

综合评述

丙酮酸脱氢酶系: 除草剂品种的新靶标

王 涛 贺红武*

袁均林

(华中师范大学农药化学研究所 武汉 430079)

(华中师范大学生命科学院 武汉)

摘 要 介绍了丙酮酸脱氢酶系(PDH)靶酶的特性与作用机制,概述了有关 PDH 抑制剂的研究动态以及相关的重要研究结论,并简要介绍了本实验室的工作进展:利用生化推理的方法设计新型丙酮酸脱氢酶系抑制剂,发现了以丙酮酸脱氢酶系为靶标的先导体—— α -(取代苯氧乙酰氧基)烷基膦酸酯;研究证明了该类化合物为丙酮酸脱氢酶系的强抑制剂,并具有良好的除草活性。

关键词 丙酮酸脱氢酶系抑制剂,靶标,除草剂,综述

中图分类号: O627.51

文献标识码: A

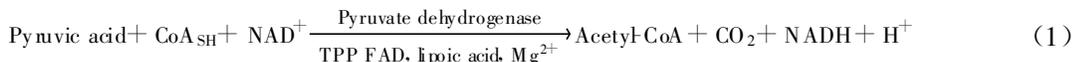
文章编号: 1000-0518(2003)07-0613-05

目前在世界上已开发应用的数百种不同结构的商品化除草剂按其作用方式,仅可归纳为 15 类,其作用靶标不足 20 种。采用传统的类同合成方法以及选择已知的除草剂靶标酶进行新型除草剂的设计合成,虽然可以获得大量具有生物活性结构新型的化合物,但其作用靶位仍局限于已商品化的除草剂作用靶标上。值得注意的是这种有限靶位除草剂的多次重复作用使得抗性杂草迅速增多。而采用靶标相同或近似的除草剂轮换使用,则使杂草抗性更为严重。显然,只有轮换使用不同作用靶标的除草剂才能预防和解决杂草抗性^[1]。因此,如何开发出更多的具有新靶标酶的商品化除草剂已成为当前的一个重要课题。

丙酮酸脱氢酶系是一个具有开发农药新产品意义的的作用靶标,但目前尚无以它为靶标的商品化除草剂。为了探索和开发具有新结构、新靶标的除草剂,丙酮酸脱氢酶抑制剂的设计和研发已成为十分活跃的研究领域^[2~4]。

1 靶酶 PDH 的特性与作用机制

丙酮酸氧化脱羧转化为乙酰辅酶 A(乙酰 CoA)是植物体内的关键代谢过程,是有氧代谢的关键环节,必须在丙酮酸脱氢酶系的催化下才能进行。因此,丙酮酸脱氢酶系是一个值得探索的除草剂作用靶标。丙酮酸脱氢酶系是一个多酶体系,其中包括丙酮酸脱羧酶(E_1)、二氢硫辛酸乙酰转移酶(E_2)和二氢硫辛酸脱氢酶(E_3)这 3 种不同的酶及焦磷酸硫胺素(TPP)、硫辛酸、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)、辅酶 A($CoASH$)和 Mg^{2+} 6 种辅助因子^[5]。在丙酮酸脱氢酶系的催化下,丙酮酸氧化脱羧形成乙酰 CoA 的反应是在真核细胞的线粒体基质中进行的。其总反应和催化过程分别示于式(1)和式(2)。



