

迈克尔反应受体分子化学生物学研究

赵勤实^{1*} 从玉文²

(1. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 昆明 650204;
2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850)

摘 要 迈克尔反应受体是烯键或炔键与吸电子基团共轭相连形成的官能团,含有这样官能团的化学小分子能与亲核试剂发生迈克尔加成反应,因此称为迈克尔反应受体分子。迈克尔反应受体分子是一类重要的生理活性分子,它们直接或间接参与许多生命过程,同时也是细胞中许多信号转导途径的调节者,在化学生物学研究中起着重要的作用。本文对迈克尔反应受体分子化学生物学研究进展进行了综述。

关键词 迈克尔反应受体 化学生物学 分子探针

中图分类号: O621.25; Q504 **文献标识码**: A **文章编号**: 1005-281X(2007)12-1972-05

Michael Reaction Acceptor Molecules in Chemical Biology

Zhao Qinshi^{1*} Cong Yuwen²

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;
2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Michael reaction acceptors are the functional groups in which the olefins or acetylenes conjugated to electron-withdrawing groups. The compounds with Michael acceptors, taking Michael reaction with nucleophile, are called as Michael reaction acceptor molecules. Michael reaction acceptor molecules are considered as a class of biologically active molecules which directly or indirectly involved in the life processes. They are also regulators in many signaling pathways in cells. They play an important role in chemical biology studies. This review covers the progress of Michael reaction acceptor molecules in chemical biology.

Key words Michael reaction acceptors; chemical biology; molecule probes

1 引言

迈克尔(Arthur Michael)在 1887 年发现亲核试剂与含 α, β -不饱和酮、酯等化合物发生加成反应^[1],这是碳碳键的重要反应,此反应被后人发展并命名为迈克尔反应。广义地说,迈克尔受体是烯键或炔键与吸电子基团共轭相连形成的官能团,含迈克尔受体的化学小分子称为迈克尔反应受体分子。迈克尔反应受体分子原只是有机化学概念,后因发现这类分子具有显著的生物活性,特别是对含有半胱氨

酸残基的蛋白有抑制活性,因此这类分子有了新的含义,即它们既是有机化学上一类反应试剂,同时也是具有生理活性一类分子^[2]。由于细胞内一些活性分子(如 GSH)和酶(如半胱氨酸蛋白酶)中存在半胱氨酸残基,这些残基中的巯基是强的亲核试剂(基团),易于与迈克尔反应受体分子发生加成反应而产生重要的生物效应。迈克尔反应受体分子是一类重要的生理活性分子,直接或间接参与许多生命过程,同时也是细胞中许多信号转导途径的调节者,在化学生物学研究中起着重要的作用。本文对迈克尔反应受体分子化学生物学研究进展进行了综述。

收稿: 2007 年 9 月

*通讯联系人 e-mail: qinshizhao@mail.kib.ac.cn

2 酶抑制活性和抗病毒活性

最早在文献中描述迈克尔反应受体分子为生物活性分子是 EC-64 的衍生物 Dc-11 (图 1), 这个化合物具有显著的组织蛋白酶 B (cathepsin B) 抑制活性, 而且作用机制是分子中迈克尔结构单元与组织蛋白酶不可逆结合^[3]。

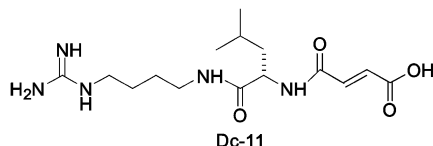


图 1 组织蛋白酶抑制剂 Dc-11 的结构

Fig. 1 The structure of cathepsin B inhibitor Dc-11

Powers 和他的合作者^[2]合成设计了一系列烯基磺 (vinyl sulfone) 和 α, β -不饱和羰基衍生物 (α, β -unsaturated carbonyl derivative) (图 2), 这类迈克尔受体具有显著的木瓜蛋白酶 B, H, L (papain B, H, L) 抑制活性, 而且活性中心就是 α, β -不饱和结构单元, 作用机制是分子中 α, β -不饱和结构单元与蛋白酶中半胱氨酸残基不可逆结合。

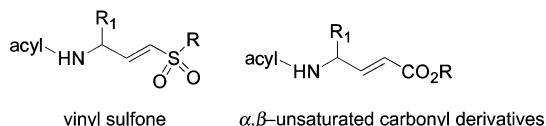


图 2 木瓜蛋白酶 B, H, L 的抑制剂烯基磺和 α, β -不饱和羰基衍生物的结构

Fig. 2 The structures of papain B, H, L inhibitors vinyl sulfone and α, β -unsaturated carbonyl derivatives

