

## 肠道菌 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂的研究进展

翁仔淼<sup>1,2</sup>, 吕珊珊<sup>1</sup>, 葛广波<sup>2</sup>, 王平<sup>2</sup>, 侯洁<sup>1\*</sup>

(1. 大连医科大学生物技术系, 辽宁 大连 116044; 2. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203)

**[摘要]**  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 (GUS) 是肠道菌群产生的一类重要的水解酶, 其可催化多种药物及内源性激素的葡萄糖醛酸苷发生水解反应。研究显示肠道菌 GUS 可影响多种药物的药代动力学行为和效应的发挥。值得注意的是, 某些药物 (如伊立替康、吡哌美辛等) 的葡萄糖醛酸化产物可被肠道菌 GUS 快速水解为具有强毒性的苷元, 后者在肠道局部累积可引发严重的胃肠不良反应。因此, 肠道菌 GUS 已成为减缓伊立替康等药物胃肠不良反应的重要靶标之一, 而开发安全、强效的肠道菌 GUS 抑制剂对于缓解临床药物引发的致死性腹泻具有重要意义。综述肠道菌 GUS 的结构及功能、GUS 抑制剂的筛选方法及肠道菌 GUS 抑制剂的研究进展。

**[关键词]**  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶; 抑制剂; 肠道菌; 药物诱导性腹泻

**[中图分类号]** R918

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094 (2018) 03-0177-10

## Research Progress in Inhibitors against Bacterial $\beta$ -Glucuronidase in Gastrointestinal Tract

WENG Zimiao<sup>1,2</sup>, LYU Shanshan<sup>1</sup>, GE Guangbo<sup>2</sup>, WANG Ping<sup>2</sup>, HOU Jie<sup>1</sup>

(1. Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Institute of Interdisciplinary Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]**  $\beta$ -glucuronidases (GUS) are an important class of hydrolase produced by intestinal flora and catalyze the hydrolysis of glucuronides of many drugs and endogenous hormones into corresponding aglycones. Many studies have clearly demonstrated that bacterial GUS could significantly modulate the pharmacokinetic properties of drugs and their *in vivo* efficacy. Notably, the glucuronides of several therapeutic drugs (such as CPT-11 and indomethacin) could be readily hydrolyzed by bacterial GUS into corresponding aglycones with strong toxicity. The overproduction of aglycone in intestine may lead to severe gastrointestinal reactions. Thus, bacterial GUS has been recognized as a key target for alleviating drug-induced gastrointestinal reactions, and the development of safe and potent inhibitors against bacterial GUS are very important for the amelioration of drug-induced life-threatening diarrhea in clinical setting. This paper reviewed the structure and function of bacterial GUS, the methods for screening inhibitors against bacterial GUS, as well as the recent advances in the development of bacterial GUS inhibitors.

**[Key words]**  $\beta$ -glucuronidase; inhibitor; intestinal bacteria; drug-induced diarrhea

肠道菌群与机体的交互作用与多种疾病的发生发展关系密切, 近年来已成为生物医学领域的研究热点<sup>[1]</sup>。新近研究发现, 人体分布的肠道菌可参与多种内源性物质和异物质的代谢, 进而影响疾病的发生发展进程以及药物的吸收和代谢过程<sup>[2-3]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶 ( $\beta$ -glucuronidase, GUS) 是肠道菌群产生的一类重要的水解酶, 其可催化葡萄糖醛酸结合物发生水解反应并生成相应的苷元<sup>[2-3]</sup>。在人体内, 肠道中分布的 GUS 还可催化多种药物 (如吡哌美辛、双氯芬酸及伊立替康的活性产物 7-乙基-10-羟基喜树碱) 及内源性激素的葡萄糖醛酸苷水解, 释放出的苷元可被肠道再次吸收,

从而形成药代动力学上的双峰现象<sup>[4-6]</sup>。值得注意的是, 该过程有可能引发严重的胃肠不良反应, 例如, GUS 可催化 7-乙基-10-羟基喜树碱-*O*-葡萄糖醛酸 (SN-38G) 的水解并生成具有强细胞毒作用的产物 SN-38, 而后者在肠道中累积可引发肠黏膜脱落并导致严重的迟发型腹泻等不良反应。国内外大量研究已证实, 利用抗生素清除能产生 GUS 的肠道菌或使用高效的 GUS 抑制剂可在一定程度上减缓伊立替康等化学药物导致的腹泻等胃肠不良反应<sup>[2, 5, 7]</sup>。然而, 抗生素的过量使用会导致患者的胃肠体系肠道菌群严重紊乱, 且对肝肾等脏器造成致命损伤。因此, 研发高效安全的 GUS 抑制剂对缓解伊立替康、吡哌美辛等药物引起的致死性腹泻有重要意义<sup>[2-3]</sup>。本文对 GUS 的结构及功能、GUS 抑制剂的筛选方法及 GUS 抑制剂的研究进展等进行综述, 期为研究人员设计研发出更加安全、有效的肠道菌 GUS 抑制剂提供参考。

**接受日期:** 2017-12-25

**项目资助:** “中医药现代化研究”重点专项 (No. 2017YFC1700200, No. 2017YFC1702000); 辽宁省大学生创新创业项目 (No. 201610161041)

**\*通讯作者:** 侯洁, 副教授;

**研究方向:** 中药及天然产物在肿瘤辅助治疗中的应用及作用机制研究;

**Tel:** 0411-86110351; **E-mail:** houjie@dmu.edu.cn

## 1 肠道菌 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的结构与功能

GUS 酶学编号为 EC3.1.1.31, 可催化 $\beta$ -D-1,4-葡萄糖醛酸苷的糖苷键水解进而释放出其苷元。在人体组织中, GUS 是细胞溶酶体中的一类水解酶, 其在肝组织中含量较高<sup>[8]</sup>。但同时, 肠道内大肠埃希菌 *E. coli* 也大量表达 GUS, 其参与多种药物的葡萄糖醛酸苷产物在肠道内的水解, 释放出的苷元如在肠道内大量蓄积, 有可能引发严重的迟发型腹泻<sup>[2, 5, 9]</sup>。肠道菌特别是 *E. coli* 表达的 GUS 已成为缓解药物迟发型腹泻的重要靶点之一, 因此, 筛选肠道菌 GUS 的特异性抑制剂对于缓解药物引发的致死性迟发型腹泻具有重要意义。