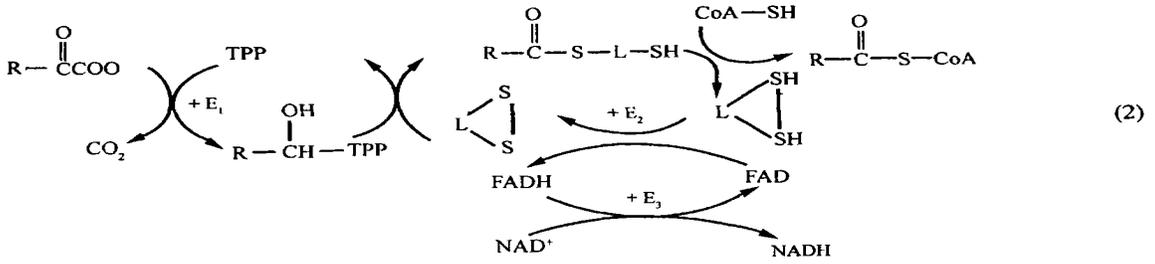
2 PDH 抑制剂研究进展

人们早已发现一些含砷含铜的农药以及某些杀菌剂都可以抑制丙酮酸脱氢酶系。1958 年 Reiss 发现^[6]亚砷酸盐在只有丙酮酸和辅酶 A 存在下会使丙酮酸脱氢酶系失活。原因是二氢硫辛酸与亚砷酸盐作用形成环状硫代亚砷酸盐。随后发现含砷系列化合物可用于杀虫和除草,如:三氧化砷(As_2O_3)、巴黎

2002-10-15 收稿, 2003-04-14 修回

国家自然科学基金(20072008)和教育部重点及骨干教师(214607, 230532)资助项目

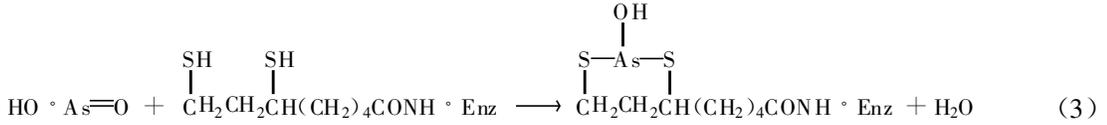
通讯联系人: 贺红武, 女, 1953 年生, 教授, 博士生导师; E-mail: hel208@public.wh.hb.cn; 研究方向: 农药化学



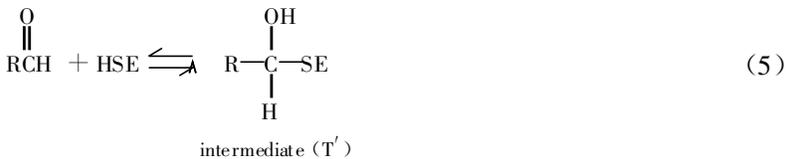
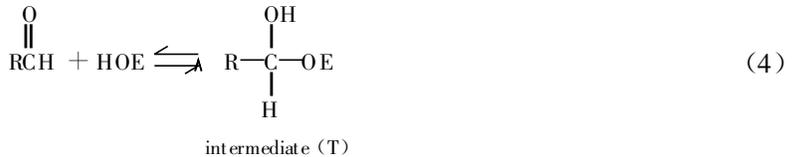
Pyruvate oxidative decarboxylation reaction^[5]

L: lipoic-acetyl; Enzymes: Pyruvate decarboxylase(E₁), dihydrolipoic acid acetylase(E₂), dihydrolipoic acid dehydrogenase(E₃); Cofactor: TPP; CoA_{SH}, FAD⁺, NAD⁺, lipoic acid, Mg²⁺

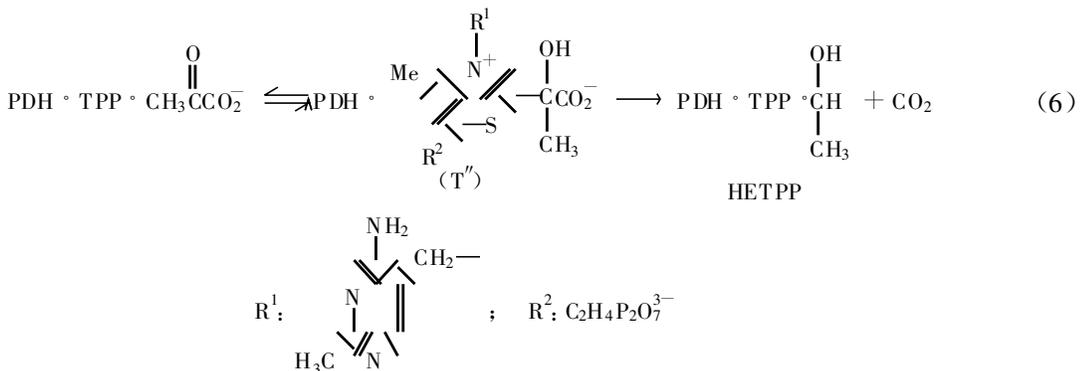
绿[(MeCOO)₂Cu·3Cu(AsO₂)₂]、亚砷酸钠、砷酸钙[(3Ca₃(AsO₄)₂·Ca(OH)₂)、砷酸氢铅(PbHAsO₄)、甲基砷酸(盐)[MeAsO(OH)₂, MeAsO(OH)·ONa]和二甲次砷酸(Me₂AsO·OH)。一般认为亚砷酸盐(HO·As=O)通过与二氢硫辛酰胺转乙酰酶中的硫辛酰胺组成上的双硫羟基结合而抑制酮酸氧化。可能的作用机理如反应式(3)所示:



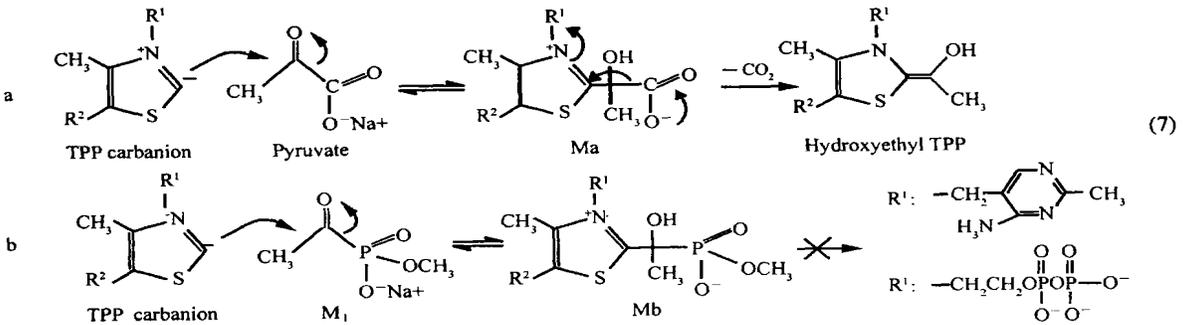
Corbett等^[7]报道二烷基二硫代氨基甲酸铜盐对丙酮酸脱氢酶系也具有抑制作用。Schwarta等^[8]和Maldonado等^[9]先后发现银化合物和溴代丙酮酸酯能使丙酮酸脱氢酶系失活。然而这些含砷等农药和载铜杀菌剂(如二烷基二硫代氨基甲酸铜盐)等并不是理想的抑制剂^[7]。因为这几类农药对相关的酶(如2-氧代戊二酶脱氢酶)活性也有较大影响,而抑制活性又不高,并且有的毒性较大,因而未商品化或推广应用。Westerik等^[10]和Thompson^[11]发展了一种形成特殊共价中间体方法,并由肽底物醛的类似物对木瓜蛋白酶和胰肽酶E具有强抑制性而得到确证,肽在催化步骤中正常裂分,并遵循酶上的羟基或巯基加成到羰基部位的规律,分别产生一假定的四面体中间体(T)和(T')



Kluger等^[12]用这种方法首先对从大肠杆菌中提取的丙酮酸脱氢酶系E₁进行了研究,证实了反应式(6)中的反应中间体T''的存在。



在这一过程中丙酮酸与丙酮酸脱羧酶 E₁ 上的 TPP 连接, TPP 的关键结构是噻唑环中 N 和 S 原子之间的 C 原子上的 H 比大多数 =CH— 基的 H 更容易解离, 使该 C 原子形成反应性很强的负碳离子, 因而可亲核攻击丙酮酸的羧基碳原子 (δ⁺) 形成加成物 M_a, TPP 噻唑环上的 N 带正电, 可作为电子穴, 使脱羧作用容易进行, 脱羧后产生羟乙基 TPP (见式 (7a))。Kluger 等^[12] 据此设计合成了丙酮酸脱氢酶系底物的类似物——甲基乙酰基磷酸钠盐 (M₁), 并研究了 M₁ 对 PDH 的抑制作用。其研究表明, M₁ 为丙酮酸脱氢酶系强有力的竞争性抑制剂; TPP 与 M₁ 慢慢结合, 因酶的活性存在, 这种抑制作用是可逆的; 一般条件下不易发生脱磷酸作用。在这一抑制过程中, M₁ 与丙酮酸的竞争, 首先占有丙酮酸的位置与 TPP 结合, 然后再与 TPP 辅酶反应, 给出一个与 M_a 类似的中间体 M_b, 但 M_b 不能发生进一步的脱羧反应, 从而抑制了在丙酮酸脱氢酶系催化下脱羧反应, 破坏了正常的有氧代谢过程, 这一过程可用反应式 (7b) 描述。