最近, Ekici 等^[4]设计合成了肽类迈克尔反应受体分子, 该类化合物能选择性抑制 caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10。其 Cbz-Asp-Glu-Val-AAsp-*trans*-CH=CH-CON(CH₂-1-Naphth)₂ 是 caspase-3 的选择性抑制剂。

迈克尔受体分子 CRA-3316 (图 3) 作为克鲁斯氏锥体虫半胱氨酸蛋白酶 (cruzain) 抑制剂用于治疗查

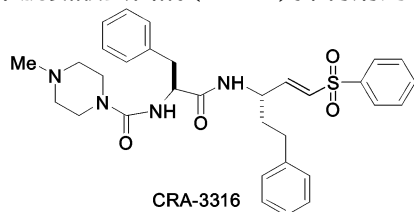


图 3 Cruzain 抑制剂 CRA-3316 的结构

Fig. 3 The structure of cruzain inhibitor CRA-3316

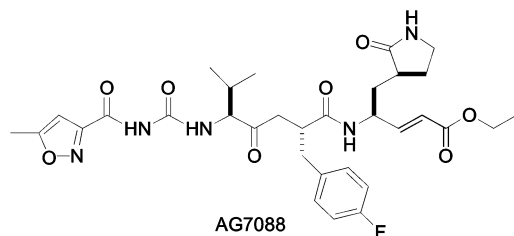


图 4 鼻病毒抑制剂 AG7088 的结构

Fig. 4 The structure of antirhinoviral agent AG7088

格斯病 (Chagas's disease) 已经进入临床研究; 另一个迈克尔受体分子 AG7088 (图 4) 是鼻病毒抑制剂 (antirhinoviral agent), 也已经进入二期临床研究^[4]。有趣的是 AG7088 结构的衍生物 KZ7088 (图 5) 因具有显著的抗 SARS 病毒活性而引起广泛的关注^[4]。因此, 迈克尔反应受体分子是一类重要的生理活性分子, 其核心药效基团是其中的 α, β -不饱和结构单元, 广泛用于药物设计。

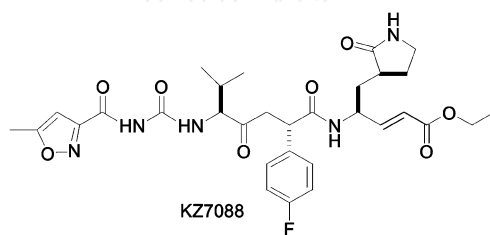


图 5 SARS 病毒抑制剂 KZ7088 的结构

Fig. 5 The structure of anti-SARS agent KZ7088

3 激活 TRPA1 离子通道

TRP (transient receptor potential) 通道是一类在外周和中枢神经系统分布很广泛的通道蛋白, TRPA1 是 TRP 家族中的一员, 在疼痛神经元中表达^[5], 可被多种有害的因素激活, 包括温度、刺激性化合物, 以及一些内、外源性配体和细胞内信号分子^[6]。4-羟基壬烯醛 (HNE) (图 6) 是组织损伤、炎症和氧化应激后膜磷脂过氧化产生的内源性迈克尔反应受体分子, 该分子通过与蛋白中的半胱氨酸、赖氨酸残基发生迈克尔加成反应激活 TRPA1, 引起疼痛和神经性炎症^[7,8]。

Macpherson 等^[9]报道 cinnamaldehyde (CA), super cinnamaldehyde (SC) (图 7) 等迈克尔受体小分子能激活 TRPA1 离子通道, 并用点击化学 (click chemistry) 方法证明作用机制为迈克尔受体通过共价键修饰 TRPA1 蛋白的半胱氨酸残基。

