



含磷丙酮酸脱氢酶系抑制剂的研究进展

贺红武*, 贺军波, 陈婷, 陶瑞娟, 李静

农药与化学生物学教育部重点实验室; 华中师范大学, 武汉 430079

*通讯作者, E-mail: he1208@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2010-03-12; 接受日期: 2010-04-28

摘要 丙酮酸脱氢酶系是生物体内重要的氧化还原酶之一, 其催化丙酮酸氧化脱羧转化为乙酰辅酶 A 是生物体内的关键代谢过程, 在生物化学研究中具有重要的意义. 根据生物化学的理由来进行新药分子生物合理设计的观点, 丙酮酸脱氢酶系是一个具有重要意义和值得探索的靶标. 研究表明许多有机磷化合物是一类重要的丙酮酸脱氢酶系抑制剂. 本文系统介绍了含磷丙酮酸脱氢酶系抑制剂的研究历程和研究动态, 并结合本课题组的研究工作对代表性的研究结果和进展进行了总结和评述.

关键词

丙酮酸脱氢酶系
抑制剂
生物合理设计
有机磷化合物

1 引言

高效率地基于特定的作用靶标的生物合理设计是国际上新药创制的前沿课题. 探索和发现可以选择调控生物大分子的小分子也是目前化学生物学领域关注的热点. 在目前人们正在努力探索的新药靶标酶中, 丙酮酸脱氢酶系是一个令人关注的作用靶标. 丙酮酸脱氢酶系, 也称丙酮酸脱氢酶复合物 (pyruvate dehydrogenase complex, PDHc) 是生物体内重要的氧化还原酶之一, 广泛存在于高等植物、微生物及哺乳动物中, 是一个复杂的多酶体系. 丙酮酸氧化脱羧转化成为乙酰辅酶 A 是生物体内的关键代谢过程, 连接糖的有氧氧化与三羧酸循环和氧化磷酸化, 必须在丙酮酸脱氢酶系 (PDHc) 的催化下才能进行. 因此根据生物化学的理由来进行新农药分子生物合理设计的观点, 丙酮酸脱氢酶系是一个具有重要意义和值得探索的靶标.

在全球范围内农药已成为保护农作物丰收不可缺少的手段之一. 在世界范围内农药新品种虽层出不穷, 然而, 从农药长期应用的实际效果表明, 目前有限靶标的除草剂的多次重复作用使得抗性杂草迅速增多, 导致的抗性越来越严重. 此外, 由于每

一种杀菌剂的杀菌谱以及作用机制的限制, 任何一种主要作物的病害也需用多种不同靶标的杀菌剂才能很好地控制. 因此寻找新的作用靶标已成为当前农药研究中一个重要课题. 据文献报道, 丙酮酸脱氢酶系广泛存在于酵母^[1-3]、真菌^[4]、细菌^[5, 6]、植物^[7-10]中, 其中, 以大肠杆菌 *Escherichia coli*^[11-12] 中的丙酮酸脱氢酶系的研究报道相对较多. 鉴于丙酮酸脱氢酶系在植物体、微生物中的重要生理作用, 开展新型高效的丙酮酸脱氢酶系抑制剂的生物合理设计, 对于探索发现这种独特作用机制新药具有重要的科学意义. 其研究也将为开发具有原创性的新型高效农药品种提供重要的理论和科学依据. 因此, 丙酮酸脱氢酶抑制剂的设计和研究已成为一个十分活跃的研究领域.

在全球农药工业的发展历史中, 有机磷农药是最重要且最具有经济价值的农药化学品之一. 纵观以丙酮酸脱氢酶系为靶标的抑制剂的研究历程, 令人感兴趣的是有机磷化合物也是目前已报道的丙酮酸脱氢酶抑制剂中的最重要的结构类型. 本文将结合本课题组的研究工作系统总结有机磷类丙酮酸脱氢酶系抑制剂的研究进展.

2 丙酮酸脱氢酶系的结构及作用机制

丙酮酸脱氢酶复合体催化丙酮酸的氧化脱羧, 在糖代谢中扮演了一个非常重要的角色^[13]. 丙酮酸脱氢酶系 (PDHc) 的核心结构通常由以下部分组成: 丙酮酸脱氢酶 (PDH, 简称 E1, EC1.2.4.1) 二氢硫辛酰胺乙酰转移酶(dihydrolipoamide acetyltransferase, 简称 E2, EC 2.3.1.12), 二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase, 简称 E3, EC1.8.1.4). 这 3 种酶在 PDHc 的催化反应过程中以首尾相接的形式发挥作用, 结构上的有序性使得丙酮酸脱氢酶系催化丙酮酸脱羧形成乙酰辅酶 A 的复杂反应顺利进行. 与低等生物相比, 高等生物体内的 PDHc 还包括丙酮酸脱氢酶激酶 (PDK, EC2.7.1.99)、丙酮酸脱氢酶磷酸酶(PDP, EC 3.1.3.43)以及 E3 结合蛋白(E3-binding protein, E3BP)^[14]. 另外, 在 PDHc 起催化作用的过程中还有 6 种重要的辅助因子参与, 分别是 ThDP (TPP), Mg^{2+} , 硫辛酸, FAD, NAD^+ , CoASH.

在 PDHc 催化反应中, PDHc E1 催化不可逆并且控制整个反应体系速率的第一步, 即依赖焦磷酸硫胺素 ThDP (thiamin diphosphate, TPP) 催化的丙酮酸脱羧反应^[15] (图 1). E1 对整个 PDHc 反应活性起着至关重要的作用, 因此对 E1 活性的调节将直接影响到整个复合体催化的反应速率^[16]. 目前已有文献报道的丙酮酸脱氢酶系抑制剂大多是以 PDHc E1 为靶标所设计的 PDHc E1 抑制.

3 丙酮酸脱氢酶系抑制剂的设计与研究

早在 1958 年, Reiss 发现一些含砷化合物如亚砷酸盐^[17] 对丙酮酸脱氢酶系有抑制作用. 1981 年, Stevenson 和 Adamson 等人也报道了 H_2PhAsO 、 $\text{BrCH}_2\text{CONHPhAsO}$ ^[18-20] 也对丙酮酸脱氢酶系的抑制作用. 这些含砷化合物主要通过 PDHc 中的 E_2 或 E_3 的相关部位反应而对丙酮酸脱氢酶系产生抑制作用. 但这些含砷的化合物并非丙酮酸脱氢酶系的专一的抑制剂, 它对 α -酮戊二酸脱氢酶复合物的活性也有较大影响, 由于含砷化合物毒性很大, 因而不是理想的 PDHc 抑制剂. 此外, 某些铜试剂^[21]、汞试剂^[22]及乙醛^[23]也对丙酮酸脱氢酶有一定的抑制作用, 但抑制效果仍不佳. 纵观前人的研究结果, 虽然上述多种结构的化合物为丙酮酸脱氢酶系的弱抑制剂, 但许多有机磷化合物对丙酮酸脱氢酶系却显示了令人瞩目的抑制活性. 随着研究的深入, 有机磷化合物作为一类重要的 PDHc 抑制剂倍受许多研究者的关注, 由此, 多种结构类型的有机磷化合物作为潜在的 PDHc 抑制剂不断的被设计和合成. 从 PDHc 抑制剂的设计思路而言, 目前文献报道的含磷 PDHc 抑制剂的结构特点主要可以分为 3 类: 底物丙酮酸类似物、辅酶 ThDP 类似物、反应过渡态类似物. 早期的 PDHc 抑制剂的研究多集中于丙酮酸类似物的设计与合成, 近年来针对辅酶 ThDP、过渡态类似物的研究也逐渐增多. 20 世纪 90 年代之前, 有关丙酮酸脱氢酶系抑