Comparison of the reactions of pyruvate and compound (M₁) with thiamine pyrophosphate catalyzed by pyruvate dehydrogenase

Kluger 等^[12] 的研究工作使丙酮酸脱氢酶系抑制剂的研究达到一个新的水平, 成为采用生物合理设计的方法获得丙酮酸脱氢酶系抑制剂的一个典范。

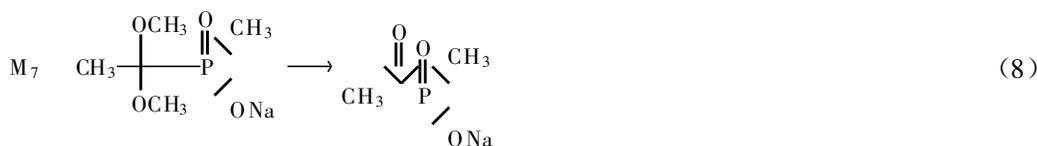
为了探索和开发以丙酮酸脱氢酶系为靶标的新型除草剂, 上世纪 80 年代初期, Baillie 等^[13] 在 Kluger 等^[12] 研究的基础上, 设计合成了约 50 种丙酮酸的含磷类似物^[14], 并研究了这类化合物的除草活性及对丙酮酸脱氢酶系抑制活性, 获得了许多有意义的研究结论。Baillie 等^[13, 14] 的研究表明, 某些烷基乙酰基磷酸酯 (盐) 或次磷酸酯 (盐) M 为丙酮酸脱氢酶系专一有效的强抑制剂, 其结构通式与代表性化合物的酶的抑制活性数据见表 1。

表 1 化合物 M 对丙酮酸脱氢酶系抑制活性
Table 1 Enzyme inhibition activity of compounds M

M	R ₁	R ₂	Inhibition activity	
	1	CH ₃	OCH ₃	<i>I</i> ₅₀ = 70 μmol/L ^a
	2	CH ₃	CH ₃	<i>t</i> _{1/2} = 12 min at 10 μmol/L ^b
	3	CH ₃	H	<i>t</i> _{1/2} = 3 min at 0.3 μmol/L ^a
	4	CH ₃	C ₂ H ₅	<i>I</i> ₅₀ = 165 μmol/L ^a
	5	H	CH ₃	Inactive
	6	C ₂ H ₅	CH ₃	<i>t</i> _{1/2} = 12 min at 1 μmol/L ^b

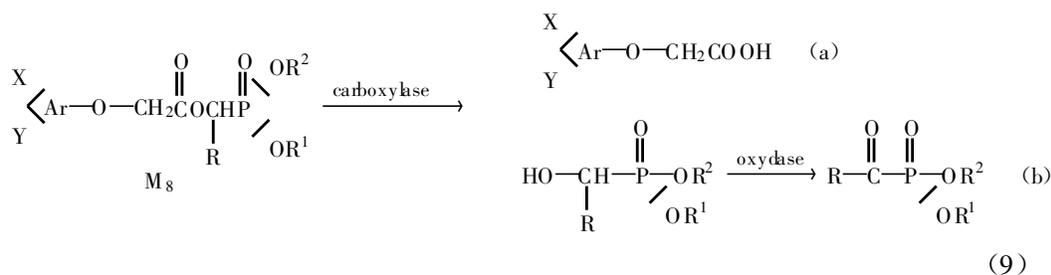
a. Reversible; b. Time dependent.

