

• 研究论文 •

含氮杂环氧钒配合物对 PTP1B 和 ALP 的抑制活性研究

高晓丽^a 卢丽萍^{*.a} 朱苗力^{*.a} 袁彩霞^a 马俊锋^b 付学奇^{*.b}

(^a 山西大学分子科学研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

(^b 吉林大学生命科学学院 Edmond H. Fischer 细胞信号传导实验室 长春 130023)

摘要 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)是当前开发治疗糖尿病药物的优秀靶标,也是钒配合物抗糖尿病作用相关的重要靶蛋白.研究了三种含氮平面杂环螯合配体 2,2'-联咪唑(L¹), 2,2'-联吡啶(L²), 1,10-邻菲咯啉(L³)的氧钒配合物对 PTP1B 以及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的体外抑制作用.结果表明,1:1和2:1型配位的氧钒化合物均表现出对 PTP1B 较强的抑制活性, IC₅₀ 值在 120~260 nmol/L 间,抑制能力接近双麦芽酚氧钒配合物(BMOV).抑制动力学实验表明这些氧钒配合物对 PTP1B 的抑制模式均为竞争性抑制,抑制常数在 20~160 nmol/L.其对 PTP1B 抑制活性较 ALP 高 10³ 倍,表明氧钒配合物对两种磷酸酶的抑制具有一定的选择性.

关键词 氧钒配合物; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B; 碱性磷酸酶; 抑制剂

Inhibitory Activities of Some Oxovanadium Complexes with N-Heterocyclic Ligands against PTP1B/ALP

Gao, Xiaoli^a Lu, Liping^{*.a} Zhu, Miaoli^{*.a} Yuan, Caixia^a
Ma, Junfeng^b Fu, Xueqi^{*.b}

(^a Institute of Molecular Science, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006)

(^b Edmond H. Fischer Signal Transduction Laboratory, College of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130023)

Abstract Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) has been emerging as an attractive drug target for diabetes disease treatment, and is also associated with the anti-diabetes effects of vanadium complexes. The inhibitory activities against PTP1B and alkaline phosphatase (ALP) by oxovanadium complexes with 2,2'-biimidazole (L¹), 2,2'-bipyridine (L²) and 1,10-phenanthroline (L³) have been investigated *in vitro*. The complexes of [VO(L¹~L³)] and [VO(L¹~L³)₂] have been found to be potent inhibitors against PTP1B (IC₅₀=120~260 nmol/L). Their inhibitory ability is close to bis(maltolato)oxovanadium (BMOV). Kinetics assays suggest that these complexes inhibit PTP1B in a classical competitive manner (K_i=20~160 nmol/L). The inhibitory activities of these complexes against PTP1B are 10³ fold higher than that against ALP, showing a selectivity against both phosphatases.

Keywords oxovanadium complex; protein tyrosine phosphatase 1B; alkaline phosphatase; inhibitor

具有生物活性和药物功能的含钒化合物引起生命科学、药学、化学多个领域的关注,自 1980 年首次报道了钒化合物具有胰岛素样活性以来^[1],钒化合物作为潜

在的糖尿病治疗剂激起了生物无机化学研究的兴趣.另一方面,蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)通过去磷酸化胰岛素受体,负向调

* E-mail: luliping@sxu.edu.cn; miaoli@sxu.edu.cn; fxq@jlu.edu.cn

Received January 5, 2009; revised March 26, 2009; accepted April 15, 2009.

国家自然科学基金(No. 20471033)、山西省自然科学基金(No. 20051013)、山西省回国人员 2008 年科研资助项目.

节胰岛素信号传导^[2]. PTP1B 基因敲除小鼠实验表明, PTP1B 的缺失能使小鼠抵抗高能量食物诱导的高血糖和肥胖症^[3]. 因此, PTP1B 抑制剂的研究可望筛选出高效低毒的抗糖尿病和抗肥胖症的新药物. 近些年来, 筛选针对 PTP1B 的高效、专一的抑制剂作为治疗糖尿病的药物吸引了众多的研究学者^[4], 目前已报道的抑制剂大多为有机小分子, 如二氟亚甲基磷酸盐类、*O*-羧甲基-水杨酸类、2-草酰氨基苯甲酸类、苯并咪唑和苯并噁吩-苯氧乙酸类、噻二唑烷酮类、哒嗪类化合物等^[5]. 临床研究表明, 钒的无机盐和配合物都有降糖作用^[6], 但无机钒化合物具有较低的口服吸收能力, 对身体也有一定的毒副作用. 常见的有: 肠胃不舒服、恶心、呕吐和腹泻等^[7], 这些毒副作用限制了其在临床上的应用. 许多实验结果表明^[8], 包含有机配体的钒化合物, 比简单的无机盐脂溶性好、细胞渗透能力强, 因而生物利用度高, 达到同样疗效所需剂量小, 相对降低了毒性. 一系列新的有机配体氧钒配合物应运而生, 如双麦芽酚氧钒 (BMOV), 乙酰丙酮氧钒 [VO(acac)₂], 吡啶二羧酸氧钒 [VO(pic)₂] 等^[9], 试图替代无机钒盐, 提高钒的生物利用度. 研究表明钒酸盐和钒配合物是很好的 PTP 抑制剂^[10], 可通过抑制 PTP1B 降低血糖^[11], 这使得开发和研究有机钒化合物作为治疗糖尿病的新型药物成为近年来热门课题之一.