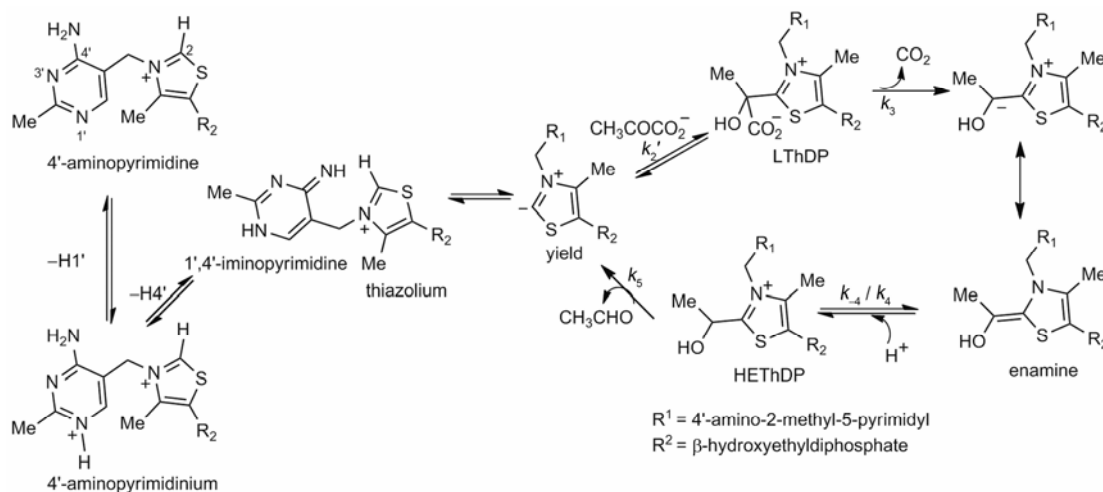


图 1 丙酮酸脱氢酶催化机理

制剂的设计与研究均为国外报道. 自 90 年代初期以来, 我们开展了含磷 PDHc 抑制剂的探索研究, 对丙酮酸含磷类似物的结构进行衍生与扩展, 重点对取代苯氧基乙酰氧基烷基磷酸酯类化合物进行了系统研究. 本文将对具有底物丙酮酸类似物、辅酶 ThDP 类似物、反应过渡态类似物结构特点的含磷 PDHc 抑制剂以及本课题组相关含磷 PDHc 抑制剂的研究进展分别总结如下.

3.1 丙酮酸含磷类似物

溴代丙酮酸^[24-26]和氟代丙酮酸^[27, 28]作为底物丙酮酸最直接的类似物, 早期曾有大量的研究报道. 研究表明溴代丙酮酸是大肠杆菌中 PDHc E₁ 的抑制剂, 它需要 ThDP 为辅因子, 且为底物丙酮酸的竞争性抑制剂. 在 ThDP 辅助下, 氟代丙酮酸在较低浓度下, 对大肠杆菌中 PDHc E₁ 和 PDHc 复合体都有明显的抑制作用, 且两者的反应速度没有很大差别. 但是这些卤代丙酮酸对 PDHc 的抑制速度较慢, 并非理想的抑制剂.

2-羰基化合物, 如乙醛酸^[12]、支链2-羰基酸^[29]等可以看作是丙酮酸的 α -H 被相关基团取代而生成的底物的类似物. 从1983年起, Kuo和 Jordon 研究组^[30-33], 对取代的 2-羰基丁烯酸、2-羰基丁炔酸和 2-羰基烷基酸系列化合物的合成及对 PDHc 的抑制作用进行了系统研究. 结果表明这些化合物对大肠杆菌中提取的 PDHc 具有抑制作用, 且证实此类化合物为 PDHc E₁ 的不可逆的抑制剂, 其抑制效果显著优于溴代丙酮酸和氟代丙酮酸.

查阅 PDHc 抑制剂的研究历程, 有的放矢地设计 PDHc 抑制剂的研究应由 Kluger (1977)和 Baillie (1988) 的工作所代表. 他们先后相隔十年的研究都表明, 丙酮酸的含磷类似物, 如烷基酰基磷酸酯或次磷酸酯可作为丙酮酸脱氢酶系专一有效的强抑制剂. 1977年, Kluger 和 Pike^[34]设计合成了 PDHc 的底物丙酮酸钠的类似物, 乙酰基磷酸甲酯单钠盐 **1** (图 2), 并从大肠杆菌中提取了粗的丙酮酸脱氢酶对其进行了动力学研究. 结果显示, 化合物 **1** 是一个较好的底物丙酮酸钠的竞争性可逆抑制剂, 其 $K_i = 0.05 \mu\text{M}$. 在正常代谢情况下, 丙酮酸与丙酮酸脱氢酶系 E₁ 上的 ThDP 连接, 由于 ThDP 中噻唑环中的 N 和 S 原子间的 C 原子上的 H 容易解离, 而使该 C 原子形成反应性很强的负碳离子, 该负碳离子亲核进攻丙酮酸

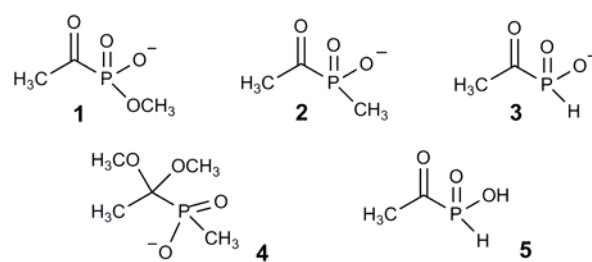


图2 含磷丙酮酸类似物

的羰基碳原子形成加成物 LThDP (图 1), 然后进行脱羧反应, 脱羧后形成 enamine (图 1). Kluger 等人的研究表明: 化合物 **1** 与丙酮酸竞争, 首先占有丙酮酸的位置与 ThDP 结合并反应, 形成与加成物 LThDP 类似的中间体, 但这一中间体却不能发生进一步的脱羧反应, 从而抑制了在 PDHc 催化下的脱羧反应, 破坏了正常的有氧代谢过程. 他们的研究工作确定了化合物 **1** 是 PDHc 的抑制剂, 初步探明了丙酮酸含磷类似物对 PDHc 产生抑制作用的机制, 为丙酮酸含磷类似物的进一步研究奠定了良好的实验基础. 与早期的报道的 PDHc 抑制剂的研究工作相比, Kluger 等人的研究工作使 PDHc 抑制剂的研究达到了根据生物化学的理由来进行分子设计与合成的新水平.

10 年之后, Baillie 等人基于对 PDHc 催化丙酮酸氧化脱羧转化成为乙酰辅酶 A 的关键代谢过程的理解, 在 Kluger 等人的工作基础上进一步优化设计了烷基酰基磷酸酯(盐)或次磷酸酯(盐)^[35]. 他们认为在酰基磷酸酯单钠盐的骨架中, 引入更小、电负性更弱的取代基代替甲氧基与磷原子相连, 则所得化合物的含磷部分与底物丙酮酸的羧基相似, 可能会提高化合物对酶的抑制活性和除草活性. 根据其设计思想, Baillie 等人合成了系列的烷基酰基磷酸酯(盐)或次磷酸酯(盐), 如图 2 所示的化合物 **2~5**, 并从豌豆中提取了 PDHc 酶, 测试了它们对 PDHc 酶的抑制活性及除草活性. 结果表明, 以甲基取代与磷原子相连的甲氧基后 (化合物 **2**), 化合物对丙酮酸脱氢酶的抑制活性及除草活性均显著提高, 如化合物 **1** 的 I_{50} 为 $70 \mu\text{M}$, 化合物 **2** 在 12 min 内其 $t_{1/2}$ 为 $10 \mu\text{M}$, 而且抑制类型也发生了变化, 化合物 **1** 为竞争性抑制剂, 化合物 **2** 为时间依赖性抑制剂, 同时化合物 **3** 与化合物 **2** 相比是一个更好的时间依赖性抑制剂, 其 $t_{1/2}$ 在 3 min 内为 $0.3 \mu\text{M}$, 实验结果与作者推测相符, 表明在

磷原子上引入更小、电负性更弱的取代基时, 将有利于提高化合物对 PDHc 酶的抑制活性. 室内生测结果表明: 此类 PDHc 抑制剂显示了不同程度的除草活性, 其中化合物 **4** 的除草活性最高, 推测其在植物体内水解为化合物 **2** 而发挥作用. Baillie 等人的生化研究也证明了正是由于这类底物的含磷类似物对丙酮酸脱氢酶系的强抑制作用而造成植物的死亡, 从而显示出引人注目的除草活性^[35]. 烷基酰基磷酸酯(盐)或次磷酸酯(盐)可作为 PDHc E₁ 的抑制剂, 其除草的作用机制可由图 3 所示的反应过程描述. 此类化合物可使植物死亡, 正是由于它们与 ThDP 作用, 抑制了 PDHc 催化下的脱羧反应, 破坏了植物体内有氧代谢的直接结果. Baillie 等人在 1994 年在美国华盛顿召开的第八届国际农药会议上也报告了这一重要结论^[36], 上述研究工作表明了丙酮酸脱氢酶系可以作为除草剂的作用靶标.

