

气体信号分子硫化氢前药开发的研究进展

郑月钦*

(哈佛医学院波士顿儿童医院, 马萨诸塞 波士顿 02115)

[摘要] 硫化氢(H_2S)是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后的第3种内源性气体信号分子,在机体中发挥着重要的生物学效应。研究表明, H_2S 具有舒张血管、保护心脏、抗炎、抗氧化等生理学作用。把 H_2S 的治疗效果推向临床应用的核心是设计前药将其有效运输到需要部位。从成药性的角度,综述 H_2S 的运输策略和前药开发的研究进展,以期对相关新药的研发与临床治疗提供参考。

[关键词] 气体信号分子;硫化氢治疗;前药;成药性;可控释放

[中图分类号] R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-5094(2019)11-0817-14

Recent Advances of Hydrogen Sulfide-Based Therapeutics

ZHENG Yueqin

(Harvard Medical School & Boston Children's Hospital, Boston 02115, USA)

[Abstract] Hydrogen sulfide (H_2S), together with nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), belongs to the gasotransmitter family and plays important roles in mammals as a signaling molecule. Many studies have shown the various therapeutic effects of H_2S , which include vasodilation, cardioprotection, anti-inflammation and anti-oxidation. One major challenge in the development of H_2S -based therapeutics is its delivery. This paper reviews the various recent H_2S delivery strategies in the context of eventual developability for guiding future research in the development of H_2S -based therapeutics.

[Key words] gasotransmitter; H_2S -based therapeutics; prodrug; drug developability; controlled release

众所周知,硫化氢(H_2S)是一种臭鸡蛋气味的有毒气体,近年来发现它是除了一氧化氮(NO)、一氧化碳(CO)以外的第3种气体信号分子^[1]。 H_2S 具有抗炎^[2]、抗肿瘤^[3]、调节离子通道^[4]、保护心血管^[5]和抗氧化等功能^[6],逐渐成为与NO和CO同等重要^[7-8],并具有相当广泛药用前景的气体信号分子。

目前,已有多篇文献证明并总结了 H_2S 的治疗潜力^[9-12],本文将重点阐述近年来 H_2S 前药开发所亟待解决的关键问题。 H_2S 前药的开发取决于如何将适当浓度的 H_2S 准确地递送到所需位置。一方面, H_2S 是一种内源性气体信号分子,其耐受浓度范围在 $nmol \cdot L^{-1}$ 到 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 之间^[13];另一方面, H_2S 的量效曲线呈钟形,其有效的治疗浓度范围非常狭窄^[14]。因此,精准控制递送剂量是 H_2S 前药研发

过程中遇到的最关键问题。直接吸入 H_2S 是一种最直接的给药方式,但这面临包括其气味、刺激性、初始给药时的局部浓度(肺部)过高、难以控制剂量以及对其吸入量取决于患者心肺功能和身体状况等诸多问题,因此直接吸入式的给药方式显然不适用。这些问题也同样存在于一些简单而且快速释放 H_2S 的前药中,例如NaHS和 Na_2S 。另外, H_2S 具有许多独特的性质,让其前药的开发面临一系列特殊的困难。本文从成药性的角度,对 H_2S 的递送策略及其前药开发的研究进展进行综述。

1 H_2S 的化学性质和生物作用

为了更好地理解和探究 H_2S 的递送和其前药的研发,了解正常生理环境中 H_2S 的化学平衡的状态十分重要。 H_2S 是一种比水分子稍大的小分子,其挥发性强,水溶性高(37℃时,浓度可达 $80 mmol \cdot L^{-1}$ ^[15]),具有弱酸性,其第一和第二解离常数分别为6.88和19^[16]。在pH为7.4的生理条件下, H_2S 主要以中性分子(H_2S)和单电离形式(HS^-)存在,而硫化物(S^{2-})的含量极低。化学性质上,

接受日期: 2019-11-05

* 通讯作者: 郑月钦, 博士;

研究方向: 小分子前药的设计;

Tel: 01-6782305926; E-mail: yueqin.zheng@childrens.harvard.edu

H₂S 具有较强的还原性和亲核性、对血红素的亲和力高、不同氧化态之间易于转换、可聚合性（多以低聚物形式存在）等特性。绝大多数作用于受体或蛋白上的信号分子均是通过其和靶蛋白的直接非共价键的配合来实现信号的传递，然而 H₂S 的信号传递是通过对其和靶蛋白或靶分子的氧化还原反应来实现，因此 H₂S 的氧化还原的化学平衡对其生理和药理作用具有直接的影响。不仅如此，H₂S 氧化物如 SO₂^[17] 和过硫化物^[18] 均具有其自身特有的生物活性，使其生理机制的研究变得更加复杂。因此 H₂S 前药是否能释放出“单一”成分的 H₂S，以及它们是否能提供精确的浓度和释放速率均将直接影响其生理学的作用效果。

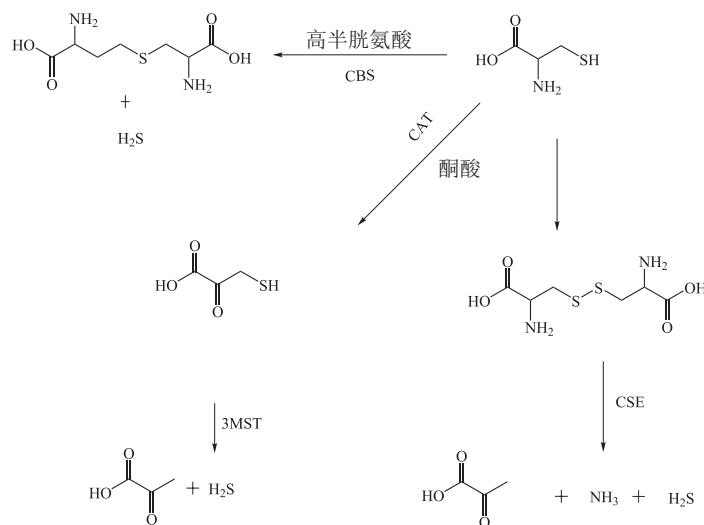


图 1 内源性 H₂S 的产生过程

Figure 1 Endogenous H₂S production in mammalian cells

1.2 生物体内 H₂S 的代谢

H₂S 主要在线粒体内通过氧化代谢分解生成硫酸盐和硫代硫酸盐^[23]。H₂S 代谢分解过程如图 2 所示，醌硫氧化还原酶（SQR）将 H₂S 氧化为 SQR 过硫化物中间体；在氧气（O₂）和水存在的条件下，硫双加氧酶（SDO）将过硫化物中间体氧化为亚硫酸盐。硫代硫酸盐硫转移酶（TST）将 SQR 过硫化物转化为硫代硫酸盐（S₂O₃²⁻），并与谷胱甘肽（GSH）作用生成过硫化谷胱甘肽（GSSH），GSSH 作底物生成亚硫酸盐，再经亚硫酸盐氧化酶（SO）进一步代谢产生硫酸盐。H₂S 代谢分解的另一种途径为与

1.1 内源性 H₂S 的生成

在哺乳动物中，酶催化可产生内源性 H₂S 已广为人知^[19-22]，其主要来源是在胱硫醚-β-合成酶（CBS）、胱硫醚-γ-裂解酶（CSE）和 3-巯基丙酮酸硫转移酶（3-MST）（见图 1）的催化下，以半胱氨酸为底物的代谢产物。CBS、CES 和 3-MST 的表达均具有组织特异性，CBS 主要在神经系统和肝内表达，而在主动脉、肝门静脉和其他血管组织中 CSE 的活性高于 CBS。3-MST 主要在中枢神经系统中表达。除了酶的表达和分布外，内源性 H₂S 的产生还依赖于底物的可用性和酶活性，而这些可能均受细胞内环境（例如氧化还原状态）的影响。

肌红蛋白（Mb）和血红蛋白（Hb）相互作用形成亚硫血红蛋白复合物。还有极少部分 H₂S 可以在胞质溶液中通过甲基化转化为二甲硫醚。

1.3 生物体内 H₂S 信号传导机制

H₂S 的信号传导机制主要有 3 种方式。第 1 种是 H₂S 对蛋白质半胱氨酸残基 S-过硫化（persulfidation）作用，即将硫醇（—SH）转化为过硫化物（—SSH），这是目前 H₂S 信号传导最重要的机制^[24-26]。蛋白质中半胱氨酸残基的过硫化会使其结构发生改变，进而改变蛋白质活性，从而导致 H₂S 产生相应的生理学作用。过硫化物形成的机制主要有 2 种：1）蛋白

