近 7.29 倍。在 MCF7 荷瘤 BALB/c 裸鼠中，即便是微小肿瘤病变（仅有 63 万个细胞），TiL4@BPQDs 也具备优良的 PA 成像能力，表明 TiL4@BPQDs 具有良好的 PA 性能和临床应用前景。

1.2　光热/光动力治疗

PTT 和 PDT 都属于光疗，具有低侵入性和高治疗效率的优点。PTT 利用富集在肿瘤部位的光热试剂，在入射光激发下，利用光热转换效应产生热量，使肿瘤局部温度升高杀伤肿瘤细胞[8]。PDT 利用光动力效应，在特定波长照射下，活化聚集在肿瘤组织的光敏药物，将能量传递给周围的氧，生成单态氧杀伤肿瘤细胞[9]。BP 具有较大的消光系数以及将近红外光转化为热的能力，BPQDs 和 BPNSs 可应用于肿瘤 PTT 和 PDT[10-11]。例如，BPQDs 光热转换效率达到 28.4%，在 808 nm 处消光系数为 14.8 $L\cdot g^{-1}\cdot cm^{-1}$。BPQDs 的光热性能即使经过 5 次

间断的激光循环也无明显下降趋势,具有良好的光稳定性[12]。BPNSs是产生单线态氧的有效光敏剂,用玫瑰红作为标准光敏剂,BPNSs产生单线态氧的量子产率是0.91,可用于肿瘤PDT[13]。值得注意的是,BP的尺寸和生物稳定性是影响其PDT和PTT能力的重要因素:聚合物等材料的包被在增强BPNSs生物稳定性的同时,可增强BP固有的PTT和PDT效应;一般来说,尺寸较大BPNSs具有更好PDT和PTT能力[14]。

1.3 药物装载

BP的高比表面积和褶皱的晶格结构,可以用于药物的装载。同时BP在水中带负电,荷正电的小分子药物可以通过静电作用封装在BP褶皱层中[15]。例如,Chen等[16]利用BPNSs作为药物传递系统,以荷正电的阿霉素(doxorubicin, DOX)作为模型药物,通过静电作用修饰在带负电荷BPNSs表面制备BPNSs@DOX。结果显示由于BPNSs较高比表体积和多褶皱结构,DOX负载量可达950%。在近红外光808 nm照射下,BPNSs@DOX引起肿瘤组织温度升高而导致肿瘤消融,同时,BPNSs@DOX表现出光响应性药物释放特性,近红外光照射时DOX释放加速,增强治疗效果。Jin等[17]设计了一种基于BPNSs的药物释放系统,研究了负载氟西汀(fluoxetine, Flu)BPNSs的抗抑郁作用。Flu通过静电作用吸附在BPNSs表面制备BP-Flu。结果显示BP-Flu具有较高Flu承载能力,药物负载量可以达到700%。在近红外光808 nm照射下,BP-Flu温度以剂量依赖性方式升高,30 min后90%以上Flu可以释放出来,表现出良好的光响应特性。

1.4 生物活性磷基药物疗法

最近研究发现,BP易被肿瘤细胞通过胞吞作用摄取,主要通过"巨胞饮→晚期内吞体→溶酶体"和"小窝蛋白介导的摄取通路"进入细胞,并被快速降解,在胞内产生大量磷酸根阴离子[18-19](如图2)。磷酸阴离子的升高影响细胞ATP水解,导致肿瘤细胞内环境改变,引起G_2/M期阻滞,抑制肿瘤细胞增殖。被抑制的肿瘤细胞通过靶向性凋亡和自噬途径进入程序化细胞死亡。研究团队将这一源自BP天然生物活性的肿瘤细胞选择性杀伤作用称为"生物活性磷基药物疗法(bioactive phosphorus-based therapy)"。该研究是BP的新应用之一,目前尚在研究中。

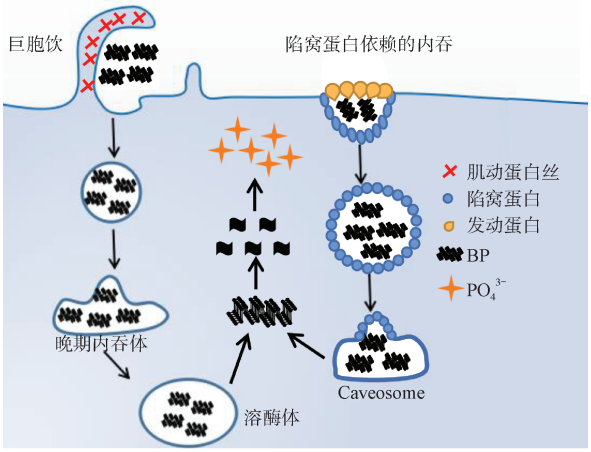


图2 生物活性磷基药物疗法作用机制图

2 黑磷递送系统构建策略

目前已有多种基于BP的递送系统被报道[20-21],根据体系的不同,可分为纳米系统和原位凝胶系统。纳米系统使用聚合物或脂质膜对BP进行包被,克服BP易氧化和易化学降解的缺点,提高其在血液循环中的稳定性,增加BP在肿瘤组织中蓄积,提高BP进入肿瘤细胞的能力,获得理想的肿瘤治疗效果。原位凝胶系统使用原位凝胶对BP进行包裹,增强BP稳定性,延长药物在用药部位滞留时间,实现BP在肿瘤组织或肿瘤细胞内的可控释放,提高肿瘤治疗效果。

2.1 黑磷纳米系统

2.1.1 聚合物包被黑磷 聚合物被认为是一种很有优势的包裹材料,一般具有相对较差的光吸收和热导率,不影响BP光学性质,可以隔离水、氧与BP的接触,提高BP的稳定性。通常选择良好生物相容性及生物可降解性的材料,如聚多巴胺(polydopamine, PDA)和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(lactic-co-glycolic acid, PLGA)等。

Shao等[22]采用乳化溶剂挥发法,利用PLGA包裹BPQDs,制备了核壳结构载BPQDs的纳米球(BPQDs/PLGA)。疏水性的PLGA不仅可以将BPQDs与氧气和水隔离,提高BPQDs的稳定性,还可以控制BPQDs的降解速率。PLGA包裹后,BPQDs可以保持8 d以上的光热稳定性,同时降低BPQDs的降解速率。Li等[23]采用自聚合法制备PDA包覆的BPQDs(BP@PDA)。其中富含苯酚基

团的 PDA 能够清除活性氧（reactive oxygen species，ROS），可有效防止 BPQDs 氧化，从而提高稳定性。实验证明 10 d 后，BP@PDA 中 BPQDs 降解率为 10%，而纯 BPQDs 降解率为 90%。此外，修饰 PDA 后可使 BPQDs 的光热转换效率从 22.6% 提高到 64.2%。与 PBS 对照组相比，在荷 A375 瘤裸鼠给予 BP@PDA，在近红外光 808 nm 照射下有效抑制了肿瘤生长，抑制率接近 100%（$P<0.001$）。

2.1.2　脂质体包被黑磷　脂质体（liposome）具有良好的安全性与稳定性，可与细胞膜融合促进细胞摄取，是临床广泛使用的纳米药物载体之一。构建 liposome-BP 体系，具备脂质体和 BP 双重优势，有助于提高 BP 的稳定性。通常可选择具有光响应和热响应的新型脂质体，如光敏脂质体和热敏脂质体等。在提高 BP 稳定性基础上，同时提高 BP 靶向性和光热能力[24-25]。

研究人员报道了一种 liposome-BPQDs[26]，在 5 周内，liposome-BPQDs 的光热效应减弱速度（约 25%）小于 BPQDs（约 40%），且随着时间延长，BPQDs 颜色发生明显变化，表明 BPQDs 发生降解；而 liposome-BPQDs 颜色几乎没有变化，说明 Liposome-BPQDs 稳定性优于 BPQDs。Zhang 等[25]利用热敏脂质体包裹 BPQDs 和万古霉素（vancomycin，vanco）制备 BPQDs-vanco@liposome，脂质体包裹能有效防止 BPQDs 的降解并保持其光热性能。在近红外照射下，BPQDs 光热效应引起的局部升温，导致 BPQDs-vanco@liposome 结构破坏释放万古霉素杀灭细菌。

2.2　原位凝胶包被黑磷

原位凝胶具有最小侵入性和潜在控释能力。原位凝胶包被 BP，有助于提高 BP 稳定性，同时具有一定的缓释能力。如选择温度敏感型凝胶包被 BP，设计光控可逆相变的温敏型凝胶，可实现通过波长、功率密度、曝光时间等光参数对 BP 释放速率的远程调节。此外，利用 BP 的光热转化能力，升高水凝胶温度，可加速温敏类水凝胶在治疗部位的分布。

Qiu 等[27]用低熔点琼脂糖和聚乙二醇化 BPNSs 制备了可生物降解的智能水凝胶 BP@Hydrogel。BP@Hydrogel 瘤内注射后为凝胶态，在近红外光照射下，BP 将光能转化为热能，BP@Hydrogel 逐渐软化、熔融和降解，BP 释放。通过调节处方因素如琼脂糖、BP 浓度等和光照参数如光强、暴露时间等可以控制 BP 释放速率。荷瘤裸鼠瘤内注射 BP@Hydrogel 后，在光照下实现可控的肿瘤光热治疗，有效抑制肿瘤生长。Shao 等[28]将 BPNSs 与热敏水凝胶［聚（d，l-丙交酯）-聚乙二醇-聚（d，l-丙交酯）（PDLLA-PEG-PDLLA：PLEL）］结合，制备 BP@PLEL 水凝胶。BP@PLEL 具有良好的光热性能。在裸鼠荷 HeLa 细胞肿瘤模型中，手术切除主体肿瘤后在切除处喷射 BP@PLEL，在 808 nm 红外照射下，BP@PLEL 快速形成胶化膜，同时光热作用清除术后残留的肿瘤组织。荷瘤小鼠经手术和 PTT 治疗后 16 d 内完全治愈，可存活两个月以上，无复发。相反，仅接受肿瘤切除手术的荷瘤小鼠表现出高复发率（80%）。

3　基于黑磷的药物递送系统

药物耐药性、肿瘤多样性以及患者个体差异等限制了单一疗法的临床治疗效果，因而肿瘤治疗常用联合治疗方案。BP 具有良好 PTT/PDT 治疗效果，可联合其他治疗手段用于肿瘤的协同治疗，也可利用其 PA 能力，实现肿瘤的诊疗一体化。

3.1　化学光疗联合治疗

化疗是目前治疗肿瘤最主要的手段之一，将抗肿瘤药物与 BP 联合，可实现光疗和化疗的联合治疗，提高肿瘤治疗效果。例如，Tao 等[19]首次通过静电作用将 DOX 负载到聚乙二醇化 BPNSs 上，制备了 BP-PEG/DOX NSs。在 808 nm 红外照射下产生局部高热，用于肿瘤光热治疗，同时驱动 DOX 释放。BP-PEG/DOX NSs 表现出 pH 和近红外光响应型药物释放特性。靶向因子叶酸（folic acid，FA）进一步修饰 BP-PEG/DOX NSs，研发了 BP-PEG-FA/DOX NSs 递送系统。与 BP-PEG-FA/DOX NSs 治疗组（约 55%）相比，BP-PEG-FA/DOX NSs+NIR 治疗组的肿瘤抑制明显，抑制率约为 91%。Zhang 等[29]通过静电作用，在 BPNSs 表面包覆了盐酸米托蒽醌（mitoxantrone hydrochloride，MTX）和透明质酸（hyaluronic acid，HA），研制了共给药系统（BP@MTX-HA NSs）。BP@MTX-HA NSs 不仅具有良好的物理稳定性和光热转换效率，而且具有独特的 pH/NIR 激光触发释药能力。在荷 4T1 瘤小鼠中，与生理盐水组比较，BP+NIR 治疗组和 MTX 治疗组有一定的治疗作用，肿瘤负荷值分别为

2.15%和2.22%;而BP@MTX-HA NSs+NIR组肿瘤抑制效果最优,肿瘤负荷值为1.13%(P<0.05)。Wang等[30]将BPQDs以及化疗药多烯紫杉醇(docetaxel, DTX)共载入PLGA粒中,制备了BP/DTX@PLGA。在近红外光照射下,BP/DTX@PLGA 96 h累积释放率约为64%,显著高于无照射组约38%(P<0.05),同时表现出良好的热化疗协同治疗效果。

3.2 免疫光疗联合治疗

近年来,免疫治疗作为一种新型抗肿瘤手段备受关注,其通过激活自身免疫系统杀伤肿瘤细胞,具有特异性和作用时间长的特点[31]。将PTT/PDT与免疫治疗联合,PTT/PDT直接杀伤肿瘤组织,凋亡的肿瘤细胞导致肿瘤抗原的释放,促进抗原递呈从而加强免疫治疗,具备协同抗肿瘤作用[32]。例如Li等[33]通过PEG和ROS敏感的聚丙硫醚[poly(propylene sulfide), PPS]接枝BPQDs自组装制备了载免疫佐剂CPG寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotides, CPG ODNs)的近红外/ROS敏感的BPQDs囊泡(BPNVs-CPG)。在近红外光照射下,BPNVs-CPG中BPQDs产生ROS有效地诱导肿瘤细胞死亡,引发原位免疫源性细胞死亡;BPNVs-CPG表面的ROS敏感型聚合物PPS被降解从而引发BPNVs-CPG解组装,释放CpG。CpG被抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)吞噬,提升APCs的成熟程度与抗原呈递能力,继而引发机体的抗肿瘤免疫应答,实现对肿瘤的免疫光疗联合治疗。与对照组比较,CPG治疗组表现为轻度抑制,BPNVs治疗组表现为中度抑制,BPNVs-CPG+NIR治疗组肿瘤抑制明显。Ye等[34]利用肿瘤细胞膜作为抗原(cancer cell membrane nanovesicle, CCNVs)包裹BPQDs制备纳米肿瘤疫苗(BPQD-CCNVs)。然后将BPQD-CCNVs、集落刺激因子(granulocyte-macrophage clony-stimulating factor, GM-CSF)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)共装载于温敏水凝胶制备光热肿瘤疫苗复合物(Gel-BPQD-CCNVs)。在近红外光照射下,BPQDs产生光热效应诱导温敏水凝胶触发释放肿瘤抗原、GM-CSF和LPS,招募抗原递呈细胞捕获肿瘤抗原并实现抗原有效递呈。该载体联合aPD-1阻断免疫检查点通路,在小鼠乳腺癌和黑色素瘤模型中有效抑制了术后肿瘤复发和转移。Liang等[35]用红细胞膜(erythrocyte membranes nanovesicle, RMNV)包覆BPQDs制备红细胞膜纳米囊泡(BPQD-RMNV),并与aPD-1联用用于乳腺癌治疗。近红外照射导致4T1乳腺肿瘤细胞凋亡,促进抗原释放与递呈。同时,aPD-1解除肿瘤免疫抑制作用,增强免疫治疗效果。与对照组相比,BPQD-RMNVs+Laser+aPD-1治疗组在体内显著抑制了基底样乳腺癌的生长。

3.3 多种光疗模式联合治疗

单独使用PTT或PDT的治疗效果不够令人满意,如PTT治疗导致肿瘤内热量分布不均,PDT治疗受缺氧肿瘤微环境的限制等[36-37]。PTT与PDT协同治疗是一种很有前途的方法。BP有良好PTT和PDT能力,可用于PTT和PDT联合治疗,提高肿瘤治疗效果。Yang等[38]通过静电作用,在聚乙二醇化BPNSs表面固定了二氢卟吩e6(chlorin e6, Ce6),制备BP@PEG-Ce6用于靶向PTT/PDT联合治疗肿瘤。Ce6是一种具有近红外光吸收特性的光敏剂,用于增强BPNSs的PDT和PTT能力。BP@PEG/Ce6不仅具有良好生物相容性、物理稳定性和肿瘤靶向性,而且具有较高的光热转换效率(43.6%)。在660 nm激光照射下,BP@PEG/Ce6可有效的产生光热和ROS,光热一方面可以直接杀伤肿瘤细胞,另一方面可以加快光敏剂Ce6的释放,产生大量ROS,导致肿瘤细胞凋亡和坏死。与BP@PEG/Ce6治疗组(约27%)相比,荷4T1瘤小鼠给予BP@PEG/Ce6后,在近红外光照射下具有明显增强抗肿瘤作用,抑制率约为99%(P<0.05),实现了光热和光动力结合的肿瘤治疗。Yang等[10]将Ce6和三苯基膦(triphenylphosphine, TPP)共价修饰到PDA包埋的BPNSs(BP@PDA NSs)上,构建了靶向线粒体的BP@PDA-Ce6&TPP NSs,用于协同PTT和PDT肿瘤治疗。利用9,10-蒽基-双(亚甲基)二丙二酸作为探针检测光动力学性能,证实BP@PDA-Ce6&TPP NSs具有高效生成ROS能力。即使在低浓度和低功率条件下,BP@PDA-Ce6&TPP NSs也会引起肿瘤组织温度快速升高。表明BP@PDA-Ce6&TPP NSs具有良好PTT与PDT效应。与对照组相比,BP@PDA-Ce6&TPP NSs组小鼠肿瘤在14 d内完全治愈,证明BP@PDA-Ce6&TPP NSs具有良好的肿瘤消融效果。

3.4 诊疗一体化

诊疗一体化是一种将疾病的诊断或监测与治

疗有机结合的策略。BP具有良好PTT和PDT能力，并且是一种优良的PA造影剂，可同时用于肿瘤的诊断和治疗。Deng等[39]用葡聚糖（dextran，DEX）和聚乙烯亚胺[poly（ethyleneimine），PEI]对BP纳米粒进行改性（BP-DEX/PEI），使其具有生物相容性和稳定性。在BP-DEX/PEI纳米粒上装载靶向因子叶酸（FA）和荧光染料硫氰酸7-羟基琥珀酰亚胺酯（sulfo-cyanine7 NHS ester，Cy7-Se），分别用于肿瘤靶向PA成像和近红外荧光成像（near-infrared fluorescence imaging，NIRF）。BP-DEX/PEI-FA/Cy7纳米粒具有较高的光热转换效率（41%）和成像能力，可用于肿瘤的体内靶向成像（PA、NIRF）和PTT。与对照组相比，BP-DEX/PEI-FA/Cy7+NIR治疗组获得肿瘤图像具有更加理想的亮度和强度，肿瘤抑制明显（100%），有望用于肿瘤的诊断和治疗。

4 展　望

BP是一种新型的二维纳米材料，具有优良的PA、PTT/PDT治疗与药物装载能力，并由于其低毒性以及良好的生物相容性，成为一种极具应用前景和临床发展潜力的递送系统和治疗剂。虽然基于BP的药物递送系统在肿瘤诊疗研究中取得很大进展，但仍存在一些科学问题有待解决。（1）BP在空气中易氧化，严重限制了其应用；（2）虽然BP具有短期安全性，但长期使用是否会引起磷酸根离子过量中毒，还需要进一步考察；（3）BP在体内与生物分子或细胞相互作用的机制尚需进一步研究。为了推动BP向临床应用转化，应进一步深入研究有效抗氧化策略、BP的体内安全性和BP的生物药剂学性质等。随着现代药剂学和材料学的发展，这些问题将会逐步解决，相信在不久的将来，BP将在生物医学领域有更广泛的应用。

参 考 文 献

[1] Bridgman PW. Two new modifications of phosphorus[J]. *J Am Chem Soc*, 1914, **36**(7): 1344.

[2] Choi JR, Yong KW, Choi JY, *et al*. Black phosphorus and its biomedical applications[J]. *Theranostics*, 2018, **8**(4): 1005-1026.

[3] Moore C, Jokerst JV. Strategies for image-guided therapy, surgery, and drug delivery using photoacoustic imaging[J]. *Theranostics*, 2019, **9**(6): 1550-1571.

[4] Ding K, Zeng JF, Jing LH, *et al*. Aqueous synthesis of PEGylated copper sulfide nanoparticles for photoacoustic imaging of tumors[J]. *Nanoscale*, 2015, **7**(25): 11075-11081.

[5] Cui DD, Shi YJ. Semiconductor single-walled carbon nanotubes for deep tissues near-infrared-II photoacoustic imaging [J]. *Acta Laser Biol Sin*（激光生物学报）, 2019, **28**(5): 463-467.

[6] Ge XX, Xia ZH, Guo SJ. Recent advances on black phosphorus for biomedicine and biosensing[J]. *Adv Funct Mater*, 2019, **29**(29): 1900318.

[7] Sun ZB, Zhao YT, Li ZB, *et al*. TiL_4-coordinated black phosphorus quantum dots as an efficient contrast agent for *in vivo* photoacoustic imaging of cancer[J]. *Small*, 2017, **13**(11). doi:10.1002/smll.201602896.

[8] Tao W, Ji XY, Xu XD, *et al*. Antimonene quantum dots: synthesis and application as near-infrared photothermal agents for effective cancer therapy[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(39): 11896-11900.

[9] Li XS, Kwon N, Guo T, *et al*. Innovative strategies for hypoxic-tumor photodynamic therapy[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(36): 11522-11531.

[10] Yang XY, Wang DY, Zhu JW, *et al*. Functional black phosphorus nanosheets for mitochondria-targeting photothermal/photodynamic synergistic cancer therapy[J]. *Chem Sci*, 2019, **10**(13): 3779-3785.

[11] Zhang M, Wang WT, Cui YJ, *et al*. Near-infrared light-mediated photodynamic/photothermal therapy nanoplatform by the assembly of Fe_3O_4 carbon dots with graphitic black phosphorus quantum dots[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, **13**: 2803-2819.

[12] Sun ZB, Xie HH, Tang SY, *et al*. Ultrasmall black phosphorus quantum dots: synthesis and use as photothermal agents[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54**(39): 11526-11530.

[13] Wang H, Yang XZ, Shao W, *et al*. Ultrathin black phosphorus nanosheets for efficient singlet oxygen generation [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(35): 11376-11382.

[14] Fu HD, Li ZB, Xie HH, *et al*. Different-sized black phosphorus nanosheets with good cytocompatibility and high photothermal performance[J]. *RSC Adv*, 2017, **7**(24): 14618-14624.

[15] Qu GB, Xia T, Zhou WH, *et al*. Property-activity relationship of black phosphorus at the nano-bio interface: from molecules to organisms[J]. *Chem Rev*, 2020, **120**(4): 2288-2346.

[16] Chen WS, Ouyang J, Liu H, *et al*. Black phosphorus nanosheet-based drug delivery system for synergistic photodynamic/photothermal/chemotherapy of cancer [J]. *Adv Mater Weinheim*, 2017, **29**(5). doi:10.1002/adma.201603864.

[17] Jin LG, Hu P, Wang YY, *et al*. Fast-acting black-phosphorus-assisted depression therapy with low toxicity [J]. *Adv Mater Weinheim*, 2020, **32** (2) : e1906050. doi: 10.1002/adma.201906050.

[18] Zhou WH, Pan T, Cui HD, *et al*. Black phosphorus: bioactive

nanomaterials with inherent and selective chemotherapeutic effects[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(3): 769-774.

[19] Tao W, Zhu XB, Yu XH, *et al*. Black phosphorus nanosheets as a robust delivery platform for cancer theranostics [J]. *Adv Mater Weinheim*, 2017, **29**(1). doi:10.1002/adma.201603276.

[20] Gao NS, Nie JP, Wang HF, *et al*. A versatile platform based on black phosphorus nanosheets with enhanced stability for cancer synergistic therapy [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, **14**(11): 1883-1897.

[21] Hai L, Zhang AM, Wu X, *et al*. Liposome-stabilized black phosphorus for photothermal drug delivery and oxygen self-enriched photodynamic therapy [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2020, **3**(1): 563-575.

[22] Shao JD, Xie HH, Huang H, *et al*. Biodegradable black phosphorus-based nanospheres for *in vivo* photothermal cancer therapy[J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12967.

[23] Li ZJ, Xu H, Shao JD, *et al*. Polydopamine-functionalized black phosphorus quantum dots for cancer theranostics [J]. *Appl Mater Today*, 2019, **15**: 297-304.

[24] Abri Aghdam M, Bagheri R, Mosafer J, *et al*. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release[J]. *J Control Release*, 2019, **315**: 1-22.

[25] Zhang LL, Wang YQ, Wang J, *et al*. Photon-responsive antibacterial nanoplatform for synergistic photothermal-/pharmacotherapy of skin infection[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(1): 300-310.

[26] Chen XL, Zhou Y, Liang X, *et al*. *In vitro* study of black phosphorus quantum dot-loaded liposomes for photothermal therapy of cervical cancer[J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2019, **54**(4): 729-736.

[27] Qiu M, Wang D, Liang WY, *et al*. Novel concept of the smart NIR-light-controlled drug release of black phosphorus nanostructure for cancer therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, **115**(3): 501-506.

[28] Shao JD, Ruan CS, Xie HH, *et al*. Black-phosphorus-incorporated hydrogel as a sprayable and biodegradable photothermal platform for postsurgical treatment of cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, **5**(5): 1700848.

[29] Zhang F, Peng FF, Qin L, *et al*. pH/near infrared dual-triggered drug delivery system based black phosphorus nanosheets for targeted cancer chemo-photothermal therapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, **180**: 353-361.

[30] Wang SH, Shao JD, Li ZB, *et al*. Black phosphorus-based multimodal nanoagent: showing targeted combinatory therapeutics against cancer metastasis[J]. *Nano Lett*, 2019, **19**(8): 5587-5594.

[31] Tan SZ, Li DP, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **124**: 109821.

[32] Ma YC, Zhang YX, Li XQ, *et al*. Near-infrared II phototherapy induces deep tissue immunogenic cell death and potentiates cancer immunotherapy[J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(10): 11967-11980.

[33] Li Z, Hu YH, Fu QR, *et al*. NIR/ROS-responsive black phosphorus QD vesicles as immunoadjuvant carrier for specific cancer photodynamic immunotherapy[J]. *Adv Funct Mater*, 2020, **30**(3): 1905758.

[34] Ye XY, Liang X, Chen Q, *et al*. Surgical tumor-derived personalized photothermal vaccine formulation for cancer immunotherapy[J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(3): 2956-2968.

[35] Liang X, Ye XY, Wang C, *et al*. Photothermal cancer immunotherapy by erythrocyte membrane-coated black phosphorus formulation[J]. *J Control Release*, 2019, **296**: 150-161.

[36] Wang KK, Zhang YF, Wang J, *et al*. Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 27421.

[37] Lin Z, Liu Y, Ma XM, *et al*. Photothermal ablation of bone metastasis of breast cancer using PEGylated multi-walled carbon nanotubes[J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 11709.

[38] Yang XY, Wang DY, Shi YH, *et al*. Black phosphorus nanosheets immobilizing Ce6 for imaging-guided photothermal/photodynamic cancer therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(15): 12431-12440.

[39] Deng LJ, Xu YF, Sun CX, *et al*. Functionalization of small black phosphorus nanoparticles for targeted imaging and photothermal therapy of cancer [J]. *Sci Bull*, 2018, **63**(14): 917-924.

LncRNA调控肝脏疾病中信号转导通路的研究进展

刘 丽[1],张倩文[1],农 程[1],张 曦[1],徐小婷[1],Mohammed Ismail[1],肖 莉[2],江振洲[1,3],张陆勇[1,4],孙丽新[1,3*]

([1]中国药科大学江苏省新药筛选重点实验室,南京 210009;[2]湖州师范学院生命科学学院,湖州 313000;[3]中国药科大学江苏省药物动力学研究与评价中心,南京 210009;[4]广东药科大学药学院新药筛选与药效学评价中心,广州 510006)

摘 要 肝脏疾病的发病率逐年上升,由于肝脏疾病发病诱因复杂和发病机制尚未阐明,治愈率不够理想,迫切需要明确其作用机制以找到更有效的治疗靶点与药物。长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)作为一种长度超过200 nt的非编码RNA,是近年来肝脏疾病的研究热点。本文以肝脏疾病中主要的信号转导通路为主线,对近年来lncRNA调控肝脏疾病相关信号通路的最新研究进展进行归纳总结,详细阐述lncRNA通过调节肝脏疾病中关键的信号通路,参与细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移等多种生理过程,从而促进肝脏疾病的发生发展,为肝脏疾病的机制研究提供新的思路,为寻找治疗肝脏疾病的新靶点及生物标志物提供新的研究方向。

关键词 长链非编码RNA;肝脏疾病;信号转导通路;进展

中图分类号 R966 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0277-10

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200304

引用本文 刘丽,张倩文,农程,等.LncRNA调控肝脏疾病中信号转导通路的研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(3):277-286.

Cite this article as: LIU Li, ZHANG Qianwen, NONG Cheng, *et al*. Research progress of lncRNA regulating signal transduction pathway in liver diseases[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 277-286.

Research progress of lncRNA regulating signal transduction pathway in liver diseases

LIU Li[1], ZHANG Qianwen[1], NONG Cheng[1], ZHANG Xi[1], XU Xiaoting[1], Ismail Mohammed[1], XIAO Li[2], JIANG Zhenzhou[1,3], ZHANG Luyong[1,4], SUN Lixin[1,3*]

[1]Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; [2]College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000; [3]Jiangsu Pharmacokinetic Research and Evaluation Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; [4]Center for Drug Screening and Pharmacodynamics Evaluation, School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract The incidence of liver disease is increasing year by year. Due to the complex predisposing factors and unclear pathogenesis of liver diseases, the cure rate is still not ideal, so it is urgent to clarify its mechanism to find more effective therapeutic targets and drugs. Long non-coding RNA (lncRNA), as a non-coding RNA with a length of more than 200 nt, is a research hotspot in liver diseases in recent years. Focusing on the main signal transduction pathways in liver diseases, this review mainly summarizes the latest research progress of lncRNA in regulating liver disease-related signaling pathways, and elaborates that lncRNAs participate in various physiological processes such as cell proliferation, apoptosis, invasion, and migration by regulating key signaling pathways in liver diseases, thereby promoting the occurrence and development of liver diseases. This review provides new ideas for studying the mechanism of liver diseases, and new directions for finding new targets and biomarkers for the treatment of liver diseases.

Key words long non-coding RNA; liver disease; signal transduction pathway; progress

收稿日期 2020-03-02 * **通信作者** Tel:15195999925 E-mail:slxcpu@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81803784,No. 81573690)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81803784,No. 81573690)

肝脏是人体最大的实质性脏器,具有多种功能,被称为“物质代谢中枢”、人体内最大的“化工厂”和“清洁器”。肝脏是一个很容易受损的器官,各种损肝因素如病毒、酗酒、脂代谢异常、药物、自身免疫等,均会造成肝脏炎症损伤,这时肝内的物质代谢就会出现障碍,身体的多种功能也会受到影响,如果炎症持续发展就会发展为肝硬化、肝纤维化、肝癌等[1]。肝脏疾病的发病率逐年上升,由于肝脏疾病复杂的发病诱因和尚未阐明的发病机制,治愈率仍不够理想,因此,迫切需要明确其作用机制以找到更有效的治疗靶点与药物。近年来研究发现,lncRNA参与了众多肝脏疾病的发生发展,包括肝癌[2]、肝纤维化[3]、肝硬化[4]、非酒精性脂肪性肝病[5]等,并作为生物标记物在肝脏疾病的诊断与预后中发挥重要作用。目前研究发现lncRNA作用肝脏疾病的作用方式多样,包括通过调控各种信号通路从而参与细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移等多种生理过程[6]。本文对近几年lncRNA调控肝脏疾病相关信号通路的研究进展进行归纳总结,为研究肝脏疾病的发生发展提供新思路,为寻找治疗肝脏疾病的新靶点及生物标志物提供新的研究方向。

1 LncRNA及其生物学功能

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于200个核苷酸,缺少特异完整的开放阅读框、无蛋白质编码功能的RNA分子[7]。同蛋白编码基因类似,lncRNA主要由Ⅱ型RNA聚合酶转录而来,具有独立的启动子、转录因子结合区、外显子及内含子。LncRNA具有较高的组织器官特异性和较低的序列保守性,可以通过多种机制在不同水平调节基因的表达。根据lncRNA在基因组中与蛋白质编码基因的相对位置,目前将其分为5类:(1)正义lncRNA(sense lncRNA):从蛋白质编码基因的正义链转录;(2)反义lncRNA(antisense lncRNA):从蛋白质编码基因的反义链转录;(3)双向lncRNA(bidirectional lncRNA):该类lncRNA可同时从与邻近mRNA转录方向相同与相反两个方向发生转录;(4)基因间lncRNA(intergenic lncRNA):从两个蛋白质编码基因之间的空间转录而来;(5)基因内lncRNA(intronic lncRNA):从编码基因的内含子区转录产生。

LncRNA分布于细胞质、细胞核以及细胞器中,功能较为复杂,具有多样性,能够在表观遗传、转录、转录后水平调控基因表达,广泛参与机体几乎所有的生理和病理过程[8]。研究表明:lncRNAs在X染色体沉默、基因组印迹、染色体修饰、转录激活、转录干扰以及核内运输等方面具有重要的功能,参与肝脏疾病的发生发展,其主要的调控机制如图1所示。LncRNA这种复杂精确的调控功能极大地诠释了基因的复杂性,同时也为人们从基因表达调控网络的维度来认识生命体的复杂性开启了新的天地。已证实lncRNA参与细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移、细胞周期、细胞分化等一系列生物学过程[9-10]。

LncRNA作为生物标记物在肝脏疾病的诊断和预后中发挥了重要作用。例如Liu等[11]对1 300例HBV阳性肝癌患者、1 344例HBV持续携带者和1 344例HBV受试者进行病例对照研究,结果发现lncRNA HULC中rs7763881的变异基因型可能有助于降低HBV携带者对肝癌的易感性。临床肝癌患者的双盲实验结果也显示HULC在诊断肝癌的发生与转移方面具有良好的预测作用,可以作为预测肝癌的新型生物标志物[12]。MALAT-1在肝癌细胞系和112例临床组织样本中表达上调;沉默MALAT-1可抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭;因此,MALAT-1可能是预测肝移植后肝癌复发的新型生物标志物。HOTAIR(一种lncRNA)在多种肿瘤例如乳腺癌、大肠癌、肝癌中高度表达并与其不良预后相关。Gao等[13]通过检测60组肝癌患者临床组织样本和正常肝组织样本中HOTAIR的表达水平,并分析HOTAIR表达水平与临床病理参数之间的关联,结果发现HOTAIR的表达水平与肿瘤的分化,转移以及早期复发显著相关,是诊断肝癌发生和肿瘤复发的重要标志物。最近研究报道,在人类原发性肝硬化胆管炎患者中,作为肝癌预后标记物的H19的表达水平与肝纤维化的严重程度显著相关[14];此外,H19还可以通过促进肝脏脂肪生成从而可能成为治疗非酒精性脂肪性肝病的潜

在靶点。由此可见，靶向 lncRNA 治疗肝脏疾病具有广阔的应用前景。因此，明确 lncRNA 作用肝脏疾病的分子机制将为阐明肝脏疾病的发病机制以及治疗肝脏疾病带来新的希望和突破点。目前研究表明，lncRNA 作用肝脏疾病的作用机制是多种多样的，不仅可以干扰下游基因的表达，也能影响特定蛋白质的活性以及在细胞中的定位。LncRNA 可以通过调控各种信号转导通路介导肝脏疾病的发生发展，因此明确 lncRNA 与信号转导通路的关系对肝脏疾病发病机制的认识和理解十分必要。

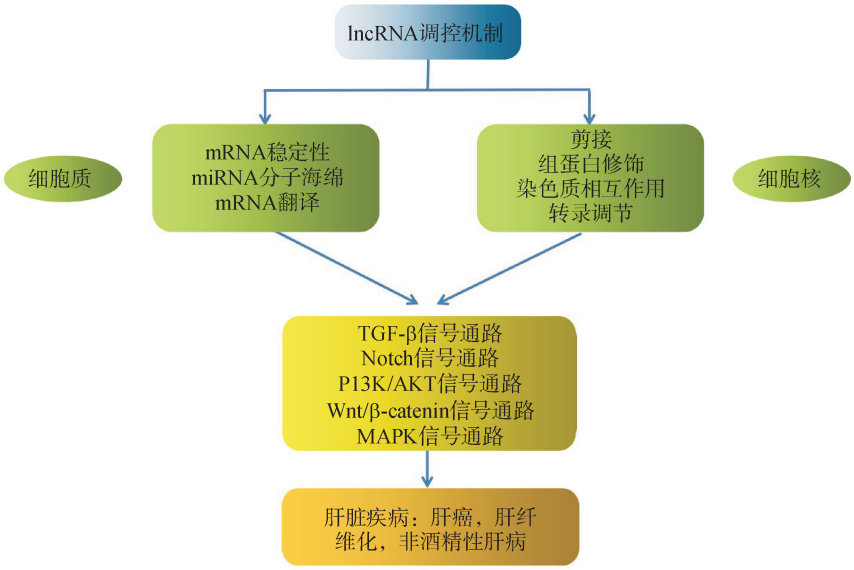


图 1　长链非编码 RNA（lncRNA）的调控机制

2　LncRNA 对肝脏疾病相关信号通路的调控作用

2.1　转化生长因子-β 通路

转化生长因子-β（TGF-β）信号通路是细胞内重要的信号转导通路，参与调控众多细胞生长发育过程，包括细胞生长、分化、凋亡以及细胞动态平衡等其他细胞功能[15]。TGF-β 超家族包括 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3，其中 TGF-β1 是最主要的促纤维化因子。Smad 蛋白质作为 TGF-β 家族受体下游的信号转导分子，具有转录激活作用，是 TGF-β 基因信号传导的关键环节。

2.1.1　LncRNA 调控肝癌中的 TGF-β 信号通路

TGF-β 在肿瘤中发挥双相调节作用。在肿瘤的早期阶段，TGF-β 通过诱导细胞周期停滞和细胞凋亡发挥肿瘤抑制作用；随着肿瘤的恶性进展，TGF-β 通过诱导细胞发生上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）进而诱导细胞增殖，迁移和侵袭来发挥促肿瘤转移作用。EMT 已被证明有助于肿瘤细胞的迁移与侵袭。肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）作为全球第六大常见肿瘤，具有高复发率和预后差的特点[16]，其中不良预后和高复发率很大程度与肝癌细胞的迁移和肿瘤转移相关。已有报道 TGF-β 通过与 lncRNA 相互作用促进肝癌的发生发展。几种与 TGF-β1 相互作用的 lncRNA，包括 MALAT1、PVT1、UCA1 在肝癌组织中表达异常，并与临床病理因素和预后显著相关[17-18]。Yuan 等[19]发现 TGF-β 诱导 lncRNA-ATB 在肝癌中表达上调，lncRNA-ATB 随之竞争性结合 miR-200 家族成员来上调 E 盒结合锌指蛋白（zinc finger E-box binding homeobox，ZEB）家族中 ZEB1 和 ZEB2 的表达，最终促进肝癌细胞发生 EMT 而获得侵袭能力。Shi 等[20]发现在肝癌患者中 lncRNA snaR 和 TGF-β1 的表达均显著增加且 snaR 在血浆中的表达水平与 TGF-β1 呈正相关；进一步研究发现，lncRNA snaR 可能作为 TGF-β1 的上游激活剂，上调 TGF-β1 信号转导从而促进肝癌细胞的侵袭与迁移，加重肝癌发展。Yang 等[21]发现，lncRNA NORAD 充当竞争性内源性 RNA（com-

peting endogenous RNAs,ceRNA)竞争性结合miR-202-5p,激活TGF-β通路,从而促进肝癌细胞的增殖与侵袭。此外,最近有研究表明,TGF-β可以降低lncRNA H19的表达,H19的低表达抑制肿瘤起始肝细胞(TICs)的祖细胞特性和致瘤作用,从而介导肝癌的发生发展[22]。

2.1.2 LncRNA调控肝纤维化中的TGF-β信号通路 肝纤维化作为肝内结缔组织异常增生的过程,其主要特征是细胞外基质(extracellular matrix,ECM)蛋白的产生和沉积增加。肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSC)是影响纤维化产生的最主要细胞,在其活化的过程中会产生大量的Ⅰ型胶原α1(collagen type Ⅰ collagenα1,COL1α1),α平滑肌动蛋白(α-smooth actin,α-SMA)以及促纤维化因子。TGF-β信号通路是肝纤维化过程中重要的参与者,可以通过诱导细胞损伤,促进炎症因子和促纤维化因子表达增加,进而加重肝纤维化,其中TGF-β/Smad是调控肝纤维化的典型信号通路。TGF-β1作为最主要的促纤维化细胞因子,与其受体TGF-βR1和TGF-βRII结合导致异四聚体复合物的形成和Smad2的磷酸化;磷酸化Smads易位进入细胞核从而促进HSC活化和胶原合成。近年来,研究发现lncRNA通过介导TGF-β/Smad信号通路进而调控肝纤维化。例如lncRNA-ATB通过与miR-425-5p竞争性结合来上调TGF-βRII和Smad2的表达,从而促进HSC的活化和增殖,发挥促纤维化作用[23];lnc-LFAR1在肝纤维化中上调Smad2/3的表达并促进其磷酸化,进而激活TGF-β信号通路,诱导COL1α1和α-SMA表达增加,ECM蛋白产生增多,HSC活化,肝纤维化加重[24];MALAT1可以通过阻断SIRT1对TGF-β信号通路的抑制进而促进HSC活化;H19充当ceRNA竞争性结合miR-148a,上调泛素特异性蛋白酶4(USP4)的表达,从而激活TGF-β信号通路,诱导HSC活化,加重肝纤维化[25]。

2.2 Notch信号通路

Notch信号通路是一个高度保守的信号通路,参与调控多种生物进程,包括细胞增殖、分化、上皮-间质转化和血管生成等。在哺乳动物中,Notch信号通路有4个受体(Notch1-4)和5个Notch配体(Delta-like 1,Dll1;Delta-like 3,Dll3;Delta-like 4,Dll4;Jagged-1 and Jagged-2)。当Notch受体与相邻细胞上的相应配体相互结合时,ADAM家族对Notch受体进行两步蛋白水解,释放Notch细胞内结构域(notch intracellular domain,NICD);NICD易位至细胞核并与DNA结合蛋白CSL作用以促进靶基因的转录,包括Hes和与Hes相关转录因子[26]。Notch通路已被报道参与多种疾病的发生发展,包括肿瘤、肝脏疾病、自身免疫性疾病等。

2.2.1 LncRNA调控肝癌中的Notch信号通路 肝癌细胞的高转移是肝癌预后差和术后复发率高的重要原因。大量研究表明,Notch通路在肿瘤中异常激活并与肿瘤的侵袭转移密切相关,例如已证实Notch1的激活有助于肝癌细胞的生长与增殖,但Notch通路如何介导肝癌细胞的侵袭机制仍不明确,目前研究报道lncRNA可能通过调控Notch通路进而介导这一过程。例如:在肝癌组织和细胞系中显著下调的lincRNA-p21被认为在肝癌中发挥抗肿瘤作用,其可以抑制肝癌细胞的增殖和迁移;对lincRNA-p21的作用机制进行探究,发现过表达的lincRNA-p21通过介导Notch信号通路诱导的EMT进程来抑制肝癌细胞的转移;激活Notch通路可以逆转pcDNA-lincRNA-p21的肝癌细胞抑制作用,提示Notch通路参与lincRNA-p21的抑癌作用[27]。Zhang等[28]发现在肝癌中上调LINC00261的表达,可以抑制肝癌细胞的增殖、集落形成、侵袭和EMT,这一结果可能与LINC00261下调Hes-1和Notch1的表达进而抑制Notch信号通路有关。此外,最近有报道表明,Notch1可以调控lncRNA AK022798的表达,后者进一步诱导HepG2细胞凋亡,介导肝癌的发生发展[29]。

2.2.2 LncRNA调控肝纤维化中的Notch信号通路 Notch通路已被报道通过各种途径与方式参与肝纤维化的发生发展。例如:敲低Notch3可以抑制α-SMA和COL1α1的表达,进而介导HSCs活化[30];Notch诱导肝细胞发生EMT,进而加重肝纤维化;Notch与TGF-β/Smad信号通路协同调节HSCs的活化;Notch与Wnt信号通路协同调节HSCs[31]。越来越多的证据表明lncRNA可以通过调控Notch通路调节HSCs的活化进而介导肝纤维化。

Zhang等[24]发现沉默lnc-LFAR1可以抑制HSCs的激活,减少体外TGF-β诱导的肝细胞凋亡并减弱CCl_4和胆管结扎诱导的小鼠肝纤维化。对

lnc-LFAR1 作用机制进行探讨，发现在 lnc-LFAR1 表达下调的 HSC 中，Notch2、Notch3、Hes1 和 Hey2 的表达水平均降低；在 lnc-LFAR1 表达上调的 HSC 中，表达结果相反；敲低 lnc-LFAR1 的表达导致 Notch2、Notch 3、Hes1 和 Hey2 的表达也降低，α-SMA 表达水平下降；以上结果表明 lnc-LFAR1 通过激活 Notch 通路促进肝纤维化和 HSC 活化。Zhang 等[32]发现 lnc-Hser 发挥抗纤维化的作用机制与其通过 Notch 途径抑制肝细胞 EMT 过程有关。另有研究表明 Meg8 通过抑制 Notch 通路抑制了 HSC 活化和 EMT，从而抑制激活的 HSC 中促纤维化和增殖基因的表达。

2.3　PI3K/AKT 信号通路

PI3K/AKT 信号通路是蛋白质合成的重要通路，可以调控细胞增殖、分化、凋亡等多种生物进程。磷脂酰肌醇-3 羟基激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）可以被 G 蛋白偶联受体、蛋白酪氨酸激酶受体或 Ras 蛋白激活；激活的 PI3K 通过激活蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB）即 AKT，进而激活下游信号分子 mTOR。mTOR 作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，负责对氨基酸、营养物质、葡萄糖等刺激产生应答，进而调控细胞周期，促进细胞增殖和存活等生物进程。

2.3.1　LncRNA 调控肝癌中的 PI3K/AKT 信号通路　PI3K/AKT 信号通路已被报道通过抑制细胞凋亡，促进肿瘤细胞的侵袭和迁移进而参与肿瘤的发生发展，是肿瘤机制研究的热点[33]。目前遏制肝癌细胞增殖、迁移或侵袭是治疗肝癌的有效途径。研究表明，lncRNA 通过调控 PI3K/AKT 信号通路在肝癌中扮演着重要角色。Han 等[34]证实 lncRNA CASC11 在肝癌组织和细胞中表达上调，可以促进肝癌细胞的侵袭与迁移；进一步研究发现其致癌机制和 PI3K/AKT 信号通路的参与有关。在 HepG2 细胞中给予 PI3K/AKT 信号通路的激活因子 IGF-1 或敲除 PI3K/AKT 信号通路的主要负向调节因子 PTEN 后，细胞的迁移和侵袭能力得到提高；沉默 CASC11 可以抑制肝癌细胞的 EMT、IGF-1 和 PTEN 部分逆转这一结果；以上结果证实了 CASC11 通过调控 PI3K/AKT 信号通路参与肝癌发展，其可能是肝癌的潜在治疗靶点。最近研究发现，lncRNA FER1L4 通过调节 PI3K/AKT 信号通路抑制肝癌细胞的增殖和迁移[35]；lncRNA HAGLROS 作为 ceRNA 竞争性结合 miR-5095，靶向 ATG12 调节肝癌细胞的增殖、凋亡和自噬，机制可能与 HAGLROS 激活 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路相关[36]。此外，有报道表明，lncRNA PTTG3P 作为肝癌预后的重要标记物，可以促进肿瘤的生长和转移，具体机制也与其激活肝癌细胞中的 PI3K/AKT 信号通路有关[37]。

2.3.2　LncRNA 调控肝纤维化中的 PI3K/AKT 信号通路　PI3K/AKT 信号通路在肝纤维化中发挥着重要作用，可以通过调节 ECM 的合成与降解，促纤维化因子的表达以及 HSC 的活化参与肝纤维化的形成。激活的 PI3K/AKT 信号通路促进 HSC 的增殖，也可以通过调控 c-FLIPL 的表达，抑制 HSC 的凋亡。PTEN 作为 PI3K/AKT 信号通路的主要负向调节因子，可以抑制 PI3K 和 AKT 磷酸化进而抑制 HSC 活化与增殖，是治疗肝纤维化的有效靶点[38]。研究发现，有多种 lncRNA 通过与 PTEN 相互作用调控 PI3K/AKT 信号通路进而参与肝纤维化的发生发展。Dong 等[39]研究表明，lncRNA GAS5 在肝纤维化组织和 HSC 中表达均下调；过表达 lncRNA GAS5 可以抑制 HSC 的活化。研究表明，GAS5 充当 ceRNA 竞争性结合 miR-23a，增强 PTEN 的表达，抑制 PI3K 磷酸化，使 AKT、mTOR 以及 Snail 的表达水平降低，从而抑制 PI_3K/AKT/mTOR/Snail 信号通路的激活，导致 E-钙黏着蛋白表达水平升高，α-SMA 和 COL1α1 表达降低，最终抑制肝纤维化，提示 lncRNA GAS5/miR-23a 可能成为治疗肝纤维化的有效分子靶标。Yu 等[40]发现 HOTAIR 竞争性结合 miR-29b，使 miR-29b 的表达降低，促使 PTEN 甲基化增强，介导 PI3K/AKT 信号通路从而加重肝纤维化。另外最近有研究发现 H19 可以通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进 IGFBPrP1 诱导的 HSC 活化，具体机制仍需进一步探究[41]。

2.3.3　LncRNA 调控非酒精性脂肪性肝病中的 PI3K/AKT 信号通路　非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）是慢性肝病的最常见病因，后期可能发展为肝硬化或肝癌，是世界性的健康问题[42]。NAFLD 通常与不健康的饮食、肥胖、高脂血症和 2 型糖尿病等有关。目前对 NAFLD 的发病机制知之甚少。研究发现，PI3K/AKT 信号通路是胰岛素作用的主要信号传导途径之一。胰岛素抵抗（insulin resistance，IR）与

NAFLD的病因及病情发展密切相关,当IR发生时,胰岛素对脂肪代谢的调节作用减弱,使血液中游离脂肪酸的摄取和三酰甘油合成增加,肝细胞内脂质沉积,肝细胞变性肿大从而导致脂肪肝形成。最近研究发现,IR发生时,AKT的蛋白表达水平失调;磷酸化AKT被激活后,可以激活下游信号分子mTOR,mTOR进一步激活下游效应蛋白S6K1,磷酸化S6核糖体蛋白,促进细胞蛋白合成以及诱发IR的发生。LncRNA之前已被报道在NAFLD中表达失调,近来研究发现PI3K/AKT信号通路可能与lncRNA作用NAFLD的机制相关。Wang等[43]发现在NAFLD大鼠中,lncRNA NEAT1的表达水平显著升高。敲除NEAT1后可以抑制肝细胞中ACC和FAS的表达水平;抑制mTOR/S6K1信号通路后可以得到同样的抑制效应,提示NEAT1可能通过mTOR/S6K1信号通路介导大鼠NAFLD发病过程。此外,最近有报道MEG3通过LRP6与miR-21竞争性结合,抑制mTOR途径,进而促进细胞内脂质蓄积,加重NAFLD病情[44]。由于目前关于lncRNA作用NAFLD的研究尚在起步阶段,对其调控信号通路更是知之甚少,未来需要找到更多lncRNA作用于NAFLD的信号通路。

2.4 Wnt/β-catenin信号通路

2.4.1 LncRNA调控肝癌中的Wnt/β-catenin信号通路 Wnt/β-catenin信号通路与肝癌的增殖、转移及侵袭密切相关。β-catenin作为该通路的关键调节因子,其表达水平与肿瘤细胞的迁移侵袭能力呈正相关;β-catenin可以促进肿瘤血管生成等方式参与肝癌的浸润和转移;Wnt/β-catenin信号通路还可通过介导细胞凋亡参与恶性肿瘤的发展。LncRNA已被报道参与调控肝癌细胞的生长、增殖、迁移、侵袭、凋亡等过程。越来越多的证据表明,lncRNA可能通过作用于Wnt/β-catenin信号通路来调节肝癌。例如:Liang等[45]发现lncRNA-NEF可以与β-catenin相互作用,增加GSK3β与β-catenin的结合,促进β-catenin抑制性磷酸化,从而抑制Wnt/β-catenin信号通路并激活FOXA2的表达,进而拮抗肝细胞EMT和肝癌细胞的迁移。Zhang等[46]发现过表达lncRNA HOTAIRM1可以抑制肝癌细胞增殖,促进凋亡启动子Bax的表达,抑制凋亡抑制因子Bcl-2和Bid的表达从而诱导肝癌细胞凋亡。机制研究表明,Wnt通路相关蛋白,包括Akt1、pGSK-3β和β-catenin在lncRNA HOTAIRM1过表后表达显著下降;结合Wnt通路可以调控细胞凋亡的作用,提示lncRNA HOTAIRM1可能通过抑制Wnt信号通路促进肝癌细胞凋亡,进而调控肝癌进程。Zhu等[47]发现敲除lncRNA CRNDE可以在体内抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭;体外抑制肿瘤的生长和转移。进一步实验揭示CRNDE通过激活Wnt/β-catenin信号通路促进肝癌细胞的EMT过程从而在肝癌中发挥作用。TICs具有自我更新和分化特性,有助于肿瘤的发生和转移。Fu等[48]发现,lncRNA linc00210在肝脏TICs中高表达,进一步研究发现lncRNA linc00210通过与CTNNBIP1相互作用使CTNNBIP1与β-catenin的结合受抑,从而激活Wnt/β-catenin信号转导通路,促进肝脏TICs的自我更新,加快肝肿瘤发展进程。以上结果提示Wnt/β-catenin信号通路是lncRNA调节肝癌的一个重要途径,靶向Wnt/β-catenin信号通路可能成为治疗肝癌的新方向。

2.4.2 LncRNA调控肝纤维化中的Wnt/β-catenin信号通路 Wnt信号通路在肝纤维化中发挥着重要作用,可以通过经典β-catenin依赖信号通路和非经典β-catenin独立通路调节HSCs的活化与增殖。当Wnt受体激活时,与相应受体结合,活化胞内Dishevelled蛋白,促使Axin结合LRP,抑制糖原合成激酶3β(glycogen synthase kinase 3β,GSK-3β)活性,胞浆内β-catenin积累;持续激增的β-catenin入核与转录因子家族TCF/LEF结合形成转录复合物,激活下游纤维化相关基因,促进HSC活化,进而调节肝纤维化。LncRNA在肝纤维化中异常表达,可以通过多种机制作用于肝纤维化。目前研究表明,lncRNA主要以充当ceRNA的方式调节Wnt信号通路介导肝纤维化。近来研究发现,沉默SNHG7可以抑制HSC活化和细胞增殖,减少胶原蛋白生成。机制研究表明,SNHG7通过竞争性结合miR-378a-3p,增加DVL2胞内含量,提高TCF活性,减少磷酸化β-catenin和GSK-3β表达,从而激活Wnt/β-catenin信号通路,诱导HSC活化,调节肝纤维化[49]。先前已报道lncRNA-ATB可以通过作用于TGF-β通路参与肝纤维化的发展,Fu等[50]进一步发现,lncRNA-ATB还可以竞争性结合miR-200a,通过lncRNA-ATB/miR-200a/β-catenin

轴调控 HSC 的激活，进而介导 HCV 相关性肝纤维化的发生发展。最近研究表明，lincRNA-p21 通过 MicroRNA-17-5p 介导的 Wnt/β-Catenin 通路抑制了 HSC 的活化[51]。

2.5　MAPK 信号通路

2.5.1　LncRNA 调控肝癌中的 MAPK 信号通路　丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路是细胞内重要的信号通路，参与调控细胞的增殖、分化、侵袭与迁移等多种生理过程，其主要的 MAPK 成员包括：细胞外信号调节激酶（ERK）、c-Jun 氨基末端激酶（JNK）和 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）[52]。已知 ERK 信号通路主要调控细胞的增殖与转移；JNK 信号通路主要调控细胞的分化、增殖与凋亡。MAPK 信号通路已被发现参与众多恶性肿瘤的发生发展，尤其与肝癌密切相关。已报道肝癌患者中高表达的炎症因子与趋化因子激活 ERK 信号通路，导致肝细胞异常增殖，加重肝癌的恶性发展；致癌物多环芳香烃抑制肝癌细胞中 MAPK5 的表达，导致 p38 MAPK 信号通路受到抑制，肝癌细胞凋亡减少，细胞持续增殖。已报道 lncRNA 可以通过调控 MAPK 信号通路作用于肝癌。Bao 等[53]发现 lncRNA Igf2as 在 HCC 细胞和组织中表达上调，敲除 Igf2as 可以显著抑制细胞增殖并促进细胞凋亡。Igf2as 的表达与 ERK 激活之间呈正相关；在被 si-Igf2as 转染的细胞中，细胞外 ERK/MAPK 信号通路受到抑制。以上结果表明 lncRNA Igf2as 可能主要通过调控 ERK/MAPK 信号通路来促进肝癌细胞的增殖和侵袭。此外，Peng 等[54]发现 lncRNA CCHE1 在肝癌组织和细胞中高表达，促进肿瘤生长与细胞增殖。进一步敲除 CCHE1 后，肝癌细胞中的 ERK/MAPK 途径被抑制，细胞的生长与凋亡抑制得到减弱，提示 CCHE1 可作为肝癌预后的生物标志物。

2.5.2　LncRNA 调控非酒精性脂肪性肝病中的 MAPK 信号通路　MAPK 信号通路除了在肝癌中发挥作用，在 NAFLD 的形成、发展中所起的作用也受到越来越多的关注。已报道游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）、炎症因子、细胞内的高氧化应激水平均可激活 JNK 信号通路，活化的 JNK 通路通过调节肥胖，IR 以及细胞凋亡介导 NAFLD 的病程；JNK1 能加重 NAFLD 中的肝损伤，且与 IR 水平呈正相关；过表达 AMPKa1 抑制 p38 MAPK 的激活，进而可能作为治疗 NAFLD 的新靶点。研究表明 lncRNA 调控 MAPK 信号通路参与 NAFLD 的发生发展。Shen 等[55]研究发现，在 NAFLD 大鼠中 lncRNA HULC 的表达显著上调，抑制 HULC 的表达可以改善 NAFLD 大鼠组织中的肝脂质沉积，肝纤维化以及减少肝细胞凋亡，但调控 HULC 的机制表达仍然未知。进一步对机制进行探讨，发现抑制 HULC 可以抑制 NAFLD 大鼠肝脏组织中的 MAPK 信号通路；抑制 p38 和 JNK 可以改善肝脏脂质病理状态和肝纤维化，减少肝细胞凋亡，表明 HULC 通过调节 MAPK 信号通路参与 NAFLD 病程。

综上，肝脏疾病中涉及的信号通路众多，lncRNA 通过多种方式调控相关信号通路进而参与调控细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡等多种生物学进程，介导肝脏疾病的发生发展（表 1）。明确 lncRNA 调控信号通路机制将有助于阐明肝脏疾病的发病机制。

3　结语与展望

肝脏疾病涉及的信号通路众多，通路之间的调控关系比较复杂，对肝脏疾病中的信号通路进行研究，有助于阐明肝脏疾病的发病机制，找到新的作用靶点。近年来 lncRNA 是肝脏疾病的研究热点，也取得了一定的进展。例如研究发现在 H19 调控序列的控制下，构建表达白喉毒素 A 链基因的单启动子载体可以治疗膀胱癌，并完成了 Ⅰ/Ⅱa 期临床试验，这可能同样适用于高表达 H19 的肝癌治疗；促进肝细胞增殖的 lncRNA LALR1 在肝损伤后的肝再生过程中发挥治疗优势；人肝纤维化中显著下调的 MEG3 在 HSCs 活化和肝纤维化发展中起重要作用，有望成为逆转肝纤维化的新潜在靶点。由此可见，靶向 lncRNA 治疗肝脏疾病为研究者提供了新方向，需要进一步明确 lncRNA 作用肝脏疾病的分子机制。目前研究证实 lncRNA 通过多种作用机制包括调控各种信号转导通路参与肝脏疾病的发生发展，但是目前对 lncRNA 调控信号通路的研究尚在起步阶段，尤其在肝癌和肝纤维化中，研究还较为深入，但在非酒精性脂肪性肝病，肝硬化等其他疾病中的研究较少。在未来分析技术和实验条件发展的基础上，需要进一步探究 lncRNA 调控各种信号通路的机制以及不同信

表1 LncRNA调控信号通路介导肝脏疾病

信号通路	lncRNA	作用靶点	生物学效应	参考文献
TGF-β信号通路	PVT1	NOP2	促进肝癌细胞增殖,加重肝癌	[18]
	lncRNA-ATB	miR-200	促进肝癌细胞的侵袭与迁移,加重肝癌	[19]
	lncRNA NORAD	miR-202-5p	促进肝癌细胞的增殖与侵袭,加重肝癌	[21]
	lnc-LFAR1	Smad2/3	促进HSC活化,加重肝纤维化	[24]
	H19	miR-148a	促进HSC活化,加重肝纤维化	[25]
Notch信号通路	lincRNA-p21	Notch	抑制肝癌细胞的增殖和迁移	[27]
	LINC00261	Hes-1和Notch1	抑制肝癌细胞的增殖和侵袭,加重肝癌	[28]
	lncRNA AK022798	Notch1	诱导肝癌细胞凋亡	[29]
	lnc-LFAR1	Notch2、Notch3、Hes1和Hey2	促进HSC活化,加重肝纤维化	[24]
	lnc-Hser	Notch1	抑制肝细胞EMT,抗肝纤维化	[32]
PI3K/AKT信号通路	lncRNA CASC11	IGF-1或PTEN	促进肝癌细胞侵袭与迁移,加重肝癌	[34]
	lncRNA HAGLROS	miR-5095	调节肝癌细胞的增殖、凋亡和自噬	[36]
	lncRNA PTTG3P	PTTG1	促进肝癌肿瘤的生长和转移	[37]
	HOTAIR	miR-29b	加重肝纤维化	[40]
	H19	PI3K/Akt/mTOR	促进HSC活化	[41]
	lncRNA NEAT1	mTOR/S6K1	加重NAFLD	[43]
	MEG3	MiR-21	促进细胞脂质蓄积,加重NAFLD	[44]
Wnt/β-cateni信号通路	lncRNA-NEF	β-catenin	抑制肝细胞EMT和肝癌细胞迁移	[45]
	lncRNA HOTAIRM1	Bcl-2、Bid、Akt1和pGSK-3β	抑制肝癌细胞增殖,促进肝癌细胞凋亡,抗肝癌	[46]
	lncRNA linc00210	CTNNBIP1	促进肝脏TICs的自我更新,加重肝癌	[48]
	SNHG7	miR-378a-3p	诱导HSC活化,促肝纤维化	[49]
	lncRNA-ATB	miR-200a	调控HSC的激活	[50]
	lincRNA-p21	MicroRNA-17-5p	抑制HSC活化,抗纤维化	[51]
MAPK信号通路	lncRNA Igf2as	ERK	促进肝癌细胞的增殖和侵袭	[53]
	lncRNA CCHE1	ERK/MAPK	促进肝癌细胞增殖,加重肝癌	[54]
	HULC	MAPK	促进肝脂质沉积,加重NAFLD	[55]

号通路之间的复杂调控关系,以阐明lncRNA作用肝脏疾病的分子机制,为临床诊断治疗肝脏疾病提供新的理论基础。

参 考 文 献

[1] Shimizu Y. Liver in systemic disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, **14**(26): 4111-4119.

