

吡啶酮类衍生物对 5-脂氧合酶的抑制作用*

谢文林 马 林 郭刚军 段志芳 邹 兰 古练权**

(中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

王 骏

(香港中文大学生物化学系, 香港)

摘要 合成了一系列 3-羟基-4 (1H)-吡啶酮类衍生物, 并研究了它们对 5-脂氧合酶的抑制作用. 发现 6-取代-3-羟基-4 (1H)-吡啶酮化合物 (2a~2e) 对 5-脂氧合酶具有显著抑制作用, 特别是 6-苯硫基-1-苯基-2-甲基-3-羟基-4 (1H)-吡啶酮 (2a) 的抑制效果最好 ($IC_{50} = 2.52 \mu\text{mol/L}$). 6-位没有取代基的羟基吡啶酮类化合物对 5-脂氧合酶却没有抑制作用. 讨论了 6-取代-3-羟基-4 (1H)-吡啶酮类化合物对 5-脂氧合酶的抑制作用机制.

关键词 吡啶酮类衍生物, 5-脂氧合酶, 抑制剂

学科分类号 Q554

5-脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LOX) 广泛存在于动植物的组织中. 它是一种长单链蛋白质, 分子质量可达到 103 ku. 酶的活性中心含有一个非血红素铁原子, 铁以 2 种状态存在, 即 Fe^{2+} (非活化态酶) 和 Fe^{3+} (活化态酶), 并通过 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 的循环实现其催化功能^[1,2]. 在哺乳动物体内, 5-脂氧合酶催化花生四烯酸氧化成 5-羟基四烯酸和 5-羟基过氧四烯酸 (5-HPETE), 而 5-HPETE 在动物体内经生物转化, 形成一类二十碳烯酸^[3,4], 即白三烯 (LTs) 类化合物. 这类化合物 (如 LTC_4 、 LTD_4 、 LTE_4) 又称肽白三烯, 可以引起平滑肌尤其是支气管平滑肌收缩, 引起支气管喘息, 被称为过敏性慢反应物质 (SRS-A). 肽白三烯引起支气管收缩作用强于组胺数百至一千倍, 对许多过敏性疾病和炎症, 如哮喘、牛皮癣、关节炎和肠道炎等疾病的发生起重要作用^[5,6]. 因此, 抑制 5-脂氧合酶的活性可以调控肽白三烯的生物合成, 对治疗哮喘及过敏性炎症性疾病具有重要意义.

具有 3-羟基-4 (1H)-吡啶酮结构特征的化合物, 能与铁、铜等多种金属离子配位, 是一类优良的金属配体, 这类化合物的生理活性, 大都与它们的配位性能有关^[7,8]. 为了筛选对 5-脂氧合酶具有特殊识别和抑制性能的新化合物, 我们设计合成了一系列吡啶酮类衍生物, 考察了它们对 5-脂氧合酶的抑制作用, 结果发现 6-取代-3-羟基-4 (1H)-吡啶酮类衍生物具有优异的抑制性能. 本文也讨论了吡啶酮类衍生物的抑制机制和结构与抑制作用的关系.

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

5-脂氧合酶 (EC 1.13.11.12), 辣根过氧化物酶 (EC 1.11.1.7), 花生四烯酸 (AA), 对二-(二甲氨基) 苯二胺 (TMPD) 为 Sigma 公司产品; 其他试剂为国产分析纯试剂, 未经进一步纯化. 主要测试仪器: XT-4 型熔点测定仪 (温度计未经校正); UV-2501PC 型紫外光谱仪; UNITY INOVA 500MHz 核磁共振仪; Nicolet FT IR-50X 型红外光谱仪; VG ZAB-HS 型质谱仪; 德国 Elementar Vario EL 元素分析仪.

1.2 方法

1.2.1 抑制剂的制备: 吡啶酮衍生物由本实验室合成^[7,9], 其中 2a~2d 为新化合物 (图 1). 产物的结构由核磁共振谱 (^1H NMR)、红外光谱 (IR)、质谱 (MS)、紫外光谱 (UV) 和元素分析确证.