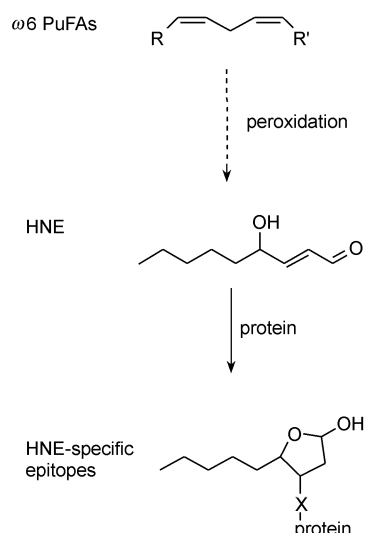


图 6 4-羟基壬烯醛(HNE)修饰蛋白的形成

Fig. 6 Formation of HNE-modified protein

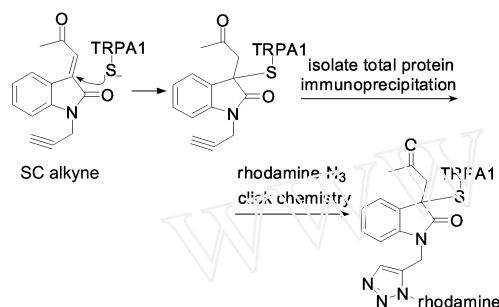


图 7 用点击化学方法确定 SC 的作用位点

Fig. 7 Schematic of reactions of SC with TRPA1 by click chemistry

4 STAT3 化学小分子抑制剂

信号转导子和转录激活子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 是研究干扰素诱导基因转录时首次鉴定的一组转录因子家族蛋白^[10]。迄今为止,已有 8 个 STATs 相继被克隆,即哺乳动物中的 STAT 1、2、3、4、5a、5b 和 6,以及果蝇中的 D-STAT。细胞因子(如 G-CSF、IL-6 等)、干扰素或生长因子(如 PDGF、EGF)通过与细胞表面相应的受体结合,引起受体二聚化,激活受体酪氨酸激酶(如 EGFR、EGFR 等)或非受体型酪氨酸激酶(如 JAK 家族激酶, JAK1、2、3 和 TYK2),使受体发生磷酸化,提供与 STATs 结合的“停泊位点(docking sites)”。STATs 通过其 SH2 结构域与磷酸化受体结合,并在 JAK 激酶的作用下,使其 C 端 Tyr 残基如 Tyr⁷⁰⁵ 发生磷酸化。两个磷酸化 STATs 分子通过 SH2

结构域相互作用形成同源或异源二聚体,转位到细胞核,与靶基因的启动子区域结合,诱导靶基因转录。基因敲除及相关实验证实 STATs 蛋白在免疫反应、炎症、增殖、分化、发育、细胞存活和凋亡中具有重要的生理功能^[11]。

在肿瘤细胞和组织中,已证实 STATs 尤其是 STAT3 蛋白的调控紊乱和持续激活对肿瘤细胞的增殖和抗凋亡活性至关重要^[12]。最近研究发现,STAT3 在肿瘤浸润的 DC 细胞呈持续激活状态,导致 DC 停留在不成熟状态,从而无法有效提呈肿瘤抗原,激发有效的抗肿瘤免疫;条件性敲除造血系统的 STAT3 基因,能够激发机体强有力的先天和获得性抗肿瘤免疫,抑制肿瘤的生长^[13]。此外,确认 STAT3 作为抗肿瘤治疗药靶最为引人关注的证据是:表达持续激活的 STAT3 突变体可引起细胞恶变并在裸鼠上成瘤;应用基因治疗手段阻止 STAT3 异常激活可导致肿瘤生长抑制和凋亡,而对正常细胞则没有明显的副作用^[14, 15]。由于基因治疗在临床应用中的局限性,抑制 STAT3 激活的化学小分子研究引起了普遍关注,并在近几年的研究中取得了很大的进展^[16]。

在众多的抑制剂中,迈克尔反应受体分子是其中重要的一类。Curcumin(姜黄素)(图 8)是从中药姜黄(*Curcuma longa*)中分离得到的活性成分,具有神经保护、抗衰老等功效,另外发现他们可以抑制细胞增殖、诱导凋亡,其活性中心是迈克尔受体(α, β -不饱和结构单元)^[17]。Bharti 等^[18]发现该化合物能抑制 IL-6 诱导的多发性骨髓瘤等肿瘤细胞 STAT3 磷酸化和后续的核转位,而不影响 STAT5 的磷酸化,但能抑制 IFN- α 诱导的 STAT1 的磷酸化。Schust 等^[19]对含 17298 化合物库进行筛选,从中发现 STAT3 的选择性抑制剂 Stattic(图 8),该化合物选择性抑制 STAT3 的激活、二聚化和核转位,增加乳腺癌细胞的凋亡。分子中含有迈克尔受体结构单元,在分子活性中具有至关重要的作用。构效关系研究表明,分子中双键被还原时活性丧失,因此推测是通过与蛋白中氨基酸残基迈克尔加成修饰蛋白。查尔酮(chalcone)(图 8)是分子中含有迈克尔受体 α, β -不饱和酮结构的一类天然分子,此类分子具有广泛的生物活性,特别是抗炎活性,是一类天然迈克尔反应受体分子。Wung 等^[20]报道查尔酮能抑制 IL-6 诱导的 STAT3 的激活,其作用机制为抑制 STAT3 的磷酸化,其中 α, β -不饱和酮起重要作用。15-去氧 $\Delta^{12,14}$ -前列腺素 J₂ (15d-PGJ₂)(图 8)是内源性环氧酶