1996 年 Jain 等首次报道了人 GUS 的结构<sup>[8, 10]</sup>, 但直到 2010 年 Wallace 等才对 *E. coli* GUS 的结构进行了

解析<sup>[2, 11]</sup>(见图 1)。*E. coli* GUS 是由 2 种不同的亚基组成的四聚体, 每个亚基约含 597 个氨基酸, 每个亚基的相对分子质量约为 70 000; N 端 180 个残基与糖基水解酶家族 2 的糖结合域相似, C 端 274~603 氨基酸残基形成了 $\alpha\beta$  折叠, N 端和 C 端之间为免疫球蛋白样折叠的 $\beta$ -夹心结构; 催化活性结合位点为 C 端的 Glu<sup>413</sup> 和 Glu<sup>504</sup>, 及四聚体中相邻亚基之间由 17 个氨基酸残基(360~376)形成的菌环结构(bacterial loops)。*E. coli* 产生的 GUS 与人源 GUS 的氨基酸序列相似度为 45%, 其最大区别在于 *E. coli* 的 GUS 结构中具有菌环结构, 而人源 GUS 中不存在此结构。因此, *E. coli* GUS 中的菌环结构对于设计和研发肠道菌 GUS 的特异性抑制剂至关重要。

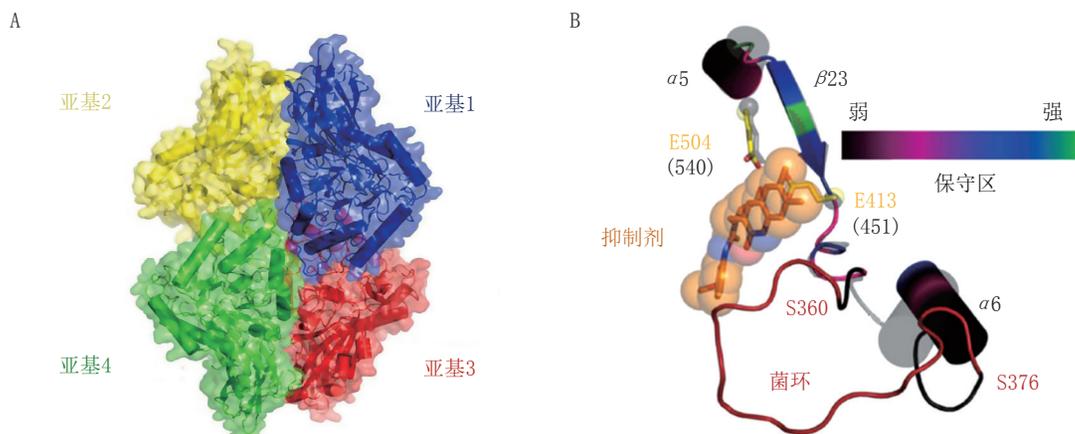


图 1 (A) *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的晶体结构(2.5 Å); (B) *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶与其特异性抑制剂的相互作用<sup>[2]</sup>  
Figure 1 (A) Crystal structure of *E. Coli*  $\beta$  GUS tetramer at 2.5 Å resolution; (B) Interaction between *E. Coli*  $\beta$  GUS and its specific inhibitors

## 2 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂的筛选与评价方法

目前报道的 GUS 活性检测方法主要有以下 3 种: 比色分析法、荧光法和高效液相色谱法(HPLC)。

### 2.1 比色分析法

比色分析法的检测原理是葡萄糖醛酸苷底物在 GUS 的作用下水解, 生成的产物在特定波长下具有紫外吸收, 因此通过测定反应液的吸光度来定量产物的生成速率, 进而获得 GUS 的残余活性。例如, 以对硝基酚- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(PNPG)为底物, 在 GUS 作用下水解, 产物对硝基酚(PNP)在约 405 nm 处具有吸收, 可用于检测 GUS 的活性<sup>[12]</sup>。此方法是目前最常用的 GUS 酶活检测方法<sup>[13-14]</sup>。此外, 以萘酚(AS-BI)- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷为底物, 在 GUS 作用下生成的产物 AS-BI 在 540 nm 处具有吸收, 其被用于

检测 GUS 的活性及其组织分布<sup>[15-16]</sup>。5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid)又称 X-Gluc, 也可被 GUS 水解, 其产物显蓝色, 该方法被用于组织化学染色进而研究 GUS 的表达水平<sup>[17-18]</sup>。比色法测定 GUS 酶活具有操作简便、快速、稳定的优点, 但同时也存在检测灵敏度低且定量范围较窄的缺点<sup>[19]</sup>。

### 2.2 荧光法

荧光检测法具有灵敏度高的特点, 可弥补比色法检测的不足。目前用于检测 GUS 活性的荧光底物主要有 3 种: 4-甲基伞形酮葡萄糖醛酸苷(4-methylumbelliferyl glucuronide, 4-MuG)<sup>[20]</sup>、荧光素双- $\beta$ -D-葡萄糖苷酸(fluorescein di- $\beta$ -D-glucuronide, FD-GlcU)<sup>[21]</sup>以及试卤灵- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(resorufin  $\beta$ -D-glucuronide,