质中半胱氨酸残基被活性氧物质 (ROS) 氧化生成亚磺基 (S-OH)，后者再与硫醇反应生成相应的过硫化物^[27]；2) 蛋白质中半胱氨酸残基直接与多硫化物反应生成过硫化物，而体内的多硫化物既可以通过 H₂S 直接被氧化生成，也可以通过 3-MST 内源性合成^[28-29]。通过蛋白的过硫化物信号传导机制，

H₂S 可以改变包括受体、离子通道和酶等细胞蛋白质的活性和功能，比如舒张血管、肠道和气道的平滑肌细胞，调节离子通道的开放和关闭，促进或抑制炎症反应等。不仅如此，最近的研究还证实了蛋白的过硫化物是生物体内保护蛋白不被 ROS 破坏的重要途径^[30]。

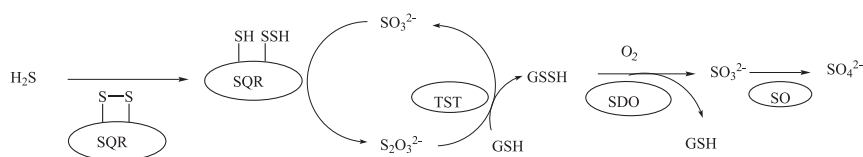


图2 H₂S 在线粒体中的代谢过程

Figure 2 H₂S metabolism in the mitochondrion

H₂S 的第 2 种信号传导机制是 H₂S 通过和血基质蛋白反应来调节其功能，从而实现信号的传导。H₂S 对血基质蛋白，比如细胞色素 C 氧化酶 (CcO)、Mb 和 Hb，均具有很强的亲和力，H₂S 能和血基质蛋白中心的高自旋三价铁形成较为稳定的低自旋三价铁硫络合物或不稳定的二价铁硫络合物，而后者将快速分解成无配位的亚铁。硫化物对血红素蛋白的影响具有浓度依赖性。高浓度的 H₂S 可以直接与铁血红素 α₃ 中心结合并完全抑制 CcO 活性，进而抑制线粒体呼吸产生毒性；低浓度（接近化学计量数）的 H₂S 可以促进 O₂ 的消耗^[31]。H₂S 与血红素蛋白的相互作用会降低细胞的 ATP 浓度并激活 K_{ATP} 通道^[32]。这些相互作用还可以调节血红素蛋白的功能，产生具有生物活性的硫化物代谢产物，防止氧化应激反应，这在硫化物信号传导中起到了重要的作用。

H₂S 的第 3 种信号传导机制是 H₂S 直接与有机亲电体 (ROS、活性氮物质 RNS) 的相互作用，例如 H₂S 与 NO 反应可生成相对分子质量较小的亚硝基硫醇 (HSNO)，进而促进蛋白质的亚硝化^[33]。

2 当前挑战

随着对 H₂S 的舒张血管、保护细胞抗氧化和抗炎等重要的生物学效应以及其信号通路机制的认识日益增长，促进了将 H₂S 极具潜力的生理学功能转化成更多可行的治疗方式。这其中最关键的便是如何有效地设计 H₂S 前药使其发挥期望的治疗效果。

正如前文所述，直接吸入式或采用硫化盐的给药方式并不可取，设计稳定、可控的 H₂S 前药，使其能在一定时间内保持稳定并且缓慢释放 H₂S，这在临床应用中会更为可取。H₂S 的大部分生理学效用来源于其氧化还原特性。不可控且快速地释放 H₂S 前药会迅速改变细胞的氧化还原状态，而这一改变对细胞的影响远高于其有益的生理学功能。随着 H₂S 浓度快速升高，各不同氧化态硫化物的分布与正常生理状态下大不相同，然而每个硫化物均具有其独特的生理学特性^[34]。一些研究表明，在 H₂S 溶液中形成的多硫化物会氧化蛋白质的硫醇，从而将半胱氨酸的硫醇盐 (Cys-S⁻) 转化为过硫化物 (Cys-SS⁻)^[29]，所以介导 H₂S 信号传导和过硫化物形成的活性分子实际是多硫化物而不是 H₂S^[29]。由于不同的释放速率及其不同的氧化态，不同 H₂S 前药即便使用相同浓度也可能产生不同浓度、不同种类含硫物质。这一系列含硫物质在细胞内分布上的变化会使 H₂S 的生理学效果和机制的研究变得非常困难。因此，这一领域迫切需要能稳定释放单一硫化物的前药，设计这类前药对于合成化学家来说也是一个挑战。

与其他小分子的前药研发相比，因 H₂S 的挥发性及其快速代谢的特性，使 H₂S 前药的开发存在许多独特挑战。H₂S 具有强烈的挥发性，其浓度一直处于挥发-溶解的动态平衡。如果再考虑 H₂S 在细胞内的快速代谢，便很容易理解经常出现的所用前药的浓度与 H₂S 浓度非线性关系的原因。此外，目

前许多 H₂S 前药中，其前药分子本身和释放 H₂S 之后的副产物均是多硫化物，所以这类前药往往很难区分其生理学效果究竟是来自于 H₂S 还是其他多硫化物。

H₂S 研究的另一个难点是缺乏对在体液循环过程中内源性 H₂S 的浓度范围及在治疗过程中 H₂S 浓度变化的定量检测的方法。造成这一问题的主要原因是 H₂S 活泼的化学性质，及体内复杂的硫化物的环境。尽管目前已有许多检测 H₂S 的方法，包括亚甲基蓝 (MB) 比色法、离子电极或极谱电极法、气相色谱法 (GC-FPD)、单溴二苯醚检测法以及利用各种荧光探针法进行测定^[35]，但都没有达到所需灵敏度，也不具备在生理环境中实时检测 H₂S 响应时间的能力。据这些报道检测出的 H₂S 在健康人或动物血浆中的生理浓度差距非常大 (0.1~300 μmol·L⁻¹)^[2]。无法准确监测循环系统或靶器官中 H₂S 浓度，使得难以评估 H₂S 和生理学效应的准确关系。因此，开发能定量检测出体内 H₂S 浓度的方法将会成为 H₂S 研究的重要工具。

3 H₂S 前药的可开发性问题

在前药的可开发性评估中，需要考虑前药特有的问题，气体信号分子的前药尤为如此。首先，对于诸如 H₂S 之类的气体信号分子前药，药物的渗透性问题与典型的小分子药物有很大不同。实际上，只需母药到达作用部位，而不一定需要前药穿透任何屏障。由于气体信号分子本身就可以穿透细胞屏障，因此前药甚至不需要进入细胞内而实现其功效。从某种意义上说，有时为了避免药物产生的副作用，研发人员会更期望前药不进入细胞内。在这方面，与传统的小分子药物的研发截然不同。其次，气体信号分子前药的另一个特有问题是量效问题。如前文所述，由于 H₂S 的挥发性和快速代谢，药物有效剂量和前药剂量之间的关系不一定是线性关系。因此需要通过药物的释放速率、挥发性和代谢速率之间的关系来确定“稳态”浓度。所以明确的释放速率对于 H₂S 前药未来的研发至关重要。最后，H₂S 还存在一些其他特有的可开发性问题：H₂S 的恶臭气味会极大地影响患者的服药依从性；含硫化物