1.2.2 吡啶酮衍生物对 5-脂氧合酶的抑制作用:

采用酶联法进行测定. 本方法的原理是 AA 先被 5-LOX 催化氧化生成 5-羟基过氧四烯酸, 然后辣根过氧化物酶以 5-羟基过氧四烯酸和 TMPD 为底物作用生成一种可在 611 nm 处产生紫外吸收的物质, 便于检测.

* 国家自然科学基金重点项目 (20032020) 和广东省自然科学基金 (2KM04103S) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-84113690, E-mail: cede14@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001-11-26, 接受日期: 2001-12-25

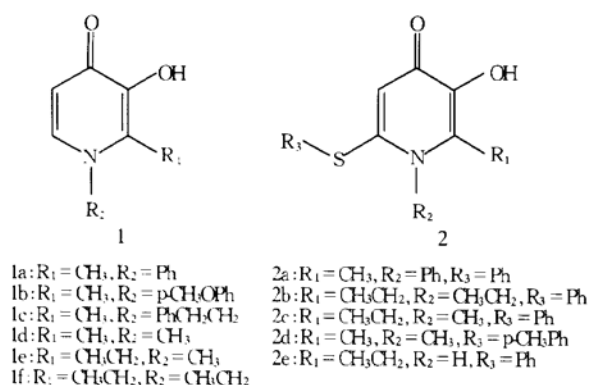


Fig. 1 Chemical structures of pyridinone derivatives

取 5 支分别装有 2.4 ml 0.1 mol/L pH 9.0 磷酸缓冲液的试管, 依次加入 0, 25, 50, 100, 150 μ l, 0.25 mmol/L 的样品 DMF 溶液, 并加入 DMF 液至总体积为 2.6 ml. 分别加入 0.1 ml 0.1 g/L 的 5-脂氧合酶和 0.1 ml 1.0 g/L 的辣根过氧化物酶, 并在 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min. 然后立即加入 0.1 ml 1.0 mmol/L 的花生四烯酸和 0.1 ml 4 g/L 的 TMPD (最后体积为: 3.0 ml), 摇匀后测其在 $\lambda = 611$ nm 处的 A 值 (A_n). 参比液用 0.1 mol/L pH 9.0 的磷酸盐缓冲液. 以未加样品所测得的 A_{control} 值作为 100 个活力单位:

$$\text{相对酶活力} = (A_n / A_{\text{control}}) \times 100$$

然后根据抑制曲线求得各种化合物的 IC_{50} 值 (抑制酶活力 50% 时的抑制剂浓度).

2 结果和讨论

2.1 吡啶酮衍生物的结构鉴定

6-苯硫基-1-苯基-2-甲基-3-羟基-4-(1H)-吡啶酮 (2a), 白色晶体, 产率为: 28%; 熔点: 197.6~200.1 $^{\circ}$ C; IR (KBr) ν_{max} : 3 176, 3 056, 2 921, 1 625, 1 563, 1 482, 1 446 cm^{-1} ; ^1H NMR (DCCl_3) δ : 1.952 (3H, s, 2'-CH₃), 5.882 (1H, s, 5'-H), 7.394~7.621 (10H, m, ph-H); MS (FAB) m/z : 310 ($M + H^+$); 计算值 ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$): C, 69.88; H, 4.89; N, 4.53; S, 10.29. 实测值: C, 69.81; H, 4.83; N, 4.50; S, 10.29.

1, 2-二乙基-6-苯硫基-3-羟基-4-(1H)-吡啶酮 (2b), 白色晶体, 产率为: 48%; 熔点: 181.5~184.1 $^{\circ}$ C; IR (KBr) ν_{max} : 3 163, 3 083, 2 975, 2 935, 2 869, 1 612, 1 559, 1 499, 1 442 cm^{-1} ; ^1H NMR (DCCl_3) δ : 1.330 (3H, t, 2'-CH₂CH₃),

1.509 (3H, t, 1'-CH₂CH₃), 2.953 (2H, q, 2'-CH₂CH₃), 4.390 (2H, q, 1'-CH₂CH₃), 6.331 (1H, s, 5'-H), 7.470~7.504 (5H, m, ph-H); MS (FAB) m/z : 276 ($M + H^+$); 计算值 ($\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{S}$): C, 65.43; H, 6.22; N, 5.09; S, 11.64. 实测值: C, 65.40; H, 6.08; N, 4.99; S, 11.58.