Buillie 等^[13] 通过研究这类化合物的结构与酶抑制活性以及除草活性的关系, 发现与丙酮酸结构更类似的 M₂ 比 M₁ 具有更强的酶抑制活性和除草活性。M₂ 不仅为强抑制剂, 同时也显示了很好的除草活性。研究结果证实了这类化合物能使植物致死, 正是它们对丙酮酸脱氢酶系的强抑制作用的直接结果。此外, Buillie 等^[13] 还发现这类抑制剂的类似物如 M₇, 见式 (8), 也显示了很好的除草活性。他们假定 M₇ 在植物体内可转化为 M₂, 从而显示出除草活性。



Buillie 等^[13] 选择除草活性较高的此类化合物进行了广泛的田间药效评价。其结果表明, 这类化合物还不具备充分的商品化潜力。但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^[15, 16]。

为了设计新型高效的丙酮酸脱氢酶系抑制剂, 以便获得具有更高除草活性的新型化合物, 我们尝试将生物化学融入农药分子设计和采用生化推理的方法, 设计合成了一类新型的芳(杂环)氧基乙酰氧基烷基磷酸衍生物(M_8) (见式(9)), 其结构特点在于既含有潜在的具有农药活性的结构单元芳(杂)氧羧酸, 同时又含有潜在的抑制丙酮酸脱氢酶系的羧基磷酸酯结构单元。当 M_8 进入植物体后, 在羧酸酯酶和氧化酶的作用下降解氧化, 代谢分解产生可能具有农药活性的芳(杂)氧羧酸类结构单元 a 和可能对丙酮酸脱氢酶系具有抑制作用的 α -羧基磷酸酯类结构单元 b。由于某些 α -羧基(次)磷酸酯 b 已被证实为丙酮酸脱氢酶系的强抑制剂^[12, 13]。当母体骨架上取代基结构匹配时, 通过式(9)中结构 a 和结构 b 的协同作用, 可能会产生活性更高的先导物, 而且也可能发现一类新型的丙酮酸脱氢酶系抑制剂。

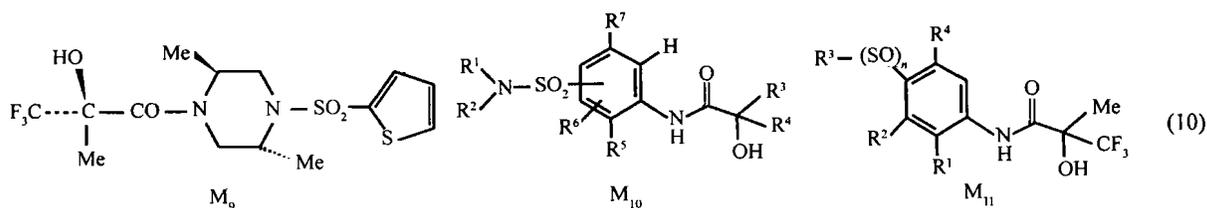


R^1, R^2 : $\text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$; Ar: heterocyclic or phenyl; X, Y: halogen, alkyl, substituted alkyl

Possible metabolic pathway of a series of new phosphonates derivatives in plant

根据上述思路, 本实验室合成了约 200 多个具有通式 M_8 的化合物^[4, 17], 并对其进行了除草活性的室内盆栽法生物测定和筛选, 发现取代苯氧乙酰氧基烷基磷酸及衍生物具有良好的除草活性^[18], 并且通过生化研究证实了某些化合物对丙酮酸脱氢酶系具有很强的抑制作用^[19], 为丙酮酸脱氢酶系的竞争性抑制剂。例如, 化合物 HW 对植物体中的丙酮酸脱氢酶系的抑制活性为: $I_{50} = 3.08 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ (*in vitro*), 显著高于 Buillie 等^[13] 所报道的 HW 类似物 M_1 的抑制活性 $I_{50} = 70 \mu\text{mol/L}$ (*in vitro*), 其除草活性也显著高于 Buillie 等所报道的相关丙酮酸含磷类似物。对丙酮酸脱氢酶系抑制活性高的化合物 HW 进行的毒性和田间小区药效评价结果表明, 这类化合物具有毒性低、选择性好的特点, 在 $\leq 40 \text{ g/亩}$ 剂量下可有效防除一年生、二年生多种阔叶杂草和沙草科杂草, 可作为禾本科作物田的除草剂开发。此外, 其作物的安全性实验表明, 此类化合物还可作为稻田、草坪、茶园和果园的除草剂进行应用开发。