之间的化学性质不稳定，会影响其质量控制、剂量管理，进而影响药品的审批过程。因此，开发能够克服这些问题的 H₂S 前药对于其未来发展十分关键。

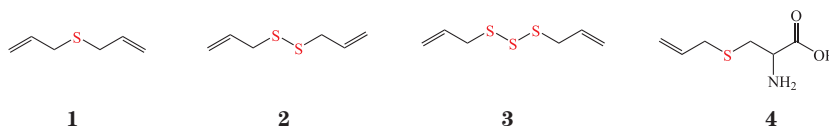
4 H₂S 前药及前药的递送方法

通过上述对有关 H₂S 前药的可发展性问题及相关挑战的讨论，总结了一些应用于治疗的 H₂S 前药及其前药的理想特性，这些均可作为评估现有前药和指导未来研究工作提供参考。1) 前药的 H₂S 释放速率必须是可调控性的。H₂S 前药的释放速率直接影响母药的有效浓度，进而影响其功能。因此，设计具有可控释放速率的 H₂S 前药非常必要。根据这条设计思路，利用明确的触发机制进行 H₂S 的控制释放对于其在医学诊疗领域的应用十分重要。2) H₂S 前药在存储、制药和制剂过程中要有比较好的稳定性。3) H₂S 前药需较好的水溶性。水溶性对于最终药物的递送和吸收有很大的影响。众所周知，药物必须具有一定的水溶性才能被吸收而发挥效用。水溶性也是影响制剂和药代动力学的重要因素。4) 具有令人厌恶的气味和味道是所有药物在开发时均希望解决的问题。对于 H₂S 前药而言，这一问题尤为严重。H₂S 的恶臭气味不仅会影响患者的服药依从性，还会影响其存储和运输，因此，找到改善这种令人不悦气味的方法是非常必要的。5) 与小分子药物的研发所不同的是，H₂S 前药的开发还面临释药过程中产生活性副产物问题。在药物的研究和临床试验阶段，应对引入人体的化学物质有充分的了解，并保证副产物不会对人体产生不良影响。下文以 H₂S 前药的适用性和局限性为背景，讨论和总结目前 H₂S 前药的各种递送方式。

4.1 硫化盐

无机硫化盐 (Na₂S、NaHS、CaS 等) 是第 1 代外源性 H₂S 前药^[36]。这些无机硫化盐溶液可通过其水合物 (NaHS·xH₂O、Na₂S·9H₂O 等) 或无水盐来制备。无机硫化盐溶于水后，溶液中存在的 S²⁻、HS⁻ 和 H₂S 建立平衡，不同硫源的比例取决于温度、压力和 pH。在生理条件下，HS⁻/H₂S 含量比约为 3:1。无机硫化盐是生物研究中最常用的 H₂S 前药，它能快速地产生 H₂S，并且在释放 H₂S 后不产生副产

物，但无机硫化物要成为 H₂S 前药的最佳候选者仍受很多限制。首先，与气态 H₂S 一样，由于多种因素的相互作用（例如，所使用的硫化盐纯度不同，金属离子污染导致的氧化作用，存在大量的多硫化物杂质等），几乎很难知道所用硫化盐溶液的准确浓度^[37]。其次，H₂S 在水溶液中的挥发性强，高浓度 H₂S 在溶液中迅速耗散^[38]。再次，直接静脉注射 Na₂S 会在体内立刻产生高浓度 H₂S，容易产生副作用，而且产生的 H₂S 会被快速代谢，致使其在组织中的有效滞留时间相对较短^[39]。最后，所有的硫化盐均具有难闻的气味，这在其药物开发中也是一大障碍。由于缺乏快速可靠的硫化物浓度检测方法，IK-1001（可注射形式的硫化钠）开始 I 期临床试验（NCT00879645）时被迫中止。另外 2 项 II 期临床试验（NCT00858936 和 NCT01007461）也因多种原因而被取消。自此之后，目前尚无任何硫化盐药物进行临床试验。



天然多硫化物因其生物毒性小、市面有售等优点备受生物学家的青睐。但 DATS、DADS 和 DAS 在结构上不适合化学转化、水溶性差以及释放 H₂S 后会产生各种副产物而限制了其应用。另外，由于天然多硫化物产生 H₂S 的速度非常缓慢，因此很难去鉴别其相对应的生理功能是否完全来自于 H₂S。

4.2 天然硫化物

与无机硫化盐相反，一些蔬菜中天然产物能以缓慢可控制的方式产生 H₂S，大蒜便是其中一种。大蒜具有多种生物活性，如抗微生物、抗氧化、抗炎、保护细胞和心脏等。但直到 2007 年，研究人员才首次将大蒜对生物体有益的功能与大蒜中存在能够产生 H₂S 的有机多硫化物 [二烯丙基硫醚 (DAS, **1**)、二烯丙基二硫化物 (DADS, **2**)、二烯丙基三硫化物 (DATS, **3**) 和 S-烯丙基半胱氨酸 (SAC, **4**)] 联系起来^[40]。研究人员还证明了人类红细胞在游离硫醇存在下能将 these 化合物转化为 H₂S，并且主动脉中加入这些化合物可导致血管舒张，其效果和用硫化钠产生的效果相似。100 μmol·L⁻¹ 的 DADS、DATS 和 SAC 的混合前药在 500 μmol·L⁻¹ GSH 的溶液中所产生的血管舒张效果超过直接用 20 μmol·L⁻¹ 的 Na₂S 所产生的效果^[40]。

4.3 Lawsson 试剂衍生物

Lawsson 试剂 (LR) 是一种在化工生产中常用的硫代试剂，可将酮、酯、酰胺和醇硫化为相应的硫类似物。近年来有许多报道 LR 及其衍生物用做 H₂S 前药^[41-45]，其中最具代表性的是由 Moore 课题组报道的 GYY4137 (**5**)^[41]，GYY4137 可经水解缓慢反应释放 H₂S (见图 3)。

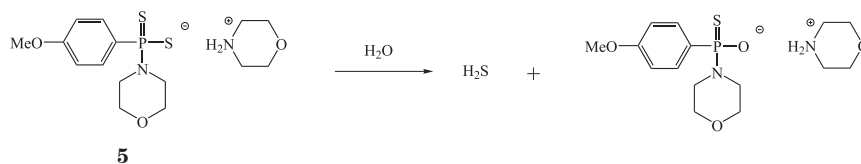


图 3 GYY4137 的 H₂S 释放机制

Figure 3 Proposed mechanism for H₂S release from GYY4137

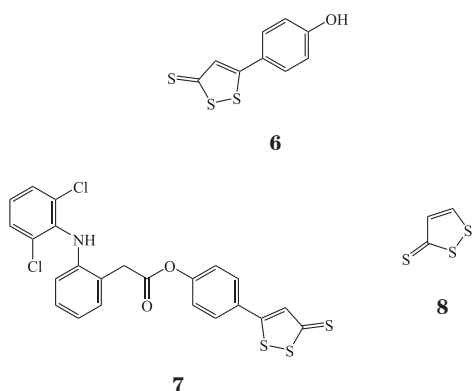
由于可获得性和缓慢释放 H₂S 的特性，LR 及其衍生物被广泛应用于多种生物效应的研究。特别值得注意的是研究人员发现这类 H₂S 前药的生理功能和其 H₂S 释放速率有关，比如在巨噬细胞的脂多糖 (LPS) 诱导的炎症中，GYY4137 可发挥抗炎作用，

而直接用 NaHS 有刺激炎症的作用^[46]。因此 H₂S 的释放速率在其前药设计中是一个关键点。但是，GYY4137 也存在一些缺点：一方面，由于其极慢的释放速率，为了达到一定的 H₂S 浓度往往需要比较大剂量的前药，而高剂量的前药分子本身在体内的

滞留时间比产生 H₂S 的时间还长，因而很难区别其生物活性是否真的来自于 H₂S；另一方面，尚没有合适的对照化合物可以用来排除 GYY4137 释放 H₂S 之后产生的副产物所引起的生物活性。因此，在使用这类前药的同时，这些问题必须要慎重考虑。

4.4 去甲苄三硫

去甲苄三硫 (ADT-OH, **6**) 是另一类由水解触发放释的 H₂S 前药，其被广泛用于已知药物分子的 H₂S 前药的衍生化^[47-49]。如双氯芬酸的羧基和 ADT-OH 的酚羟基进行成酯反应，可得到相应的 H₂S 前药衍生物 ATB-337 (**7**)^[47]，这种巧妙的杂合型前药设计不仅降低了非甾体抗炎药 (NSAIDs) 双氯芬酸的胃肠道不良反应，也增强了其抗炎作用。然而这类前药也有几点需要注意的地方：首先，ADT-OH 释放 H₂S 的部分即 1, 2-二硫杂-3-硫酮 (DTT, **8**) 的水解释放机制尚不明确。在体外实验中把 ADT-OH 放入水中很难直接检测到 H₂S 的生成，然而在 200 μmol·L⁻¹ ATB-337 溶液中加入肝匀浆 30 min 后，约有不超过 10 μmol·L⁻¹ 的 H₂S 被检测到^[47]。直接腹腔注射 50 μmol·kg⁻¹ ATB-337，3 h 后大鼠血液中 H₂S 浓度比对照组高出 40%^[47]。其次，和 GYY4137 类似，这类前药很难用合适的对照化合物来排除副产物带来的影响。最后，此类前药的 H₂S 释放和 NSAIDs 的生成并无关联，故不能保证在生成 NSAIDs 的同时释放 H₂S，进而产生协同作用。因此，设计新型杂合型前药能同时保证 NSAIDs 的释放和原位生成 H₂S，这也是一个值得研究的方向。