REG)<sup>[22]</sup>。GUS可快速水解4-MuG生成荧光产物4-甲基伞形酮(4-Mu),该产物可在激发波长355 nm、发射波长456 nm条件下进行检测。此方法灵敏、可靠,因此使用较为广泛。Bunkers等<sup>[17]</sup>用该方法对小麦基腐病菌*Pseudocercospora herpotrichoides*中重组表达基因后的GUS活性进行了检测;Ahmad等<sup>[20]</sup>使用4-MuG底物体系对11 520个化合物进行了细菌GUS抑制活性的筛选。FD-GlcU在GUS的水解作用下,生成荧光素(fluorescein),可在激发波长492 nm、发射波长520 nm条件下检测产物的生成量。Su等<sup>[21]</sup>使用FD-GlcU作为荧光探针来检测细胞膜上的GUS活性,还用于GUS表达的结肠癌CT26细胞及接种裸鼠活体GUS活性的检测。由此可见,该方法不仅可用于常规的体外目标酶活性检测,更重要的是可以用于体内的GUS活性检测。在此基础上,为了更好地实现细胞及深层组织成像,用于GUS活性检测的长波长荧光探针也陆续被开发出来。如Cheng等<sup>[19]</sup>使用二氟甲基酚分别将荧光染料异硫氰酸荧光素(FITC)和近红外染料IR-820与葡萄糖醛酸偶联,分别得到FITC-TrapG和NIR-TrapG 2种荧光探针,其可被组织中分布的GUS水解释放出荧光产物,进而通过荧光强弱来测定GUS的组织分布。REG也被作为GUS探针底物用于该酶的活性检测,其优势在于REG本身不具有荧光属性,但其在GUS水解作用下可快速释放出具有优良荧光属性的产物试卤灵。由于试卤灵的发射波长较长(606 nm),因此其抗生物基质干扰能力强。此外,REG还具有反应迅速、灵敏度高、准确度高等优点。虽然REG在GUS活性检测及生物示踪领域显示了良好的应用前景,但其合成工艺复杂、价格昂贵,极大地限制了其应用。王欣欣等<sup>[22]</sup>以猴肝微粒体为酶源,采用生物转化法实现了试卤灵葡萄糖醛酸苷的高效制备,为REG的合成提供了新的方法。

### 2.3 高效液相色谱法

上述具有紫外吸收和荧光吸收的底物均可借助HPLC进行检测。此外,借助HPLC-FD(荧光检测器)还可以SN-38G为底物进行GUS抑制剂的筛选和评价。Narita等<sup>[23]</sup>以SN-38G为底物,选用ODS-80<sup>TM</sup>液相色谱柱及荧光检测器(Shimadzu Model RF-530)对SN-38G的水解过程进行检测,在激发波长380 nm、发射波长556 nm条件下测定水解产物SN-38的生成速率,进而实现了对GUS残余活性的检测。

## 3 肠道菌 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂

根据来源,*E. coli* GUS抑制剂可分为合成类抑制剂及天然抑制剂。

### 3.1 合成类 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂

目前,已报道的*E. coli* GUS抑制剂以合成化合物为主,其来源上大体上可分为以下3大类:1)已上市的“老药”;2)在构效关系指导下开展系列化合物的结构优化和活性筛选;3)基于*E. coli* GUS晶体结构开展*E. coli* GUS抑制剂的理性设计与合成。

#### 3.1.1 源于临床药物的 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂

为了发现具有GUS抑制活性的潜在药物以缓解伊立替康引起的腹泻,Ahmad等<sup>[4]</sup>对获美国FDA批准上市的11 520种药物进行了高通量筛选。通过高通量筛选后,发现5种化合物具有较高的抑制活性,分别是烟肼酰胺(nialamide)、异唑肼(isocarboxazid)、阿莫沙平(amoxapine)、苯乙肼(phenelzine)、甲氟喹(mefloquine)。烟肼酰胺、异唑肼、苯乙肼、阿莫沙平均为抗抑郁药物,其中烟肼酰胺、异唑肼、苯乙肼为不可逆单胺氧化酶抑制剂(MAOI),阿莫沙平是三环类抗抑郁药物,甲氟喹是抗疟药。上述5个药物的GUS抑制活性(IC<sub>50</sub>)分别为71、128、2 282、388、1 212 nmol·L<sup>-1</sup>;其中烟肼酰胺、异唑肼、阿莫沙平对*E. coli*的抑菌活性范围为17 nmol·L<sup>-1</sup>~7.1  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>。

#### 3.1.2 构效关系研究导向下的 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂发现

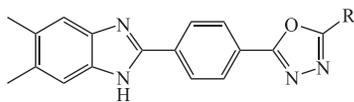
3.1.2.1 2,5-二取代-1,3,4-噁二唑衍生物 Zawawi等<sup>[24]</sup>以2,5-二取代-1,3,4-噁二唑为母核,2位取代基为p-5,6-二甲苯基并咪唑,通过改变5位取代基的结构类型,对18个系列噁二唑类化合物(1a~1r)的GUS抑制活性进行了考察(见表1),同时比较了取代基对抑制活性的影响。通过构效关系研究发现,此类化合物的抑制活性依赖于5位取代基芳环的类型和芳环取代基上的官能团,并且分子内氢键会降低化合物的抑制活性。通过对上述18个化合物与GUS的蛋白结构对接,发现化合物1j与GUS的结合呈线型构象,即5位取代基苯环上的酚羟基与烷基链形成非极性作用,而噁二唑环与GUS结构中的Asn<sup>484</sup>形成很强的氢键作用,噁二唑与苯并咪唑之间的苯环与Tyr<sup>508</sup>的羟基形成强相互作用。此外,苯并咪唑环与Tyr<sup>205</sup>形成疏水作用。化合物1j表现出如此高的GUS抑制能力与以上这些强的分子间相互作用密切相关。利用软件进行预测,化合物1j与

蛋白的结合位点为 His<sup>385</sup>、Arg<sup>600</sup>、His<sup>509</sup>、Asn<sup>484</sup>、Lys<sup>606</sup> 和 Tyr<sup>504</sup>, 其他碱基主要用于稳定化合物与蛋白活性位点之间的相互作用。而对化合物 **1f**、**1k** 和 **1p** 的蛋白

对接发现, 上述 3 个化合物由于其 5 位芳环上的取代基为非极性烷基, 无法与周围的氨基酸残基形成有效的相互作用, 导致此类化合物对于 GUS 的抑制活性非常弱。