杂环化合物和以杂环化合物为配体合成的金属配合物以其新颖的结构及独特的功能在配位化学、生物化学、医药科学以及材料科学领域引起了广泛的重视, 得到了深入的研究. 在生物体内, 许多金属蛋白酶都含有组氨酸残基, 其咪唑氮与金属的配位对许多蛋白酶的功能起关键性的作用. 2,2'-联咪唑(2,2'-biimidazole, H₂biim, L¹), 2,2'-联吡啶(2,2'-bipyridine, bpy, L²)与 1,10-邻菲咯啉(1,10-phenanthroline, phen, L³)均为含氮杂环的平面双齿配体, 具有很强的配位能力, 是生物无机化学研究者常用的平面螯合配体. 我们最近的研究结果显示多吡啶与三齿席夫碱混配氧钒配合物对蛋白酪氨酸磷酸酶表现出很好的抑制作用^[12]. 本文中我们合成了含氮杂环的平面双齿配体与钒的 1:1 型和 2:1 型配合物, 探讨配合物对 PTP1B 的体外抑制活性和作用机理, 为进一步筛选小分子氧钒配合物 PTP1B 抑制剂提供依据. 另一方面, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)在蛋白去磷酸化过程中也起着十分重要的作用, 临床研究表明糖尿病患者血清中的 ALP 明显高于健康对照组, 两者间有显著差异^[13], 本文通过研究氧钒配合物与 ALP 的作用探讨氧钒化合物对不同磷酸酶的抑制作用.

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器

碱性磷酸酶为 Sigma 产品; 对硝基苯磷酸二钠盐 (*p*-NPP) 上海西宝生物有限公司; MOPS [3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid], GSH [*L*-glutathione (reduced)] 购买自北京华美生物有限公司; 合成所用试剂均为国内市售分析纯, 购回直接使用.

C, H, N 组成分析使用 Perkin-Elmer 240B 微量元素分析仪器; ¹H NMR 在 DRX 300 MHz 核磁共振仪上测试; 紫外光谱用 Hewlett-Packard 8453 UV-Vis 吸收光谱仪记录; 红外光谱用 KBr 压片法在 Shimadzu 8300 FT-IR 光谱仪器上测试; 酶活性测试使用 BIO-RAD 550 USA 酶标仪, pH 测试使用 PHS-3TC 型 pH 计.

1.2 人蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 的表达与纯化

通过 5'端引物 5'-CCATATGGAGATGGAAAAGG-AGTTCGAG-3' (28 bp) 和 3'端引物 5'-CCTAGTCCTC-GTGGGAAAGCTCCTTCC-3' (27 bp), 用 PCR 扩增得到蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 催化域基因, 其中 5'端引入 NdeI 限制酶位点, 而 3'端引入终止密码子. 将其连入用限制酶 EcoRV 消化的克隆载体 pBluescript II KS 中, 经 Nde I 和 EcoR I 双酶切, 核酸电泳鉴定产物正确后, 重组到用上述两种限制酶消化的表达载体 pT7, 并转化入 *E. coli* BL21 感受态细胞. 阳性克隆接种于 5 mL Luria-Bertani (LB) 液体培养基中(含 100 μg/mL Amp, 34 μg/mL Cam, 下同), 置于 37 °C 振荡培养过夜, 取 2 mL 该培养物于 200 mL LB 液体培养基中扩大培养至 OD₅₅₀=0.6, 加入 IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside), 使其终浓度为 100 μmol/L, 并在 28 °C 培养过夜; 将所得菌液离心、破碎, 通过 SDS-PAGE 验证 PTP1B 催化结构域(35 kDa) 的表达情况.

为取得纯化蛋白所需菌体, 诱导前进一步扩大培养, 诱导后将菌液在 6000 r/min 离心 10 min, 收集菌体. 取 10 g 用 PBS 洗涤, 加 100 mL 提取缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 2-mercaptoethanol (2-ME), 1 mmol/L benzamidine, 0.002% phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 20 μg/mL leupeptin, 1 μmol/L pepstatin A, 1 μg/mL aprotinin, pH 7.5), 超声波破碎; 15000 r/min 离心 30 min, 收集上清, 得到粗提物. Buffer Q (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 2 mmol/L 2-ME, 1 mmol/L EDTA) 平衡 FFQ 柱, 将粗提物用 Buffer Q 稀释一倍加到 FFQ 柱上, 用含 0.1 mol/L NaCl 的 Buffer Q 洗脱, 除去杂蛋白, 然后用含 0.2 mol/L NaCl 的 Buffer Q

洗脱, 得到活性组分. 用 Buffer Q 平衡 S-100 层析柱, 将洗脱得到的活性组分除盐、浓缩后, 上 S-100 柱, 收集活性峰, 浓缩, 透析除去 EDTA, 用 Bradford 法, 以牛血清白蛋白为标准测定蛋白浓度.

1.3 化合物的合成

配体 2,2'-联咪唑按文献[14]合成, 白色粉末. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 7.08 (s, 4H). 配合物按文献[15~19]合成.

1.3.1 $[\text{VO}(\text{H}_2\text{biim})(\text{OH}_2)_3]\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) 的合成

VOSO_4 (1.082 g, 5 mmol) 于 10 mL 水中溶解, 待完全溶解后加入配体联咪唑(1.342 g, 10 mmol)的 20 mL 热水溶液, 室温搅拌反应 3 h, 过滤, 收集滤液, 一周后析出蓝色晶体, 分别用冰水、乙醚洗涤, 真空干燥. 产率为 25%. Anal. calcd for $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_8\text{SV} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 18.61, H 4.16, N 14.47; found C 18.72, H 4.16, N 14.55.