4.5 硫代酰胺的类似物

硫代酰胺的类似物也可作为缓慢水解释放 H₂S

的前药。2013—2014 年 Calderone 课题组报道了一系列基于芳基硫酰胺 H₂S 前药 (见图 4)^[50-52]，通过改变苯环上的取代基可以调节 H₂S 的释放速率，同时，高浓度硫醇的加入也可加速 H₂S 的释放。该类前药可以使人血管平滑肌细胞膜超极化，且呈现出浓度依赖性。1 mmol·L⁻¹ 该前药诱导的最大超极化约为 79%，而 NaHS 的最大超极化约为 52%。血压正常的大鼠经口给药 0.1 mg·kg⁻¹ NaHS 和该前药均导致收缩压显著降低约 90%。这类前药的 H₂S 释放速率非常缓慢，1 mmol·L⁻¹ 该前药即使在 5 mmol·L⁻¹ 的 GSH 溶液中能检测到 H₂S 最高浓度为 10 μmol·L⁻¹，因此，在体外和活体实验中，其产生的生理学活性也很难区分是来自于高浓度的前药本身还是释放出来的微量 H₂S。

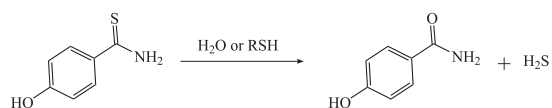


图 4 硫代酰胺 H₂S 前药的 H₂S 释放机制

Figure 4 Proposed mechanism for H₂S release from thioamide-based H₂S prodrugs

4.6 硫醇触发的 H₂S 前药

目前，硫醇触发的 H₂S 前药的设计策略是利用保护基团保护不稳定硫醇 (氮硫醇、过硫醇或偕硫醇)。保护基团的选择应使活泼硫醇在合成、纯化和贮存阶段保持足够稳定，但在特定情况下可以选择性地除去。迄今为止，酰基是最普遍的巯基保护基团，可以稳定活泼硫醇；由于酰基的亲电性强，当遇上游离硫醇类物质作用时，又可以被亲核进攻而脱保护生成硫醇，不稳定的硫醇进一步分解得到 H₂S。

2010 年，Xian 课题组利用 S—N 键的不稳定性研究发现一类 N-(苯甲酰巯基)苯甲酰胺化合物 (NSHD, **9**) 可用作 H₂S 前药^[53]。这类 NSHD 可与游离硫醇 (半胱氨酸或 GSH) 发生硫醇交换反应，生成 S-酰基化半胱氨酸 (副产物) 和 N-巯基苯甲酰胺；半胱氨酸攻击 N-巯基苯甲酰胺，继而形成过硫醇中间体；过硫醇中间体与半胱氨酸进一步反应释放出 H₂S。NSHD 的释放机制 (见图 5) 研究表明，过硫醇是产生 H₂S 的非常有用的中间体。H₂S 释放速率调节可通过硫酯部分的修饰来实现。结构-活性

关系 (SAR) 研究发现, 硫酯部分电子密度较小的前药, H_2S 的释放速率较快; 取代基位阻更大的前药, H_2S 的释放速率较慢。在 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 半胱氨酸中, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 该类前药在 45~80 min 内可以释放出最大浓度的 H_2S ($20\sim 55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。该类前药对小鼠心肌缺血再灌注损伤模型具有保护作用。与

对照组相比, 该类前药治疗组心肌梗死区 (INF) 与危险区 (AAR) 比值 (INF/AAR) 显著减少。 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ NSHD-1 (**10**) 和 NSHD-2 (**11**) 分别可使 INF/AAR 比值最大降低 35% 和 50%, 其相应的循环心肌肌钙蛋白 I 水平也显著降低^[53]。

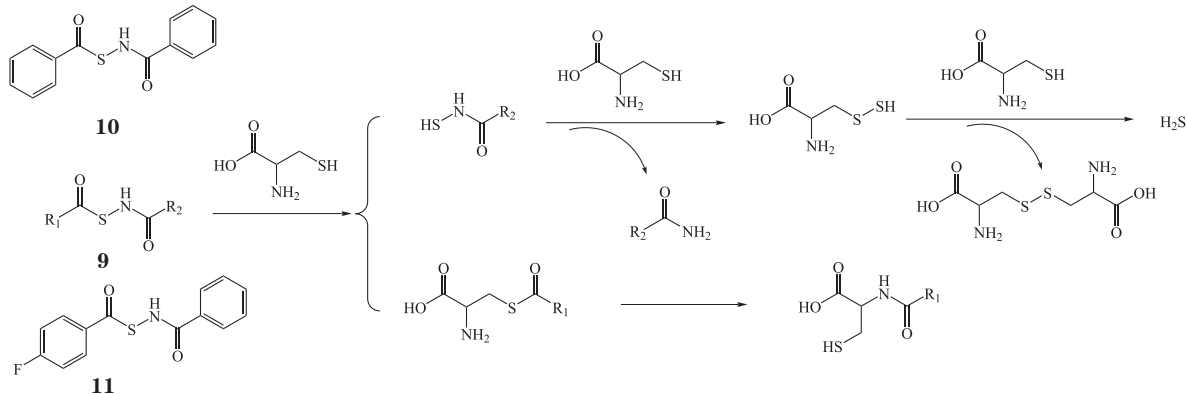


图 5 NSHD 类 H_2S 前药的 H_2S 释放机制

Figure 5 Proposed mechanism for H_2S release from NSHD-based H_2S prodrugs

2013 年, Xian 课题组又报道了一种叔丁基过硫醇的 H_2S 前药^[54], 其释放机制如图 6 所示。这类 H_2S 前药与游离硫醇作用产生过硫醇, 过硫醇很不稳定, 它易和游离硫醇类物质反应, 而直接释放

H_2S ; 或生成另一种过硫醇, 生成的新过硫醇再以相同的过程最终释放出 H_2S 。这类前药也显示了和 NSHD 类似的心肌保护作用^[54]。

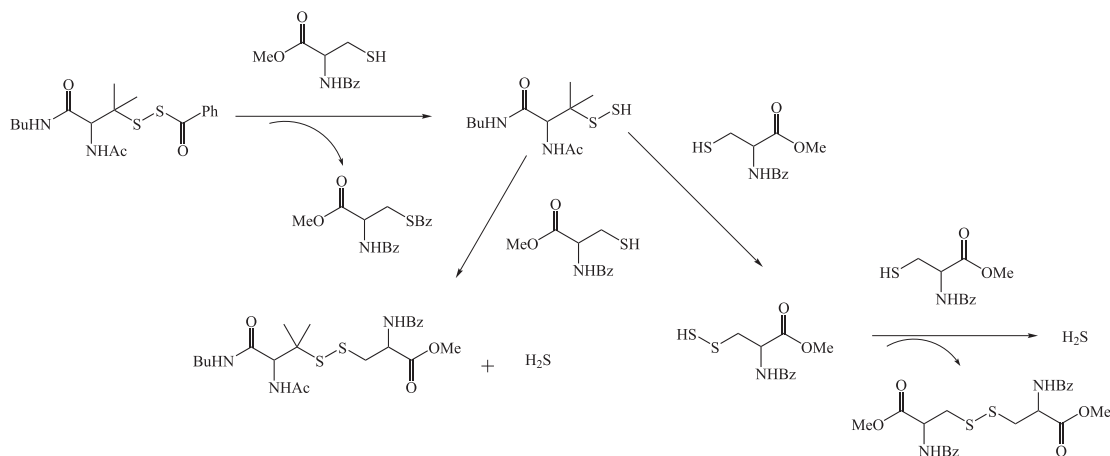


图 6 叔丁基过硫醇 H_2S 前药的 H_2S 释放机制

Figure 6 Proposed mechanism for H_2S release from tertiary perthiol-based H_2S prodrugs