[2] Xu LC, Chen QN, Liu XQ, *et al*. Erratum: Up-regulation of *LINC00161* correlates with tumor migration and invasion and poor prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2019, **10**(14): 1474.

[3] Song YF, Liu CN, Liu X, *et al*. H19 promotes cholestatic liver fibrosis by preventing ZEB1-mediated inhibition of epithelial cell adhesion molecule[J]. *Hepatology*, 2017, **66**(4): 1183-1196.

[4] Tang SH, Gao JH, Wen SL, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 is correlated with lncRNA-COX-2 in cirrhotic mice induced by carbon tetrachloride[J]. *Mol Med Rep*, 2017, **15**(4): 1507-1512.

[5] Chen X, Tan XR, Li SJ, *et al*. LncRNA NEAT1 promotes hepatic lipid accumulation via regulating miR-146a-5p/ROCK1 in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Life Sci*, 2019, **235**: 116829.

[6] Pan XF, Zheng GB, Gao CF. LncRNA PVT1: a novel therapeutic target for cancers[J]. *Clin Lab*, 2018, **64**(5):655-662.

[7] Tang XW, Gao Y, Yu LX, *et al*. Correlations between lncRNA-SOX2OT polymorphism and susceptibility to breast cancer in a Chinese population [J]. *Biomark Med*, 2017, **11** (3): 277-284.

[8] Yoon JH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **34**: 9-14.

[9] Gong CG, Maquat LE. LncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3′ UTRs via Alu elements [J]. *Nature*, 2011, **470**(7333): 284-288.

[10] Long FQ, Su QJ, Zhou JX, *et al*. LncRNA *SNHG12* amelio-

rates brain microvascular endothelial cell injury by targeting miR-199a[J]. *Neural Regen Res*, 2018, **13**(11): 1919-1926.

[11] Liu Y, Pan SD, Liu L, *et al*. A genetic variant in long non-coding RNA HULC contributes to risk of HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(4): e35145. doi:10.1371/journal.pone.0035145.

[12] Li J, Wang XC, Tang JW, *et al*. HULC and Linc00152 act as novel biomarkers in predicting diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, **37**(2): 687-696.

[13] Gao JZ, Li J, Du JL, *et al*. Long non-coding RNA HOTAIR is a marker for hepatocellular carcinoma progression and tumor recurrence[J]. *Oncol Lett*, 2016, **11**(3): 1791-1798.

[14] Liu RP, Li X, Zhu WW, *et al*. Cholangiocyte-derived exosomal long noncoding RNA H19 promotes hepatic stellate cell activation and cholestatic liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2019, **70**(4): 1317-1335.

[15] Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF-β family signaling[J]. *Sci Signal*, 2019, **12**(570): eaav5183.

[16] Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2017, **34**(2): 153-159.

[17] Hu ML, Wang XY, Chen WM. TGF-β1 upregulates the expression of lncRNA UCA1 and its downstream HXK2 to promote the growth of hepatocellular carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, **22**(15): 4846-4854.

[18] Wang F, Yuan JH, Wang SB, *et al*. Oncofetal long noncoding RNA PVT1 promotes proliferation and stem cell-like property of hepatocellular carcinoma cells by stabilizing NOP2[J]. *Hepatology*, 2014, **60**(4): 1278-1290.

[19] Yuan JH, Yang F, Wang F, *et al*. A long noncoding RNA activated by TGF-β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2014, **25**(5): 666-681.

[20] Shi ZT, Wei D, Wu HM, *et al*. Long non-coding RNA snaR is involved in the metastasis of liver cancer possibly through TGF-β1[J]. *Oncol Lett*, 2019, **17**(6): 5565-5571.

[21] Yang X, Cai JB, Peng R, *et al*. The long noncoding RNA NORAD enhances the TGF-β pathway to promote hepatocellular carcinoma progression by targeting miR-202-5p[J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(7): 12051-12060.

[22] Zhang JQ, Han C, Ungerleider N, *et al*. A transforming growth factor-β and H19 signaling *Axis* in tumor-initiating hepatocytes that regulates hepatic carcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2019, **69**(4): 1549-1563.

[23] Fu N, Niu XM, Wang Y, *et al*. Role of lncRNA-activated by transforming growth factor beta in the progression of hepatitis C virus-related liver fibrosis[J]. *Discov Med*, 2016, **22**(119): 29-42.

[24] Zhang K, Han XH, Zhang Z, *et al*. The liver-enriched lncLFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGFβ and Notch pathways[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 144.

[25] Zhu J, Luo ZG, Pan YD, *et al*. H19/miR-148a/USP4 *Axis* facilitates liver fibrosis by enhancing TGF-β signaling in both hepatic stellate cells and hepatocytes[J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(6): 9698-9710.

[26] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling[J]. *Science*, 1995, **268**(5208): 225-232.

[27] Jia M, Jiang L, Wang YD, *et al*. LincRNA-p21 inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma through Notch signaling-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Hepatol Res*, 2016, **46**(11): 1137-1144.

[28] Zhang HF, Li W, Han YD. LINC00261 suppresses cell proliferation, invasion and Notch signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2018, **21**(3): 575-582.

[29] Hao L, Xing YC, Chun MW, *et al*. A Notch1-regulated lncRNA, AK022798, contributes to the baicalein-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, **10**(4): 4303-4311.

[30] Chen YX, Weng ZH, Qi D, *et al*. Effect of Notch signaling on the activation of hepatic stellate cells[J]. *Chin J Hepatol*(中华肝脏病杂志), 2012, **20**(9): 677-682.

[31] Li CY, Song GR, Zhang SY, *et al*. Wnt3a increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer cells *in vitro* in part via its upregulation of Notch3[J]. *Oncol Rep*, 2015, **33**(3): 1207-1214.

[32] Zhang K, Zhang MX, Yao QB, *et al*. The hepatocyte-specifically expressed lnc-HSER alleviates hepatic fibrosis by inhibiting hepatocyte apoptosis and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Theranostics*, 2019, **9**(25): 7566-7582.

[33] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, *et al*. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer[J]. *Gene*, 2019, **698**: 120-128.

[34] Han YD, Chen MZ, Wang AL, *et al*. STAT3-induced upregulation of lncRNA CASC11 promotes the cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by epigenetically silencing PTEN and activating PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, **508**(2): 472-479.

[35] Wang X, Dong K, Jin QZ, *et al*. Upregulation of lncRNA FER1L4 suppresses the proliferation and migration of the hepatocellular carcinoma via regulating PI3K/AKT signal pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, **120**(4): 6781-6788.

[36] Wei HM, Hu J, Pu J, *et al*. Long noncoding RNA HAGLROS promotes cell proliferation, inhibits apoptosis and enhances autophagy via regulating miR-5095/ATG12 *Axis* in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, **73**: 72-80.

[37] Huang JL, Cao SW, Ou QS, *et al*. The long non-coding RNA PTTG3P promotes cell growth and metastasis via up-regulating PTTG1 and activating PI3K/AKT signaling in hepatocellular

carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2018, **17**(1): 93.

[38] Wu SM, Li TH, Yun H, *et al*. MiR-140-3p knockdown suppresses cell proliferation and fibrogenesis in hepatic stellate cells via PTEN-mediated AKT/mTOR signaling[J]. *Yonsei Med J*, 2019, **60**(6): 561-569.

[39] Dong ZH, Li S, Wang XH, *et al*. LncRNA GAS5 restrains CCl_4-induced hepatic fibrosis by targeting miR-23a through the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, **316**(4): G539-G550.

[40] Yu FJ, Chen BC, Dong PH, *et al*. HOTAIR epigenetically modulates PTEN expression via MicroRNA-29b: a novel mechanism in regulation of liver fibrosis[J]. *Mol Ther*, 2017, **25**(1): 205-217.

[41] Huang TJ, Ren JJ, Zhang QQ, *et al*. IGFBPrP1 accelerates autophagy and activation of hepatic stellate cells via mutual regulation between H19 and PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2019, **116**: 109034.

[42] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, *et al*. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the american association for the study of liver diseases[J]. *Hepatology*, 2018, **67**(1): 328-357.

[43] Wang X. Down-regulation of lncRNA-NEAT1 alleviated the non-alcoholic fatty liver disease via mTOR/S6K1 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, **119**(2): 1567-1574.

[44] Huang P, Huang FZ, Liu HZ, *et al*. LncRNA MEG3 functions as a *Cerna* in regulating hepatic lipogenesis by competitively binding to miR-21 with LRP6[J]. *Metab Clin Exp*, 2019, **94**: 1-8.

[45] Liang WC, Ren JL, Wong CW, *et al*. LncRNA-NEF antagonized epithelial to mesenchymal transition and cancer metastasis via *Cis*-regulating FOXA2 and inactivating Wnt/β-catenin signaling[J]. *Oncogene*, 2018, **37**(11): 1445-1456.

[46] Zhang Y, Mi L, Xuan Y, *et al*. LncRNA HOTAIRM1 inhibits the progression of hepatocellular carcinoma by inhibiting the Wnt signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, **22**(15): 4861-4868.

[47] Zhu LY, Yang NH, Du GQ, *et al*. LncRNA CRNDE promotes the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells via enhancing the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018. doi:10.1002/jcb.26762.

[48] Fu XM, Zhu XY, Qin FJ, *et al*. Linc00210 drives Wnt/β-catenin signaling activation and liver tumor progression through CTNNBIP1-dependent manner [J]. *Mol Cancer*, 2018, **17**(1): 73.

[49] Yu FJ, Dong PH, Mao YF, *et al*. Loss of lncRNA-SNHG7 promotes the suppression of hepatic stellate cell activation via miR-378a-3p and DVL2[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, **17**: 235-244.

[50] Fu N, Zhao SX, Kong LB, *et al*. LncRNA-ATB/microRNA-200a/β-catenin regulatory *Axis* involved in the progression of HCV-related hepatic fibrosis[J]. *Gene*, 2017, **618**: 1-7.

[51] Yu FJ, Guo Y, Chen BC, *et al*. LincRNA-p21 inhibits the wnt/β-catenin pathway in activated hepatic stellate cells via sponging MicroRNA-17-5p [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, **41**(5): 1970-1980.

[52] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**(2): 320-344.

[53] Bao H, Guo CG, Qiu PC, *et al*. Long non-coding RNA Igf2as controls hepatocellular carcinoma progression through the ERK/MAPK signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2017, **14**(3): 2831-2837.

[54] Peng W, Fan H. Long noncoding RNA CCHE1 indicates a poor prognosis of hepatocellular carcinoma and promotes carcinogenesis via activation of the ERK/MAPK pathway[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2016, **83**: 450-455.

[55] Shen XT, Guo HY, Xu JJ, *et al*. Inhibition of lncRNA HULC improves hepatic fibrosis and hepatocyte apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(10): 18169-18179.

·论 文·

作用于polo-box结构域的拟肽类polo样激酶1抑制剂的设计、合成及其生物活性

李芝艳[1,2,3],刘 婕[1,2,3],李冰艳[1,2,3],江 程[1,2,3*]

([1]中国药科大学江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室,南京 210009;[2]中国药科大学蛋白质化学与结构生物学重点实验室,南京 210009;[3]中国药科大学药学院药物化学系,南京 210009)

摘 要 为寻找新型的作用于polo-box结构域的拟肽类polo样激酶1(Plk1 PBD)抑制剂,将先导化合物(PLHSpT)结构中的磷酸基团替换为羧基,并采用非天然氨基酸进一步改造与优化,设计合成了一系列不含磷酸基团的拟肽类Plk1 PBD抑制剂(化合物**7a~7u**)。设计合成的21个拟肽类化合物均对Plk1 PBD抑制作用较强,其中化合物**7l**高选择性地抑制Plk1 PBD,IC_{50}为0.285 μmol/L,体外对HeLa肿瘤细胞株的生长抑制作用优于含磷酸基团的化合物。经过非天然氨基酸修饰和改造,化合物在大鼠血浆中的稳定性得到了提高。实验证明,用羧基替换磷酸基团并进行肽链的结构改造,可以获得成药性更好的选择性Plk1 PBD抑制剂。

关键词 Plk1 PBD;抑制剂;合成;抗肿瘤

中图分类号 R914 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0287-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200305

引用本文 李芝艳,刘婕,李冰艳,等.作用于polo-box结构域的拟肽类polo样激酶1抑制剂的设计、合成及其生物活性[J].中国药科大学学报,2020,51(3):287-294.

Cite this article as: LI Zhiyan, LIU Jie, LI Bingyan, *et al*. Design, synthesis and evaluation of peptidomimetics targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 287-294.

Design, synthesis and evaluation of peptidomimetics targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1

LI Zhiyan[1,2,3], LIU Jie[1,2,3], LI Bingyan[1,2,3], JIANG Cheng[1,2,3*]

[1]Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; [2]Key Laboratory on Protein Chemistry and Structural Biology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; [3]Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To identify novel inhibitors targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1 (Plk1 PBD), a series of new peptidomimetics (**7a-7u**) without phosphate group were designed and synthesized, where the phosphate group in the structure of the selective Plk1 PBD inhibitor PLHSpT was replaced by the carboxyl group, and the unnatural amino acids were applied for further modification and optimization. The 21 peptidomimetic compounds designed and synthesized had a strong inhibitory effect on Plk1 PBD, of which compound **7l** highly selectively inhibited Plk1 PBD with IC_{50} of 0.285 μmol/L. The growth inhibition effect of HeLa tumor cell lines *in vitro* was better than that of compounds containing phosphate group. Moreover, the stability of the compound in rat plasma was improved by unnatural amino acids. Thus it is proved that selective Plk1 PBD inhibitor with improved characters can be obtained by replacing the phosphate group with a carboxyl group and restructuring the peptide chain.

Key words Plk1 PBD; inhibitor; synthesis;antitumor

收稿日期 2020-03-27 * **通信作者** Tel: 025-86185296 E-mail: jc@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81573278);2017年江苏省高等学校优秀科技创新团队资助项目

This work has been financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81573278) and the Excellent Science and Technology Innovation Team Projects of Jiangsu Provincal Universities in 2017

Polo样激酶家族(polo-like kinases, Plks)是一类结构上高度保守的丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶,在细胞周期进程中有重要的调控作用[1]。研究发现Plks主要有5种亚型,即Plk1,Plk2,Plk3,Plk4和Plk5[2]。人类Plks中,Plk1-4含有*N*末端激酶结构域(kinase domain, KD),以及一个或多个高度保守的C末端polo-box结构域(polo-box domains, PBDs),而Plk5不含*N*末端的KD部分[2]。PBD是Plks特有的结构,对Plks在亚细胞中的定位及对底物蛋白识别和磷酸化过程中起到重要作用[2]。

Plk1,Plk2和Plk3这3种亚型的结构相似,而Plk4与前三者差别较大[3-4]。Plk1在多种肿瘤细胞中过度表达,抑制其功能可以引起肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤细胞的生长,但对正常细胞却没有明显影响,因此,Plk1是新型抗肿瘤药物研发的一个有效靶标,目前也报道了多种Plk1抑制剂[5-6]。然而,与Plk1结构高度类似的两个激酶Plk2和Plk3对保持基因的稳定及阻止细胞癌变具有重要作用,通常被认为具有抑制肿瘤生长的作用[7-9]。因此,在研究作用于Plk1的抑制剂时,必须考虑如何高选择性地抑制Plk1而不抑制Plk2和Plk3[9-10]。在Plk1抑制剂中,研究最为广泛的是作用于ATP结合位点的ATP竞争性小分子化合物,目前已有很多化合物进入临床研究(表1),作用于Plk1 PBD的ATP非竞争性抑制剂也受到了越来越多的关注[11-12]。PBD是Plks特有的结构,对Plk1在亚细胞中的定位及对底物的磷酸化过程中起到重要作用,不同亚型的Plk磷酸化的底物不同,其PBD的结合口袋也不相同,因此以Plk1 PBD为靶点开发抑制剂,对于寻找高选择性的Plk1抑制剂具有重要意义。

以从Plk1的底物蛋白PBIP1中截取的磷酸肽为模板,Lee等[13]报道了第1个五肽结构的高活性、选择性的Plk1 PBD抑制剂PLHSpT(图1,化合物**1**)。此后,一系列拟肽结构的Plk1 PBD抑制剂被报道出来(图1,化合物**2~5**)[14-19]。本课题组前期也报道了一些在结构中引入非天然氨基酸,获得高活性、选择性的拟肽结构的Plk1 PBD抑制剂(图1,化合物**6**),这些抑制剂的血浆稳定性与PLHSpT相比也得到了较大提高[20-22]。

目前文献报道的高活性拟肽结构的Plk1 PBD抑制剂通常含有磷酸基团,并且这个磷酸基团被认为对于保持化合物的高活性起到了重要作用[12]。然而,磷酸基团通过磷酸酯键和拟肽化合物骨架相连,这个部分容易受到细胞中磷酸酯酶的破坏,同时,磷酸基的存在降低了化合物的细胞穿透性,大大降低了化合物对细胞的作用[18]。用一系列(2*S*, 3*R*)-2-氨基-3-甲基-4-膦酰基丁酸(Pmab)掺入肽模拟物,得到的拟肽化合物保留了对Plk1 PBD的高效抑制作用,同时还对磷酸酶十分稳定[18]。但是由于Pmab合成难度非常大,给这类拟肽化合物的制备和使用带来了一定的局限。本研究将五肽中磷酸化的苏氨酸中的磷酸基替换为羧基,获得了一系列不含磷酸基团的拟肽化合物,为寻找新型的选择性Plk1 PBD抑制剂提供了参考。

1 材 料

1.1 药品与试剂

Rink树脂(替代度SD = 0.8 mmol/g)、9-芴甲基氯甲酸酯(Fmoc)、*O*-苯并三唑-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲四氟硼酸盐(HBTU)、1-羟基苯并三唑(HOBt)和各种氨基酸均购自上海毕得医药科技有限公司;三氟醋酸(阿拉丁试剂);*N*,*N*-二甲基甲酰胺(DMF,天津化学试剂厂);FITC-Probe1(FITC-GPMQSpTPLNG-OH)、FITC-Probe2(FITC-GPMQSpTPKNG-OH)、FITC-Probe3(FITC-GPLASpTPKNG-OH)购自上海沐晋生物有限公司;其他试剂均为市售分析纯;人类HeLa细胞由中国药科大学基础医学与临床药学院提供。

1.2 仪 器

多肽合成反应管(北京欣维尔玻璃仪器有限公司);振荡器(杭州奥盛仪器有限公司);1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);岛津SPD-20A制备液相色谱仪(日本岛津公司);Thermo Scientific TSQ Quantis液质联用仪(美国Thermo-Finnigan公司)。

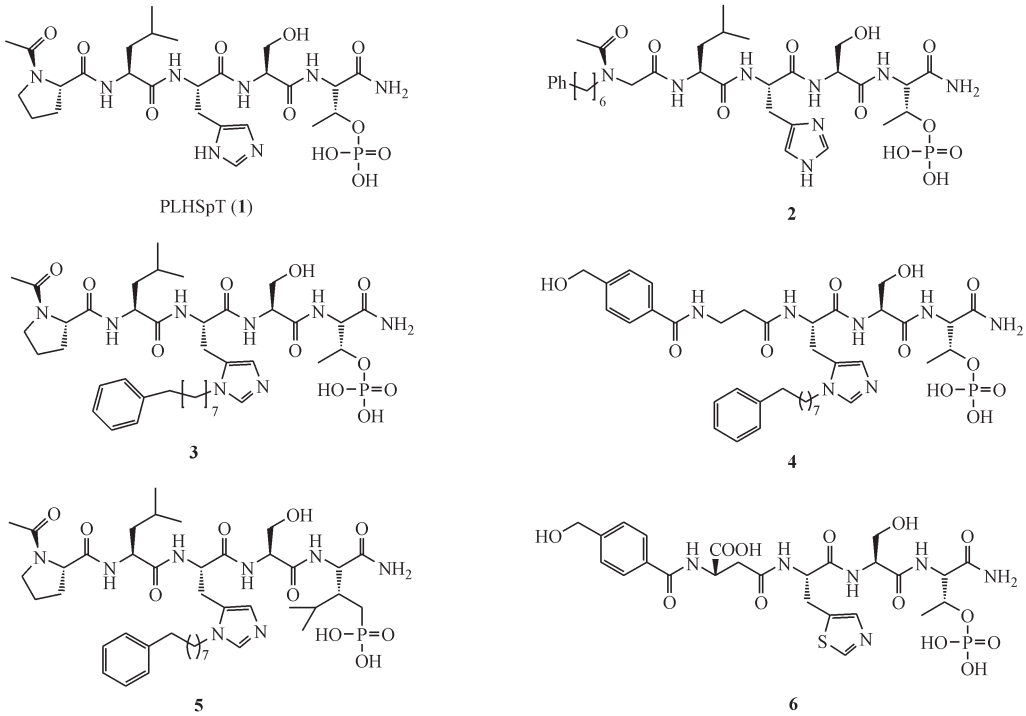


Figure 1　Representative reported peptidomimetics as Plk1 PBD inhibitors

2　方　法

2.1　拟肽化合物的合成

目标化合物的合成采用的是文献报道的 Fmoc 保护基固相合成法[17]。目标化合物合成路线通式见图 2。Rink 树脂用 DMF 溶胀 20 min，将 Fmoc 保护的氨基酸（3.0 eq.）、HBTU（3.0 eq.）、HOBt（3.0 eq.）和 *N*,*N*-二异丙基乙二胺（DIEPA，6.0 eq.）与 DMF（1 mL）混合 2 min，加入到树脂中，剧烈振荡 1 h，减压抽滤掉反应液，再用 DMF 和 DCM 交替洗涤树脂 3 次后，加入配制好的封端液（DMF-醋酐-DIPEA，7∶2∶1）1 mL 左右，在涡旋振荡仪上反应 30 min，再重复上述洗涤操作。向混合物中加入事先配制好的 Fmoc 脱保护溶液（DMF-哌啶，4∶1）2 mL，在涡旋振荡器上振荡反应 10 min，减压抽滤掉溶液，再用 DMF、DCM 交替洗涤 3 次，再加入脱 Fmoc 溶液 2 mL，振荡 15 min 后，重复上述洗涤步骤洗涤之后，用刮刀取少量置于试管中，加入几滴配制好的 5% 苯并茚三酮溶液，100 ℃水中煮沸 2 min 后，树脂显蓝紫色则表示 Fmoc 脱除完毕，如树脂显无色透明状，或者浅红色则需再加脱 Fmoc 溶液，振荡，直到 Fmoc 脱除完全，才可进行下步操作。用后续连接需要的不同“砌块”重复以上偶联-脱保护过程，直至完成所需拟肽链的合成。将合成结束后的树脂用 DMF 洗涤 2 次，减压抽滤掉 DMF，尽可能地抽干溶液，然后加入冰三氟醋酸 2 mL 左右，摇晃使溶液和树脂的颜色变红或变黑之后，再将其放置于涡旋振荡仪上振荡 3~4 h，使其充分脱掉多肽上的保护基并从树脂上裂解完全。将裂解后的反应液缓慢滴入 3~5 倍体积冷却的无水乙醚（0 ℃）中，将沉淀及无水乙醚倒入 20 mL 离心管中，用转速 2 500 r/min 的离心机，离心 3 min 后，倒掉上层的无水乙醚，下层沉淀再加冰乙醚搅拌洗涤后，再对其离心，重复上述步骤，最后得到固体的粗肽。裂解沉降得到的粗肽用溶剂（超纯水-色谱级乙腈，1∶1）溶解，用 0.45 μm 粒径的水滤膜对其进行过滤，得到的滤液用岛津反相高效制备液相仪对其进行分离纯化，流动相 A 为超纯水溶液，流动相 B 为含 0.1% 三氟醋酸的色谱级乙腈。目标物纯度经 HPLC 检测均高于 95%，高分辨质谱确定其相对分子质量（表 1）。

2.2　目标化合物对 Plk1 的抑制活性

采用荧光偏振法测定目标化合物对 Plk1 PBD 的抑制活性。将 FITC-Probe1（60 nmol/L）与 Plk1 PBD（300 nmol/L）以及不同浓度的待测试目标化合物各 20 μL 依次加入 384 黑色孔板中，先从高浓度

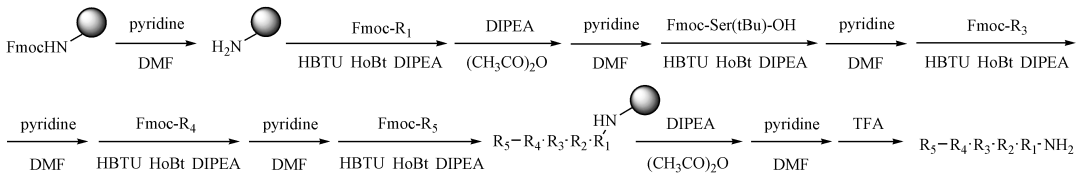


Figure 2 Synthetic route of target compound. "R" represents different amino acids or small molecule acids

Table 1 HRMS and purity data of the target compounds

Compd.	Calculated $[M+H]^+$	Found $[M+H]^+$	Purity/%
7a	609.299 6	609.299 6	99.14
7b	623.315 3	623.315 4	99.74
7c	637.331 0	637.331 2	97.26
7d	634.320 1	634.320 2	99.45
7e	634.320 1	634.319 8	99.36
7f	634.320 1	634.320 1	96.05
7g	639.281 2	639.281 6	98.76
7h	625.305 8	625.305 9	99.33
7i	640.276 5	640.276 8	98.63
7j	595.218 6	595.218 5	97.98
7k	658.250 7	658.250 8	99.32
7l	637.192 8	637.192 7	95.42
7m	638.188 1	638.188 3	99.80
7n	639.172 1	639.172 3	99.45
7o	643.163 4	643.1636	97.53
7p	675.169 2	675.168 9	98.89
7q	689.185 3	689.185 5	98.92
7r	657.179 0	657.179 0	99.75
7s	657.179 0	657.179 5	99.91
7t	657.179 0	657.179 1	99.80
7u	657.179 0	657.179 4	98.12

到低浓度加待测试化合物,再从低浓度到高浓度加入Plk1 PBD(300 nmol/L)蛋白溶液,最后从低浓度到高浓度加入FITC-Probe1(60 nmol/L)探针溶液,每个浓度设立3个复孔。此外,需要加入FITC-Probe1(60 nmol/L)标签溶液20 μL,再加缓冲液40 μL作为测试的空白对照,以及含有FITC-Probe1(60 nmol/L)标签溶液20 μL和Plk1 PBD(300 nmol/L)蛋白溶液20 μL,再加缓冲液20 μL的混合溶液作为阴性对照,空白对照孔与阴性对照孔都需要设置3个复孔,空白对照与阴性对照处理方法与每个化合物的处理方法一致。加完之后室温避光在台式摇床上缓慢振摇孵育30 min后,在荧光偏振仪上进行偏振检测并进行数据分析,通过计算公式计算出目标化合物对Plk1 PBD的抑制率。抑制率(%)=[1-(阳性对照偏振值－空白对照偏振值)/(阴性对照偏振值-空白对照偏振值)]×100。再用GraphPad Prism 5软件拟合抑制曲线并计算出目标化合物的IC_{50},实验结果见表2。

2.3 化合物7l对Plk2、Plk3的抑制活性

化合物对Plk2 PBD和Plk3 PBD的抑制活性测试方法与Plk1 PBD的抑制活性测试方法相同,只需将探针和标签分子换成相应的FITC-Probe2和FITC-Probe3即可。

2.4 目标化合物对HeLa细胞增殖的抑制活性

Plk1在HeLa细胞中高表达,因此选择HeLa细胞测试化合物对细胞增殖的抑制活性。将培养的HeLa细胞以每孔2 500个细胞加入到96孔板中,然后加入不同浓度的待测化合物(0, 100, 200, 300, 400, 500 μmol/L)100 μL,再加入细胞培养基进行培养。培养孵育24 h后,每孔加入浓度为5 mg/mL的3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)溶液20 μL,继续培养4 h后弃去上清液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)100 μL。将该悬浮液置于微型振动器上振荡5 min后,使用广谱酶标仪测定其在波长为570 nm处的吸收度(A)。实验重复3次,最终结果取3次结果的平均值。化合物对肿瘤细胞增殖抑制率通过下式计算:抑制率(%)=[(对照组吸收度－给药组吸收度)/对照组吸收度]×100。

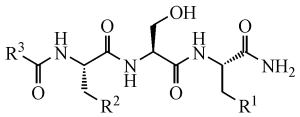
2.5 大鼠血浆稳定性测试

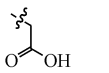
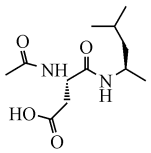
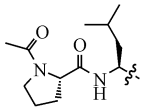
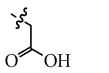
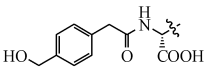
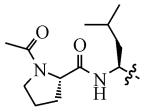
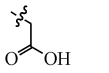
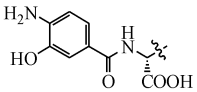
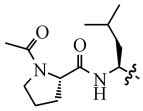
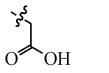
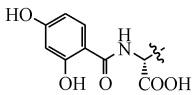
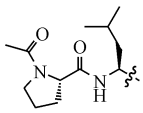
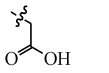
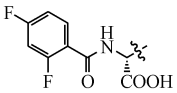
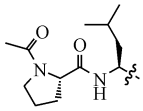
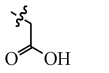
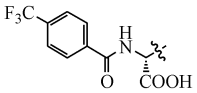
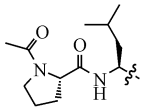
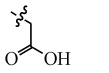
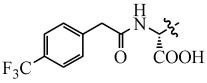
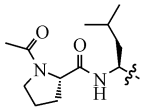
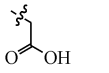
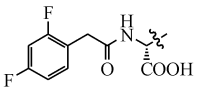
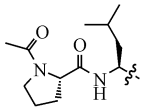
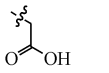
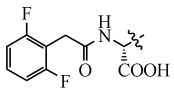
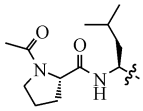
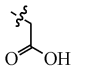
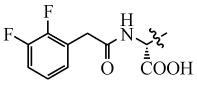
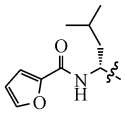
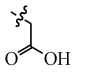
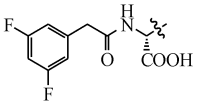
将待测化合物与阳性药配制为100 μg/mL的溶液,取0.1 mL加入到新鲜的大鼠血浆1 mL中,终浓度为10 μg/mL,混合均匀在37 ℃下恒温孵育。在不同时间点取孵育的混合溶液100 μL加入到溶剂(甲醇-乙腈,1∶1)300 μL中,涡旋振荡后在4 ℃下以12 000 r/min离心20 min以沉降血浆蛋白。取上清液并用LC-MS测定不同时间点大鼠血浆中残留的化合物含量。

LC-MS分析是通过Thermo TSQ Quantis LC MS/MS系统进行的,色谱分离使用InertSustain C_{18}色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相A是超纯

水中含 0.1% 的甲酸溶液（A 泵），流动相 B 是乙腈中含 0.1% 的甲酸溶液（B 泵）。设定流动相梯度如下：0 min，5%B；8 min，30%B；8.2 min，80%B；9 min，80%B；9.1 min，5%B；15 min，5%B。流速为 1 mL/min。所有样品的进样量为 20 μL。正电喷雾电离（ESI）模式用于 MS 测定，其源参数如下：喷雾电压，4 000 V；传输管温度为 350 ℃；鞘气 30 Arb；离子吹扫气体压力为 1.0 psi（1 psi=6.895 kPa）。

Table 2　Structures of designed compounds and inhibitory activity to Plk1 PBD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



Compd.	R^1	R^2	R^3	Plk1 PBD IC_{50}/(μmol/L)	Compd.	R^1	R^2	R^3	Plk1 PBD IC_{50}/(μmol/L)
PLHSpT(**1**)	–	–	–	0.526 ± 0.013	**7k**				0.425 ± 0.113
7a				125.3 ± 11.5	**7l**				0.285 ± 0.073
7b				0.716 ± 0.052	**7m**				1.316 ± 0.478
7c				1.815 ± 0.571	**7n**				1.619 ± 0.295
7d				0.645 ± 0.058	**7o**				1.443 ± 0.310
7e				0.771 ± 0.243	**7p**				0.479 ± 0.142
7f				0.502 ± 0.109	**7q**				1.014 ± 0.313
7g				0.558 ± 0.032	**7r**				2.714 ± 0.641
7h				0.490 ± 0.201	**7s**				1.770 ± 0.544
7i				0.413 ± 0.019	**7t**				1.724 ± 0.393
7j				0.702 ± 0.316	**7u**				12.06 ± 1.701

2.6 分子对接研究

Plk1 PBD蛋白结构从RCSB的蛋白数据库中获得,网址为http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do,晶体结构ID为3HIK。晶体结构首先用GOLD 5.1软件进行结构优化,添加极性氢以及去除原晶体结构中的配体文件,保存为sdf格式文件备用。小分子文件采用MOE 2019.01优化,使用MMFF94x力场进行能量优化。能量收敛到41.86 J/mol,最大迭代次数1 000至优化结束,保存为sdf文件备用。对接采用CCDC GOLD v5.1软件中的ChemScore计算方法,活性位点定义为以配体分子几何中心为圆心、半径为8 Å的球,遗传算法参数(GA)设置为10,采用ChemScore打分函数并设定选择所有的对接构象,要求计算结果RMSD < 1.5 Å。根据ChemScore的打分、氢质子转移的可行性以及化合物与酶形成氢键综合挑选,获得最优对接构象。最佳构象用MOE 2019.01做可视化图象。

3 结果和讨论

由表2可知,以PLHSpT为先导化合物,将结构中的磷酸基团替换为羧基,并考察羧基与拟肽骨架之间连接链的长度对活性的影响。当羧基与骨架之间的距离为2个原子(化合物**7b**)时,化合物对Plk1 PBD的抑制活性与先导化合物PLHSpT相当,延长(如化合物**7c**)或缩短(如化合物**7a**)均引起活性下降。接下来,将肽链中组氨酸的咪唑基团用不同的杂环化合物进行替换,也就是将组氨酸残基用非天然氨基酸残基进行替换,所获得的化合物均保持了对Plk1 PBD的抑制活性,选取化合物**7i**(咪唑环被噻唑环替换)进行进一步的探索。对*N*-末端的Pro-Leu基团的修饰,参考本课题组前期研究工作[22],引入了多种非天然的氨基酸取代基,大部分化合物表现出较高的Plk1 PBD抑制活性,其中化合物**7l**(*N*-末端的取代基是4-羟甲基苯甲酰-D-β-天冬氨酰基)表现出最高的Plk1 PBD抑制活性(IC_{50} = 0.285 μmol/L)。化合物**7l**的选择性测试结果如图3所示,其对Plk2 PBD和Plk3 PBD的IC_{50}均大于100 μmol/L,表现出显著的亚型选择性。

先导化合物(PLHSpT,化合物**1**)在500 μmol/L下对HeLa细胞增殖没有抑制作用,酶水平的抑制活性和肿瘤细胞增殖抑制活性之间的巨大差别由于磷酸肽对细胞膜较差的渗透性所导致[17]。化合物**7l**对HeLa细胞增殖的IC_{50}为362 μmol/L(图4)。虽然化合物**1**对Plk1 PBD的抑制活性与化合物**7l**相当,但是对肿瘤细胞增殖的作用却远远低于化合物**7l**。这说明对拟肽化合物结构改造提高了化合物对肿瘤细胞生长的抑制作用。

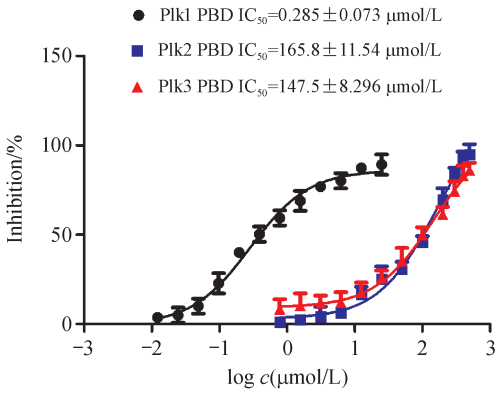


Figure 3 Inhibition of compound **7l** to Plk1, Plk2, and Plk3 PBD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

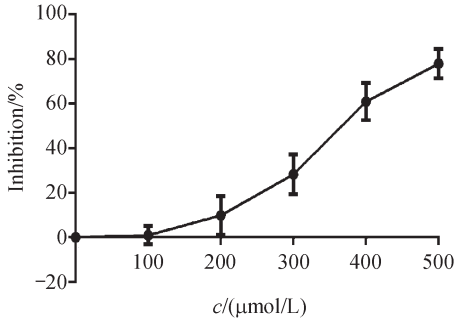


Figure 4 *In vitro* cell toxicity of compound **7l** on HeLa cells after 24 h incubation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物的大鼠血浆稳定性实验结果如图5所示,当孵育时间达到30 min或者更久时,化合物**7l**的降解速度明显慢于阳性对照(PLHSpT,化合物**1**)。孵育到120 min时,血浆中阳性对照PLHSpT的残留量为43.3%,而相比之下,化合物**7l**的剩余量仍超过70%。PLHSpT结构中全部是天然氨基酸,而改造得到的化合物**7l**的结构中仅含有两个天然氨基酸残基,这样的非天然氨基酸修饰增加了拟肽化合物的血浆稳定性。

选取活性最好的化合物**7l**,将其进行对接研究,对接结果见图6。从分子对接图中可以看出,化合物**7l**上C端的羧基可以进入磷酸基结合口袋

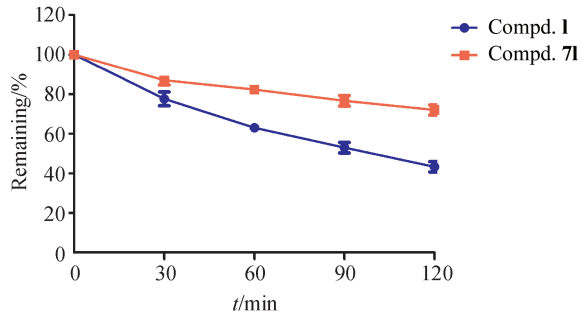


Figure 5　Plasma stability of PLHSpT (**1**) and compound **7l** ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

与 Plk1 PBD 上的 Lys540 产生静电相互作用，这与 PLHSpT 类似。丝氨酸残基上的羰基和氨基与 Trp414 上的氨基与羰基产生氢键相互作用，β-D-天冬氨酸侧链的羧基与 Plk1 PBD 上的 Arg516 的胍基产生静电相互作用，这个作用力的增加可能是化合物 **7l** 结构中虽然缺少了磷酸基这样强作用的基团却仍然能保持活性的主要原因。

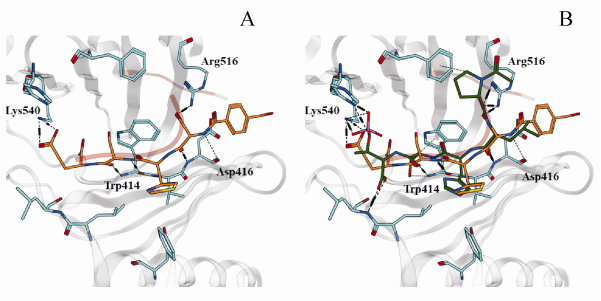


Figure 6　Docking study on compound **7l** with Plk1 PBD(A). Binding modes of compound **7l** (yellow) and the co-crystallized ligand PLHSpT (cyan) (B), where consistent binding modes were found between compound **7l** and PLHSpT in the crystal structure (PDB code 3HIK)

4　结　论

通过将磷酸肽结构的 Plk1 PBD 抑制剂的磷酸基用羧基替换，并且将肽链中用各种非天然氨基酸进行改造和修饰，本研究获得了一系列不含磷酸基团的选择性 Plk1 PBD 抑制剂。大部分化合物表现出对 Plk1 PBD 的中等抑制活性，其中化合物 **7l** 对 Plk1 PBD 抑制活性与先导化合物 PLHSpT 相当，且具有高选择性。与磷酸肽类结构化合物相比，改造后的化合物具有更好的肿瘤细胞生长抑制作用。并且，经过非天然氨基酸修饰和改造，化合物的血浆稳定性得到了提高。这类不含磷酸基团的拟肽类化合物的发现，为寻找新型的选择性 Plk1 PBD 抑制剂提供了参考。

参 考 文 献

[1] Park JE, Soung NK, Johmura Y, *et al*. Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, **67**(12): 1957-1970.

[2] de Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases[J]. *Cell Cycle*, 2011, **10**(14): 2255-2262.

[3] Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(4): 321-330.

[4] Lowery DM, Lim D, Yaffe MB. Structure and function of Polo-like kinases[J]. *Oncogene*, 2005, **24**(2): 248-259.

[5] Golsteyn RM, Mundt KE, Fry AM, *et al*. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function[J]. *J Cell Biol*, 1995, **129**(6): 1617-1628.

[6] Lee KS, Burke TR Jr, Park JE, *et al*. Recent advances and new strategies in targeting Plk1 for anticancer therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, **36**(12): 858-877.

[7] Ma S, Liu MA, Yuan YL, *et al*. The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB[J]. *Mol Cancer Res*, 2003, **1**(5): 376-384.

[8] Ma S, Charron J, Erikson RL. Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(19): 6936-6943.

[9] Burns TF, Fei PW, Scata KA, *et al*. Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (Taxol)-exposed cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(16): 5556-5571.

[10] Xie SQ, Xie B, Lee MY, *et al*. Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases [J]. *Oncogene*, 2005, **24**(2): 277-286.

[11] Kong KL, Lu S, Gao YP, *et al*. Advances on the study of PLK1 inhibitors as antitumor agents[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2011, **42**(1): 9-15.

[12] Yao AH, Chang YJ, Jiang C, *et al*. Research progress of Polo-like kinase 1 inhibitors targeting Polo-box domain[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2016, **47**(1): 1-8.

[13] Yun SM, Moulaei T, Lim D, *et al*. Structural and functional analyses of minimal phosphopeptides targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, **16**(8): 876-882.

[14] Liu F, Park JE, Qian WJ, *et al*. Peptoid-peptide hybrid ligands targeting the polo box domain of polo-like kinase 1[J]. *ChemBioChem*, 2012, **13**(9): 1291-1296.

[15] Murugan RN, Park JE, Lim D, *et al*. Development of cyclic peptomer inhibitors targeting the polo-box domain of polo-like

kinase 1[J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, **21**(9): 2623-2634.

[16] Qian WJ, Park JE, Lee KS, *et al*. Non-proteinogenic amino acids in the pThr-2 position of a pentamer peptide that confer high binding affinity for the polo box domain (PBD) of polo-like kinase 1 (Plk1)[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, **22**(24): 7306-7308.

[17] Ahn M, Han YH, Park JE, *et al*. A new class of peptidomimetics targeting the polo-box domain of Polo-like kinase 1[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(1): 294-304.

[18] Hymel D, TRJrBurke. Phosphatase-stable phosphoamino acid mimetics that enhance binding affinities with the polo-box domain of polo-like Kinase 1[J]. *ChemMedChem*, 2017, **12**(3): 202-206.

[19] Zhao XZ, Hymel D, Burke TR Jr. Enhancing polo-like kinase 1 selectivity of polo-box domain-binding peptides[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, **25**(19): 5041-5049.

[20] Chen YH, Li ZY, Liu Y, *et al*. Identification of novel and selective non-peptide inhibitors targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1[J]. *Bioorg Chem*, 2018, **81**: 278-288.

[21] Li ZY, Zhang ZG, Chen YH, *et al*. Design, synthesis and evaluation of d-amino acid-containing peptidomimetics targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1[J]. *Bioorg Chem*, 2019, **85**: 534-540.

[22] Li ZY, Zhang ZG, Sun HY, *et al*. Identification of novel peptidomimetics targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1[J]. *Bioorg Chem*, 2019, **91**: 103148.

·本 刊 讯·

本刊副主编孔令义教授及编委郝海平教授受邀参加江苏省科学技术奖励大会接受颁奖

2020年6月10日,江苏省委、省政府在宁举行全省科学技术奖励大会,隆重表彰2019年度省科学技术奖获奖单位和个人,激励全省广大科技工作者攻坚克难、勇攀高峰,为推动高质量发展走在前列、建设“强富美高”新江苏提供坚实科技支撑。本刊副主编孔令义教授作为江苏省科学技术一等奖获奖代表上台领奖,郝海平教授作为江苏省青年科技杰出贡献奖获奖者上台领奖。江苏省长吴政隆同志为孔令义教授颁奖,政协主席黄莉新同志为郝海平教授颁奖,并亲切握手表示祝贺。

孔令义教授团队获得江苏省科学技术一等奖项目为“中药和天然药物活性物质的发现与研究”,项目实施期间在常用中药物质基础的阐明、中药和天然药物新颖结构化学成分的发现、基于化学对照品的中药质量标准的提升以及从天然活性成分中发现新药等方面都取得了在国内外具有重要影响的成果。在Organic Letters,Cancer Letters,Journal of Natural Products等天然药物化学及其相关领域国际权威和著名期刊上共发表学术论文266篇,14个化合物当选为国际热点天然产物,获得中国和国际授权发明专利10项。研究成果对阐明中药和天然药物的科学内涵,促进基于中药和天然药物活性成分的新药创制,提高临床应用的中药和天然药物的质量控制水平,实现中药的现代化和国际化都具有十分重要的意义。

郝海平教授从事代谢调控与靶标发现、中药及天然药物体内过程及作用机理研究,构建了完善、普适的体内外天然药物复杂成分定性、定量分析与体内过程研究的方法学体系,提出并建立了符合天然药物多成分多靶标作用特点的药代动力学研究理论与模式。所领导的团队完成创新药物临床前药代动力学20余项,关键技术为省内外知名药企提供技术支持。提出“反向药代动力学”新理论,发现胆汁酸等重要内源活性分子的新靶标,针对代谢性脂肪肝炎等疾病的药物研发提出新策略。在Cell Metab, Nat Commun等重要期刊发表高水平论文120余篇,作为主要完成人之一,获国家科技进步二等奖2项,部省级一等奖3项。

(来源:科学技术处,本刊有删改)

黄绵马酸AB的合成

石培琪,蓝晓茹,林铮华,陈创发,黎旭彬,叶连宝*

(广东药科大学药学院,广州 510006)

摘 要 黄绵马酸AB是香鳞毛蕨中具有多种生物活性的双环型间苯三酚衍生物。对黄绵马酸AB采用逆合成分析法进行结构分析,利用拼合原理设计合成了黄绵马酸AB。以间苯三酚为原料,经维尔斯迈尔-哈克反应、还原反应和酰基化反应合成2-甲基-4-丁酰基间苯三酚,经酰基化反应、烷基化反应和脱酰基反应合成绵马酸片段,最后以*N*, *N*-二甲基亚甲基碘化铵活化反应得到黄绵马酸AB。中间体和黄绵马酸AB经MS、^{1}H NMR和^{13}C NMR进行结构确证,目标产物总收率达14.7%,设计的黄绵马酸AB合成路线原料易得且操作简便。

关键词 黄绵马酸AB;间苯三酚;合成

中图分类号 R914 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0295-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200306

引用本文 石培琪,蓝晓茹,林铮华,等.黄绵马酸AB的合成[J].中国药科大学学报,2020,51(3):295-298.

Cite this article as: SHI Peiqi, LAN Xiaoru, LIN Zhenghua, *et al*. Synthesis of flavaspidic acid AB[J].*J China Pharm Univ*,2020,51(3):295-298.

Synthesis of flavaspidic acid AB

SHI Peiqi, LAN Xiaoru, LIN Zhenghua, CHEN Chuangfa, LI Xubin, YE Lianbao*

College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006,China

Abstract Flavaspidic acid AB is a bicyclic phloroglucinol derivative with various biological activities in *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. The structure of flavaspidic acid AB was analyzed by inverse synthesis techniques, and its synthesis was designed under the principle of association. Using phloroglucinol as raw material, the 2-methyl-4-butyrylphloroglucinol was synthesized by Vilsmeier-Haack reaction, reduction and acylation, and the flavaspidic acid fragment was synthesized by acylation, alkylation and deacylation, after which *N*, *N*-dimethylmethyleneammonium iodide was activated and the flavaspidic acid AB was obtained. The structures of intermediates and flavaspidic acid AB were confirmed by MS, ^{1}H NMR and ^{13}C NMR, and the yield of the target product reached 14.7%. Results indicate that the designed synthetic route of flavaspidic acid AB is simple and easy.

Key words flavaspidic acid AB; phloroglucinol; synthesis

This study was supported by the College Students' Innovative and Entrepreneurial Training Plan Program (No. 201910573010)

香鳞毛蕨为鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物,分布于我国东北、华北各省,主要用于治疗真菌感染的手足癣、体股癣等,疗效甚佳,不易复发[1]。间苯三酚类化合物是香鳞毛蕨的主要活性成分,也是特征性成分,具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化等多种药理作用[2-3]。黄绵马酸AB(flavaspidic acid AB)是香鳞毛蕨中常见的一种双环型间苯三酚化合物[4],该化合物由2-甲基-4-丁酰基间苯三酚和绵马酸片段通过亚甲基桥连而成,结构如图1所示。研究表明,黄绵马酸AB具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化和抗病毒等作用,尤以抗菌作用明显,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、变形链球菌和枯草杆菌有良好的抑制作用[5-10]。

目前,间苯三酚类化合物由于其广泛的生物

收稿日期 2020-03-27 *通信作者 Tel:020-39352139 E-mail:yelb7909@163.com

基金项目 大学生创新创业训练计划资助项目(201910573010)

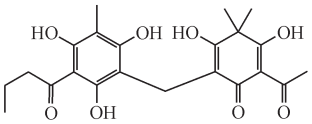


Figure 1 Structure of flavaspidic acid AB

活性已被应用于各种疾病的治疗,香鳞毛蕨中间苯三酚类化合物受到广泛研究者的关注[11]。关于黄绵马酸AB的研究主要集中在提取分离和生物活性,关于该化合物的全合成研究未见文献报道,同时鳞毛蕨科间苯三酚类化合物共存于植物中,该类化合物易分解、氧化和聚合,提取分离耗时长、分离困难,且获得的单体含量极低[12-13]。若能完成黄绵马酸AB的全合成研究,可为该类双环型间苯三酚的合成及药理作用研究提供理论依据。

1 合成路线

本研究采用逆合成方法分析,将黄绵马酸AB拆分为2-甲基-4-丁酰基间苯三酚(化合物**1-4**)和绵马酸片段(化合物**2-4**)合成前体,采用拼合原理将两个片段经亚甲基拼合得到黄绵马酸AB。首先,以间苯三酚为原料,与草酰氯在*N*, *N*-二甲基甲酰胺作用下发生Vilsmeier-Haack反应,在苯环上引入一个甲酰基,经锌粉还原为甲基,再以丁酰氯为酰化剂,在三氯化铝的催化下发生Friedel-crafts酰基化反应,得到2-甲基-4-丁酰基间苯三酚。接着,继续以间苯三酚为原料,以乙酸为酰化剂,通过酰基化反应,在苯环上同时引入两个乙酰基得到2, 4-二乙酰基间苯三酚,再以碘甲烷作为烷化剂,在强碱条件下通过烷基化反应引入两个甲基同时发生变构,接着在硫酸的作用下脱去一个乙酰基得到绵马酸片段。最后,将2-甲基-4-丁酰基间苯三酚片段与绵马酸片段在*N*, *N*-二甲基亚甲基碘化铵作用下通过聚合反应得到目标产物黄绵马酸AB(图2)。

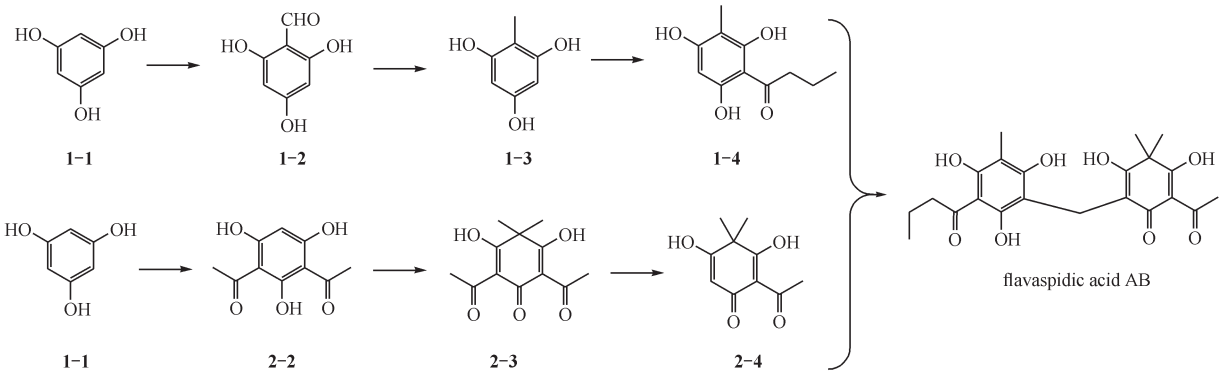


Figure 2 Synthesis of flavaspidic acid AB

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

JJ323BC电子天平(常数市双杰测试仪器厂);RV3V-C旋转蒸发仪(德国IKA公司);SHZ-D (III)循环水式多用真空泵(上海鹰迪仪器设备有限公司);DZF-6032真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);集热式恒温加热搅拌器DF-101(巩义市予华仪器有限责任公司)。

硫酸、盐酸(广州化学试剂厂);三氯氧磷(纯度99%,阿法埃莎化学有限公司);锌粉、甲醇钠(纯度99%,北京伊诺凯科技有限公司);三氟化硼乙醚(BF_3 48%,上海麦克林生化科技有限公司);碘甲烷(纯度99%,上海萨恩科技有限公司);无水三氯化铝(纯度99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),其他试剂均为市售分析纯。

2.2 合成部分

2.2.1 2, 4, 6-三羟基苯甲醛的合成(**1-2**) 将无水间苯三酚(3 g,0.024 mol)溶解于乙酸乙酯,加入*N*, *N*-二甲基甲酰胺(5.9 mL, 0.074 mol)、水(0.864 mL,0.048 mol)搅拌均匀后,冰浴下缓慢滴加三氯氧磷(6.49 mL,0.696 mol),升至室温反应1 h,过滤,乙酸乙酯洗涤滤饼,收集滤饼加入反应瓶,加水,氮气保护下升温至回流10 min,冷却至室温,将反应体系放置冰箱冷藏析出大量固体,抽滤,水洗,真空加热干燥得化合物**1-2**,淡红色固体

3.1 g，收率 84%，mp：194.6~197.4 ℃。^{1}H NMR（300 MHz，DMSO-d_6）δ：11.46（2H，s，OH），10.66（1H，s，OH），9.93（1H，s，CHO），5.79（s，2H，Ar-H）。ESI-MS（*m/z*）：153.36［M−H］$^-$。

2.2.2　2-甲基间苯三酚的合成（**1−3**）　将化合物 **1−2**（5 g，0.0397 mol）完全溶解于乙酸乙酯（25 mL）和乙醚（25 mL）的混合溶液，加锌粉（7.5 g，0.115 mol），剧烈搅拌，冰浴下缓慢滴加浓盐酸（21 mL），反应 10 min 后，过滤除去锌粉，加水，乙酸乙酯萃取，浓缩后柱色谱（洗脱剂：乙酸乙酯-石油醚，1∶1）得化合物 **1−3**，白色固体 5.5 g，收率 99%，mp：213.0~215.6 ℃。^{1}H NMR（300 MHz，DMSO-d_6）δ：8.81（2H，s，OH），8.68（1H，s，OH），5.76（2H，s，Ar-H），1.80（3H，s，CH_3）。ESI-MS（*m/z*）：139.52［M−H］$^-$。

2.2.3　2-甲基-4-丁酰基间苯三酚的合成（**1−4**）　将化合物 **1−3**（5 g，0.035 mol）混悬于硝基苯（40 mL），分 3 次加入三氯化铝（18.67 g，0.14 mol），氮气保护下搅拌 30 min 至溶液澄清，加入丁酰氯（3.95 mL，0.038 mol），65 ℃ 反应 24 h 至 TLC 检测反应完全，将反应液倒入冰水中，乙酸乙酯萃取，氢氧化钠水溶液洗涤有机层，浓盐酸调至弱酸性，乙酸乙酯萃取，浓缩后柱色谱（洗脱剂：乙酸乙酯-石油醚，6∶1）得化合物 **1−4**，黄白色固体 3.8 g，收率 50%，mp：153.5~155.9 ℃。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：14.02（1H，s，OH），10.49（1H，s，OH），10.25（1H，s，OH），5.99（1H，s，Ar-H），2.96（2H，t，*J*=7.3 Hz，CH_2），1.83（3H，s，CH_3），1.60（2H，m，*J*=7.4 Hz，CH_2），0.91（3H，t，*J*=7.4 Hz，CH_3）。^{13}C NMR（101 MHz，DMSO-d_6）δ：205.1，163.5，162.4，159.7，103.5，101.4，94.0，45.1，17.9，13.9，7.3。ESI-MS（*m/z*）：211.53［M+H］$^+$。

2.2.4　2,4-二乙酰基间苯三酚的合成（**2−2**）　将无水间苯三酚（4 g，0.032 mol），乙酸（5.57 mL，0.095 mol），三氟化硼乙醚溶液（36 mL）依次加入 150 mL 三颈烧瓶，氮气保护，100 ℃ 反应 3 h 至 TLC 检测反应完全，冷却后倒入冰水中，乙酸乙酯萃取，合并有机相，水洗，浓缩后柱色谱（洗脱剂：乙酸乙酯-石油醚，8∶1）得化合物 **2−2**，黄白色固体 4.0 g，产率 65%，mp：153.0~156.1 ℃。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：5.89（1H，s，Ar-H），2.61（6H，s，CH_3）。ESI-MS（*m/z*）：209.16［M−H］$^-$。

2.2.5　2,6-二乙酰基-3,5-二羟基-4,4-二甲基-1,4-环己二烯-1-酮的合成（**2−3**）　将化合物 **2−2**（5 g，0.024 mol）溶解于无水甲醇（100 mL），氮气保护下依次缓慢滴加甲醇钠（7.13 g，0.132 mol）的甲醇（26.40 mL）溶液和碘甲烷（5.98 mL，0.096 mol），40 ℃ 反应至 TLC 检测反应完全后，补加甲醇钠（2.59 g，0.048 mol）的甲醇（9.6 mL）溶液和碘甲烷（2.99 mL，0.048 mol），继续反应 6 h，移至冰浴条件下，加浓盐酸调至弱酸性，旋去甲醇，加水，乙酸乙酯萃取，食盐水洗，浓缩后柱色谱（洗脱剂：乙酸乙酯-石油醚，100∶1）得化合物 **2−3**，白色固体 2.9 g，收率 51%，mp：64.6~66.8 ℃。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.59（6H，s，CH_3），1.34（6H，s，CH_3）。ESI-MS（*m/z*）：237.81［M−H］$^-$。

2.2.6　2-乙酰基-3,5-二羟基-4,4-二甲基-1,4-环己烯-1-酮的合成（**2−4**）　将化合物 **2−3**（2 g，0.0084 mol）、80% 硫酸溶液（26 mL）依次加入 100 mL 圆底烧瓶，升温至 80 ℃，反应 30~40 min，倒入冰水（90 mL）中，乙酸乙酯萃取，水洗，食盐水洗，浓缩后柱色谱（洗脱剂：乙酸乙酯-石油醚，8∶1）得化合物 **2−4**，黄白色固体 1.1 g，收率 65%，mp：164.8~167.9 ℃。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：5.43（1H，s，Ar-H），2.46（3H，s，CH_3），1.26（6H，s，CH_3）。^{13}C NMR（101 MHz，DMSO-d_6）δ：200.3，196.4，188.5，182.4，105.1，94.7，48.5，28.1，24.5。ESI-MS（*m/z*）：197.08［M+H］$^+$。

2.2.7　黄绵马酸 AB 的合成　将化合物 **1−4**（0.3 g，0.0014 mol）完全溶于二氯甲烷（9 mL），氮气保护下冰浴 10 min，迅速加入 *N*，*N*-二甲基亚甲基碘化铵（0.278 g，0.015 mol），继续冰浴 2 h，加入化合物 **2~4**（0.28 g，0.0014 mol），冰浴 10 min 后升温至 45 ℃，TLC 检测反应完全后，加水淬灭反应，二氯甲烷萃取，弱酸性水洗，浓缩柱色谱（洗脱剂：乙酸乙酯-石油醚，6∶1）所得浅黄色固体，0.4 g，收率 68%，mp：204.3~208.9 ℃。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：3.33（2H，s，CH_2），3.05（2H，t，*J*=7.2 Hz，CH_2），2.38（3H，s，CH_3），1.87（3H，s，CH_3），1.61（2H，q，*J*=7.2 Hz，CH_2），1.16（6H，s，CH_3），0.92（3H，t，*J*=7.3 Hz，CH_3）。^{13}C NMR（101 MHz，Chloroform-*d*）δ：206.9，203.6，198.9，187.6，172.1，111.3，108.6，45.8，44.4，29.8，18.3，17.1，16.2，14.1，14.1，7.6。ESI-MS（*m/z*）：417.90［M−H］$^-$。

IR(KBr):3 439,2 966,2 937,2 875,1 616,1 546,1 463,1 428,1 381,1 165 cm^{-1}。数据与文献一致[14]。

3 结果与结论

3.1 合成工艺参数讨论

酰基化反应常用催化剂为三氟化硼乙醚和三氯化铝,以三氯化铝为催化剂主要生成一元取代产物,三氟化硼乙醚可以同时作为溶剂和催化剂在苯环上同时引入两个酰基得到二元酰基产物,减少后续烷基化反应过程重排和多取代副产物产生。选用羧酸为酰化剂较酰氯和酸酐为酰化剂的成本和毒性也更低。此外,温度对2,4-二乙酰基间苯三酚的产率影响较大,在一定温度范围内,产率随着温度的升高而升高,最佳反应温度为100 ℃。

受卤素的电负性影响,卤代烃具有较强的烷基化活性,碘甲烷在该类烷基化试剂中活性较强。在碱性条件下,碘甲烷产生的烷基碳正离子可发生亲电取代,生成单甲基化产物。由于甲基的供电性,单甲基化产物比原料具有更高的亲核性,在足量的碱和烷基化试剂存在的条件下,可以继续发生烷基化反应生成一元、二元取代等多取代的混合物。当选择叔丁醇钾、氢氧化钠和碳酸钾提供碱性环境时,产率均较低。选用甲醇钠提供碱性条件,当原料完全转化为单甲基化产物后继续补加甲醇钠和碘甲烷后二元取代产物的产率明显提高。

在制备2-乙酰基-3,5-二羟基-4,4-二甲基-1,4-环己烯-1-酮的过程中,在硫酸的作用下,原料脱去一个乙酰基和两个乙酰基的反应同时发生,反应时间的延长和硫酸浓度的增加有利于反应向脱去两个酰基进行导致副产物生成增多,反应时间太短和硫酸浓度太低会导致反应不完全,产率过低。控制合适的温度和硫酸浓度可以缩短反应时间同时提高产率,本研究选择80%的硫酸并且反应时间在30~40 min为最佳。

3.2 结 论

本研究以间苯三酚为原料,经7步反应成功制备了天然产物黄绵马酸AB,开发出一条新的黄绵马酸AB合成路线,原料易得,操作简便,黄绵马酸AB的总收率达14.7%,为后续该类间苯三酚化合物的合成和药理作用研究奠定理论基础。

参 考 文 献

[1] Fang ZX, Xie ZH, Pan H, *et al*. Study on preparation procedure for *Dryopteris fragrans* bath tablets of Wudalianchi mineral springs [J]. *Heilongjiang Sci* (黑龙江科学), 2015, **6**(4): 21-23.