1.3.2 $[\text{VO}(\text{H}_2\text{biim})_2\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2) 的合成

V_2O_5 (0.460 g, 2.5 mmol) 溶于过量浓 HCl 中, 加热溶解生成绿色的氯化氧钒溶液, 蒸干溶剂, 将 20 mL 联咪唑(1.342 g, 10 mmol)的水与甲醇 1:1 ($V:V$)溶液 10 mL 加入粘稠状 VOCl_2 中, 室温反应 6 h, 生成绿色产物. 收集沉淀, 分别用冰水、甲醇、乙醚洗涤, 真空干燥. 产率 16%. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{OV} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: C 30.14, H 4.22, N 23.43; found C 29.85, H 3.67, N 23.33.

1.3.3 $[\text{VO}(\text{bpy})(\text{OH}_2)_3]\text{SO}_4$ (3) 的合成

VOSO_4 (1.082 g, 5 mmol) 溶于 10 mL 水中, 将 2,2'-联吡啶(0.783 g, 5 mmol)溶于 5 mL 甲醇中, 待完全溶解后加入 VOSO_4 溶液, 60 °C 回流反应 5 h, 析出绿色沉淀, 冷却, 收集沉淀, 分别用冰水、甲醇、乙醚洗涤, 真空干燥. 产率为 28%. Anal. calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{SV}$: C 32.18, H 3.78, N 7.51; found C 31.46, H 3.67, N 7.29.

1.3.4 $[\text{VO}(\text{bpy})_2(\text{OSO}_3)] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4) 的合成

VOSO_4 (1.084 g, 5 mmol) 溶于 10 mL 水中, 将其加入 2,2'-联吡啶(1.562 g, 10 mmol)的 10 mL 甲醇溶液中, 室温反应 12 h, 析出棕色沉淀, 冷却, 收集沉淀, 分别用冰水、甲醇、乙醚洗涤, 真空干燥^[18]. 产率为 47%. Anal. calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{SV} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: C 43.88, H 4.42, N 10.23; found C 43.73, H 3.89, N 10.25.

1.3.5 $[\text{VO}(\text{phen})(\text{OH}_2)_3]\text{SO}_4$ (5) 的合成

VOSO_4 (1.084 g, 5 mmol) 溶于 10 mL 水中, 将 1,10-邻菲咯啉(0.901 g, 5 mmol)的 5 mL 甲醇溶液加入其中, 60 °C 回流反应 5 h, 析出绿色沉淀, 冷却, 收集沉淀, 分别用冰水、甲醇、乙醚洗涤, 真空干燥. 产率为 38%. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{SV}$: C 36.28, H 3.55, N 7.05; found C 36.50, H 3.63, N 6.90.

1.3.6 $[\text{VO}(\text{phen})_2(\text{OSO}_3)] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (6) 的合成

VOSO_4 (1.080 g, 5 mmol) 溶于 10 mL 水中, 将 1,10-邻菲咯啉(1.802 g, 10 mmol)溶于 10 mL 甲醇中, 待完全溶解后加入 VOSO_4 溶液, 室温反应 6 h 后过滤得到棕色滤液, 过夜析出棕色沉淀, 收集沉淀, 分别用冰水、甲醇、乙醚洗涤, 真空干燥. 产率为 16%. Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{SV} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: C 45.65, H 4.47, N 8.87; found C 45.46, H 4.50, N 8.85.

1.4 氧钒配合物对 PTP1B 和 ALP 的抑制作用

底物对硝基苯磷酸二钠盐(p -NPP)被磷酸酶水解的产物对硝基苯酚(p -NP)在 405 nm 处有强吸收峰^[11,20], 其摩尔吸光系数为 $1.78 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. 配合物对 PTP1B 的抑制作用在 pH 7.20 buffer (20 mmol/L MOPS, 2 mmol/L GSH, 50 mmol/L NaCl)体系中进行; 对 ALP 的抑制作用在 pH 10.2 buffer (50 mmol/L NaCO_3 , 50 mmol/L NaHCO_3 , 2 mmol/L MgCl_2)体系中进行. 反应温度 25 °C, 体系总体积 100 μL .

半数抑制浓度 IC_{50} 测定: 一定浓度梯度的配合物作为抑制组分于酶活性测定体系中(96 孔板), 温浴 10 min, 酶浓度为 80 nmol/L, 加入 p -NPP (100 mmol/L, 2 μL)启动酶反应, 30 min 后加入 NaOH (2 mol/L, 5 μL)终止反应, 测定 OD_{405} (平行实验三次), 以酶的相对剩余活力对抑制剂浓度的对数作图, 实验中分别采取非酶校正, 溶剂校正.

抑制常数 K_i 测定: 根据 Lineweaver-Burk 双倒数方程, 酶反应速率随抑制剂和底物的浓度改变而改变. 酶浓度为 160 nmol/L, 底物浓度变化范围在 0.2~5 mmol/L 之间, 抑制剂浓度变化范围在各自 IC_{50} 值附近.

2 结果和讨论

2.1 氧钒配合物的表征

2.1.1 红外光谱

本文合成的联咪唑单配体氧钒配合物为晶体颗粒, 其它氧钒配合物均呈粉末状. 红外光谱表明, 配合物中均存在配体和钒氧离子的特征吸收峰. 咪唑环 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动峰在自由配体联咪唑中为 1684 cm^{-1} , 形成氧钒配合物后, 1 和 2 中该峰分别红移 48 和 44 cm^{-1} ; 吡啶环 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动峰在自由配体联吡啶中为 1649 cm^{-1} , 而在配合物 3 和 4 中该峰均红移 47 cm^{-1} ; 邻菲咯啉环上 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动峰由 1638 cm^{-1} 在 5 和 6 中分别红移 9 和 3 cm^{-1} , 这些都表明杂环氮原子直接参与了金属配位^[21,22], 受其配位影响, 杂环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动峰也有明显地位移. 配合物 1~6 的 $\text{V}=\text{O}$ 伸缩振动峰出现在 $974 \sim 1001 \text{ cm}^{-1}$, 仅配合物 2 和 3 的 $\text{V}=\text{O}$ 伸缩振动峰

与文献[15, 16]报道值 978 和 979 cm^{-1} 有很小的位移, 其它配合物该值与文献报道一致^[15, 18, 19]. 另外配合物中 620 和 420 cm^{-1} 附近出现的新峰分别表明了 V—N 和 V—O 键的形成^[13, 23]. 相关数据见表 1.