6-苯硫基-1-甲基-2-乙基-3-羟基-4-(1H)-吡啶酮 (2c), 白色晶体, 产率为: 40%; 熔点: 180.9~183.2 $^{\circ}$ C; IR (KBr) ν_{max} : 3 178, 3 056, 2 963, 2 923, 2 853, 1 618, 1 559, 1 472, 1 437 cm^{-1} ; ^1H NMR (DCCl_3) δ : 1.237 (3H, t, 2'-CH₂CH₃), 2.878 (2H, q, 2'-CH₂CH₃), 3.769 (3H, s, 1'-CH₃), 6.341 (1H, s, 5'-H), 7.355~7.407 (5H, m, ph-H); MS (FAB) m/z : 262 ($M + H^+$); 计算值 ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$): C, 64.34; H, 5.79; N, 5.36; S, 12.27. 实测值: C, 64.28; H, 5.71; N, 5.38; S, 12.15.

6-对甲苯硫基-1, 2-二甲基-3-羟基-4-(1H)-吡啶酮 (2d), 白色晶体, 产率为: 38%; 熔点: 156.2~159.0 $^{\circ}$ C; IR (KBr) ν_{max} : 3 171, 2 931, 2 825, 1 620, 1 561, 1 492, 1 358, 1 242, 1 082, 1 058 cm^{-1} ; ^1H NMR (DCCl_3) δ : 2.415 (3H, s, 2'-CH₃), 3.365 (3H, s, Ph-CH₃), 3.918 (3H, s, 1'-CH₃), 6.183 (1H, s, 5'-H), 7.262~7.375 (4H, m, Ar-H); MS (FAB) m/z : 262 ($M + H^+$); 计算值 ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$): C, 64.34; H, 5.79; N, 5.36; S, 12.27. 实测值: C, 64.28; H, 5.71; N, 5.38; S, 12.20.

2.2 吡啶酮衍生物对 5-脂氧合酶的抑制作用

将合成的吡啶酮类衍生物按照 1.2.2 所述方法

Table 1 Inhibition of 5-lipoxygenase by 6-substituted pyridinone derivatives

Compounds	IC_{50} $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ¹⁾	Compounds	IC_{50} $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ¹⁾
2a	2.52	1a	NO ²⁾
2b	13.17	1b	NO
2c	30.83	1c	NO
2d	31.16	1d	NO
2e	37.70	1e	NO
		1f	NO

¹⁾ Each IC_{50} was measured two times and calculated average value. ²⁾ NO: no inhibition. Assay conditions: certain amount of 6-substituted pyridinone derivatives was mixed with 5-lipoxygenase and peroxidase solution (10 μg of 5-LOX and 100 μg of peroxidase in 2.4 ml buffer contain 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 9.0). arachidonic acid (0.1 ml, 1.0 mmol/L) and TMPD (0.1 ml, 4 mmol/L) was added to started the reaction. The A value was measured by absorbance at 611 nm.

进行酶的抑制实验, 以酶的相对活力对抑制剂浓度作图而求得它们的 IC_{50} 值, 结果见表 1.

实验结果表明, 6-取代-3-羟基-4 (1H) -吡啶酮类衍生物 (2a~ 2e) 对 5-脂氧合酶均有明显的抑制作用, 化合物 (2a) 的抑制效果最好 ($IC_{50}=2.52 \mu\text{mol/L}$), 其次是化合物 (2b) ($IC_{50}=13.17 \mu\text{mol/L}$), 而其他非 6-取代的吡啶酮化合物 (N-取代-3-羟基-4 (1H) -吡啶酮 1a~ 1f) 对酶的活力没有影响. 说明 6 位的取代基是抑制作用的关键基团. 氮原子上的取代基对它们的抑制活性也有一定的影响, 但并不起关键影响作用, 如化合物 (2e) 的氮原子上没有取代基也有抑制作用, 只是抑制作用较弱. 当氮上的取代基为苯环等大的疏水性基团时, 抑制效果最好. 这可能与 5-脂氧合酶的活性空间结构有关. 5-脂氧合酶活性中心的铁原子是通过两个洞与外界联系的, 而这两个洞的内框主要是疏水性的氨基酸残基^[2], 因此抑制剂分子的氮原子和 6 位连有苯环这样大的疏水基团时, 它的空间匹配效应和疏水识别作用, 使抑制剂分子容易进入酶的活性中心与铁原子配位, 抑制了酶分子 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 的循环.