表 1 苯并咪唑衍生物对 *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的抑制效果\*

Table 1 The inhibitory effect of benzimidazole derivatives on *E. Coli* GUS

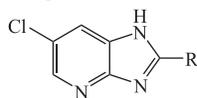


化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>1a</b>		46.14±1.26	<b>1j</b>		2.14±0.03
<b>1b</b>		8.14±0.29	<b>1k</b>		
<b>1c</b>		11.14±0.35	<b>1l</b>		30.14±0.98
<b>1d</b>		15.14±0.54	<b>1m</b>		32.14±1.10
<b>1e</b>		19.16±0.62	<b>1n</b>		40.14±1.20
<b>1f</b>			<b>1o</b>		31.14±1.05
<b>1g</b>		13.14±0.76	<b>1p</b>		
<b>1h</b>		4.12±0.10	<b>1q</b>		3.14±0.05
<b>1i</b>		16.12±0.36	<b>1r</b>		20.14±0.89

注: \* 阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸 1, 4-内酯的 IC<sub>50</sub> 为 48.5 μmol·L<sup>-1</sup>

**3.1.2.2 6-氯-2-苯环-1H-咪唑并[4,5-b]吡啉衍生物** 苯并咪唑类化合物是非常重要的一类杂环药效团, Taha 等<sup>[25]</sup> 对此类化合物进行了 GUS 抑制活性的考察 (见表 2)。在筛选的 26 个化合物中, 只有 8 个化合物表现出 GUS 抑制活性。结果表明, 化合物结构中的羟基数目与抑制活性直接相关。将蛋白分子和化合物结构进行对接分析, 发现底物 PNPG 与 GUS 催化中心 Glu<sup>451</sup>、Glu<sup>540</sup>、Tyr<sup>504</sup> 相结合, 其中 Glu<sup>451</sup> 作为酸/碱催化中心, 且 Asp<sup>207</sup>-Glu<sup>451</sup> 残基对形成了亲核-酸-碱催化中心, 而 Glu<sup>540</sup> 为亲核反应中心。6-氯-2-苯环-1H-咪唑并[4,5-b]吡啉类化合物通过氢键与活性残基 Asp<sup>207</sup>、His<sup>385</sup>、Glu<sup>451</sup>、Tyr<sup>504</sup> 和 Glu<sup>540</sup> 结合, 其中的酚羟基定位于活性中心空穴, 咪唑并[4,5-b]吡啉环与 Glu<sup>451</sup>、Asn<sup>484</sup>、Asn<sup>502</sup>、Tyr<sup>504</sup> 和 Tyr<sup>508</sup> 极性残基形成夹心结构。对比发现, 抑制活性最强的化合物 **2a** 和 **2c** 与 GUS 活性中心的残

基结合更为紧密, 其中咪唑并[4,5-b]吡啉环上的仲胺 (NH) 与 GUS 上的 Glu<sup>451</sup> 相互作用, 酚羟基与 Asp<sup>207</sup> 和 Lys<sup>606</sup> 相互作用。化合物 **2a** 中对位的羟基取代基与 Asp<sup>207</sup> 形成键长为 2.16 Å 的氢键, 间位羟基与 Asn<sup>604</sup> 形成键长为 2.76 Å 的氢键。化合物 **2c** 中间位羟基与 Asp<sup>207</sup> 形成键长为 1.86 Å 的氢键, 邻位羟基与 Tyr<sup>504</sup> 形成氢键。另一相似作用在于化合物 **2a** 中的间位羟基和化合物 **4c** 中的邻位羟基与 Lys<sup>606</sup> 形成键长分别为 2.60 Å 和 2.83 Å 的氢键。因此, 对于此类化合物来说, 在咪唑并[4,5-b]吡啉环衍生物中苯环上的羟基应处于相邻的 2 个碳上, 以便于酚羟基与酶活性残基 Asp<sup>207</sup> 和 Lys<sup>606</sup> 产生相互作用。而在化合物 **2b** (含 2, 4-二羟基) 和化合物 **2d** (含 2, 5-二羟基) 中, 咪唑并[4,5-b]吡啉环中的 NH 无法与 Glu<sup>451</sup> 形成相互作用, 可能是造成其抑制活性降低的主要原因。

表 2 6-氯-2-苯环-1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啉衍生物对 *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的抑制效果\*Table 2 The inhibitory effect of 6-chloro-2-aryl-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives on *E. Coli* GUS

化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
2a		30.10±0.60	2e		68.10±1.30
2b		49.60±1.20	2f		128.60±2.10
2c		29.25±0.50	2g		113.60±2.40
2d		46.10±1.10	2h		52.60±1.60

注: \* 阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸 1,4-内酯的 IC<sub>50</sub> 为 48.5 μmol·L<sup>-1</sup>

**3.1.2.3 噻二唑类衍生物** 基于噻二唑类化合物具有多种良好的药理学性质, Salar 等<sup>[26]</sup>对 24 个噻二唑类衍生物进行了 GUS 抑制活性的评价(见表 3)。结果表明,噻二唑类化合物具有较强的 GUS 抑制活性。其中,化合物 **3q**、**3r**、**3s**、**3w** 和 **3x** 5 种化合物抑制活性最强,分别为 8.96、4.16、6.28、7.16 和 2.16 μmol·L<sup>-1</sup>。为了进一步解析构效关系,将蛋白与底物及抑制剂进行分子对接。如前所述,在 GUS 对底物 PNPG 的催化水解过程中, Glu<sup>451</sup>、Glu<sup>540</sup> 及 Tyr<sup>504</sup> 为催化活性中心,

PNPG 与酶分子结构中的 Glu<sup>540</sup>、Glu<sup>451</sup>、Asp<sup>207</sup>、His<sup>385</sup> 和 Tyr<sup>504</sup> 形成强的氢键。在上述 5 种化合物中,化合物 **3x** 进入酶的催化空腔,并且其氨基与 Glu<sup>451</sup> 的羟基形成氢键, N-芳基取代基的卤素与 Tyr<sup>504</sup> 和 Tyr<sup>508</sup> 产生了疏水作用, Asp<sup>207</sup> 与噻唑环和氨基形成了  $\pi$ - $\pi$  共轭效应,这些作用共同加强了抑制剂-蛋白复合物的稳定性,也提高了化合物 **3x** 的 GUS 抑制活性。因此,此类化合物中噻二唑基团和芳香基团均与其抑制活性强弱有关。