表 1 氧钒配合物 1~6 和配体 L¹~L³ 的主要红外吸收频率 (cm^{-1}) 及归属

Table 1 Principle characteristic IR absorption frequency (cm^{-1}) for the oxovanadium complexes 1~6 and L¹~L³

Label	$\nu_{\text{C}=\text{N}}$	$\nu_{\text{C}=\text{C}}$	$\nu_{\text{V}=\text{O}}$	$\nu_{\text{V}-\text{N}}$	$\nu_{\text{V}-\text{O}}$
L ¹	1684 (s)	1545 (s)			
1	1636 (s)	1544 (s)	1001 (s)	624 (m)	457 (m)
2	1640 (s)	1529 (s)	974 (s)	620 (m)	
L ²	1649 (s)	1557 (s)			
3	1602 (s)	1573 (s)	983 (s)	598 (m)	420 (m)
4	1602 (s)	1563 (s)	981 (s)	600 (m)	420 (m)
L ³	1638 (s)	1561 (s)			
5	1629 (s)	1586 (s)	978 (s)	606 (m)	433 (m)
6	1635 (s)	1560 (s)	978 (s)	619 (m)	433 (m)

2.1.2 紫外-可见光谱

由于氧钒配合物 1~6 在水中的溶解性较差, 其紫外光谱在 DMSO 溶剂中测定. 配合物在紫外区的荷移跃迁峰较各自配体峰均有明显位移, 表明配体参与了金属配位; 钒氧离子含一个 d 电子, 在 1~6 中, 其 d-d 跃迁从八面体对称降低为 C_{4v} (2, 4, 6) 和 C_s 对称性 (1, 3, 5). 按 C_{4v} 对称性, 其 d 轨道具有四个能级: xy (b₂) < xz, yz (e*) < x²-y² (b₁) < z² (a₁)^[21, 24]. 可见区基于钒氧化合物的对称性, 化合物 2, 4, 5 给出了全部跃迁峰 I: b₂→e* (d_{xy}→d_{xz}, d_{yz}), II: b₂→b₁ (d_{xy}→d_{x²-y²}) 和 III: b₂→a₁ (d_{xy}→d_{z²}), 化合物 1, 3, 6 给出了 I 和 III 两个 d-d 跃迁, 归属和摩尔吸光系数值见表 2.

配体与钒 1:1 反应时, 钒氧离子与配体两个氮原子及三个水分子氧配位形成 VO(N₂O₃) 型六配位配合物, 呈蓝绿色; 按 2:1 反应时, 钒氧离子与两个配体分子四个氮原子及溶液中不同的阴离子配位也形成六配位结构的配合物, 其中 VO(N₂N₂Cl) 型结构双联咪唑钒为绿色, VO(N₂N₂O) 型双联吡啶钒和双邻菲咯啉钒均为棕色, 它们在空气中均稳定存在. 元素分析结果表明实验值和理论值吻合较好. 综上分析, 本文合成配合物为目标氧钒配合物, 其结构式如图 1 所示.

2.2 氧钒配合物对 PTP1B 的抑制作用

图 2 和表 3 分别给出了氧钒配合物 1~6 在 pH 7.20 的 MOPS 缓冲体系中对 PTP1B 的抑制浓度依赖性和 IC₅₀ 值, 实验中以 VOSO₄ 为阳性参照物. 实验结果表明杂环配体 L¹~L³ 对 PTP1B 抑制作用较差, L¹ 的 IC₅₀ 值

表 2 氧钒配合物 1~6 和配体 L¹~L³ 在 DMSO 中的紫外吸收峰 [$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$, $\epsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$]

Table 2 UV-Vis data for the oxovanadium complexes 1~6 and L¹~L³ in DMSO [$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$, $\epsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$]

Label	L(n→π*)	LMCT	d-d		
			III	II	I
L ¹	282 (20053)				
1		276 (18495)	332 (sh, 561)		785 (27)
2		270 (12125)	350 (sh, 280) 445 (105)	574 (15)	758 (28)
L ²	267 (27105)				
3		275 (21112)	332 (sh, 513)		762 (26)
4		269 (24739)	348 (sh, 572) 440 (210)	577 (12)	761 (20)
L ³	282 (14924)				
5		274 (14548)	389 (206)	570 (30)	756 (36)
6		269 (31850)	365 (sh, 827) 438 (416)		761 (36)

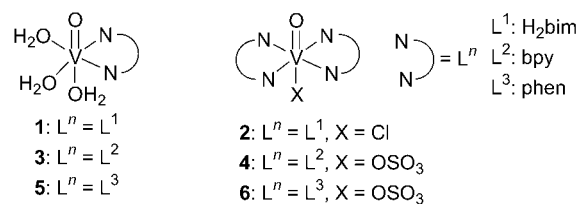


图 1 氧钒配合物的结构式

Figure 1 Schemes of the oxovanadium complexes

约为 200 $\mu\text{mol/L}$, 而 L² 和 L³ 在 10 mmol/L 时均未表现出抑制活性. 该类配体与钒氧配合后, 对 PTP1B 的活性表现出较强的抑制能力, IC₅₀ 值范围在 120~260 nmol/L 之间, 但略低于多吡啶与三齿席夫碱混配氧钒配合物对 PTP1B 的抑制作用^[12]. 1:1 型配合物抑制顺序依次为: 1 > 5 > 3; 2:1 型配合物为: 6 > 4 > 2. 三个配体的 1:1 型配合物抑制能力约为 VOSO₄ 的 50%, 2:1 型配合物中 2, 4 活性较差, 约为 VOSO₄ 的 30%; 但 6 活性好, 接近于 1:1 型配合物 5. 这表明: 不同的配体以及配位类型对配合物的空间构型产生的影响不同, 在一定程度上影响着对酶的抑制能力.