Baillie 等人进一步选择除草活性最高的化合物 **4** 进行了广泛的田间除草药效评价, 结果表明, 化合物 **4** 的活性与选择性达不到作为除草剂开发的要求, 因而尚未进入商品化开发. 虽然 Kluger 和 Baillie 等人有关 PDHc 抑制剂的研究并未成功地获得以丙酮酸脱氢酶系为靶标的商品化除草剂, 但此类丙酮酸含磷类似物的研究成为采用生物合理设计的方法获得 PDHc 抑制剂的一个典范. 所取得的研究结果也极大的鼓舞和支持了根据生物化学的理由进行农业化学分子设计必将成功的观点, 而且, 这种设计方法的学术价值和良好前景在农药界得到了高度的肯定和评价^[37, 38]. 随后先灵公司也有 PDHc 抑制剂的报道, 发现丙酮酸含磷类似物甲基乙酰基次磷酸具有除草活性^[39].

1990 年 Laber 等人深入研究了化合物 **5** 对大肠杆菌丙酮酸脱氢酶的抑制机理^[40]. 结果表明, 化合物

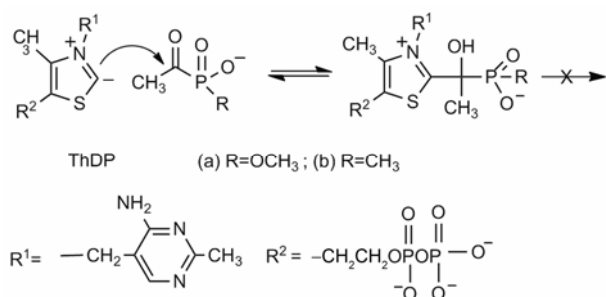


图 3 酰基磷酸酯(盐)或次磷酸酯(盐)除草作用机制

5 也是一种时间依赖性抑制剂, 反应起始时快速形成可逆的酶-抑制剂复合物 EI, 随后转变成紧密结合的复合物 EI*. 通过研究化合物 **5** 对丙酮酸脱氢酶复合物在 290 nm 处激发荧光的影响可验证由 EI 到 EI* 的缓慢转变过程. 而且所有的实验均表明化合物 **5** 与丙酮酸脱氢酶的相互作用所形成的产物与正常反应中底物丙酮酸与 ThDP 结合形成的中间体类似.

2006 年 Nemeria 等人首次报道了化合物 **2** 和 **3** 对人体丙酮酸脱氢酶的抑制活性^[41], 并与此类化合物对大肠杆菌的抑制活性进行了比较. 结果表明, 对两种不同生物体内的丙酮酸脱氢酶, 化合物 **3** 的活性均高于化合物 **2**, 两种抑制剂对酶均为可逆抑制, 且化合物 **3** 和化合物 **2** 的活性均比化合物 **1** 的活性高. 这与 1988 年 Baillie 等人报道的结果一致^[35]. 采用圆二色谱对抑制过程中所形成中间体的验证结果表明, 此类抑制剂与 ThDP 结合形成的中间体也类似于底物和 ThDP 形成的中间体.

上述研究说明, 在具有丙酮酸类似物结构的 PDHc 抑制剂中, 丙酮酸的含磷类似物是一类引人注目, 作用效果显著的 PDHc 抑制剂.

3.2 辅酶 ThDP 类似物

另一类 PDHc 抑制剂是辅酶 ThDP (图 4) 的类似物. ThDP 是一种辅酶, 在催化反应过程中有助于与羰基相连的 C-C 键的形成和断裂. 许多不同的酶如 PDC (pyruvate decarboxylase, EC 4.1.1.1), TK (transketolase, EC 2.2.1.1), PDHc 都需要 ThDP 作为催化反应的电子穴, 以烯胺中间体的形式稳定羰基碳. 因此通过设计合成 ThDP 类似物开展酶水平上的研究, 可以了解 ThDP 依赖型酶的复杂作用机理, 如酶和辅酶间的疏水作用如何稳定反应中间体, 以及辅酶在酶结合、催化中的作用, 这些重要的信息将有助于设计对靶酶具有高效、专一抑制活性的药物分子.

1983 年 Low 等人报道将 ThDP 中噻唑啉鎓离子还原成噻唑烷基而生成的化合物四氢 ThDP (图 5) 对 PDHc 具有一定抑制作用^[42]. 作者通过测定四氢

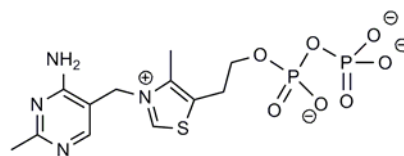
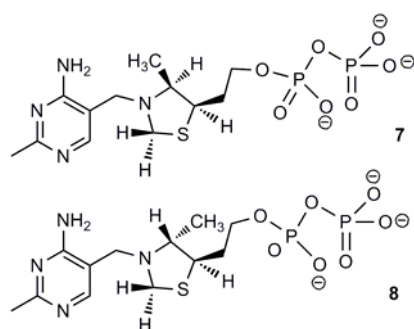


图 4 辅酶 ThDP 结构式

图5 *cis*-四氢 ThDP 7 及 *trans*-四氢 ThDP 8

ThDP 对大肠杆菌 PDHc 的抑制反应速率常数表明, *cis*-ThDP 7 的结合能力比 ThDP 强很多, 但是 *trans*-ThDP 8 的结合能力和 ThDP 差不多. 作者认为将 ThDP 还原成四氢 ThDP, 提高了分子中噻唑环的活性, 因而对 PDHc 具有较高的抑制作用.

2001 年 Nemeria 等人报道另一类 ThDP 类似物: 2-噻唑酮 ThDP 9 和 2-噻唑硫酮 ThDP 10^[43] (图 6). 由于这些化合物与 ThDP 类似, 因而有可能在生物体中代替 ThDP 和底物结合, 从而破坏正常的代谢过程. 与 PDHc 作用的生化实验表明, 2-噻唑酮 ThDP 9 和 2-噻唑硫酮 ThDP 10 显示出比 ThDP 更强的结合能力. 2004 年 Arjunan 等人^[44]又报道了抑制剂 9 与大肠杆菌的 PDHc 复合物的晶体结构. 从而进一步证实了抑制剂 9 可以在生物体内取代 ThDP 与 PDHc 酶结合, 破坏正常的代谢过程的观点.

2005 年 Leeper 等人报道了一种对 PDHc E1 酶具有高选择性、高抑制活性的抑制剂 deaza ThDP 11 (图 7), 其设计思想是将 ThDP 噻唑环上的 N 原子换成 C 原子形成新的 ThDP 类似物 deaza ThDP^[45]. 化合物 deaza ThDP 11 对 PDHc E1 显示出比 ThDP 更强的结合能力, 实验中测得该化合物与酶的速度常数比

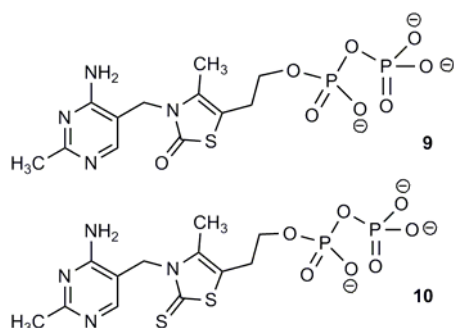


图6 含噻唑酮 9 和噻唑硫酮 10 的 ThDP 类似物

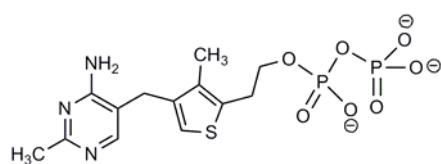


图7 deaza ThDP 11 结构式

ThDP 快 7 倍. 作者认为 deaza ThDP 对 PDHc E1 强的结合能力可归因于 deaza ThDP 的电荷状态. 其电荷从 +1 价到 0 价, 使酶活性位点的氨基酸与 deaza ThDP 间的疏水作用增强, 从而导致相应的结合作用增强.