2013 年, Galardon 课题组发现了一类新的 H_2S 前药即二硫代过氧酯^[55]。这类 H_2S 前药同样利用过硫醇作为中间体, 其释放机制 (见图 7) 与上述过硫醇 H_2S 前药相似, 即通过硫醇进攻硫代酯来释放中间体, 进而释放 H_2S 。 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 该类 H_2S

前药在 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 半胱氨酸的作用下, 可释放 H_2S 达到最高浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究还发现, 该类 H_2S 前药能够诱导离体大鼠主动脉松弛, 且效果呈浓度依赖性, 其半数最大有效浓度 (EC_{50}) 是 $5.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

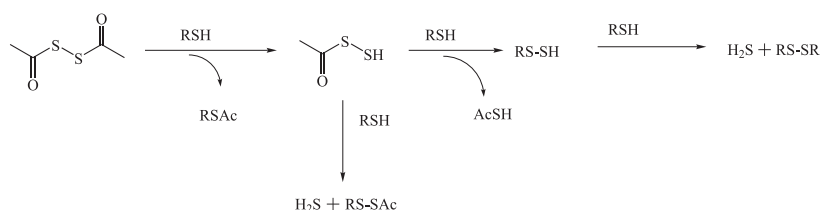


图7 二硫代过氧酞 H₂S 前药释放 H₂S 的机制

Figure 7 Proposed mechanism for H₂S release from dithioperoxyanhydrides-based H₂S prodrugs

另一类前药是偕二硫醇 (gem-dithiols) H₂S 前药^[56], 其 H₂S 释放机制如图 8 所示。偕二硫醇是一类不稳定的物质, 分解后会释放 H₂S, 用酰基可以保护这类化合物使其足够稳定。通过改变偕二硫醇上的取代基可以改变 H₂S 的释放速率。在 500 μmol·L⁻¹ 半胱氨酸中, 100 μmol·L⁻¹ 该类 H₂S 前药能够释放 25~94 μmol·L⁻¹ H₂S。该类 H₂S 前药在 5~25 μmol·L⁻¹ 浓度范围内未在 HeLa 细胞显示任何细胞毒性。

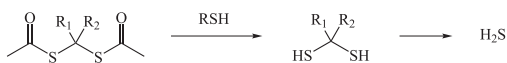


图8 偕二硫醇 H₂S 前药的 H₂S 释放机制

Figure 8 Proposed mechanism for H₂S release from gem-dithiol H₂S prodrugs

最近, Matson 课题组开发了一系列硫醇活化的聚合物前药^[57-58]。因半胱氨酸在肽凝胶中的渗透能力有限, 该类前药的 H₂S 释放速率较慢, 因此可在一段时间内持续释放 H₂S。在 1 mmol·L⁻¹ 半胱氨酸水溶液中, 100 μmol·L⁻¹ 该类 H₂S 前药在 110 min 时产生的 H₂S 达到峰值浓度 (5.5 μmol·L⁻¹), 且在 15 h 后仍可检测到 H₂S。

上述硫醇活化的 H₂S 前药均具有可控的释放速率, 使其成为出色的研究工具及潜在的前药。但这类前药也有一些问题需要注意。首先, 产生的中间体过硫醇本身就可能具有特殊的生物活性。其次, 这类前药需要依靠游离的高浓度硫醇类物质作为激活剂 (通常需要 5 倍或更多当量)。游离硫醇类物质的不足会阻碍 H₂S 的释放, 因此, 充分了解体内游离硫醇浓度的波动对于制定剂量方案和分析潜在问题非常重要。再次, 缺乏明确的阴性对照将很难确定“活性成分”。当然在实际应用中, 过硫醇的特有活性可能也会成为一个优势, 但是在研究过程

中很难区分其功能是否来自释放出来的 H₂S 还是过硫醇。最后, 这类前药的水溶性也是一个需要改进的方向。

4.7 光敏 H₂S 前药

2013 年, Xian 课题组利用偕二硫醇具有释放 H₂S 的能力设计了一种光敏 H₂S 前药 (**12**), 其 H₂S 的释放机制如图 9 所示^[59]。利用光敏性基团 (2-硝基苄基) 保护不稳定的偕二硫醇, 在紫外光照射下, 释放偕二硫醇, 然后发生水解反应释放 H₂S。在磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) (pH = 7.4)/乙腈 (1:1) 的环境中, 200 μmol·L⁻¹ 该光敏 H₂S 前药在紫外线 (365 nm) 照射 7 min 时产生的 H₂S 峰值浓度为 36 μmol·L⁻¹。2014 年, Nakagawa 团队设计了另一种光敏 H₂S 前药: 光敏酮洛芬酸酯 H₂S 前药 SPD-1 (**13**)^[60]。如图 9 所示, 经紫外光 (300~350 nm) 照射, SPD-1 将释放 1 个当量的 H₂S, 并伴随生成 2 个当量的 2-丙烯基二苯甲酮和二氧化碳 (CO₂)。这类光敏 H₂S 前药的 H₂S 释放能力取决于光照时间及强度。用 5.1 mW·cm⁻² 的光照 200 s, 100 μmol·L⁻¹ SPD-1 可释放 18 μmol·L⁻¹ 的 H₂S。2015 年, Nakagawa 团队进一步优化前药结构, 提出了可以被更长波长 (325~385 nm) 光源激发的光敏 H₂S 前药 SPD-2 (**14**)^[61]。与第 1 代前药分子相比, SPD-2 可以利用较长波长、较弱强度的光源实现更多 H₂S 释放。用 2.3 mW·cm⁻² 的光照 400 s, 100 μmol·L⁻¹ SPD-2 可释放 47 μmol·L⁻¹ 的 H₂S。

光敏 H₂S 前药具有良好的选择性和可控性, 是 H₂S 作为前药非常良好的载体。然而, 光的穿透深度有限、用以调节紫外光裂解和水解速率的化学修饰方法选择有限、前药的细胞毒性和水溶性差均使这类前药的发展受到了限制。另外, 在生物环境中 2-亚硝基苯甲醛 (副产物) 与 H₂S 及许多其他亲核试剂的反应性也需要加以考虑。

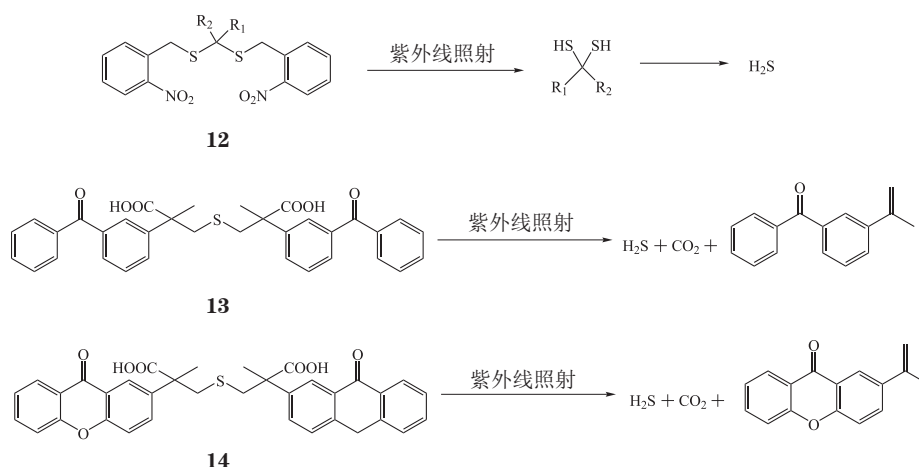

 图 9 光敏 H₂S 前药的 H₂S 释放机制

 Figure 9 Proposed mechanism for H₂S release from photo-sensitive H₂S prodrugs

4.8 硫代氨基酸

2012 年, Giannis 课题组提出了在生理环境中碳酸氢盐存在的条件下, 硫代氨基酸可以用作 H₂S 前药^[62]。如图 10 所示, 硫代氨基酸先与碳酸氢盐反应形成氨基甲酸酯中间体, 再通过环化反应生成 N-羧酸酐并伴有 H₂S 的释放。腹膜内注射 5 mg·kg⁻¹