表 3 噻二唑类衍生物对 *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的抑制效果\*Table 3 The inhibitory effect of thiaziazole derivatives on *E. Coli* GUS

化合物	结构	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	化合物	结构	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
3a		48.38±1.05	3m		32.16±0.55
3b		39.25±0.90	3n		17.31±0.30
3c		34.25±0.70	3o		22.61±0.50
3d		50.28±1.40	3p		16.65±0.50
3e		58.06±1.60	3q		8.96±0.20
3f		26.34±0.46	3r		4.16±0.01
3g		28.55±0.60	3s		6.28±0.02

续表 3

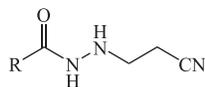
化合物	结构	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	化合物	结构	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
3h		31.06±0.55	3t		15.61±0.31
3i		40.16±0.80	3u		19.16±0.35
3j		29.65±0.50	3v		22.64±0.40
3k		36.14±0.65	3w		7.16±0.06
3l		49.16±1.10	3x		2.16±0.01

注: \* 阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸 1, 4-内酯的 IC<sub>50</sub> 为 48.5 μmol·L<sup>-1</sup>

3.1.2.4  $\beta$ -N-氰乙基酰基胍类衍生物 Khan 等<sup>[27]</sup>合成了一系列  $\beta$ -N-氰乙基酰基胍类化合物, 并对此类化合物的 GUS 抑制活性进行了评价(见表 4)。此类化合物的抑制活性在 2.2~120.0 μmol·L<sup>-1</sup> 之间, 其中化合物 4a、4c~4h 为非竞争性抑制, 而化合物 4b 为反竞争性抑制。化合物 4e 和 4f 表现出很强的抑制活性, IC<sub>50</sub>

分别为 1.6 和 6.0 μmol·L<sup>-1</sup>。从构效关系分析来看, 3 位取代比 4 位取代时抑制活性更强, 而苯氧基取代时对增强酶抑制活性最为有利; 4 位取代基为羟基或苯甲酰氨基时抑制活性相当, 但羟基取代时抑制类型为反竞争性抑制, 苯甲酰氨基取代时为非竞争性抑制。

表 4  $\beta$ -N-氰乙基酰基胍类衍生物对 *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的抑制效果<sup>\*</sup>  
Table 4 The inhibitory effect of  $\beta$ -N-cyanoethyl acyl hydrazide derivatives on *E. Coli* GUS



化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
4a		55.4±0.002	4e		1.6±0.120
4b		12.0±0.033	4f		6.0±0.066
4c		7.8±0.100	4g		11.6±0.020
4d		2.2±0.050	4h		277.0±0.012

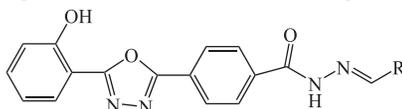
注: \* 阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸 1, 4-内酯的 IC<sub>50</sub> 为 48.5 μmol·L<sup>-1</sup>

Bn:benzyl(苯甲基); Bz:benzoyl(苯甲酰基); Ts: tosyl(甲苯磺酰基)

3.1.2.5 4-(2-(2-羟基)苯基-1,3,4-噁二唑)苯甲酰胺衍生物 基于噁二唑与苯甲酰胺类衍生物均具有较强的 GUS 抑制活性, 因此 Taha 等<sup>[28]</sup>将其两部分药效团进行连接, 得到 25 个噁二唑苯甲酰胺衍生物, 并考察了其对 GUS 的抑制效果(见表 5)。结果表明, 此类化合物表现出较强的 GUS 抑制活性(IC<sub>50</sub> 为 7.14~44.16 μmol·L<sup>-1</sup>), 其

中化合物 5a、5b、5c、5d、5f、5h、5i 和 5m 抑制活性较强。对化合物 5h 与 GUS 进行对接发现, 此化合物与酶催化空腔结合紧密, 并且与其他化合物相比可与酶结构中的氨基酸活性位点形成的氢键作用最多, 即邻位羟基与 Asp<sup>207</sup> 的羧基及 Tyr<sup>508</sup> 的羟基形成氢键, 其他羟基与 His<sup>385</sup> 侧链、Glu<sup>540</sup> 的羧基及 Asn<sup>450</sup> 酰胺基形成氢键。

表 5 噁二唑苯甲酰肼衍生物对 *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的抑制效果<sup>\*</sup>  
Table 5 The inhibitory effect of oxadiazolebenzohydrazones on *E. Coli* GUS



化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	化合物	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
5a		18.46±0.65	5h		7.14±0.30
5b		34.46±0.85	5i		21.14±1.05
5c		29.15±0.75	5j		86.12±2.15
5d		15.14±0.55	5k		88.14±2.38
5e		64.12±1.62	5l		91.4±2.45
5f		44.16±1.20	5m		42.26±1.16
5g		82.16±2.25	5n		108.14±3.14

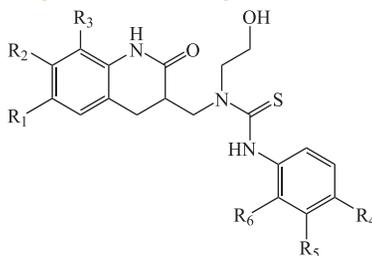
注: \* 阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸 1,4-内酯的 IC<sub>50</sub> 为 48.5 μmol·L<sup>-1</sup>

### 3.1.3 基于靶酶晶体结构的 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂的理性设计与合成

*E. coli* GUS 与哺乳类动物 GUS 在结构上最大的区别是 360~376 氨基酸位点形成特有的菌环结构。2010 年, Wallace 等<sup>[2]</sup>对 *E. coli* GUS 的结构进行了解析, 并基于 GUS 结构发现了 4 种强效的特异性抑制剂(见

表 6)。结果表明, 这 4 种抑制剂的 IC<sub>50</sub> 分别是 283、369、586 和 1 060 nmol·L<sup>-1</sup>, 远小于阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸 1,4-内酯的 IC<sub>50</sub> (26.4 μmol·L<sup>-1</sup>), 并且这 4 种抑制剂几乎不抑制牛肝中 GUS 的活性。对 4 种抑制剂与 GUS 进行对接发现, 这 4 种抑制剂均能紧密结合在 GUS 特有的菌环结构附近, 故其能特异性抑制 GUS。