[2] Gao ZP, Li RF, Wang BH, *et al*. Progress in chemical constituents of genus *Dryopteris*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae* (中国实验方剂学杂志), 2003, **9**(3): 50-55.

[3] Zuo L, Chen RY. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activity in plants of *Dryopteris Adanson* [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, **36**(9): 150-154.

[4] Du WZ, Song GQ, Liu HQ, *et al*. Study on phloroglucinol derivatives of *Dryopteris fragrans* (L.) Schott [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2016, **32**(1): 22-24.

[5] Lee HB, Kim JC, Lee SM. Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspidic acids AB and PB, from Dryopteris crassirhizoma[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, **32**(5): 655-659.

[6] Na M, Jang J, Min BS, *et al*. Fatty acid synthase inhibitory activity of acylphloroglucinols isolated from *Dryopteris crassirhizoma*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**(18): 4738-4742.

[7] Yang Q, Gao L, Si JY, *et al*. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by flavaspidic acid AB[J]. *Antiviral Res*, 2013, **97**(1): 66-73.

[8] Ren Q, Quan XG, Wang YL, *et al*. Isolation and identification of phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma* by HPLC-LTQ-orbitrap mass spectrometry[J]. *Chem Nat Compd*, 2016, **52**(6): 1137-1140.

[9] Patama TT, Widen CJ. Phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fusco*-atra and D. hawaiiensis[J]. *Phytochemistry*, 1991, **30**(10): 3305-3310.

[10] Lee SM, Na MK, An RB, *et al*. Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, **26**(9): 1354-1356.

[11] Yang LM, Zhang M, Huang XF. Research progress on chemical structures and pharmacological activities of natural phloroglucinols[J]. *Nat Prod Res Develop*(天然产物研究与开发), 2019, **31**(9): 1656-1667.

[12] Liu Z, An XQ, Si JY, *et al*. Active constituents of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai[J]. *Med J West China*(西部医学), 2011, **23**(12): 2300-2302, 2306.

[13] Tian L, Tian SG. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott [J]. *J Xinjiang Med Univ*(新疆医科大学学报), 2014, **37**(9): 1118-1120.

[14] Gao ZP, Li SW, Lu YR, *et al*. Studies on the chemical constituents of *Dryopteris crassirhizoma*[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2003, **38**(4): 260-262.

阿奇霉素口服微球的制备及其评价

苏日娜[1],樊万君[1],张自强[2],何淑旺[3],姚 静[1*]

([1]中国药科大学药学院,南京 210009;[2]南京泽恒医药技术开发有限公司,南京 210046;
[3]山东达因海洋生物制药股份有限公司,荣成 264300)

摘 要 为改善阿奇霉素(AZI)苦味与服药顺应性,以乙基纤维素(EC)为载体,采用O/W乳化溶剂挥发法制备载阿奇霉素口服微球(AZI-EC MS),对其释放与掩味效果进行初步考察,并通过差式扫描量热法、红外光谱和扫描电镜表征。通过联合应用不同相对分子质量EC解决了微球突释问题,当药载质量比1∶1、混合EC(N22/T10,7∶3)为载体时,微球0.5 h累积释放量小于40%,8 h累积释放量可达90%;该微球载药量为(48.95±0.86)%,形态圆整,表面光滑。AZI味道极苦,苦味阈值浓度为9.93 μg/mL,所制备的AZI-EC MS掩味效果良好。结果表明,混合EC为载体的AZI-EC MS能够改善AZI苦味,提高患者顺应性,为AZI新制剂的研究开发奠定基础。

关键词 阿奇霉素;微球;制备;苦味阈值;乙基纤维素

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0299-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200307

引用本文 苏日娜,樊万君,张自强,等.阿奇霉素口服微球的制备及其评价[J].中国药科大学学报,2020,51(3):299-304.

Cite this article as: SU Rina, FAN Wanjun, ZHANG Ziqiang, *et al*. Preparation and evaluation of azithromycin-loaded microspheres for oral administration[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 299-304.

Preparation and evaluation of azithromycin-loaded microspheres for oral administration

SU Rina[1], FAN Wanjun[1], ZHANG Ziqiang[2], HE Shuwang[3], YAO Jing[1*]

[1]School of Pharmacy, China PharmaceuticalUniversity, Nanjing 210009; [2]Nanjing Zeheng Pharmaceutical Technology Development Co.Lt.d, Nanjing 210046; [3]Shandong Dyne Marine Biopharmaceutical Co. Ltd., Rongcheng 246300,China

Abstract To mask the bitterness of azithromycin(AZI) and improve patient compliance, an AZI-loaded microsphere (AZI-EC MS) for oral administration was prepared by O/W emulsion solvent evaporation with ethylcellulose (EC) as carrier. The release profiles and taste-masking effect of AZI-EC MS were preliminarily assessed. Its physical properties and morphology were then investigated by differential scanning calorimetry (DSC), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscope (SEM). The results indicated that the polymer weight of EC could influence the drug release behavior. With a drug polymer ratio of 1∶1 and mixed EC (N22/T10, 7∶3) as carrier, the cumulative release of AZI-EC MS at 0.5 h was less than 40% and reached 90% at 8 h; the drug loading efficiency of microspheres was (48.95 ± 0.86)% with smooth spherical morphology. The AZI bitterness threshold is 9.93 μg/mL with a strong bitter taste, which indicated a better taste masking effect. Therefore, AZI-EC MS prepared in this study can mask AZI bitterness and improve patient compliance, setting the stage for the research of new AZI preparations.

Key words azithromycin; microspheres; preparation; bitter taste threshold; ethylcellulose

This study was supported by the National Science and Technology Major Project (No. 2018ZX09721003-007-005)

收稿日期 2020-02-05 ***通信作者** Tel: 025-83271059 E-mail: yaojing@cpu.edu.cn

基金项目 国家科技重大专项资助项目(No. 2018ZX09721003-007-005)

阿奇霉素(azithromycin,AZI)是由红霉素衍生的半合成氮杂内酯类抗生素,对多种革兰阳性菌和革兰阴性菌有效[1]。临床上因其抗菌谱广、安全性好和易吸收等特点不仅广泛用于成人患者,还可用于婴幼儿患者。由于AZI味道极苦,给药剂量大,儿童患者适口性差,会导致服药不准确甚至治疗效果不佳。除具有苦味之外,AZI口服给药时还会出现恶心、痉挛、腹泻和呕吐等胃肠道不良反应[2]。因此,研究开发一种改善AZI苦味,提高患者接受度与降低不良反应的制剂极为重要。

最近研究表明,稳定性好且便于贮存与携带的微型固体制剂更为适合儿科患者[3-7],其中微球剂量灵活性高、载药量大,适合给药剂量大并具有不同给药方案的抗生素类药物。不仅如此,微球粒径范围小、易于吞咽,在一项不同粒径多微粒体系评价中,小粒径范围微粒服用需水量与口腔残留少,在成人与儿童群体中服用意愿与接受度更高[8]。与此同时,微球可通过载体材料的特性进行包衣,制备口腔速崩片等达到掩味、缓控药物释放,提高制剂灵活性,从而适合不同年龄段或不同吞咽能力患者。乙基纤维素(ethylcellulose, EC)是制备微球常用的可降解、生物相容性良好的缓释载体材料,可以减少口腔中药物释放而达到掩味效果,药物从EC微球中的缓慢释放可降低胃肠道中药物浓度,从而降低药物的胃肠道不良反应[9-10]。

因此,本研究采用EC为载体材料,以O/W乳化溶剂挥发法制备阿奇霉素载药微球(AZI-EC MS),通过混合不同相对分子质量EC为载体的简易方法解决其突释问题并初步探讨释药机制。确定AZI苦味阈值浓度,得出苦味评价拟合方程并评价AZI-EC MS掩味效果,旨在制备改善AZI苦味,提高患者顺应性的口服微球,为AZI制剂研究与AZI苦味评价奠定基础。

1 材 料

1.1 药品与试剂

阿奇霉素原料药(湖北展望药业有限公司,纯度99%);乙基纤维素[型号:Aqualon ™ T10(M_r 75 kD)、N22(M_r 140 kD)、N50(M_r 160 kD),美国亚什兰公司];甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

岛津CTO-10ASUP高效液相色谱仪(日本岛津公司);PB-10 pH计(北京赛多利斯仪器系统有限公司);OS20-Pro置顶式搅拌器(美国Scilogex公司);SHA-B水浴恒温振荡器(精达有限公司);ZRS-6G智能溶出试验仪(天津天大天发科技有限公司);DSC200F3差示扫描量热仪(德国耐驰公司);S-3400N扫描电镜仪(日本Hitachi公司)。

2 方 法

2.1 AZI-EC MS的制备

采用O/W乳化溶剂挥发法制备AZI-EC MS。精密称取EC 0.5 g溶于二氯甲烷10 mL,待其完全溶解后,精密称取AZI 0.5 g加至上述溶液作为油相,匀速滴入至高速搅拌的0.1 % SDS水相,搅拌挥发一定时间后,过滤冲洗微球,烘干至恒重后收集微球。连续过100目和200目筛取75~154 μm范围AZI-EC MS。

2.2 载药量的测定

色谱条件:C_{18}色谱柱,流动相:0.1 mol/L磷酸氢二钾(20%磷酸调至pH 8.2)-甲醇(25∶75),检测波长:210 nm,流速:1 mL/min,柱温:30 ℃,进样量20 μL。

精密称取适量AZI-EC MS于2 mL量瓶,加入二氯甲烷待溶解完全后定容至刻度,摇匀后精密移取1 mL至10 mL量瓶以流动相定容至刻度,过膜取续滤液进HPLC测定。计算载药量:载药量(%)=所含药物重量/微球总重×100。

2.3 体外释放度测定

称取适量AZI-EC MS(含AZI 125 mg),以新鲜脱气磷酸氢二钠(pH 6.0)500 mL为释放介质,温度(37±0.5)℃,转速100 r/min测定释放度。于时间点0.5、1、3、6、8 h取样5 mL并补充同温同体积介质,过滤后取续滤液进HPLC测定,绘制累计释药曲线。

2.4 EC-AZI MS表征

2.4.1 DSC分析 取AZI、EC(T10)、EC(N22)、AZI与EC(T10)和EC(N22)物理混合物(EC(N22)与EC(T10)质量比为7∶3,药载质量比为1∶1)、EC-AZI MS(EC(N22)与EC(T10)质量比为7∶3,药载质量比为1∶1)样品约5 mg于铝坩埚中,以升温速率10 ℃/min,升温范围30~300 ℃条件进行分析,绘

制DSC曲线图。

2.4.2　FTIR 分析　分别将 AZI、EC（T10）、EC（N22）、AZI-EC MS［EC（N22）与 EC（T10）质量比为 7∶3，药载质量比为 1∶1］样品 1～2 mg 在 400～6 000 cm^{-1}范围内进行分析，绘制红外光谱图。

2.4.3　SEM 分析　使用导电胶分别将空白微球［EC（N22）与 EC（T10）质量比为 7∶3］与 AZI-EC MS［EC（N22）与 EC（T10）质量比为 7∶3，药载质量比为 1∶1］固定在铜板上，金粉涂覆导电扫描并拍照，扫描电镜观察微球形态与表面。

2.4.4　体外模拟口腔 pH 介质内释放研究　以经脱气处理的新鲜配制 pH 7.4 磷酸氢二钠 5 mL 为模拟口腔 pH 的释放介质，介质温度为（37±0.5）℃，设恒温振荡器转速 50 r/min，取药物/载体比例为 1∶1、2∶1 和 3∶1 处方载药微球以及 AZI 原料药（pure drug）适量（含 AZI 125 mg）进行体外释放实验。于 1、3 和 5 min 分别取液 1 mL 并及时补充相同体积等温介质，样品经 0.22 μm 水系滤膜，取续滤液适量加流动相稀释后进 HPLC 测定。

2.4.5　AZI 阈值测定与苦味评价　取适量 AZI 原料药粉末，以纯净饮用水配制 4.97、9.93、14.9、19.9、29.8、48.5 和 99.3 μg/mL 等一系列质量浓度后，由 7 位 19～25 岁健康成人志愿者组成的小组进行 AZI 人体苦味阈值测试。要求志愿者以纯净水漱口后，取适量 AZI 溶液含至口腔中，并将舌头左右前后转动至溶液与舌苔充分接触，30 s 后吐掉并用纯净水漱口数次，同法依次测试浓度递增的 AZI 溶液。志愿者对不同浓度 AZI 溶液的苦味意见根据苦味量表评分。苦味量表由 0 为“无味”、1 为“微苦”、2 为“中苦”和 3 为“强烈苦味”4 种标准组成。记录志愿者评分并确定 AZI 苦味阈值。

为得到苦味评分与 AZI 浓度之间的数量关系，将所得志愿者平均评分与 AZI 浓度对数作多项式拟合[11]，得到 lgC（AZI）与志愿者评分之间的关系。在此多项式拟合方程结果下，根据模拟口腔 pH 条件下进行的释放度测定结果进行苦味评价计算。

3　结果与讨论

3.1　AZI-EC MS 的制备

以 EC（T10）、EC（N22）、EC（N50）等不同相对分子质量 EC 为载体，制备载药微球。当药载质量比 1∶1 时，分别以 T10、N22 和 N50 型号 EC 为载体制得微球的载药量依次是（42.57±1.71）%、（47.66±0.85）%和（49.10±1.87）%。另外，如图 1-A 所示，EC 相对分子质量会影响微球释药速率；其中 EC（T10）微球在 0.5 h 突释率可达 85%，1 h 释放量达到 90% 以上，而 EC（N22）型在各个时间点释放量均高于 EC（N50），8 h 释放量分别为 62% 和 54%。这说明 EC 相对分子质量能够影响微球释药行为，相对分子质量越大，药物释放越缓慢，这可能是因为随着聚合物相对分子质量增加，其链长增加，导致更强的韧性，使载药微球中的药物与载体更为紧密。

进一步制备以不同比例混合 EC（N22/T10）为载体，药载质量比为 1∶1 的微球，其释药结果如图 1-B 所示，随着 EC（T10）比例降低，其释药速率变慢，EC（N22）/EC（T10）比例 5∶5 和 6∶4 微球在 0.5 h 释放量将近 80%，3 h 释放量可达到 90%，而比例 7∶3 和 9∶1 的 0.5 h 均未突释，8 h 释放量分别可达 90% 和 60% 左右。不同型号 EC 的混合比例对载药量无明显影响。而以 EC（N22/T10，7∶3）为载体的微球随药载质量比提高，微球释药速率与载药量增加（如图 1-B 和图 1-C 所示）。

综合考虑突释（0.5 h 释放量小于 40%）和累计释放百分率（8 h 内释放量可达 90%），确定药载质量比为 1∶1，以混合 EC（N 22/T 10，7∶3）为载体制备 AZI-EC MS。

3.2　释药机制研究

缓释微球释药原理主要包括溶出、扩散、溶蚀等。扩散原理又包括透膜扩散（零级释放）、膜孔扩散（接近零级）和骨架材料扩散（非零级释放，Higuchi 扩散模型）。将微球释药曲线与零级释放、Hixson crowell 溶蚀模型、Baker-lonsdale 球形扩散模型和 Higuchi 扩散模型等释药模型方程进行拟合，讨论微球释药机制。如表 1 所示，微球释药过程与零级释放模型拟合程度均较差；而 EC（N22）、EC（N 22/T 10，9∶1）处方为 Baker-lonsdale 球形扩散模型拟合度相对高，其余均与 Higuchi 扩散模型拟合相对高，这说明微球释药是通过骨架材料扩散而非透膜扩散，药物通过 EC 骨架孔道以浓度梯度为驱动进行释放。

3.3　AZI-EC MS 表征与性质评价

3.3.1　DSC 和 FTIR 分析　DSC 分析结果如图 2-A 所示，EC（N22）和 EC（T10）在 53 ℃处有吸热峰，

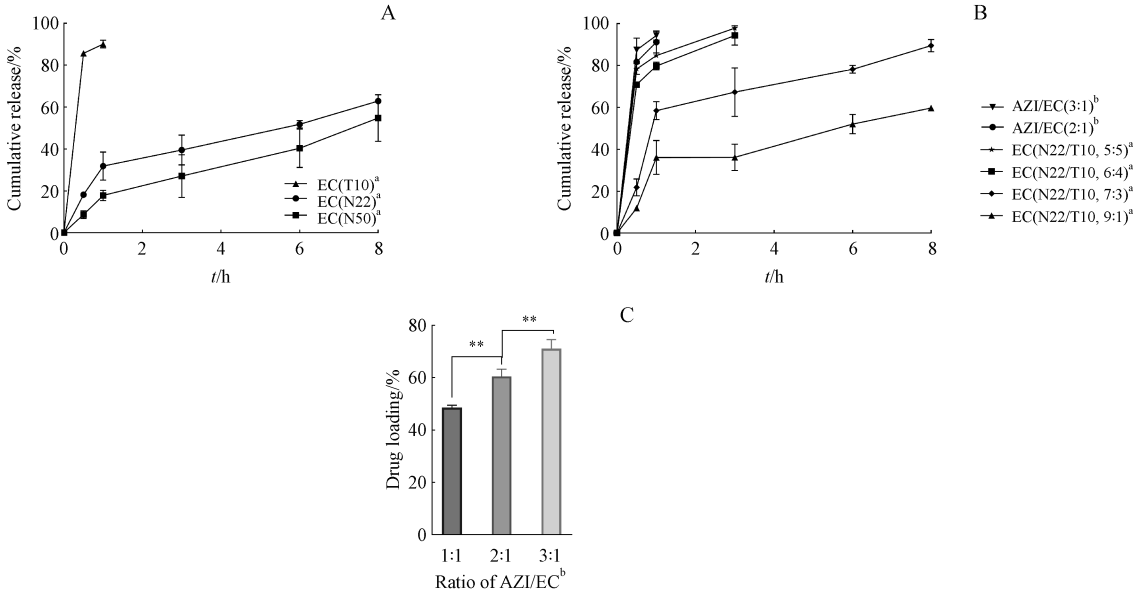


Figure 1 Effect of molecular weight of ethylcellulose(EC) and ratio of azithromycin(AZI)/EC on cumulative drug release(A and B) and drug loading efficiency of AZI-EC microspheres (MS) (C) ($\bar{x} \pm s$, n=3)

$^{**}P$<0. 01; [a] formulation with AZI/EC ratio (1∶1); [b] formulation with EC (N22/T10, 7∶3)

Table 1 Fitting results of the *in vitro* release data to various release kinetic models from different microsphere formulations

Formulation	Drug release model (R^2)			
	Zero-order	Hixson crowell corrosion	Baker-lonsdale spherical diffusion	Higuchi
	Q_t=kt+C	$(1-Q_t)^{1/3}$=kt+C	$2/3[1-(1-Qt)^{2/3}]-Qt$=kt	Qt=k$t^{1/2}$+C
EC(N22)[a]	0.855 7	0.912 2	0.974 5	0.970 5
EC(N50)[a]	0.960 4	0.973 1	0.933 2	0.976 5
EC(T10)[a]	0.787 1	0.834 2	0.869 8	0.941 2
EC(N 22/T 10,5∶5)[a]	0.503 3	0.785 8	0.673 8	0.801 9
EC(N 22/T 10,6∶4)[a]	0.549 1	0.780 1	0.746 1	0.838 4
EC(N 22/T 10, 7∶3)[a]	0.737 6	0.872 2	0.898 1	0.899 0
EC(N 22/T 10,9∶1)[a]	0.808 0	0.862 5	0.938 8	0.920 9
AZI/EC(3∶1)[b]	0.828 2	0.924 1	0.892 9	0.963 4
AZI/EC(2∶1)[b]	0.826 6	0.905 3	0.890 3	0.962 5

[a] formulation with drug/polymer ratio (1∶1); [b] formulation with N22/T10 ratio (7∶3)

AZI原料药在128 ℃与253 ℃处有明显吸热峰，物理混合物则分别出现AZI、EC(N22)和EC(T10)的特征吸热峰，而AZI-EC MS在128 ℃与253 ℃处未见AZI特征吸热峰，且53 ℃处载体特征吸热峰有变宽趋势；FTIR结果如图2-B所示，AZI在1 725. 1 cm^{-1}处有羰基伸缩振动，而AZI-EC MS光谱与EC(N22)和EC(T10)红外光谱相似，并且在1 729. 6 cm^{-1}出现AZI羰基伸缩振动，有变宽趋势。上述结果说明，AZI-EC MS中EC与AZI没有形成新化学键，但是存在分子间作用力。

3. 3. 2 SEM形态观察 如图3所示，空白微球与AZI-EC MS整体成球效果均良好，形态相似，且粒径较均匀，而相比空白微球，AZI-EC MS表面较粗糙，但仍未观察到药物结晶析出，这可能是由于药物的加入，使载体之间的作用有所改变而导致的。此外，放大后观察球表面结构(图3-C和3-F)，结果显示，由于在微球过程中溶剂挥发，在空白微球与AZI-EC MS表面均有大量的微小孔洞，而得益于这些孔洞，药物以浓度梯度为驱动力扩散释放。

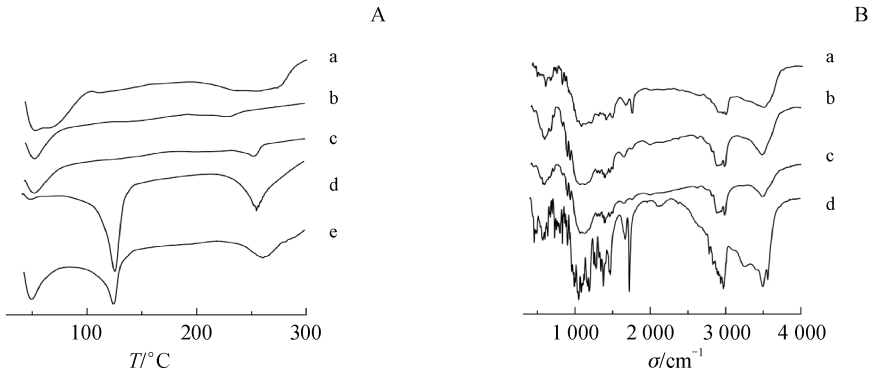


Figure 2　DSC traces(A) and FTIR spectra(B)of AZI-EC MS(a), EC(N22)(b), EC(T10)(c), AZI(d) and physical mixture(e)

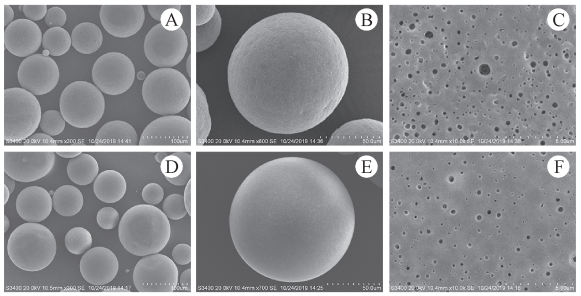


Figure 3　Typical SEM images of blank EC MS (A), single blank EC MS (B), surface of blank EC MS (C), AZI-EC MS (D)singleAZI-EC MS (E), surface of AZI-EC MS (F)

3.3.3　体外模拟口腔pH内释放分析　接近唾液实际体积和pH的释放介质能够更好地模拟口腔环境。一般唾液pH范围在5.5～7.4之间，其中，1～12月小儿唾液pH范围为5.7～7.0，大于pH 7.0时与小孩和成人唾液呈密切相关[12]。因此，本实验采用pH 7.4磷酸盐缓冲溶液为释放介质。如图4所示，与原料药相比，在药物/载体比例高达3∶1时，AZI-EC MS在5 min时释药量仍低于5%，说明微球明显阻滞了药物在口腔中的释放，有助于提高适口性。

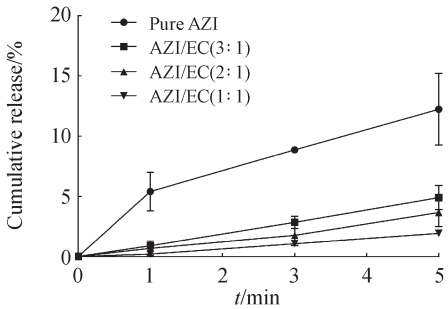


Figure 4　Dissolution profiles of different drug/polymer ratio EC microspheres, 37 °C, pH 7.4 dissolution medium ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3.3.4　AZI阈值测定与苦味评价　志愿者评价AZI原料药苦味结果如图5-A所示，在本实验条件下AZI人体苦味阈值浓度为9.93 μg/mL，等于或低于该浓度时口腔内口感为无味。

为得到志愿者评分与AZI浓度之间的数量关系，将所得志愿者平均评分与AZI浓度对数作多项式拟合，得到lg$c$(AZI)与志愿者评分之间拟合方程为：Y=0.848 6X^2－0.353 1X－0.411(R^2=0.976 6)。其中，Y为苦味得分，X为lg$c$(AZI)。

根据该多项式拟合方程，分别利用AZI、不同药载质量比处方微球在pH 7.4介质内1 min时的释放浓度计算苦味得分。多项式拟合曲线与计算结果如图5-B所示，AZI在1 min内释放药物浓度高，其苦味评分远远高于强烈苦味值，而载药微球即使在药载质量比为3∶1情况下也远低于AZI的苦味程度，且随着药载质量比的降低，其苦味程度降低，其中在药载质量比为1∶1时口腔内停留1 min时释药浓度可介于微苦程度，掩味效果良好。

4　结　论

改善苦味与服药顺应性在提高患者接受度及治疗效果方面具有重要意义。一项针对800多名儿科医生的调查报告显示，90.8%的急性病患者和83.9%的慢性病患者的依从性障碍主要是由药物不良口感引起的[3]。患者接受度与口感有关之外，还与可吞咽性相关，如制剂体积、给药量和剂型均会影响可吞咽性。因此，本实验针对剂量大且具强烈苦味的AZI，采用EC为载体，以O/W乳化溶剂挥发法制备AZI-EC MS微球，其载药量高、剂

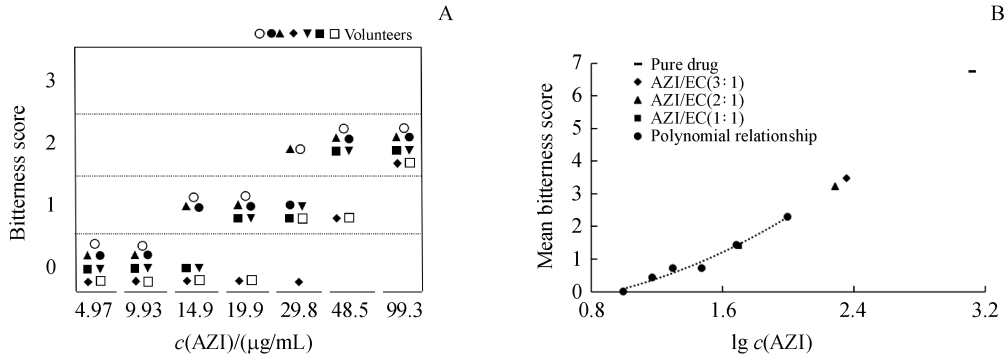


Figure 5 Taste scores assigned by human volunteers to different azithromycin solutions(A) and the polynomial relationship with calculation score of pure drug and AZI-EC MS formulations(B)

量灵活性好、易于吞服、掩味效果良好。AZI-EC MS制备方法简单,可有效控制药物释放和改善AZI适口性,能够明显提高患者用药顺应性,为该类新剂型研究奠定基础。

参 考 文 献

[1] Bakheit AH, Al-Hadiya BM, Abd-Elgalil AA. Azithromycin [J]. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 2014, **39**: 1-40.

[2] Hansen MP, Scott AM, McCullough A, *et al*. Adverse events in people taking macrolide antibiotics versus placebo for any indication [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, **1**: CD011825.

[3] Walsh J, Cram A, Woertz K, *et al*. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: do not forget the excipients [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, **73**: 14-33.

[4] Lopez FL, Ernest TB, Tuleu C, *et al*. Formulation approaches to pediatric oral drug delivery: benefits and limitations of current platforms [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, **12**(11): 1727-1740.

[5] Ivanovska V, Rademaker CM, van Dijk L, *et al*. Pediatric drug formulations: a review of challenges and progress [J]. *Pediatrics*, 2014, **134**(2): 361-372.

[6] Mistry P, Batchelor H. Evidence of acceptability of oral paediatric medicines: a review [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2017, **69**(4): 361-376.

[7] Sun JD, Zhang ZQ, He SW, *et al*. Progress on novel pediatric oral solid dosage forms [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2019, **50**(6): 631-640.

[8] Lopez FL, Mistry P, Batchelor HK, *et al*. Acceptability of placebo multiparticulate formulations in children and adults [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 9210.

[9] Gandhi R, Kaul CL, Panchagnula R. Pharmacokinetic evaluation of an azithromycin controlled release dosage form in healthy human volunteers: a single dose study [J]. *Int J Pharm*, 2004, **270**(1/2): 1-8.

[10] Curatolo W. Interdisciplinary science and the design of a single-dose antibiotic therapy [J]. *Pharm Res*, 2011, **28**(9): 2059-2071.

[11] Kharb V, Saharan VA, Dev K, *et al*. Formulation, evaluation and 3(2) full factorial design-based optimization of ondansetron hydrochloride incorporated taste masked microspheres [J]. *Pharm Dev Technol*, 2014, **19**(7): 839-852.

[12] Pein M, Preis M, Eckert C, *et al*. Taste-masking assessment of solid oral dosage forms: a critical review [J]. *Int J Pharm*, 2014, **465**(1/2): 239-254.

SPE-UPLC-MS/MS同时检测污水中多种滥用药物及其代谢物

王婧媛[1,2],侯臣之[1,2],花镇东[2,3],张婷婷[1,2],苏梦翔[1,2],徐 慧[1,2],王优美[2,3*],狄 斌[1,2**]

([1]中国药科大学药物分析系,南京 210009;[2]国家禁毒委员会办公室中国药科大学禁毒关键技术联合实验室,南京 210009;[3]公安部禁毒情报技术中心,北京 100714)

摘 要 建立一种基于固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱(SPE-UPLC-MS/MS)同时检测污水中多种滥用药物及其代谢物的定量分析方法。样品在pH 2条件下过滤后加入内标,利用Oasis Prime MCX固相萃取柱、甲醇淋洗溶剂4 mL、5%氨水-乙腈洗脱溶剂4 mL和0.1%甲酸水溶液复溶溶剂进行固相萃取,采用色谱柱ZORBAX Eclipse Plus C_{18}进行色谱分析,流动相0.1%甲酸水溶液和乙腈进行梯度洗脱;采用ESI离子源正离子方式,多反应监测模式(MRM)进行定量分析。所有待测物在各自的标准曲线范围内线性关系良好(r≥0.993 2),定量限为1 ng/L(除苯丙胺为2.5 ng/L),提取回收率范围为82.13%~99.96%,日内与日间精密度均小于9.43%。该方法准确可靠、重复性好,适用于污水中多种滥用药物及其代谢物的定量检测,为实时监测药品滥用提供了分析手段。

关键词 滥用药物;污水;固相萃取;超高效液相色谱-串联质谱;含量测定

中图分类号 R917;D631.4 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0305-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200308

引用本文 王婧媛,侯臣之,花镇东,等.SPE-UPLC-MS/MS同时检测污水中多种滥用药物及其代谢物[J].中国药科大学学报,2020,51(3):305-312.

Cite this article as: WANG Jingyuan, HOU Chenzhi, HUA Zhendong, *et al*. Simultaneous determination of illicit drugs and their metabolites in wastewater by SPE-UPLC-MS/MS[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 305-312.

Simultaneous determination of illicit drugs and their metabolites in wastewater by SPE-UPLC-MS/MS

WANG Jingyuan[1,2], HOU Chenzhi[1,2], HUA Zhendong[2,3], ZHANG Tingting[2,3], SU Mengxiang[1,2], XU Hui[1,2], WANG Youmei[2,3*], DI Bin[1,2**]

[1]Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing210009; [2]China National Narcotics Control Commission-China Pharmaceutical University Joint Laboratory on Key Technologies of Narcotics Control, Nanjing 210009; [3]Drug Control Information and Technology Center of Ministry of Public Security of the People's Republic of China, Beijing 100741, China

Abstract A quantitative analysis method based on solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-UPLC-MS/MS) for simultaneous determination of illicit drugs and their metabolites in wastewater was established. Samples filtered at pH of 2 and spiked with internal standard were loaded to Oasis Prime MCX cartridges for solid-phase extraction. The samples were washed with 4 mL of methanol and eluted with 4 mL of 5% ammonia in acetonitrile before reconstituting with 0.1% formic acid/water solution. ZORBAX Eclipse Plus C_{18} column was used for chromatography, and gradient elution was performed with 0.1% formic acid/water solution and acetonitrile as mobile phase. The samples were then detected by electrospray ionization (ESI) in positive ion mode, and multiple reaction monitoring mode (MRM) was adopted for quantitative analysis. All analytes had a good linear relationship ($r \geqslant 0.993\ 2$) within the range of their respective standard curve; the limit of quantification was 1 ng/L (except amphetamine at 2.5 ng/L); the extraction recovery ranged

收稿日期 2020-03-31 **通信作者** *E-mail:youmei_626@163.com

**Tel:025-83271269 E-mail:dibin@cpu.edu.cn

基金项目 国家重点研发计划资助项目(No.2018YFC0807402)

from 82. 13% to 99. 96%; and the intra- and inter-day precisions were less than 9. 43%. The method is accurate, reliable and reproducible, and is suitable for the quantitative determination of illicit drugs and their metabolites in wastewater and can provide an analytical method for real-time monitoring of drug abuse.

Key words illicit drugs; wastewater; solid phase extraction (SPE); ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); content determination

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC0807402)

近年来,全球毒品滥用问题不断扩大,毒品危害日益严重,影响人类健康,造成严重的社会危机。联合国毒品和犯罪办公室发布的2019年世界毒品问题报告显示,全球3 500万人患有药物滥用障碍,国际毒品滥用形势严峻[1]。国家禁毒办发布的2018年中国毒品形势报告也显示,我国毒品滥用人数规模依然较大且呈蔓延之势[2]。因此,掌握毒品滥用的实时信息,打击毒品犯罪,是国家禁毒工作的重要环节。

一种基于污水流行病学的分析方法由Daughton等[3]于2001年首次提出,通过测定污水中药物非法使用后的活性成分和人体代谢物,以及污水处理厂的流量和服务人口数,可反推出相应人口的毒品消耗量。Zuccato等[4]首次将这种污水分析法实施,利用固相萃取-液质联用法对意大利国内的可卡因消耗量进行估计。随后,污水分析法在国内外得到应用[5],研究人员开发了多种基于固相萃取的定量监测方法,用于实时监测各国毒品滥用情况。

本研究根据国内外已有的污水分析法[6-12],对样品前处理及色谱条件等进行进一步优化,建立了一种基于固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法(SPE-UPLC-MS/MS)同时检测污水中多种滥用药物及其代谢物的定量分析方法。依照国内毒品滥用情况,选择甲基苯丙胺、苯丙胺、可替宁、苯甲酰爱康宁、氯胺酮、3,4-亚甲基二氧基苯丙胺、3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺、6-单乙酰吗啡、甲卡西酮、吗啡、去甲氯胺酮、可待因作为待测物,可替宁作为人口标记物。该方法操作简便、定量限低、可靠性高,已较好地应用于国内10个城市的实际污水样品检测。

1 材 料

1.1 药品与试剂

13种待测物及其氘代内标储备液均购于美国Cerilliant公司,包括6-单乙酰吗啡(6-MAM)、苯丙胺(AM)、可替宁(COT)、可卡因(COC)、苯甲酰爱康宁(BZE)、氯胺酮(KET)、3,4-亚甲基二氧基苯丙胺(MDA)、3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺(MDMA)、甲基苯丙胺(MAM)、甲卡西酮(MC)、吗啡(MOR)、去甲氯胺酮(NK)、可待因(COD)以及6-MAM-D3、AM-D5、COT-D3、COC-D3、BZE-D3、KET-D4、MDA-D5、MDMA-D5、MAM-D5、MC-D3、MOR-D3、NK-D4、COD-D6。乙腈、甲醇(色谱纯,美国TEDIA公司);其余试剂均为市售分析纯;超纯水由实验室制备。

1.2 仪 器

Agilent 1290 Infinity II UPLC超高效液相色谱串联6470 Trip Quad LC-MS质谱仪(美国Agilent公司);真空离心浓缩仪(美国LABCONCO公司);低温冷冻离心机(瑞士BioTool公司);实验室超纯水系统(南京妙之仪电子科技有限公司);24位固相萃取装置(美国Supelco公司);Oasis Prime MCX固相萃取柱(美国Waters公司);GF/C™无黏合剂玻璃纤维滤纸(英国Whatman公司);Agela SPE Column 60 mL及Agela小柱连接配适器(美国Agela公司)。

2 方 法

2.1 色谱条件

色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18} (50 mm×2. 1 mm,1. 8 μm);流动相A为0. 1%甲酸水溶液,流动相B为乙腈;流速为0. 3 mL/min;柱温为40 ℃;进样室温度为4 ℃;进样量为5 μL;梯度洗脱程序:0～6 min, B相比例从5%升至25%;6～6. 2 min, B相比例从25%升至100%; 6. 2～8 min, B相比例保持100%; 8～8. 1 min, B相比例从100%降至5%;8. 1～11 min, B相比例保持5%以平衡色谱柱。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI源);检测方式为

ESI+；毛细管电压为3.5 kV；离子源温度为300 ℃；脱溶剂气温度为250 ℃；脱溶剂气流速为11 L/min；锥孔反吹气流速为5 L/min；脱溶剂气体为N_2；碰撞气体为N_2；扫描方式为MRM；根据质谱扫描结果确定各待测物的MRM监测通道具体见表1。13种待测物的UPLC-MS/MS色谱图如图1所示。

Table 1　MRM parameters of 12 illicit drugs and cotinine (COT) and their internal standards

	t_R/min	MRM/(*m/z*)	Collision/kV	Dwell	Compd.	t_R/min	MRM/(*m/z*)	Collision/kV	Dwell
6-MAM	2.814	328.1→165.0	50	7.5	MDA-D5	2.570	185.1→168.1	9	7.5
		328.1→211.1	29				185.1→110.1	25	
6-MAM-D3	2.805	331.2→165.0	29	7.5	MDMA	2.893	194.1→163.0	9	7.5
		331.2→211.1	45				194.1→105.1	25	
AM	2.290	136.1→91.1	20	7.5	MDMA-D5	2.876	199.1→165.1	13	7.5
		136.1→119.1	5				199.1→107.1	29	
AM-D5	2.265	141.1→93.1	17	7.5	MAM	2.663	150.0→91.1	20	7.5
		141.1→124.1	7				150.1→119.1	9	
COT	0.595	177.2→98.1	21	7.5	MAM-D5	2.646	155.1→91.1	21	7.5
		177.2→80.1	29				155.1→121.1	9	
COT-D3	0.603	180.2→101.1	25	7.5	MC	1.775	164.1→131.1	20	7.5
		180.2→80.1	29				164.1→146.1	13	
COC	5.205	304.1→182.1	22	7.5	MC-D3	1.774	167.1→134.1	25	7.5
		304.2→82.1	33				167.1→149.1	13	
COC-D3	5.204	307.2→185.1	21	7.5	MOR	0.825	286.1→201.0	35	7.5
		307.2→85.1	33				286.1→165.0	50	
BZE	3.928	290.1→168.1	21	7.5	MOR-D3	0.824	289.1→201.2	35	7.5
		290.1→105.0	33				289.1→165.0	50	
BZE-D3	3.928	293.1→171.1	21	7.5	NK	3.631	224.1→125.0	29	7.5
		293.1→105	33				224.1→207.0	9	
KET	3.830	238.0→125.0	30	7.5	NK-D4	3.606	228.1→129.0	29	7.5
		238.1→207.1	12				228.1→211.1	9	
KET-D4	3.804	242.1→129.0	33	7.5	COD	2.101	300.1→165.0	60	7.5
		242.1→211.0	16				300.1→199.0	40	
MDA	2.595	180.0→163.0	10	7.5	COD-D6	2.068	306.2→165.1	45	7.5
		180.1→105.1	25				306.2→202.1	30	

6-MAM: 6-Monoacetylmorphine; AM: Amphetamine; COT: Cotinine; COC: Cocaine; BZE: Benzoylecognine; KET: Ketamine; MDA: 3, 4-Methylenedioxyamphetamine; MDMA: 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine; MAM: Methamphetamine; MOR: Morphine; NK: Norketamine; COD: Codeine

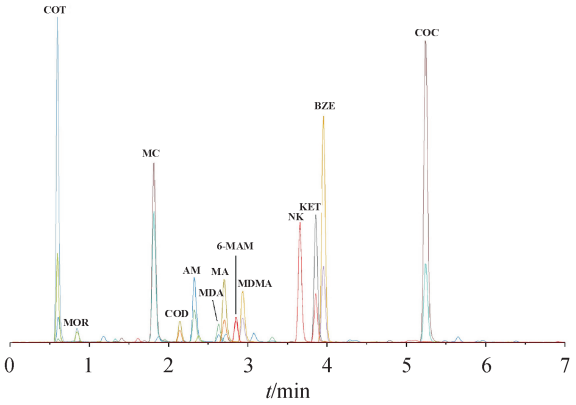


Figure 1　Typical chromatogram of 12 illicit drugs and cotinine

2.3　对照品溶液配制

一级储备液：分别取13种待测物的1 mg/mL标准品溶液1 mL于10 mL量瓶中，用甲醇或乙腈溶解并稀释至刻度，配制成含各待测物100 μg/mL的一级储备液；分别取13种氘代内标的100 μg/mL标准品溶液1 mL于10 mL量瓶中，用甲醇或乙腈溶解并稀释至刻度，配制成含13种氘代内标的10 μg/mL的一级储备液。

甲醇混合溶液：取AM-D5、MAM-D5、MDA-D5、MDMA-D5、BZE-D3、MOR-D3、KET-D4、NK-D4和COD-D6的一级储备液各1 mL混合加入20 mL

量瓶中,甲醇稀释至刻度,得含各内标物500 ng/mL的甲醇混合溶液。

乙腈混合溶液:取MC-D3、6-MAM-D3和COC-D3的一级储备液各1 mL混合加入20 mL量瓶中,乙腈稀释至刻度,得含各内标物500 ng/mL的乙腈混合液。

工作内标溶液:取甲醇混合溶液和乙腈混合溶液各1 mL,混合加入20 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,得25 ng/mL的工作内标溶液。

COT-D3内标溶液:取COT-D3的一级储备液100 μL于20 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,得500 ng/mL COT-D3内标溶液。

2.4 样品预处理

所取水样用盐酸调至pH2,-20 ℃条件下冷冻保存,待分析时先融化,然后进行分析。分析前所有水样经GF/C™无黏合剂玻璃纤维滤纸过滤去除固体颗粒物,过滤后的样品取100 mL,分别加入工作内标溶液和COT-D3内标溶液200 μL,充分振摇混合均匀,分装为两份,每份50 mL。

2.5 固相萃取

选用Oasis Prime MCX固相萃取柱进行操作。样品50 mL以4 mL/min的速度过柱上样;上样完成后先用甲醇4 mL淋洗;最后用5%的氨水-乙腈溶液4 mL洗脱(流速1 mL/min);50 ℃条件下在真空旋转浓缩仪中挥至剩余约20 μL,用0.1%甲酸水溶液80 μL复溶,涡旋3 min;4 ℃,13 000 r/min条件下离心取上清液进UPLC-MS/MS分析。

2.6 方法验证

2.6.1 标准曲线的线性范围及定量限 取13种待测物的一级储备液适量,用甲醇逐级稀释,配制成浓度范围为0.5～250 ng/mL的标准曲线混合溶液(除AM浓度范围为1.25～625 ng/mL)和浓度范围为0.5～2 500 ng/mL的COT标准曲线溶液。取不同浓度的标准曲线混合溶液、COT标准曲线溶液、工作内标溶液、COT-D3内标溶液各100 μL,分别用纯水50 mL配制成模拟样品,按“2.5”项下操作后进样分析,以待测物浓度(ng/mL)为横坐标(X),待测物的峰面积为纵坐标(Y),用加权最小二乘法(权重系数:$1/Y^2$)进行线性回归运算,求得的线性回归方程即为标准曲线方程。结果表明AM在2.5～1 250 ng/L范围内线性关系良好,COT在10～5 000 ng/L范围内线性关系良好,其他物质在1～500 ng/L范围内线性关系良好。

取0.5 ng/mL的标准曲线混合溶液(AM质量浓度为1.25 ng/mL)、0.5 ng/mL的COT标准曲线溶液、工作内标溶液、COT-D3内标溶液各100 μL,分别用纯水50 mL配制成定量下限(LLOQ)模拟样品,按“2.5”项下操作后进样分析。结果表明,当信噪比S/N大于10时,AM的定量下限为2.5 ng/L,其他物质的定量下限为1 ng/L。同时使用回归曲线偏差法估算各待测物的检测限(LOD)和定量限(LOQ),结果见表2。

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients, lower limit of quantitation (LLOQ), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of 12 illicit drugs and cotinine

Analyte	Linear range/(ng/L)	Correlation coefficient (r)	LLOQ/(ng/L)	LOD/(ng/L)	LOQ/(ng/L)
COT	10–5 000	0.999 4	1	8.69	28.98
MOR	1–500	0.997 4	1	2.99	9.98
MC	1–500	0.999 6	1	2.73	9.09
COD	1–500	0.993 6	1	4.03	13.45
AM	2.5–1 250	0.997 2	2.5	11.82	39.40
MDA	1–500	0.996 2	1	3.01	10.05
MAM	1–500	0.993 2	1	5.47	18.23
6-MAM	1–500	0.999 5	1	3.86	12.85
MDMA	1–500	0.999 7	1	2.66	8.86
NK	1–500	0.995 3	1	3.58	11.93
KET	1–500	0.998 8	1	4.13	13.77
BZE	1–500	0.999 2	1	1.45	4.82
COC	1–500	0.994 6	1	2.83	9.44

2.6.2　提取回收率　取13种待测物的一级储备液适量，用甲醇逐级稀释，配制成质量浓度分别为1，25，200 ng/mL的混合储备液（除AM质量浓度分别为2.5，62.5，500 ng/mL）和质量浓度分别为25，200，2 000 ng/mL的COT储备液。取上述不同浓度的混合储备液、COT储备液、工作内标溶液、COT-D3内标溶液各100 μL，分别用混合污水基质50 mL配制成低、中、高浓度的质控样品，按“2.5”项下操作，每一浓度进行6样本分析，得各待测物的峰面积；对照组另取污水基质50 mL，除内标用初始比例流动相溶液代替外，其余按“2.5”项下操作，向获得的上清液中加入相应浓度的混合储备液、COT储备液、工作内标溶液和COT-D3内标溶液，振摇混匀，分别制备成与上述浓度相同的低、中、高样品。依法测定，每个浓度3样本分析，得各待测物的峰面积。以每一浓度两种处理方法峰面积之比计算提取回收率并求得3种浓度的平均值，结果见表3。

2.6.3　准确度与精密度　按“2.6.2”项下的方法配制低、中、高3个浓度的质控样品，按“2.5”项下操作，每一浓度进行6样本分析，连续测定3 d，求得各待测物的准确度与精密度的平均值。结果见表4，各待测物不同浓度的的平均日内及日间精密度的RSD范围为1.70%～9.43%。

2.6.4　基质效应　按“2.6.2”项下的对照组方法操作，每个浓度3样本分析，得各待测物的峰面积；同时另取相应浓度的混合储备液，COT储备液、工作内标溶液和COT-D3内标溶液各100 μL溶于5%氨水-乙腈溶液4 mL中，涡旋混匀，50 ℃条件下在真空旋转浓缩仪中挥至剩余约20 μL，用0.1%甲酸水溶液80 μL复溶，涡旋3 min；4 ℃，13 000 r/min条件下离心取上清液进UPLC-MS/MS分析，每一浓度3样本分析，得各待测物的峰面积。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算基质效应并求得平均值，结果见表4。

2.6.5　稳定性　取“2.6.2”项下的3种浓度的混合储备液、COT储备液、工作内标溶液、COT-D3内标溶液各100 μL，用纯水50 mL配制成低、中、高3种浓度的QC样品。分别在4 ℃进样室放置24 h、室温放置24 h和经3次冻融循环后，按“2.5”项下操作，每一浓度进行3样本分析。结果表明，除低浓度吗啡和甲基苯丙胺外，其余待测物水样品在4 ℃条件下放置24 h稳定；除低浓度甲基苯丙胺外，其余待测物水样品在室温条件下放置24 h稳定且经3次冻融循环后稳定。

Table 3　Extraction recoveries at three concentrations and average recoveries of 12 illicit drugs and cotinine (n=3)

Analyte	Added/(ng/L)	Extraction recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
COT	25	52.34±15.89		
	400	104.63±5.98	82.13±26.90	14.14
	4 000	89.41±5.67		
MOR	2	89.16±13.23		
	50	105.72±12.74	94.08±10.12	12.32
	400	87.37±8.82		
MC	2	95.22±5.57		
	50	93.74±1.48	97.07±4.55	4.40
	400	102.26±5.91		
COD	2	99.98±7.97		
	50	95.99±3.15	95.41±4.88	5.67
	400	90.27±5.20		
AM	5	108.09±8.75		
	125	92.05±3.19	97.24±9.40	6.06
	1 000	91.59±6.06		
MDA	2	104.52±2.62		
	50	102.17±2.58	98.31±8.79	3.54
	400	88.25±4.93		
MAM	2	119.57±8.59		
	50	91.79±2.81	99.51±17.53	5.63
	400	87.17±5.80		
6-MAM	2	100.40±3.20		
	50	97.14±3.58	96.64±4.03	3.90
	400	92.38±4.47		
MDMA	2	104.64±4.75		
	50	100.88±2.14	99.96±5.20	4.05
	400	94.37±5.18		
NK	2	95.42±2.75		
	50	94.42±1.82	94.02±1.64	3.71
	400	92.22±5.81		
KET	2	98.98±5.87		
	50	91.61±2.49	94.77±3.79	4.93
	400	93.74±5.76		
BZE	2	97.19±4.72		
	50	98.02±4.35	94.76±4.95	5.19
	400	89.07±5.59		
COC	2	92.63±2.98		
	50	94.65±2.13	93.13±1.33	3.64
	400	92.13±5.02		

Table 4 Average precisions , accuracies and matrix effects of 12 illicit drugs and cotinine (n=3)

Analyte	Average precision (RSD,%)		Average accuracy/%	Average matrix effect/%	RSD/%
	Intra-day	Inter-day			
COT	5.37	5.13	98.77	57.25±29.25	16.02
MOR	6.63	8.67	102.93	38.56±7.63	15.88
MC	5.50	5.87	100.03	226.35±25.12	6.48
COD	4.50	8.07	95.97	87.43±7.14	6.18
AM	6.00	9.43	100.73	294.64±21.19	9.44
MDA	5.93	7.13	101.23	138.28±10.24	6.36
MAM	4.47	9.67	99.97	250.47±13.44	9.42
6-MAM	3.73	8.47	98.47	91.29±4.51	5.14
MDMA	3.00	8.83	100.80	113.63±11.19	6.15
NK	3.00	1.93	97.60	124.57±12.61	5.10
KET	4.00	5.30	97.14	142.63±28.21	7.10
BZE	4.43	3.07	98.80	94.44±4.05	3.84
COC	1.70	1.90	96.94	116.51±10.20	4.09

2.6.6 *残留考察* 取“2.6.1”项下质量浓度为250 ng/mL的标准曲线混合储备液(除AM质量浓度为625 ng/mL)和质量浓度为2 500 ng/mL的COT标准曲线溶液各100 μL,用纯水50 mL配制成标准曲线最高点样品,按“2.5”项下操作,双样本平行分析3次,同时配制6份空白流动相样品。首先检测标准曲线最高点样品2份,其次将空白流动相样品与标准曲线最高点样品交叉双样本分析。在本试验条件下,残留的各待测物响应值低于其定量下限各待测物响应值的20%,说明残留效应对水样中各待测物测定的影响可以忽略不计。

2.7 *方法应用*

将本研究建立的SPE-UPLC-MS/MS法应用于实际样品的检测,从全国10个城市采集的污水样品按“2.4”项和“2.5”项操作后分析测定。各待测物的浓度检测结果如表5所示。

Table 5 Concentrations of 12 illicit drugs and cotinine in wastewater samples (S1–S10)

Analyte	c/(ng/L)									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
COT	707.82	617.65	639.96	864.44	466.37	1 258.74	1 494.61	1 200.06	771.96	561.02
MOR	14.61	2.07	17.49	8.89	3.17	10.76	12.68	9.61	15.02	3.88
MC	1.17	1.44	–	2.70	–	3.85	2.21	1.30	2.86	–
COD	4.61	2.58	4.40	3.56	18.31	5.84	13.72	2.52	11.70	–
AM	8.02	–	6.35	5.90	2.00	6.41	7.87	3.49	1.48	2.44
MDA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MAM	18.69	15.02	9.45	8.00	9.80	7.83	27.43	8.51	16.80	6.84
6-MAM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MDMA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NK	1.54	4.72	–	–	–	–	1.17	1.84	–	–
KET	7.25	11.40	–	4.70	1.53	–	5.82	10.87	–	–
BZE	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
COC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

S1-S10: 10 wastewater samples from different cities

3 讨　论

3.1　色谱条件的优化

3.1.1　色谱柱的选择　采用3种不同色谱柱进行考察，分别为色谱柱1：Shiseido Capcell PAK C_{18}（2.0 mm×150 mm，5 μm）；色谱柱2：Shiseido Capcell PAK C_{18}（3.0 mm×75 mm，3 μm）和色谱柱3：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18}（2.1 mm×50 mm，1.8 μm）。实验结果表明色谱柱1的柱长较长，相同梯度洗脱条件下需更长时间才能完全洗脱，且峰形较短柱更宽；色谱柱2的大部分待测物的峰形良好，可在较短时间内完成各化合物的分离洗脱，但待测物之一的COT及其氘代内标峰出现分叉干扰且无法改变；色谱柱3的所有待测物的峰形良好，可在短时间内完成各化合物的分离洗脱。故色谱柱选择Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18}。

3.1.2　流速的选择　采用0.25，0.3，0.35和0.4 mL/min 4种不同流速进行考察。实验结果表明：当流速为0.25 mL/min时，各待测物的峰形差且分析时间长；当流速为0.3 mL/min时，峰形佳，能在较短时间内满足分离要求；当流速为0.35 mL/min和0.4 mL/min时，部分待测物死时间出峰，故流速为0.3 mL/min。

3.2　样品前处理方法的优化

3.2.1　固相萃取柱及洗脱溶剂的选择　根据各待测物的性质及pK_a，采用SEP-PAK VAC C_{18}、Oasis Prime HLB、Oasis Prime MCX 3种不同固相萃取柱，以及甲醇、乙腈、5%氨水-甲醇溶液、5%氨水-乙腈溶液4种不同洗脱溶剂分别进行考察。实验结果表明，SEP-PAK VAC C_{18}柱上利用5%氨水-甲醇溶液可将待测组分洗脱出，但萃取效果较差；Oasis Prime HLB柱上利用甲醇和乙腈均可将待测组分洗脱出，但萃取效果较差；Oasis Prime MCX柱上利用5%氨水-甲醇溶液和5%氨水-乙腈溶液均可将待测组分洗脱出并获得良好的回收率，但甲醇作为洗脱液，挥干所需时间远远长于乙腈。故选用Oasis Prime MCX柱为方法用固相萃取柱且5%氨水-乙腈溶液为方法洗脱溶剂。

3.2.2　洗脱溶剂体积的选择　采用2，4，8 mL 3种不同体积的洗脱溶剂进行考察。实验结果表明，2 mL洗脱溶剂无法将待测物完全洗脱；4 mL洗脱溶剂能将各待测物完全洗脱且峰面积较大；8 mL洗脱溶剂效果与4 mL无明显差别。考虑到减少有机溶剂的污染，故选用4 mL为方法用洗脱溶剂体积。

3.2.3　淋洗溶剂的选择　采用超纯水、pH2的超纯水、甲醇和2%甲酸-甲醇溶液4种不同的淋洗溶剂进行考察。实验结果表明，超纯水及pH2的超纯水与有机溶剂淋洗无明显差别，但会在洗脱过程中带入水分导致最终挥干时间增加；甲醇及2%甲酸-甲醇溶液二者淋洗结果无明显差别。考虑到节省时间成本，故选择甲醇为方法用淋洗溶剂。

4 总　结

本研究建立了一种同时检测污水中多种滥用药物及其代谢物的固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱定量分析方法。该方法操作简单、定量限低、重现性好，已成功应用于国内10个城市的污水实际样品检测，具有较高的准确度和可靠性。公安部门基于此方法进行毒情监测，可以准确掌握毒品滥用信息，预防和打击毒品犯罪，为全面开展各项禁毒工作提供了重要的技术支持和数据支撑。

参 考 文 献

[1] United Nations Office on Drugs and Crime. World drug report [R].Vienna: UNODC, 2019.

[2] China National Narcotic Control Committee. 2018 Report of Drug Situation of China[R]. Beijing: China National Narcotic Control Committee, 2019.

[3] Daughton CG, Jones-Lepp TL.*Pharmaceuticals and Care products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*[M]. Washington, D. C.: American Chenmical Society, 2001: 348-364.

[4] Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, *et al*. Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse [J]. *Environ Health*, 2005,**4**(1):14-21.

[5] Hou CZ, Hua ZD, Xu P, *et al*. Research and application progress on evaluation of the abuse of illicit drugs based on wastewater analysis[J].*J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2018, **49**(4): 502-508.