由于在测试过程中加入了辣根过氧化物酶, 为了排除抑制剂对过氧化物酶的影响, 我们测定了化合物 2a 对辣根过氧化物酶活性的影响情况. 在测试体系中不加 5-脂氧合酶, 用过氧化氢代替花生四烯酸, 其他条件不变, 结果发现化合物 2a 对过氧化物酶没有抑制作用.

2.3 外源铁离子对抑制剂抑制作用的影响

N-取代-3-羟基-4 (1H) -吡啶酮类化合物的生理活性, 大都和它们与金属离子的配位能力有关^[8, 10]. 如 1, 2-二甲基-3-羟基-4 (1H) -吡啶酮和 1, 2-二乙基-3-羟基-4 (1H) -吡啶酮在临床上可用于治疗地中海贫血症和帕金森氏症^[11]. 定性的配位实验证明, 化合物 (2a~ 2e) 对 Fe^{3+} 具有优良的络合配位能力.

我们认为, 6-取代-3-羟基-4 (1H) -吡啶酮类化合物对 5-脂氧合酶的抑制作用主要是与 Fe^{3+} 络合配位的结果. 由于酶的活性中心所含的是一个非血红素铁原子, 因此, 外加 Fe^{3+} (酶活性状态时铁的存在形式), 应该可以观察到酶活性的部分恢复. 图 2 为外加 Fe^{3+} 对被抑制的 5-脂氧合酶的活性恢复实验.

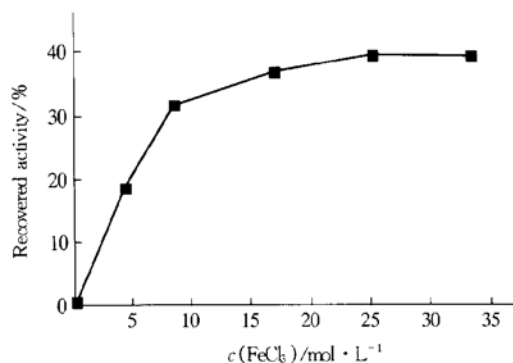


Fig. 2 Effect of extra Fe^{3+} ion on the inhibitory activity of 6-substituted-3-hydroxy-4 (1H) -pyridinones

The reaction was carried out with 1.0 mmol/L arachidonic acid, 4.0 mmol/L TMPD, 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 9.0), 1 106 U of 5-lipoxygenase, 500 U of peroxidase, FeCl_3 and $8.33 \mu\text{mol/L}$ of 6-substituted-3-hydroxy-4 (1H) -pyridinones. Percentage of recovered activity was calculated based on the control value.

从图 2 可以看出, 加入 Fe^{3+} 后, 5-脂氧合酶的活性有一定程度的恢复, 并且随着 Fe^{3+} 浓度的增加活性也随着增加. 但当 Fe^{3+} 浓度增加到 $25 \mu\text{mol/L}$ 时, 5-脂氧合酶的活性不再增加, 表明外源性 Fe^{3+} 和内源性 Fe^{3+} 竞争与抑制剂的络合配位达到平衡.

2.4 吡啶酮衍生物对 5-脂氧合酶的抑制机制

5-脂氧合酶催化花生四烯酸氧化反应主要包括两个步骤: 底物花生四烯酸的活化和氧化加成. 催化反应机制^[2]如图 3 所示:

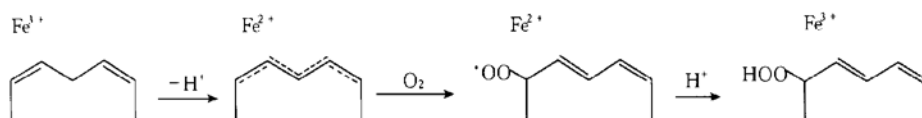


Fig. 3 The mechanism of arachidonic acid reaction catalyzed by the 5-lipoxygenase

Fe^{3+} oxidizes the 1, 4-diene moiety of the arachidonic acid to form a pentadienyl radical, which subsequently reacts with molecular oxygen produces a peroxy radical which reoxidizes Fe^{2+} and forms hydroperoxide product.