硫代甘氨酸后, 大鼠血浆中的 H₂S 浓度呈时间依赖性增加, 在 2 h 后达到 35 μmol·L⁻¹。该前药的生物活性通过其增加细胞内环磷酸鸟苷 (cGMP) 水平的能力来评估。300 μmol·L⁻¹ 硫代甘氨酸导致平滑肌细胞中 cGMP 水平增加 10 倍, 而 NaHS 在相同浓度下仅增加 2 倍。

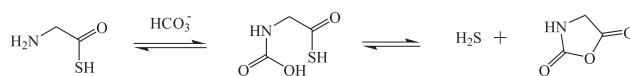

 图 10 硫代氨基酸 H₂S 前药释放 H₂S 的机制

 Figure 10 Proposed mechanism for H₂S release from thiol amino acid H₂S prodrugs

基于硫代氨基酸的 H₂S 释放系统表现出良好的 H₂S 释放能力和溶解性。但这类前药的化学修饰空间不大, 且生理条件下也很难调控碳酸氢盐的浓度, 使其 H₂S 的释放速率几乎是固定的。

4.9 酶触发的 H₂S 前药

2016 年, Wang 课题组开发了一类由酶触发的 H₂S 前药, 其 H₂S 释放机制如图 11 所示^[63]。这类前药将 H₂S 以硫代羧酸的形式存储在前期药物中, 通过酯酶触发, 生成的具有亲核性的酚羟基, 再依靠分子自身的成环作用把 H₂S 给释放出来。实验结果表明, 在含有猪肝酯酶 (PLE) 的 PBS 缓冲液 (37 °C, pH = 7.4, 1% DMSO) 中, 200 μmol·L⁻¹ 该前药在 15 min 时产生的 H₂S 峰值浓度约为 95 μmol·L⁻¹。该前药在无酯酶环境下非常稳定, 而通过修饰酚羟基保护基团、调控内酯化的速率可以控制 H₂S 的释放

速率, 基于此研究人员合成了一系列这类前药, 其半衰期为 13~99 min, 产生的 H₂S 峰浓度为 95~13 μmol·L⁻¹, 同时证明这类前药在 50 μmol·L⁻¹ 浓度下具有明显的抗炎作用, 而相同浓度的 NaHS 却显现出明显的引发炎症的效果。这类酶响应的 H₂S 前药是无味、白色固体, 具有良好的水溶性 (在水基缓冲液中浓度为 10 mmol·L⁻¹)、稳定性 (室温放置 3 d, -20 °C 数月未见明显分解) 和低细胞毒性。通过改变保护基团和内酯化的方式可衍生数百种具有不同释放速率的类似物。

NSAIDs 的常见不良反应是对胃肠道造成损伤, 这是因为 NSAIDs 抑制了环氧合酶 1 (COX-1) 和羧基团的刺激性^[64]。H₂S 不仅在抗炎上和 NSAIDs 有协同作用, 还可以克服 NSAIDs 对胃肠道的副作用, 因此, 将 H₂S 前药与 NSAIDs 制成的杂合药物

具有十分广阔的治疗前景^[65]。然而正如前文所述, 目前这类杂合药物由于很难实现 NSAIDs 和 H₂S 在同一部位有效释放, 进而难以控制协同作用的发生。为了解决这一问题, Wang 课题组利用上述酶响应

的 H₂S 前药释放模型设计出了一类与 NSAID 偶联的酯酶敏感前药 (见图 11)^[63], 很好地保证了在释放 NSAIDs 的同时在原位生成一个 H₂S 分子。这类前药的半衰期约为 2 h, 明显长于乙酰基酯酶前药。

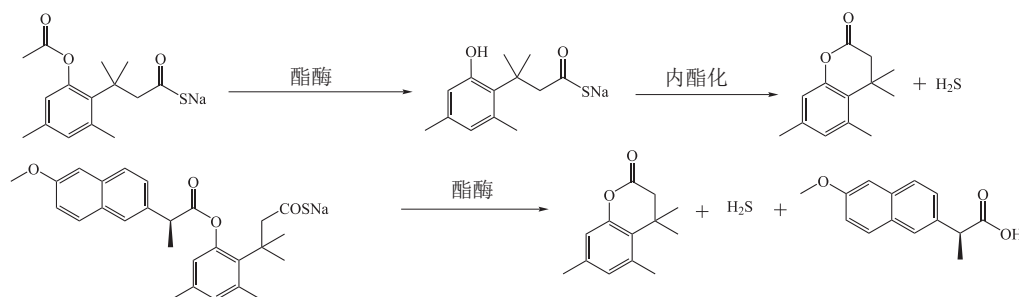


图 11 酶触发的 H₂S 前药的 H₂S 释放机制

Figure 11 Proposed mechanism for H₂S release from enzyme-triggered H₂S prodrugs

酯酶作为前药激活剂, 在生物环境中普遍存在, 并且活性不同, 因此在采用这类前药时需要注意这点。由于硫代羧酸的化学性质比较活泼, 其自身在生物体内的稳定性和活性也需要注意。因此, 这些酶响应前药还需要生物学测试来评价其真正应用潜力。

4.11 pH 响应的 H₂S 前药

2016 年, Xian 课题组报道了基于硫代磷酸酯的 pH 敏感 H₂S 前药^[66]。如图 12 所示, 在酸性条件下,

亲核的羧酸攻击磷酸盐中心形成稳定的五元环, 并伴随 H₂S 的释放。实验结果证实, 100 μmol·L⁻¹ 该类前药在 pH 为 5 时 20 min 内可以释放 50 μmol·L⁻¹ H₂S, 而当 pH 升高至 8.0 时, 却未检测到 H₂S 的产生。这类酸性 pH 敏感的 H₂S 前药因心肌缺血等使局部 pH 降低而使其在心肌缺血再灌注损伤治疗领域备受关注。在小鼠心肌缺血再灌注损伤模型中, 相对于对照组, 该类 H₂S 前药治疗组可使 INF/AAR 比值显著降低。

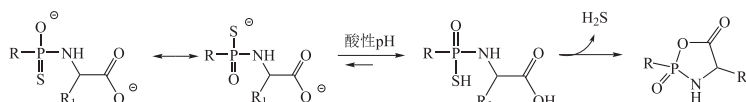


图 12 pH 响应的 H₂S 前药的 H₂S 释放机制

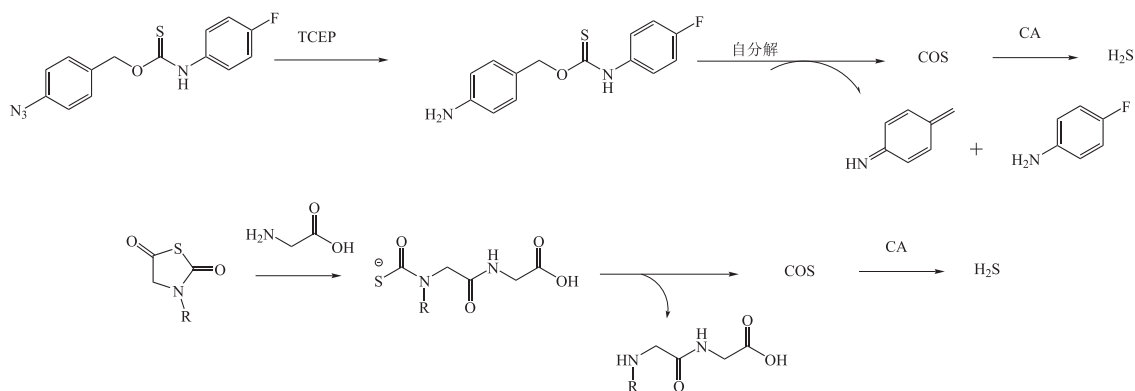
Figure 12 Proposed mechanism for H₂S release from pH-sensitive H₂S prodrugs

4.12 羧基硫的 H₂S 前药

2016 年, Pluth 课题组首先报道了一种基于硫代氨基甲酸酯的自发级联分解产生羧基硫 (COS) 的 H₂S 前药 (见图 13)^[67]。该前药中的叠氮部分被还原剂三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 还原为氨基, 随后自分解产生 COS, COS 可在全身广泛分布的碳酸酐酶 (CA) 作用下水解为 H₂S。25 μmol·L⁻¹ 该前药在大鼠血液中 30 min 能释放出 18 μmol·L⁻¹ H₂S。在同一时间 Matson 课题组也报道了另一种基于 COS 水解的 H₂S 前药^[68]。在这一系统中, N-硫代羧酸酐 (NTA) 与生物亲核试剂 (如甘氨酸) 发生开环聚合反应, 产生 COS, COS 又通过 CA 或简单水解转化为 H₂S。实验证实, 与小分子 NTA 相比, 聚合