表 6 4 种特异性抑制剂对 *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶的抑制效果<sup>\*</sup>  
Table 6 The inhibitory effect of four specific inhibitors on *E. Coli* GUS



化合物	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
6a	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	283±26.10
6b	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	O-CH <sub>3</sub>	H	369±2.51
6c	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	F	586±31.10
6d	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	COOCH <sub>3</sub>	1 060±3.54

注: \* 阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸 1,4-内酯的 IC<sub>50</sub> 为 26.4 μmol·L<sup>-1</sup>

目前报道的合成类 *E. coli* GUS 抑制剂主要为芳香族及杂环化合物, 如噻唑、噁二唑、酰肼类, 通过构效关系分析及分子对接, 发现这些衍生物对 GUS 抑制活性的强弱与化合物能否与酶活性空腔形成氢键有密切关系。化学合成的优势在于其可以根据目标酶的活性空腔及催化中心, 实现目标酶抑制剂的理性设计, 进

而获得活性更强的酶抑制剂。

### 3.2 源于天然的 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂

从天然产物中发现目标酶的天然抑制剂, 进而将其作为先导化合物去设计研发目标酶的强效抑制剂, 一直是药物研发的一个重要途径<sup>[29-33]</sup>。Weng 等<sup>[13]</sup>以 PNPG 为底物, 对 30 余种天然黄酮化合物进行 *E. coli*

GUS 抑制活性的评价和构效关系分析(见图 2)。结果表明, 野黄芩素、木犀草素、黄芩素、槲皮素、野黄芩苷 5 种天然黄酮具有较强的 GUS 抑制活性,  $IC_{50}$  分别为 5.76、8.68、14.67、20.82、29.64  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 而二氢黄酮和异黄酮化合物则表现出非常弱的抑制活性。对野黄芩素和木犀草素进行抑制动力学考察, 发现二者均为竞争性抑制类型, 抑制常数  $K_i$  均低于 3.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将上述 2 种化合物与 *E. coli* GUS 的蛋白结构进行分子对接, 发现其结构与 *E. coli* GUS 的催化水解 PNPG 的活性中心高度重叠, 揭示了野黄芩素和木犀草素抑制 *E. coli* GUS 活性的机制。

日本学者 Narita 等<sup>[23]</sup>以 SN-38G 为底物, 发现汉方药物中天然葡萄糖醛酸苷——黄芩苷、汉黄芩苷、木犀草素-3'-葡萄糖醛酸苷、甘草酸对 *E. coli* GUS 活性具有一定的抑制效果, 其中黄芩苷、汉黄芩苷、木犀草素-3'-葡萄糖醛酸苷抑制活性较强,  $IC_{50}$  分别为 2.9、4.0 和 5.2

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与已报道的阳性抑制剂 D-葡萄糖二酸-1,4 内酯抑制活性相当。

近年来, 从中草药中筛选和发现肠道菌中 GUS 抑制剂, 进而用于减缓伊立替康等药物引起的不良反应已成为肿瘤辅助治疗研究领域的一大热点<sup>[34-39]</sup>。例如, 日本的 Mori 等<sup>[40]</sup>给 44 例患者服用半夏泻心汤(TJ-14), 并对患者腹泻情况进行了分析。结果表明, TJ-14 组中药物可以改善腹泻等级并降低化疗药物导致的腹泻发生率, 其中 11% 患者出现轻微便秘。半夏泻心汤出自《伤寒杂病论》, 由半夏、黄芩、黄连、炙甘草、干姜、人参、大枣 7 味药组成, 研究者认为黄芩苷对 *E. coli* GUS 具有抑制作用<sup>[30]</sup>, 降低了肠道中 SN-38 的生成进而降低腹泻率。此外, 贯叶连翘、生姜泻心汤、黄芩汤、参苓白术散、痛泻药方合四神汤、脾胃双补法等均在临床上用于预防和治疗迟发型腹泻, 但其作用机制仍有待进一步研究。

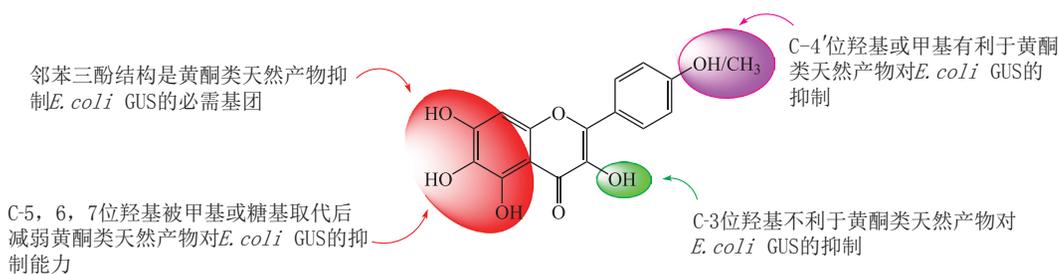


图 2 *E. Coli*  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶抑制剂黄酮类天然产物的构效关系<sup>[13]</sup>

Figure 2 The structure-activity relationships of natural flavonoids against *E. Coli* GUS

#### 4 结语与展望

肠道菌 GUS 可催化众多药物的葡萄糖醛酸苷产物发生水解, 释放出毒性更强的苷元, 后者在肠道内的过量累积会引起严重的迟发型腹泻。基于人源和肠道菌 GUS 在立体结构上的差异, 设计研发靶向肠道菌 GUS 的特异性抑制剂, 是缓解伊立替康等药物诱导的迟发型腹泻的重要手段。靶向肠道菌 GUS 的特异性抑制剂即不影响人体脏器中 GUS 的活性, 又可以最大程度的