6-取代-3-羟基-4 (1H)-吡啶酮类衍生物, 例如化合物 2a, 它与 5-脂氧合酶的活性中心有最好的空间匹配效应和疏水识别作用, 容易进入酶的活性中心与铁原子配位, 抑制了酶分子中 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 的循环。同时, 由于抑制剂体积较大, 而且与活性中心内框疏水基团结合较牢固, 所以, 使底物花生四烯酸难于进入活性中心与 Fe^{3+} 发生反应。

参 考 文 献

- 1 Percival M D. Human 5-lipoxygenase contains an essential iron. *J Biol Chem*, 1991, **266** (16): 10058~10061
- 2 Prigge S T, Boyington J C, Faig M, *et al.* Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie*, 1997, **79** (11): 629~636
- 3 Ford-Hutchinson A W. Leukotrienes and Lipoxygenases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. 405~425
- 4 Musser J H, Kreft A F. 5-lipoxygenase: properties, pharmacology and the quinoliny (bridged) aryl class of inhibitors. *J Med Chem*, 1992, **35** (14): 2501~2524
- 5 Lewis R A, Austen K F, Soberman R J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *N Engl J Med*, 1990, **323** (10): 645~655
- 6 Henderson W R. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med*, 1994, **121** (11): 684~697
- 7 Bijaya L R, Lotfollah S D, Hicham K, *et al.* Synthesis, physicochemical properties, and evaluation of N-substituted-2-alkyl-3-hydroxy-4 (1H)-pyridinones. *J Med Chem*, 1998, **41** (18): 3347~3359
- 8 Zaihui Z, Steven J, Chris O. Lipophilic coordination compounds: aluminum, gallium, and indium complexes of 1-aryl-3-hydroxy-2-methyl-4-pyridinones. *Inorg Chem*, 1991, **30** (3): 509~515
- 9 William O N, Timothy B K, Steven J R, *et al.* Physical and structural studies of N-substituted-3-hydroxy-2-methyl-4 (1H)-pyridinones. *Can J Chem*, 1988, **66** (1): 123~131
- 10 Aytemir M D, Uzbay T, Erol D D. New 4 (1H)-pyridinone derivatives as analgesic agents. *Arzneim Forsch/Drug Res*, 1999, **49** (3): 250~254
- 11 Rai B L, Liu Z D, Liu D Y, *et al.* Synthesis, physicochemical properties and biological evaluation of ester prodrugs of 3-hydroxypyridin-4-ones: design of orally active chelators with clinical potential. *Eur J Med Chem*, 1999, **34** (6): 475~485

Inhibition of 5-lipoxygenase by Pyridinone Derivatives*

XIE Wen-Lin, MA Lin, GUO Gang-Jun, DUAN Zhi-Fang, ZOU Lan, GU Liang-Quan**

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

WANG Jun

(Department of Biochemistry, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract A series of pyridinone derivatives were synthesized and examined for inhibition of 5-lipoxygenase. The 6-substituted pyridinone derivatives (2a~2e) exhibited a prominent inhibitory activity on 5-lipoxygenase. Among them, 6-phenylthio-1-phenyl-2-methyl-3-hydroxy-4 (1H)-pyridinone (2a) showed the most potent inhibitory activity ($IC_{50}=2.52 \mu\text{mol/L}$). As removal of substituent at 6-position of pyridinones, the inhibitory abilities of these compounds were almost vanished. The inhibition mechanism of pyridinone derivatives was discussed.

Key words pyridinone derivatives, 5-lipoxygenase, inhibitor

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (20032020) and The National Natural Sciences Foundation of Guangdong (2KM04103S).

** Corresponding author. Tel: 86-20-84113690, E-mail: cedc14@zsu.edu.cn

Received: November 26, 2001 Accepted: December 25, 2001