近来, Butlin 等^[20] 研制出一类新型丙酮酸脱氢酶抑制剂 *N*-乙酰基杂环化合物 M_9 , 为含氟的具有光学活性的化合物。同时, 还合成了 2 类促进丙酮酸脱氢酶活性的化合物 (M_{10}, M_{11}), 见式(10):



该类化合物主要用于治疗人类糖尿病, 脉管炎, 心肌萎缩, 高血脂和动脉硬化症等疾病。能通过促进或抑制热血动物(如人类)体内的丙酮酸脱氢酶(PDH)而改善体内代谢, 缓解病症, 为寻找不含磷的丙酮酸脱氢酶(PDH)抑制剂(或促进剂)提供了非常有意义的先导化合物。

参 考 文 献

- 1 SU Shao-Quan(苏少泉). *Pesticide*(农药)[J], 1998, **37**(11): 1
- 2 Eto M. *Biosci Biotech Biochem*[J], 1997, **61**(1): 1
- 3 HE Hong-Wu(贺红武). *Pestic World*(世界农药)[J], 1999, **21**: 21
- 4 HE Hong-Wu(贺红武), LIU Zhao-Jie(刘钊杰). *Chin J Org Chem*(有机化学)[J], 2001, **21**(11): 878
- 5 SHEN Tong(沈同), WANG Jing-Yan(王镜岩). *Chin Biol Chemistry*(生物化学)[M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 2000: 92
- 6 Reiss O K. *J Biol Chem*[J], 1958, **233**: 789
- 7 Corbett J R, Wright K, Baillie A C. *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, 2nd Edn, Chap. 1[M]. New York/London, Academic Press 1984
- 8 Schwartz E R, Reed L. *J Biol Chem*[J], 1970, **245**: 183
- 9 Maldonado M E, Ok K J, Frey P A. *J Biol Chem*[J], 1972, **247**: 2 711
- 10 Westeik J O, Wolfenden R. *J Biol Chem*[J], 1974, **249**: 6 351
- 11 Thompson R C. *Biochemistry*[J], 1973, **12**: 47
- 12 Kluger R, Pike D C. *J Amer Chem Soc*[J], 1977, **99**(13): 4 504
- 13 Baillie A C, Wright K, Wright B J, et al. *Pestic Biochem Physiol*[J], 1988, **30**: 103
- 14 Baillie A C, Wright B J, Wright K. EP Appl 9 348[P]
- 15 Abell L M, Hanna W S, Kunitsky K J, et al. *Pestic Sci*[J], 1995, **44**: 89
- 16 Biryukov A I, Vasilyeva I G, Zhukov Y N, et al. *Pestic Sci*[J], 1990, **30**: 321
- 17 HE Hong-Wu(贺红武), LIU Zhao-Jie(刘钊杰), WANG Jun(汪军). *Chin J Appl Chem*(应用化学)[J], 1998, **15**(3): 88
- 18 HE Hong-Wu(贺红武), LIU Zhao-Jie(刘钊杰), WANG Jun(汪军). ZL 97 109 095. 5, C07F9/38[P]
- 19 YUAN Jun-Lin(袁均林), HE Hong-Wu(贺红武). *Pesticide Society of China the 11th Symposium on Pesticide Science*(中国化工学会农药专业委员会第十一届年会论文集), Chengdou(成都), 2002, **9**: 95
- 20 Butlin R J, Pease J E, Block M H, et al. PCT Int Appl WO 0 117 942A₁[P]

PDH: A New Reacting Target for Herbicide

WANG Tao, HE Hong-Wu^{*}

(*Institute of Agricultural Pesticide Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079*)

YUAN Jun-Lin

(*College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan*)

Abstract A brief introduction is present on progresses in researches of inhibitors of pyruvate dehydrogenase complex (PDH) and the characteristic and function of PDH. Authors ongoing research works in this field are also introduced: an approach to design an inhibitor of pyruvate dehydrogenase with a novel structure by biochemical reasoning, α -(substituted phenoxy acetoxy) alkyl phosphonates with good herbicidal activities and a new kind of inhibitors of pyruvate dehydrogenase complex.

Keywords inhibitor, pyruvate dehydrogenase complex, target, herbicide, review