[6] Boleda MA, Galceran MA, Ventura F. Monitoring of opiates, cannabinoids and their metabolites in wastewater, surface water and finished water in Catalonia, Spain[J]. *Water Res*, 2009, **43**(4): 1126-1136.

[7] Postigo C, López de Alda MJ, Barceló D. Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: occurrence in

sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation [J]. *Environ Int*, 2010, **36**(1): 75-84.

[8] Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, *et al*. Estimating community drug abuse by wastewater analysis[J]. *Environ Health Perspect*, 2008, **116**(8): 1027-1032.

[9] Zuccato E, Castiglioni S, Tettamanti M, *et al*. Changes in illicit drug consumption patterns in 2009 detected by wastewater analysis[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2011, **118**(2/3): 464-469.

[10] Zuccato E, Castiglioni S, Senta I, *et al*. Population surveys compared with wastewater analysis for monitoring illicit drug consumption in Italy in 2010-2014[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2016, **161**: 178-188.

[11] van Nuijs AL, Mougel JF, Tarcomnicu I, *et al*. Sewage epidemiology: a real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium[J]. *Environ Int*, 2011, **37**(3): 612-621.

[12] Yargeau V, Taylor B, Li HX, *et al*. Analysis of drugs of abuse in wastewater from two Canadian cities[J]. *Sci Total Environ*, 2014, **487**: 722-730.

·本刊讯·

《中国药科大学学报》再次入选中国科学引文数据库(CSCD)核心库

据中国科学院文献情报中心的最新消息,我校主办的学术期刊《中国药科大学学报》再次被中国科学引文(CSCD)数据库(2019-2020)收录为来源期刊,并进入核心库(全国药学期刊仅9种入选核心库)。

中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database,简称CSCD)由中国科学院文献情报中心与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社联合主办,并由清华同方光盘电子出版社正式出版。通过清华大学和中国科学院资源与技术的优势结合和多年的数据积累,CSCD已发展成为我国规模最大、最具权威性的科学引文索引数据库,为中国科学文献计量和引文分析研究提供了强大工具。

经过中国科学引文数据库(CSCD)定量遴选、专家定性评估,2019-2020年度中国科学引文数据库收录来源期刊1230种,其中中国出版的英文期刊229种,中文期刊1001种。CSCD数据库来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库908种(备注栏中标记C);扩展库322种(备注栏中标记E)。

(本刊编辑部)

色谱-质谱联用技术鉴定盐酸咪达唑仑的有关物质

金 瑞,闫若凝,陆宇婷,宋 敏,杭太俊*

(中国药科大学药物分析系,南京 210009)

摘 要 色谱-质谱联用(LC-MS)技术鉴定盐酸咪达唑仑中的有关物质。采用Thermo BDS Hypersil C_{18}(100 mm×4.6 mm,2.4 μm)色谱柱,以乙腈-25 mmol/L醋酸铵水溶液(冰醋酸调节pH为5.5)为流动相梯度洗脱,对盐酸咪达唑仑有关物质进行分离,电喷雾正离子化-四极杆-飞行时间串联质谱(ESI-Q-TOF/MS)高分辨测定各有关物质母离子及其子离子的准确质量和元素组成,通过光谱解析并结合合成工艺分析鉴定了它们的结构,并对部分杂质进一步采用对照品对照确证。在所建立的分析条件下,盐酸咪达唑仑及其有关物质分离良好,检测并鉴定出盐酸咪达唑仑及其强制降解试验样品中22个主要有关物质,其中8个为美国药典规定的已知杂质。LC-MS技术能有效地分离鉴定盐酸咪达唑仑中的有关物质,可为其贮存条件制定、生产工艺优化和质量控制提供参考依据。

关键词 盐酸咪达唑仑;有关物质;结构鉴定;色谱-质谱联用

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0313-14

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200309

引用本文 金瑞,闫若凝,陆宇婷,等.色谱-质谱联用技术鉴定盐酸咪达唑仑的有关物质[J].中国药科大学学报,2020,51(3):313-326.

Cite this article as: JIN Rui, YAN Ruoning, LU Yuting, *et al*. Identification of related substances of midazolam hydrochloride by LC-MS[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 313-326.

Identification of related substances of midazolam hydrochloride by LC-MS

JIN Rui, YAN Ruoning, LU Yuting, SONG Min, HANG Taijun*

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study aimed to identify the related substances of midazolam hydrochloride by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). To separate the related substances of midazolam hydrochloride, gradient elution was performed using acetonitrile and 25 mmol/L of ammonium acetate (pH was adjusted to 5.5 with acetic acid) as mobile phase on Thermo BDS Hypersil C_{18} column (100 mm × 4.6 mm, 2.4 μm). The accurate mass and elemental composition of the parent ions and their product ions of related substances were determined by electrospray-ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q-TOF/MS). The structures of the related substances were identified by spectral analysis and process synthesis, and some of them were further confirmed by reference substances. Under the established HPLC condition, midazolam hydrochloride and its related substances were adequately separated, and 22 major related substances were detected and identified by hyphenated techniques in midazolam hydrochloride and its stressed samples, of which 8 were recorded as impurities in the *United States Pharmacopeia*. The LC-MS techniques can effectively separate and identify the related substances of midazolam hydrochloride and provide reference for the establishment of storage condition, optimization of synthetic processes and quality control.

Key words midazolam hydrochloride; related substances; structural identification; LC-MS

This study was supported by the National Key R&D Program of China (No. 2017YFC0803606, No. 2018YFC0807400)

收稿日期 2020-03-25 * **通信作者** Tel:025-83271090 E-mail:hangtj@cpu.edu.cn

基金项目 国家重点研发计划资助项目(No. 2017YFC0803606, No. 2018YFC0807400)

盐酸咪达唑仑(1-甲基-8-氯-6-(2-氟苯基)-4*H*-咪唑并[1,5-a][1,4]苯并二氮杂草盐酸盐,midazolam hydrochloride,图1)是一种短效苯二氮草类药物(GABA-a激动剂),对中枢神经系统有抑制作用,起效快,不良反应少[1-5],可用于镇静催眠、抗惊厥及麻醉诱导[6-7]。目前,文献报道主要集中在临床应用和药理学研究[6-9]。咪达唑仑有关物质研究虽已有报道[10-13],主要阐述了咪达唑仑有关物质分析方法的建立及验证[10],针对工艺杂质、降解杂质的鉴定和裂解机制的研究[11-13]尚不完善。

本研究建立了适用于盐酸咪达唑仑全部有关物质(工艺杂质及降解产物)检查的LC-MS方法,通过光谱检测和分析、对照品比对、并结合合成工艺(图1),共分析鉴定了成品中潜在的22个有关物质,其中包括中间体、副产物及分降解产物(图2),可为盐酸咪达唑仑的贮存条件制定,生产工艺和质量控制提供参考依据。

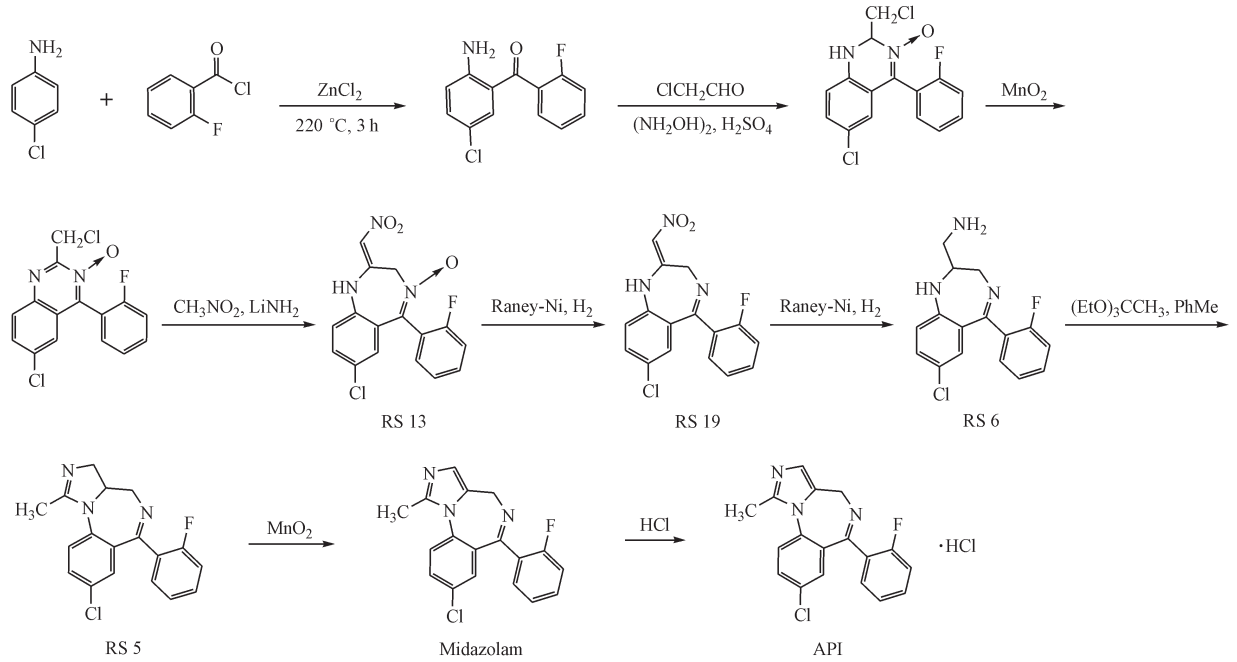


Figure 1 Typical synthetic routes of midazolam hydrochloride

1 材 料

1.1 试 剂

盐酸咪达唑仑及其有关物质对照品(中国食品药品检定研究院及USP对照品);乙酸铵、冰醋酸(AR级,南京化学试剂有限公司);乙腈(CR级,美国Tedia公司),市售超纯水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪 器

岛津LCMS-9030四极杆飞行时间质谱仪、LabSolutions数据处理系统(日本岛津公司);BS21S分析天平(德国Sartorius公司)。

2 方 法

色谱条件:Thermo BDS HYPERSIL C_{18} (100 mm × 4.6 mm,2.4 μm)色谱柱;流动相A相为25 mmol/L乙酸铵缓冲溶液(用冰醋酸调节pH至5.5),B相为乙腈,线性梯度洗脱(A∶B):0 min(75∶25)→20 min(50∶50)→25 min(50∶50)→26 min(75∶25)→32 min(75∶25),流速0.65 mL/min,柱温40 ℃,检测波长254 nm,进样量10 μL。

质谱条件:电喷雾正离子化,高分辨Q-TOF/MS测定,NaI溶液(400 μg/mL)准确质量校正。喷雾电压4.0 kV,雾化气压力230 kPa,流量3 L/min,接口温度300 ℃,加热气流量10 L/min,干燥气流量10 L/min,氩气CID碰撞能量30～40 eV,扫描范围*m/z* 50~1 000。

供试品溶液:取盐酸咪达唑仑约5 mg,精密称定,置于5 mL量瓶中,加25%乙腈溶解并稀释至刻

度，摇匀，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液。精密量取上述溶液适量，加 25% 乙腈定量稀释，配制 0.1% 的自身对照溶液。

混合对照品溶液：取各有关物质对照品（有关物质 **5**、**6**、**8**、**10**、**13**、**16**、**17**、**18**、**19**、**21** 和 **22**）适量，精密称定，加乙腈溶解并定量稀释成质量浓度均约为 1 μg/mL 的溶液，作为混合杂质对照溶液。

强制降解试验溶液：取盐酸咪达唑仑约 5 mg，加 0.01 mol/L 盐酸溶液 0.2 mL，60 ℃水浴放置 10 min，或加 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 0.2 mL，60 ℃水浴放置 10 min，或加 30% 过氧化氢 1 mL，60 ℃水浴放置 10 h，或加 25% 乙腈 1 mL，90 ℃水浴放置 6 d，或加 25% 乙腈 1 mL 光照（4 500 lx）放置 2 d，或 110 ℃烘箱中放置 10 d，或光照（4 500 lx）放置 10 d，分别处理后，各加 25% 乙腈溶解（酸碱处理样品先中和）并稀释至 5 mL，配制成质量浓度均约为 1 mg/mL 的强制降解试验溶液。同时进行空白溶剂试验。

3　结　果

3.1　有关物质检查

美国药典（USP 43）中采用乙腈-100 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液等度洗脱[14]的反相 HPLC 方法检查咪达唑仑的有关物质。该条件下潜在有关物质之间的分离差异较大，耗时较长。

本研究优化了缓冲溶液浓度，并使用梯度洗脱方法进行盐酸咪达唑仑中有关物质的分离与检查。结果：显著改善了盐酸咪达唑仑各有关物质的分离度，提高了分析效率，并适用于有关物质的 LC-MS 鉴定。

根据工艺过程、潜在副产物分析[13,15]，结合强制降解试验，分离检测到盐酸咪达唑仑中潜在的 22 个主要有关物质（图 2），对各杂质依保留时间从小到大顺序编号。其中 8 个为工艺杂质：**5**、**6**、**8**、**11**、**13**、**17**、**18** 和 **19**；11 个为降解产生：**1**、**2**、**4**、**7**、**9**、**12**、**14**、**15**、**16**、**20** 和 **22**；3 个既是工艺杂质又是降解杂质：**3**、**10**、**21**。并且有关物质：**5**、**6**、**8**、**10**、**13**、**17**、**18** 和 **21** 分别与 USP 43 规定的已知有关物质 **A**、**C**、**B**、**D**、**E**、**F**、**G** 和 **H** 相对应。

采用 0.1% 主成分自身对照法估算杂质的含量，盐酸咪达唑仑原料药中仅检测到 **1** 个有关物质（**3**）的含量大于 0.1%。

强制降解试验结果表明（表 1），盐酸咪达唑仑在酸、碱破坏条件下，有关物质 **3** 的含量显著增大，并新增 1 个明显降解产物（有关物质 **16**）。在高温干法条件下，未见明显降解产物；在高温湿法破坏条件下，产生 4 个主要降解产物（有关物质 **7**、**15**、**16**、**21**）。在干法光照条件下，新增 1 个明显降解产物（有关物质 **4**）；在湿法光照破坏条件下，产生 6 个主要降解产物（有关物质 **2**、**7**、**12**、**14**、**16**、**22**）。在氧化破坏条件下，产生 9 个主要降解产物（有关物质 **1**、**2**、**4**、**7**、**9**、**10**、**14**、**20**、**22**）。

Table 1　Material balance of the stressed samples of midazolam hydrochloride

Sample	*m*/mg	$Area_{API}$	$Area_{Impurities}$	Total area	Total area/Sample weight	Calibration
Normal	5.12	25 057 041	244 425	25 301 466	4.94×10^6	1.00
Acid	5.02	22 582 999	1 211 053	23 794 052	4.74×10^6	0.96
Alkaline	5.03	22 983 352	630 032	23 613 384	4.69×10^6	0.95
Oxidation	4.96	21 119 501	1 278 797	22 398 298	4.52×10^6	0.91
Dry thermal	5.12	24 484 586	415 227	24 899 813	4.86×10^6	0.98
Wet thermal	5.01	25 184 043	520 509	25 704 552	5.13×10^6	1.04
Dry photolysis	5.05	25 365 361	440 405	25 805 766	5.11×10^6	1.03
Wet photolysis	4.98	26 512 382	748 254	27 260 636	5.47×10^6	1.11

3.2　有关物质鉴定

采用 Q-TOF/MS 高分辨测定各有关物质的母离子及子离子的准确质量和元素组成，并通过合成工艺路线及反应机制的分析，推定各主要有关物质的结构；主要工艺杂质（**3**、**5**、**6**、**8**、**10**、**11**、**13**、**17**、**18**、**19** 和 **21**），均进一步通过制备和对照品比对确证。结果见表 2、图 3 和图 4。

ESI-Q-TOF/MS 测得咪达唑仑 $[M+H]^+$ 的准确质量为 326.085 54，与离子式 $C_{18}H_{14}ClFN_3^+$ 相应；其主要特征碎片离子（图 5）*m/z* 291.120 3（$C_{18}H_{14}FN_3^+$）

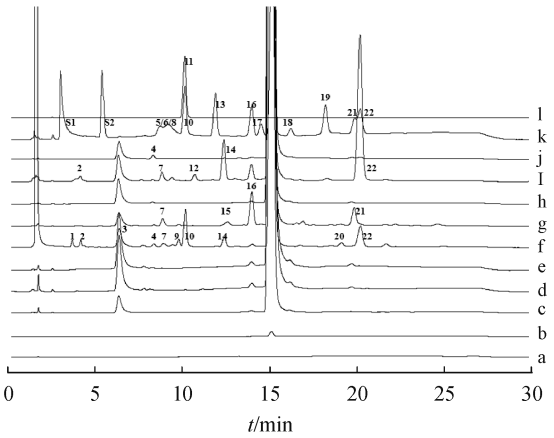


Figure 2 HPLC-UV chromatograms of midazolam hydrochloride
a:Blank; b:Reference 0.1%; c:Active pharmaceutical ingredients(API) and its stressed solutions (d:Acid; e:Alkaline; f:Oxidation; g:Wet thermal; h:Dry thermal; i:Wet photolysis; j:Dry photolysis); k:Impurity references mixture; l:Impurity **11** reference

249.085 0($C_{16}H_{10}FN_2^+$)、244.035 7($C_{14}H_8ClFN^+$)、223.081 3($C_{15}H_{10}FN^{+\cdot}$)和209.065 2($C_{14}H_8FN^{+\cdot}$),分别是[M+H]$^+$脱去一个Cl原子、同时脱氯与咪唑环裂解脱乙烯亚胺(CH_2=C=NH)、脱2-甲基咪唑基、脱氯并七元杂环开环重排、或同时脱氯与2-甲基咪唑基单元产生。咪达唑仑的二级质谱和裂解途径分析对解析确证其有关物质结构具有参考意义。

3.2.1 工艺杂质的结构鉴定 根据合成工艺、潜在副产物分析[13,15]和对照品比对,确证鉴定各工艺有关物质的结构及其来源。

有关物质**3**是成品中存在的特征杂质,并且在强制降解的多个试验条件下极易产生,所以有关物质**3**是咪达唑仑的关键工艺杂质和关键质量指标成分。ESI-Q-TOF/MS测得有关物质**3**[M+H]$^+$的准确质量344.095 83,与离子式$C_{18}H_{16}ClFN_3O^+$相应,与咪达唑仑元素组成相比,多1分子水;据文献报道[16],咪达唑仑制成盐酸盐时,处于酸性环境中,结构中亚胺基会发生可逆性水解开环,有关物

Table 2 LC-MS characteristics of midazolam related substances

No.	t_R/min	[M+H]$^+$ (*m/z*)	Ion formula	Dif./(×10^{-6})	Product ions (*m/z*)	Origins
1	3.769	248.058 91	$C_{12}H_{11}ClN_3O^+$	1.588	219,178,150,139,111,88	Dr
2	4.268	359.059 55	$C_{18}H_{13}ClFN_2O_3^+$	0.628	315,297,240,222,123,95	Dr
3	6.442	344.095 83	$C_{18}H_{16}ClFN_3O^+$	−0.623	315,297,274,123,109,95	Pr,Dr
4	8.441	342.080 08	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	−0.919	325,311,307,278,260,211,177,116	Dr
5(**A**)	8.682	328.101 91	$C_{18}H_{16}ClFN_3^+$	2.378	258,234,223,125,95	Pr
6(**C**)	8.975	304.101 13	$C_{16}H_{16}ClFN_3^+$	0.264	287,246,211,109	Pr
7	8.976	358.075 49	$C_{18}H_{14}ClFN_3O_2^+$	0.506	315,297,235,222,123,95	Dr
8(**B**)	9.202	330.116 87	$C_{18}H_{18}ClFN_3^+$	0.273	301,273,260,211,166,109,95	Pr
9	9.866	342.081 55	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	3.378	307,272,260,240,265,225	Dr
10(**D**)	10.183	342.080 49	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	0.280	322,320,281,253,204	Pr, Dr
11	10.246	292.124 00	$C_{18}H_{15}FN_3^+$	−1.548	250,231,210,183,155,128	Pr
12	10.788	342.080 78	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	1.127	325,297,262,234,109	Dr
13(**E**)	11.976	348.054 89	$C_{16}H_{12}ClFN_3O_3^+$	0.909	330,302,287,227,123	Pr
14	12.477	289.054 47	$C_{15}H_{11}ClFN_2O^+$	2.161	261,259,226,206,165,140,109	Dr
15	12.638	326.085 55	$C_{18}H_{14}ClFN_3^+$	0.215	297,261,243,221,201,128	Dr
16	14.057	343.064 69	$C_{18}H_{13}ClFN_2O_2^+$	0.816	315,297,246,150,123,109,95	Dr
17(**F**)	14.566	328.102 03	$C_{18}H_{16}ClFN_3^+$	2.744	297,258,222,205,109,95	Pr
API	15.194	326.085 54	$C_{18}H_{14}ClFN_3^+$	0.185	291,249,244,223,209	API
18(**G**)	16.273	308.096 07	$C_{18}H_{15}ClN_3^+$	3.792	273,266,226,191,169,155,129	Pr
19	18.267	332.059 25	$C_{16}H_{12}ClFN_3O_2^+$	−1.231	315,287,271,259,236,163,109	Pr
20	19.166	273.059 55	$C_{15}H_{11}ClFN_2^+$	2.268	256,236,221,201	Dr
21(**H**)	19.928	326.085 76	$C_{18}H_{14}ClFN_3^+$	0.860	299,258,250,222,189,128	Pr
22	20.239	273.059 51	$C_{15}H_{11}ClFN_2^+$	2.122	177,150,136	Dr

Pr:Process related substance;Dr:Degradation product

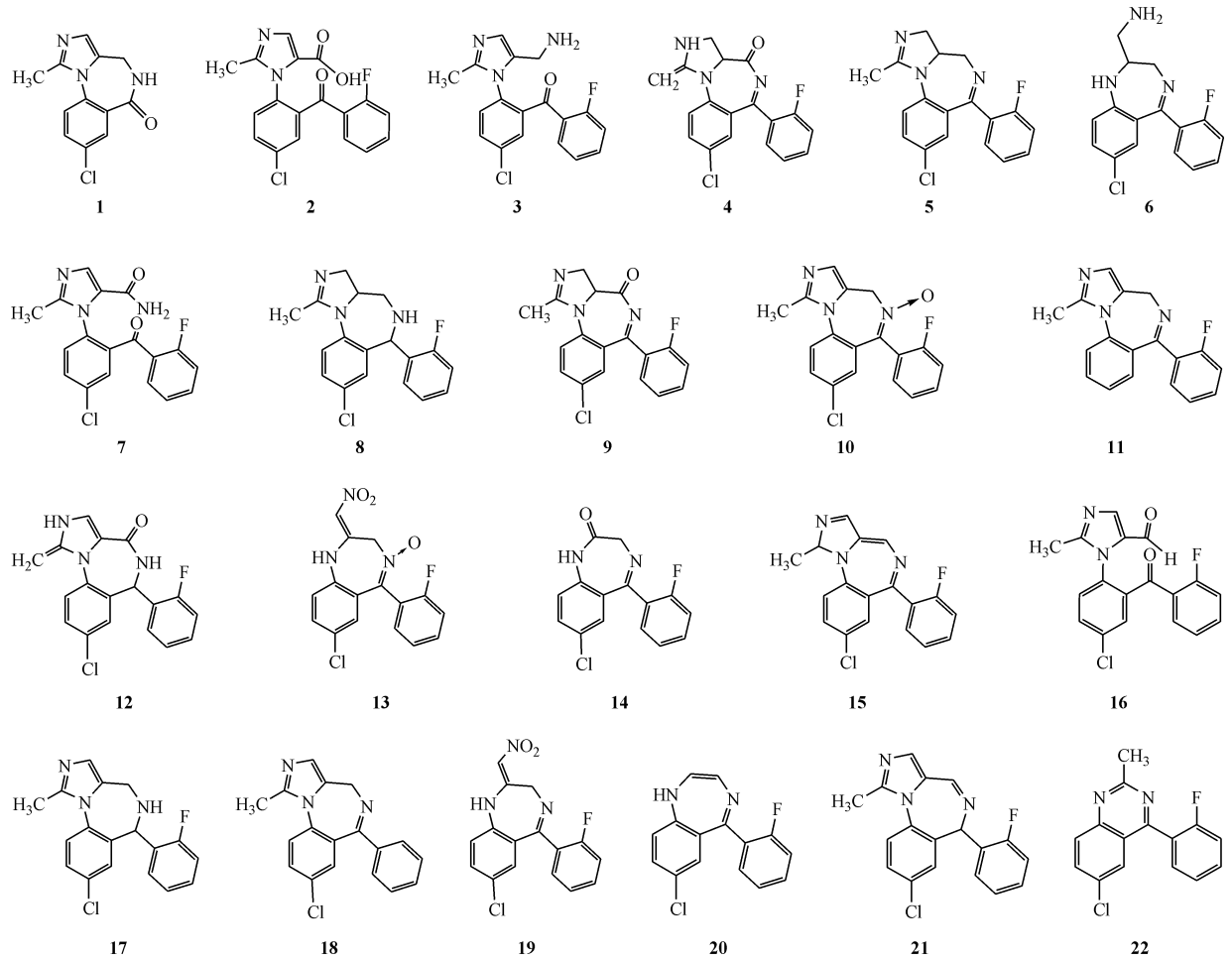


Figure 3　Chemical structures of midazolam related substances **1**–**22**

质**3**是该水解产物。其主要特征碎片(图6)离子 *m/z* 315.072 0 ($C_{17}H_{13}ClFN_2O^+$)、274.048 9 ($C_{15}H_{10}ClFNO^+$)和123.025 8($C_7H_4FO^+$)均与分子结构中含有二苯酮单元特征相应,分别与[M+H]+脱亚胺(CH_2=NH)、咪唑环裂解乙烯亚胺(CH_2=C=NH)、或二苯酮基断裂相应。确证有关物质**3**是咪达唑仑结构中苯并二氮杂草环上亚胺基水解开环,而形成的二苯酮胺降解或工艺杂质。

有关物质**10**主要在氧化破坏条件下产生,[M+H]$^+$的准确质量342.080 49,与离子式$C_{18}H_{14}ClFN_3O$+相应,与咪达唑仑元素组成相比,多一个O元素。MS及对照品比对确证鉴定有关物质**10**为咪达唑仑的苯并二氮杂草环上亚胺的N氧化副产物(USP咪达唑仑杂质D),其二级质谱碎片离子(图7)均确证相应结构。

有关物质**21**主要在高温湿法条件下产生,[M+H]$^+$的准确质量为326.085 76,与离子式$C_{18}H_{14}ClFN_3^+$相应,与咪达唑仑相对分子质量一致,两者互为同分异构体。MS及对照品比对确证鉴定有关物质**21**是咪达唑仑合成中七元杂环上双键位置异构的副产物(USP咪达唑仑杂质**H**),其二级质谱碎片离子(图8)均确证相应结构。

有关物质**5**和**17**[M+H]$^+$的准确质量分别为328.101 91和328.102 03,均与离子式$C_{18}H_{16}ClFN_3^+$相应,比咪达唑仑相对分子质量多2;有关物质**8**[M+H]$^+$的准确质量为330.116 87,与离子式$C_{18}H_{18}ClFN_3^+$相应,比咪达唑仑相对分子质量多4;结合咪达唑仑合成工艺[15],MS及对照品比对确证鉴定。有关物质**5**是咪达唑仑合成过程中的一个中间体(图1,USP咪达唑仑杂质**A**),有关物质**8**和**17**是咪达唑仑发生不同程度还原,而产生的副产物(USP咪达唑仑杂质**B**和**F**)。

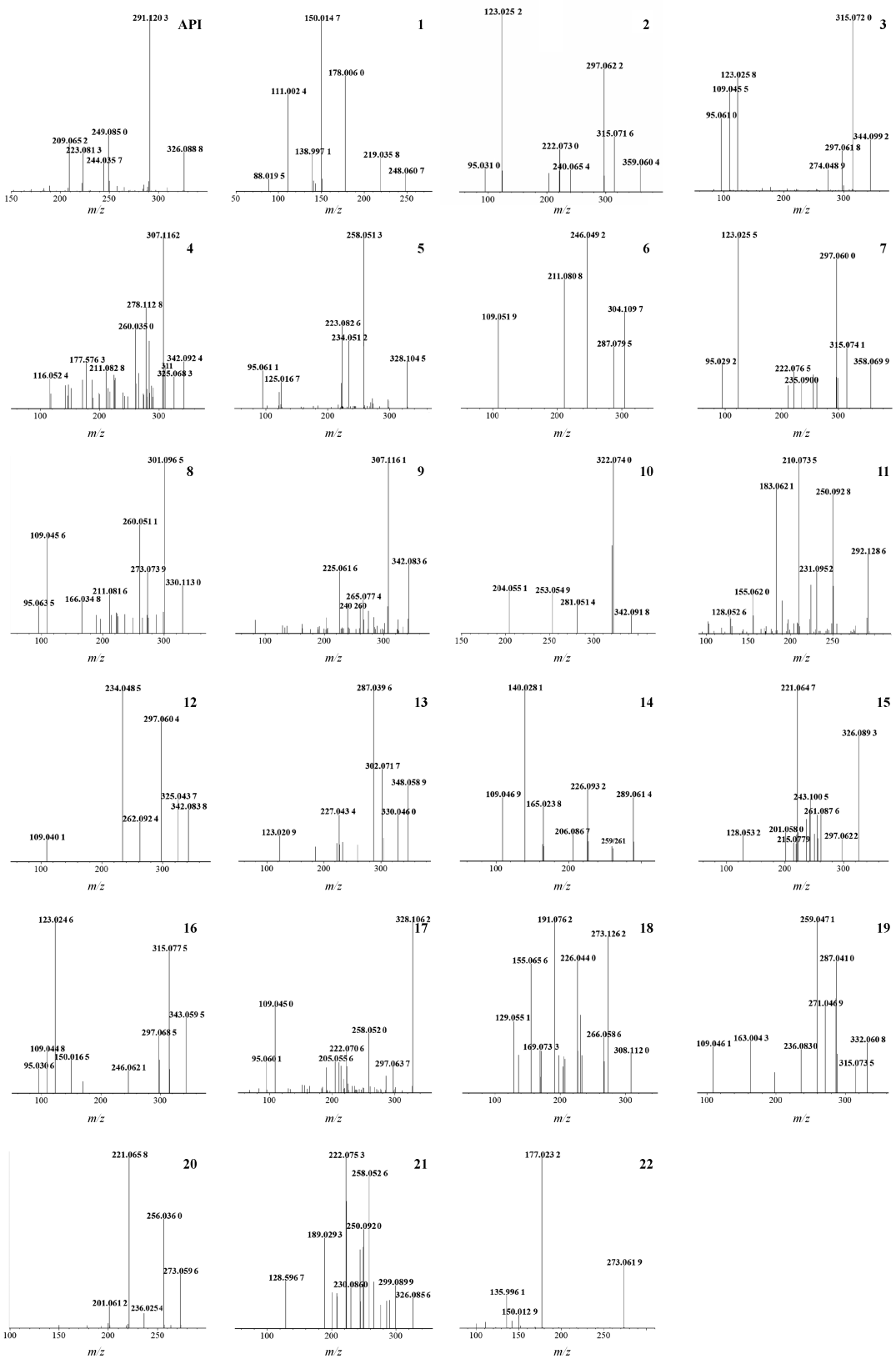


Figure 4 MS/MS spectra of midazolam and its related substances $[M+H]^+$ ions

API(*m/z* 326); **1**(*m/z* 248); **2**(*m/z* 359); **3**(*m/z* 344); **4**(*m/z* 342); **5**(*m/z* 328); **6**(*m/z* 304); **7**(*m/z* 358); **8**(*m/z* 330); **9**(*m/z* 342); **10**(*m/z* 342); **11**(*m/z* 292); **12**(*m/z* 342); **13**(*m/z* 348); **14**(*m/z* 289); **15**(*m/z* 326); **16**(*m/z* 343); **17**(*m/z* 328); **18**(*m/z* 308); **19**(*m/z* 332); **20**(*m/z* 273); **21**(*m/z* 326); **22**(*m/z* 273)

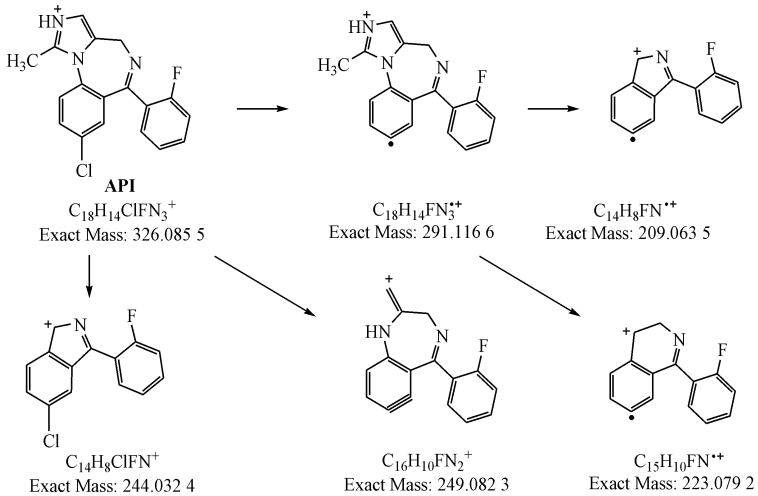


Figure 5　Midazolam $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

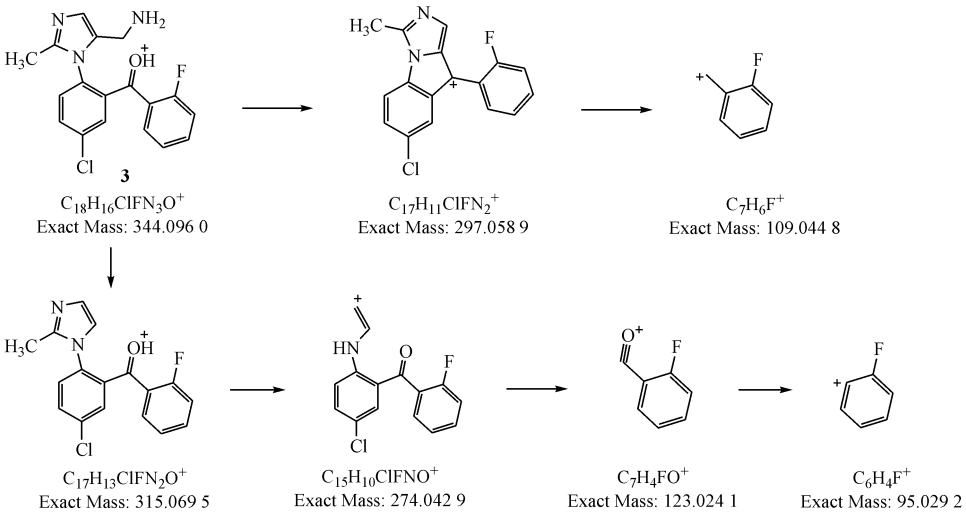


Figure 6　RS **3** $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

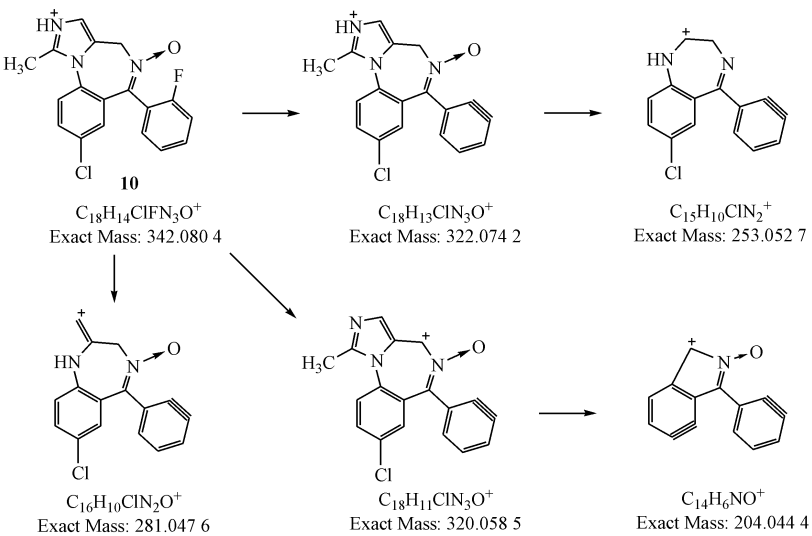


Figure 7　RS **10** $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

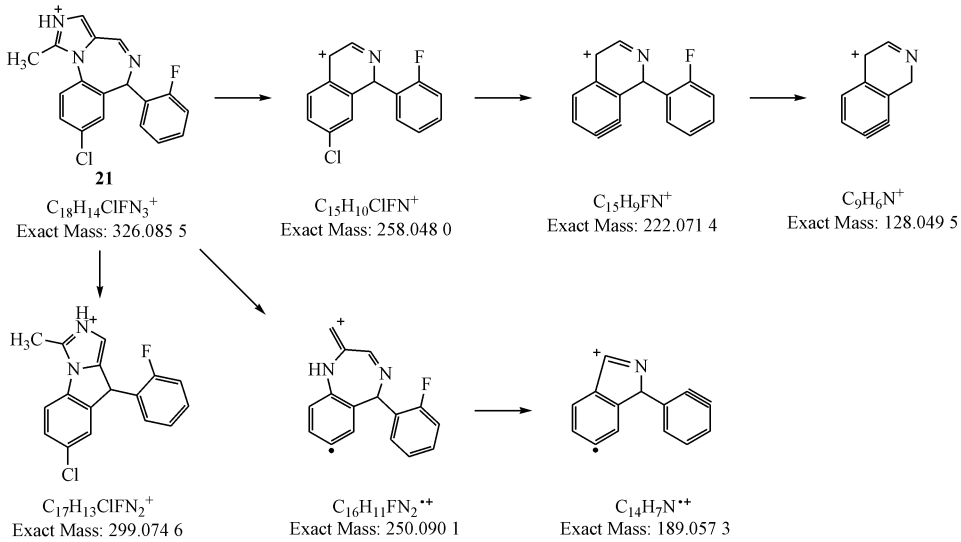


Figure 8 RS **21** $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质**6**$[M+H]^+$的准确质量为304.101 13，与离子式$C_{16}H_{16}ClFN_3^+$相应，其碎片离子287.079 5（$C_{16}H_{13}ClFN_2^+$）比$[M+H]^+$少17，与NH_3相应；结合咪达唑仑合成工艺[15]，MS及对照品比对，确证鉴定有关物质**6**是咪达唑仑合成过程中的一个中间体（图1，USP咪达唑仑杂质**C**）。

有关物质**11**$[M+H]^+$的准确质量为292.124 00，与离子式$C_{18}H_{15}FN_3^+$相应，与咪达唑仑元素组成相比，少1个Cl元素，多1个H元素，其一级质谱结果中也未出现Cl的同位素峰，说明该杂质与咪达唑仑结构中的Cl被H替代相应。MS及对照品比对，确证鉴定有关物质**11**为咪达唑仑的非氯代副产物。

有关物质**13**$[M+H]^+$的准确质量为348.054 89，与离子式$C_{16}H_{12}ClFN_3O_3^+$相应，与咪达唑仑元素组成相比，少两个C元素，多3个O元素；其特征碎片*m/z* 330.046 0（$C_{16}H_{10}ClFN_3O_2^+$）、302.071 7（$C_{16}H_{12}ClFN_2O^+$）、287.039 6（$C_{15}H_9ClFN_2O^+$），分别与$[M+H]^+$离子丢失1分子H_2O、1分子NO_2和硝基亚甲基碎片相应；确证分子结构中含有硝基取代。结合咪达唑仑合成工艺[15]，MS及对照品比对，确证有关物质**13**是咪达唑仑合成过程中的一个中间体（图1，USP咪达唑仑杂质**E**）。

有关物质**18**$[M+H]^+$的准确质量为308.096 07，与离子式$C_{18}H_{15}ClN_3^+$相应，与咪达唑仑元素组成相比，少1个F元素多1个H元素。MS及对照品比对，确证有关物质**18**为咪达唑仑非氟代的副产物（USP咪达唑仑杂质**G**）。

有关物质**19**$[M+H]^+$的准确质量为332.059 25，与离子式$C_{16}H_{12}ClFN_3O_2^+$相应，与有关物质**13**元素组成相比，少一个O元素；结合咪达唑仑合成工艺[15]，MS及合成对照品比对，确证有关物质**19**是咪达唑仑合成过程中的中间体（图1）。

3.2.2 降解杂质的结构鉴定 通过有关物质HPLC定位及质谱特征分析，测得各降解杂质母离子的准确质量和离子组成及它们的二级质谱特征碎片（图4），结合咪达唑仑裂解规律，对强制降解样品中产生的有关物质进行综合分析，鉴定它们的结构。

有关物质**1**和**2**是咪达唑仑的特征氧化降解杂质，反相色谱保留显著降低，表明极性显著增大。有关物质**1**$[M+H]^+$的准确质量为248.058 91，与离子式$C_{12}H_{11}ClN_3O^+$相应，与咪达唑仑被氧化脱去2-氟苯基单元的羟基取代转化物相应；其主要特征碎片（图9）离子*m/z* 219.035 8（$C_{11}H_8ClN_2O^+$）、178.006 0（$C_9H_5ClNO^+$）和150.014 7（$C_8H_5ClN^+$）分别与$[M+H]^+$开环裂解脱去亚胺（CH_2=NH）、进一步咪唑环裂解（CH_2=C=NH）、或咪唑环和酰基亚胺（CHO-N=CH_2）同时脱去相应，确证了该杂质结构中仍然保留了与咪达唑仑相应的咪唑环并苯并二氮杂草环基本结构特征。同时测得*m/z* 138.997 1（$C_7H_4ClO^+$）和111.002 4（$C_6H_4Cl^+$）离子，它们进一步证明了咪达唑仑被氧化脱去2-氟苯基单元后，羟基取代亚胺转化成内酰胺的结构特征。

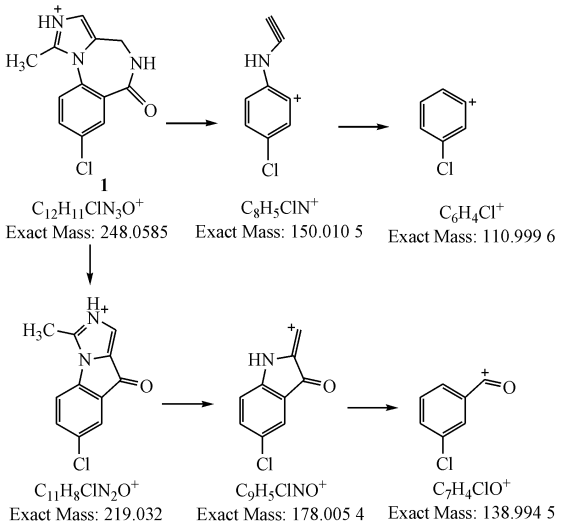


Figure 9　RS 1 $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质 **2** $[M+H]^+$ 的准确质量为 359.059 55，与离子式 $C_{18}H_{13}ClFN_2O_3^+$ 相应，与咪达唑仑元素组成相比，多 3O、少 NH；其主要特征碎片（图 10）离子 *m/z* 315.071 6（$C_{17}H_{13}ClFN_2O^+$）、297.062 2（$C_{17}H_{11}ClFN_2^+$）和 123.025 2（$C_7H_4FO^+$）均与有关物质 **3** 的特征碎片一致，表明其分子结构中也含有二苯酮单元。又 *m/z* 315 离子与其 $[M+H]^+$ 脱去羧基单元相应。所以，鉴定有关物质 **2** 是咪达唑仑结构中苯并二氮杂草环上亚胺基发生水解开环、并氧化成羧酸，而生成的二苯酮类降解杂质。其极性明显增大，反相色谱保留显著减弱。

有关物质 **7** 也是氧化降解杂质，并在湿法加热和光照条件下产生，其 $[M+H]^+$ 的准确质量为 358.075 49，与离子式 $C_{18}H_{14}FClN_3O_2^+$ 相应，与咪达唑仑元素组成相比，多 2 个 O 元素；其主要特征碎片（图 11）离子 *m/z* 315.074 1（$C_{17}H_{13}ClFN_2O^+$）、297.060 0（$C_{17}H_{11}ClFN_2^+$）和 123.025 5（$C_7H_4FO^+$）均与有关物质 **3** 的特征碎片一致，表明其分子结构中也含有二苯酮单元。又 *m/z* 315 离子与其 $[M+H]^+$ 脱去酰胺（O=C=NH）单元相应。所以，鉴定有关物质 **7** 是咪达唑仑苯并二氮杂草环上亚胺基发生水解开环、并氧化成酰胺，而生成的二苯酮类降解杂质。

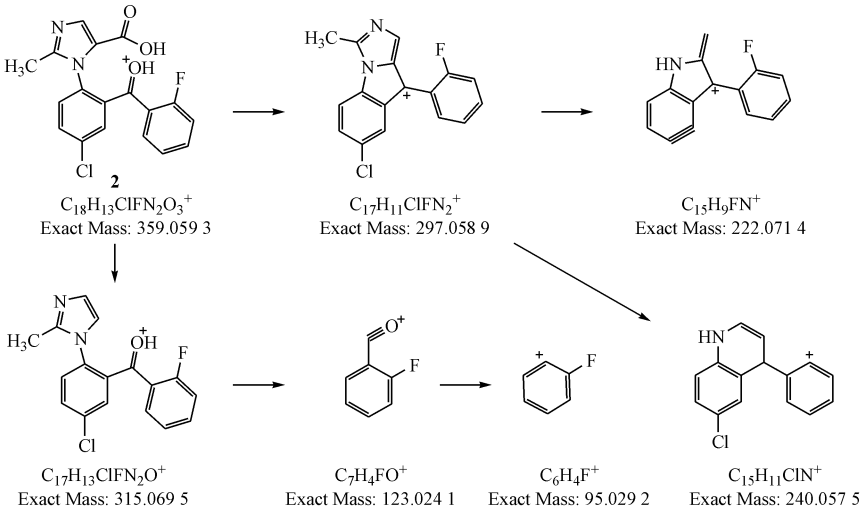


Figure 10　RS 2 $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质 **4** 和 **9** 均主要为氧化降解杂质，有关物质 **12** 主要在湿法光照条件下降解产生，三者 $[M+H]^+$ 的准确质量分别为 342.080 08、342.081 55 和 342.080 78，均与离子式 $C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$ 相应，与咪达唑仑元素组成相比，均多一个 O 元素，并都与咪达唑仑的氧化副产物 **10** 互为同分异构体。所以，在咪达唑仑结构中，存在多个易被氧化降解的位点，潜在多种氧化产物结构，需要结合二级质谱区别确证。

有关物质 **4** 的主要特征碎片离子（图 12）*m/z* 325.068 3（$C_{18}H_{11}ClFN_2O^+$）、311（$C_{17}H_9ClFN_2O^+$）、307.116 2（$C_{18}H_{14}FN_3O^{+\cdot}$）、278.112 8（$C_{17}H_{13}FN^{3+}$）和 260.035 0（$C_{14}H_8ClFNO^+$），分别与 $[M+H]+$ 脱 NH_3、咪唑环断裂（NH_2-CH_3）、脱 Cl 原子、脱 1 分子 HCl 和羰基单元、或咪唑环断裂脱去相应。因此，鉴定有关物质 **4** 为咪达唑仑的甲基与咪唑亚胺双键异构，并且氮杂草环的 CH_2 被氧化而成的酰基亚胺化合物。

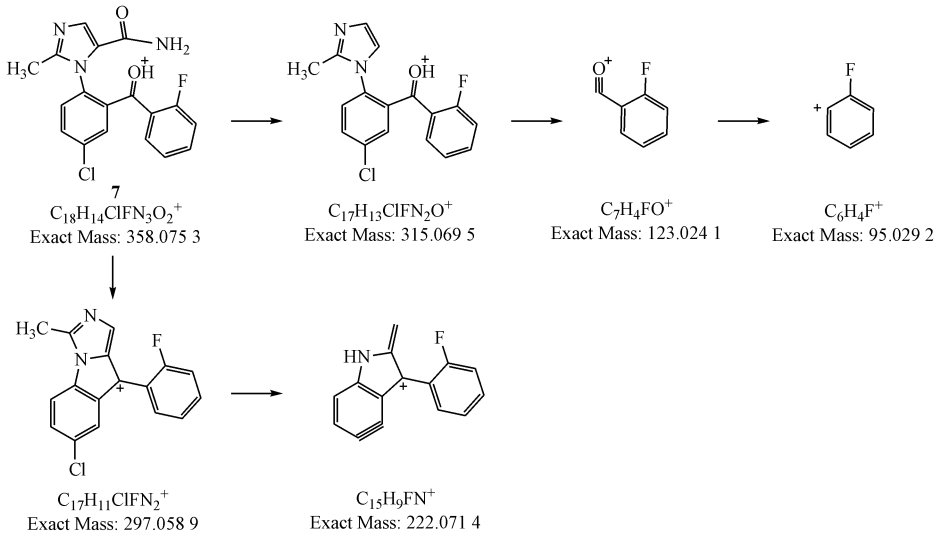


Figure 11 RS 7 $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质**9**的二级质谱图与有关物质**4**相似，也有特征碎片离子 *m/z* 307.116 1（$C_{18}H_{14}FN_3O^{+\cdot}$）、260（$C_{14}H_8ClFNO^+$），推测二者具有类似的特征结构；但是，未见有关物质**4**特有的与$[M+H]^+$脱NH_3和咪唑环断裂（NH_2-CH_3）碎片 *m/z* 325.068 3（$C_{18}H_{11}ClFN_2O^+$）和311（$C_{17}H_9ClFN_2O^+$）；所以，有关物质**9**中的杂环氮均为叔胺状态，其特征碎片265.077 4（$C_{16}H_{10}FN_2O^+$）和225.061 6（$C_{14}H_8FNO^{+\cdot}$）分别与$[M+H]^+$脱去一个Cl原子且咪唑环断裂脱乙烯亚胺（CH_2=C=NH）、或咪唑环与苯并二氮杂草环同时断裂特征相应。确证，有关物质**9**为咪达唑仑的咪唑环双键与氮杂草环异构后，再被氧化而成的酰基亚胺化合物（图12）。

有关物质**12**的主要特征碎片离子（图12）*m/z* 325.083 8（$C_{18}H_{11}ClFN_2O^+$）、297.060 4（$C_{17}H_{11}ClFN_2^+$）和262.092 4（$C_{17}H_{11}FN_2^{+\cdot}$）分别与$[M+H]^+$脱去$NH_3$、脱去酰胺（O=CH-$NH_2$）、或进一步脱去Cl原子相应，表明结构中存在内酰胺结构，且易脱去NH_3。所以鉴定有关物质**12**是咪达唑仑的甲基与咪唑亚胺双键异构和氮杂草的环亚胺的双键异构并羟基取代转化物（图12）。

有关物质**14**是光照湿法条件的特征杂质，也是氧化降解杂质，其$[M+H]^+$的准确质量为289.054 47，与离子式$C_{15}H_{11}FClN_2O^+$相应，与咪达唑仑元素组成相比，多1个O元素，少C_3H_3N；其主要特征碎片（图13）*m/z* 261（$C_{14}H_{11}ClFN_2^{+\cdot}$）和259（$C_{14}H_9ClFN_2^{+\cdot}$）均与$[M+H]^+$脱去羰基相应，226.093 2（$C_{14}H_{11}FN_2^{+\cdot}$）与206.086 7（$C_{14}H_{10}N_2^{+\cdot}$）分别为 *m/z* 261脱去一个Cl原子、进一步脱去1分子HF而成。确证有关物质**14**是咪达唑仑的咪唑环氧化开环脱去，形成内酰胺的降解杂质[13]。

有关物质**15**是高温湿法降解杂质，其$[M+H]^+$的准确质量326.085 55，与离子式$C_{18}H_{14}N_3FCl^+$相应，与咪达唑仑及有关物质**21**的元素组成一致，三者互为同分异构体，这与咪达唑仑母核中多个双键易发生双键位置异构的特征相应；有关物质**15**的特征碎片离子（图15）*m/z* 297.062 2（$C_{17}H_{11}FN_2^+$）、243.100 5（$C_{16}H_9N_3^+$）和221.064 7（$C_{15}H_8FN^{+\cdot}$）分别与$[M+H]^+$脱亚胺（CH_2=NH）、脱去Cl原子及1分子HF并咪唑环裂解乙烯（CH_2=CH_2）、或同时脱氯且咪唑环裂解（CH=N-C（CH_3）=NH）相应；*m/z* 221.064 7（$C_{15}H_8FN^{+\cdot}$）比咪达唑仑特征碎片离子223.081 3（$C_{15}H_{10}FN^{+\cdot}$）少2，说明有关物质**15**是苯并二氮杂草环上为烯双键；除有关物质**21**外咪达唑仑双键位置异构体还存在两种（图14），相对于化合物**a**，化合物**b**更容易脱亚胺（CH_2=NH）产生 *m/z* 297.062 2。所以，鉴定有关物质**15**是咪达唑仑高温条件下产生双键位置异构的化合物（图15）。

有关物质**16**也是高温湿法降解特征杂质，并在湿法光照条件下产生，其$[M+H]^+$的准确质量为343.064 69，与离子式$C_{18}H_{13}ClFN_2O_2^+$相应；与咪达唑仑元素组成相比，多2个O元素，少NH；其主要特征碎片离子（图16）*m/z* 315.0775（$C_{17}H_{13}ClFN_2O^+$）、

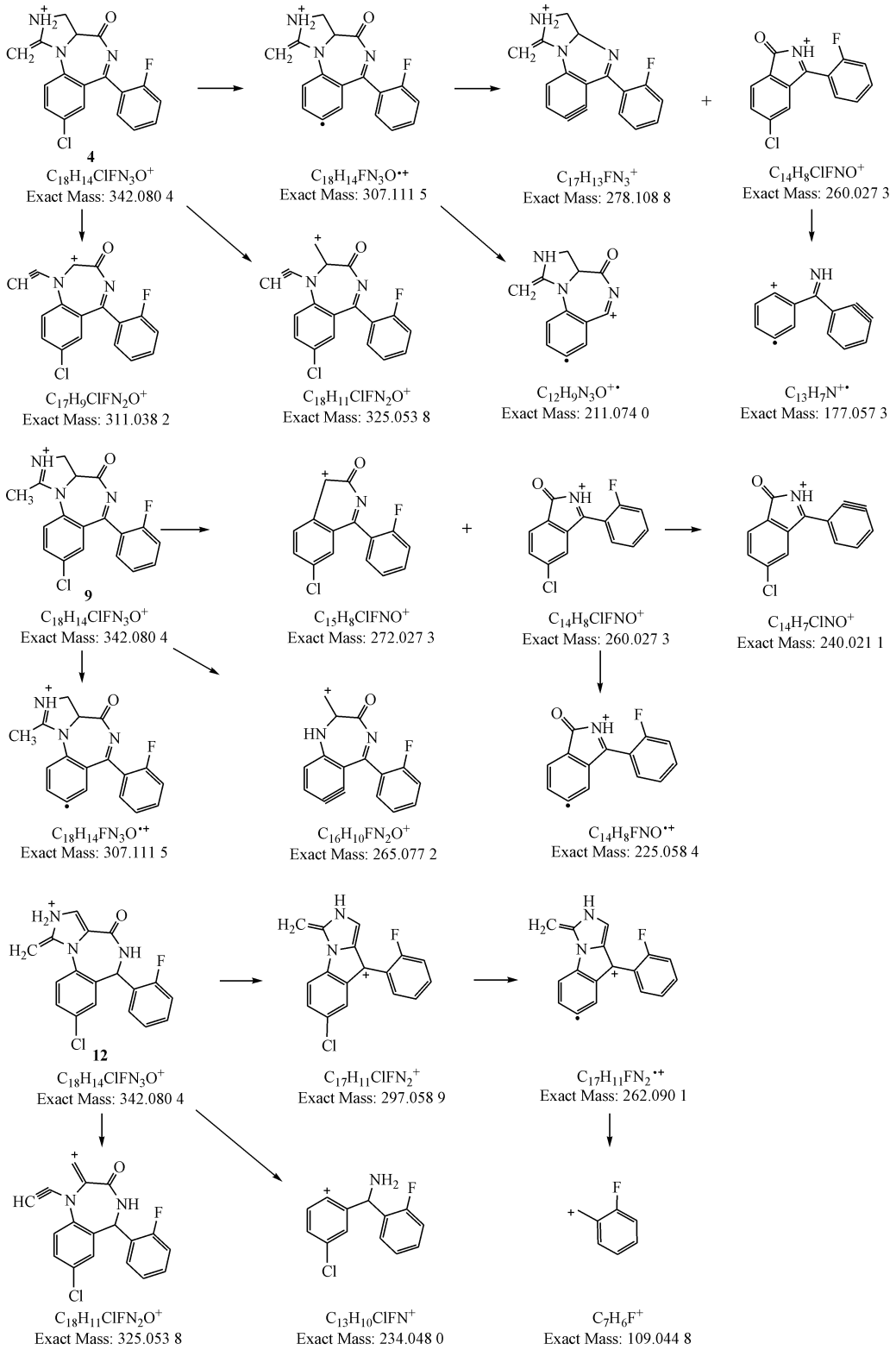


Figure 12　RS **4,9,12** $[M+H]^+$ ions MS/MS fragmentation pathways

297.068 5($C_{17}H_{11}ClFN_2^+$)和 123.024 6($C_7H_4FO^+$)均与有关物质**3**的特征碎片一致,表明其分子结构中也含有二苯酮单元,又 *m/z* 315 离子与其$[M+H]^+$脱去 CO 相应。所以,鉴定有关物质**16**是咪达唑仑苯并二氮杂草环上亚胺基水解开环,并氧化脱氨成醛,而形成的二苯酮类化合物,并通过合成对照品

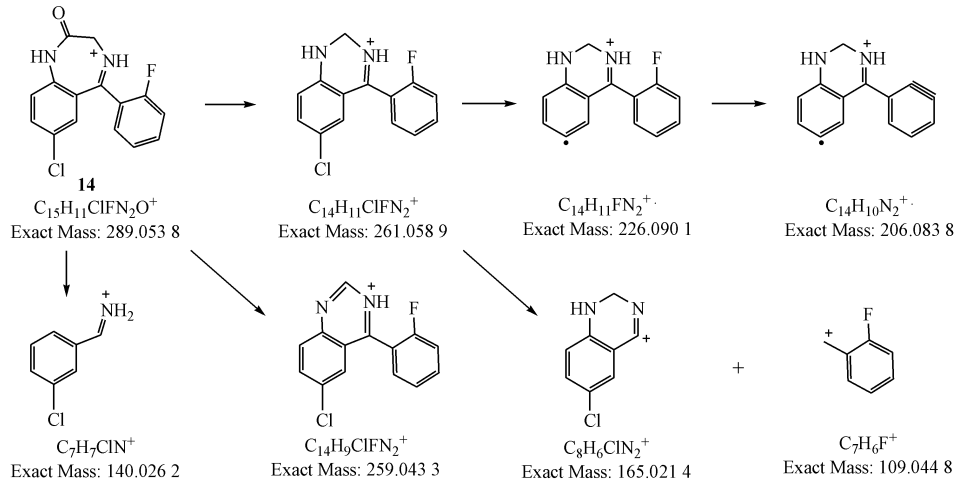


Figure 13 RS **14** $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

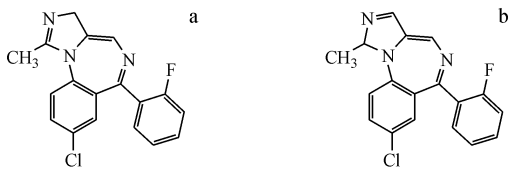


Figure 14 Possible structures of RS **15**

比对确证。

有关物质**20**和**22**同为氧化降解杂质,**22**还是湿法光照条件下的特征降解杂质,测得有关物质**20**和**22**$[M+H]^+$的准确质量分别为273.059 55和273.059 51,均与离子式$C_{15}H_{11}ClFN_2^+$相应,两者互为同分异构体,与咪达唑仑元素组成相比,少C_3H_3N,与咪唑环的开环重排异构化相应。

有关物质**22**的主要特征碎片离子(图18)*m/z* 177.023 2($C_9H_6ClN_2^+$),比其$[M+H]^+$少96,与其结构中易发生氟苯基裂解相应,其他裂解特征均与氯苯并1,3-哌嗪特征结构相应;MS及合成对照品比对,确证有关物质**22**其是咪达唑仑上咪唑环断裂,同时七元杂环发生重排产生的特征光降解杂质,在氧化条件下也易生成。

有关物质**20**的主要特征碎片离子*m/z* 256.036 0($C_{15}H_8ClFN^+$)、221.065 8($C_{15}H_8FN^{+\cdot}$)和201.061 2($C_{15}H_7N^{+\cdot}$),分别为$[M+H]^+$脱NH_3、进一步脱去一个Cl原子、或继续脱去1分子HF产生。推测,咪唑环的开环重排异构化有3种可能的结构(图17),其中化合物**b**不易脱NH_3离子,化合物**c**虽易脱NH_3,但其结构中含有伯氨基,极性相对较大。所以,鉴定有关物质**20**具有氮杂草的环烯单亚胺结构的化合物(图17-**a**,图18)。

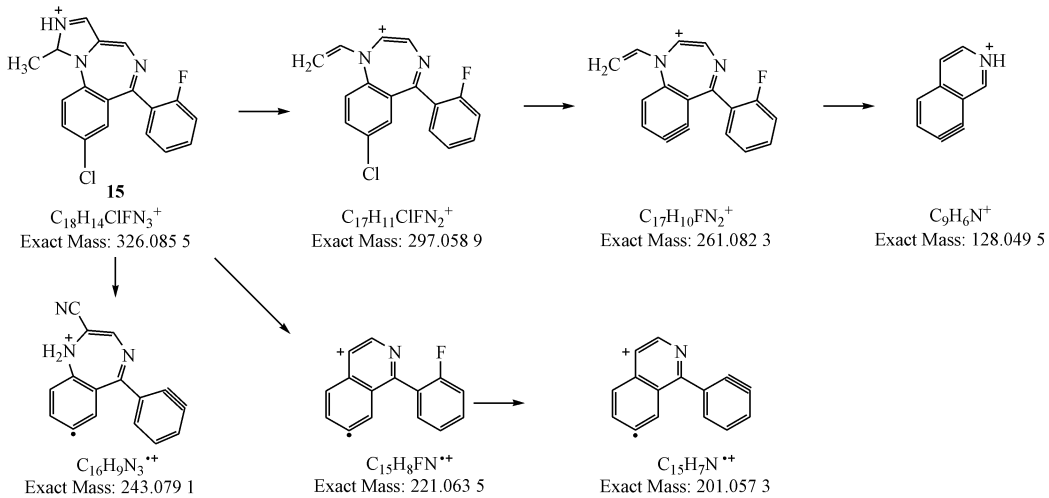


Figure 15 RS **15** $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

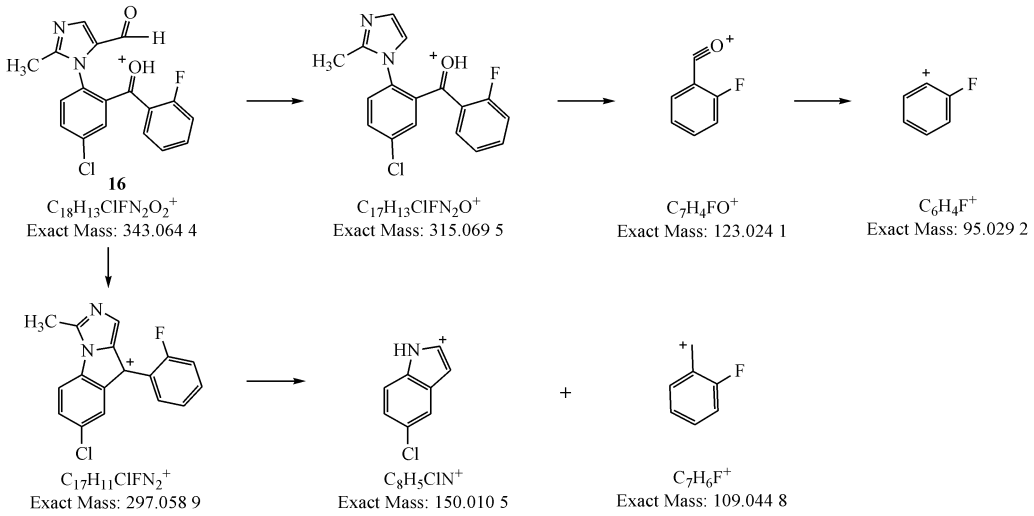


Figure 16　RS **16** $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

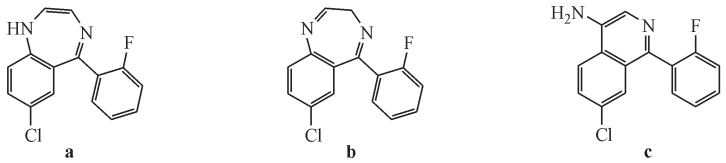


Figure 17　Possible structures of RS **20**

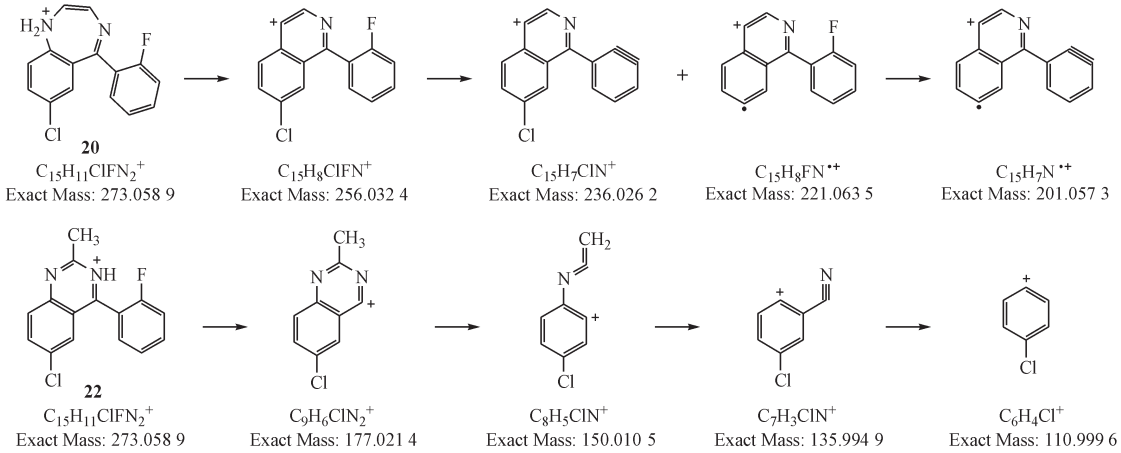


Figure 18　RS **20, 22** $[M+H]^+$ ions MS/MS fragmentation pathways

4　讨　论

在建立的LC-MC联用鉴定条件下，盐酸咪达唑仑与各有关物质均得到有效的分离，共检测到22个有关物质，其中8个为工艺相关的中间体或副产物杂质：**5**、**6**、**8**、**11**、**13**、**17**、**18**和**19**；有11个为分降解产物：**1**、**2**、**4**、**7**、**9**、**12**、**14**、**15**、**16**、**20**和**22**；3个既是工艺杂质也是降解杂质：**3**、**10**和**21**。

强制降解试验表明，盐酸咪达唑仑在酸、碱条件下咪达唑仑结构中七元杂环上亚胺基易发生水解开环，生成特征有关物质**3**；在高温湿法条件下，容易产生咪达唑仑异构体（有关物质**15**、**21**）；在氧化、光照条件下，咪达唑仑结构中的咪唑环和苯并二氮杂草环上亚胺基易水解开环并氧化为二苯酮类降解杂质，或氧化为内酰胺、羟基取代转化物和N氧化杂质。因此，盐酸咪达唑仑原料药应避光、阴凉暗处密闭存储。

此外，临床上咪达唑仑常被制成糖浆剂[17]，并

加入枸橼酸等辅料矫味,故枸橼酸也可能参与水解,生成二苯酮胺的枸橼酸酰胺潜在制剂特征有关物质**S1**,其脱H_2O则形成有关物质**S2**(图19),它们均已经通过杂质谱分析、MS及对照品比对确证。

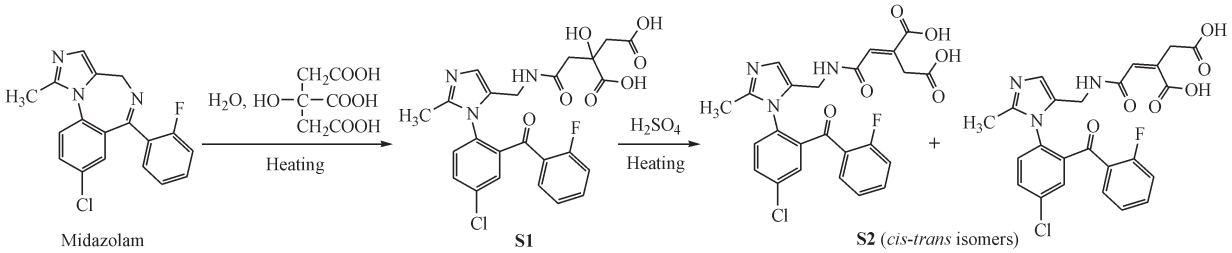


Figure 19 Synthesis of the RS **S1** and **S2**

通过LC-MS技术对盐酸咪达唑仑有关物质进行分析研究,探讨了其杂质来源和降解途径,为其贮藏条件制定、工艺优化提供了依据,为更好的质量控制提供了参考,为稳定性研究奠定了基础[18-19]。

参考文献

[1] Conway A, Rolley J, Sutherland JR. Midazolam for sedation before procedures[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016(5): CD009491.