(COX) 氧化产物 PGI_2 的衍生物, 存在于炎症分泌物中, 是 PPAR γ 的激动剂^[21]。Wung 等^[22] 报道 15d-PG 2 能抑制 IL-6 诱导的 STAT3 蛋白 Tyr⁷⁰⁵ 磷酸化, 但不抑制 STAT3 蛋白丝氨酸磷酸化和上游 JAK2 的酪氨酸磷酸化。构效关系分析表明, 该化合物对 STAT3 蛋白 Tyr⁷⁰⁵ 的磷酸化抑制活性取决于分子中迈克尔受体。

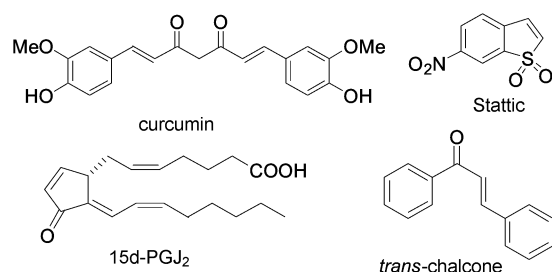


图 8 STAT3 的抑制剂

Fig. 8 The inhibitors of STAT3

5 调节 Nrf2-Keap1/ARE 通路

在各种致癌因子作用下, 正常细胞发展成肿瘤细胞是一个长期和隐蔽过程, 有充足证据表明癌基因的持续活化或/和抑癌基因的失活是由于致癌物质对 DNA 不断损伤造成的。癌变过程是由多因素引起, 经历多个阶段并涉及到多条信号传递通路的异常。近数 10 年研究表明癌变过程是可被放慢、阻止和逆转的。因此, 阻止癌变过程是预防癌症的最有效策略。尽管紫外线、病毒等能引起癌变, 但化学致癌剂是癌变的首要因素。Nrf2-Keap1/ARE 通路是与氧化剂和亲电试剂致癌作用密切相关的信号调节系统^[23]。生理状态下, Nrf2 与 Keap1 偶联并与肌动蛋白结合而被锚定在胞浆中, 当受到亲电试剂或氧化剂作用时, Nrf2 与 Keap1 解偶连并转移入核, 与核内 Maf 蛋白结合成异二聚体后识别并与 ARE (antioxidant response element) 结合, 启动第 Ⅰ 相解毒酶和抗氧化应激蛋白基因的转录, 提高细胞抗氧化损伤能力。因此, 活化 Nrf2-Keap1/ARE 通路是预防肿瘤最有前景的策略^[24]。Talalay 等^[25] 首次报道迈克尔反应受体分子能诱导第 Ⅰ 相解毒酶和抗氧化应激蛋白基因的转录, 提高细胞抗致癌剂的能力, 并在以后研究中发现这类分子作用机制为迈克尔受体与 Keap1 中的巯基结合, 促经 Keap1 泛素化并降解, 从而使与之结合的 Nrf2 游离出来并进入细胞核, 启动第 Ⅰ 相解毒酶和抗氧化应激蛋白基因的转录^[26]。鉴于迈克尔反应受体分子是 Nrf2-Keap1/ARE 信号途

径激活剂, Dinkova-Kostova 等^[27] 以齐敦果酸为原料合成了一系列迈克尔反应受体分子, 其中 TP225 和 TP235 (图 9) 对 Nrf2-Keap1/ARE 信号通路具有显著的激活作用, 而齐敦果酸没有活性, 推测这类活性分子的作用机制也可能与迈克尔受体与 Keap1 中的巯基结合, 从而引起 Nrf2 核转位相关。他们^[28] 基于酚类骨架结构合成系列迈克尔反应受体分子, 构效关系分析发现, 酚类化合物对 Nrf2-Keap1/ARE 通路的激活作用与迈克尔受体反应活性密切相关, 如在 bis(2-hydroxybenzylidene)acetone (图 9) 中, 苯环上的羟基在迈克尔加成反应时起到协同作用, 也使得该分子对 Nrf2-Keap1/ARE 通路的激动活性显著增强。