态的 NTA 具有更长的机体保留时间。100 μmol·L⁻¹ 的该前药在 300 nmol·L⁻¹ CA 和 1 mmol·L⁻¹ 半胱氨酸的作用下, 在 75 min 可检测到 H₂S 峰浓度为 0.7 μmol·L⁻¹, 而在 24 h 后仍能检测到微量的 H₂S。100 μmol·L⁻¹ 该前药能显著促进内皮细胞的增殖。

通过触发剂选择性地释放 COS 并进一步在 CA 作用下转化为 H₂S 的策略, 被很好地运用到新型可控 H₂S 前药的设计中。这些触发剂包括 pH^[69]、酯酶^[70]、ROS^[71]、光^[72]、四嗪^[73]等。由于 CA 也几乎遍布全身且各处浓度不同, 因此这类前药无法保证在激活的原位释放一定量的 H₂S, 而且这类前药的水溶性都比较差而且合成复杂, 因此在实际运用上可能并不理想。

图 13 基于 COS 的 H₂S 前药的 H₂S 释放机制Figure 13 Proposed mechanism for H₂S release from COS-based H₂S prodrugs

5 结语与展望

随着 H₂S 的治疗潜力日益显现，越来越多的研究人员开始关注具有可控释放能力 H₂S 前药的研发。与小分子药物的研发一样，在投入临床试验前一些可开发性问题必须得到良好解决。对于气体信号传导分子 H₂S 的递送及其前药的研发，除了与吸收、分布、代谢和毒性等有关的普遍性问题外，还因其独特理化及生理学性质面临着特殊的可开发性问题。例如，气体剂量的问题，这不仅仅是其在生物体内的浓度问题，还涉及到前药的释放速率问题。就化学性质而言，H₂S 既是良好的亲核试剂，又是强还原试剂，这在药物递送方面提出了新的挑战。掩盖或祛除 H₂S 特殊气味的问题在其作为医疗制剂推广和发展中也亟待解决。

除了上述基本问题之外，还有更多更具挑战性的问题。例如 H₂S 信号通路中蛋白活性变化的核心机制已被证实是过硫化化 (persulfidation)，近年来已有多篇文献报道过硫化物前药^[74-80]。与 H₂S 前药不同，过硫化物前药可以直接将蛋白上半胱氨酸的巯基转化成过硫化物，而不需要活性氧的参与。无选择性地过硫化化必将严重地改变蛋白原有的活性，因此如何实现选择性过硫化化将会是这个领域最具有挑战性的研究方向之一。这不仅要求把前药准确地运输到靶部位，还要求实现对靶蛋白中多个巯基氨基酸中目标氨基酸的选择性修饰。这不论从化学性质还是生物活性的研究上均充满巨大挑战。希望本文所提出的可开发性问题将有助于指导 H₂S 的未来研究工作，并推动 H₂S 前药在临床应用方面的发展。

【参考文献】

- [1] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?[J]. *FASEB J*, 2002, 16(13): 1792-1798.
- [2] Wallace J L, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(5): 329-345.
- [3] Szabo C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(3): 185-203.
- [4] Zhao W M, Zhang J, Lu Y J, *et al.* The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener[J]. *EMBO J*, 2001, 20(21): 6008-6016.
- [5] Yuan G, Peng Y J, Khan S A, *et al.* H₂S production by reactive oxygen species in the carotid body triggers hypertension in a rodent model of sleep apnea[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(441): ra80. Doi: 10.1126/scisignal.aaf3204.
- [6] Xie L, Feng H, Li S, *et al.* SIRT3 mediates the antioxidant effect of hydrogen sulfide in endothelial cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(6): 329-343.
- [7] Huerta S, Chilka S, Bonavida B. Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics[J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(5): 909-927.
- [8] Ji X, Damera K, Zheng Y, *et al.* Toward carbon monoxide-based therapeutics: critical drug delivery and developability issues[J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2): 406-416.

- [9] Guo W, Cheng Z Y, Zhu Y Z. Hydrogen sulfide and translational medicine[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(10): 1284-1291.
- [10] Li L, Rose P, Moore P K. Hydrogen sulfide and cell signaling[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2011, 51: 169-187.
- [11] Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(11): 917-935.
- [12] Calderone V, Martelli A, Testai L, et al. Using hydrogen sulfide to design and develop drugs[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(2): 163-175.
- [13] Klingerma C M, Trushin N, Prokopczyk B, et al. H₂S concentrations in the arterial blood during H₂S administration in relation to its toxicity and effects on breathing[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 305(6): R630-R638.
- [14] Stein A, Bailey S M. Redox biology of hydrogen sulfide: implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology[J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 32-39.
- [15] Ungerer P, Wender A, Demoulin G, et al. Application of Gibbs ensemble and NPT Monte Carlo simulation to the development of improved processes for H₂S-rich gases[J]. *Mol Simulat*, 2004, 30(10): 631-648.
- [16] Hughes M N, Centelles M N, Moore K P. Making and working with hydrogen sulfide: the chemistry and generation of hydrogen sulfide *in vitro* and its measurement *in vivo*: a review[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(10): 1346-1353.
- [17] Huang Y, Tang C, Du J, et al. Endogenous sulfur dioxide: a new member of gasotransmitter family in the cardiovascular system[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 8961951. Doi: 10.1155/2016/8961951.
- [18] Ono K, Akaike T, Sawa T, et al. Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: implications of their possible biological activity and utility[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 77: 82-94.
- [19] Yamanishi M, Kabil O, Sen S, et al. Structural insights into pathogenic mutations in heme-dependent cystathionine-beta-synthase[J]. *J Inorg Biochem*, 2006, 100(12): 1988-1995.
- [20] Teng H, Wu B, Zhao K, et al. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine beta-synthase mediated by Lon protease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(31): 12679-12684.
- [21] Renga B. Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine-beta-synthase (CBS) and cystathionine-gamma-lyase (CSE)[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011, 10(2): 85-91.
- [22] Zheng Y, Yu B, De La Cruz L K, et al. Toward hydrogen sulfide based therapeutics: critical drug delivery and developability issues[J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(1): 57-100.
- [23] Kabil O, Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29): 21903-21907.
- [24] Mustafa A K, Gadalla M M, Sen N, et al. H₂S signals through protein S-sulfhydration[J]. *Sci Signal*, 2009, 2(96): ra72. Doi: 10.1126/scisignal.2000464.
- [25] Mishanina T V, Libiad M, Banerjee R. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(7): 457-464.
- [26] Paul B D, Snyder S H. H₂S: a novel gasotransmitter that signals by sulfhydration[J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(11): 687-700.
- [27] Francoleon N E, Carrington S J, Fukuto J M. The reaction of H₂S with oxidized thiols: generation of persulfides and implications to H₂S biology[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 516(2): 146-153.
- [28] Kimura Y, Toyofuku Y, Koike S, et al. Identification of H₂S₃ and H₂S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14774. Doi: 10.1038/srep14774.
- [29] Greiner R, Pálinkás Z, Bäsell K, et al. Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(15): 1749-1765.
- [30] Zivanovic J, Kouroussis E, Kohl J B, et al. Selective persulfide detection reveals evolutionarily conserved antiaging effects of S-sulfhydration[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(6): 1152-1170.
- [31] Helmy N, Prip-Buus C, Vons C, et al. Oxidation of hydrogen sulfide by human liver mitochondria[J]. *Nitric Oxide*, 2014, 41: 105-112.
- [32] Collman J P, Ghosh S, Dey A, et al. Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(52): 22090-22095.
- [33] Filipovic M R, Miljkovic J, Nauser T, et al. Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(29): 12016-12027.
- [34] Artaud I, Galardon E. A persulfide analogue of the nitrosothiol SNAP: formation, characterization and reactivity[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(16): 2361-2364.