[2] Chen XJ, Mou XQ, He ZY, *et al*. The effect of midazolam on pain control after knee arthroscopy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, **12**(1): 179.

[3] Grant MC, Kim J, Page AJ, *et al*. The effect of intravenous midazolam on postoperative nausea and vomiting: a meta-analysis[J]. *Anesth Analg*, 2016, **122**(3): 656-663.

[4] Reddy SD, Reddy DS. Midazolam as an anticonvulsant antidote for organophosphate intoxication: a pharmacotherapeutic appraisal[J]. *Epilepsia*, 2015, **56**(6): 813-821.

[5] Shtull-Leber E, Silbergleit R, Meurer WJ. Pre-hospital midazolam for benzodiazepine-treated seizures before and after the rapid anticonvulsant medication prior to arrival trial: a national observational cohort study [J]. *PLoS One*, 2017, **12** (3): e0173539. doi:10.1371/journal.pone.0173539.

[6] Dao K, Giannoni E, Diezi M, *et al*. Midazolam as a first-line treatment for neonatal seizures: retrospective study[J]. *Pediatr Int*, 2018, **60**(5): 498-500.

[7] Ng E, Taddio A, Ohlsson A. Intravenous midazolam infusion for sedation of infants in the neonatal intensive care unit[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, **1**(1): CD002052.

[8] Sivaramakrishnan G, Sridharan K. Nitrous oxide and midazolam sedation: a systematic review and meta-analysis[J]. *Anesth Prog*, 2017, **64**(2): 59-65.

[9] Santotoribio JD, Parodi Fernández V, Mesa Suárez P. Sedation with midazolam without neurotoxic effects [J]. *Med Clin (Barc)*, 2018, **150**(11): 450.

[10] Cheng X, Chen L, Huang LN, *et al*. Determination of related substances of midazolam syrup by RP-HPLC[J]. *Fujian Anal Test*(福建分析测试), 2010, **19**(2): 76-79.

[11] Huang CY, Chen MH, Cai M, *et al*. Preliminary exploration and structure identification of related substances of midazolam injection by 2D-LC-IT-TOF/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2017, **37**(4): 688-694.

[12] Feng XL, Du G, Hou TY, *et al*. Characterization of degradation products of midazolam maleate by UHPLC-HR-IT-MS^n and NMR[J]. *Pharmazie*, 2017, **72**(2): 73-80.

[13] Sati B, Sati H, Saklani S, *et al*. Synthesis of the impurities during the manufacture of bulk drug midazolam and separation of these impurities by HPLC [J]. *Acta Pharm*, 2013, **63** (3): 385-396.

[14] The United States Pharmacopeia Convention. United States Pharmacopeia 43[S]. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2020: 2952-2953.

[15] Guo JF, Shan XY, Shi HL. Graphical synthetic routes of midazolam[J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2012, **43** (5): 82-84.

[16] Fu YG, Li L, Li J, *et al*. Study on conjugated system of midazolam[J]. *Chem Bioeng* (化学与生物工程), 2010, **27**(10): 31-32, 36.

[17] Hou XY. Study on the stability of midazolam syrup solution(咪达唑仑糖浆混合液稳定性研究)[D]. Bejing: Peking Union Medical College, 2017.

[18] Yin XY, Wang C, Ming GJ, *et al*. Identification of the related substances in pioglitazone hydrochloride by hyphenated LC-MS techniques[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2017, **48**(6): 701-710.

[19] Ni YL, Han X, Song M, *et al*. Identification of the related substances of cyclosporin A by LC-MS techniques[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2019, **50**(4): 423-437.

银杏叶提取物对4种口服抗凝药抗凝活性的影响

刘志双,郑玉粉,孙红娜,于 锋*

(中国药科大学基础医学与临床药学学院,南京 211198)

摘 要 体外研究银杏叶提取物(GBE)对4种新型口服抗凝药(NOACs)达比加群、阿哌沙班、利伐沙班和依度沙班的抗凝活性的影响。分别测定大鼠血浆在不同浓度NOACs、GBE或NOACs联合GBE下的凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶时间(APTT)和凝血因子Xa(FXa)活性。结果表明在0~500 ng/mL质量浓度范围内,TT、PT和APTT随NOACs浓度增大而延长,除利伐沙班的TT外,其余均具有较好的线性相关性(r^2=0.78~0.98);FXa活性随Xa因子抑制剂(阿哌沙班、利伐沙班和依度沙班)浓度增大而降低,在低浓度范围内(0~250 ng/mL)具有较好的线性相关性(r^2=0.85~0.94)。GBE在0~500 μg/mL质量浓度范围内对TT、PT和APTT没有显著影响(P > 0.05),但FXa活性随GBE浓度增大而增强,且具有较好的线性相关性(r^2 = 0.840 4)。达比加群联合GBE后,TT随GBE浓度增大而延长。上述Xa因子抑制剂联合GBE后,TT随GBE浓度增大而缩短,FXa活性随GBE浓度增大而增强。NOACs联合GBE后的PT、APTT没有显著变化(P > 0.05)。实验结果提示GBE可能协同达比加群的抗凝活性;GBE可能拮抗Xa因子抑制剂的抗凝活性,可能是因为其具有增强FXa活性的作用。

关键词 银杏叶提取物;抗凝药;药物相互作用;凝血酶时间;凝血酶原时间;凝血因子Xa活性

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0327-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200310

引用本文 刘志双,郑玉粉,孙红娜,等.银杏叶提取物对4种口服抗凝药抗凝活性的影响[J].中国药科大学学报,2020,51(3):327-332.

Cite this article as: LIU Zhishuang, ZHENG Yufen, SUN Hongna, *et al*. Effect of *Ginkgo biloba* extract on anticoagulation of 4 new oral anticoagulants[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 327-332.

Effect of *Ginkgo biloba* extract on anticoagulation of 4 new oral anticoagulants

LIU Zhishuang, ZHENG Yufen, SUN Hongna, YU Feng*

School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198,China

Abstract To explore the effect of *Ginkgo biloba* extract (GBE) on anticoagulation of 4 new oral anticoagulants (NOACs), dabigatran, apixaban, rivaroxaban and edoxaban *in vitro*, thrombin time (TT), prothrombin time (PT), activated partial thrombin time (APTT) and the activity of coagulation factor Xa (FXa) of rat plasma were measured at different concentrations of NOACs, GBE or NOACs combined with GBE, respectively. The results showed that TT, PT and APTT were prolonged with the increase of NOACs concentration in the range of 0-500 ng/mL; that except for TT of rivaroxaban, other results showed a good linear correlation with NOACs concentration (r^2= 0.78-0.98); and that FXa activity decreased with increased concentration of FXa inhibitors (apixaban, rivaroxaban and edoxaban), with a good linear correlation with concentration of FXa inhibitors in the range of 0-250 ng/mL (r^2= 0.85-0.94). GBE had no significant effect on TT, PT and APTT (P>0.05) in the concentration range of 0-500 μg/mL, but FXa activity had a positive linear correlation with GBE concentration (r^2= 0.840 4). TT was prolonged with increasing GBE concentration when dabigatran was combined with GBE. When the above FXa inhibitors were combined with GBE, TT shortened and FXa activity increased with rising GBE concentra-

收稿日期 2020-02-19 *通信作者 Tel:13809045501 E-mail:yufengcpu@163.com

基金项目 中国药科大学基本科研业务费资助项目(No. 2632019PY05)

tion. There were no significant changes in PT and APTT (P>0.05) when NOACs were combined with GBE. The study results suggest that GBE may synergize with the anticoagulant activity of dabigatran and antagonize the anticoagulant activity of FXa inhibitors, possibly due to its role in increasing FXa activity.

Key words *Ginkgo biloba* extract; anticoagulants; drug interaction; thrombin time; prothrombin time; factor Xa activity

This study was supported by the Basic Research Foundation of China Pharmaceutical University (No. 2632019PY05)

抗凝治疗是治疗血栓性疾病的基础,新型口服抗凝药(NOACs)的问世克服了传统维生素K拮抗剂在血栓性疾病治疗的局限性,已显著改变了抗凝治疗现状并受到广泛关注[1-3]。目前在我国获批上市的NOACs包括直接凝血酶(Ⅱa因子)抑制剂达比加群酯(其在体内转化为具有直接抗凝血活性的达比加群),以及Xa因子抑制剂阿哌沙班、利伐沙班和依度沙班。银杏叶提取物(GBE)作为活血化瘀类中药,已被越来越多的基础和临床实验证明对预防和治疗心脑血管疾病有益[4-5],在国内外已广泛应用于心脑血管疾病的预防和治疗。

随着NOACs在临床上的广泛使用,伴有多种血栓性疾病的患者可能出现同时服用GBE和NOACs的情况,然而临床上对于联合使用GBE是否影响NOACs的抗凝活性提出疑问。目前国内外还尚未有关于GBE和NOACs间相互作用的研究报道。故本研究利用大鼠血浆体外研究GBE联合4种NOACs(达比加群、阿哌沙班、利伐沙班和依度沙班)的抗凝效果,通过测定凝血时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、部分活化凝血酶时间(APTT)和凝血因子Xa(FXa)活性评估GBE对NOACs药效的影响,旨在初步探索GBE对NOACs的相互作用,以期为临床上NOACs的安全合理用药提供参考。

1 材 料

1.1 药品与试剂

达比加群(粉末,纯度95.4%)、阿哌沙班(粉末,纯度99.9%)、依度沙班(粉末,纯度99.9%)、利伐沙班(粉末,纯度99.7%)和银杏叶提取物(粉末,由银杏叶经乙醇回流提取、大孔树脂乙醇水溶液梯度洗脱而得,含24%银杏黄酮和6%银杏内酯)均购于上海源叶生物有限公司;凝血酶时间(TT)测定试剂盒(上海太阳生物有限公司);凝血酶原时间测定液体试剂盒、活化部分凝血酶时间测定试剂盒(泰州中勤世帝生物技术有限公司);大鼠凝血因子Xa(FXa)活性酶联免疫分析试剂盒(南京金霖生物有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

BS124S型电子分析天平(上海Sartorius Intec公司);TDZ4A-WS型低速平衡离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);LG-PABER-I半自动凝血因子分析仪(泰州中勤世帝生物技术有限公司);VersaMax™酶标仪、SoftMax Pro v5.4软件(美国Molecular Devices公司)。

1.3 动 物

SPF级Sprague-Dawley大鼠,体重(250±20)g,雄性,由南京青龙山动物繁殖场提供,合格证号:SCXK(苏)2017-001。所有动物实验符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 大鼠血浆采集与处理

大鼠禁食8 h后,水合氯醛(10%,0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,劲动脉取血,血浆收集于含有109 mmol/L枸橼酸钠的试管中,枸橼酸钠和血浆以体积比1∶9的比例混合,轻轻颠倒混匀。收集的抗凝血浆以3 000 r/min离心10 min,吸取上清液,即为待测血浆。所有血浆样品于室温下2 h内进行测试,以确保其稳定性。

2.2 含药血浆配制

参照相关文献[6-9],设置NOACs在大鼠血浆中的终浓度为125、250、500 ng/mL,GBE在大鼠血浆中的终浓度为125、250、500 μg/mL;根据实验结果,设置联合GBE时NOACs在大鼠血浆中的终浓度为125 ng/mL。

配制NOACs和GBE的DMSO储备液,再用生理盐水配制成12.5、25、50 μg/mL的NOACs生理

盐水溶液和 12.5、25、50 mg/mL 的 GBE 生理盐水溶液。将 NOACs 或 GBE 生理盐水溶液和大鼠血浆按体积比 1∶99 混合制备为所需浓度的含药血浆样品，用于 NOACs 或 GBE 对大鼠血浆凝血指标影响的实验，同时设置空白对照组，空白对照组使用生理盐水与大鼠血浆按体积比 1∶99 混合制备的血浆样品。将 NOACs 生理盐水溶液、GBE 生理盐水溶液和大鼠血浆按体积比 1∶1∶98 混合制备为所需浓度的含药血浆样品，用于 NOACs 联合 GBE 对大鼠血浆凝血指标影响的实验，同时设置 NOAC 对照组和空白对照组，NOAC 对照组使用 NOACs 生理盐水溶液、生理盐水和大鼠血浆按体积比 1∶1∶98 混合制备的含药血浆样品，空白对照组使用生理盐水与大鼠血浆按体积比 1∶49 混合制备的血浆样品。控制 DMSO 在含药或空白生理盐水溶液中的体积分数小于 0.1%，所有血浆样品现用现配。

2.3　凝血指标测定

2.3.1　TT、PT 和 APTT 测定　使用 TT、PT 和 APTT 检测试剂盒于半自动凝血因子分析仪进行检测，设置仪器参数，测试杯的每个通道中加入搅拌珠，并将待测含药血浆（TT：100 μL，PT：50 μL，APTT：50 μL 和 APTT 试剂 50 μL）加入测试杯，放置 37 ℃预温区预温 3 min 后，将测试杯转入测试区，加入检测试剂（TT：TT 溶液 100 μL，PT：PT 溶液 100 μL，APTT：$CaCl_2$ 溶液 50 μL）的同时启动开始键，测定各凝血指标并记录结果。

2.3.2　FXa 活性测定　使用大鼠凝血因子 Xa 活性酶联免疫分析试剂盒，将标准品稀释为 2、4、8、16、32 U/L 的标准溶液，酶标包被板设置标准孔、空白孔和待测样品孔，标准孔准确加入标准溶液 50 μL，空白孔加入样品稀释液 40 μL 和生理盐水 10 μL，待测样品孔加入样品稀释液 40 μL 和含药血浆样品 10 μL，轻轻晃动混匀。用封板膜封板后置于 37 ℃温育 30 min 后，揭掉封板膜，弃去所有液体，每孔加满洗涤液重复洗涤 5 次，甩干液体后，除空白孔外其他孔加入酶标试剂 50 μL，封板温育 30 min 后洗涤 5 次，加显色剂 A 和 B 各 50 μL，轻轻振荡混匀后于 37 ℃避光显色 10 min，每孔加终止液 50 μL 终止反应，在 450 nm 波长下测定各孔的吸收度，通过标准曲线计算样品中 FXa 的活性。

2.4　数据处理

每个实验均独立重复 6 次，所有数据应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示，组间比较采用独立样本 t 检验，$P < 0.05$ 视为有统计学差异。

3　结　果

3.1　NOACs 对各凝血指标的影响

如表 1 所示，在 0~500 ng/mL 质量浓度范围内，TT、PT 和 APTT 随 NOACs 浓度增大而延长，除利伐沙班的 TT 外，其余均具有较好的线性相关性（r^2=0.78~0.98）。TT 对于达比加群异常敏感，相比于空白对照组，125 ng/mL 达比加群已显著延长 TT 约 7 倍（$P < 0.01$）。TT 和 APTT 的延长随着达比加群浓度增大趋于平缓。TT 对利伐沙班、阿哌沙班的灵敏度较低。达比加群在 0~500 ng/mL 范围内延长 PT 具有较好的线性相关性（r^2=0.979 7）。PT 对阿哌沙班的灵敏度较低。依度沙班在 0~500 ng/mL 范围内延长 APTT 具有较好的线性相关性（r^2=0.982 2）。FXa 活性随 Xa 因子抑制剂（指阿哌沙班、利伐沙班和依度沙班，下同）浓度增大而降低，在 0~250 ng/mL 质量浓度范围内呈较好的线性相关性（r^2=0.85~0.94），利伐沙班和依度沙班在高于 250 ng/mL 时抑制作用趋于平缓。根据上述结果，选择 NOACs 质量浓度为 125 ng/mL 进行后续联合 GBE 的实验。

3.2　GBE 对各凝血指标的影响

如表 2 所示，GBE 在 0~500 μg/mL 质量浓度范围内不影响大鼠血浆的 TT、PT 和 APTT（$P > 0.05$），但随 GBE 浓度增大而显著增强 FXa 活性，具有较好的线性相关性（r^2=0.840 4）。

3.3　GBE 对 NOACs 各凝血指标的影响

如表 3 所示，单独 NOACs 存在时，相比于空白对照组，TT 显著延长（$P < 0.01$）。达比加群联合 GBE 时，TT 随 GBE 浓度增大而呈线性延长（r^2=0.936 1），相比于达比加群对照组具有显著性差异。临床上 TT 延长超过 3 s 显示异常，达比加群联合 125 μg/mL GBE 时，比达比加群对照组的 TT 已延长约 10 s，提示 GBE 有抗凝的临床意义。利伐沙班联合 GBE 时，TT 随 GBE 浓度增大而缩短，但相比于利伐沙班对照组无显著性差异（$P > 0.05$）。阿哌沙班联合 GBE 时，TT 随 GBE 浓度增大而呈线性缩短（r^2=0.799 7），相比于阿哌沙班对照组，联合 500 μg/mL GBE 下的 TT 具有显著性差异（$P <$

Table 1 Effects of new oral anticoagulants (NOACs) on coagulation indicators of rat plasma ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Indicator	c/(ng/mL)	TT/s	PT/s	APTT/s	FXa activity/(U/L)
Dabigatran	0	35.37 ± 0.24	14.00 ± 0.37	26.22 ± 0.22	
	125	286.52 ± 3.44**	16.85 ± 0.19**	53.22 ± 0.32**	
	250	431.03 ± 10.05**	21.00 ± 0.81**	65.78 ± 1.52**	
	500	615.57 ± 26.19**	29.77 ± 1.23**	83.70 ± 4.47**	
Rivaroxaban	0	30.68 ± 0.29	17.43 ± 0.28	16.38 ± 0.21	44.62 ± 1.02
	125	31.3 ± 0.36**	17.97 ± 0.23*	21.40 ± 0.77**	37.06 ± 2.05*
	250	31.67 ± 0.51**	19.27 ± 0.29**	22.27 ± 0.52**	33.57 ± 1.40**
	500	31.9 ± 0.40**	20.13 ± 0.30**	26.73 ± 0.31**	31.76 ± 2.21**
Apixaban	0	30.68 ± 0.29	17.43 ± 0.28	16.33 ± 0.24	44.62 ± 1.02
	125	31.23 ± 0.47*	17.70 ± 0.21	19.32 ± 0.43**	38.05 ± 1.47*
	250	31.62 ± 0.28**	17.73 ± 0.26	21.17 ± 0.61**	34.95 ± 2.15**
	500	32.4 ± 0.26**	18.78 ± 0.15**	25.98 ± 0.92**	29.89 ± 2.66**
Edoxaban	0	32.97 ± 0.36	16.07 ± 0.23	34.17 ± 0.28	44.62 ± 1.02
	125	36.13 ± 0.45**	17.42 ± 0.33**	37.87 ± 0.45**	38.65 ± 1.31*
	250	37.50 ± 0.64**	19.50 ± 0.40**	41.62 ± 0.23**	33.24 ± 1.42**
	500	38.67 ± 0.37**	22.18 ± 0.66**	46.60 ± 0.49**	34.07 ± 0.85**

*P < 0.05, **P < 0.01 *vs* 0 μg/mL group. TT:thrombin time; PT:prothrombin time; APTT:activated partial thrombin time; FXa :activated factor X

Table 2 Effects of *Ginkgo biloba* extract (GBE) on coagulation indicators of rat plasma ($\bar{x} \pm s$,n=6)

Group	c/(μg/mL)	TT/s	PT/s	APTT/s	FXa activity/(U/L)
Control		36.20 ± 0.39	16.65 ± 0.19	44.82 ± 0.69	15.80 ± 0.36
GBE	125	35.57 ± 0.90	16.72 ± 0.53	45.32 ± 0.72	17.40 ± 1.25*
	250	35.92 ± 0.49	16.45 ± 0.50	44.58 ± 0.62	19.40 ± 1.17*
	500	35.77 ± 0.33	16.77 ± 0.33	44.50 ± 1.20	21.87 ± 1.15**

*P < 0.05, **P < 0.01 *vs* control group

0.05)。依度沙班联合GBE时,TT随GBE浓度增大而呈线性缩短(r^2=0.810 9),相比于依度沙班对照组,联合250 μg/mL(P < 0.05)和500 μg/mL(P < 0.01)GBE下的TT具有显著性差异。

单独NOACs存在时,相比于空白对照组,PT和APTT延长,具有显著性差异。但NOACs联合GBE后的PT和APTT相比于NOAC对照组没有显著变化(P > 0.05)。

单独Xa因子抑制剂存在时,相比于空白对照组,FXa活性显著降低(P < 0.05)。Xa因子抑制剂联合GBE时,FXa活性相比于NOAC对照组显著性增强,且随GBE浓度增大而增强,具有较好的线性相关性(r^2=0.88~0.92),变化趋势和单用GBE时相似,再次说明GBE具有显著增强FXa活性的作用。

4 讨 论

银杏叶在国内外地区分布广泛,是广泛使用的中药材,在国外也是非常受欢迎的膳食补充剂,具有抗血栓、抗氧化、扩张血管等作用[5]。目前在国内外已有大量关于银杏叶的研究,其生物活性成分的药理作用及抗血栓机制已有相关阐明[10-13]。

本研究通过TT、PT、APTT和FXa活性初步判断GBE对凝血系统的影响,结果显示GBE在0~500 μg/mL范围内对TT无显著性改变,表明GBE对凝血酶及纤维蛋白原无显著性影响。本研究结果显示GBE对PT和APTT无显著性改变,GBE联合NOACs后的PT和APTT相比于NOAC对照组也无显著变化,而FXa活性随GBE浓度增大而增强,根据凝血级联反应可知,FXa活性的增强会加速凝

Table 3　Effects of NOACs combined with GBE on coagulation indicators of rat plasma ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Indicator	Group	c/(μg/mL)	TT/s	PT/s	APTT/s	FXa activity/(U/L)
Dabigatran	Control		35.37 ± 0.24	13.87 ± 0.16	26.97 ± 0.22	
	Single		286.52 ± 3.44**	18.30 ± 0.77**	57.35 ± 0.72**	
	Combined with GBE	125	296.33 ± 4.53#	18.00 ± 0.41	56.90 ± 0.52	
		250	308.22 ± 1.92##	17.92 ± 0.43	57.62 ± 0.93	
		500	315.55 ± 1.12##	17.82 ± 0.26	57.93 ± 0.72	
Rivaroxaban	Control		26.27 ± 0.61	15.03 ± 0.28	47.40 ± 0.67	15.80 ± 0.36
	Single		26.97 ± 0.27*	15.57 ± 0.19*	51.48 ± 0.58**	15.22 ± 0.21*
	Combined with GBE	125	27.02 ± 0.54	15.62 ± 0.31	51.17 ± 0.70	16.66 ± 0.71#
		250	26.80 ± 0.34	15.43 ± 0.26	50.02 ± 0.51	20.63 ± 0.66##
		500	26.62 ± 0.40	15.48 ± 0.19	51.25 ± 0.97	22.59 ± 1.12##
Apixaban	Control		26.43 ± 0.72	15.95 ± 0.24	34.17 ± 0.28	15.80 ± 0.36
	Single		27.32 ± 0.50*	16.42 ± 0.26*	39.18 ± 0.38**	15.27 ± 0.37*
	Combined with GBE	125	27.20 ± 0.40	16.18 ± 0.34	38.82 ± 0.23	16.66 ± 0.77#
		250	26.83 ± 0.32	16.63 ± 0.46	38.88 ± 0.29	18.68 ± 0.24#
		500	26.75 ± 0.23#	16.43 ± 0.23	39.03 ± 0.22	20.22 ± 0.66##
Edoxaban	Control		26.43 ± 0.72	15.95 ± 0.24	34.17 ± 0.28	15.80 ± 0.36
	Single		27.33 ± 0.39*	17.95 ± 0.26**	37.87 ± 0.45**	15.00 ± 0.53*
	Combined with GBE	125	27.00 ± 0.15	18.07 ± 0.37	37.52 ± 0.53	18.29 ± 0.58##
		250	26.87 ± 0.31#	17.93 ± 0.26	37.78 ± 0.40	18.97 ± 0.55##
		500	25.82 ± 0.28##	18.03 ± 0.24	37.95 ± 0.37	22.29 ± 0.35##

*P < 0. 05，**P < 0. 01 *vs* control group; #P < 0. 05，##P < 0. 01 *vs* NOAC single drug group (125 ng/mL)

血酶的生成，这原本应该造成PT和APTT的缩短，可能GBE增强的FXa活性不足以造成PT和APTT的显著缩短，又或者GBE具有其他抗凝活性，如对蛋白C、蛋白S或抗凝血酶有促进作用，从而抵消了其增强FXa活性的作用。

本研究表明FXa活性随Xa因子抑制剂浓度增大而降低，在低浓度范围内（0~250 ng/mL）具有较好的线性相关性，这和相关文献的结论是一致的[14-17]，本研究发现GBE具有增强FXa活性的作用，这在中外文献中还未有相关的报道。本研究结果显示Xa因子抑制剂联合GBE后随GBE浓度增大而缩短TT，但只在高浓度（500 μg/mL）GBE下缩短的TT具有统计学差异，这可能与高浓度GBE显著增强FXa活性有关。而达比加群联合GBE后随GBE浓度增大而显著延长TT，这可能与达比加群是凝血酶的直接、强效的抑制剂有关，虽然GBE能增强FXa活性，加速凝血酶的生成，但生成的凝血酶被达比加群所抑制，使GBE增强FXa活性的作用失效，而GBE可能的抗凝活性发挥作用，协同达比加群使TT延长。

本研究与临床研究存在一定差异，首先本研究使用的是大鼠血浆，而凝血系统中的许多关键蛋白如活化凝血酶C和蛋白S的抗凝血活性具有物种特异性[18-19]，所以使用大鼠血浆和人体血浆在实验结果上可能存在差异；再者临床疗程一般为一个月，药物在体内经过较长时间的吸收代谢过程，对机体造成了一定的影响，而本研究只是在血浆中加入一定量的药物，这和复杂的体内药代动力学过程有较大的差异；最后，服药者的个体差异和健康状况或许也是影响实验结果的一个重要因素。因此GBE及其联合NOACs后对凝血系统的影响需在体内实验及临床试验中进一步研究。

本研究使用凝血指标TT、PT、APTT和FXa活性初步评估GBE对NOACs药效学的影响。实验结果提示GBE可能协同达比加群的抗凝作用；而GBE可能拮抗Xa因子抑制剂（阿哌沙班、利伐沙班和依度沙班）的抗凝作用，原因可能是GBE具有增强FXa活性的作用。后续将在大鼠体内及人体血浆中进一步验证，并进行GBE对NOACs药代动力学研究，以明确GBE对NOACs药物相互作用，以期为临床联合使用GBE和NOACs的安全性和有效性提供理论参考。

参 考 文 献

[1] Steffel J, Verhamme P, Potpara TS, *et al*. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation[J]. *Eur Heart J*, 2018, **39**(16): 1330-1393.

[2] Tran HA, Gibbs H, Merriman E, *et al*. New guidelines from the Thrombosis and Haemostasis Society of Australia and New Zealand for the diagnosis and management of venous thromboembolism[J]. *Med J Aust*, 2019, **210**(5): 227-235.

[3] Saar JA, Maack C, European Society of Cardiology. Diagnosis and management of acute pulmonary embolism. ESC guidelines 2014[J]. *Herz*, 2015, **40**(8): 1048-1054.

[4] Wang GX, Cao FL, Chen J. Progress in researches on the pharmaceutical mechanism and clinical application of *Ginkgo Biloba* extract on various kinds of diseases[J]. *Chin J Integr Med*, 2006, **12**(3): 234-239.

[5] Tian JF, Liu Y, Chen KJ. *Ginkgo biloba* extract in vascular protection: molecular mechanisms and clinical applications[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, **15**(6): 532-548.

[6] Li JY, Fang J, Zhong FY, *et al*. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of dabigatran etexilate, intermediate metabolite and dabigatran in 50 μL rat plasma and its application to pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, **973C**: 110-119.

[7] Gai SC, Huang AL, Feng T, *et al*. LC-MS/MS method for simultaneous determination of rivaroxaban and metformin in rat plasma: application to pharmacokinetic interaction study[J]. *Bioanalysis*, 2019, **11**(24): 2269-2281.

[8] He K, Luettgen JM, Zhang DL, *et al*. Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban, a potent and selective factor Xa inhibitor[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, **36**(3): 129-139.

[9] Ude C, Schubert-Zsilavecz M, Wurglics M. *Ginkgo biloba* extracts: a review of the pharmacokinetics of the active ingredients[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2013, **52**(9): 727-749.

[10] Chen TR, Wei LH, Guan XQ, *et al*. Biflavones from *Ginkgo biloba* as inhibitors of human thrombin[J]. *Bioorg Chem*, 2019, **92**: 103199.

[11] Hirsch GE, Viecili PRN, de Almeida AS, *et al*. Natural products with antiplatelet action[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, **23**(8): 1228-1246.

[12] Diamond BJ, Bailey MR. *Ginkgo biloba*: indications, mechanisms, and safety[J]. *Psychiatr Clin North Am*, 2013, **36**(1): 73-83.

[13] Peng YR, Jiang J, Shen H, *et al*. Pharmacodynamic study of *Ginkgo leaf* extract on promoting blood circulation[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2003, **34**(6): 77-79.

[14] Parasrampuria DA, Truitt KE. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of edoxaban, a non-vitamin K antagonist oral anticoagulant that inhibits clotting factor xa[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2016, **55**(6): 641-655.

[15] Gouin-Thibault I, Flaujac C, Delavenne X, *et al*. Assessment of apixaban plasma levels by laboratory tests: suitability of three anti-Xa assays. A multicentre French GEHT study[J]. *Thromb Haemost*, 2014, **111**(2): 240-248.

[16] Bookstaver DA, Sparks K, Pybus BS, *et al*. Comparison of anti-Xa activity in patients receiving apixaban or rivaroxaban[J]. *Ann Pharmacother*, 2018, **52**(3): 251-256.

[17] Wolzt M, Samama MM, Kapiotis S, *et al*. Effect of edoxaban on markers of coagulation in venous and shed blood compared with fondaparinux[J]. *Thromb Haemost*, 2011, **105**(6): 1080-1090.

[18] Katsuura Y, Mochizuki T, Tamura M, *et al*. Species specificity of anticoagulant activity of activated human protein C: involvement of factor V as well as protein S[J]. *Thromb Res*, 1996, **82**(2): 147-157.

[19] Fernández JA, Heeb MJ, Xu X, *et al*. Species-specific anticoagulant and mitogenic activities of murine protein S[J]. *Haematologica*, 2009, **94**(12): 1721-1731.

β-榄香烯对血管内皮细胞功能紊乱和血管平滑肌细胞异常增殖的影响

段兰兰[1,2],董 菁[1,2],范香成[1,2],朱俊艺[1,2],张逸凡[1,2],韩吉春[1,2],尚 靖[1,2,3*]

([1]中国药科大学中药学院,南京 211198;[2]中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室,南京 211198;[3]中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室,南京 210009)

摘 要 研究β-榄香烯是否能改善低剪切力(LSS)诱导的血管内皮细胞功能紊乱和氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移。分别采用平行板流动腔和ox-LDL建立血管内皮细胞(ECs)功能紊乱模型和血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和迁移模型,并检测β-榄香烯对ECs功能紊乱和VSMCs增殖迁移的影响。DHE法检测ECs中ROS的活性,DAF-FM DA法检测ECs中NO的活性。Western blot法检测ECs中Akt和ERK的蛋白磷酸化水平。MTT法检测VSMCs的增殖。细胞划痕实验和Transwell实验检测VSMCs的迁移。RT-qPCR法检测VSMCs中MMP-2和MMP-9的基因表达。在ECs中,β-榄香烯可以显著降低LSS诱导的ROS的升高,显著升高LSS诱导的NO的降低,并且降低ERK的磷酸化,并升高Akt的磷酸化。在VSMCs中,β-榄香烯可以显著降低ox-LDL诱导的VSMCs的增殖和迁移,降低MMP-2和MMP-9的基因表达。β-榄香烯可以改善LSS诱导的ECs功能紊乱和ox-LDL诱导的VSMCs增殖和迁移。

关键词 β-榄香烯;血管内皮细胞功能紊乱;血管平滑肌细胞;增殖;迁移

中图分类号 R966 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0333-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200311

引用本文 段兰兰,董菁,范香成,等.β-榄香烯对血管内皮细胞功能紊乱和血管平滑肌细胞异常增殖的影响[J].中国药科大学学报,2020,51(3):333-339.

Cite this article as: DUAN Lanlan, DONG Jing, FAN Xiangcheng, *et al*. β-Elemene improves endothelial cells dysfunction, and abnormal proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 333-339.

β-Elemene improves endothelial cells dysfunction, and abnormal proliferation and migration of vascular smooth muscle cells

DUAN Lanlan[1,2], DONG Jing[1,2], FAN Xiangcheng[1,2], ZHU Junyi[1,2], ZHANG Yifan[1,2], HAN Jichun[1,2], SHANG Jing[1,2,3*]

[1]School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; [2]Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211198; [3]State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study aimed to investigate whether β-elemene could improve the dysfunction of vascular endothelial cells induced by low shear force (LSS), and the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). Parallel plate flow chambers and ox-LDL were used to establish vascular endothelial cells (ECs) dysfunction model and vascular smooth muscle cell (VSMCs) proliferation and migration model, respectively, and the effects of β-elemene on ECs dysfunction and VSMCs proliferation and migration were examined. The activity of ROS in ECs was measured by DHE and the activity of NO in ECs was tested by DAF-FM DA. The protein phosphorylation of Akt and ERK in ECs were detected by Western blot. The proliferation of VSMCs was measured by MTT. The migration of VSMCs was examined by cell scratch test and Transwell assay. The gene expression of MMP-2 and MMP-9 in VSMCs was measured by RT-qPCR. In ECs, β-elemene could significantly reduce the LSS-induced increase in ROS, significantly increase the

收稿日期 2019-12-04 * **通信作者** Tel:025-86185566 E-mail: shangjing21cn@163.com

LSS-induced decrease in NO, decrease the phosphorylation of ERK, and increase the phosphorylation of Akt. In VSMCs, β-elemene could significantly reduce the proliferation and migration of VSMCs induced by ox-LDL, and reduce the gene expression of MMP-2 and MMP-9. To conclude, β-elemene can improve the LSS-induced ECs dysfunction and ox-LDL-induced VSMCs proliferation and migration.

Key words β-elemene; endothelial cells dysfunction; vascular smooth muscle cells; proliferation; migration

心血管疾病是目前我国引起死亡的主要疾病之一。随着生活水平和生活习惯的改变,我国的心血管疾病发病率也逐年升高,严重威胁着我国人民的健康。动脉粥样硬化是心血管疾病中最为常见的类型之一,也是引发心血管疾病患者死亡的主要原因之一[1]。因此,寻找一种安全、有效、低毒的治疗动脉粥样硬化药物十分必要。

氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)是动脉粥样硬化的独立危险因素,能够促进血管平滑肌细胞(VSMCs)迁移和增殖、促进泡沫细胞和血栓的形成,最后导致了动脉粥样硬化的发生[2-3]。一些临床研究发现,动脉粥样硬化患者的斑块多发生于血管弯曲处内侧或血管分叉处外侧,这一发现说明血流动力学可能也参与了动脉粥样硬化的发生[4]。目前很多研究发现低剪切力(LSS)可以损伤血管内皮细胞(ECs),诱导ECs产生大量的ROS,诱发ECs功能紊乱,促进动脉粥样硬化的发生和发展[5-6]。

β-榄香烯是从姜科植物温郁金中提取的抗肿瘤有效成分,具有很好的抗肿瘤作用[7-8]。本课题组前期的研究发现,β-榄香烯可以减轻高脂饲料诱导的ApoE$^{(-/-)}$小鼠动脉粥样硬化症状[9-10],但是具体的作用机制并不清楚。本研究主要通过建立LSS诱导的ECs功能紊乱和ox-LDL诱导的VSMCs增殖迁移模型,研究β-榄香烯对ECs功能紊乱和VSMCs增殖迁移的影响,为β-榄香烯治疗动脉粥样硬化提供理论基础。

1 材 料

1.1 试 剂

β-榄香烯[含量99%,石药集团远大(大连)制药有限公司];噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司);DMEM培养基、RPMI 1640培养基(美国Gibco公司);Akt抗体、p-Akt抗体、ERK抗体、p-ERK抗体、β-actin抗体、二氢乙锭、3-氨基,4-氨基甲基-2′,7′-二荧光素、二乙酸酯(美国Abcam公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

LEGEND Micro 21R型离心机(美国Thermo Scientific公司);BS210S电子天平(德国Sartorius公司);荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);iCycler iQ5(美国Bio-Rad公司);核酸定量仪(美国Amersham Biosciences公司);Veriti 96逆转录仪器(美国ABI公司);Tanon 5200多倍镜(中国山海塔农科技公司)。

1.3 细 胞

大鼠胸大动脉平滑肌细胞株(A7r5)和人脐静脉内皮细胞株(EA. hy926即ECs)均来源于ATCC公司。

2 方 法

2.1 细胞培养

取生长状态良好的A7r5细胞,使用含10 %胎牛血清、链霉素(100 μg/L)、庆大霉素(100 μg/L)的DMEM培养液(pH 7.5),在37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行各项实验。

取生长状态良好的ECs,使用含10%胎牛血清、链霉素(100 μg/L)、庆大霉素(100 μg/L)的RPMI 1640培养液(pH 7.5),在37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行各项实验。

2.2 剪切力诱导内皮细胞功能紊乱

采用平行板流动腔建立ECs功能紊乱模型,造模方法与文献一致[6],大体操作如下:将ECs爬片贴壁后置于可体外模拟LSS的平行板流动腔中,施加剪切力0.2 Pa于贴壁的细胞,作用30 min即可。

2.3 二氢乙锭法检测ECs中ROS活性

取处于对数生长期的细胞,细胞的密度按照每毫升5×10^5个细胞接种于含有盖玻片的6孔培养板中,于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。将实验分为5组:正常组、模型组和3个不同浓度的β-榄

香烯（0.1、1、10 mg/L）组。正常培养 24 h 后，换用无血清培养基继续培养 12 h，使细胞同步化。给药组分别用含有不同浓度的β-榄香烯（0.1、1、10 mg/L）的无血清培养基预培养 24 h，其余组只用无血清培养基培养相同时间，去除培养液，用 PBS 洗 2 次，加入 DHE 于 37 ℃培养箱中避光孵育 20 min。用 PBS 洗 3 次，并将盖玻片置于荧光显微镜下拍照。

2.4　3-氨基，4-氨基甲基-2′，7′-二荧光素，二乙酸酯法检测 ECs 中 NO 活性

具体细胞给药操作步骤同“2.3”项，用 PBS 洗过后加入 DAF-FM DA 于 37 ℃培养箱中避光孵育 20 min。用 PBS 洗 3 次，并将盖玻片置于荧光显微镜下拍照。

2.5　Western blot 法检测检测 ECs 中 Akt 和 ERK 的蛋白磷酸化水平

具体细胞给药操作步骤同“2.3”项，PBS 洗过后加入蛋白裂解液 50 μL 置于冰上静置 20 min 后用细胞刮刀将细胞刮下并转移至 1.5 mL 离心管内，于离心机内 4 ℃，1 350 r/min，离心 5 min 后收集上清液即为蛋白悬浮液。通过在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上的 SDS-PAGE 分离 ECs 的裂解物，并将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 1 h，然后与一抗（Akt 抗体、p-Akt 抗体、ERK 抗体、p-ERK 抗体、β-actin 抗体）（所有抗体以 1∶1 000 稀释度使用）在 4 ℃下反应 18 h，然后与相应的次级辣根过氧化物酶结合抗体反应（所有抗体以 1∶1 000 稀释）在室温下放置 2 h。利用 ECL 检测系统对蛋白质进行可视化检测。用 Tanon 5200 多倍镜进行光密度分析扫描信号。本文报道的 Western blot 检测结果代表了重复 3 次的结果。

2.6　MTT 法检测不同浓度 ox-LDL 对 A7r5 细胞活力的影响

选取处于对数生长期的 A7r5 细胞，用 0.25% 的胰酶进行消化，按照每毫升 2×10^4~4×10^4 个细胞的密度制成细胞悬液，并将细胞接种于 96 孔板中（每孔 180 μL），置于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h。弃去培养基，用 PBS 清洗 2 次，换上含有不同浓度的 ox-LDL（0，20，40，60，80，100，200 mg/L），置于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h 后，每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL，继续培养 4 h 后，吸弃培养基，加入 DMSO 200 μL，摇床振荡 10 min，用酶标仪测定波长 570 nm 处吸收度，计算细胞活力，以选出 ox-LDL 的适合浓度。

2.7　MTT 法检测β-榄香烯对 A7r5 细胞增殖的影响

按“2.6”项方法筛选出适合浓度的 ox-LDL（80 mg/L）建造 A7r5 细胞增殖迁移模型。将实验分为 5 组：正常组、模型组和 3 个不同浓度的β-榄香烯（0.1、1、10 mg/L）组。通过 MTT 法检测β-榄香烯对 A7r5 细胞增殖的影响，操作步骤与“2.6”项方法一致。

2.8　细胞划痕法检测 A7r5 细胞迁移

选取处于对数生长期的 A7r5 细胞接种于培养皿中，将实验分为 5 组：正常组、模型组和 3 个不同浓度的β-榄香烯（0.1、1、10 mg/L）组。当细胞的生长覆盖面积约 90% 时，在培养皿底部做一直线标记，用无菌枪头沿着标记作划痕，PBS 漂洗后加入含有 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基（含有对应组别的药物）继续培养，并分别在 0 和 24 h 进行拍照，并用 Image-Pro Plus 软件进行分析，以划痕闭合比率来评估细胞迁移程度。

2.9　Transwell 法检测 A7r5 细胞迁移

选取处于对数生长期的 A7r5 细胞，实验前换用无血清的 DMEM 培养基进行饥饿培养 24 h。用胰酶消化细胞，终止消化后离心弃去培养液，用无血清的 DMEM 重悬。取细胞悬液 200 μL 分别加入 5 个 Transwell 小室中，分别标记：正常组、模型组和 3 个不同质量浓度的β-榄香烯（0.1、1、10 mg/L）组，调整细胞密度为每孔 3×10^4 个细胞，下室中β-榄香烯组分别加入含药物血清培养基（质量浓度为 0.1、1、10 mg/L），其余组别只加入血清培养基。正常培养 24 h，将小室取出，弃去小室中的培养液，用 PBS 洗 1～2 遍后倒扣风干。将风干的小室放入已加入 4% 多聚甲醛 600 μL 的孔板中，对小室底部背面穿过的细胞进行固定 30 min。取出固定好的小室，风干后放入结晶紫染液中染色 20 min。将染完色的小室用 PBS 洗 3 遍，然后用棉签擦尽小室内部未迁移的细胞，在倒置显微镜下观察，拍照计数。

2.10　RT-qPCR 法检测 A7r5 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的基因表达

引物设计与合成：MMP-2 引物（上游 5′-GCT TCC AGG GCA CCT CTT ACA-3′；下游 5′-ACC TTC TGA ATT TCC ACC CAC AG-3′）、MMP-9 引物（上游 5′-CCA TGT CAC TTT CCC TTC ACC TT-3′；

下游5′-GCC ATG CTC CGT GTA GAG ATT C-3′),引物由Primer3 software设计与合成。

细胞总RNA的提取:取培养24 h后的正常组、模型组和3个不同质量浓度的β-榄香烯(0.1、1、10 mg/L)组的A7r5细胞,分别制成细胞悬液转移至离心管中离心,弃上清液后按照RNA提取说明书的方法采用Trizol溶液提取细胞总RNA。

RNA的逆转录反应:按照说明书配制RT反应液(5×反转录试剂2 μL,总RNA,用无核酸酶水补足至10 μL),置于逆转录仪中反转录成cDNA。

荧光定量PCR检测:以上述反转录cDNA为模板,应用荧光定量PCR检测细胞中MMP-2和MMP-9的基因表达。25 μL反应体系:SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 12.5 μL,上下游引物各1 μL,模板2 μL,灭菌双蒸水补足至25 μL。扩增条件为预变性95 ℃ 30 s,变性95 ℃ 5 s,退火60 ℃ 30 s,以上两步扩增循环。每个循环结束后收集荧光信号,反应结束后确认扩增曲线和融解曲线。

2.11 数据处理和统计学分析

统计学处理应用SPSS 10.0软件进行统计学处理,Origin 8.0处理图片,数据采用$\bar{x} \pm s$表示,组间比较采用t检验,多组均数比较采用方差分析,当$P<0.05$时,则表示具有显著性差异。

3 结 果

3.1 β-榄香烯改善LSS诱导的ECs功能紊乱

通过检测ECs中ROS和NO的活性来评估β-榄香烯对LSS诱导的ECs功能紊乱的改善作用。结果如图1所示,ECs经过30 min的LSS处理后,ROS的活性显著升高,而NO的活性却显著性降低。β-榄香烯治疗可以显著降低LSS诱导的ROS升高,升高LSS诱导的NO降低,并具有一定的剂量依赖性。这些结果均表明,β-榄香烯可以改善LSS诱导的ECs功能紊乱。

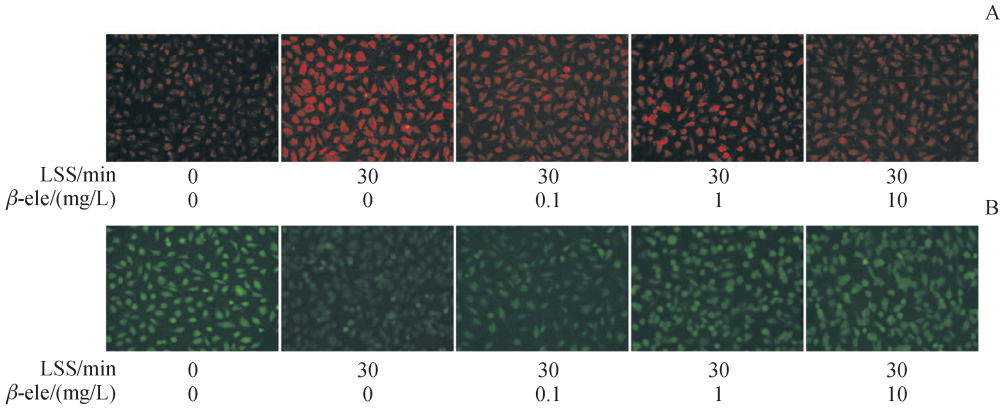


Figure 1 Effects of β-elemene (β-ele) on ROS and NO activities in endothelial cells (ECs) induced by low shear stress (LSS) (×100, $\bar{x} \pm s$, n=3)
A: Inhibitory effect of different concentrations of β-elemene on NO activity in ECs induced by LSS; B: Promoting effect of different concentrations of β-elemene on ROS activity in ECs induced by LSS

3.2 β-榄香烯对ECs中Akt和ERK的蛋白磷酸化水平的影响

通过Western blot法检测检测ECs中Akt和ERK的蛋白磷酸化水平的变化。结果如图2所示,在ECs中,β-榄香烯可以显著降低LSS所诱导的ERK的磷酸化升高,并可以显著升高LSS所诱导的Akt的磷酸化降低。

3.3 β-榄香烯抑制ox-LDL诱导的A7r5细胞增殖

为了确定适合浓度的ox-LDL建造VSMCs增殖迁移模型,本研究使用MTT法检测了不同浓度的ox-LDL对A7r5细胞增殖和迁移的影响。结果如图3-A所示,80 mg/L ox-LDL可以显著增加A7r5细胞发生增殖。因此,本研究选择了80 mg/L的ox-LDL建造VSMCs增殖迁移模型。使用MTT法检测β-榄香烯对ox-LDL诱导的A7r5细胞增殖的影响。结果发现,β-榄香烯可以显著降低ox-LDL诱导的A7r5细胞增殖,并具有一定的剂量依赖性(图3-B)。

3.4 β-榄香烯抑制ox-LDL诱导的A7r5细胞迁移

通过细胞划痕实验和Transwell法检测A7r5细胞迁移。结果如图4所示,ox-LDL可以诱导A7r5细胞发生明显的迁移现象,β-榄香烯治疗可以显著抑制ox-LDL诱导的A7r5细胞迁移,并具有一定的剂量依赖性。

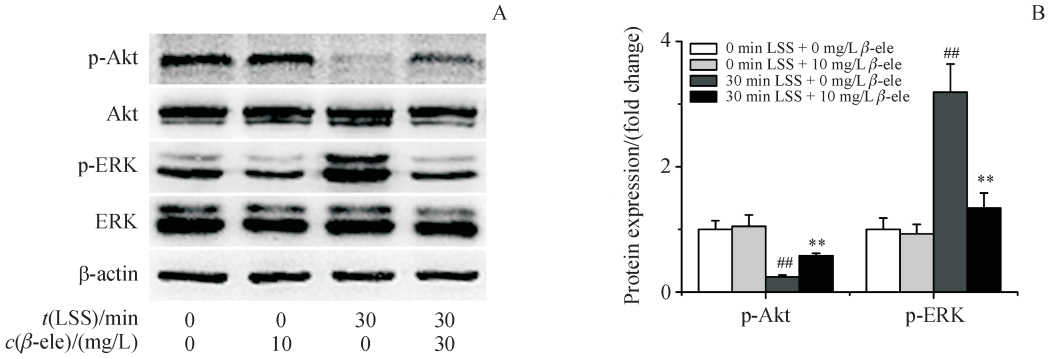


Figure 2　Effects of β-elemene on protein phosphorylation levels of Akt and ERK ($\bar{x} \pm s$, n=3)

A: Effect of β-elemene on the protein phosphorylation level of Akt and ERK in ECs induced by LSS; B: Gray-scale scanning of the protein phosphorylation level of Akt and ERK in ECs. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* 0 min LSS + 0 mg/L β-ele; $^{**}P < 0.01$ *vs* 30 min LSS + 0 mg/L β-ele

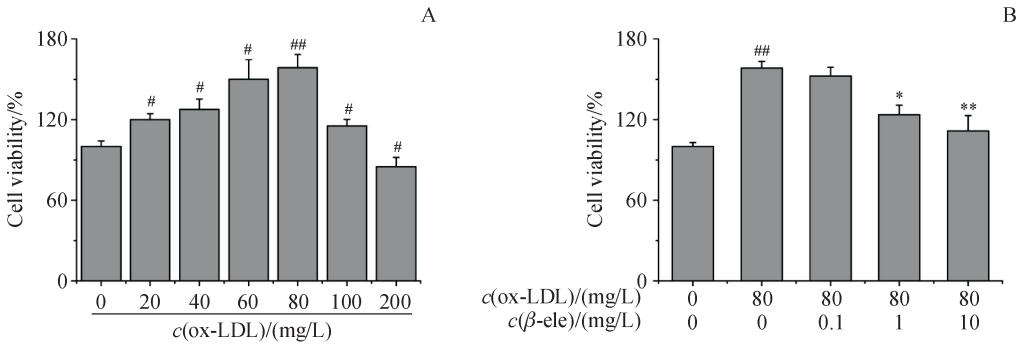


Figure 3　β-elemene inhibits the proliferation of A7r5 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, n=3)

A: Vability of A7r5 cells upon exposure to different concentrations of ox-LDL for 24 h; B: β-elemene inhibits the proliferation of A7r5 cells induced by ox-LDL at 80 mg/L. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* treatment with 0 mg/L ox-LDL; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* treatment with 80 mg/L ox-LDL

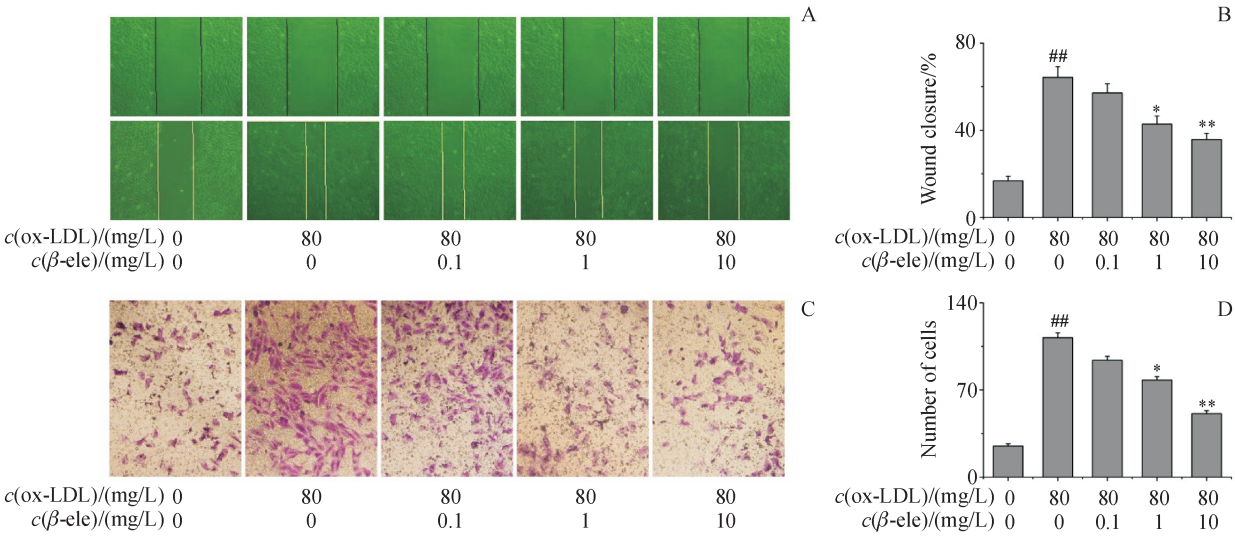


Figure 4　β-elemene inhibits A7r5 cell migration induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, n=3)

A: A7r5 cell migration was assessed by wound healing assay; B: Quantitative data as the percentage of A7r5 cell migrating into the wound with respect to the cell-free area at the time 0 h; C: Transwell assay was performed to determine the migration of A7r5 cell; D: Quantitative data of A7r5 cell migration. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* treatment with 0 mg/L ox-LDL; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* treatment with 80 mg/L ox-LDL

3.5 β-榄香烯对MMP-2和MMP-9基因表达的影响

为了进一步研究β-榄香烯对ox-LDL诱导的A7r5细胞迁移影响,本研究使用RT-qPCR法检测了β-榄香烯对迁移相关的基因(主要是MMP-2和MMP-9)表达影响。结果如图5所示,ox-LDL显著升高A7r5细胞中MMP-2和MMP-9的基因表达。β-榄香烯治疗可以显著降低MMP-2和MMP-9的基因表达,并具有一定的剂量依赖性。

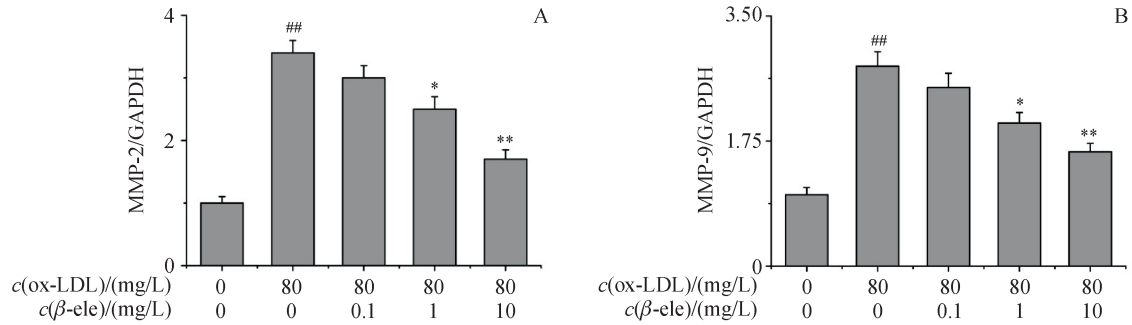


Figure 5 Effects of β-elemene on the mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

A: β-elemene significantly reduced MMP-2 gene expression in A7r5 cells induced by ox-LDL; B: β-elemene significantly reduced MMP-9 gene expression in A7r5 cells induced by ox-LDL. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* treatment with 0 mg/L ox-LDL; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* treatment with 80 mg/L ox-LDL

4 讨 论

剪切力是指血液流动时与血管壁内膜面的摩擦力,目前研究已经证实了剪切力参与了动脉粥样硬化的发生[11]。病理研究证实,动脉粥样硬化病变发生的部位为低剪切力处[12]。大量的体内体外的实验研究也发现,低剪切力会诱导ERK磷酸化和Akt去磷酸化,使血管内皮细胞的ROS活性升高和NO活性降低,从而造成内皮细胞功能紊乱,最终促进了动脉粥样硬化的发生[13]。本研究采用平行板流动腔在体外模拟低剪切力诱导血管内皮细胞功能紊乱模型。结果发现,低剪切力确实可以诱导ECs的ROS活性升高和NO活性降低,以及诱导ERK磷酸化的升高,Akt的磷酸化的降低。β-榄香烯治疗可以显著降低ROS活性,并升高NO活性;降低ERK的磷酸化,并升高Akt的磷酸化。这一结果说明,β-榄香烯可以改善低剪切力诱导的内皮细胞功能紊乱。

血管平滑肌细胞增殖和迁移也在动脉粥样硬化发病中起着重要的作用[14-15]。Ox-LDL过量时,它携带的胆固醇堆积在动脉壁上形成了斑块,引起动脉粥样硬化的发生[16-17]。本研究使用ox-LDL诱导血管平滑肌细胞[18]增殖和迁移模型,并检测β-榄香烯对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响。结果发现,ox-LDL可以诱导血管平滑肌细胞发生显著的迁移和增殖现象,通过β-榄香烯治疗可以显著抑制ox-LDL诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移。本研究也对与血管平滑肌细胞增殖和迁移相关的基因(MMP-2和MMP-9)进行检测,结果发现,ox-LDL可以显著升高血管平滑肌细胞中MMP-2和MMP-9的基因表达,而β-榄香烯可以显著抑制MMP-2和MMP-9的基因表达。这一结果说明,β-榄香烯可以抑制ox-LDL诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移。

总之,β-榄香烯可以改善LSS诱导的内皮细胞功能紊乱和ox-LDL诱导的血管平滑肌细胞增殖与迁移。这些结果表明,β-榄香烯的抗动脉粥样硬化作用可能与其在内皮细胞和血管平滑肌细胞上的作用相关。

参 考 文 献

[1] Yang XL, Li JX, Hu DS, *et al*. Predicting the 10-year risks of atherosclerotic cardiovascular disease in Chinese population: the China-*Par* project (prediction for ASCVD risk in China)[J]. *Circulation*, 2016, **134**(19): 1430-1440.