抑制剂对酶活力的抑制作用主要有两种模式, 可逆抑制和不可逆抑制, 而可逆抑制又有四种类型: 竞争性, 非竞争性, 反竞争性和混合竞争性. 本文利用 Lineweaver-Burk 方程(式 1)考察了六种氧钒配合物对 PTP1B 的抑制类型(图 3), 由图 3 可以看出: 化合物均表

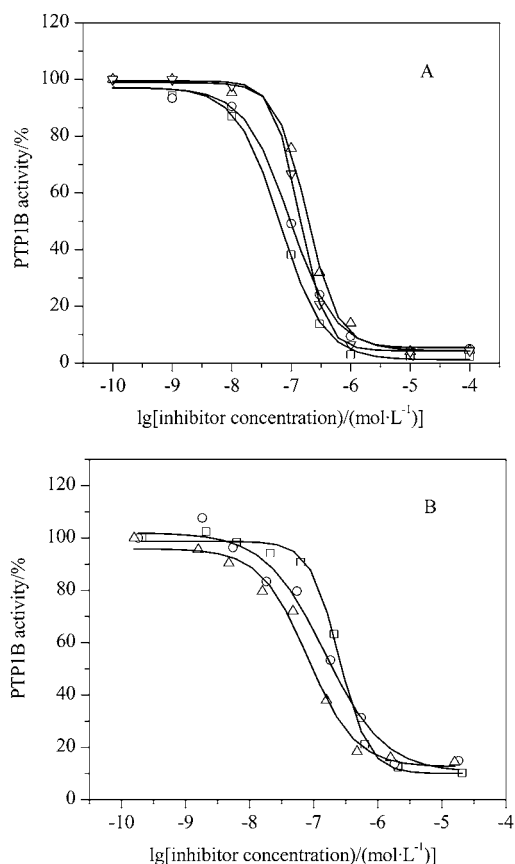


图2 钒化合物浓度对 PTP1B 酶活性的影响

Figure 2 Dose effect of vanadium complexes on PTP1B activity

IC₅₀ values calculated from the regression curves fit for each inhibitor. (A) □—VOSO₄, ○—1, △—3, ▽—5; (B) □—2, ○—4, △—6

现为交于纵轴的一组直线,表明抑制剂对 PTP1B 抑制作用属于典型的竞争性抑制模式,与多吡啶与三齿席夫碱混配钒配合物对 PTP1B 的抑制类型一致^[12]。分别以不同浓度抑制剂的斜率对抑制剂浓度作图(图 3 中的插图),按照式(1)计算出化合物的抑制常数见表 3。含氮杂环类钒配合物的抑制常数 K_i 值在 20~120 nmol/L 之间,均低于它们的 IC₅₀ 值。

$$\text{竞争性抑制: } v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]}$$

$$\text{双倒数式: } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i}) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

研究表明,钒酸盐是 PTP1B 的竞争性抑制剂,作为一种磷酸盐类似物可与 PTP1B 活性中心的半胱氨酸结合,从而影响酶的催化活性^[10,25]。不管注射或口服,钒的无机盐和配合物的类胰岛素活性都有很大差异,说明配合物进入体内后并非迅速降解,完全被体内竞争性小分子配体所取代,而是直到进入细胞前还保持完整或者

表 3 氧钒配合物配位模式对 PTP1B 的抑制作用比较

Table 3 The inhibition of complexes with coordination geometries against PTP1B

Ligand/ Coordinated geometry	Inhibitor	IC ₅₀ / (nmol·L ⁻¹)	K _i / (nmol·L ⁻¹)	Inhibitory mode
	VOSO ₄	≈ 70	—	—
L ¹	H ₂ biim	≈ 2 × 10 ⁵	—	—
L ²	bpy	> 10 ⁷	—	—
L ³	phen	> 10 ⁷	—	—
VO(N ₂ O ₃)	1	≈ 120	20	Competitive
VO(N ₂ N ₂ Cl)	2	≈ 260	158	Competitive
VO(N ₂ O ₃)	3	≈ 170	56	Competitive
VO(N ₂ N ₂ O)	4	≈ 240	145	Competitive
VO(N ₂ O ₃)	5	≈ 140	43	Competitive
VO(N ₂ N ₂ O)	6	≈ 120	92	Competitive
VO(O ₂ O ₂)	BMOV ^a	109	900	Competitive
VO(O ₂ O ₂)	VO(hino) ₂ ^b	270	150	Competitive
VO(O ₂ N ₂)	VO(pic) ₂ ^c	750	700	Competitive

^a BMOV, bis(maltolato) oxovanadium^[11]; ^b VO(hino)₂, bis(hinokitolonato) oxovanadium^[26]; ^c VO(pic)₂, bis(picolinato) oxovanadium^[26]。