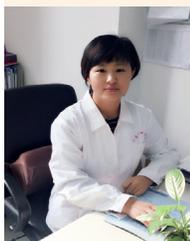
保证肠道菌群的平衡, 因此极具开发前景。近年来, 随着相关研究的不断深入, 基于肠道菌 GUS 立体结构的计算机辅助设计和虚拟筛选, 以及基于光学探针底物的肠道菌 GUS 抑制剂的高通量筛选方法已成为现实。药物化学家可以借助上述手段从天然产物、食品或中草药化学成分以及临床药物中高效发现肠道菌 GUS 的特异性抑制剂, 进而结合高效化学衍生技术去获得更加安全有效的肠道菌 GUS 抑制剂。

#### 【参考文献】

- [1] 林璋, 祖先鹏, 谢海胜. 肠道菌群与人体疾病发病机制的研究进展[J]. 药学学报, 2016, 51(6): 843-852.
- [2] Wallace B D, Wang H, Lane K T, et al. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme[J]. *Science*, 2010, 330(6005): 831-835.
- [3] Wallace B D, Redinbo M R. The human microbiome is a source of therapeutic drug targets[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(3): 379-384.
- [4] Ahmad S, Hughes M A, Yeh L A, et al. Potential repurposing of known drugs as potent bacterial beta-glucuronidase inhibitors[J]. *J Biomol Screen*, 2012, 17(7): 957-965.
- [5] Patel A G, Kaufmann S H. Targeting bacteria to improve cancer therapy[J]. *Science*, 2010, 330(6005): 766-767.
- [6] Abet V, Filace F, Recio J, et al. Prodrug approach: an overview of

- recent cases[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 127: 810-827.
- [7] Tobin P, Clarke S, Seale J P, *et al*. The *in vitro* metabolism of irinotecan (CPT-11) by carboxylesterase and beta-glucuronidase in human colorectal tumours[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2006, 62(1): 122-129.
- [8] Jain S, Drendel W B, Chen Z W, *et al*. Structure of human beta-glucuronidase reveals candidate lysosomal targeting and active-site motifs[J]. *Nat Struct Biol*, 1996, 3(4): 375-381.
- [9] Hsieh Y T, Chen K C, Cheng C M, *et al*. Impediments to enhancement of CPT-11 anticancer activity by *E. coli* directed beta-glucuronidase therapy[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118028.
- [10] Islam M R, Tomatsu S, Shah G N, *et al*. Active site residues of human beta-glucuronidase. Evidence for Glu(540) as the nucleophile and Glu(451) as the acid-base residue[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(33): 23451-23455.
- [11] Wallace B D, Roberts A B, Pollet R M, *et al*. Structure and inhibition of microbiome beta-glucuronidases essential to the alleviation of cancer drug toxicity[J]. *Chem Biol*, 2015, 22(9): 1238-1249.
- [12] Brot F E, Bell C E, Sly W S. Purification and properties of  $\beta$ -glucuronidase from human placenta[J]. *Biochemistry*, 1978, 17(3): 385-391.
- [13] Weng Z M, Wang P, Ge G B, *et al*. Structure-activity relationships of flavonoids as natural inhibitors against *E. coli* beta-glucuronidase[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 109(Pt 2): 975-983.
- [14] Taha M, Ismail N H, Imran S, *et al*. Synthesis of novel disulfide and sulfone hybrid scaffolds as potent beta-glucuronidase inhibitor[J]. *Bioorg Chem*, 2016, 68: 15-22.
- [15] Dolbear F A, Phares W. Naphthol AS-BI (7-bromo-3-hydroxy-2-naphtho-o-anisidine) phosphatase and naphthol AS-BI  $\beta$ -D-glucuronidase in Chinese hamster ovary cells: biochemical and flow cytometric studies[J]. *J Histochem Cytochem*, 1979, 27(1): 120-124.
- [16] Prosperi E, Raap A K. Substrate protection during the fixation of  $\beta$ -glucuronidase cytochemical model system studies[J]. *Histochem J*, 1982, 14(4): 689-692.
- [17] Bunkers G J. Expression of the *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase gene in *Pseudocercospora herpotrichoides*[J]. *Appl Environ Microb*, 1991, 57(10): 2896-2900.
- [18] Jefferson R A. The GUS reporter gene system[J]. *Nature*, 1989, 342(6251): 837-838.
- [19] Cheng T C, Roffler S R, Tzou S C, *et al*. An activity-based near-infrared glucuronide trapping probe for imaging beta-glucuronidase expression in deep tissues[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(6): 3103-3110.
- [20] Ahmad S, Hughes M A, Lane K T, *et al*. A high throughput assay for discovery of bacterial  $\beta$ -glucuronidase inhibitors[J]. *Curr Chem Genomics*, 2011, 5: 13-20.
- [21] Su Y C, Chuang K H, Wang Y M, *et al*. Gene expression imaging by enzymatic catalysis of a fluorescent probe via membrane-anchored beta-glucuronidase[J]. *Gene Therapy*, 2007, 14(7): 565-574.
- [22] 王欣欣, 吕侠, 葛广波, 等.  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶荧光底物试卤灵葡萄糖醛酸苷的高效制备[J]. *高等学校化学学报*, 2015, 36(7): 1321-1327.
- [23] Narita M, Nagai E, Hagiwara H, *et al*. Inhibition of beta-glucuronidase by natural glucuronides of *Kampo* medicines using glucuronide of SN-38 as a substrate[J]. *Xenobiotica*, 1993, 23(1): 5-10.
- [24] Zawawi N K, Taha M, Ahmat N, *et al*. Novel 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoles with benzimidazole backbone: a new class of beta-glucuronidase inhibitors and in silico studies[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(13): 3119-3125.
- [25] Taha M, Ismail N H, Imran S, *et al*. Synthesis of 6-chloro-2-aryl-1H-imidazo[4,5-b]pyridine derivatives: antidiabetic, antioxidant, beta-glucuronidase inhibitor and their molecular docking studies[J]. *Bioorg Chem*, 2016, 65: 48-56.
- [26] Salar U, Taha M, Ismail N H, *et al*. Thiadiazole derivatives as new class of beta-glucuronidase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(8): 1909-1918.
- [27] Khan K M, Shujaat S, Rahat S, *et al*.  $\beta$ -N-cyanoethyl acyl hydrazide derivatives: a new class of  $\beta$ -glucuronidase inhibitors[J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(11): 1443-1446.
- [28] Taha M, Ismail N H, Imran S, *et al*. Synthesis of novel benzohydrazone-oxadiazole hybrids as beta-glucuronidase inhibitors and molecular modeling studies[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(23): 7394-7404.
- [29] Liu Y J, Li S Y, Hou J, *et al*. Identification and characterization of naturally occurring inhibitors against human carboxylesterase 2 in White Mulberry Root-bark[J]. *Fitoterapia*, 2016, 115: 57-63.
- [30] Wang D D, Zou L W, Jin Q, *et al*. Recent progress in the discovery of natural inhibitors against human carboxylesterases[J]. *Fitoterapia*, 2017, 117: 84-95.
- [31] Zou L W, Dou T Y, Wang P, *et al*. Structure-activity relationships of pentacyclic triterpenoids as potent and selective inhibitors against human carboxylesterase 1[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 435.
- [32] Li Y G, Hou J, Li S Y, *et al*. *Fructus Psoraleae* contains natural compounds with potent inhibitory effects towards human carboxylesterase 2[J]. *Fitoterapia*, 2015, 101: 99-106.
- [33] Zou L W, Li Y G, Wang P, *et al*. Design, synthesis, and structure-