合成高效 PDHc E1 抑制剂 deaza ThDP 具有一定的难度. 2007 年 Leeper 等人仅通过 4 步合成了三唑类 ThDP 类似物 12^[46], 与 deaza ThDP 相比, 尽管化合物 12 的抑制活性稍差, 但避免了合成 deaza ThDP 的困难. 在 ThDP 结构中焦磷酸部分与酶间的结合力最强 (焦磷酸基能与 Mg^{2+} 形成配位键^[47]). 但由于焦磷酸电荷高, 很难穿透细胞膜, 导致细胞对化合物的有效利用率差. 因此如果要设计合成以 ThDP 为先导的高效药物分子, 应考虑合成具有较低的电荷量但又与酶有高结合力的焦磷酸类似物. Leeper 等考察了具有不同焦磷酸基变化的 ThDP 类似物结构^[46] (图 8). 含亚甲基的焦磷酸类似物 13 和 14 的 K_i 值是焦磷酸取代基化合物 12 的 30~40 倍, 按化合物 13 和 14 至化合物 15、16、17、18 的次序, 它们与酶的亲和力依次降低. 化合物 18 与酶基本无结合力.

3.3 过渡态类似物

Pauling 在对酶催化机制的阐述中, 曾提出酶催化的过渡态理论, 他认为酶通过某种方式与高能, 短

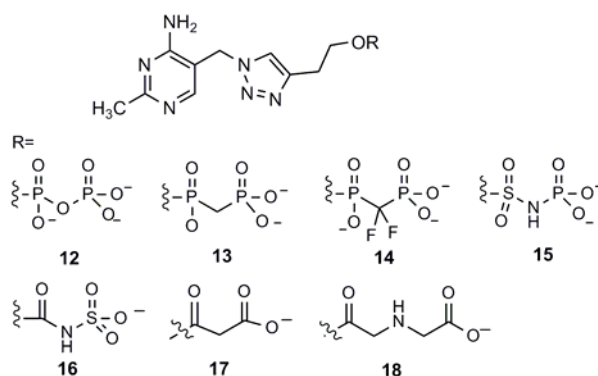


图8 不同焦磷酸基变化的 ThDP 类似物

寿命的过渡态结合而起催化作用, 在这个处于反应底物和产物之间的过渡态构型中, 某些键正在形成, 另一些键正在断裂. Jencks^[48]后来又进一步发展了 Pauling 的理论, 他认为在结构和电荷排列方面; 酶分子与它催化反应的过渡态是互补的, 即酶分子充当化学反应的模板, 使底物分子转变成新的构型——过渡态, 随着反应的进行, 能量平衡转向有利于能量较低的产物分子一边. 而过渡态不会回到底物分子. 在空间结构, 疏水性匹配和电子等因素上能够模拟一个酶催化反应过渡态的稳定化合物被称为过渡态类似物^[49]. 在酶催化的反应中, 一个很重要的特点是酶与反应过渡态的亲和能力远大于酶与底物或产物的亲和能力. 可以设想, 底物的过渡态类似物必然是一种很强的竞争性抑制剂, 分析和模拟酶催化反应过渡态的结构是设计获得靶标酶专一性抑制剂的有效途径^[50], 因此过渡态理论的提出和运用, 对于靶标酶的三维结构尚不清楚的情况下的生物合理设计, 提供了另一个有效的研究策略.

基于上述理论, 根据丙酮酸脱氢酶系催化反应过渡态的结构来设计过渡态的类似物也是获得 PDHc 专一性抑制剂的另一有效途径^[51], 值得积极探索. 图 1 表示了正常生物体内 ThDP 与丙酮酸的结合过程. 根据 Pauling 和 Jencks 对酶催化机制的阐述^[52], 图 1 中的过渡态产物, LThDP, enamine, HEThDP 的类似物都可能成为 PDHc 的抑制剂.

由前文所述, 2005 年 Leeper 等人报道的 PDHc E1 抑制剂 deaza ThDP **11** 在生物体内与底物丙酮酸结合的过程中具有比 TPP 更强的结合能力, 是由于 deaza

ThDP **11** 的电荷状态更接近于反应中的过渡态. Deaza ThDP **11** 与 PDHc E1 的相互作用可由图 9 描述^[45]. 首先, ThDP 的噻唑啉环上的 C(2) 去质子化, 形成叶立德 **h-2**, 叶立德 **h-2** 在丙酮酸中羰基的进攻下, 生成 α -乳酰基 ThDP **h-3**, 噻唑啉环的正电性加速了 α -乳酰基 ThDP **h-3** 的脱羧, 然后过渡态 **h-4** 在质子的作用下形成羟乙基 ThDP **h-5**, 羟乙基 ThDP **h-5** 再脱去乙醛重新生成 **h-2**.

由于 deaza ThDP 更易形成反应过渡态. 因此也更易与酶的活性位点结合. 该研究组培养了 deaza ThDP 与 PDH-deaza ThDP 共结晶的晶体. 结果表明, deaza ThDP 出现在活性位点上, 占据了正常情况下 ThDP 的结合位置.

根据 Pauling 和 Jencks 对酶催化机制的阐述^[52], 图 8 中过渡态 **h-2**, **h-3**, **h-4**, **h-5** 的类似物都可能成为 PDHc 的抑制剂. 由此, Leeper 等人^[53]除了合成 deaza ThDP 外, 还尝试合成了过渡态 **h-5** 的类似物 **19** 和 **20** (图 10). 对大肠杆菌 PDHc 的抑制实验显示, 化合物 **19** 和 **20** 具有和 deaza TPP 类似的抑制活性.

3.4 丙酮酸含磷类似物的衍生与扩展

我们注意到, 在上述国外有关 PDHc 抑制剂的研究报道中, 多数基于酶水平开展的研究是针对微生物 (如大肠杆菌) 中的丙酮酸脱氢酶系而进行. 而 Builie 等人对 PDHc 抑制剂的研究是基于高等植物 (如碗豆) 中的丙酮酸脱氢酶系开展的. 通过生化反应机理的研究证实了烷基酰基磷酸酯(盐)或次磷酸酯(盐)能使植物致死, 正是由于它们对丙酮酸脱氢酶系

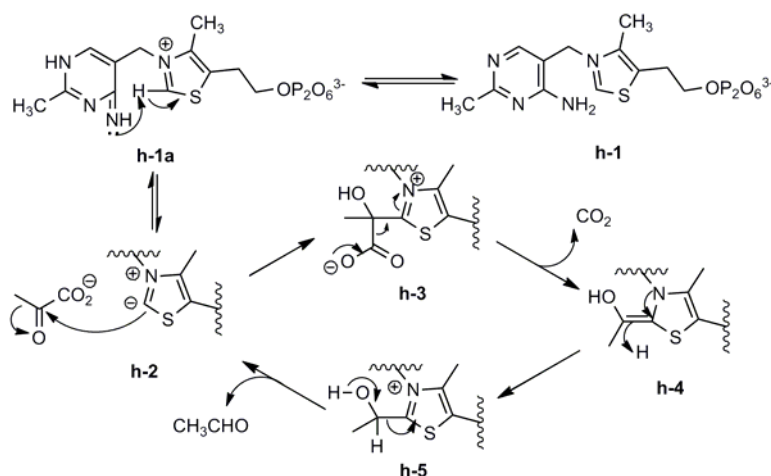


图 9 ThDP 与丙酮酸反应的过渡态

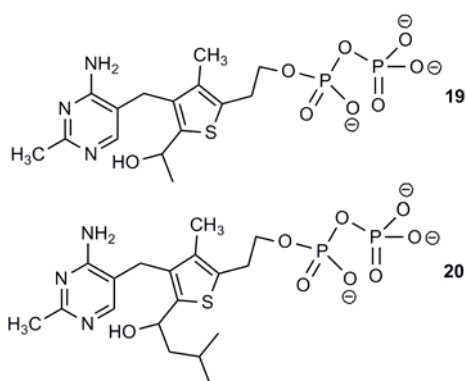


图 10 过渡态 h-5 类似物

抑制作用的直接结果^[36]. 其结果表明了丙酮酸脱氢酶系可以作为除草剂的作用靶标. 虽然他们设计的 PDHc 抑制剂作为除草剂未能进入商品化开发, 但其学术价值在农药界得到了高度的肯定和评价^[37, 38]. 同时对于我们的研究给予了很好的启示. 我们认为 PDHc 可作为一个商品化除草剂的潜在靶标进一步研究和开发^[54]. 这一研究对于新农药创制研究也将具有挑战性和理论价值.