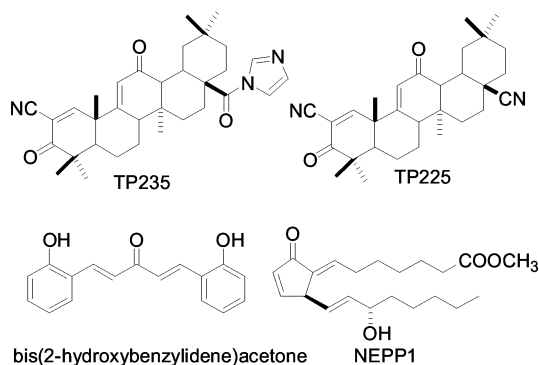


图 9 Nrf2-keap1/ARE 信号通路激活剂

Fig. 9 The activators of Nrf2-keap1/ARE signal pathway

迈克尔受体化学小分子激活 Nrf2-Keap1/ARE 通路不仅可以使细胞防护氧化剂和亲电试剂的致癌作用, 而且能使神经细胞免受氧化损伤。NEPP (neurite outgrowth-promoting prostaglandin) (图 9) 是一类能保护神经元免受损伤的迈克尔反应受体分子^[29], 这类分子作用机制为迈克尔受体化学小分子通过与 Keap1 半胱氨酸残基发生迈克尔反应, 激活 Nrf2-Keap1/ARE 信号通路, 诱导 HO-1 (hemeoxygenase) 基因表达, 对神经细胞的氧化损伤起到保护作用^[30]。

6 NF- κ B 信号通路抑制剂

NF- κ B 是一类关键性的核转录因子, 以同源或异源二聚体非活性形式存在于几乎所有类型细胞的胞质中, 具有十分重要的功能。生理状态下, NF- κ B 与抑制性蛋白 κ B 结合而使其在胞质中处于失活状态, 许多因素通过细胞内信号传递可激活核转录因子 NF- κ B, 使其从胞质转位到细胞核, 与 NF- κ B 反应性基因的 κ B 位点结合并调控 NF- κ B 反应性基因的转录, 参与免疫、炎症和细胞凋亡的调节。NF-

κB 信号转导通路不仅调节炎症因子表达,而且也参与肿瘤的发生过程,因此它逐渐成为治疗相关疾病的重要靶点^[31]。现已发现 700 个 NF-κB 信号通路的抑制剂,其中小分子化合物占绝大多数^[32]。

含有 α,β-不饱和酮的对映贝壳杉烷二萜是天然二萜类化合物中的重要类群,唇型科香茶菜属中富含这类化合物。这类化合物中 α,β-不饱和酮是抗肿瘤和抗炎活性中心,因此这类化合物是天然的迈克尔反应受体分子,其中从民间抗炎植物冬凌草 (*Isodon rubescens*) 中分离的冬凌草甲素 (oridonin) (图 10) 和从毛萼香茶菜 (*Isodon eriocalyx*) 中分离的活性成分毛萼乙素 (eriocalyxin B) (图 10) 是这类化合物的典型代表。孙汉董等^[33,34]先后发现冬凌草甲素和 eriocalyxin B 能抑制 NF-κB 的转录和下游的靶点 COX-2 和 NO 合酶的表达,其作用机制为干预 NF-κB 的 p65 和 p50 亚基与 DNA 的结合,并有抑制 NF-κB 向细胞核转移,但不影响 IκB 的磷酸化和降解的作用,从而起到抑制肿瘤生长作用。孙汉董与陈赛娟等^[35]合作研究发现 eriocalyxin B 通过 NF-κB 和 MAPK 信号途径启动 caspase-3 依赖的 AML1-ETO 蛋白降解诱导 t(8;21) leukemia 细胞凋亡。