[2] Wu JH, Li YN, Zhou YF, *et al*. Semaphorin-3E attenuates neointimal formation via suppressing VSMCs migration and proliferation[J]. *Cardiovasc Res*, 2017, **113**(14): 1763-1775.

[3] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Acta Med Indones*, 2007, **39**(2): 86-93.

[4] Liu QY, Chen M. Research progress on role of shear stress in carotid atherosclerosis[J]. *Oncoradiology*(肿瘤影像学), 2014, **23**(1): 68-72.

[5] Mahmoud MM, Kim HR, Xing RY, *et al*. TWIST1 integrates endothelial responses to flow in vascular dysfunction and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, **119**(3): 450-462.

[6] Chao YL, Ye P, Zhu LL, *et al*. Low shear stress induces endothelial reactive oxygen species via the AT1R/*Enos*/NO pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, **233**(2): 1384-1395.

[7] Guo TT, Huang WP, Hu CX, *et al*. Effects of β-elemene on invasion and migration of human breast cancer cells[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中国药理与临床), 2018, **34**(1): 76-80.

[8] Jiang S, Yu G, Feng XL. Advances in antitumor status and mechanism of elemene[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*(辽宁中医药大学学报), 2018, **20**(4): 218-221.

[9] Liu M, Chen XT, Ma J, *et al*. B-Elemene attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via restoring NO levels and alleviating oxidative stress[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2017, **95**: 1789-1798.

[10] Liu M, Mao LF, Daoud A, *et al*. B-elemene inhibits monocyte-endothelial cells interactions via reactive oxygen species/MAPK/NF-κB signaling pathway *in vitro*[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, **766**: 37-45.

[11] Kumar S, Williams D, Sur S, *et al*. Role of flow-sensitive microRNAs and long noncoding RNAs in vascular dysfunction and atherosclerosis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, **114**: 76-92.

[12] Gao WH, Cui HB. Correlation between distribution of coronary lesions and low shear stress[J]. *Med Recapitul*(医学综述), 2013, **19**(21): 3871-3874.

[13] Wu LY, Wang GX, Tang ST, *et al*. Protection of endothelial cells, inhibition of neointimal hyperplasia by β-elemene in an injured artery [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, **25**(3): 233-242.

[14] Schlosser A, Pilecki B, Hemstra LE, *et al*. MFAP4 promotes vascular smooth muscle migration, proliferation and accelerates neointima formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, **36**(1): 122-133.

[15] Li WF, Zhi WB, Zhao JM, *et al*. Cinnamaldehyde protects VSMCs against ox-LDL-induced proliferation and migration through S arrest and inhibition of p38, JNK/MAPKs and NF-κB [J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, **108**: 57-66.

[16] Chen XZ, Yuan YH, Wang Q, *et al*. Post-translational modification of adiponectin affects lipid accumulation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, **43**(1): 172-181.

[17] Li WF, Zhi WB, Liu F, *et al*. Atractylenolide I restores HO-1 expression and inhibits Ox-LDL-induced VSMCs proliferation, migration and inflammatory responses *in vitro*[J]. *Exp Cell Res*, 2017, **353**(1): 26-34.

[18] Li JX, Luo W, Wang JY, *et al*. Influence of puerarin on endogenous NOS inhibitor of human umbilical vein endothelial cells cultured with oxidized low density lipoprotein [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2004, **35**(4): 353-356.

中国药科大学学报
Journal of China Pharmaceutical University 2020,51(3):340 – 348

断裂内含肽C片段在大肠埃希菌表达系统中酶解稳定性的改良

陈 浩,曹 津,张 静,朱建伟,陈俊升*

(上海交通大学药学院,细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心,上海 200240)

摘 要 断裂内含肽*Npu* DnaE介导的蛋白质剪接、剪切反应,可以应用于蛋白质工程领域诸多方面,但其C段重组蛋白在表达纯化过程中发生的降解,降低了重组蛋白的产率和纯度。为提高*Npu*C段稳定性,本研究构建了N端融合*Npu*N2片段的*Npu*C延长变体N2C。将N2C在BL21(DE3)中进行表达、用亲和色谱进行纯化,用ImageJ扫描计算表达纯化中降解情况,进而对影响内含肽C端剪切反应的各因素如温度、DTT浓度、N/C比例等进行了考察。结果表明,延长变体N2C使降解产物占比降低至2.7%~7.2%,在1 mmol/L DTT催化,N/C比例为5∶1,37 ℃反应条件下,30 min产物生成率达90%。N2C在提升*Npu* DnaE内含肽C段在大肠埃希菌表达系统中表达、纯化过程的稳定性的同时,保留了其C端剪切反应的活性,对其在蛋白纯化领域应用有重要意义。

关键词 *Npu* DnaE;C端剪切;蛋白质稳定性;蛋白质降解

中图分类号 Q816 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0340-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200312

引用本文 陈浩,曹津,张静,等.断裂内含肽C片段在大肠埃希菌表达系统中酶解稳定性的改良[J].中国药科大学学报,2020,51(3):340-348.

Cite this article as: CHEN Hao, CAO Jin, ZHANG Jing, *et al*. Improving proteolytic stability of *Npu* DnaE C-fragment in *Escherichia coli* expression system[J].*J China Pharm Univ*,2020,51(3):340-348.

Improving proteolytic stability of *Npu* DnaE C-fragment in *Escherichia coli* expression system

CHEN Hao, CAO Jin, ZHANG Jing, ZHU Jianwei, CHEN Junsheng*

Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody (MOE), School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract Naturally split *Npu* DnaE intein can mediate rapid trans-splicing and C-cleavage, which is of great use in many aspects of protein engineering. However, the degradation of *Npu*C during expression and purification reduces the yield and purity of recombinant protein. N2C, an extended *Npu*N2-containing N-terminal *Npu*C fragment, was constructed to improve *Npu*C stability. N2C was expressed in BL21(DE3) and purified by affinity chromatography. The degradation ratio was calculated by ImageJ, and the factors affecting the C-terminal cleavage reaction of intein, such as temperature, DTT concentration and N/C ratio, were also investigated. The results showed that N2C lowered the proportion of degradation to 2.7%-7.2% and the yield of C-terminal cleavage reached 90% in 30 min at 37 °C with an N/C ratio of 5∶1 catalyzed by 1 mmol/L DTT. N2C can not only improve the stability of *Npu*C in Escherichia coli expression system, but also retain the activity of C-terminal cleavage reaction, which is of great significance for its application in protein purification.

Key words *Npu* DnaE; C-terminal cleavage; protein stability; protein degradation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773621)

收稿日期 2020-02-22 * **通信作者** Tel: 021-34204631 E-mail: js.chan@sjtu.edu.cn
基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81773621)

断裂型内含肽能够自发催化蛋白质剪接反应，相比连续型内含肽，它具有抑制不可控的提前剪接和剪切的天然优势，常被用于蛋白质纯化、蛋白质连接、毒素蛋白的生产等领域[1-3]。

Npu DnaE 是一种来源于念珠藻（*Nostoc punctiforme*，*Npu*）的断裂型内含肽，具有高效、快速的蛋白质反式剪接活性[4-5]，Ramirez 等[6]在 *Npu* DnaE 中引入 D118G 突变，获得了巯基化合物依赖性的 C 端剪切突变体，Guan 等[7]在此基础上开发了快速蛋白纯化系统（SIRP），展现出了 *Npu* DnaE 内含肽在蛋白质标签纯化领域的巨大应用潜力。但有文献报道，*Npu*C 段融合蛋白在表达纯化过程中会发生降解[7-8]，本课题组前期工作中也发现了 *Npu*C 融合蛋白的不同程度降解。这一缺陷将影响前体蛋白收率和产物纯度，进而增加了目的蛋白特别是药用重组蛋白的生产成本。因此，提升 *Npu*C 段在表达、纯化过程中的稳定性，就显得尤为重要。

研究人员发现，断裂内含肽 *Npu* DnaE 的 N 段（1-102 aa）和 C 段（103-137 aa）的识别、结合、折叠依赖于两者之间的静电作用和疏水作用[8-10]：*Npu*C 携带碱性氨基酸，整体片段带有正电，处于无序状态；*Npu*N 由 *Npu*N1（1-50 aa）和 *Npu*N2（51-102 aa）两个区域组成，其中 *Npu*N1 主要由疏水性氨基酸组成，处于折叠状态，而 *Npu*N2 集中了大部分的酸性氨基酸残基，带有负电，处于无序状态。在 *Npu*N 和 *Npu*C 的重构过程中，*Npu*N2 先与 *Npu*C 通过静电作用结合、部分折叠，随后与 *Npu*N1 通过疏水作用进一步折叠形成活性构象。他们在研究中还发现 *Npu*C 段的无序状态，可能是造成其对蛋白酶不稳定的原因。因此，推测使 *Npu*C 段在翻译后形成部分折叠，将可能减少降解的产生。

本研究从 *Npu*N 和 *Npu*C 重构机制出发，构建 N 端融合 *Npu*N2 片段的 *Npu*C 延长变体 N2C，技术路线如图 1 所示，以麦芽糖结合蛋白（maltose binding protein，MBP）为 *Npu*C 端外显肽，研究此延长的 *Npu*C 变体在原核表达系统中对 *Npu*C 片段的酶解稳定性的提升作用，并探讨延长变体对内含肽 C 端剪切反应活性的影响。

1　材　料

1.1　试　剂

PCR 所用 DNA 聚合酶、连接酶和限制性内切酶均购自宝生物工程（大连）有限公司；质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和 PCR 清洁试剂盒均购自康宁生命科学（吴江）有限公司；ECL 发光显色液购自苏州新赛美生物科技有限公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）和二硫苏糖醇（DTT）购自美国 Sigma 公司；抗 MBP 一抗（鼠源）、抗 His 一抗（鼠源）、和羊抗鼠二抗均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；引物合成及 DNA 测序服务由生工生物工程（上海）股份有限公司提供；其他试剂均为市售分析纯。

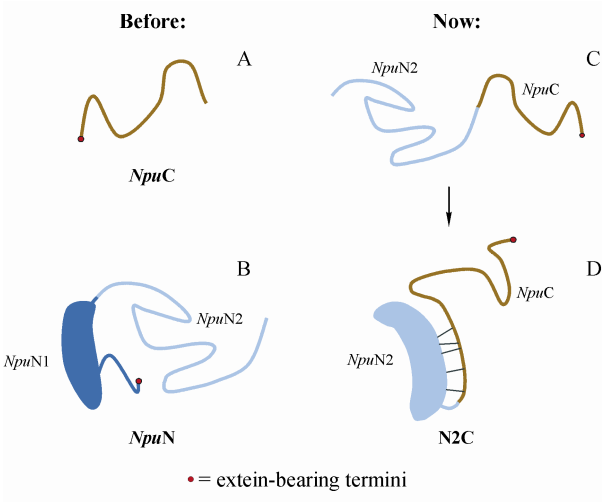


Figure 1　Illustration of the "*Npu*N2 extended *Npu*C". The reconstitution of *Npu* DnaE follows the "Capture and Collapse" mechanism. *Npu*C is highly basic, and is disordered, which makes it sensitive to proteolytic degradation (A); *Npu*N is comprised of two different lobes, *Npu*N1 (residues 1-50) is partially folded while *Npu*N2 (residues 51-102) is acidic and disordered (B). *Npu*C preferentially binds to *Npu*N2 through the electrostatic interaction to form a compacted intermediate[8]. When N-terminally fused with *Npu*N2 (C), *Npu*C would readily to form the compacted *Npu*N2-*Npu*C intermediates, which would confer *Npu*C with improved resistance to proteolytic degradation (D)

1.2　仪　器

DNA 凝胶电泳仪和凝胶成像分析系统（上海 Tanon 科技有限公司）；蛋白凝胶电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；LRH-70F 型生化培养箱（上海天呈仪器制造有限公司）；镍柱亲和色谱填料（通用电气（中国）医疗集团生命科学部）；Dextrin Beads 6FF 填料（常州天地人和生物科技有限公司）。

1.3　菌株和质粒

大肠埃希菌 DH5α 和大肠埃希菌 BL21（DE3）购自苏州新赛美生物科技有限公司；包含 MBP 的

质粒pET30a/MBP、包含*Npu* DnaE断裂内含肽的质粒pET28a/*Npu*、包含硫氧还蛋白(Trx)标签的质粒pET32a/野生型,均为本实验室保藏。

2 方 法

2.1 重组表达质粒的构建

本研究使用MBP作为*Npu*C端外显肽,将*Npu*C段内含肽与之融合后在原核表达系统中进行诱导表达。表达质粒的名称、抗性、目的基因片段的理论相对分子质量等信息见表1,本实验中用到的引物信息见表2。

本研究中构建的质粒均以基本的分子生物学实验手段,以酶切连接的方法进行构建。以下以pET30a/N2C-MBP重组表达质粒的构建为例进行说明。

以上游引物*Npu*N2-F,含有限制性酶切位点*Nde* I,下游引物*Npu*C-MBP-R,以pET28a/*Npu*质粒为模板扩增N2C片段。PCR条件为:98 ℃变性10 s,55 ℃退火5 s,72 ℃延伸10 s,35个循环后,72 ℃终延伸5 min。PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收待用。同样的PCR方法以pET30a/MBP质粒为模板,*Npu*C-MBP-F和MBP-R为引物扩增MBP片段。

通过重叠PCR连接N2C片段和MBP片段,以*Npu*N2-F为上游引物,MBP-R为下游引物,以回收的N2C片段和MBP片段DNA为模版,重叠PCR扩增N2C-MBP片段,PCR程序同N2C片段的扩增。琼脂糖凝胶电泳分离得到的N2C-MBP连接片段,用*Nde* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ双酶切后,连入经过*Nde* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ双切的pET30a质粒中,将连接产物转化入大肠埃希菌DH5α感受态中,挑取单克隆提取质粒并送测序。

表1中所列其他重组表达质粒均以酶切连接方式构建,目的基因DNA片段使用对应引物进行扩增。

Table 1 Resistance, insert gene length and restriction enzymes of the recombinant plasmids constructed in this study

Plasmid name	Resistance	Insert gene length/bp	Restriction enzymes
pET 28a/6×His-*Npu*N1	Kan	222	*Nde* I, *Hind* III
pET 30a/*Npu*N-6×His	Kan	336	*Nde* I, *Xho* I
pET 30a/Trx-*Npu*C-MBP	Kan	1 587	*Nde* I, *Kpn* I
pET 30a/N2C-MBP	Kan	1 407	*Nde* I, *Kpn* I
pET 30a/Trx-N2C-MBP	Kan	1 773	*Nde* I, *Kpn* I
pET 30a/Trx-MBP	Kan	1 461	*Nde* I, *Kpn* I

2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

2.2.1 重组蛋白的诱导表达 将以上所得重组表达质粒分别转化入大肠埃希菌BL 21(DE3)中得到相应重组蛋白表达菌株。挑取单克隆菌落分别接种至含有对应抗性的LB培养基中,在37 ℃,220 r/min摇床培养9 h后,将获得的种子菌液按1∶100接种量接种至LB培养基500 mL中继续培养,当A_{600}达到0.6时,加入IPTG至终浓度1 mmol/L,过夜诱导培养(25 ℃,180 r/min)。重组蛋白的相对分子质量、等电点等信息如表3所示。

2.2.2 重组蛋白的亲和纯化 过夜诱导表达的培养液经4 ℃,5 000 r/min离心15 min,收集菌体,用上样缓冲液(20 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,20 mmol/L咪唑)将沉淀菌体重悬分散,用高压均质机加压至900 bar(1 bar = 0.1 MPa),4 ℃破菌5 min后,减压收集破裂菌液。然后转移至离心机内,4 ℃,12 000 r/min离心30 min,收集上清液并用0.45 μm滤膜过滤后,上样于镍亲和色谱柱,用上样缓冲液和2 mol/L咪唑母液配置不同浓度的缓冲液进行梯度洗脱。收集纯化过程中的流穿及各洗脱浓度下收集的样品,进行SDS-PAGE电泳检测。

对于*Npu*C段重组蛋白,先经过上述镍柱亲和纯化步骤纯化,收集200 mmol/L咪唑洗脱液,用Dextrin Beads 6FF(MBP标签亲和重力柱)纯化,使用洗脱液(20 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,10 mmol/L麦芽糖,pH 8.5)洗脱。收集纯化过程中的流穿及洗脱样品,进行SDS-PAGE电泳检测。

2.3 N2C的C端剪切反应

2.3.1 Western blot和SDS-PAGE检测N2C的C端

Table 2　Sequence and restriction enzyme of the primers used to construct recombinant plasmids

Primer name	Sequence	Restriction enzyme
*Npu*N-F	5′-ATA*CATATG*GCATTAAGCTATGAAACG-3′	*Nde* I
*Npu*N-R	5′-GTG*CTCGAG*ATTCGGCAAATTATCAAC-3′	*Xho* I
*Npu*N1-R	5′-CGC*AAGCTT*TCAGCGATCGTGCCATTG-3′	*Hind* III
Trx-F	5′-ATA*CATATG*AGCGATAAAATTATTCAC-3′	*Nde* I
Trx-*Npu*C-R	5′-TGTGGCTATTTTGATCATAGAACCAGAACCGGCCAGGTTAGCGTC-3′	–
Trx-*Npu*C-F	5′-GACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTATGATCAAAATAGCCACA-3′	–
*Npu*C-MBP-R	5′-TTCTTCGATTTTCATGCTTCCTTTATTGAAACAATTAGAAGCTAT-3′	–
*Npu*C-MBP-F	5′-ATAGCTTCTAATTGTTTCAATAAAGGAAGCATGAAAATCGAAGAA-3′	–
MBP-R	5′-GTC*GGTACC*TTAGTGATGATGATGATGATGAGTCTGCGCGTCTTT-3′	*Kpn* I
*Npu*N2-F	5′-ATA*CATATG*GGAGAACAAGAGGTGTTT-3′	*Nde* I
*Npu*N2-C-R	5′-ACGTGTGGCTATTTTGATATTCGGCAAATTATCAAC-3′	–
*Npu*N2-C-F	5′-GTTGATAATTTGCCGAATATCAAAATAGCCACACGT-3′	–
Trx-*Npu*N2-R	5′-TCC*GGATCC*TCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCGGCCAGGTTAGC-3′	*Bam*H I
Trx-*Npu*N2-F	5′-GGA*GGATCC*GGAGGTGGAGGTTCTATGGAACAAGAGGTGTTT-3′	*Bam*H I
Trx-MBP-R	5′-TTCTTCGATTTTCATAGAACCAGAACCGGCCAGGTTAGC-3′	–
Trx-MBP-F	5′-GCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTATGAAAATCGAAGAA-3′	–

Table 3　Theoretical molecular weight and pI of recombinant proteins expressed in this study

Recombinant protein	Short name	M_r/kD	pI
6 × His-*Npu*N1	*Npu*N1	8.3	6.76
*Npu*N-6 × His	*Npu*N	13.2	4.95
Trx-*Npu*C-MBP-6 × His	Trx-*Npu*C-MBP	57.9	5.80
N2C-MBP-6 × His	N2C-MBP	52.0	5.47
Trx-N2C-MBP-6 × His	Trx-N2C-MBP	64.6	5.21
Trx-GS-MBP-6 × His	Trx-MBP	53.2	5.20

Table 4　Reactions to study N2C C-terminal cleavage reaction activity (No. 2, No. 3, No. 4) and reaction of wild type *Npu* DnaE intein (No. 1)

No.	N-fragment	C-fragment
1	*Npu*N	Trx-*Npu*C-MBP
2	*Npu*N1	N2C-MBP
3	*Npu*N	Trx-N2C-MBP
4	*Npu*N	N2C-MBP

剪切反应　为研究N2C的C端剪切反应活性，本研究进行的C端剪切反应如表4所示，其中反应编号1为阳性对照组。剪切反应体系如下：N段和C段底物物质的量比（以下简称：N/C比例）为5∶1，DTT浓度为1 mmol/L，反应温度为37 ℃。

反应体系在不同时刻取样，并立即加入还原型5×蛋白上样缓冲液，95 ℃煮样5 min终止反应。反应结果用SDS-PAGE和Western blot进行检测，WB分别使用抗组氨酸抗体（anti-His）和抗麦芽糖结合蛋白抗体（anti-MBP）作为一抗。

2.3.2　*影响N2C的C端剪切反应因素*　为了进一步研究N2C的剪切反应条件耐受性，本研究对影响其反应速率和产物生成率的3个因素进行考察：对反应温度的考察中，N/C比例为5∶1，DTT浓度为1 mmol/L，温度分别选取4，25，30，37 ℃进行实验；对N/C比例的考察中，温度为30 ℃，DTT浓度为1 mmol/L，N/C比例分别选取1∶1，3∶1，5∶1，10∶1进行实验；对DTT浓度的考察中，温度为30 ℃，N/C比例为5∶1，DTT浓度分别选取0，1，5，10，50 mmol/L进行实验。对以上3个因素考察的C端剪切反应底物为N2C-MBP和*Npu*N。

内含肽C端剪切反应在0，5，10，30，60，120，360，1 440 min时刻取样，并用SDS-PAGE电泳检测，用Image J软件对SDS-PAGE电泳图上的产物条带和底物条带进行灰度扫描，并按照如下公式计算C端剪切反应产物生成率。产物生成率（%）=（产物条带灰度值/产物相对分子质量）/[（底物条带灰度值/底物相对分子质量+（产物条带灰度值/产物相对分子质量]×100。反应结果制作曲线。

3 结 果

3.1 重组表达质粒的构建

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示N2C-MBP片段(1 407 bp)、Trx-N2C-MBP片段(1 773 bp)、Trx-*Npu*C-MBP片段(1 587 bp)、Trx-MBP片段(1 461 bp)、*Npu*N1片段(222 bp)和*Npu*N片段(336 bp)均与理论片段大小一致,电泳结果如图2。双酶切连接后转入大肠埃希菌DH5α中,抽提质粒后送DNA测序,结果表明质粒构建成功。

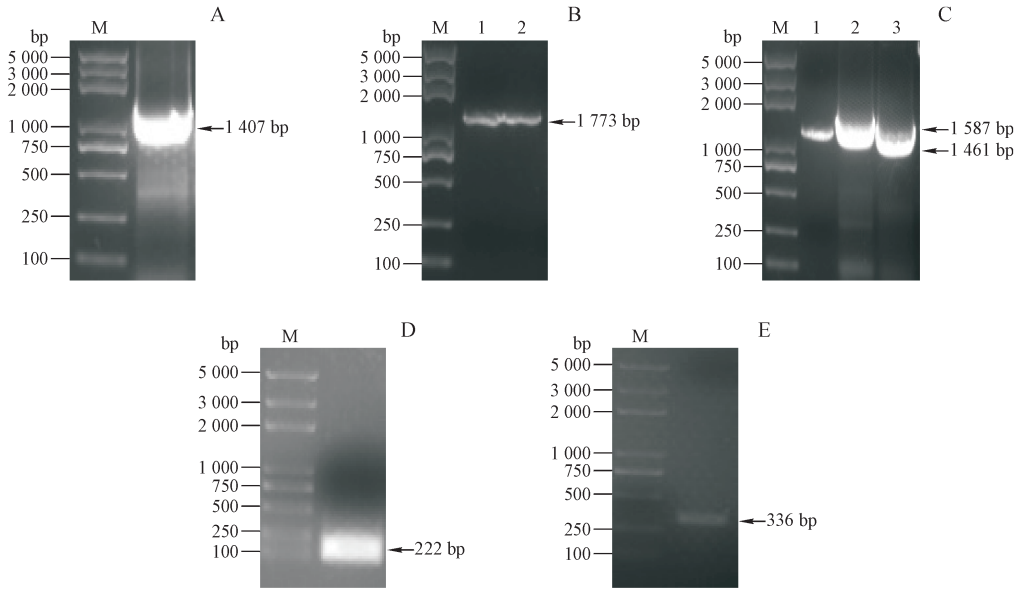


Figure 2 Detection of the PCR products amplified from the constructed plasmids by agarose gel electrophoresis
(A) N2C-MBP; (B) 1-2: Trx-N2C-MBP; (C) 1-2: Trx-*Npu*C-MBP, 3: Trx-MBP; (D) *Npu*N1; (E) *Npu*N

3.2 *Npu*C段重组蛋白在表达纯化过程中的降解情况

*Npu*C段重组蛋白经两步纯化后,用SDS-PAGE检测延长前后的降解情况,并对条带进行灰度扫描作图,结果如图3、图4所示,纯化条带大小均符合理论相对分子质量。Trx-*Npu*C-MBP在表达纯化过程中,发生31.4%～51.6%的降解(图3-A,图4-B),不含*Npu*C的重组蛋白Trx-MBP不发生降解(图3-B),提示降解发生在*Npu*C段上;此外,在表达过程中,*Npu*C降解条带并不明显(图3-A,泳道2),而在裂菌纯化后(图3-A,泳道5～8),出现降解条带,提示*Npu*C的降解发生在菌体裂解之后,与文献报道一致。

延长变体N2C-MBP和Trx-N2C-MBP在菌体裂解后的降解得到显著缓解($P < 0.01$),经Image J软件对降解条带进行灰度扫描,计算出降解条带所占比例从31.4%～51.6%降低到了2.7%～7.2%(图4-B)。

3.3 N2C的C端剪切反应

3.3.1 Western blot检测N2C的C端剪切反应

将不同的N与C底物混合反应,WB考察C端断裂反应,结果如图5所示:*Npu*N1与N2C-MBP的反应体系,在42 kD附近出现单一条带(图5,泳道1～2),符合预期产物相对分子质量大小;阳性对照组*Npu*N和Trx-*Npu*C-MBP反应体系,在42 kD附近出现单一条带(图5,泳道3～4),符合预期产物相对分子质量大小;延长变体N2C-MBP和Trx-N2C-MBP与*Npu*N的反应体系,在42 kD附近出现单一条带(图5,泳道5～8),符合预期产物相对分子质量大小。即,N2C与*Npu*N1和*Npu*N均能够发生C端剪切反应。

3.3.2 SDS-PAGE检测N2C的C端剪切反应

N2C的C端剪切反应用SDS-PAGE检测结果如图6所示,Image J对结果灰度扫描计算剪切反应时间曲线结果如图7所示。在1 mmol/L DTT催化,N/C比例为5∶1,37 ℃反应条件下:N2C与*Npu*N1的剪切反应(图6-B),24 h仅有40%产物生成;N2C与

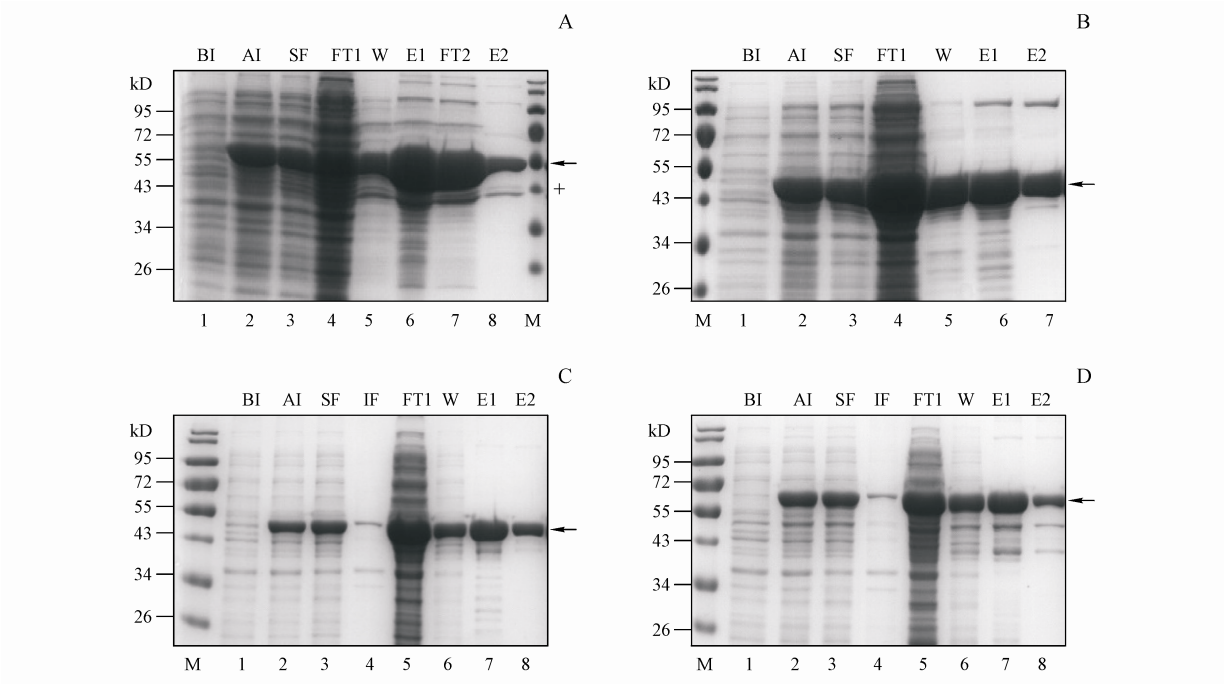


Figure 3　SDS-PAGE analysis of *Npu*C-Fusion expression and purification

A: Trx-*Npu*C-MBP; B: Trx-MBP; C: N2C-MBP; D: Trx-N2C-MBP purification, using Ni column and Dextrin Beads 6FF. BI: before induction, AI: after induction, SF:soluble fraction after lysis, IF:insoluble fraction after lysis, FT1: flow through by Ni column, FT2: flow through by Dextrin, W: 20 mmol/L imidazole wash, E1: 200 mmol/L imidazole elution, E2: elution by Dextrin. ← denotes fusion protein, + denotes degradated species

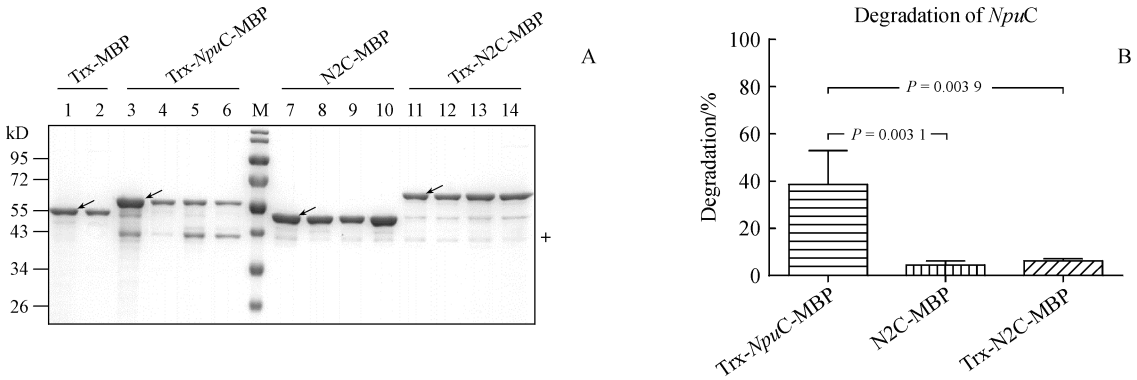


Figure 4　SDS-PAGE and grayscale scanning analysis of *Npu*C-Fusion after purification

A: SDS-PAGE of *Npu*C-fusion, Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 were protein eluted by 200 mmol/L imidazole, lane 2, 4, 6, 8, 10 and 12 were protein purified by Dextrin. ← denotes fusion protein, + denotes degradated species; B: Degradation histogram of *Npu*C-fusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

*Npu*N的剪切反应(图6-C,6-D),10 min产物生成率达到70%,30 min达90%以上;阳性对照组*Npu*C野生型的C端剪切反应(图6-A),5 min产物生成率达90%以上。即,N2C和*Npu*N反应具有和阳性对照组相似的快速剪切的反应特点,但N2C和*Npu*N1反应效率较差,故对影响C端剪切反应因素的考察中使用N2C-MBP和*Npu*N进行实验。

3.3.3　*影响N2C的C端剪切反应的因素*　对影响内含肽剪切反应因素的考察结果如图8所示。

对不同反应温度进行考察,结果如图8-A所示,37 ℃下反应最快,10 min产物生成率达到70%,1 h即达到平衡;而达到70%的产物生成率,在30 ℃下需30 min、25 ℃下需60 min、4 ℃下则需6 h以上;反应24 h后,所有考察温度下产物生成率均达到90%以上。

对不同N/C比例进行考察,结果如图8-B所示,N/C比例为1∶1时反应初始速率较慢;*Npu*N段过量条件下,进一步增加*Npu*N用量反应效率没有

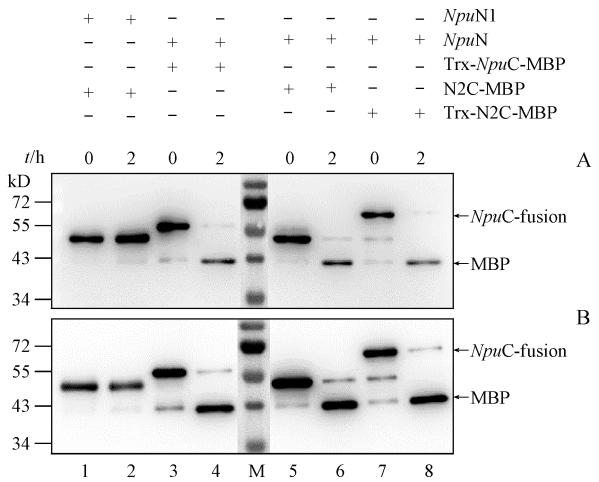


Figure 5 Western blot analysis of the C-terminal cleavage activity of N2C. Reactions were carried out at 37 °C with the N-C ratio of 5∶1, in the presence of 1 mmol/L DTT. The compositions of the reactions were indicated above the figure. Reactions between *Npu*N fragments and N2C fusions were visualized by Western blot, using anti-His antibody (A) or anti-MBP antibody (B) as the primary antibody respectively. 'MBP' is the cleaved product

明显差异;24 h后,所有考察N/C比例下产物生成率均在90%以上。

对DTT浓度进行考察,结果如图8-C所示,在0~50 mmol/L DTT浓度下,剪切反应10 min产物生成率均达到50%;2 h后,产率均达到90%以上。

4 讨 论

内含肽在蛋白质工程领域是一类颇具应用价值的工具,断裂型内含肽*Npu* DnaE在介导蛋白质剪接和C端剪切方面表现出快速和高效的特点,展现出重大的应用潜力,譬如介导免疫毒素的生产[11-12]、双特异性抗体的装配[13]、重组蛋白的标签纯化[14-15]等。但其在应用中遇到的*Npu*C段发生的降解,使其在生产应用中的收率和产物的纯度方面受到一定程度的影响。此外,在肿瘤微环境下一些基质金属蛋白酶也可能对*Npu* DnaE内含肽造成酶解,限制了*Npu* DnaE在体内,特别是肿瘤微环境当中的应用[11]。因此,研究如何提高*Npu*C段的稳定性具有关键意义。

本研究基于N/C重构机制构建了N端融合*Npu*N2片段的*Npu*C延长变体N2C,探究了其在原核表达系统中融合表达、纯化过程中的稳定性,并探究了N2C发生剪切反应的可行性。结果显示,N2C在表达、纯化过程中,降解产物占比从

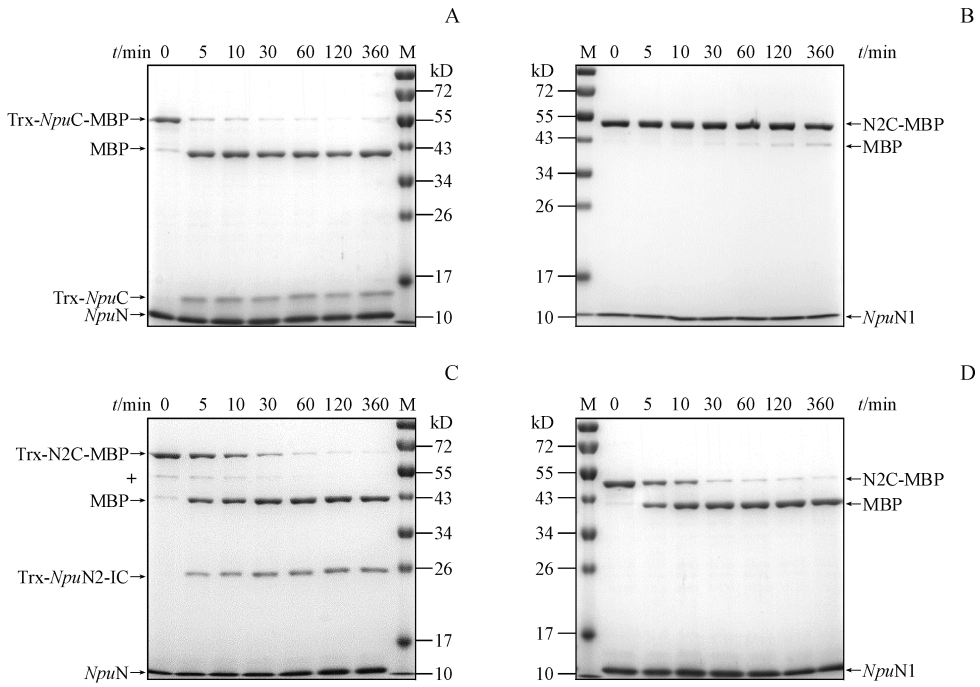


Figure 6 SDS-PAGE analysis of the C-terminal cleavage activity of N2C. Reactions were carried out at 37 °C with the N-C ratio of 5∶1, in the presence of 1 mmol/L DTT. Aliquots at specified time points were visualized on SDS-gels. A: reaction between *Npu*N and Trx-*Npu*C-MBP; B: reaction between *Npu*N1 and N2C-MBP; C: reaction between *Npu*N and Trx-N2C-MBP; D: reaction between *Npu*N and N2C-MBP. 'Trx-*Npu*C' and 'Trx-*Npu*N2-IC' are the cleaved C-intein fragments. '+' denotes unidentified band

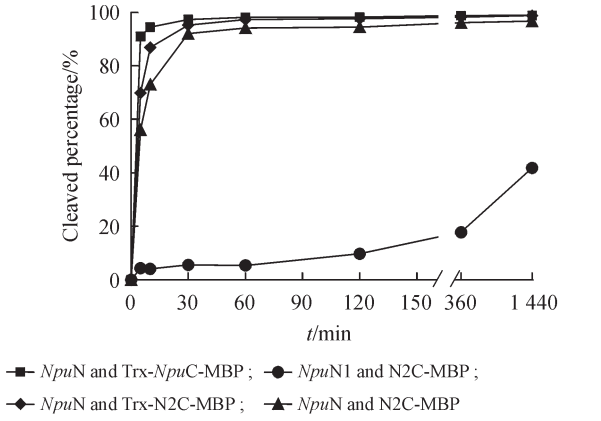


Figure 7　Time course of the cleavage product formation of different reactant combinations. C-terminal cleavage reactions were carried out at 37 °C in the presence of 1 mmol/L DTT, with the N-C ratio of 5∶1. Aliquots were removed from the mixture at specified time points and quenched by adding SDS-PAGE loading buffer and then visualized by SDS-PAGE

31.4% ~ 51.6% 降低到了 2.7% ~ 7.2%；且 N2C 能与全长 *Npu*N 段发生快速、高效的 C 端剪切反应。值得注意的是，N2C 与 *Npu*N1 反应效率较低（24 h，40%），较低的反应效率可能与 *Npu*N 和 *Npu*C 的重构机制有关：*Npu*N1 通过疏水作用与 *Npu*N2 和 *Npu*C 的复合物进一步折叠，作用力弱于 *Npu*N2 与 *Npu*C 的静电作用，因而表现为 N2C 与 *Npu*N1 反应效率降低；另外，全长 *Npu*N 能够与 N2C 有较高的反应效率，可能是由于 N2C 中的 *Npu*C 虽然通过静电相互作用与融合的 *Npu*N2 相互结合，但由于 *Npu*N2 与 *Npu*C 的结合、折叠处于动态可逆过程，过量的全长 *Npu*N 会与 N2C 中的 N2 片段竞争结合 *Npu*C 段，形成能反应的正确折叠构象。

本研究还对影响断裂内含肽 C 端剪切反应的因素、反应温度、N/C 比例、还原剂 DTT 浓度等条件进行了考察，N2C 延长变体表现出与 *Npu*C 野生型相似的条件耐受性[6]。对上述各因素的考察，表明 N2C 延长变体能够减少 *Npu*C 在融合表达纯化过程中的降解，同时具有良好的 C 端剪切反应活性，为其应用在蛋白质纯化领域奠定了基础。同时，本课题仍有许多方面可以进行更为深入的研究，例如：对其他影响断裂型内含肽反应效率的因素进行考察优化，如纯化、剪切反应中盐离子浓度、pH 等条件；研究 N2C 内含肽对其介导的蛋白质剪接反应造成的影响等。

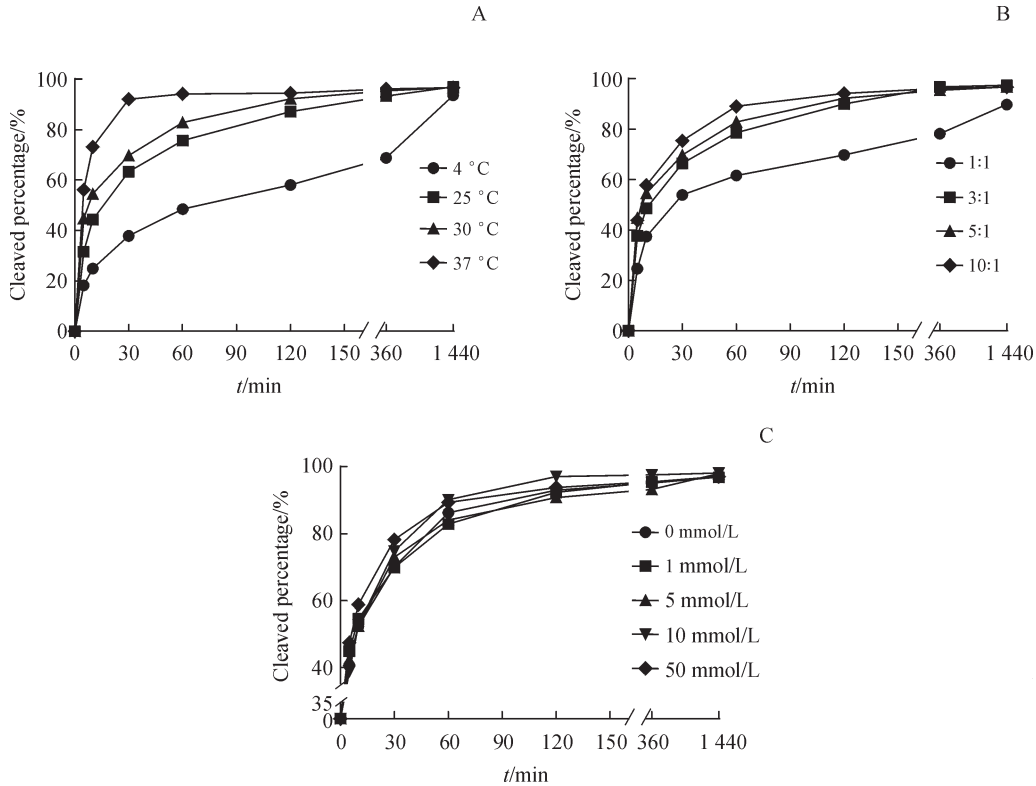


Figure 8　Time course of N2C C-terminal cleavage under different temperatures (A), different ratios between *Npu*N and N2C (B), and different concentrations of DTT (C) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$). Aliquots were taken at different time points and ran on SDS-gels, then the band intensities corresponding to reactants and products were quantified by Image J

参 考 文 献

[1] Conibear AC, Watson EE, Payne RJ, *et al*. Native chemical ligation in protein synthesis and semi-synthesis[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, **47**(24): 9046-9068.

[2] Shah NH, Muir TW. Inteins: nature's gift to protein chemists [J]. *Chem Sci*, 2014, **5**(1): 446-461.

[3] Shi SW, Chen HH, Jiang H, *et al*. A novel self-cleavable tag Zbasic-ΔI-CM and its application in the soluble expression of recombinant human interleukin-15 in *Escherichia coli*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, **101**(3): 1133-1142.

[4] Zettler J, Schütz V, Mootz HD. The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction[J]. *FEBS Lett*, 2009, **583**(5): 909-914.

[5] Iwai H, Züger S, Jin J, *et al*. Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from *Nostoc punctiforme*[J]. *FEBS Lett*, 2006, **580**(7): 1853-1858.

[6] Ramirez M, Valdes N, Guan DL, *et al*. Engineering split intein DnaE from *Nostoc punctiforme* for rapid protein purification[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2013, **26**(3): 215-223.

[7] Guan DL, Ramirez M, Chen ZL. Split intein mediated ultra-rapid purification of tagless protein (SIRP)[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, **110**(9): 2471-2481.

[8] Shah NH, Eryilmaz E, Cowburn D, *et al*. Naturally split inteins assemble through a "capture and collapse" mechanism [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(49): 18673-18681.

[9] Stevens AJ, Sekar G, Gramespacher JA, *et al*. An atypical mechanism of split intein molecular recognition and folding[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(37): 11791-11799.

[10] Shah NH, Vila-Perelló M, Muir TW. Kinetic control of one-pot trans-splicing reactions by using a wild-type and designed split intein[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**(29): 6511-6515.

[11] Wang J, Han L, Chen JS, *et al*. Reduction of non-specific toxicity of immunotoxin by intein mediated reconstitution on target cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, **66**: 288-295.

[12] Pirzer T, Becher KS, Rieker M, *et al*. Generation of potent anti-HER1/2 immunotoxins by protein ligation using split inteins[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(8): 2058-2066.

[13] Han L, Zong HF, Zhou YX, *et al*. Naturally split intein Npu DnaE mediated rapid generation of bispecific IgG antibodies [J]. *Methods*, 2019, **154**: 32-37.

[14] Vila-Perelló M, Liu ZH, Shah NH, *et al*. StreamLined expressed protein ligation using split inteins[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(1): 286-292.

[15] Lu W, Sun ZY, Tang YC, *et al*. Split intein facilitated tag affinity purification for recombinant proteins with controllable tag removal by inducible auto-cleavage[J]. *J Chromatogr A*, 2011, **1218**(18): 2553-2560.

·校园信息·

中国药科大学10位专家入选国家药品监督管理局药品审评中心第一批外聘专家名单

2020年6月5日,国家药品监督管理局(NMPA)药品审评中心公布了第一批626位外聘专家名单,囊括临床医学、药学、法律等相关领域,其中来自高校的专家为109人。中国药科大学马爱霞、王广基、尤启冬、尹莉芳、孔令义、李萍、狄斌、陈永法、姚文兵、涂家生10位教授入选(以姓氏笔画为序)。

药品审评中心同时公布了《药品审评中心外聘专家管理办法》。外聘专家的主要工作包括:为药品审评过程中遇到的技术问题提供日常咨询;在建立药物评价技术标准、处理新领域、新技术、新发现、新适应症等现行技术标准不能涵盖的问题提供技术指导与技术建议;为解决药品审评争议和药物安全性、有效性、质量可控性评价等问题提供技术指导与技术决策建议;对重大技术争议进行专家论证,形成技术意见;参与药品技术审评复审工作等。

近年来,中国药科大学积极参与到国家药品审评工作中,在推动药品管理政策法规出台、健全审评质量控制体系、保障药品审评科学公正等方面发挥了重要的智库作用。

(来源:科学技术处,本刊有删改)

PD-L1疫苗中引入不同免疫原性氨基酸对T细胞亚群分化的影响

陈红梅,康彦良,刘 利,姚文兵,田 浤*

(中国药科大学生命科学与技术学院,江苏省生物药物成药性研究重点实验室,南京 210009)

摘 要 为了比较内源性的3-硝基酪氨酸与非天然的4-硝基苯丙氨酸在PD-L1疫苗中的引入对T细胞亚群分化的影响,利用遗传密码扩充技术,将这两种免疫原性氨基酸分别引入到PD-L1疫苗的相同位点,获得具有3-硝基酪氨酸以及4-硝基苯丙氨酸的两种PD-L1突变体。用这两种突变体免疫小鼠,分析对小鼠脾脏T细胞亚群分化的影响。流式细胞术检测结果显示,4-硝基苯丙氨酸在PD-L1疫苗中的引入可促进Th1细胞的极化,同时降低Treg细胞的比例,3-硝基酪氨酸的引入对Th1细胞的极化无影响,同时能显著提高Treg和Th17细胞的比例。二者在PD-L1疫苗中的引入均能促进脾脏$CD8^+$ T细胞的应答,其中含有4-硝基苯丙氨酸的PD-L1突变体应答效果更强。实验结果表明,与内源性的3-硝基酪氨酸在PD-L1疫苗中的引入相比,非天然的4-硝基苯丙氨酸更适合用于肿瘤疫苗的设计。

关键词 PD-L1;疫苗;3-硝基酪氨酸;4-硝基苯丙氨酸;T细胞亚群

中图分类号 R967 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0349-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200313

引用本文 陈红梅,康彦良,刘利,等.PD-L1疫苗中引入不同免疫原性氨基酸对T细胞亚群分化的影响[J].中国药科大学学报,2020,51(3):349-356.

Cite this article as: CHEN Hongmei, KANG Yanliang, LIU Li, *et al*. Effects of different immunogenic amino acids in PD-L1 vaccine on the differentiation of T cell subsets[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 349-356.

Effects of different immunogenic amino acids in PD-L1 vaccine on the differentiation of T cell subsets

CHEN Hongmei, KANG Yanliang, LIU Li, YAO Wenbing, TIAN Hong*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To compare the effects of endogenous 3-nitrotyrosine and non-natural 4-nitrophenylalanine in PD-L1 vaccine on the differentiation of T cell subsets, two immunogenic amino acids were introduced into the same site of PD-L1 vaccine. Two PD-L1 mutants with 3-nitrotyrosine and 4-nitrophenylalanine were obtained, respectively, using genetic code expansion technology. Mice were immunized with these two mutants, and their effects on the differentiation of T cell subsets in spleen were analyzed. The results of flow cytometry showed that the introduction of 4-nitrophenylalanine in PD-L1 vaccine could promote the polarization of Th1 cells while reducing the proportion of Treg cells; the introduction of 3-nitrotyrosine had no effect on the polarization of Th1 cells, while significantly increasing the proportion of Treg and Th17 cells. The introduction of both into PD-L1 vaccine could promote the response of $CD8^+$ T cells in spleen, and the response of PD-L1 mutant containing 4-nitrophenylalanine was stronger. In summary, the non-natural 4-nitrophenylalanine is more suitable for the design of tumor vaccines as compared with endogenous 3-nitrotyrosine.