面对我国农业现代化对环境友好除草剂的重大需求, 同时鉴于目前国内外未见有以 PDHc 为靶标的商品化除草剂, 20 世纪 90 年代以来, 我们选择以植物 PDHc 为靶标, 开展了除草剂分子设计、合成的探索性研究. 针对国外文献报道的 PDHc 抑制剂具有毒性高, 除草活性低, 选择性差的问题, 我们从靶标生物特异性及新先导结构发现的关键科学问题切入, 提出了设计 PDHc 抑制剂的新思路. 对文献报道的丙酮酸含磷类似物进行了衍生与扩展, 设计合成了既含有潜在的抑制 PDHc 的羧基磷酸酯结构单元 A, 同时又含有潜在的具有除草活性的芳(杂)氧羧酸结构单元 B 的新骨架 I: 我们设想当母体骨架 I 上取代基结构匹配时, 通过结构单元 A 和结构单元 B 的协同作用, 可以构建一类全新并具有更高除草活性的先导母体结构 (图 11).

由此我们合成了具有母体骨架 I 的十多个系列近千个不同的新型芳杂环氧基烷基磷酸衍生物^[55]. 并采用盆栽法系统测定了所有化合物对植物的抑制活性. 结果表明, 母体骨架中磷酸结构单元 A 保持不变时, 结构 B 的改变对其生物活性有显著的影响. 通过系统的研究和筛选, 从中发现具有结构通式 II 的二乙基 α -(取代苯氧乙酰氧基) 烷基磷酸酯在剂量为

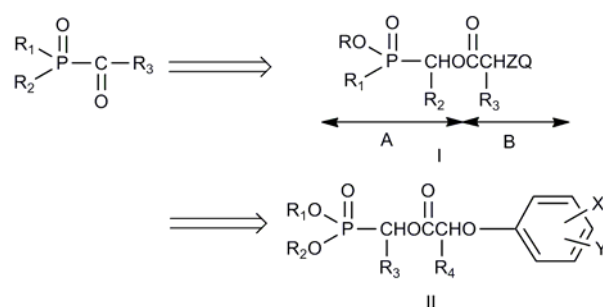


图 11 丙酮酸含磷类似物的衍生与扩展

2.5 kg/ha 的盆栽实验中, 对双子叶植物的抑制率大 100%, 显著高于其他系列化合物的除草活性^[55]. 其用量低于 Builie 等人报道的除草活性最高的 PDHc 抑制剂 4 (2.8 kg/ha) 的使用剂量, 可作为除草剂的先导体.

为了获得高效 PDHc 抑制剂或除草剂, 我们尝试通过基于 PDHc 的理论计算研究指导结果优化. 由于 PDHc 是一个十分复杂的多酶复合物, 至今尚无植物体 PDHc 晶体结构的报道. 但在 2002 与 2004 年分别已有大肠杆菌 PDHc E1 的晶体结构以及 E1 与相关抑制剂复合物结构测定的文献报道^[44, 56], 这一新的研究结果为我们开展基于 PDHc E1 分子设计的理论计算研究提供了必要的信息. 蛋白质环境下丙酮酸脱羧酶的催化反应机理的理论计算表明: 在该催化反应中最重要的两步是 LThDP 脱羧和噻唑环上的 C2 负离子的质子化, 如果 PDHc 抑制剂能有效抑制脱羧反应, 便可发挥高效作用^[57]. 我们根据第一步脱羧反应中酶与天然底物的反应特点, 以二乙基 α -(取代苯氧乙酰氧基) 烷基磷酸酯为先导进行结构修饰, 设计合成了多系列化合物 IIA~IIH^[58-67] (图 12)

研究发现当 II 中 6 个取代基 R^1, R^2, R^3, R^4, X, Y 的结构达到合理匹配时, 化合物可显示较高的除草活性. 证实了我们提出的通过结构 A 和结构 B 的协同作用, 可获得更高除草活性先导结构的设计思路. 并通过生化研究证明了此类化合物对丙酮酸脱氢酶系具有很强的抑制作用. 例如化合物 O-甲基- α -(2,4-二氯苯氧基乙酰氧基) 甲基磷酸酯单钠盐对植物体中的丙酮酸脱氢酶系的抑制活性 $I_{50} = 29.14 \mu\text{M}$ (*in vitro*)^[68]. 特别是发现化合物 II 的除草活性与酶抑制活性正相关. 高除草活性的化合物均显示了对植物 PDHc 的强抑制活性. 通过 Hansch Fujita QSAR 方法及 CoMFA 方法从二维及三维空间对化合物 II 进行定量构效关系的研究发现: 当 X、Y 占据苯环的 2, 4 位,

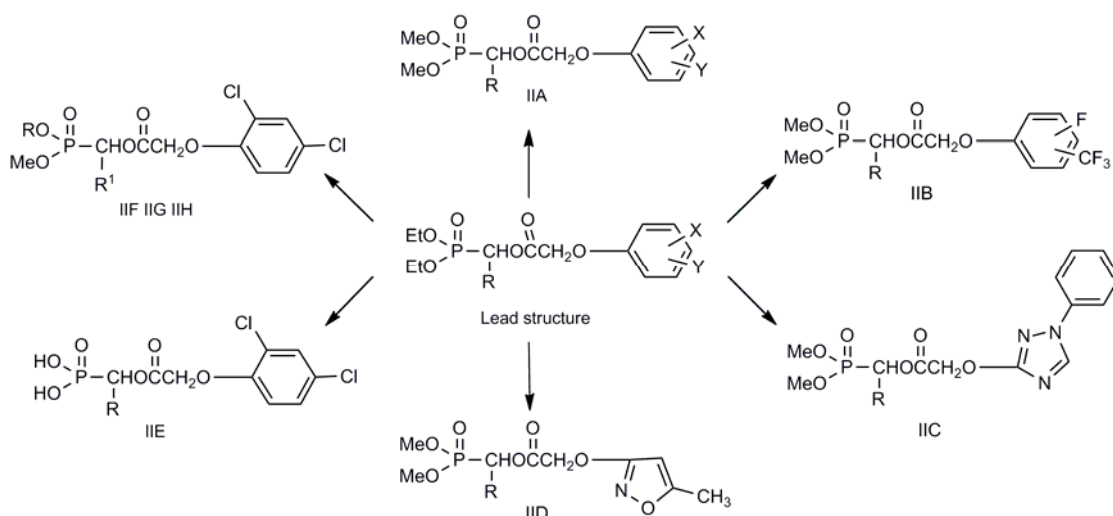


图 12 二乙基 α -(取代苯氧乙酰氧基)烷基膦酸酯的结构修饰

吸电性的适当增强有利于除草活性的提高; R^1 , R^2 , R^4 体积的增大, 使除草活性降低. 我们注意到在通式 II 中 R^1 和 R^2 的结构变化对除草活性的影响规律和 Baillie 等人的研究结果是一致的.