部分未被取代^[6]。从化学的观点看,活性与结构存在一定的关系。Seale 等^[26]对比了具有 VO(O₂O₂)和 VO(O₂N₂)配位结构的多种有机钒对 PTP1B 的抑制活性,全部氧原子配位化合物活性优于氮氧原子混合配位化合物(表 3),但它们的活性均低于 BMOV 和硫酸氧钒。本文实验结果给出的氧钒配合物具有较强的抑制能力,单配体配位的 VO(N₂O₃)型配合物 **1**, **3**, **5** 和双配体配位的 VO(N₂N₂O)型配合物 **6** 的活性接近 BMOV^[11]的活性;双配位型 VO(N₂N₂Cl)型配合物 **4** 和 VO(N₂N₂O)型配合物 **5** 活性接近于 VO(O₂O₂)型配合物 VO(hino)₂, 抑制能力约为 BMOV 的 40%。目前报道的各种钒化合物对 PTP1B 的抑制模式大多为竞争性抑制^[11,27], 抑制剂和底物竞争酶的结合部位^[28]。另外,采用高通量筛选技术,或运用基于 PTP1B 酶三维结构的设计方法,目前已获得了大量有机小分子抑制剂,主要包括酪氨酸磷酸酯(pTyr)模拟物、变构抑制剂和作用位点尚不明确的其它抑制剂,其中具有代表性的 pTyr 模拟物二氟亚甲基磷酸盐类化合物是目前报道的抑制能力最强的 PTP1B 抑制剂, K_i 值可达 2.4 nmol/L^[29], 大部分有机小分子抑制剂的能力在 10⁻⁴~10⁻⁸ mol/L^[4,5], 钒化合物的抑制能力在 10⁻⁶~10⁻⁸ mol/L 间,这表明了钒配合物具有一定的优势。

2.3 氧钒配合物对 ALP 的抑制活性

在 pH 值为 10.2 的 NaCO₃-NaHCO₃ 缓冲测活体系中,加入不同浓度的氧钒配合物抑制剂(VOSO₄, **1**~**6**),测

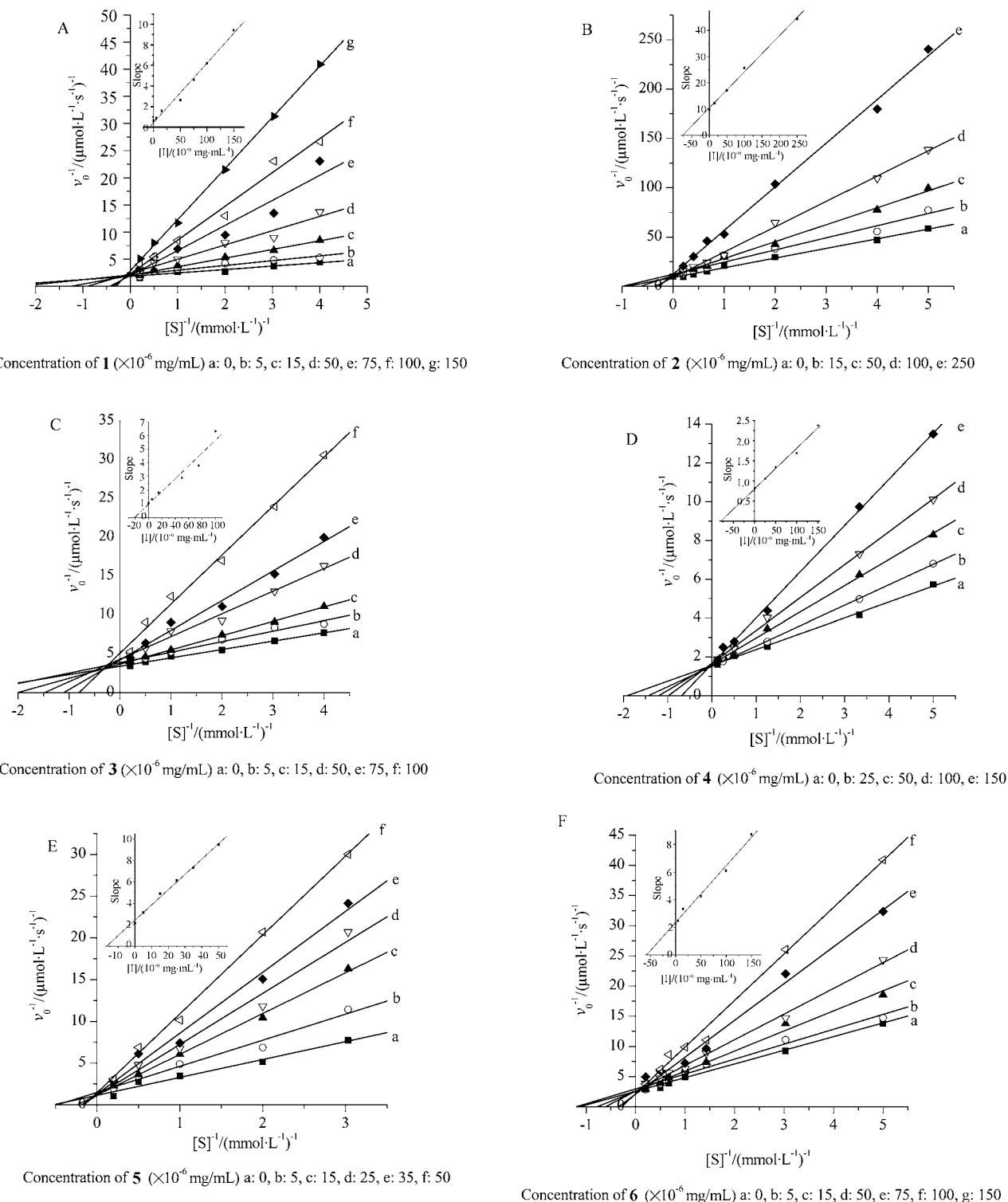


图3 氧钒配合物对 PTP1B 的抑制动力学双倒数图

Figure 3 Lineweaver-Burk plots for competitive inhibition of the oxovanadium complexes on PTP1B for the hydrolysis of *p*-NPP. The inset represents the slope versus the concentration of the complex to determine the inhibition constant. The line is drawn using a linear least squares fit. (A) **1**, (B) **2**, (C) **3**, (D) **4**, (E) **5**, (F) **6**