Key words PD-L1; vaccine; 3-nitrotyrosine; 4-nitrophenylalanine; T cell differentiation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81973222, No. 81673343, No. 91753112)

收稿日期 2020-03-23 ***通信作者** Tel:025-83271543 E-mail:tinahew@139.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81573222, No. 81673343, No. 91753112)

免疫原性氨基酸是一类能增强多肽、蛋白免疫原性的非天然氨基酸,如硝基苯丙氨酸、硝基酪氨酸等[1-2],对自身免疫性疾病的发病、肿瘤的免疫逃逸等生理病理过程有重要影响。免疫原性氨基酸改变蛋白质免疫原性的作用在免疫病理学、肿瘤免疫学等领域中受到了广泛关注。

含有免疫原性氨基酸的蛋白质可以在多种病理条件下自发形成,如:酪氨酸的硝基化修饰与自身免疫性疾病密切相关。例如,在类风湿关节炎患者的滑液和系统性红斑狼疮或急性肺损伤的患者血清中已鉴定出抗硝基酪氨酸抗体[3-5]。含有酪氨酸硝基化修饰的蛋白质具有潜在的免疫原性[6],高水平的酪氨酸硝基化蛋白会激活免疫系统,可能在维持自身性免疫疾病中起重要作用。此外,也有研究人员用化学或生物学的方法将免疫原性氨基酸引入蛋白质或多肽中,以此改变目标分子的免疫原性。例如:Hardy等[7]曾经将3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, $3NO_2Tyr$)引入到抗原表位肽的特定位置,通过改变MHC I限制性抗原接触位置间接影响T细胞的识别。课题组前期研究也发现,将4-硝基苯丙氨酸(4-nitrophenylalanine, $4NO_2Phe$)定点引入到人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、细胞程序性死亡配体1(programmed death ligand 1, PD-L1)等自体蛋白中,不仅能诱导机体产生高滴度抗HER2、抗PD-L1的抗体,还能刺激$CD4^+$T细胞激活,辅助$CD8^+$T细胞产生抗体依赖性细胞介导的杀伤作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)和细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)介导的杀伤效应,成为有效的肿瘤疫苗候选分子[8-10]。

尽管硝基取代的苯丙氨酸和酪氨酸均是免疫原性氨基酸,但3-硝基酪氨酸在各种病理条件下由一氧化氮合酶催化产生,属于酪氨酸的衍生物,而4-硝基苯丙氨酸并不能在机体内自发形成,属于非天然的外源氨基酸,两者在机体内诱发的免疫应答可能存在差异,尤其是这两种免疫原性氨基酸对T细胞亚群分化的影响,可能对机体免疫耐受和自身免疫之间的平衡存在重要影响。然而,关于免疫原性氨基酸对T细胞亚群分化影响的研究报道较少。

为了解决这一问题,本文利用遗传密码扩充技术在PD-L1疫苗的相同位点分别引入了3-硝基酪氨酸和4-硝基苯丙氨酸,比较二者对$CD4^+$T细胞不同亚群的影响以及$CD8^+$T细胞的激活情况,从而分析二者的引入对机体免疫耐受和自身免疫之间的平衡是否存在不同的影响,为后续基于免疫原性氨基酸的蛋白疫苗的设计提供指导。

1 材 料

1.1 试 剂

3-硝基酪氨酸、4-硝基苯丙氨酸(上海吉尔生化有限公司);异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、L-阿拉伯糖(L-Ara)、卡那霉素(Kan)、氯霉素(Cm)(南京鼎国生物技术有限公司);BCA蛋白定量分析试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠IgG、CpG(美国Sigma公司);白细胞激活刺激剂(Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™)、流式固定/破膜液(Cytofix/Cytoperm Soln Kit)、流式抗体等(美国BD公司)。

1.2 仪 器

Multiscan自动酶标仪、高速冷冻离心机、恒温培养箱(美国Thermo公司);Countstar全细胞计数仪(上海泽权仪器设备有限公司);水平离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);Accuri C6 Plus流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 动 物

清洁级C57BL/6雌性小鼠(6~8周龄)购自扬州大学比较医学中心,合格证号:SCXK(苏)2017-0001。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

1.4 菌种和质粒

E. coli BL21(AI)为中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室保存。

2 方 法

2.1 WT PD-L1疫苗分子的表达

将实验室前期构建的WT PD-L1疫苗分子的甘油菌pET28-PD-L1 BL21(DE3)接种于20 mL LB培养基小瓶中(Kan),37 ℃,220 r/min培养过夜,取活化的菌液接种于至200 mL LB(Kan)培养基大瓶中,37 ℃,220 r/min培养3 h后,测得A_{600}为0.6~

0.8，加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导剂，诱导 8 h，取诱导前后的菌液进行SDS-PAGE验证蛋白是否表达，8 000 r/min离心 10 min收集菌体，保存于−20 ℃。

2.2　3-硝基酪氨酸和4-硝基苯丙氨酸取代的PD-L1表达菌株的构建

将编码PD-L1疫苗分子的11位氨基酸密码子突变为琥珀密码子TAG，将突变体基因片段和质粒载体pET28a利用*Nco* Ⅰ、*Hin*d Ⅲ进行双酶切，胶回收酶切产物，T4 DNA连接酶16 ℃过夜连接。连接产物转化至*E. coli* DH10B大肠埃希菌感受态细胞，37 ℃培养过夜。次日挑取阳性克隆，接种在含Kan性的液体LB培养基中，37 ℃，220 r/min过夜培养。取菌液测序，测序正确的质粒命名命名为pET28a-3NO_2Tyr^{11}PD-L1。将质粒转化至实验室前期构建的含pAC-3NO_2TyrRS质粒的*E. coli* BL21（AI）感受态细胞中，涂布于Kan/Cm双抗的LB平板，37 ℃倒置培养过夜。挑取阳性克隆并进行表达验证，菌命名为3NO_2Tyr^{11}PD-L1-BL21（AI）。4-硝基苯丙氨酸取代的PDL1质粒以及表达菌株按同样方法的构建，质粒命名为pET28a-4NO_2Phe^{11}PD-L1，菌命名为4NO_2Phe^{11}PD-L1-BL21（AI）。

2.3　3-硝基酪氨酸和4-硝基苯丙氨酸取代的PD-L1蛋白的表达与纯化

将保存的3NO_2Tyr^{11}PD-L1-BL21（AI）菌种接种于2 mL LB培养基的试管中（Kan/Cm）振荡培养过夜。将活化的菌液接种于至200 mL LB（Kan/Cm）培养基大瓶中，37 ℃，220 r/min培养3 h后，测得A_{600}为0.6~0.8，加入终浓度为0.15% L-Ara、1 mmol/L IPTG诱导剂及终浓度0.1 mol/L的3NO_2Tyr，诱导8 h，8 000 r/min离心10 min收集菌体，称重，按1∶10（g/mL）的比例加入包涵体洗涤液，4 ℃搅拌30 min。超声破碎，离心收集沉淀，加入包涵体洗涤液清洗，去除杂蛋白以及核酸。随后按1∶10（g/mL）的比例加入含有8 mol/L脲素的变性液，4 ℃搅拌变性过夜。变性液经镍亲和色谱柱纯化后将目的蛋白按1∶4比例进行复性。将复性液于20 mmol/L Tris-HCL冲液透析除盐，超滤浓缩。所获得的的目的蛋白进行SDS-PAGE检测和Western blot鉴定。不含免疫原性氨基酸的野生型PD-L1（WT PD-L1）和4NO_2Phe^{11}PD-L1按同样方法制备。

2.4　动物分组及免疫方案

将6~8周雌性C57BL/6小鼠随机分为PBS、WT PD-L1、3NO_2Tyr^{11}PD-L1、4NO_2Phe^{11}PD-L1共4组，每组8只。与CpG佐剂联合使用皮下免疫小鼠，每周免疫1次，每次每只给药剂量为50 μg，佐剂10 μg，一共免疫3次，第28天处死小鼠。

2.5　流式细胞术测定各组对T细胞亚群分化的影响

处死小鼠后，浸泡于75%乙醇中5 min，无菌条件下取出小鼠脾脏，研磨过70 μm筛网，加入PBS 1 mL于培养皿中洗残留细胞并过筛，1 200 r/min离心5 min收集细胞。用PBS重悬洗涤细胞1次，加入裂解液轻柔吹悬准确控制时间裂解10～15 min，1 200 r/min离心5 min。收集细胞用PBS轻柔洗涤1次，弃上清液，加入适量无菌RPMI 1640培养基（含10% FBS）对细胞进行重悬，计数，稀释为每毫升1×10^6个细胞备用。

细胞标记：Th1（CD4-FITC、IFN-γ-Cy5.5），Th2（CD4-FITC、IL-4-APC），Treg（CD4-FITC、CD3-Cy5.5、Foxp3-PE、CD25-APC），Th17（CD4-FITC、CD3-Cy5.5、IL17-APC），CD8（CD8-FITC、IFN-γ-Cy5.5）。

设置单染组：空染组（加转录因子缓冲液）、CD4组（先加CD4抗体，后加Cytofix/Cytoperm Soln Kit）、IL-4组（先加Cytofix/Cytoperm Soln Kit，后加IL-4抗体）、IFN-γ组（先加Cytofix/Cytoperm Soln Kit，后加IFN-γ抗体）、CD8组（先加CD8抗体，后加Cytofix/Cytoperm Soln Kit）、CD25（先加CD25抗体，后加转录因子缓冲液）、FOXP3（先加转录因子缓冲液，后加FOXP3抗体）、IL17（先加Cytofix/Cytoperm Soln Kit，后加IL-17抗体）。

CD8/Th1/Th2/Th17细胞染色：取每个小鼠脾脏细胞1×10^6个铺板于24孔板，每孔1 mL，每孔加入Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ 2 μL刺激，孵育5 h。离心收集细胞收集细胞于2 mL EP管中（以下所有溶液提前4 ℃预冷），离心（4 ℃，1 000 r/min，5 min），加入PBS 1 mL，离心（4 ℃，1 000 r/min，5 min），加入CD4/CD8抗体，冰上避光孵育30 min，然后加入PBS 1 mL，离心（4 ℃，1 300 r/min，5 min），每孔加入细胞破膜液250 μL，冰上避光孵育15 min，然后加入工作洗涤液1 mL，离心（4 ℃，1 300 r/min，5 min），弃上清液，

再加入工作洗涤液1 mL,离心(4 ℃,1 300 r/min,5 min)。分别加入对应的流式抗体,冰上避光孵育30 min。再加入工作洗涤液1 mL,离心(4 ℃,1 300 r/min,5 min)。加入PBS 300 μL重悬。流式细胞仪检测。

Treg细胞染色:取每个小鼠脾脏细胞1×10^6个铺板于24孔板,每孔1 mL,每孔加入Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ 2 μL刺激,孵育5 h。离心收集细胞收集细胞于2 mL EP管中(以下所有溶液提前4 ℃预冷),离心(4 ℃,1 000 r/min,5 min),加入PBS 1 mL,离心(4 ℃,1 000 r/min,5 min),加入CD4和CD25抗体,冰上避光孵育25 min,然后加入PBS 1 mL,离心(4 ℃,1 300 r/min,5 min),每孔加入转录因子缓冲液1 mL,冰上避光孵育40 min。然后加入工作洗涤液2 mL,离心(4 ℃,1 300 r/min,5 min),弃上清液,重复1次。加入FOXP3抗体,冰上避光孵育50 min。再加入工作洗涤液2 mL,离心(4 ℃,1 300 r/min,5 min)。加入PBS 300 μL重悬。流式细胞仪检测。

2.6 统计学分析

采用GraphPad Prism 7软件进行统计学分析。采用One-Way ANOVA进行数据显著性比较,$P<0.05$为显著性差异,具有统计学意义。

3 结 果

3.1 $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1和$4NO_2Phe^{11}$PD-L1菌株的构建

$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1和$4NO_2Phe^{11}$PD-L1的质粒构建图谱如图1所示,在PD-L1相同位点分别引入$3NO_2Tyr$和$4NO_2Phe$,用于PD-L1突变体蛋白的表达。

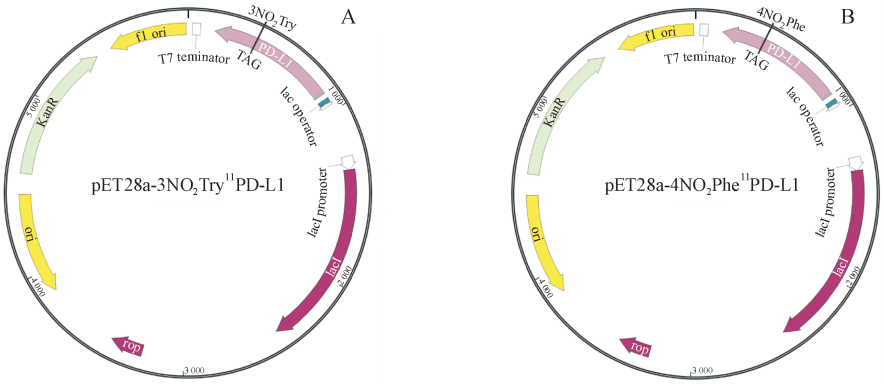


Figure 1 Plasmid map of $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1(A)and $4NO_2Phe^{11}$PD-L1(B)

3.2 WT PD-L1、$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1和$4NO_2Phe^{11}$PD-L1蛋白的表达

对WT PD-L1、$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1和$4NO_2Phe^{11}$PD-L1蛋白进行表达,取诱导前后全菌进行SDS-PAGE。结果如下图2所示,诱导后菌体在相对分子质量27 kD左右的位置出现条带,与目的蛋白的相对分子质量大小相符。

3.3 WT PD-L1、$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1、$4NO_2Phe^{11}$PD-L1蛋白的纯化及Western blot鉴定

用镍亲和色谱柱对WT PD-L1、$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1、$4NO_2Phe^{11}$PD-L1进行纯化,目的蛋白经过复性、透析、超滤浓缩之后,进行SDS-PAGE以及Western blot鉴定。如图3所示获得纯度大于90%的WT PD-L1及突变体蛋白,且经Western blot验证表明WT PD-L1及突变体正确表达。

3.4 $4NO_2Phe^{11}$PD-L1和$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1免疫对小鼠脾脏内Th1、Th2细胞亚群的影响

流式细胞术分析$4NO_2Phe^{11}$PD-L1以及$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1免疫后小鼠脾脏内Th1、Th2细胞比例变化,结果如图4所示,$4NO_2Phe^{11}$PD-L1免疫组小鼠脾脏内Th1细胞比例(2.52 ± 0.04)%显著高于PBS组(1.99 ± 0.08)%,而Th2细胞比例(0.26 ± 0.04)%显著低于PBS组($P<0.05$)。$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1免疫组小鼠脾脏内Th2细胞比例为(0.20 ± 0.02)%,显著低于PBS组,但$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1免疫对Th1细胞的比例无明显影响($P>0.05$)。实验结果提示,4-硝基苯丙氨酸在PD-L1疫苗中的引入能使Th1/Th2细胞平衡趋向Th1细胞。

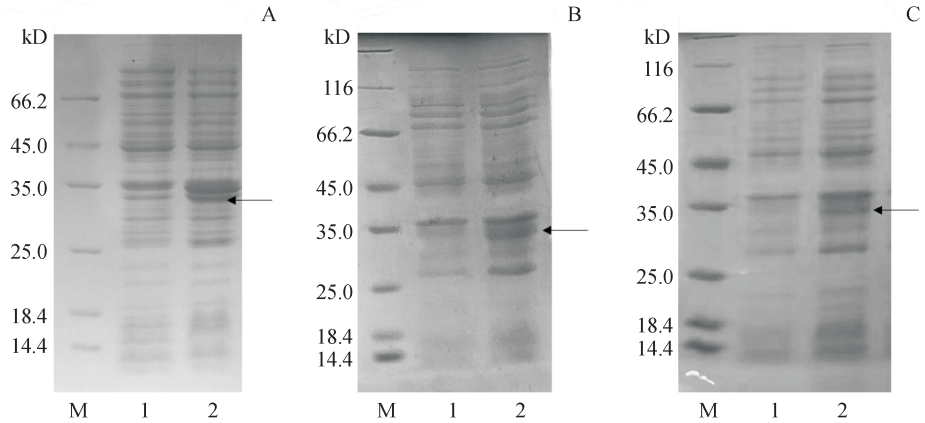


Figure 2　SDS-PAGE analysis of the expression WT PD-L1 and mutated PD-L1
A: WT PD-L1; B: $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1; C: $4NO_2Phe^{11}$PD-L1. M: Marker, 1: Before IPTG induction, 2: After IPTG induction

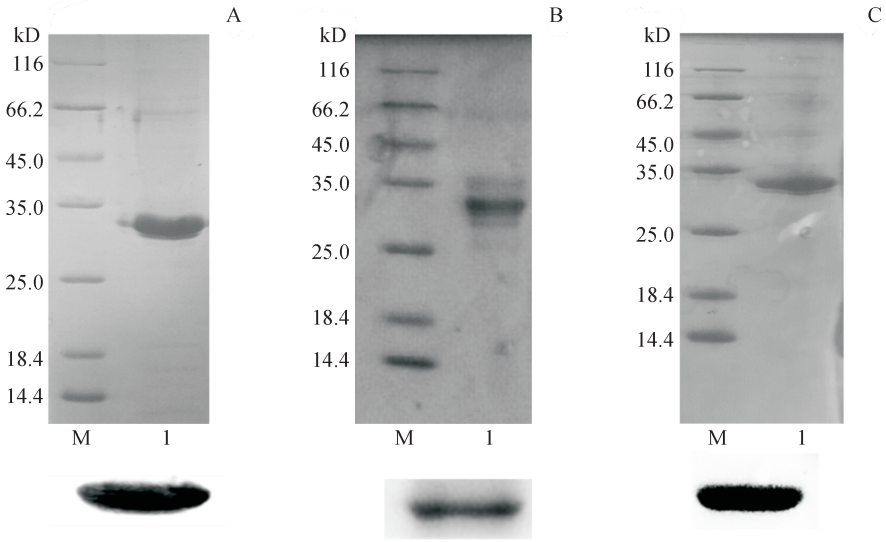


Figure 3　SDS-PAGE analysis and Western blot identification of WT PD-L1 and mutated PD-L1
(A) WT PD-L1. M: Marker, 1: Purified WT PD-L1; (B) $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1. M: Marker, 1: Purified $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1; (C) $4NO_2Phe^{11}$PD-L1. M: Marker, 1: Purified $4NO_2Phe^{11}$PD-L1

3.5　$4NO_2Phe^{11}$PD-L1 和 $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 免疫小鼠对脾脏内 Treg 细胞比例的影响

流式细胞术分析 $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 以及 $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 免疫后小鼠脾脏内 Treg 细胞比例变化，结果如图 5 所示，与 PBS 组（3.78 ± 0.06）% 相比，$4NO_2Phe^{11}$PD-L1 组小鼠脾脏内 Treg 细胞比例（2.90 ± 0.20）% 显著降低（$P < 0.01$），而 $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 组 Treg 细胞比例（5.34 ± 0.44）% 与 PBS 组相比则明显提高（$P < 0.05$）。

3.6　$4NO_2Phe^{11}$PD-L1 以及 $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 免疫小鼠后脾脏内 Th17 细胞比例

通过流式细胞术测定脾脏内 Th17 细胞的比例，结果发现，如图 6 所示，与其他各组相比，$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 免疫小鼠后，脾脏内 Th17 细胞的比例显著增高，$4NO_2Phe^{11}$PD-L1 免疫后对小鼠脾脏内 Th17 细胞比例没有明显影响。随后分析了 Th17 / Treg 细胞的比例，发现 $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 组与 $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 组无显著性差异［（0.33 ± 0.06）% *vs*（0.28 ± 0.03）%］，上述结果提示，3-硝基酪氨酸可能在体内作为一种炎症信号发挥作用，对 Th17 细胞亚群影响较大，而 4-硝基苯丙氨酸对 Treg 细胞亚群作用更明显，提示机体可能把含 4-硝基苯丙氨酸的蛋白质作为外源蛋白处理。

3.7　$4NO_2Phe^{11}$PD-L1 和 $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 免疫小鼠对脾脏内 $CD8^+$ T 细胞的影响

通过流式细胞术分析 $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 和

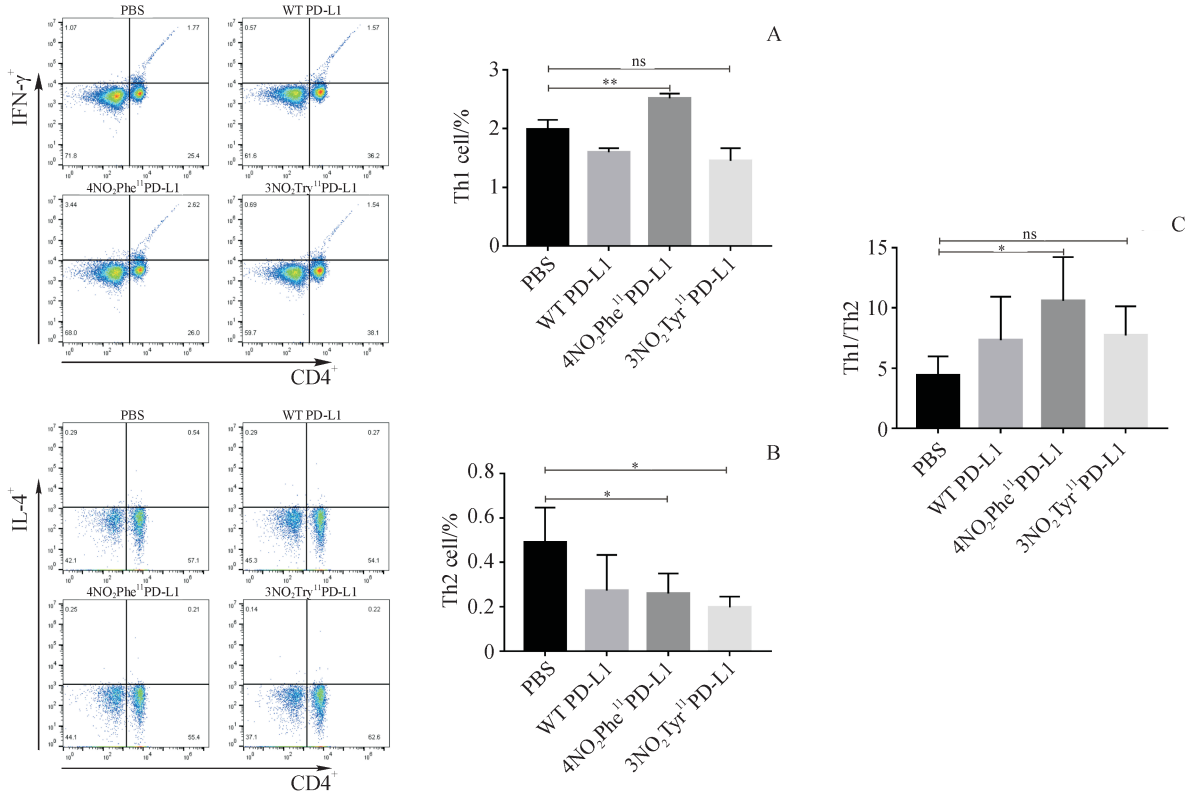


Figure 4 Immunization of $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 and $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 induces polarization of naïve $CD4^+$T cells to Th1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

A: Frequency of Th1 cells; B: Frequency of Th2 cells; C: Rations of Th1/Th2 cells

$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; ns :not significant

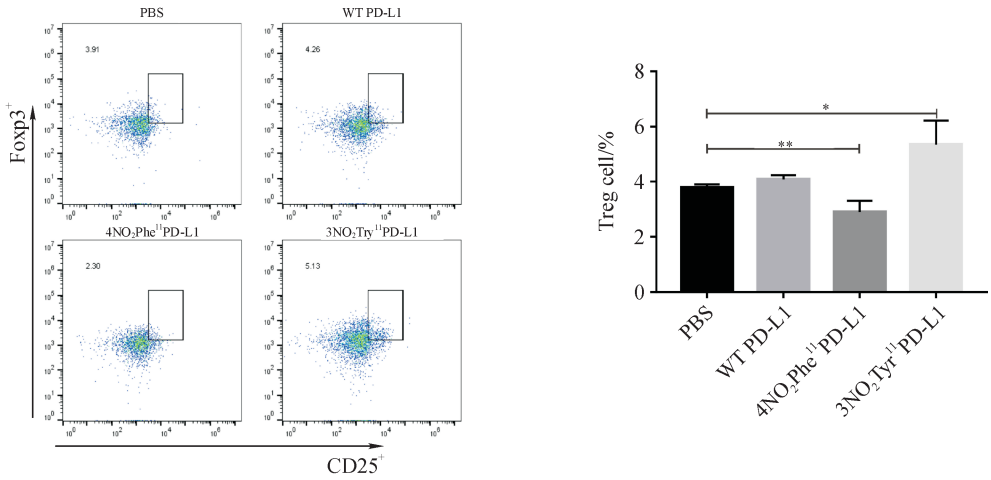


Figure 5 Effect of $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 and $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 immunization on the frequency of Treg cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 免疫后小鼠脾脏内 $CD8^+$ T细胞的激活情况，结果如图7所示，与PBS组相比，$3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 以及 $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 免疫后小鼠脾脏中的 $CD8^+IFN\gamma^+$T细胞比例均显著增加，但是 $3NO_2Tyr^{11}$PDL 组 $CD8^+IFN\gamma^+$T 细胞比例[(4.50 ± 0.43)%]显著低于 $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 组[(6.97 ± 0.78)%]。这可能是由于两者对 $CD4^+$T细胞亚群的作用差异造成的。

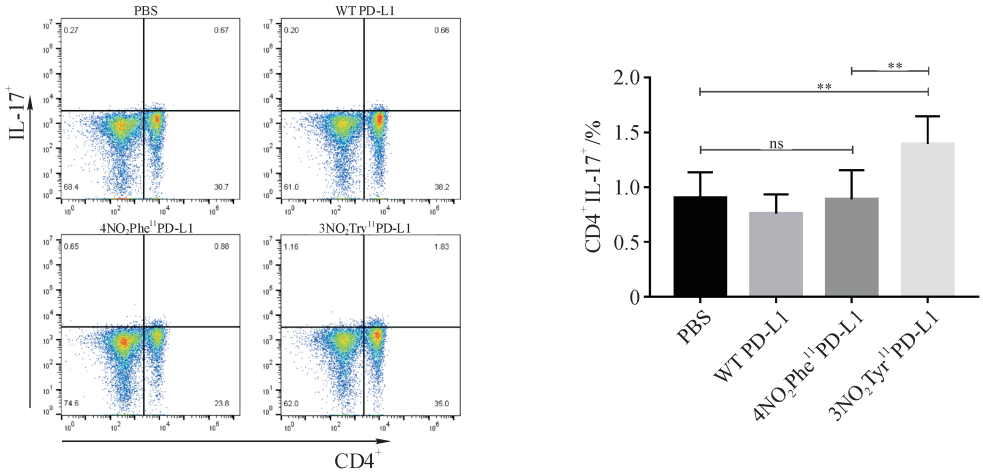


Figure 6　Effect of $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 and $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 immunization on the frequency of Th17 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
$^{**}P < 0.01$;ns :not significant

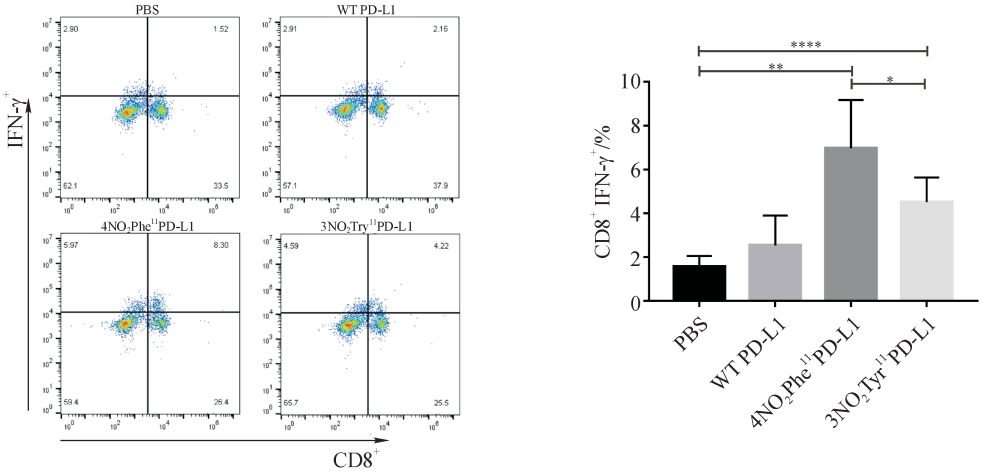


Figure 7　Effect of $4NO_2Phe^{11}$PD-L1 and $3NO_2Tyr^{11}$PD-L1 immunization on the frequency of $CD8^+$ T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$

4　讨　论

本研究利用遗传密码扩充技术，将两种免疫原性氨基酸4-硝基苯丙氨酸和3-硝基酪氨酸分别引入到PD-L1疫苗的相同位点，获得具有3-硝基酪氨酸以及4-硝基苯丙氨酸的两种PD-L1突变体。遗传密码扩充技术中，非天然氨基酸由琥珀终止密码子TAG编码，蛋白表达过程中，携带非天然氨基酸的tRNA会和TAG释放因子竞争结合TAG，因此，相较于原型蛋白，突变目的蛋白的产量较低，造成了后续纯化困难，其表达和纯化效率有待进一步提高。

研究发现4-硝基苯丙氨酸在PD-L1疫苗中的引入，能够显著提高脾脏内Th1细胞比例，同时Th2细胞比例显著降低，促进Th1细胞的极化。3-硝基酪氨酸在PD-L1疫苗中的引入对Th1/Th2比例无影响。有研究显示，肿瘤患者具有较低的Th1/Th2比值，而相较于趋向于Th2细胞反应的患者，趋向于Th1反应的患者主要表现出较高的生存率和较低的肿瘤复发率。因此，Th1/Th2平衡向Th1细胞反应的转变有助于肿瘤的有效治疗[11]。

随后本研究分析了二者在PD-L1疫苗中的引入对Treg细胞比例的影响，4-硝基苯丙氨酸的在PD-L1疫苗中的引入显著降低Treg细胞的比例，而3-硝基酪氨酸的引入显著提高Treg细胞比例。Treg细胞是肿瘤免疫微环境中有效的免疫抑制细胞，特异性表达转录因子FOXP3，可通过分泌细胞

因子(IL-10/TGF-β)或者细胞间的直接接触来抑制CD8⁺T细胞使机体产生免疫耐受,维持机体稳态[12]。实验结果提示,机体可能把4-硝基苯丙氨酸的蛋白质作为外源蛋白处理,因此可能打破免疫耐受的能力更强。

值得关注的是,3-硝基酪氨酸的引入与4-硝基苯丙氨酸相比,能显著提高Th17细胞的比例,而很早有文献发现在患有不同炎症相关疾病(例如急性肺损伤、心血管疾病和系统性红斑狼疮)的患者血浆中[13-15],均可分离出识别3-硝基酪氨酸的免疫球蛋白,并且由于这些蛋白持续产生会激活免疫系统,因此可能在维持自身性免疫疾病中起作用。而Th17细胞能够通过分泌炎症介质IL-17诱导严重的自身免疫反应[16-17],上述结果提示,3-硝基酪氨酸可能在机体内作为一种炎症信号发挥作用。

本研究还分析了二者在PD-L1疫苗中的引入对CD8⁺ T细胞的影响,它们均能有效地促进CD8⁺ T细胞的激活,但4-硝基苯丙氨酸在PD-L1疫苗中的引入对CD8⁺T细胞的激活作用更强,这一结果与4-硝基苯丙氨酸的引入能显著提高Th1细胞的比例相一致,提示4-硝基苯丙氨酸更适用于抗肿瘤疫苗的开发。

参考文献

[1] Grünewald J, Tsao ML, Perera R, *et al*. Immunochemical termination of self-tolerance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(32): 11276-11280.

[2] Grünewald J, Hunt GS, Dong L, *et al*. Mechanistic studies of the immunochemical termination of self-tolerance with unnatural amino acids[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(11): 4337-4342.

[3] Khan F, Siddiqui AA. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, **370**(1/2): 100-107.

[4] Khan F, Ali R. Antibodies against nitric oxide damaged poly L-tyrosine and 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, **39**(2): 189-196.

[5] Thomson L, Christie J, Vadseth C, *et al*. Identification of immunoglobulins that recognize 3-nitrotyrosine in patients with acute lung injury after major trauma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, **36**(2): 152-157.

[6] Ohmori H, Kanayama N. Immunogenicity of an inflammation-associated product, tyrosine nitrated self-proteins[J]. *Autoimmun Rev*, 2005, **4**(4): 224-229.

[7] Hardy LL, Wick DA, Webb JR. Conversion of tyrosine to the inflammation-associated analog 3′-nitrotyrosine at either TCR- or MHC-contact positions can profoundly affect recognition of the MHC class I-restricted epitope of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein 33 by CD8 T cells[J]. *J Immunol*, 2008, **180**(9): 5956-5962.

[8] He Y, Tian H, Dai X, *et al*. Immunogenicity of HER2 vaccine containing *p*-nitrophenylalanine[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(3): 369-375.

[9] Tian H, He Y, Song XD, *et al*. Nitrated T helper cell epitopes enhance the immunogenicity of HER2 vaccine and induce antitumor immunity[J]. *Cancer Lett*, 2018, **430**: 79-87.

[10] Tian H, Kang YL, Song XD, *et al*. PDL1-targeted vaccine exhibits potent antitumor activity by simultaneously blocking PD1/PDL1 pathway and activating PDL1-specific immune responses[J]. *Cancer Lett*, 2020, **476**: 170-182.

[11] Datta J, Fracol M, McMillan MT, *et al*. Association of depressed anti-HER2 T-helper type 1 response with recurrence in patients with completely treated HER2-positive breast cancer: role for immune monitoring[J]. *JAMA Oncol*, 2016, **2**(2): 242-246.

[12] Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, *et al*. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells[J]. *J Immunol*, 2005, **174**(5): 2591-2601.

[13] Lakshminrusimha S, Suresh MV, Knight PR, *et al*. Role of pulmonary artery reactivity and nitric oxide in injury and inflammation following lung contusion[J]. *Shock*, 2013, **39**(3): 278-285.

[14] Thomson L. 3-Nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis[J]. *Dis Markers*, 2015, **2015**: 1-8.

[15] Ferreira I, Croca S, Raimondo MG, *et al*. Nitrated nucleosome levels and neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus; a multi-center retrospective case-control study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, **19**(1): 287.

[16] Jin B, Sun T, Yu XH, *et al*. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, **2012**: 836485.

[17] Li P, Spolski R, Liao W, *et al*. Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells[J]. *Immunol Rev*, 2014, **261**(1): 141-156.

·综　　述·

构象限制策略在药物设计中的应用

吴国丽[1],卢晓林[2],许晋芳[2*]

([1]山西省儿童医院药剂科,太原 030013;[2]山西医科大学药学院,太原 030001)

摘　要　在药物分子设计中,构象限制已成为先导化合物结构优化中重要的改造策略之一。本文综述了一些合理增加分子构象限制的应用实例。通过在分子中引入稠合环、大环、螺环、环丙基、桥环、甲基等结构,展示了构象限制策略在改善药代动力学性质、提高化合物的活性和选择性,以及增加化合物新颖性等方面的广泛应用。通过运用这些构象限制策略,能够显著改善先导化合物的成药性,以期能够为创新药物的设计与开发提供理论指导和实践经验。

关键词　构象限制;药物设计;结构优化

中图分类号　R914　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1000 -5048(2020)03 -0357 -11

doi:10. 11665/j. issn. 1000 -5048. 20200314

引用本文 吴国丽,卢晓林,许晋芳.构象限制策略在药物设计中的应用[J].中国药科大学学报,2020,51(3):357 - 367.

Cite this article as: WU Guoli,LU Xiaolin,XU Jinfang. Application of a conformational restriction strategy in drug design[J].*J China Pharm Univ*,2020,51(3):357 - 367.

Application of a conformational restriction strategy in drug design

WU Guoli[1], LU Xiaolin[2], XU Jinfang[2*]

[1]*Department of Pharmacy, Children's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030013;*

[2]*College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001,China*

Abstract　Conformational restriction has become one of the important strategies for modification and optimization of lead compounds in structure-based drug design. In this review, we select some recent practical examples from literature to present applications of conformational restriction in structure-based drug design. By introducing fused rings, macrocycles, spiral rings, cyclopropyl groups, bridging rings, methyl groups into molecules, we can find that the conformational restriction strategy is widely used in improving pharmacokinetic properties, enhancing the activity and selectivity, and increasing the novelty of compounds. By using these conformational restriction strategies, the drug-like properties of lead compounds can be significantly improved. This paper can help to provide theoretical guidance and practical experience for innovation in drug design and development.

Key words　conformational restriction; drug design; structural optimization

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31700306)

在药物化学中,对于可旋转键数目在5个或者5个以上的化合物,其晶体结构并不能代表其与蛋白结合的真实构象。此外,同一个药物的不同构象可能会与不同的靶点分子相结合,导致选择性降低,引起毒性和不良反应。药物分子拥有太多的自由旋转键不利于与靶蛋白的结合和口服吸收[1]。但是,在基于结构的药物设计中,适当的构象限制可用于控制配体构象,并使分子偏向所需的构象以进行结合[2]。因此,构象限制策略在先导化合物优化中具有重要意义。

收稿日期　2019-08-22　　*通信作者　Tel:0351-3985247　E-mail:xjf. 0358@163. com

基金项目　国家自然科学基金资助项目(No. 31700306)

对分子进行构象限制的方式有很多种,如柔性键可通过成环固定,柔性链可以通过引入大环、螺环、环丙基、桥环等结构进行构象限制,还可以通过引入甲基等立体位阻方式进行构象限制。

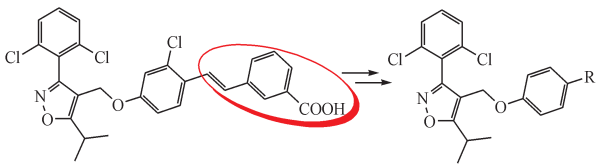
本文综述了在分子中引入稠合环、大环、螺环、环丙基、桥环、甲基等结构,采用构象限制策略,改善药代动力学性质、提高化合物的活性和选择性的研究进展,以期能够为创新药物的设计与开发提供参考。

1 成环化构象限制

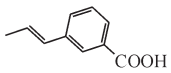
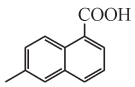
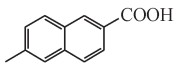
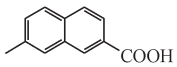
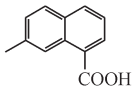
1.1 小环构象限制

药物设计中经常使用的一种策略是在分子结构中引入稠合环结构从而固定配体的构象。法尼醇受体(farnesoid X receptor,FXR)是一个潜在的肝病和脂肪代谢作用靶点,GW4046(**1**)(表1)是通过化合物库筛选的非甾体FXR激动剂。该化合物体外测试表现优异,然而药代动力学(pharmacokinetics,PK)属性较差(高清除率和低生物利用度)以及具有潜在的毒性和光不稳定性。主要原因是由结构中的二苯乙烯结构造成的,大大限制了其成药的可能性。二苯乙烯结构的构象刚性是实现激动作用的关键,因此在对二苯乙烯结构进行优化时,要充分保证其构象刚性。

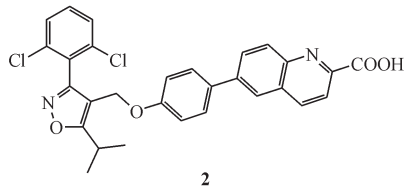
Table 1 Conformationally restricted design of questionable stilbene pharmacophores



GW4046 (**1**) **1a**-**1d**

Compd.	R	EC_{50}/(nmol/L)	Efficacy/%
1		59	100
1a		87	130
1b		420	69
1c		100	90
1d		2 300	52

用构象限制的萘环替代苯乙烯结构后,光稳定性得到了较大的提高。从活性数据结果来看,经改造的化合物活性得到了较好的保持,其中化合物**1a**为全激动剂且活性和GW4046(**1**)相近,但是该化合物的溶解性较差和口服暴露量有限。针对上述问题,该课题组将萘环进行不同位置的氮杂设计,细胞测试结果显示,化合物**2**(图1)和化合物**1a**的活性相近,同时表现出更好的生物利用度和更高的口服给药曲线下面积(AUC)[3]。



2

EC_{50} = 120 nmol/L (105% efficacy)

Figure 1 Structure of compound **2** with a quinoline moiety

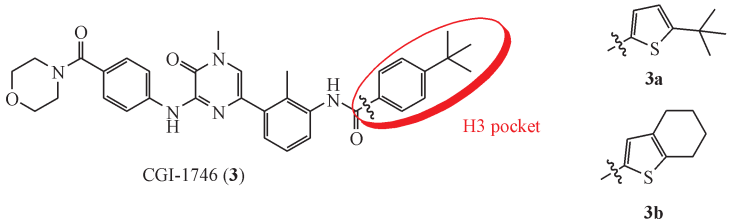
化合物CGI-1746(**3**)是由基因泰克公司(Genentech)研发的一个高效高选择性的、可逆的Bruton酪氨酸激酶(BTK)小分子抑制剂。但是该化合物的吸收、分布、代谢、排泄性能不好,在大鼠体内的清除率(CL)为87 mL/(min·kg),口服生物利用度(F)仅为5%,因此不适合作为候选化合物。Young等[4]通过构效关系分析,先改变该化合物右侧的H3口袋。考虑到低的生物利用度,尝试更改苯环的极性,用噻吩替代苯环得到化合物**3a**、**3b**,以期降低亲脂性,降低lg$D$,延长化合物在体内的停留时间。活性结果显示,化合物**3b**不仅与CGI-1746活性相当,而且在大鼠体内的生物利用度得到明显的提高(表2)。

在药物设计中,噻吩在生物体内并非是一个稳定的结构,由于富电子而容易被氧化代谢。但是在化合物**3a**和**3b**结构中,噻吩右侧大位阻的叔丁基和稠合成环的环己烷的构象限制作用,以及左侧酰基的吸电子作用,克服了噻吩环的不稳定性。

1.2 大环构象限制

大环类结构抑制剂一定程度上可以保留相对分子质量大小、保留较好的亲脂效率(lipophilic efficiency,LipE),并可以实现很好的构象限制。通过构象限制构建大环类抑制剂是近几年靶点药物

Table 2　Conformationally constrained design of H3 pocket in Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors



Compd.	Enzyme IC_{50} BTK/(μmol/L)	B-cell EC_{50} CD86/(μmol/L)	Rat *F* /%	Rat CL/ ($mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$)
3	0.008	0.15	<5	87
3a	0.06	0.49	NT	NT
3b	0.008	0.23	29	6

NT: not tested

研发的热点。

在肿瘤细胞内，Mcl-1（myeloid cell leukemia-1）抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白通过蛋白-蛋白相互作用（PPI）发挥抗凋亡作用，导致肿瘤细胞增殖。但这种 PPI 接触界面很大且亲和力强，对开发小分子药物产生较大困难。Tron 等[5]通过小分子-蛋白共晶结构发现，化合物 **4** 占据更大的疏水空间，并且采取“U”型构象，吡唑甲基与萘环仅相距 3.6 Å。基于这个结构特点，研究人员将吡唑甲基同萘环连接起来限制分子构象，得到接触面更大的大环化合物 **4a**。该化合物对 Mcl-1 的活性远高于化合物 **4**，IC_{50} 达到 19 nmol/L（图 2）。进一步优化得到的候选化合物，对 Mcl-1 表现出更强的抑制活性和选择性。

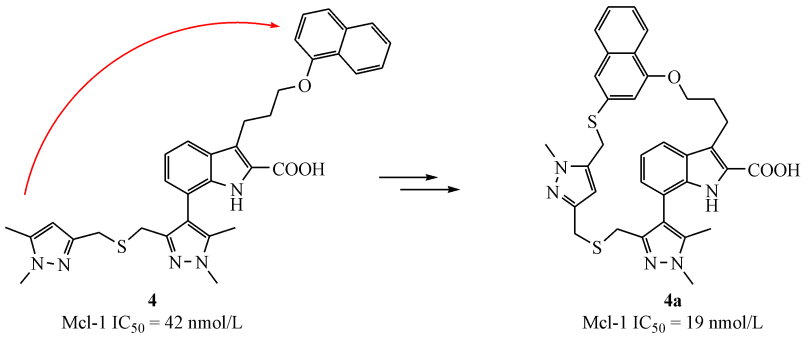


Figure 2　Conformational restriction by macrocyclization of U-shaped open chain molecular backbones in Mcl-1 inhibitors

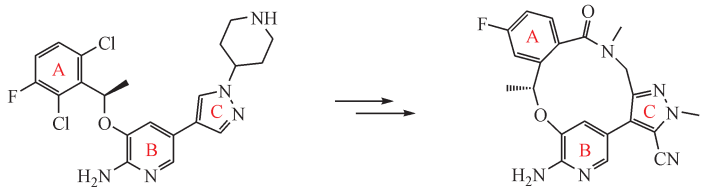
脂肪类的第一代、第二代间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase，ALK）抑制剂不能同时达到对突变型 pALK-L1196M 细胞高抑制活性和低药物外排率（BA/AB）的特性，难以提供药物在中枢神经系统中的暴露量。Johnson 等[6]基于前期化合物与 ALK 激酶的共晶结构发现，氟苯基基团与尾部的三唑基团相接近，整个分子呈现“U”型结合构象。应用基于“U”型构象的药物设计策略和 LipE，以克唑替尼（crizotinib，**5**）为先导化合物，经过一系列结构优化，最终得到了含有腈基吡唑基结构的酰胺大环类化合物劳拉替尼（lorlatinib，**5a**）。该化合物表现出良好的激酶选择性、良好的药代动力学特征、选择性脑渗透和强烈的抗增殖活性[7]（表 3）。

2　螺环化构象限制

螺环化合物是指含有两个环共用一个原子的化合物。螺环结构与平面的芳香结构相比，有着更大的空间三维结构，具有构象限制性，能以较低的熵值构象结合到靶点蛋白。由于其独特的结构特征以及良好的 PK 属性，螺环化合物越来越受到药物化学家的关注[8]。

格佐匹韦（grazoprevir，**6**）是由默沙东公司研制的一种口服治疗丙肝的药物，靶向慢性丙型肝

Table 3 Conformational restriction by macrocyclization of U-shaped open chain molecular backbones in anaplastic lymphoma kinase(ALK) inhibitors



Compd.	ALK K_i/(nmol/L)	ALK-L1196M K_i/(nmol/L)	pALK cell IC_{50}/(nmol/L)	pALK-L1196M cell IC_{50}/(nmol/L)	LipE	HLM CL	MDR BA/AB
5	0.74	8.2	80	843	4.1	44	44.5
5a	0.70	8.2	1.3	21	4.1	<8	1.5

HLM CL:Clearance in human liver microsomes; MDR:Multidrug resistance

炎(HCV)的NS3/4A蛋白酶。研究发现修饰P2喹啉区可以提高HCV基因3a型(gt3a)的活性[9],该课题组期望将结构刚性赋予这些优化的P2基团,以得到一个具有活性显著的新颖母核结构。Velázquez等[10]巧妙地将P2喹啉基团螺环化,得到的独特"螺环"脯氨酸,赋予分子更大的构象刚性,使分子构象偏向生物活性构象,提高了化合物活性。该系列类似物**6a**不仅突破了专利,而且活性得到提升,并且与原药相比对耐药的HCV病毒也有更好效果(图3)。

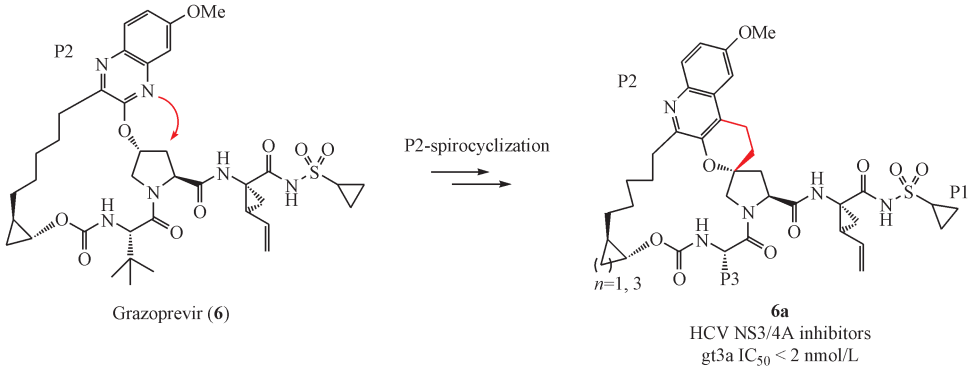


Figure 3 Conformational restriction by spirocyclization of the proline-P2 moiety

胆固醇酯转运蛋白(cholesteryl ester transfer protein,CETP)键合口袋的疏水特性决定了其抑制剂具有高度的亲脂性。然而高亲脂性的化合物对溶解度和药物分布具有显著的影响,具有较差的类药性。为了降低潜在的CETP抑制剂开发风险,将亲脂性的降低作为重要的结构改造策略。Triesselmann等[11]应用螺环策略,将化合物**7**的氟苄基侧链进行构象限制得到类似物**7a**,在降低脂溶性的同时,提高了对CETP的抑制活性。此外,化合物**7a**在转基因HCETP小鼠中表现出高效的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)升高和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)降低,而且在食蟹猴临床前体内试验时,其血压和心电图均无显著影响(图4)。

3 环丙基及其类似物构象限制

近年来,从临床前期到临床阶段的药物中,环丙基的使用越来越多。由于环丙基环的构象限制作用能够促进药物分子生物活性构象的形成,使其在药物分子设计中经常被应用。环丙基的引入对药物的多种性质产生影响,包括增强药效、提高代谢稳定性、提高生物利用度、改善半衰期、增加血-脑脊液屏障透过率以及改善水溶性等[12]。

化合物**8**是一个高效高选择性的具有吲哚唑啉-吲哚酮母核的polo样蛋白激酶4(polo-like kinases 4,PLK4)抑制剂。然而该系列母核的化合物显示出较差的药代动力学特性,特别是具有较低的口服暴露量。另一方面,这些烯烃连接抑制

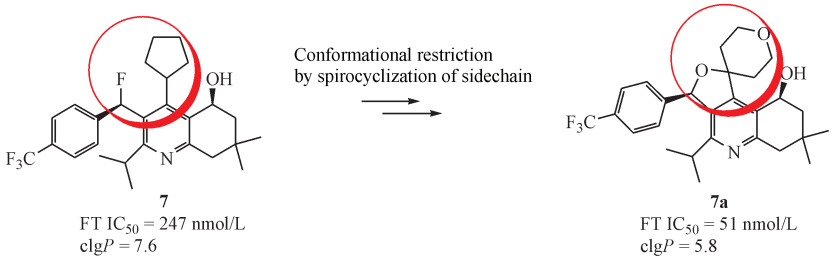
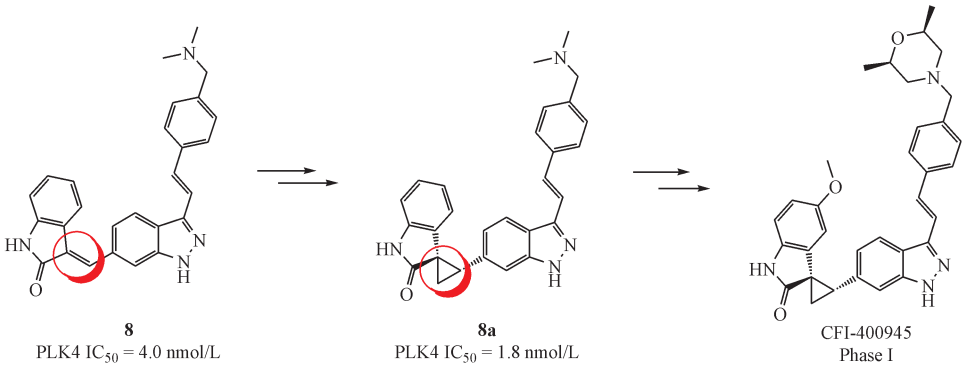


Figure 4　Conformational restriction by spirocyclization of sidechain

剂具有内在的构型不稳定性。Sampson 等[13]用环丙烷生物电子等排体替代化合物**8**中的刚性双键，得到构型稳定、代谢稳定性增强的化合物**8a**。经过其他侧链的进一步修饰得到候选药物 CFI-400945[14]。目前该药已经进入Ⅰ期临床实验阶段(表4)。

Table 4　Conformationally restricted design of the alkene moiety with instable configuration



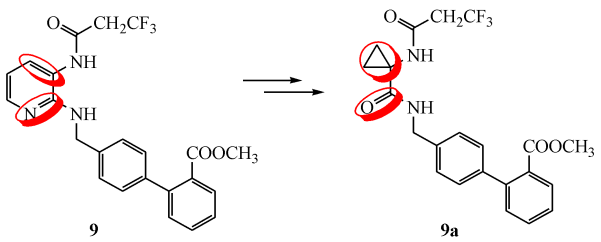
Compd.	PLK4 kinase IC_{50}/(nmol/L)	Cancer cell line GI_{50}/(nmol/L)		PK property			
		MCF-7	MDA-MB-468	Solubility/ (μg/mL)	$t_{1/2}$ [a]/min	$t_{1/2}$ [b]/min	AUC/(μg·h/mL)
8	4	7	12	<0.1	7	40	0.83
8a	1.8	<10	<10	1.7	13	>60	7.2

[a]Mouse liver microsomes; [b]Human liver microsomes

Feng 等[15]报道了含有二氨基吡啶骨架的缓激肽 B1(bradykinin B1)受体拮抗剂**9**的构效关系研究。进一步的研究结果显示，该类衍生物中的二氨基吡啶骨架容易被代谢[16]。为了克服该类衍生物的代谢不稳定性，Wood 等[17]利用环丙基酰胺基团替代二氨基吡啶骨架，经设计改造的环丙烷甲酰胺化合物**9a**尽管活性略微降低，但是该类化合物的 PK 属性得到了较好的改善(表5)。

辉瑞公司(Pfizer)研发人员通过对高通量筛选的先导化合物优化，获得了一个以腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activatedprotein kinase，AMPK)为靶点的β亚基选择性激动剂**10**，该化合物可以治疗模型动物的糖尿病肾病。虽然该化合物对 AMPK α1β1γ1 亚型具有较好激动作用，但是在大鼠和人

Table 5　Conformationally restricted design of the diaminopyridine scaffold

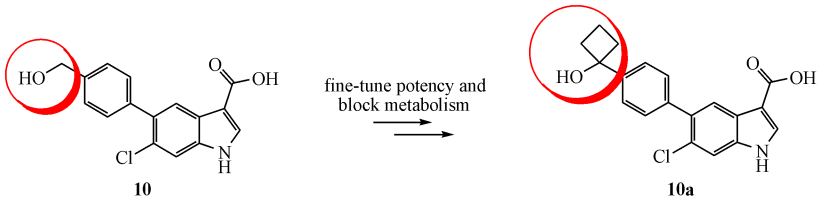


Compd.	hBK1 K_i/ (nmol/L)	Rat PK profile		
		F/%	$t_{1/2}$/h	CL/ (mL·min^{-1}·kg^{-1})
9	12	9	0.2	35
9a	63	26	9.5	9.3

hBK1:Human bradykinin B1

的肝细胞中具有较高的清除率。Cameron等[18]推测可能是由于苄醇的苄位亚甲基容易发生代谢。因此,将苄醇α位碳原子用环丁基替代,得到类似物**10a**。活性结果显示,该化合物不仅具有纳摩尔级别的活性,而且具有良好的体外药代动力学性质(表6)。大位阻的环丁基在苄位具有构象限制的作用,阻碍了亚甲基的代谢,改善了化合物的代谢稳定性和体内暴露量,同时使活性提高。

Table 6 Conformationally restricted design of the easily metabolizable benzylidene moiety



Compd.	Activation-protection α1β 1γ1 EC_{50}/(nmol/L)	lg*D*	Permeability/ (10^{-6} cm/s)	Apparent solubility/(μmol/L)	Human/Rat HEP. CL/ (μL·min^{-1}·million $cells^{-1}$)
10	53	1.2	3.5	494	70/>170
10a	7.0	2.0	5.8	406	14/27

Human/Rat HEP. CL:Human/Rat hepatic clearance

4 桥环化构象限制

4.1 哌嗪、吗啉和哌啶桥环化构象限制

吗啉及其衍生物既可以通过与靶蛋白的相互作用,来增强化合物的效力,又可以作为基团来调节化合物的理化性质,因此吗啉及其衍生物是药物研发中使用频率较高的基团[19]。有研究发现,具有代谢不稳定、hERG钾通道抑制的含有吗啉或者其衍生物结构的化合物,引入桥环后,由桥环带来的微妙的构象限制不仅可以显著改善药物的药代动力学性质,而且可以提高化合物的选择性和活性。

以白细胞介素-1受体相关激酶4(interleukin-1 receptor-associated kinase 4,IRAK4)抑制剂为例,在化合物**11**的哌嗪环结构上引入一个亚甲基,得到类似物**11a**和**11b**。结果显示,大鼠的肝清除率明显下降,同时没有明显的hERG抑制增加和渗透性增加[20](表7)。

同理,又如在吗啉结构上引入桥环后,将ATR激酶抑制剂**12**改造为桥环**12a**。活性结果显示,该化合物的肝清除率和hERG抑制得到明显改善,然而对ATR激酶的抑制作用却有所下降[21](表8)。

GW4064(**1**)是一种有效的FXR激动剂,为了提高化合物的成药性,Tully等[22]在其他相关研究的基础上,将GW4046(**1**)结构中间的苯环用哌啶环替代,开发出了含哌啶环的异噁唑类FXR激动剂**13**,其活性相比GW4046体外活性提高了一倍多,但是其血浆清除率较高且口服生物利用度极低(6%)。在后期亲脂性和代谢稳定性优化中,得到了化合物活性和PK属性较好的化合物**13a**和**13b**(图5)。

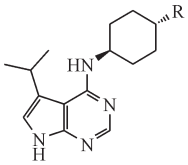
由于苯环用哌啶环替代,分子构象自由度也随之增加。将哌啶环用构象限制的莨菪烷替代后,化合物**13b**的活性得到极大的提高。这可能是由于莨菪烷的桥环结构能够最大限度的保持分子的构象刚性。后续的活性测试和PK试验中,化合物**13b**表现优异,是一个非常理想的异噁唑类FXR激动剂。

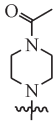
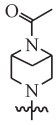
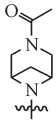
4.2 BCP构象限制

双环[1.1.1]戊烷(BCP)具有对称、刚性棒状的立体结构,以及亲脂性、增强电负性等理化性质。另外,从成药性角度分析,化合物结构中含有太多平面的芳香环结构时成药性下降。因此BCP在药物设计中的应用已经逐渐引起药物化学家的重视[23]。

Avagacestat(**14**)是曾处于临床Ⅱ期的用于治疗阿尔茨海默病的γ-分泌酶抑制剂,Stepan等[24]将该化合物结构中的对位取代氟苯环用BCP替代,得到类似物**14a**,极大地提高了其被动渗透性、水溶性和代谢稳定性(表9)。BCP体系相对于苯环其三维性增加,提高其构象限制性,而这一特性破

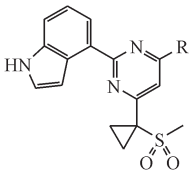
Table 7　Conformationally restricted carbon-bridge analogs of piperazines



Compd.	R	pK_a	lg$D_{7.4}$	hERG IC_{50}/ (μmol/L)	Caco-2 P_{app}/(10^{-6} cm/s)	Rat Hep. CL_{int}/ (μL·min^{-1}·million cells^{-1})
11		7.2	2.2	18	2.3	22
11a		7.5	2.0	>40	2.0	5.7
11b		7.4	1.8	>40	0.9	5.5

Rat Hep. Cl_{int}:Rat hepatic intrinsic clearance; P_{app}:apparent permeability

Table 8　Conformationally restricted carbon-bridge analogs of morpholines



Compd.	R	ATR IC_{50}/ (μmol/L)	lg$D_{7.4}$	hERG IC_{50}/ (μmol/L)	Rat Hep. CL_{int}/ (μL·min^{-1}·million cells^{-1})
12		0.008	2.2	>40	8.2
12a		0.206	2.1	>100	5.3

坏了两个苯环之间的 π-π 堆积作用以及平面性，从而使化合物 **14a** 具有良好的体外药代动力学性质。

他扎罗汀（tazarotene，**15**）是 FDA 批准的用于治疗银屑病、痤疮，并用于角化异常性疾病的二种维 A 酸受体（RAR-β，RAR-γ）激动剂药物，具有刚性的双芳香基乙炔结构。Makarov 等[25]尝试用多维的刚性 BCP 基团替代炔基，合成了 Tazarotene 类似物 **15a**。通过比较两种化合物的理化性质发现，类似物 **15a** 在 pK_a 以及非特异性键合等性质上与 tazarotene 非常接近（表 10）。

5　甲基化构象限制

甲基是小分子药物中最常见基团之一，在药物分子的合理设计中起到重要作用。甲基具有一定的空间体积，在分子中巧妙地引入甲基可以产生位阻作用，引起分子构象改变，从而增加小分子与靶标蛋白的相互作用，提高药效[26-27]。

葛兰素史克公司（GlaxoSmithKline）的一个经典的案例——p38α MAPK 激酶抑制剂，充分证明

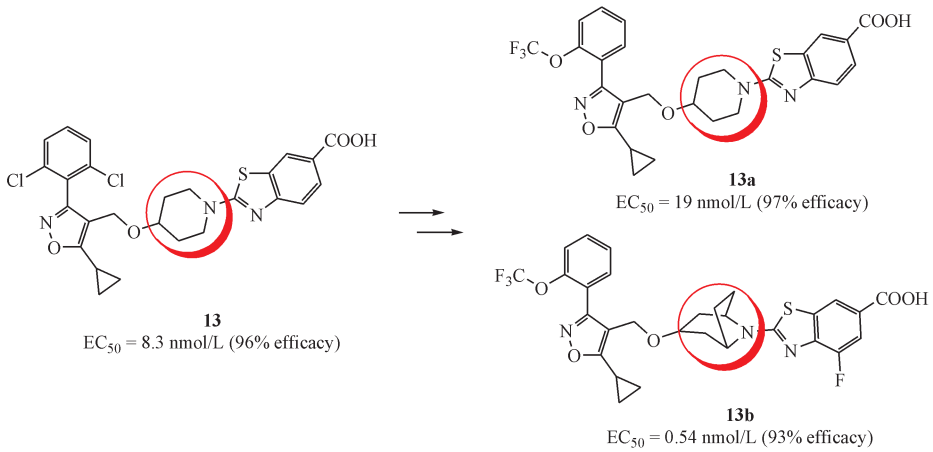
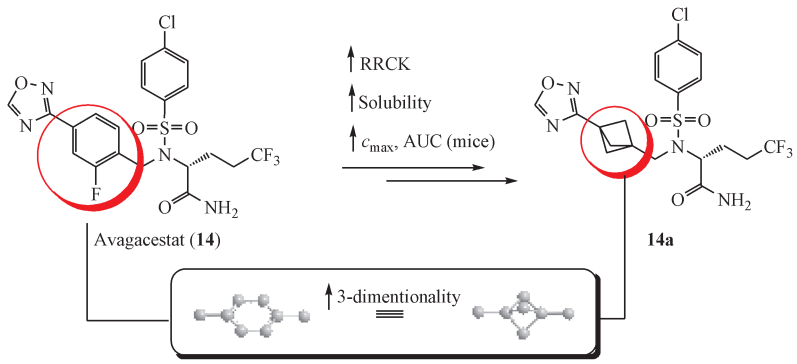


Figure 5 Conformationally restricted carbon-bridge analogs of piperidines

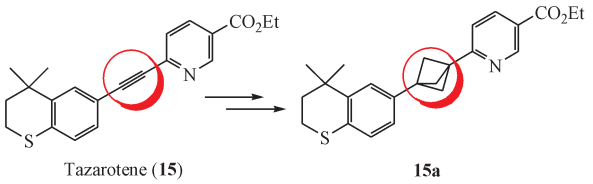
Table 9 Conformationally constrained design of the phenyl group



Compd.	$A\beta_{42}$ IC_{50}/(nmol/L)	Human Hep. CL/($\mu L \cdot min^{-1} \cdot$ million $cells^{-1}$)	HLM CL/($mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$)	Elg*D*	RRCK P_{app}/(10^{-6} cm/s)	Kinetic solubility/(μmol/L)	AUC, mice brain/($\mu mol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
14	0.225	15	<16.2	4.70	5.52	0.60	5.18
14a	0.178	<3.8	<8.17	3.80	19.3	216	12.0

RRCK:Ralph russ canine kidney

Table 10 Conformationally constrained design of the alkynyl group



Compd.	mp/℃	pK_a	CHI (IAM)
15	103.4	2.1	52.9
15a	167.7	3.0	53.1

CHI (IAM): Chromatographic hydrophobicity index on immobilized artificial membranes

了甲基所带来的生物活性效应。化合物**16**与化合物**16a**虽然只相差了一个甲基,生物活性却相差了208倍(图6)。共晶结构显示,化合物**16a**结合激酶时的二面角为85°。由于仅仅依靠单个甲基的疏水相互作用,是很难提高200多倍的亲和力。所以,该甲基除了通过与蛋白形成疏水相互作用增加活性外,更为重要的是通过构象限制影响两个苯环的二面角的角度,显著地提高了生物学活性[28]。

化合物**17**是一种高效的分泌型磷脂酶A2

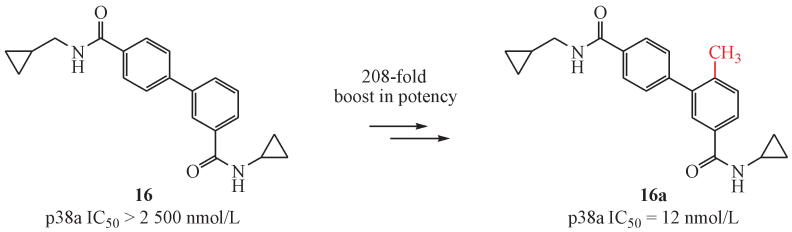


Figure 6　Methyl effects in p38α MAPK kinase inhibitors

(sPLA2)抑制剂，具有较高的生物利用度和较低的系统清除率。但不足的是，该化合物对有机阴离子转运多肽 1B1(OATP1B1)有明显的抑制活性。Giordanetto 等[29]为了避免与他汀类药物联合用药时，所带来的药物相互作用的潜在风险。在羧基的 α 位引入一个甲基，得到了类似物 AZD2716(**17a**)。甲基引起的立体障碍，限制了该化合物中羧基与 OATP1B1 的键合。活性结果显示，AZD2716 对 sPLA2 的抑制活性是化合物 **17** 的 70 倍。更为重要的是，在最大测试浓度 25 μmol/L 时，其对 OATP1B1 没有抑制作用(图 7)。最终该药物分子被阿斯利康选为治疗冠状动脉疾病的临床候选药物。

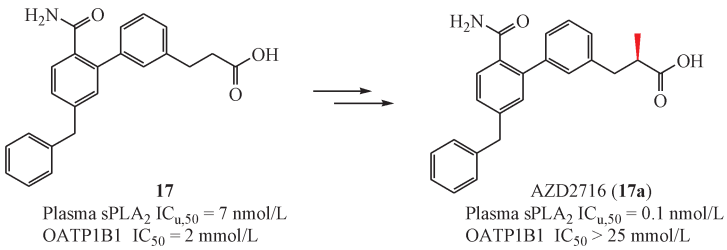


Figure 7　Methyl effects in sPLA2 inhibitors

双重食欲素受体拮抗剂(dual orexin receptor antagonist，DORs)的构象分析和构效关系研究表明，强效的 DORs 往往采用一个“U”型构象[30]。基于对这种构象的理解，Coleman 等[31]在化合物 **18** 的哌啶环的 2 位引入一个甲基，得到活性显著增强的哌啶类似物 **18a**(图 8)。然而该化合物的溶解性较差(<24 μmol/L)，口服生物利用度较低(<10%)。进一步优化得到嘧啶类似物 filorexant(**18b**)，该化合物对食欲素受体 OX_1(OX_1R)和 OX_2(OX_2R)的活性得到改善，并显著提高了水溶性(192 μmol/L)和口服生物利用度(大鼠和狗分别为 25% 和 26%)。Filorexant 与受体的共晶结构显示，2，5-二取代的哌啶在椅式构象中处于反式的位置。其中，嘧啶环吡邻氟吡啶环形成 π-π 堆积作用。推测其原因可能是由于甲基诱导分子向有利构象变化，促使 5 位的亚甲氧基与其处于椅式构象的反式，使 Filorexant 更容易结合受体的构象。

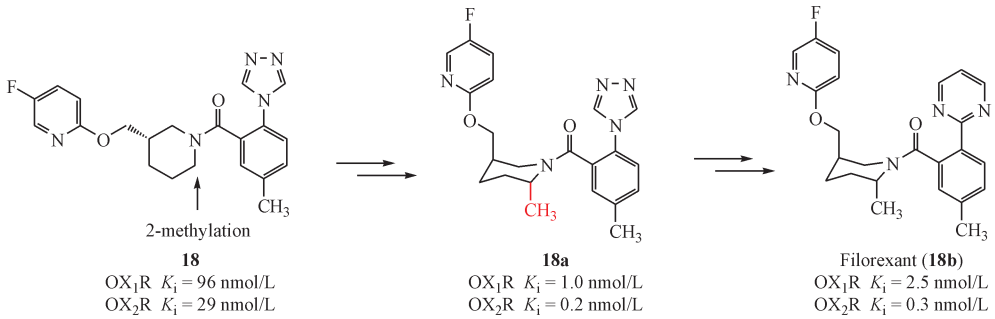


Figure 8　Methyl effects in dual orexin receptor antagonist(DOR)s

6 结 语

构象限制是近年来逐渐发展和扩充的策略，涉及到成环化、螺环化、桥环化、引入甲基等方法。此类结构修饰不仅可以提高化合物的活性和选择性、改善药代动力学性质，而且可以完善结构缺陷、突破专利保护，得到更为理想的新颖化合物，为先导化合物结构改造提供新的研究思路。综上所述，适当的构象限制已经成为先导化合物结构优化的重要策略之一，相信其在未来的药物研发中会发挥更多的作用。

参 考 文 献

[1] Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2004, **1**(4): 337-341.