为了在分子水平上理解抑制剂与 PDHc E1 相互作用机制, 我们利用现代计算化学技术手段开展了辅酶 ThDP 与相关抑制剂与大肠杆菌 PDHc E1 的相互作用研究. 熊英等^[69]运用 MM-PBSA 理论计算的方法计算 PDHc E1 与配体 (图 13) 的结合自由能, 以此了解抑制剂与靶标之间的微观结构信息. 所计算的结合自由能由高到低的顺序是 ThDP > ThTDP > ThTTDP > PLThDP, 与实验所测数据相符. 计算结果与实验值良好的吻合表明本计算方法对设计新型 PDHc E1 抑制剂有重要价值.

我们通过分子对接和三维定量构效关系方法研究了取代苯氧乙酰氧基烷基膦酸酯类化合物 II 与 PDHc E1 的作用模式 (图 14). CoMSIA 分析表明化合物的静电作用和疏水作用是影响除草活性的主要因素. 化合物 II 与 *E. coli* PDHc E1 进行对接的研究^[70]表明: 在母体结构 II 的苯环上 2, 4 位具有吸电子取代基时, 将有利于与 2, 4 位附近具有正电性的组氨酸残基 His106, His640 的静电相互作用, 而且 2, 4 位上取代基合适的大小对抑制剂与靶酶的相互作用也是至关重要的. 分子对接的结果表明化合物在结合部位所应满足的空间和静电要求与 CoMFA 和 CoMSIA 分析的结果一致.

上述研究表明取代苯氧基乙酰氧基烷基膦酸酯

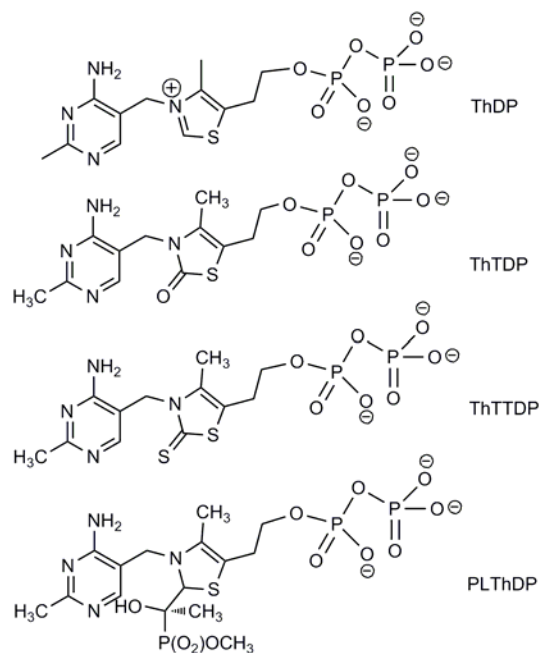


图 13 配体 ThDP、ThTDP、ThTTDP、PLThDP 结构式

II 为一类新型的 PDHc 抑制剂, 是一类具有潜在除草活性和研究价值的化合物, 此类结构的特点在于: 分子中的结构 A 和 B 是通过羧酸酯键有机组合, 在环境中将易于降解. 在结构 II 中含有 6 个可变化的取代基, 从而具有较大的结构变化空间. 由此我们可预测通过 II 的结构优化, 有可能获得高活性、低残留的新型 PDHc 抑制剂或除草剂.

通过优化结构 II 中的 6 个取代基, 我们获得了

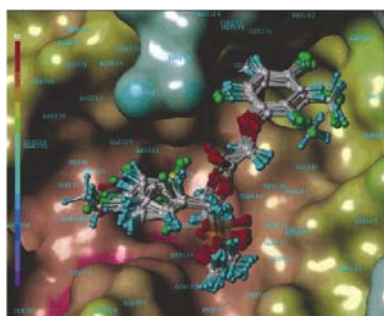


图 14 化合物在 PDHc E1 活性部位的可能结合构象

一批具有较高除草活性的化合物. 为了评价此类化合物作为除草剂的可能性, 我们选择其中除草活性较高的化合物 HW02, *O,O*-二甲基-1-(2,4-二氯苯氧乙酰氧基) 乙基膦酸酯进行了深入研究与开发. 研究表明: HW02 为 PDHc 竞争性抑制剂, 对双子叶植物绿豆与豌豆的 PDHc 具有强抑制作用, 而对水稻的 PDHc 具有弱抑制作用. 它对单、双子叶植物 PDHc 酶的选择性与它在田间除草的选择性完全一致. 国外报道的 PDHc 抑制剂中, 除草活性最高的化合物 **4** 在 2.8 kg/ha 剂量下, 苗后除草活性抑制率可达 80%~100%, 但对作物有药害, 因而未能满足商品化除草剂的要求. 而通过对丙酮酸含磷类似物的结构优化所获得的 HW02 的选择性和除草活性均显著高于文献报道的烷基酰基膦酸酯类化合物 **4**, 并且对作物安全. 多项田间除草试验表明, HW02 为内吸、速效型茎叶处理除草剂, 对禾本科作物与阔叶杂草具有较高的选择性. HW02 在使用剂量为 0.15~0.45 kg/ha 时, 苗后除草活性便可达 80%~100%. 一次施药基本能控制田间作物全生育期阔叶杂草危害.

此外, HW02 对温血动物和植物中的靶标酶具有很好的选择性, 对温血动物及水生生物低毒, 对生态环境中的蜂、鸟、鱼、蚕安全, 在收获期玉米籽粒和土壤中的残留量均低于检出极限, 说明 HW02 具有高效、低毒、选择性高、易降解的特点, 显示出很好的安全性和环境相容性. 证实了分子设计思想的合理性. HW02 作为可用于防治阔叶杂草的除草剂新品种, 于 2007 年获得了国家农业部新农药临时登记证 (商品名: 氯酰草膦).

4 展望

随着科学的发展, 农药分子设计已经从传统的随机筛选发展到了基于靶酶的合理生物设计. 同样随着研究的深入, PDHc 抑制剂的发现已从最初传统的随机筛选发展到了 Baillie 等人基于酶化学机制的分子合理设计. 长期以来, 由于缺乏完整的生物体丙酮酸脱氢酶系的三维结构的数据, 人们难以开展在蛋白质三维结构水平上的分子设计.

近十多年来, 关于丙酮酸脱氢酶系的晶体结构研究获得了显著进展. 如从酿酒酵母 (*brewer's yeast Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*)^[71]和运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)^[72]中分离的丙酮酸脱氢酶 (E. C. 4.1.1.1) 晶体结构已有相关报道(P. Arjunan, 1996; U. Neveling, 1998). 2001 年 Kleiger 研究组报道了 *Pyrobaculum aerophilum* 中丙酮酸脱氢酶 E₁ β亚基的晶体结构^[73]. 一年后, Arjunan 等人首次报道了 1.85 Å 分辨率下大肠杆菌 *Escherichia coli* 中的 E₁α₂ 同型二聚体的 E₁p 亚基结构^[56]. 2004 年又进一步测定了大肠杆菌 PDHc E1 与抑制剂复合物结构^[44].

随着生物体内丙酮酸脱氢酶系的三维结构的数据的不断完善, 使我们有可能在分子水平上理解抑制剂与 PDHc 相互作用机制, 并借助现代计算化学技术手段开展基于 PDHc 的生物合理分子设计. 目前已取得的 PDHc 抑制剂的研究进展, 将鼓舞着我们进一步开展基于有害生物体中 PDHc 抑制剂的设计、研究与开发.

综上所述, 多年来的研究虽使人们对丙酮酸脱氢酶系的结构、抑制剂在生物体内的作用机制以及抑制剂构效关系有了初步的认识, 但由于丙酮酸脱氢酶系是一个复杂的多酶体系, 仍有许多鲜为人知的奥妙需要探索. 我们认识到: 在 PDHc 抑制剂的研究中, 相关分子生物学的深入研究, 抑制剂筛选方法的建立以及现代计算机辅助药物分子设计手段的利用, 对于设计结构新颖、高效 PDHc 抑制剂都是至关重要的.