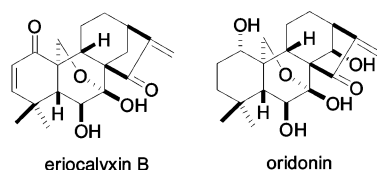


图 10 NF-κB 信号通路抑制剂

Fig. 10 The inhibitors of NF-κB signal pathway

7 结 语

综上所述,迈克尔反应受体分子能与酶中半胱氨酸残基的巯基发生迈克尔加成反应形成共价键结合,是一类理想的用于研究细胞生物学的分子探针。这类分子具有广泛的生理活性,作用于多种信号转导系统,通过对其与生物大分子作用研究可揭示化学结构、化学反应、生物活性和作用靶点及其介导的信号转导通路之间的内在联系和规律。天然迈克尔反应受体分子具有结构复杂性和多样性,是大自然经过几千年甚至上万年漫长的进化选择出来的,因此它们可能对信号转导系统更具有选择性。深入系统地研究合成和天然的迈克尔反应受体分子,对各种信号转导系统的作用对于发现分子探针、认识蛋白质功能、发现药物新靶点,以及发现先导化合物具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Michael A. J. Prakt. Chem., 1887, 35: 349—356
- [2] Powers J C, Asgjan J L, Ekici O D, et al. Chem. Rev., 2002, 102: 4639—4750
- [3] Barrett A J, Kembhavi A A, Brown M A, et al. Biochem. J., 1982, 201: 189—198
- [4] Ekici O D, Li Z Z, Powers J C, et al. J. Med. Chem., 2006, 49: 5728—5748
- [5] Clapham D E. Nature, 2003, 426: 517—524
- [6] Jordt S E, Bautista D M, Julius D, et al. Nature, 2004, 427: 260—265
- [7] Trevisani M, Siemens J, Julius D, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104: 13519—13524
- [8] Toyoda K, Nagae R, Uchida K, et al. J. Bio. Chem., 2007, 282: 25769—25778
- [9] Macpherson L J, Dubin A E, Patapoutian A, et al. Nature, 2007, 445: 541—545
- [10] Darnell J E Jr, Kerr I M, Stark G R. Science, 1994, 264: 1415—1421
- [11] Levy D E, Darnell J E Jr. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2002, 3: 651—662
- [12] Yu H, Jove R. Nat. Rev. Cancer, 2004, 4: 97—105
- [13] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, et al. Nat. Med., 2005, 11: 1314—1321
- [14] Turkson J, Bowman T, Garcia R, et al. Mol. Cell. Biol., 1998, 18: 2545—2552
- [15] Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, et al. Cancer Res., 1999, 59: 5059—5063
- [16] Deng J, Grande F, Neamati N. Curr. Cancer Drug Targets, 2007, 7: 91—107
- [17] Matsuda H, Ando S, Yoshikawa M, et al. Bioorg. Med. Chem., 2006, 14: 138—142
- [18] Bharti A C, Donato N, Aggarwal B B. J. Immunol., 2003, 171: 3863—3871
- [19] Schust J, Sperl B, Berg T, et al. Chem. Biol., 2006, 13: 1235—1242
- [20] Liu Y C, Hsieh C W, Wung B S, et al. Life Sci., 2007, 80: 1420—1430
- [21] Coyle A T, Ókeeffe C M, Kinsella B T. FEBS J., 2005, 272: 4754—4773
- [22] Wung B S, Wu C C, Hsu M C, et al. Life Sci., 2006, 78: 3035—3042
- [23] Gudice A, Montella M. BioEssays, 2006, 28: 169—181
- [24] Zhang Y, Gordon G B. Mol. Cancer Ther., 2004, 3: 885—893
- [25] Talalay P, Long M J D, Prochaska H J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85: 8261—8265
- [26] Dinkova Kostova A T, Holtzclaw W D, Kensler T W. Chem. Res. Toxicol., 2005, 18: 1779—1791
- [27] Dinkova Kostova A T, Liby K T, Talalay P, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102: 4584—4589
- [28] Dinkova Kostova A T, Massiah M A, Talalay P, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98: 3404—3409
- [29] Satoh T, Kyoji F, Watanabe Y. Neurosci. Lett., 2000, 291: 167—170
- [30] Satoh T, Okamoto S I, Lipton S A, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 768—773
- [31] Karin M. Nature, 2006, 441: 431—436
- [32] Gilmore T D, Herscovitch M. Oncogene, 2006, 25: 6887—6899
- [33] Leung C H, Sun H D, Cheng Y C. Mbl. Pharmacol., 2005, 68: 286—297
- [34] Leung C H, Sun H D, Cheng Y C. Mbl. Pharmacol., 2006, 70: 1946—1955
- [35] Wang L, Sun H D, Chen S J, et al. Cell Death Differ., 2007, 14: 306—317