定它们对碱性磷酸酶活力的影响, 其中 VOSO_4 用来作为氧钒配合物的阳性参照物(图 4)。抑制实验表明: 硫酸氧钒和含氮杂环氧钒配合物对 ALP 均表现出了一定的抑制作用, IC_{50} 值在 20~50 $\mu\text{mol/L}$ 间, 与文献报道

的其它配位型氧钒化合物基本在相同的数量级^[30], 它们的抑制活性顺序为 $\mathbf{1} > \mathbf{3} > \mathbf{2} = \mathbf{4} > \mathbf{6} > \mathbf{5} > \text{VOSO}_4$ 。钒化合物对 ALP 的抑制活性较 PTP1B 低约 10^3 倍, 有机钒活性大于硫酸氧钒, 这可能是由于钒化合物作用于两种

不同的磷酸酶时作用位点不同, 进而结合方式不同而导致。Zhou 等^[31]报道了五价钒离子的钒酸盐: 偏钒酸钠、钒酸钠、偏钒酸铵对 ALP 的抑制作用, 抑制能力约为本文四价钒配合物的 20%, 含有机配体联吡啶和邻菲咯啉的过氧钒配合物也表现出了对 ALP 较好的抑制作用^[20], 且均属竞争型抑制模式, 抑制常数在毫摩尔数量级, 抑制能力明显低于四价的氧钒配合物。含氮杂环氧钒配合物对 ALP 的抑制作用表明, 当较高浓度的配合物进入体内时, ALP 会与其结合, 这在一定程度上可以降低 ALP 水平, 同时也可减少钒在体内的积累, 降低钒化合物毒副作用, 而低浓度的氧钒配合物在体内则可能对 ALP 的影响不大。同时也说明氧钒配合物对磷酸酶存在一定的选择性。

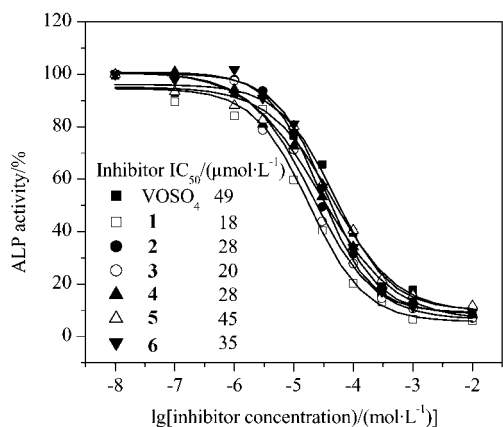


图4 氧钒化合物浓度对 ALP 活性的影响

Figure 4 Dose effect of the oxovanadium complexes on ALP activity

IC₅₀ values calculated from the regression curves fit for each inhibitor

3 小结

含氮平面杂环螯合配体 2,2'-联咪唑、2,2'-联吡啶、1,10-邻菲咯啉氧钒配合物对 PTP1B 表现出了较强的体外抑制活性, 配合物的活性和配体结构有密切关系, 这些配合物对 PTP1B 的抑制活性较 ALP 高约 10³ 倍, 表明配合物对两种磷酸酶的作用有一定的选择性。因此对配体进行各种修饰仍是加强氧钒配合物生物活性的重要途径之一, 深入的机理探讨正在进一步研究中。

References

- Shechter, Y.; Karlsh, S. J. D. *Nature* **1980**, *284*, 556.
- (a) Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. *Nature* **2001**, *414*, 799.
(b) Li, S. Q.; Depetris, R. S.; Barford, D.; Chernoff, J.; Hubbard, S. R. *Structure* **2005**, *13*, 1643.
- Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A. L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-