随着科学技术的进步, 分子生物学等相关学科的发展以及各种生化作用机制的进一步阐明, 将为 PDHc 的研究提供更广阔的前景, 相信不久的将来, 将会获得更多结构新颖、作用机制独特、具有商品化潜力的丙酮酸脱氢酶系抑制剂.

致谢 本工作得到国家重点基础研究发展规划项目-973 计划 (2003CB114400, 2010CB126100), 国家十一五科技支撑计划课题(2006BAE01A04-07), 国家自然科学基金项目(20372023, 20772042) 资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Killengerg-Jabs M, König S, Hohmann S, Hübner G. Purification and characterisation of the pyruvate decarboxylase, from a haploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1996, 377: 313—317
- 2 Krieger F, Spinka M, Golbik R, Hübner G, König S. Pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. An enzyme with extraordinary substrate activation behaviour. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3256—3263
- 3 Wang QH, He P, Lu DG, Shen A, Jiang N. Purification, characterization, cloning and expression of pyruvate decarboxylase from *Torulopsis glabrata* IFO005. *J Biochem*, 2004, 136: 447—455
- 4 König S. Subunit structure, function and organization of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1385: 271—286
- 5 Miczka G, Vernau J, Kula MR, Hofmann B, Schomburg D. Purification and primary structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, 15: 192—206
- 6 Lowe SE, Zeikus JG. Purification and characterization of pyruvate decarboxylase from *Sarcina ventriculi*. *J Gen Microbiol*, 1992, 138: 803—807
- 7 Zehender H, Trescher D, Ullrich J. Improved purification of pyruvate decarboxylase from wheat germ. Its partial characterisation and comparison with the yeast enzyme. *Eur J Biochem*, 1987, 167: 149—154
- 8 Rivoal J, Ricard B, Pradet A. Purification and partial characterization of pyruvate decarboxylase from *Oryza sativa* L. *Eur J Biochem*, 1990, 194: 791—797
- 9 Mücke U, König S, Hübner G. Purification and characterization of pyruvate decarboxylase from pea seeds (*Pisum sativum* cv. Miko). *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995, 116: 1443—1450
- 10 Thelen JJ, Miernyk JA, Randall DD. Partial purification and characterization of the maize mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1443—1450
- 11 Reed LJ. Multienzyme complex. *Acc Chem Res*, 1974, 7: 40—46
- 12 Saumweber H, Binder R, Bisswanger H. Pyruvate dehydrogenase component of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*, purification and characterization. *Eur J Biochem*, 1981, 114: 407—411
- 13 Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J*, 1990, 4: 3224—3233
- 14 Seifert F, Ciszak E, Korotchkina L, Golbik R, Spinka M, Dominiak P, Sidhu S, Brauer J, Patel MS, Tittmann K. Phosphorylation of serine 264 impedes active site accessibility in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Biochemistry*, 2007, 46: 6277—6287
- 15 Nemeria N, Baykal A, Joseph E, Zhang S, Yan Y, Furey W, Jordan F. Tetrahedral intermediates in thiamin diphosphate-dependent decarboxylations exist as a 1',4'-imino tautomeric form of the coenzyme, unlike the Michaelis complex or the free coenzyme. *Biochemistry*, 2004, 43: 6565—6575
- 16 de-Kok A, Hengeveld AF, Martin A, Westphal AH. The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from gram-negative bacteria. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1385: 353—366
- 17 Reiss OK. Pyruvate metabolism II. Restoration of pyruvate utilization in heart sarcosomes by α -(+)-lipoic acid. *J Biol Chem*, 1958, 233: 789
- 18 Stevenson KJ, Hale G, Perham RN. Inhibition of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli* with mono- and bifunctional arsenoxides. *Biochemistry*, 1978, 17: 2189—2192
- 19 Adamson SR, Stevenson KJ. Inhibition of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli* with a bifunctional arsenoxide: Selective inactivation of lipoamide dehydrogenase? *Biochemistry*, 1981, 20: 3418—3424
- 20 Adamson SR, James A, Robinson JA, Stevenson KJ. Inhibition of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli* with a radiolabeled bifunctional arsenoxide: Evidence for an essential histidine residue at the active site of lipoamide dehydrogenase? *Biochemistry*, 1984, 23: 1269—1274
- 21 Corbett JR, Wright K, Baillie AC. *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. 2nd ed, Chap. 1. New York/London: Academic Press, 1984
- 22 Schwartz ER, Reed LJ. α -Keto acid dehydrogenase complexes XIII. Reactions of sulfhydryl group in pyruvate dehydrogenase with organic mercurials. *J Biol Chem*, 1970, 245: 183—187
- 23 Harda ML, Rahab S, Spinoc M, Robinson BH, Korena G. Impairment of pyruvate dehydrogenase activity by acetaldehyde. *Alcohol*, 2001, 25: 1—8
- 24 Apfel MA, Ikeda BH, Speckhard DC, Freyp PA. *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex, thiamine pyrophosphate-dependent inactivation by 3-bromopyruvate. *J Biol Chem*, 1984, 259: 2905—2909

- 25 Maldonado ME, Oh KJ, Frey PA. Studies on *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex. I. Effect of bromopyruvate on the catalytic activities of the complex. *J Biol Chem*, 1972, 247: 2711—2716
- 26 Lowe PN, Perham RN. Bromopyruvate as an active-site-directed inhibitor of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1984, 23: 91—97
- 27 Bisswanger H. Fluoropyruvate: A potent inhibitor of the bacterial and the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, 95: 513—519
- 28 Flournoy DS, Frey PA. Inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* by fluoropyruvate. *Biochemistry*, 1989, 28: 9594—9602
- 29 Jackson RH, Singer TP. Inactivation of the 2-ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes of beef heart by branched chain keto acids. *J Biol Chem*, 1983, 258: 1857—1865
- 30 Kuo DJ, Jordon F. Active site directed irreversible inactivation of brewers' yeast pyruvate decarboxylase by the conjugated substrate analogus (*E*)-4-(4-chlorophenyl)-2-oxo-3-butenic substrate? *Biochemistry*, 1983, 22: 3735—3740
- 31 Annan N, Paris R, Jordon F. (*E*)-4-(α -Halo-*p*-tolyl)-2-oxo-3-butenic acids inhibit yeast pyruvate decarboxylase by a diversity of mechanisms: Multiple fate for the thiamin-bound enamine intermediate. *J Am Chem Soc*, 1989, 111: 8895—8901
- 32 Chiu CC, Jordon F. Novel synthesis of 2-oxo-4-phenyl-3-butylnic acids, a new inhibitor of alternative substrate of pyruvate decarboxylase. *J Org Chem*, 1994, 59: 5763—5766
- 33 Brown A, Nemeria N, Yi J, Zhang D, Jordon WB, Machado RS, Guest JR, Jordon F. 2-oxo-3-alkynoic acids, universal mechanism-based inactivation of thiamine diphosphate-dependent decarboxylase: Synthesis and evidence for potent inactivation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Biochemistry*, 1997, 36: 8071—8081
- 34 Kluger R, Pike DC. Active site generated analogues of reactive intermediates in enzymic reactions. Potent inhibition of pyruvate dehydrogenase by a phosphonate analogue of pyruvate. *J Am Chem Soc*, 1977, 13: 4504—4506
- 35 Baillie AC, Wright K, Wright BJ, Earnshaw CG. Inhibitors of pyruvate dehydrogenase as herbicides. *Pest Biochem Phys*, 1988, 30: 103—112
- 36 张一宾编译, 世界新农药开发动向(上). 农药译丛, 1995, 17: 1—12
- 37 Evans DA, Lawson KR. Crop protection chemicals-research and development perspectives and opportunities. *Pesticide Outlook*, 1992, 3: 10—17
- 38 Eto M. Functions of phosphorus moiety in agrochemical molecules. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 61(1): 1—11
- 39 周卫平编译, 生物化学在农药研究开发中的涵义. 农药译丛, 1999, 21: 34—37
- 40 Schonbrunn-Hanebeck E, Laber B, Amrhein N. Slow-binding inhibition of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by acetylphosphinate. *Biochemistry*, 1990, 29: 4880—4885
- 41 Nemeria NS, Korotchkina LG, Chakraborty S, Patel MS, Jordan F. Acetylphosphinate is the most potent mechanism-based substrate-like inhibitor of both the human and *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase components of the pyruvate dehydrogenase complex. *Bioorg Chem*, 2006, 34: 362—379
- 42 Lowe PN, Leeper FJ, Perham RN. Stereoisomers of tetrahydrothiamin pyrophosphate, potent inhibitors of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*? *Biochemistry*, 1983, 22: 150—157
- 43 Nemeria N, Yan Y, Zhang Z, Brown AM, Arjunan P, Furey W, Guest JR, Jordan F. Inhibition of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex E1 subunit and its tyrosine 177 variants by thiamin 2-thiazolone and thiamin 2-thiothiazolone diphosphates. *J Biol Chem*, 2001, 276: 45969—45978
- 44 Arjunan P, Chandrasekhar K, Sax M, Brunskill A, Nemeria N, Jordan F, Furey W. Structural determinants of enzyme binding affinity: The E1 component of pyruvate dehydrogenase from *Escherichia coli* in complex with the inhibitor thiamin thiazolone diphosphate. *Biochemistry*, 2004, 43: 2405—2411
- 45 Leeper FJ, Hawksley D, Mann S, Melero CP, Wood MDH. Studies on thiamine diphosphate-dependent enzyme. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 772—775
- 46 Erixon K, Dabalos C, Leeper F. Inhibition of pyruvate decarboxylase from *Z. mobilis* by novel analogues of thiamin pyrophosphate: Investigating pyrophosphate mimics. *Chem Commun*, 2007, 9: 960—962
- 47 Schellenberger A. The structure and mechanism of the active centre of yeast pyruvate decarboxylase. *Angew Chem Int Ed*, 1967, 6: 1024—1035
- 48 Jencks WP. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. New York: McGraw-Hill, 1969
- 49 马军安, 黄润秋, 杨华铮. 酶催化过渡态理论在药物分子设计中的应用. 合成化学, 2000, 8(6): 479—484