- activity relationship study of glycyrrhetic acid derivatives as potent and selective inhibitors against human carboxylesterase 2[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 112: 280-288.
- [34] Pope J L, Tomkovich S, Yang Y, *et al.* Microbiota as a mediator of cancer progression and therapy[J]. *Transl Res*, 2017, 179: 139-154.
- [35] 闫利利, 石钺. 中医药防治伊立替康肠毒性的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(3): 501-503.
- [36] Xie B, Zhang Z, Gong T, *et al.* Application of metabonomic strategy to discover an unreported active ingredient in LiuWeiDiHuang pills suppressing beta-glucuronidase[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(2): 609-614.
- [37] Khan K M, Fakhri M I, Shaikh N N, *et al.*  $\beta$ -glucuronidase inhibitory studies on coumarin derivatives[J]. *Med Chem*, 2014, 10(8): 778-782.
- [38] Chen X, Yu T, Chen Z, *et al.* Effect of saikosaponins and extracts of vinegar-baked Bupleuri Radix on the activity of  $\beta$ -glucuronidase[J]. *Xenobiotica*, 2014, 44(9): 785-791.
- [39] Summart R, Chewonarin T. Purple rice extract supplemented diet reduces DMH- induced aberrant crypt foci in the rat colon by inhibition of bacterial  $\beta$ -glucuronidase[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2): 749-755.
- [40] Mori K, Kondo T, Kamiyama Y, *et al.* Preventive effect of *Kampo* medicine (Hangeshashin-to) against irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 51(5): 403-406.



**【专家介绍】**侯洁：博士，大连医科大学基础医学院副教授。近年来的研究方向为“中药及天然药物在肿瘤辅助治疗中的应用及作用机制研究”。围绕抗肿瘤药物伊立替康引发严重迟发型腹泻的作用机制和相关靶点，构建了目标酶抑制剂的高通量筛选方法，并在此基础上开展活性导向下的天然产物发现及体内外药效学评价。近5年，先后在 *Biosensor Bioelectronics*、*Sensors and actuators B-Chemical*、*Analytica Chimica Acta*、*Food and Chemical Toxicology*、*Bioorganic Chemistry* 等国际学术刊物上发表 SCI 收录论文 40 余篇。应邀担任 *Analytica Chimica Acta*、*Journal of Biomedical Material Research: Part A* 及 *Journal of Chromatography B* 等国际刊物的审稿人。先后主持国家自然科学基金、辽宁省自然科学基金等多个省部级科研项目，并入选大连市“青年科技之星项目”及辽宁省“百千万人才计划”等人才项目。

## 《药学进展》杂志2018年征订启事

《药学进展》杂志是由中国药科大学和中国药学会主办、国家教育部主管的国家级医药科技期刊，以促进行业技术进步为宗旨，面向医药行业教学、科研、生产、管理及临床应用的专业人士，全面报道医药科研创新链、学科链、技术链、产业链的国内外研究前沿与进展，突出医药信息的前瞻性、权威性、系统性、实用性，力求打造成为药学学科进展、技术进展、新药研发技术链各环节及临床应用的高端学术交流平台。

《药学进展》编委会由国家重大专项化学药总师陈凯先院士担任主编，编委由新药研发技术链政府监管部门、高校科研院所、制药企业、临床医院、CRO、金融资本及知识产权相关机构百余位极具影响力的专家组成。

《药学进展》设有“前沿与进展”、“医药行业报告”、“专家论坛”、“热点透视”、“知识产权”、“业界关注”、“文献计量”、“临床药学”等栏目。改版至今，组稿策划了“聚焦蛋白质与多肽类药物”、“肿瘤药理学研究进展”、“聚焦心脑血管疾病药物”、“糖尿病药物研发策略”、“靶向纳米递药系统的创新药物制剂设计”等专题，刊载了数十篇报道行业领域进展且极具学术价值的综述类文章，多位院士评述，充分发挥了《药学进展》作为专业媒体引领学术发展、服务科技的作用；与科睿唯安（原汤森路透）信息机构合作，独家分享全球新药研发报告，因内容全面、资料权威、视角新颖、观点独到、数据翔实、时效性强广受好评。目前刊物已在药学学科进展、科研思路方法、靶点机制探讨、新药研发报告、临床用药分析、国际医药前沿等方面形成特色。

《药学进展》杂志为月刊，每期 80 页，铜版纸全彩印刷，国内外公开发行，每期定价 30 元，全年定价 360 元。CN 32-1109/R，ISSN 1001-5094，国内邮发代号：28-112，欢迎广大读者向本刊编辑部或当地邮局订阅。

编辑部地址：南京市童家巷 24 号 中国药科大学《药学进展》编辑部； 邮编：210009

电话 / 传真：025-83271227； E-mail: yxjz@163.com