- [35] Lin V S, Chen W, Xian M, *et al.* Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems[J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(4): 4596-4618.
- [36] Martelli A, Testai L, Breschi M C, *et al.* Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery[J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(6): 1093-1130.
- [37] Nagy P, Pálkás Z, Nagy A, *et al.* Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(2): 876-891.
- [38] DeLeon E R, Stoy G F, Olson K R. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments[J]. *Anal Biochem*, 2012, 421(1): 203-207.
- [39] Toombs C F, Insko M A, Wintner E A, *et al.* Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in healthy human volunteers during intravenous administration of sodium sulphide[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2010, 69(6): 626-636.
- [40] Benavides G A, Squadrito G L, Mills R W, *et al.* Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(46): 17977-17982.
- [41] Li L, Whiteman M, Guan Y Y, *et al.* Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide[J]. *Circulation*, 2008, 117(18): 2351-2360.
- [42] Nicolau L A, Silva R O, Damasceno S R, *et al.* The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(8): 708-714.
- [43] Park C M, Zhao Y, Zhu Z, *et al.* Synthesis and evaluation of phosphorodithioate-based hydrogen sulfide donors[J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(10): 2430-2434.
- [44] Feng W, Teo X Y, Novera W, *et al.* Discovery of new H₂S releasing phosphordithioates and 2,3-dihydro-2-phenyl-2-sulfanylenebenzo[d][1,3,2]oxazaphospholes with improved antiproliferative activity[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(16): 6456-6480.
- [45] Nin D S, Idres S B, Song Z J, *et al.* Biological effects of morpholin-4-ium 4 methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate and other phosphorothioate-based hydrogen sulfide donors[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32(2): 145-158.
- [46] Whiteman M, Li L, Rose P, *et al.* The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(10): 1147-1154.
- [47] Li L, Rossoni G, Sparatore A, *et al.* Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(5): 706-719.
- [48] Wallace J L, Caliendo G, Santagada V, *et al.* Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(1): 261-271.
- [49] Wallace J L. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(10): 501-505.
- [50] Martelli A, Testai L, Citi V, *et al.* Arylthioamides as H₂S donors: l-cysteine-activated releasing properties and vascular effects *in vitro* and *in vivo*[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(10): 904-908.
- [51] Martelli A, Testai L, Citi V, *et al.* Pharmacological characterization of the vascular effects of aryl isothiocyanates: is hydrogen sulfide the real player?[J]. *Vascul Pharmacol*, 2014, 60(1): 32-41.
- [52] Citi V, Martelli A, Testai L, *et al.* Hydrogen sulfide releasing capacity of natural isothiocyanates: is it a reliable explanation for the multiple biological effects of Brassicaceae?[J]. *Planta Med*, 2014, 80(8/9): 610-613.
- [53] Zhao Y, Wang H, Xian M. Cysteine-activated hydrogen sulfide (H₂S) donors[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(1): 15-17.
- [54] Zhao Y, Bhushan S, Yang C, *et al.* Controllable hydrogen sulfide donors and their activity against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(6): 1283-1290.
- [55] Roger T, Raynaud F, Bouillaud F, *et al.* New biologically active hydrogen sulfide donors[J]. *ChemBioChem*, 2013, 14(17): 2268-2271.
- [56] Zhao Y, Kang J, Park C M, *et al.* Thiol-activated gem-dithiols: a new class of controllable hydrogen sulfide donors[J]. *Org Lett*, 2014, 16(7): 4536-4539.
- [57] Foster J C, Matson J B. Functionalization of methacrylate polymers with thiooximes: a robust postpolymerization modification reaction and a method for the preparation of H₂S-releasing polymers[J]. *Macromolecules*, 2014, 47: 5089-5095.
- [58] Carter J M, Qian Y, Foster J C, *et al.* Peptide-based hydrogen sulphide-releasing gels[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51(66): 13131-13134.
- [59] Devarie-Baez N O, Bagdon P E, Peng B, *et al.* Light-induced

- hydrogen sulfide release from “caged” gem-dithiols[J]. *Org Lett*, 2013, 15(11): 2786-2789.
- [60] Fukushima N, Ieda N, Sasakura K, *et al.* Synthesis of a photocontrollable hydrogen sulfide donor using ketoprofenate photocages[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50(5): 587-589
- [61] Fukushima N, Ieda N, Kawaguchi M, *et al.* Development of photo-controllable hydrogen sulfide donor applicable in live cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(2): 175-178.
- [62] Zhou Z, von Wantoch Rekowski M, Coletta C, *et al.* Thioglycine and L-thiovaline: biologically active H₂S-donors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(8): 2675-2678.
- [63] Zheng Y, Yu B, Ji K, *et al.* Esterase-sensitive prodrugs with tunable release rates and direct generation of hydrogen sulfide[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(14): 4514-4518.
- [64] Qandil A M. Prodrugs of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), more than meets the eye: a critical review[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 17244-17274.
- [65] Gargallo C J, Lanás A. Is NSAIDs-related gastrointestinal damage preventable?[J]. *J Dig Dis*, 2013, 14(2): 55-61.
- [66] Kang J, Li Z, Organ C L, *et al.* pH-controlled hydrogen sulfide release for myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(20): 6336-6339.
- [67] Steiger A K, Pardue S, Kevil C G, *et al.* Self-immolative thiocarbamates provide access to triggered H₂S donors and analyte replacement fluorescent probes[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(23): 7256-7259.
- [68] Powell C R, Foster J C, Okyere B, *et al.* Therapeutic delivery of H₂S via COS: small molecule and polymeric donors with benign byproducts[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(41): 13477-13480.
- [69] Gilbert A K, Zhao Y, Otteson C E, *et al.* Development of acid-mediated H₂S/COS donors that respond to a specific pH window[J]. *J Org Chem*, 2019, 84(22): 14469-14475.
- [70] Chauhan P, Bora P, Ravikumar G, *et al.* Esterase activated carbonyl sulfide/hydrogen sulfide (H₂S) donors[J]. *Org Lett*, 2017, 19(1): 62-65.
- [71] Zhao Y, Pluth M D. Hydrogen sulfide donors activated by reactive oxygen species[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(47): 14638-14642.
- [72] Zhao Y, Bolton S G, Pluth M D, *et al.* Light-activated COS/H₂S donation from photocaged thiocarbamates[J]. *Org Lett*, 2017, 19(9): 2278-2281.
- [73] Steiger A K, Yang Y, Pluth M D, *et al.* Bio-orthogonal “click-and-release” donation of caged carbonyl sulfide (COS) and hydrogen sulfide (H₂S)[J]. *Chem Commun*, 2017, 53(8): 1378-1380.
- [74] Zheng Y, Yu B, Li Z, *et al.* An esterase-sensitive prodrug approach for controllable delivery of persulfide species[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(39): 11749-11753.
- [75] Yu B, Zheng Y, Yuan Z, *et al.* Toward direct protein S-persulfidation: a prodrug approach that directly delivers hydrogen persulfide[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(1): 30-33.
- [76] Khodade V S, Toscano J P. Development of S-substituted thioisothioureas as efficient hydropersulfide precursors[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(50): 17333-17337.
- [77] Powell C R, Dillon K M, Wang Y, *et al.* A persulfide donor responsive to reactive oxygen species: insights into reactivity and therapeutic potential[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(21): 6324-6328.
- [78] Yuan Z, Zheng Y, Yu B, *et al.* Esterase-sensitive glutathione persulfide donor[J]. *Org Lett*, 2018, 20(20): 6364-6367.
- [79] Kang J, Xu S, Radford M N, *et al.* O→S relay deprotection: a general approach to controllable donors of reactive sulfur species[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(20): 5893-5897.
- [80] Xu S, Wang Y, Parent Z, *et al.* Diacyl disulfides as the precursors for hydrogen persulfide (H₂S₂)[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 19: 126903. Doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126903.



【专家介绍】郑月钦：博士，2011年本科毕业于中国科学技术大学；2017年获佐治亚州立大学药物化学专业博士学位，指导老师为王炳和教授，随后在哈佛医学院波士顿儿童医院和麻省理工学院进行博士后研究和学习，指导老师为 Denial Kohane 教授（哈佛）和 Robert Langer 教授（MIT）。主要研究方向包括靶向药物运输体系的设计，新型气体信号分子前药的研发和选择性阻滞感觉神经局部麻药的开发。近年来以第一作者或通讯作者身份在 *Nature Chemistry*、*Angew Chem Int Ed*、*JACS* 等多个顶级期刊发表论文 30 多篇。曾获包括博士研究生金奖，优秀自费留学生在内的多个奖项。