- Hagen, J.; Chan, C. C.; Ramachandran, C.; Gresser, M. J.; Tremblay, M. L.; Kennedy, B. P. *Science* **1999**, *283*, 1544.
- (a) Salmeen, A.; Andersen, J. N.; Myers, M. P.; Tonks, N. K.; Barford, D. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1401.
(b) Taylor, S. D.; Hill, B. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2004**, *13*, 199.
(c) Zhou, M.; Zhang, W.; Cheng, Y.-H.; Ji, M.-J.; Xu, X.-J. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*(23), 2131 (in Chinese).
(周梅, 章威, 成元华, 计明娟, 徐筱杰, 化学学报, **2005**, *63*(23), 2131.)
- (a) Johnson, T. O.; Ermoloeff, J.; Jirousek, M. R. *Nat. Rev. Drug. Discovery* **2002**, *1*, 696.
(b) Shi, J.-X.; Shi, Q. *Sect. Clin. Biochem. Lab Med. Foreign Med. Sci.* **2005**, *26*(5), 281 (in Chinese).
(石继祥, 施杞, 国外医学临床生物化学与检验学分册, **2005**, *26*(5), 281.)
(c) Pan, Y.-M.; Ji, M.-J.; Ye, X.-Q.; Kuang, P.-X. *Chin. J. Org. Chem.* **2003**, *23*(2), 167 (in Chinese).
(潘咏梅, 计明娟, 叶学其, 邝平先, 有机化学, **2003**, *23*(2), 167.)
(d) Yu, Q.; Li, Y.-N.; Ge, Z.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*(2), 188 (in Chinese).
(于倩, 李艳妮, 葛志强, 化学学报, **2008**, *66*(2), 188.)
- Chen, R.-J.; Tu, S.-J.; Zhou, Y.-Z. *Chem. World* **2006**, *2*, 119 (in Chinese).
(陈瑞金, 屠淑洁, 周荫庄, 化学世界, **2006**, *2*, 119.)
- Zhang, Y.; Yang, X.-D.; Wang, K. *Chin. Sci. Bull.* **2005**, *50*(14), 1459 (in Chinese).
(张悦, 杨晓达, 王夔, 科学通报, **2005**, *50*(14), 1459.)
- (a) Thompson, K. H.; McNeill, J. H.; Orvig, C. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2561.
(b) Rangel, M.; Tamura, A.; Fukushima, C.; Sakurai, H. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 128.
- (a) McNeill, J. H.; Yuen, V. G.; Hoveyda, H. R.; Orvig, C. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1489.
(b) Xie, M.-J.; Liu, W.-P.; Yang, Y.-K.; Pu, S.-P.; Li, L.; Yang, L.-C.; Chen, Z.-H. *Chin. J. Med. Chem.* **2001**, *11*(3), 134 (in Chinese).
(谢明进, 刘伟平, 杨懿昆, 普绍平, 李玲, 杨丽川, 陈植和, 中国药物化学杂志, **2001**, *11*(3), 134.)
(c) Li, M.; Ding, W. J.; Baruah, B.; Crans, D. C.; Wang, R. L. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1846.
- Poucheret, P.; Verma, S.; Grynpsas, M. D.; McNeill, J. H. *Mol. Cell Biochem.* **1998**, *188*, 73.
- Peters, K. G.; Davis, M. G.; Howard, B. W.; Pokross, M.; Rastogi, V.; Diven, C.; Greis, K. D.; Eby-Wilkens, E.; Maier, M.; Evdokimov, A.; Soper, S.; Genbauffe, F. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 321.
- Yuan, C. X.; Lu, L. P.; Gao, X. L.; Wu, Y. B.; Guo, M. L.; Li, Y.; Fu, X. Q.; Zhu, M. L. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, online, DOI:10.1007/s00775-009-0496-6.
- Xiao, L.-P.; Qiu, M. C. *Chin. J. Diabetes* **2000**, *8*, 198 (in Chinese).
(肖丽平, 邱明才, 中国糖尿病杂志, **2000**, *8*, 198.)

- 14 Thummel, R. P.; Gouille, V.; Chen, B. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3057.
- 15 Sang, R. L.; Zhu, M. L.; Yang, P. *Acta Crystallogr.* **2002**, *58E*, m172.
- 16 Cancela, J.; Garmendia, M. J. G.; Quirós, M. *Inorg. Chim. Acta* **2001**, *313*, 156.
- 17 Khan, M. I.; Cevik, S.; Doedens, R. J. *Chem. Commun.* **2001**, 1930.
- 18 Triantafillou, G. D.; Tols, E. I.; Terzis, A.; Deliqiannakis, Y.; Raptopoulou, C. P.; Sigalas, M. P.; Kabanos, T. A. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 79.
- 19 Dong, Y. H.; Narla, R. K.; Sudbeck, E.; Uckun, F. M. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *78*, 321.
- 20 Zhou, X. W.; Chen, Q. X.; Chen, Z.; He, Z. Q.; Zhou, H. M. *Biochemistry* **2000**, *65*(12), 1690.
- 21 Baran, E. J. *J. Coord. Chem.* **2001**, *54*, 215.
- 22 (a) Ando, R.; Ono, H.; Yagyu, T.; Maeda, M. *Inorg. Chim. Acta* **2004** *357*, 817.
(b) Beard, C. D.; Barrie, R. J.; Evans, J.; Levason, W.; Reid, G.; Spicer, M. D. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 4391.
- 23 Zamian, J. R.; Dockal, E. R.; Castellano, G.; Oliva, G. *Polyhedron* **1995**, *14*, 2411.
- 24 Sakurai, H.; Katoh, A.; Yoshikawa, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*(11), 1645.
- 25 Huyer, G.; Liu, S.; Kelly, J.; Moffat, J.; Payette, P.; Kennedy, B.; Tsaprailis, G.; Gresser, M. J.; Ramachandran, C. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*(2), 843.
- 26 Seale, A. P.; Jesus, L. A.; Kim, S.-Y.; Choi, Y.-H.; Lim, H. B.; Hwang, C.-S.; Kim, Y.-S. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 221.
- 27 Nxumalo, F.; Glover, N. R.; Tracey, A. S. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 534.
- 28 Wang, J. Y.; Zhu, S. G.; Xu, C. F. *Textbook of Biological Chemistry*, Higher Education Press, Beijing, **2002**, p. 368 (in Chinese).
(王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 生物化学, 高等教育出版社, 北京, **2002**, p. 368.)
- 29 Shen, K.; Keng, Y. F.; Wu, L.; Guo, X. L.; Lawrence, D. S.; Zhang, Z. Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47311.
- 30 (a) Williams, P. A. M.; Barrio, D. A.; Etcheverry, S. B. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *75*, 99.
(b) Whisnant, A. R.; Gilman, S. D. *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 226.
- 31 Zhou, X.-W.; Shi, Y.-Y.; Liu, X. D.; Chen, Z.; Chen, Q. X. *J. Xiamen Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2000**, *39*(3), 375 (in Chinese).
(周兴旺, 史渊源, 刘晓丹, 陈忠, 陈清西, 厦门大学学报 (自然科学版), **2000**, *39*(3), 375.)

(A0901057 Li, L.)