- 50 Ssucking CJ. *Enzyme Chemistry: Impact and Applications*. Chapman and Hall, 1984
- 51 Gutowski JA, Lienhard GE. Transition-state analogs for thiamin pyrophosphate-dependent enzymes. *J Biol Chem*, 1976, 251: 2863—2866
- 52 廖桂红, 贺红武. 正碳离子样的过渡态类似物研究进展. 化学进展, 2005, 17: 1048—1053
- 53 Versees W, Spaepen S, Wood MD, Leeper FJ, Vanderleyden J, Steyaert J. Molecular mechanism of allosteric substrate activation in a thiamine diphosphate-dependent decarboxylase. *J Biol Chem*, 2007, 282: 35269—35278
- 54 王涛, 贺红武, 袁均林. 丙酮酸脱氢酶系: 除草剂品种新靶标. 应用化学, 2003, 20: 613—617
- 55 贺红武, 刘钊杰. 具有除草活性 α -氧代磷酸衍生物研究进展. 有机化学, 2001, 21: 878—883
- 56 Arjunan P, Nemeria N, Brunskill A, Chandrasekhar K, Sax M, Yan Y, Jordan F, Guest JR, Furey W. Structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 component from *Echerichia coli* at 1.85 Å resolution. *Biochemistry*, 2002, 41: 5213—5221
- 57 Wang JY, Dong H, Li SH, He HW. Theoretical study toward understanding the catalytic mechanism of pyruvate decarboxylase. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 18664—18672
- 58 贺红武, 刘钊杰, 汪军. α -[2-(2, 4-二氯苯氧基)丙酰氧基]芳基磷酸酯的合成与生物活性. 应用化学, 1998, 15(3): 88—90
- 59 Wang T, He HW. Simple and improved preparation of oxophosphonate monolithium salts. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem*, 2004, 179: 2081—2089
- 60 He HW, Liu XF, Hu LM, Wang SQ, Liu ZJ. Synthesis and dealkylation of 1-(dichlorophenoxyacetoxy)alkylphosphonate. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem*, 1999, 144-146: 633—636
- 61 He HW, Mong LP, Hu LM, Liu ZJ. Synthesis and plant growth regulatory activity of 1-(1-phenyl-1,2,4-trizole-3-oxo acetoxy)alkylphosphonates. 农药学报, 2002, 4: 14—18
- 62 He, HW Li MQ, Lu AH, Liu ZJ. Synthesis and biological activity of methyl 1-(5-methyl isoxazol-3-oxy acetoxy)alkyl methyl phosphinates. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem*, 2002, 177: 1651—1655
- 63 Wang T, He HW. An efficient synthesis of α -(2,4-dichlorophenoxyacetoxy)aryl methyl phosphonate monosodium salts. *Synth Commun*, 2004, 34: 1415—1423
- 64 He HW, Wang T, Yuan JL. Synthesis and herbicidal activities of methyl 1-(2,4-dichlorophenoxyacetoxy)alkyl phosphonate monosalts. *J Organomet Chem*, 2005, 690: 2608—2613
- 65 He HW, Chen T, Li YJ. Synthesis and herbicidal activity of alkyl 1-(3'-trifluoromethylphenoxyacetoxy)-1-substituted methylphosphonates. *J Pestic Chem*, 2007, 32: 42—44
- 66 Chen T, Shen P, Li YJ, He HW. Synthesis and herbicidal activity of *O,O*-dialkyl phenoxyacetoxyalkyl phosphonates containing fluorine. *J Fluorine Chem*, 2006, 127(2): 291—295
- 67 Chen T, Shen P, Li YJ, He HW. The synthesis and herbicidal evaluation of fluorine-containing phenoxyacetoxy alkylphosphonate derivatives. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem*, 2006, 181(9): 2135—2145
- 68 谭宏亮, 袁均林, 贺红武, 王涛. 磷酸酯单钠盐对丙酮酸脱氢酶活性的影响. 化学与生物工程, 2005, 6: 4—5
- 69 Xiong Y, Li YJ, He HW, Zhan CG. Theoretical calulation of the binding free energies for pyruvate dehydrogenase E1 binding with ligands. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 5186—5190
- 70 Peng H, Wang T, Xie P, Chen T, He HW, Wan J. Molecular docking and three-dimensional quantitative structure-activity relationship studies on the binding modes of herbicidal 1-(substituted phenoxyacetoxy)alkyl phosphonates to the E1 component of pyruvate dehydrogenase. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 1871—1880
- 71 Arjunan P, Umland T, Dyda F, Swaminathan S, Furey W, Sax M, Farrenkopf B, Gao Y, Zhang D, Jordan F. Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, 1996, 256: 590—600
- 72 Neveling U, Klasen R, Meyer SB, Sahm H. Purification of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *zymomonas mobilis* and identification and sequence analysis of the corresponding genes. *J Bacteriol*, 1998, 180: 1540—1548
- 73 Kleiger G, Perry J, Eisenberg D. 3D structure and significance of G Helix packing motif in tetramers of the E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase from the *Archeon Pyrobaculum aerophilum*. *Biochemistry*, 2001, 40: 14484—14492

Progresses in research of phosphorus-containing PDHc inhibitors

HE HongWu, HE JunBo, CHEN Ting, TAO RuiJuan & LI Jing

Key Laboratory of Pesticide and Chemistry Biology, Ministry of Education; College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract: The pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) is one of the most important oxidoreductase in organism. It catalyzes the oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl CoA which is a pivotal process in cellular metabolism and plays a great significance in the biochemical study. So the pyruvate dehydrogenase complex is of interest and worthy of approach from the point of view of agrochemical biorational design. A lot of organophosphorus compounds have been demonstrated as a kind of inhibitor of PDHc. This review focus on the study of history and research progress of phosphorus-containing PDHc inhibitors including the work in our laboratory. The trend on the research and the development of PDHc inhibitors as agrochemical are summarized and discussed.

Keyword: pyruvate dehydrogenase complex, inhibitor, biorational design, organophosphorus compounds