[2] Zheng YJ, Tice CM, Singh SB. Conformational control in structure-based drug design[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, **27**(13): 2825-2837.

[3] Akwabi-Ameyaw A, Bass JY, Caldwell RD, *et al*. Conformationally constrained farnesoid X receptor (FXR) agonists: naphthoic acid-based analogs of GW 4064 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(15): 4339-4343.

[4] Young WB, Barbosa J, Blomgren P, *et al*. Potent and selective Bruton's tyrosine kinase inhibitors: discovery of GDC-0834 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25**(6): 1333-1337.

[5] Tron AE, Belmonte MA, Adam A, *et al*. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 5341.

[6] Johnson TW, Richardson PF, Bailey S, *et al*. Discovery of (10*R*)-7-amino-12-fluoro-2, 10, 16-trimethyl-15-oxo-10, 15, 16, 17-tetrahydro-2*H*-8, 4-(metheno)pyrazolo[4, 3-h][2, 5, 11] -benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations[J]. *J Med Chem*, 2014, **57**(11): 4720-4744.

[7] Basit S, Ashraf Z, Lee K, *et al*. First macrocyclic 3rd-generation ALK inhibitor for treatment of ALK/ROS1 cancer: clinical and designing strategy update of lorlatinib [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, **134**: 348-356.

[8] Zheng YJ, Tice CM, Singh SB. The use of spirocyclic scaffolds in drug discovery[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, **24**(16): 3673-3682.

[9] Shah U, Jayne C, Chackalamannil S, *et al*. Novel quinoline-based P2-P4 macrocyclic derivatives as *Pan*-genotypic HCV NS3/4a protease inhibitors[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, **5**(3): 264-269.

[10] Velázquez F, Chelliah M, Clasby M, *et al*. Design and synthesis of P2-P4 macrocycles containing a unique spirocyclic proline: a new class of HCV NS3/4A inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, **7**(12): 1173-1178.

[11] Trieselmann T, Wagner H, Fuchs K, *et al*. Potent cholesteryl ester transfer protein inhibitors of reduced lipophilicity: 1, 1′-spiro-substituted hexahydrofuroquinoline derivatives[J]. *J Med Chem*, 2014, **57**(21): 8766-8776.

[12] Talele TT. The "cyclopropyl fragment" is a versatile player that frequently appears in preclinical/clinical drug molecules[J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(19): 8712-8756.

[13] Sampson PB, Liu Y, Patel NK, *et al*. The discovery of Polo-like kinase 4 inhibitors: design and optimization of spiro[cyclopropane-1, 3′[3*H*]indol]-2′(1′*H*)-ones as orally bioavailable antitumor agents[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(1): 130-146.

[14] Sampson PB, Liu Y, Forrest B, *et al*. The discovery of Polo-like kinase 4 inhibitors: identification of (1*R*, 2*S*). 2-(3-((*E*).4-(((*cis*).2, 6-dimethylmorpholino)methyl)styryl). 1*H*. indazol-6-yl) -5′-methoxyspiro [cyclopropane-1, 3′-indolin] -2′-one (CFI-400945) as a potent, orally active antitumor agent [J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(1): 147-169.

[15] Feng DM, Wai JM, Kuduk SD, *et al*. 2, 3-Diaminopyridine as a platform for designing structurally unique nonpeptide bradykinin B1 receptor antagonists[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15**(9): 2385-2388.

[16] Tang CY, Subramanian R, Kuo Y, *et al*. Bioactivation of 2, 3-diaminopyridine-containing bradykinin B1 receptor antagonists: irreversible binding to liver microsomal proteins and formation of glutathione conjugates[J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, **18**(6): 934-945.

[17] Wood MR, Schirripa KM, Kim JJ, *et al*. Cyclopropylamino acid amide as a pharmacophoric replacement for 2, 3-diaminopyridine. Application to the design of novel bradykinin B1 receptor antagonists[J]. *J Med Chem*, 2006, **49**(4): 1231-1234.

[18] Cameron KO, Kung DW, Kalgutkar AS, *et al*. Discovery and preclinical characterization of 6-chloro-5-[4-(1-hydroxycyclobutyl)phenyl]-1*H*-indole-3-carboxylic acid (PF-06409577), a direct activator of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), for the potential treatment of diabetic nephropathy[J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(17): 8068-8081.

[19] Degorce SL, Bodnarchuk MS, Cumming IA, *et al*. Lowering lipophilicity by adding carbon: one-carbon bridges of morpholines and piperazines[J]. *J Med Chem*, 2018, **61**(19): 8934-8943.

[20] Scott JS, Degorce SL, Anjum R, *et al*. Discovery and optimization of pyrrolopyrimidine inhibitors of interleukin-1 receptor associated kinase 4 (IRAK4) for the treatment of mutant

MYD88^{L265P} diffuse large B-cell lymphoma[J]. *J Med Chem*, 2017, **60**(24): 10071-10091.

[21] Foote KM, Blades K, Cronin A, *et al*. Discovery of 4-{4-[(3*R*)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl}-1*H*-indole (AZ20): a potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy *in vivo* antitumor activity[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(5): 2125-2138.

[22] Tully DC, Rucker PV, Chianelli D, *et al*. Discovery of tropifexor (LJN452), a highly potent non-bile acid FXR agonist for the treatment of cholestatic liver diseases and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)[J]. *J Med Chem*, 2017, **60**(24): 9960-9973.

[23] Lopchuk JM, Fjelbye K, Kawamata Y, *et al*. Strain-release heteroatom functionalization: development, scope, and stereospecificity[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(8): 3209-3226.

[24] Stepan AF, Subramanyam C, Efremov IV, *et al*. Application of the bicyclo[1.1.1]pentane motif as a nonclassical phenyl ring bioisostere in the design of a potent and orally active γ-secretase inhibitor[J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(7): 3414-3424.

[25] Makarov IS, Brocklehurst CE, Karaghiosoff K, *et al*. Synthesis of bicyclo[1.1.1]pentane bioisosteres of internal alkynes and Para-disubstituted benzenes from [1.1.1]propellane[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(41): 12774-12777.

[26] Schönherr H, Cernak T. Profound methyl effects in drug discovery and a call for new C-H methylation reactions[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(47): 12256-12267.

[27] Sun SY, Fu JM. Methyl-containing pharmaceuticals: methylation in drug design[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, **28**(20): 3283-3289.

[28] Angell R, Aston NM, Bamborough P, *et al*. Biphenyl amide p38 kinase inhibitors 3: improvement of cellular and *in vivo* activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(15): 4428-4432.

[29] Giordanetto F, Pettersen D, Starke I, *et al*. Discovery of AZD2716: a novel secreted phospholipase A_2 ($sPLA_2$) inhibitor for the treatment of coronary artery disease[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, **7**(10): 884-889.

[30] Cox CD, McGaughey GB, Bogusky MJ, *et al*. Conformational analysis of *N*, *N*-disubstituted-1, 4-diazepane orexin receptor antagonists and implications for receptor binding[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**(11): 2997-3001.

[31] Coleman PJ, Schreier JD, Cox CD, *et al*. Discovery of [(2*R*, 5*R*)-5-{[(5-fluoropyridin-2-yl)oxy]methyl}-2- methylpiperidin-1-yl][5-methyl-2-(pyrimidin-2-yl) phenyl] methanone (MK-6096): a dual orexin receptor antagonist with potent sleep-promoting properties[J]. *ChemMedChem*, 2012, **7**(3): 415-424, 337.

Journal of China Pharmaceutical University
中国藥科大學 学报

中国藥科大學 学报

中国精品科技期刊　中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊　中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿
提供药学领域的前沿信息　反映最新的药学研究进展

创新成果
展示医药科技最新成果　构建学术交流的平台

研究论文
科学研究原创论文　国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号：28-115，欢迎订阅，欢迎投稿！

中国药科大学学报
Journal of China Pharmaceutical University 2020,51(3):368 – 373

蛋白质组学在糖尿病及其并发症中的应用

陶颖君,吴 洁,刘 畅*

(中国药科大学生命科学与技术学院,南京 211198)

摘 要 蛋白质组学是近年来兴起的研究各种疾病的最前沿领域和热点之一,蛋白组学的发展为糖尿病早期诊断及治疗提供了新的研究方向并取得一定的研究成果,糖尿病早期诊断有助于控制患者的病情发展甚至免于手术治疗,对于改善患者预后具有重要意义。本文从蛋白质组学研究技术及其在糖尿病及并发症中应用的现状和前景进行了总结,就蛋白质组学的快速发展对糖尿病研究的影响以及在发现更多糖尿病生物标志物方面的积极作用进行了展望,未来的研究应更加注重发现生物标志物之间的相互联系,为糖尿病及其并发症的诊断与治疗提供新的思路。

关键词 蛋白质组学;糖尿病;糖尿病并发症;早期诊断;生物标志物

中图分类号 Q51;R587 **文献标志码** A **文章编号** 1000 –5048(2020)03 –0368 –06

doi:10. 11665/j. issn. 1000 –5048. 20200315

引用本文 陶颖君,吴洁,刘畅.蛋白质组学在糖尿病及其并发症中的应用[J].中国药科大学学报,2020,51(3):368 - 373.

Cite this article as: TAO Yingjun, WU Jie, LIU Chang. Application of proteomics in diabetes and its complications[J]. *J China Pharm Univ*, 2020,51(3):368 - 373.

Application of proteomics in diabetes and its complications

TAO Yingjun, WU Jie, LIU Chang*

School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Proteomics is one of the most advanced fields and hotspots in the research of various diseases in recent years. Its development has provided a new research direction for the early diagnosis and treatment of diabetes and has achieved some research results. Early diagnosis is helpful to control the progression of the disease or even avoid surgical treatment, which is of great significance for improving the prognosis of patients. This paper reviews the current status and prospects of proteomic technology and its applications in diabetes as well as its complications with a prospect of the impact of the rapid development of proteomics on diabetes and its positive role in discovering more diabetes biomarkers. In the future research, more attention should be paid to the interconnections between biomarkers.

Key words proteomics; diabetes; diabetic complications; early diagnosis; biomarker

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673340)

1 蛋白质组学及其研究方法

蛋白质组学本质是在大规模水平上对蛋白质进行研究,包括蛋白质表达、翻译后修饰、蛋白质间相互作用等[1]。通过全面筛选复杂的蛋白质,测量多种蛋白质变化并运用大量生物信息学技术等,提供蛋白质表达改变的定性和定量证据[2],最终整体而全面地认识蛋白质水平上疾病的发生以及细胞的变化等过程。

目前研究蛋白质组学主要的方法包括双向凝胶电泳(2-DE)、高效液相色谱(HPLC)、飞行时间质谱(TOF-MS)、同位素亲和标签(SID-MRM)、半定量多反应监测(SQ-MRM)和生物信息学技术等,

收稿日期 2019-10-30 * **通信作者** Tel:025-86185443 E-mail: changliu@cpu. edu. cn
基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81673340)

其中最常用的是双向凝胶电泳和高效液相色谱法。双向凝胶电泳是一种多功能的基于凝胶的技术，可以对蛋白质进行定性和定量分析。通过凝胶图像分析显示不同样品或条件之间差异表达的斑点，结合质谱则可以进一步识别所选斑点中存在的蛋白质从而实现对蛋白质的鉴定[3]（如图 1）。高效液相色谱以液体为流动相，采用高压输液系统实现对样品的分析，在典型条件下与质谱仪在线耦合，从而对分析柱中洗脱的肽或蛋白质直接进行定性或定量分析[4]。随着更多更好性能的质谱仪逐渐普及，并行反应监测（PRM）和质谱连续窗口分段式扫描技术（SWATH）可以提供关于不同条件下更多蛋白质组变化的定性和定量数据，监测各种条件下个体蛋白质相对或绝对水平的变化，从而为生物标志物研究提供更多有价值的信息[5]，并且为蛋白质组学的研究提供了便利。

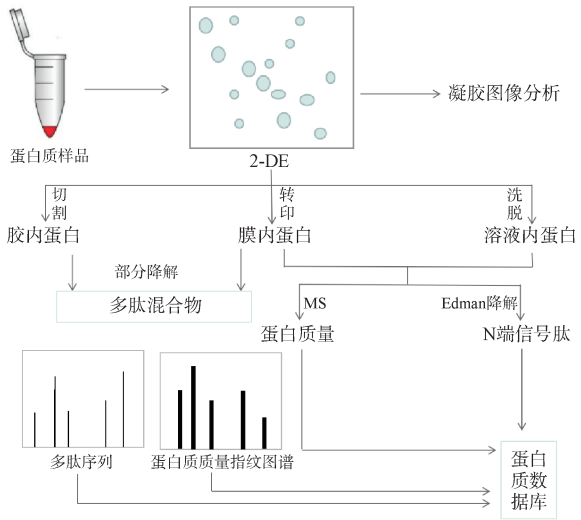


图 1　蛋白质组学双向凝胶电泳（2-DE）检测示意图

2　糖尿病

1 型糖尿病（T1D）是一种慢性自身免疫性疾病，是由胰岛 β 细胞，免疫系统和遗传易感个体的外部环境之间复杂的相互作用引起的[6-7]，占我国糖尿病 10% 左右。2 型糖尿病（T2D）是以胰岛功能受损、胰岛素抵抗为主要病因而导致的胰岛素相对缺乏，受后天生活习惯影响很大，线粒体呼吸活动受损会导致 T2D 胰岛素抵抗的发展[8]。我国 T2D 占糖尿病的 90% 左右。糖尿病可导致严重的健康问题，尤其是心血管和肾脏并发症[9]，是糖尿病患者死亡更主要的原因。由于并发症的致死性威胁，早期诊断显得尤为重要，其有助于控制患者的病情发展甚至免于手术治疗，对于改善患者预后具有重要意义。而蛋白质组学的发展也为糖尿病早期诊断提供了新的研究方向及可能。

3　蛋白质组学与糖尿病及其并发症

3.1　蛋白质组学在糖尿病诊断与致病机制研究中的应用

目前，在临床症状发作前用于预测是否有患 T1D 风险的最佳方法是测量胰岛细胞抗原的自身抗体[10]。这些自身抗原包括谷氨酸脱羧酶（GAD）、蛋白酪氨酸磷酸酶（IA-2）、胰岛素以及锌转运蛋白 ZnT8 等。尽管多年来自身抗体检测的性能已大大提高，但并非所有胰岛自身抗体阳性受试者都进展至 T1D，而且 T1D 中胰岛自身抗体的致病作用仍然难以捉摸[11]，所以无法有效预测 T1D 的发生，但是近年来随着蛋白质组学的飞速发展，对于 T1D 的诊断也有了新的进展。Soggiu 等[12]采用高分辨率双向凝胶电泳分离 T1D 患者和健康受试者的尿蛋白，并通过 LC-MS/MS 进行分析，发现两者的尿蛋白之间存在差异，其中 Tamm-Horsfall 尿糖蛋白、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 E、α2-硫醇蛋白酶抑制剂和人补体调节蛋白 CD59 等 5 种蛋白质被下调，而 α-1-微球蛋白、锌-α2 糖蛋白、α-1B 糖蛋白和视黄醇结合蛋白 4 等 4 种蛋白质被上调。

Huth 等[13]运用蛋白质组学对与 T2D 预测及早期诊断相关的蛋白质进行了鉴定。团队选择了 892 名年龄在 42 ~ 81 岁之间的受试者，其中包括 123 位 T2D 患者和 255 位 WHO 定义的糖尿病前期患者。得出了甘露聚糖结合凝集素丝氨酸肽酶（MASP）水平与 T2D 和前驱糖尿病呈正相关。脂联素与 T2D 发病呈负相关。 MASP、脂联素、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 C-II 和 C 反应蛋白等与预后相关。这些研究在蛋白质水平上给糖尿病的预测方法提供了一个新的方向。

近年来的研究表明，T1D 的发生与人类肠道病毒尤其是柯萨奇 B 组病毒（group B Coxsackie viruses，CVB）的感染关系密切。Lietzén 等[14]利用基于质谱的蛋白组学研究了 CVB 持续感染人胰腺细胞后对细胞内蛋白表达和分泌的影响，发现会导致一系列广泛的变化，包括线粒体网络形态、能量代谢、分泌途径调节以及抗病毒免疫反应蛋白的表

达。该研究结果为T1D的病毒致病机制提供了信息和新的研究思路。

3.2 蛋白质组学在糖尿病并发症诊断中的应用

3.2.1 糖尿病视网膜病变(DR) 糖尿病视网膜病变(DR)是由糖尿病引起的常见微血管并发症,这种病症是血管起源的,其特征是视网膜缺血以及血管通透性增加,是成人T1D患者视力损害和丧失的主要原因,它在一定程度上最终影响超过90%的糖尿病患者[15-16]。DR可以在没有任何严重症状的情况下发展,引起视力减退,目前主要治疗方法是视网膜光凝术和玻璃体视网膜手术[17],若能及早发现,则可通过控制系统性危险因素,如高血糖、高血压和血脂异常等[18]改善临床症状避免手术。因此DR的早期发现至关重要,亟需尽快改进DR的诊断筛查方法。Jin等[18]进行了一项全面的蛋白质组学研究,以确定DR的生物标志物。其通过使用SQ-MRM和SID-MRM分析糖尿病无视网膜病变、轻度和中度非增殖性视网膜病变的患者血浆,得出了4种蛋白分子:载脂蛋白APO4、C7、CLU和ITIH2,可作为早期DR的新型生物标志物,但是该研究需使用更大的蛋白质组进行进一步验证。除此之外,由于泪液可非侵入性收集且含有相对高的蛋白质浓度,故其可成为发现生物标志物的良好来源,有助于早期诊断,因此泪液蛋白质组学可以作为一种潜在的新型人群筛查工具[19]。Csösz等[5]在单一系统中使用微动脉瘤检测器结合泪液蛋白质组学提高了糖尿病视网膜病变筛查方法的敏感性和特异性。运用蛋白质组学技术检查泪液,已经鉴定出多种蛋白质作为糖尿病视网膜病变不同阶段的可能生物标志物,而这些生物标志物或许能够改进已有的DR检测筛查方法。

3.2.2 糖尿病肾病(DN) 糖尿病肾病(DN)是由于糖尿病影响体内葡萄糖平衡而引起的严重并发症[20]。它已成为发达国家慢性肾病最常见的原因[21]。在DN领域的临床实践和研究中,尿微量白蛋白(MAU)的概念至关重要。然而,近年来仅仅基于MAU诊断DN的方法受到质疑。虽然MAU的绝对水平和变化率与DN的发生和进展有关,但其本身缺乏准确预测糖尿病肾病的敏感性或特异性[22-23]。de Boer等[24]在糖尿病控制和并发症试验/糖尿病干预和并发症流行病学(DCCT / EDIC)研究中量化了MAU异常变化后长期肾脏转归的发生率和危险因素。DCCT随机分配了1 441名T1D患者进行强化或常规糖尿病治疗,并在观察性EDIC研究期间对参与者进行随访,发现在持续性MAU发展之后,肾脏疾病的进展和消退通常都会发生。同时,其他纵向观察性研究发现在儿童和成人的T1D和T2D患者中也具有相似的现象[25]。因此,这些研究表明MAU可能不是研究DN进展的理想标志[26]。而且,虽然肾组织病理学活检分析能准确诊断糖尿病患者的组织学损伤,但大多数医疗中心并不经常进行肾活检分析[27]。所以,除MAU和肾活检外,需要寻找更加准确有效的非侵入性生物标志物用于DN的早期诊断。

现已有多种研究蛋白质组学的方法用于DN诊断,如2-DE、LC-MS/MS、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、蛋白质微阵列和芯片上的微流体技术等[28]。Hirao等[20]通过LC-MS/MS对无微量白蛋白尿的糖尿病患者和健康受试者的尿蛋白质组进行全面分析,采用无标记半定量法和基因本体论分别对健康受试者尿液中的942种蛋白质和糖尿病患者尿液中的645种蛋白质进行鉴定分析,通过图2严格鉴定的蛋白质组韦恩图可以看出,有327种蛋白质是健康人群特有的,30种蛋白质是糖尿病患者特有的,两类人群共有615种蛋白质[20]。通过所测蛋白质在患者和健康人尿液中的调节水平来阐明变化途径,希望可以发现用于DN早期诊断的生物标志物。DN相关蛋白质组学方法的研究对DN病理生理学的理解和疾病相关生物标志物的鉴定起到了关键作用[29]。

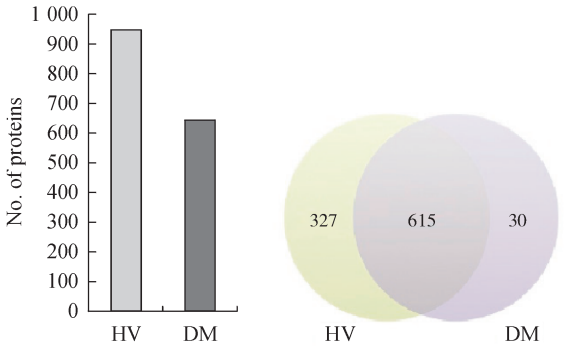


图2 糖尿病患者(DM)与健康受试者(HV)蛋白差异鉴定韦恩图

3.2.3 糖尿病心肌病(DC) 心血管疾病包括糖尿病心肌病、心血管自主神经病变、高血压以及冠状动脉心脏病变等致使超过10%的T1DM患者在

40岁之前死亡[30]。秋田小鼠（Akita Ins2WT/C96Y）是一种类似于人类T1DM进展的小鼠模型，其在5周时会出现明显的心脏萎缩，是研究DC的理想模型。Dewey等[31]对秋田小鼠DC的发生进行了研究，用无标记蛋白质组学分析5周左右糖尿病小鼠的心脏以鉴定可能在DC的病理生理学中起关键作用的蛋白质。在早期阶段，他们发现GANC、PLEKHN1、COLIA1、GSTK1、EPHX2等9种线粒体蛋白质在糖尿病小鼠中存在差异表达，qPCR结果表明，这些变化主要是由转录调控驱动的。而在EPHX2基因的研究中发现，其在第3周和第4周表达没有差异，在第5周和第12周分别增加50%和100%。此外，免疫印迹显示12周龄秋田小鼠的腓肠肌组织中由EPHX2编码的可溶性环氧化物水解酶（sEH）增加约100%（P <0.01）。研究结果表明，sEH的增加是DC发展的关键因素，因此sEH可用作DC诊断的潜在靶标。

3.2.4　*糖尿病周围神经病变（DPN）*　糖尿病周围神经病变（DPN）是糖尿病常见的微血管并发症，能够增加溃疡和下肢截肢的风险，并对生活质量产生严重的影响[32]。对DPN发病机制的不完全了解在很大程度上阻碍了其有效治疗的发展。一些研究表明，氧化应激特别是由线粒体损伤引起的氧化应激是DPN的主要诱因[33]。Zhang等[34]利用蛋白质组学分析线粒体蛋白质谱的变化来研究DPN的发病机制及唐洛宁（TLN）对其治疗的效果。利用相对和绝对定量标记（iTRAQ）与串联质谱联用对TLN治疗组大鼠与对照组大鼠进行蛋白质定性定量实验，发现治疗组大鼠与对照组大鼠相比有388种蛋白差异表达，其中176种下调，212种上调。对成模大鼠进行分析发现有11种线粒体蛋白质（线粒体复合物Ⅲ细胞色素C还原酶2、乌头酸酶和线粒体复合物Ⅰ NADH-辅酶Q还原酶5等）受到影响，而经TLN处理后有4种蛋白质（线粒体复合物Ⅲ细胞色素C还原酶2、线粒体复合物Ⅲ细胞色素C还原酶1、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化物酶）被逆转，预测这4种蛋白质可能是TLN的治疗靶点。因此，通过蛋白质组学方法，可以发现糖尿病中一系列线粒体蛋白所受到的影响，而这些线粒体蛋白的变化可以帮助解释疾病的发病机制并确定潜在的治疗靶点。

3.2.5　*妊娠期糖尿病（GDM）*　妊娠期糖尿病（GDM）是指妊娠期出现的血糖异常，作为产科常见孕期合并症之一，其对于母婴均有严重的不利影响[13]。临床报道显示GDM产妇母婴并发症发病率及病死率明显高于健康产妇，围产期病死率极高[35]。其可以诱使胎儿发育紊乱，并使孕妇发生早产、感染、先兆子痫，未来发生糖尿病的可能性提高。故需要开发有效的妊娠筛查工具做好临床GDM筛查，识别有发展GDM风险的孕妇，做到早诊断早治疗[36]，这对于改善母婴预后具有重要作用。Kim等[36]随机选择12名在24～28孕周被诊断为GDM的孕妇血液作为病例，然后选取相同数量的16～20孕周健康孕妇血液作为对照，运用SELDI-TOF-MS技术进行蛋白质组学分析，证明患有GDM的妇女载脂蛋白CⅢ水平相比对照组显著升高。数据表明，妊娠期糖尿病妇女母体内在16～20周时已经存在生物标志物，因此，确定蛋白质生物标志物进而预测GDM的后期发展是完全可行的。

4　展　望

蛋白质组学为生命科学的许多研究领域开辟了新的视野，成为近年来兴起的研究热点，也为糖尿病的临床研究提供了强有力的工具，展现出广阔的应用前景。相信在未来几年中，随着精准医疗的加入，可以使糖尿病的控制更加有效，从而有希望预防其并发症和改善糖尿病患者的生活质量[37]。虽然蛋白质组学用于糖尿病研究刚起步，但在β细胞、玻璃体、骨骼肌和心肌等方面已取得一定成果，预计将有更多新的生物标志物被发现，而这些标志物将在血清、血浆和尿液等样本的临床试验中起着关键作用[38]。然而，虽然蛋白质组学技术已经被医学界广泛重视，但是仍存在一些问题，如其发展尚处于初级阶段，虽然许多文献中报告的候选生物标志物彼此紧密相关，但很少有研究试图同时评估多种生物标志物以确定这些相关生物标志物中最有用的部分[39]。但是随着质谱等蛋白质组学研究技术的持续改进以及生物信息学技术的应用，将使基础技术更易于使用且更具效益，其在医学和药物开发等领域的应用也会更加广泛。相信在不久的将来，大规模基于质谱的蛋白质组学方法将在糖尿病及其并发症等疾病的研究方面发挥巨大作用。

参 考 文 献

[1] Mauvoisin D. Circadian rhythms and proteomics: it's all about posttranslational modifications[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2019, **11**(5): e1450.

[2] Vaudel M, Barsnes H, Ræder H, *et al*. Using proteomics bioinformatics tools and resources in proteogenomic studies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, **926**: 65-75.

[3] Joubert R, Strub JM, Zugmeyer S, *et al*. Identification by mass spectrometry of two-dimensional gel electrophoresis-separated proteins extracted from lager brewing yeast[J]. *Electrophoresis*, 2001, **22**(14): 2969-2982.

[4] Chen GD, Pramanik BN. Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects[J]. *Drug Discov Today*, 2009, **14**(9/10): 465-471.

[5] Csösz, Deák E, Kalló G, *et al*. Diabetic retinopathy: proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms[J]. *J Proteomics*, 2017, **150**: 351-358.

[6] Haythorne E, Rohm M, van de Bunt M, *et al*. Diabetes causes marked inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic β-cells[J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2474.

[7] Mohan V, Radha V. Precision diabetes is slowly becoming a reality[J]. *Med Princ Pract*, 2019, **28**(1): 1-9.

[8] Wang Y, An HY, Liu T, *et al*. Metformin improves mitochondrial respiratory activity through activation of AMPK[J]. *Cell Rep*, 2019, **29**(6): 1511-1523.e5.

[9] Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, *et al*. From pre-diabetes to diabetes: diagnosis, treatments and translational research[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, **55**(9): E546.

[10] Metz TO, Qian WJ, Jacobs JM, *et al*. Application of proteomics in the discovery of candidate protein biomarkers in a diabetes autoantibody standardization program sample subset[J]. *J Proteome Res*, 2008, **7**(2): 698-707.

[11] Zhang QB, Fillmore TL, Schepmoes AA, *et al*. Serum proteomics reveals systemic dysregulation of innate immunity in type 1 diabetes[J]. *J Exp Med*, 2013, **210**(1): 191-203.

[12] Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, *et al*. A discovery-phase urine proteomics investigation in type 1 diabetes[J]. *Acta Diabetol*, 2012, **49**(6): 453-464.

[13] Huth C, von Toerne C, Schederecker F, *et al*. Protein markers and risk of type 2 diabetes and prediabetes: a targeted proteomics approach in the *Kora* F4/FF4 study[J]. *Eur J Epidemiol*, 2019, **34**(4): 409-422.

[14] Lietzén N, Hirvonen K, Honkimaa A, *et al*. Coxsackievirus B persistence modifies the proteome and the secretome of pancreatic ductal cells[J]. *iScience*, 2019, **19**: 340-357.

[15] Lutty GA. Effects of diabetes on the eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, **54**(14): ORSF81.

[16] Rangasamy S, McGuire PG, Das A. Diabetic retinopathy and inflammation: novel therapeutic targets[J]. *Middle East Afr J Ophthalmol*, 2012, **19**(1): 52-59.

[17] Whitehead M, Osborne A, Widdowson PS, *et al*. Angiopoietins in diabetic retinopathy: current understanding and therapeutic potential[J]. *J Diabetes Res*, 2019, **2019**: 5140521.

[18] Jin J, Min H, Kim SJ, *et al*. Development of diagnostic biomarkers for detecting diabetic retinopathy at early stages using quantitative proteomics[J]. *J Diabetes Res*, 2016, **2016**: 6571976.

[19] Torok Z, Peto T, Csosz E, *et al*. Tear fluid proteomics multimarkers for diabetic retinopathy screening[J]. *BMC Ophthalmol*, 2013, **13**(1): 40.

[20] Hirao Y, Saito S, Fujinaka H, *et al*. Proteome profiling of diabetic mellitus patient urine for discovery of biomarkers by comprehensive MS-based proteomics[J]. *Proteomes*, 2018, **6**(1): E9.

[21] Campion CG, Sanchez-Ferras O, Batchu SN. Potential role of serum and urinary biomarkers in diagnosis and prognosis of diabetic nephropathy[J]. *Can J Kidney Health Dis*, 2017, **4**: 2054358117705371.

[22] Yoon JJ, Park JH, Kim HJ, *et al*. *Dianthus superbus* improves glomerular fibrosis and renal dysfunction in diabetic nephropathy model[J]. *Nutrients*, 2019, **11**(3): E553.

[23] Thippakorn C, Schaduangrat N, Nantasenamat C. Proteomic and bioinformatic discovery of biomarkers for diabetic nephropathy[J]. *EXCLI J*, 2018, **17**: 312-330.

[24] de Boer IH, Rue TC, Cleary PA, *et al*. Long-term renal outcomes of patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria: an analysis of the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications cohort[J]. *Arch Intern Med*, 2011, **171**(5): 412-420.

[25] Son MK, Yoo HY, Kwak BO, *et al*. Regression and progression of microalbuminuria in adolescents with childhood onset diabetes mellitus[J]. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2015, **20**(1): 13-20.

[26] van JA, Scholey JW, Konvalinka A. Insights into diabetic kidney disease using urinary proteomics and bioinformatics[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, **28**(4): 1050-1061.

[27] Moresco RN, de Carvalho JAM. Applying proteomics to diagnosis of diabetic kidney disease[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2017, **14**(10): 841-843.

[28] Harpole M, Davis J, Espina V. Current state of the art for enhancing urine biomarker discovery[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, **13**(6): 609-626.

[29] Papale M, di Paolo S, Vocino G, *et al*. Proteomics and diabetic nephropathy: what have we learned from a decade of clinical proteomics studies[J]? *J Nephrol*, 2014, **27**(3): 221-228.

[30] Wende AR. Post-translational modifications of the cardiac proteome in diabetes and heart failure[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2016, **10**(1): 25-38.

[31] Dewey S, Sohal M, Gomes AV. Proteomic analysis of Akita mice reveals 9 proteins altered during early stages of diabetic cardiomyopathy[J]. *Biophys J*, 2013, **104**(2): 313a-314a.

[32] Pai YW, Lin CH, Lin SY, *et al*. Reconfirmation of newly discovered risk factors of diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes: a case-control study[J]. *PLoS One*, 2019, **14**(7): e0220175.

[33] Hosseini A, Abdollahi M. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, **2013**: 168039.

[34] Zhang TJ, Gao YB, Gong YB, *et al*. Tang-Luo-ning improves mitochondrial antioxidase activity in dorsal root Ganglia of diabetic rats: a proteomics study[J]. *Biomed Res Int*, 2017, **2017**: 8176089.

[35] Singh A, Subramani E, Datta Ray C, *et al*. Proteomic-driven biomarker discovery in gestational diabetes mellitus: a review[J]. *J Proteomics*, 2015, **127**(Pt A): 44-49.

[36] Kim SM, Park JS, Norwitz ER, *et al*. Identification of proteomic biomarkers in maternal plasma in the early second trimester that predict the subsequent development of gestational diabetes[J]. *Reprod Sci*, 2012, **19**(2): 202-209.

[37] Seyhan AA, Carini C. Are innovation and new technologies in precision medicine paving a new era in patients centric care[J]? *J Transl Med*, 2019, **17**(1): 114.

[38] Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, *et al*. Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs[J]. *J Proteome Res*, 2005, **4**(4): 1086-1097.

[39] Colhoun HM, Marcovecchio ML. Biomarkers of diabetic kidney disease[J]. *Diabetologia*, 2018, **61**(5): 996-1011.

·本 刊 讯·

本刊副主编孔令义教授喜获第二届全国创新争先奖

2020年5月30日，人力资源社会保障部、中国科协、科技部、国务院国资委联合举办的第二届全国创新争先奖表彰奖励大会在北京隆重举行。三代半导体（氮化镓）创新团队等10个团队获得全国创新争先奖牌，丁健等28名科技工作者获得全国创新争先奖章，丁奎岭等258名科技工作者获得全国创新争先奖状。本刊副主编孔令义教授以其在中药和天然药物领域杰出的研究成果荣获全国创新争先奖，被授予全国创新争先奖状。

全国创新争先奖于2017年设立，每三年评选一次，是继国家自然科学奖、国家技术发明奖、国家科学技术进步奖之后，国家批准设立的又一重大科技奖项，是仅次于国家最高科技奖的一个科技人才大奖，旨在表彰在基础研究和前沿探索、重大装备和工程攻关、成果转化和创新创业、科普及社会服务等方面作出卓越贡献的优秀科技工作者和优秀团队。本届评选还特别设立了“疫情防控”和“脱贫攻坚”专题，表彰为疫情防控和决战脱贫攻坚作出重要贡献的科技工作者。

孔令义教授是中国药科大学副校长、国家杰出青年科学基金获得者，教育部创新团队带头人，国家双一流建设学科中国药科大学中药学一级学科首席学科带头人，全国优秀教师。兼任国务院学位委员会学科评议组成员、国家药典委员会委员、教育部高等学校中药学类专业教学指导委员会副主任委员、*Chinese Journal of Natural Medicines*主编、《中国药科大学学报》副主编等学术职务。多年来他在中药化学和天然药物化学相关领域取得了在国内外具有重要影响的研究成果，在国际权威和重要刊物发表学术论文500余篇，为2014至2019年连续6年中国高被引学者。获国内外授权发明专利19件。以第一完成人获得国家科技进步二等奖、江苏省科学技术一等奖、教育部自然科学一等奖，并获吴阶平医药创新奖、吴阶平-保罗•杨森医学药学奖。

（来源：科学技术处，本刊有删改）

中国药科大学学报
Journal of China Pharmaceutical University 2020,51(3):374 – 378

环状RNA与2型糖尿病关系及其临床应用

穆金铭,刘 悦,张方方,金 亮*

(中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210009)

摘 要 环状RNA(circular RNA)是一类新发现的具有共价闭合环的非编码RNA,在2型糖尿病的发生发展中扮演着重要角色。本文从环状RNA调控胰岛β细胞功能及其调控心脏、肾脏等器官的代谢活动两方面,综述了环状RNA与2型糖尿病的关系,同时指出了环状RNA作为2型糖尿病及其并发症临床诊断标志物的可能性,以期为2型糖尿病的预防、诊断和治疗提供参考和研究方向。

关键词 环状RNA;胰岛β细胞;2型糖尿病;生物标志物

中图分类号 R587 **文献标志码** A **文章编号** 1000 –5048(2020)03 –0374 –05

doi:10. 11665/j. issn. 1000 –5048. 20200316

引用本文 穆金铭,刘悦,张方方,等.环状RNA与2型糖尿病关系及其临床应用[J].中国药科大学学报,2020,51(3):374 – 378.

Cite this article as: MU Jinming, LIU Yue, ZHANG Fangfang, *et al*. Relationship between circular RNA and type 2 diabetes and its clinical application[J].*J China Pharm Univ*,2020,51(3):374 – 378.

Relationship between circular RNA and type 2 diabetes and its clinical application

MU Jinming, LIU Yue, ZHANG Fangfang, JIN Liang*

School of Life Sciences and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009,China

Abstract Circular RNA (circRNA) is a novel type of non-coding RNA with covalently closed loops which plays an important role in the occurrence and development of type 2 diabetes. In this paper, the relationship between circRNA and type 2 diabetes in terms of the regulation of pancreatic β-cell function by circRNA and the metabolic activity of heart, kidney and other organs is reviewed, and the possibility of circRNA as a clinical diagnostic marker for type 2 diabetes and its complications is emphasized, hoping to provide reference and clues for the prevention, diagnosis and treatment of type 2 diabetes.

Key words circular RNA; islet beta cells; type 2 diabetes; biomarkers

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81570696)

糖尿病是以高血糖和大分子代谢缺陷为特点的代谢紊乱综合征。根据国际糖尿病联合会(International Diabetes Federation, IDF)的报告,2019年全球有4.63亿人患有糖尿病,预计到2040年这一数字将上升到6.45亿。在全部糖尿病患者中,2型糖尿病(type 2 diabetes ,T2D)患者约占90%[1]。T2D的病因包括胰岛β细胞功能障碍导致的胰岛素分泌缺陷及外周组织器官(心脏、肝脏、脂肪等)对胰岛素不敏感产生的胰岛素抵抗[2]。T2D发病率及病死率的不断增加与环境、遗传、现代生活方式改变及其多种并发症(包括肾病、心血管病变、视网膜病变等)等因素相关[3]。

环状RNA(circular RNA)是一类新发现的具有共价闭合环的非编码RNA,与线性RNA不同,其免受RNA外切酶的攻击[4]。环状RNA具有较强的保守性,且其表达具有组织特异性。环状RNA可

收稿日期 2019-12-30 *通信作者 Tel:025-83271152 E-mail: ljstemcell@cpu. edu. cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81570696)

以通过以下 6 种机制发挥作用：(1)作为 microRNA 的分子海绵或诱饵，保护 microRNA 的靶基因免受其降解；(2)充当某些 RNA 结合蛋白的海绵或诱饵，间接调节蛋白的功能；(3)与某些蛋白质相互作用并增强其功能；(4)作为蛋白支架，促进酶及其底物的共域化，从而影响反应动力学；(5)招募蛋白到特定的位点或亚细胞结构；(6)作为翻译的模板产生独特的环状 RNA 多肽[5]。

目前已有报道表明环状 RNA 在糖尿病的发生发展中扮演着重要角色[6]。本文综述了近年来环状 RNA 与 2 型糖尿病关系及其应用的研究进展。

1　环状 RNA 参与调控 2 型糖尿病的发生发展

环状 RNA 可以通过调控胰岛 β 细胞功能直接参与糖尿病的发生发展，同时也可以通过调控心脏、肾脏等器官的代谢活动参与糖尿病及其并发症的发生发展。

1.1　环状 RNA 调控胰岛 β 细胞功能直接参与糖尿病的发生发展

全基因组关联分析研究结果显示，2 型糖尿病的大部分危险基因与胰岛功能相关[7]。环状 RNA 广泛表达于人类胰岛 β 细胞中并能够调控胰岛 β 细胞活性[8]。Stoll 等[9]采用微阵列分析法在人的胰岛样本中检测到 3 441 个环状 RNA 转录本，其中有 497 个转录本在小鼠胰岛中有精确的同源表达。目前报道能够直接调控胰岛 β 细胞功能的环状 RNA 主要有 circHIPK3 和 ciRS-7。

Stoll 等[9]研究结果显示，与对照组相比，db/db 小鼠胰岛 β 细胞中 circHIPK3 表达显著下调，circHIPK3 的表达下调能够抑制胰岛 β 细胞在葡萄糖刺激下的胰岛素合成与分泌，同时能够促进胰岛 β 细胞凋亡。在 db/db 小鼠胰岛 β 细胞中下调的 circHIPK3 损害胰岛 β 细胞功能的作用机制主要是通过作为 miR-124-3p、miR-338-3p、miR-29b-3p、和 miR-30 的分子海绵从而抑制下游与胰岛功能直接相关的靶基因的表达，这些靶基因包括 *AKT*(编码蛋白激酶 B，protein kinase B，PKB)、*MTPN*(编码肌营养素，myotrophin)、*SLC2A2*(编码葡萄糖转运蛋白 2，glucose transporter 2，GLUT2)、*MCL1*(编码髓细胞白血病因子 1，myeloid cell leukemia-1)等。PKB 在磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase，PI3K)信号通路中扮演着重要角色，能够促进胰岛 β 细胞增殖[10]；MTPN 能够促进胰岛素的分泌；GLUT2 作为葡萄糖转运蛋白在 β 细胞葡萄糖摄取中扮演着重要角色，与对照相比缺乏 GLUT2 的纯合子小鼠体内糖耐量异常；MCL1 是一种抗凋亡蛋白，属于 B 细胞淋巴瘤蛋白 2(B-cell lymphoma-2，Bcl2)家族，其能够抑制细胞凋亡且在胰岛 β 细胞存活中起着关键作用(图 1)。

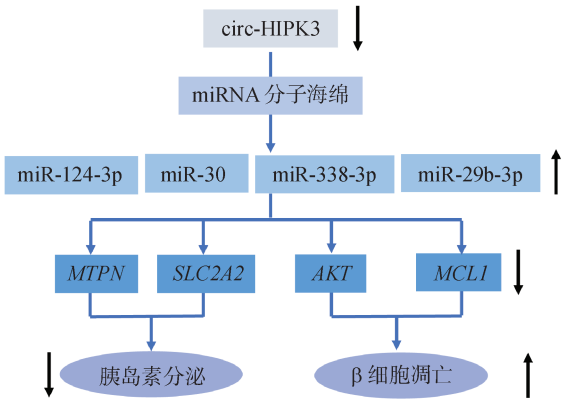


图 1　circ-HIPK3 调控胰岛 β 细胞功能作用机制示意图

下调的 circ-HIPK3 可作为 miR-124-3p、miR-30、miR-338-3p、miR-29b-3p 的分子海绵，使它们的表达水平上调并使它们靶基因 *MTPN*、*SLC2A2*、*AKT*、*MCL1* 的表达水平下调。*MTPN* 基因编码肌营养素，*SLC2A2* 基因编码葡萄糖转运蛋白 2，两蛋白均能促进胰岛素的分泌，因此两者表达下调导致胰岛素分泌能力下降；*AKT* 基因编码蛋白激酶 B，*MCL1* 基因编码髓细胞白血病因子 1，两蛋白均能抑制 β 细胞凋亡，因此两者表达下调导致 β 细胞凋亡增加(黑色↑代表增加；黑色↓代表减少)

Hansen 等[11]研究结果表明 ciRS-7 可以作为 miR-7 的分子海绵。Latreille 等[12]研究结果表明 miR-7 是人和小鼠胰岛中表达含量最丰富的 microRNA，其能够抑制胰岛素颗粒的胞吐作用。Xu 等[13]研究结果表明与对照组相比在胰岛 β 细胞中过表达 ciRS-7 能够促进胰岛 β 细胞胰岛素合成和分泌，其机制是通过抑制 miR-7 的表达从而上调 miR-7 靶基因 *MYRIP*(编码肌球蛋白 VIIA 和 Rab 相互作用蛋白，myosin VIIA and Rab interacting protein)及 *PAX6*(编码同源盒蛋白 6，paired box 6)的蛋白表达。MYRIP 可以与肌凝蛋白(myosin)及 RAS 癌基因家族成员 RAB27A 形成三元复合物参与胰岛素颗粒的运输和分泌。PAX6 作为转录因子能够与胰岛素基因的启动子结合，增强 *Insulin1* 和 *Insulin2* 的转录从而促进胰岛素合成与分泌(图 2)。

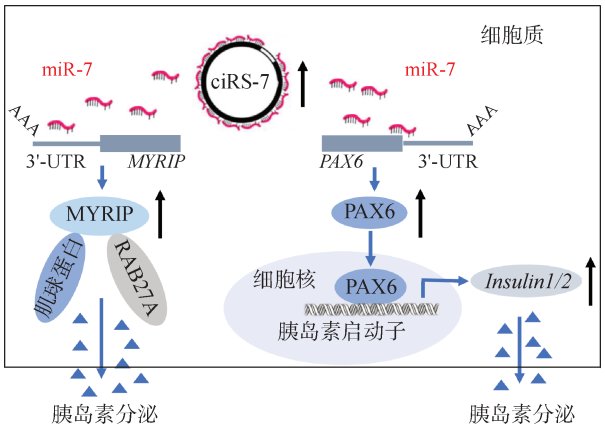


图2 ciRS-7调控胰岛β细胞功能作用机制示意图

ciRS-7作为miR-7的分子海绵;miR-7能与mRNA 3′-UTR结合并抑制MYRIP及PAX6的表达;MYRIP可与肌凝蛋白(myosin)及RAS癌基因家族成员RAB27A形成三元复合物促进胰岛素颗粒的运输和分泌;PAX6作为转录因子能够与胰岛素基因的启动子结合,增强*Insulin1*和*Insulin2*的转录从而促进胰岛素合成与分泌。因此,上调的ciRS-7可以减弱miR-7对MYRIP及PAX6表达的抑制并上调两者的表达,两者的表达上调会促进胰岛素的合成与分泌(黑色↑代表基因或蛋白表达上调)

1.2 环状RNA调控外周组织器官胰岛素信号传导间接参与糖尿病的发生发展

T2D的特征之一是外周组织器官对胰岛素的敏感性降低并发生胰岛素抵抗,其潜在机制是胰岛素信号传导异常。目前有关环状RNA参与调控肝脏、肌肉、脂肪等外周组织器官胰岛素信号传导的报道比较少。

肌肉是机体内重要的胰岛素敏感组织,对全身代谢至关重要。骨骼肌胰岛素抵抗的特点是胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用受损。目前全基因组表达谱研究结果显示肌肉组织中有数千种环状RNA,但对它们的功能却知之甚少。在糖尿病小鼠心肌组织和血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)处理的小鼠心肌成纤维细胞中,circRNA-010567表达显著升高,其可能作为miR-141的分子海绵,从而增强miR-141靶基因*TGFβ1*(编码转化生长因子β1,transforming growth factor β 1)的蛋白表达并促进心肌纤维化的发生。在冠心病患者血清中circANRIL与lncANRIL的表达呈负相关,且circANRIL比lncANRIL更稳定。CircANRIL可通过与pescadillo同源物1(pescadillo homolog 1,PES1)结合破坏核糖体RNA成熟,诱导p53蛋白活化,进而增加细胞凋亡,减少细胞增殖,预防动脉粥样硬化的发生[14],但是circANRIL是否参与调控肌肉组织胰岛素信号传导仍有待进一步探究。

白色脂肪组织炎症是导致肥胖相关代谢紊乱(包括胰岛素抵抗)的重要原因。Zhang等[15]研究结果表明与对照组相比高脂喂养组(high fat diet,HFD)小鼠脂肪组织中circARF3表达显著下调;circARF3作为miR-103的分子海绵能够促进miR-103下游靶基因*TRAF3*(编码肿瘤坏死因子相关受体因子3,TNF receptor associated factor 3)的蛋白表达,TRAF3能够增强线粒体自噬从而减弱炎症反应,因此HFD小鼠脂肪组织中circARF3的表达下调导致白色脂肪组织炎症增加进而引起胰岛素抵抗等肥胖相关代谢紊乱的发生。

2 环状RNA参与调控糖尿病并发症的发生发展

糖尿病患者病死率增加的主要原因之一是其多种并发症(包括糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变和心血管疾病等)的出现。已有研究表明环状RNA在血管内皮细胞功能障碍和糖尿病神经痛中扮演着重要角色。因此,环状RNA的异常表达可能与糖尿病并发症的发生发展有关[6]。

2.1 糖尿病肾病

糖尿病肾病是糖尿病患者慢性肾功能衰竭最常见的原因之一[16]。已有研究表明,在急性肾损伤患者血液和肾组织中可以检测到大量的循环环状RNA,其中circRNA-15698在db/db小鼠和高糖暴露小鼠的系膜细胞(SV40-MES13)中表达均上调,其可以作为miR-185的分子海绵从而促进miR-185靶基因*TGFβ1*的蛋白表达[17]。TGFβ1与转化生长因子β受体Ⅱ(TβRⅡ)结合并激活转化生长因子β受体Ⅰ(TβRⅠ)进而使Smad2蛋白和Smad3蛋白磷酸化后形成复合物,该复合物能够促进细胞外基质的沉积并导致肾小球硬化和间质纤维化。

2.2 糖尿病心血管并发症

血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖受损在糖尿病动脉粥样硬化进程中扮演着重要角色。Chen等[18]研究结果表明与正常组相比,circ-WDR77在高糖处理VSMCs中的表达水平显著上调,且其可靶向miR-124/*FGF2*(编码成纤维细胞生长因子2,fibroblast growth factor 2)轴从而促进VSMCs的增殖和迁移。目前已有多项研究结果表明,血糖升高会损害糖尿病患者的血管内皮细胞并可能导致心血

管并发症的发生[19]。Shang 等[20]通过体外实验证明高糖能够诱导内皮细胞中 95 个环状 RNA 的表达发生显著变化，这表明环状 RNA 在高血糖诱导的内皮细胞损伤和糖尿病心血管疾病的发病机制中具有重要作用。

Liu 等[21]通过实验证明在小鼠体内敲降环状 RNA cZNF609 可以促进内皮细胞迁移和成管，保护内皮细胞不受氧化应激的影响；该环状 RNA 可作为内源性 miR-615-5p 的分子海绵从而上调其靶基因 *MEF2A*（编码肌细胞增强因子 2A，myocyte enhancer factor 2A）的蛋白表达；MEF2A 的激活与血管内皮细胞功能密切相关。

2.3　T2D 相关慢性炎症

T2D 是一种以慢性、低度炎症为特征的代谢紊乱综合征。已有研究报道，环状 RNA 在 T2D 患者外周血白细胞中的表达谱与炎性细胞因子存在相关性且研究结果显示与非糖尿病对照组相比，糖尿病患者中共有 220 个环状 RNA 的表达发生显著变化，其中 107 个表达上调，113 个表达下调，在这些环状 RNA 中，circ-ANKRD36 的表达水平上调最为显著且与白介素 6（interleukin 6，IL-6）、葡萄糖和糖化血红蛋白表达水平呈正相关[22]。此外，Fang 等[23]研究结果表明 circ-ANKRD36 可能通过与 miR-3614-3p、miR-498、miR-501-5p 相互作用参与炎症反应相关信号通路的调控及 T2D 的发生发展。

2.4　糖尿病与视网膜病变及神经性疼痛

神经性疼痛是糖尿病最常见的并发症之一，其在 T2D 患者中的发病率约为 30%，并随着糖尿病病程的延长而增加。有研究表明 circHIPK3 的下调可减轻 STZ 诱导的糖尿病大鼠的神经痛。Zhang 等[24]通过体外实验证明 circ-0005015 可作为 miR-519d-3p 的分子海绵并上调其靶基因 *MMP-2*（编码基质金属蛋白酶 2，matrix metallopeptidase 2）、*STAT3*（编码信号转导及激活蛋白 3，signal transducer and activator of transcription 3）、*XIAP*（编码 X 连锁凋亡抑制蛋白，X-linked inhibitor of apoptosis protein）的蛋白表达，进而参与血管化、糖尿病视网膜病变和神经保护等生物过程。

3　环状 RNA 作为 T2D 潜在诊断生物标志物

大多数经典的 T2D 诊断生物标志物只有在疾病建立后才发挥作用，不能在疾病早期起到预测作用[25]。因此，迫切需要开发新的、更敏感的生物标志物。由于环状 RNA 的环状结构和缺乏游离的 5′ 和 3′ 端，其对外切酶 RNase R 具有很强的抗性[26]。环状 RNA 在体液中十分稳定，在血浆中的半衰期平均为 48 h，比 mRNA 的平均值长 10 h。环状 RNA 在组织和细胞中的表达具有特异性并且其在血液、脑脊液、唾液、尿液等体液中含量较高[27]。因此，将环状 RNA 作为潜在的生物标志物用于包括糖尿病在内的一系列人类疾病的早期诊断和预后检测趋势明显[24]。

Zhao 等[28]对 T2D 患者组、糖尿病前期组和健康对照组人群外周血中部分环状 RNA 的表达水平进行评估，结果发现 3 组间 circ-0124636 及 circ-0139110 的表达水平无明显差异，而 circ-0018508 和 circ-0054633 在糖尿病前期组和 T2D 患者组外周血中的表达水平均高于健康对照组并且 circ-0054633 的表达水平从健康对照组至 T2D 患者组逐渐升高。接收者操作特征曲线分析（receiver operating characteristic curve，ROC）结果表明，circ-0054633 有望成为临床应用中诊断糖尿病前期和 T2D 的生物标志物。

Li 等[29]检测了冠心病患者组、T2D 患者组及健康对照组人群外周血中环状 RNA 的表达谱，结果显示各组间 circ-0009036 和 circ-0054129 的表达水平无明显差异，但与对照组相比，T2D 患者组和冠心病组外周血中 circRNA11783-2 的表达水平均显著下调。因此 circ-RNA11783-2 作为诊断或预测 T2D 与心血管系统疾病的生物标志物具有十分重要的潜在价值。

4　总结与展望

环状 RNA 的动态表达模式及复杂的调控网络都表明它们不仅仅是异常剪接的副产品，而是新出现的具有调控功能的 RNA 分子。越来越多的研究结果表明，环状 RNA 的异常表达可能与 T2D 等多种人类疾病相关，然而目前环状 RNA 与 T2D 的临床相关性还不清楚，有待进一步的体内体外实验阐明环状 RNA 在 T2D 及其并发症发生发展中的具体作用，以及这些环状 RNA 作为 T2D 潜在治疗靶点和生物标志物的可能性。

参 考 文 献

[1] Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2019, **576**(7785): 51-60.

[2] Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. *Nat Med*, 2017, **23**(7): 804-814.

[3] Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2006, **116**(7): 1802-1812.

[4] Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. *Mol Cell*, 2018, **71**(3): 428-442.

[5] Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Circular RNAs: biogenesis, function, and a role as possible cancer biomarkers[J]. *Int J Genomics*, 2017, **2017**: 6218353.

[6] Ghasemi H, Sabati Z, Ghaedi H, *et al*. Circular RNAs in β-cell function and type 2 diabetes-related complications: a potential diagnostic and therapeutic approach [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, **46**(5): 5631-5643.

[7] Thurner M, van de Bunt M, Torres JM, *et al*. Integration of human pancreatic islet genomic data refines regulatory mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci[J]. *Elife*, 2018, **7**: e31977.

[8] Kaur S, Mirza AH, Pociot F. Cell type-selective expression of circular RNAs in human pancreatic islets[J]. *Noncoding RNA*, 2018, **4**(4): E38.

[9] Stoll L, Sobel J, Rodriguez-Trejo A, *et al*. Circular RNAs as novel regulators of β-cell functions in normal and disease conditions[J]. *Mol Metab*, 2018, **9**: 69-83.

[10] Elghazi L, Balcazar N, Bernal-Mizrachi E. Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, **38**(2): 157-163.

[11] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, *et al*. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, **495**(7441): 384-388.

[12] Latreille M, Hausser J, Stützer I, *et al*. MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function[J]. *J Clin Invest*, 2014, **124**(6): 2722-2735.

[13] Xu HY, Guo S, Li W, *et al*. The circular RNA Cdr1as, via miR-7 and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells[J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 12453.

[14] Holdt LM, Stahringer A, Sass K, *et al*. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans[J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12429.

[15] Zhang ZZ, Zhang TT, Feng RN, *et al*. CircARF3 alleviates mitophagy-mediated inflammation by targeting miR-103/TRAF3 in mouse adipose tissue[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 192-203.

[16] Kölling M, Seeger H, Haddad G, *et al*. The circular RNA *ciRs-126* predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury[J]. *Kidney Int Rep*, 2018, **3**(5): 1144-1152.

[17] Parveen A, Jin M, Kim SY. Bioactive phytochemicals that regulate the cellular processes involved in diabetic nephropathy [J]. *Phytomedicine*, 2018, **39**: 146-159.

[18] Chen JJ, Cui LQ, Yuan JL, *et al*. Circular RNA WDR77 target FGF-2 to regulate vascular smooth muscle cells proliferation and migration by sponging miR-124[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **494**(1/2): 126-132.

[19] Balijepalli C, Druyts E, Siliman G, *et al*. Hypoglycemia: a review of definitions used in clinical trials evaluating antihyperglycemic drugs for diabetes [J]. *Clin Epidemiol*, 2017, **9**: 291-296.

[20] Shang FF, Luo SX, Liang XX, *et al*. Alterations of circular RNAs in hyperglycemic human endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **499**(3): 551-555.

[21] Liu C, Yao MD, Li CP, *et al*. Silencing of circular RNA-ZNF609 ameliorates vascular endothelial dysfunction[J]. *Theranostics*, 2017, **7**(11): 2863-2877.

[22] Khodabandehloo H, Gorgani-Firuzjaee S, Panahi G, *et al*. Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and β-cell dysfunction [J]. *Transl Res*, 2016, **167**(1): 228-256.

[23] Fang Y, Wang XX, Li WQ, *et al*. Screening of circular RNAs and validation of circANKRD36 associated with inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Int J Mol Med*, 2018, **42**(4): 1865-1874.

[24] Zhang SJ, Chen X, Li CP, *et al*. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in diabetes retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, **58**(14): 6500-6509.

[25] Vaishya S, Sarwade RD, Seshadri V. MicroRNA, proteins, and metabolites as novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and related complications[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, **9**: 180.

[26] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(5): 453-461.

[27] Zhang ZR, Yang TT, Xiao JJ. Circular RNAs: promising biomarkers for human diseases [J]. *EBioMedicine*, 2018, **34**: 267-274.

[28] Zhao ZZ, Li XJ, Jian DD, *et al*. Hsa_circ_0054633 in peripheral blood can be used as a diagnostic biomarker of pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus[J]. *Acta Diabetol*, 2017, **54**(3): 237-245.

[29] Li XJ, Zhao ZZ, Jian DD, *et al*. Hsa-circRNA11783-2 in peripheral blood is correlated with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2017, **14**(6): 510-515.