小分子氢过硫化物供体的研究进展

许亚文^a 王健鲲^b 甄乐^{*,b} 王广基^{*,a,b}^(a) 广东药科大学药学院 广州 510006^(b) 中国药科大学药物代谢动力学重点实验室 南京 210009

摘要 小分子氢过硫化物(RSSH)具有独特的化学性质,近年来其生物学活性备受瞩目.近五年间,生理或病理条件下即可实现 RSSH 原位释放供体化合物取得了突破性的进展,这类供体将成为研究 RSSH 生理功能、作用机制以及治疗潜能的有力工具.按照激活模式将现有供体分子分为五类,即酯酶激活型、ROS(活性氧物种)激活型、pH 依赖型、光激活型以及硝基还原酶激活型,并对各类供体进行综述.现有供体在细胞水平表现出理想的抗氧化应激活性,部分供体已经应用于心肌缺血再灌注模型的干预中,并取得了积极效果.此外,还介绍了供体的释放机理及其概念验证过程,并对供体分子的发展前景进行了展望.

关键词 氢过硫化物;供体;氧化应激;酯酶;硫烷硫

Research Progress of Small-Molecular Hydropersulfide Donors

Xu, Yawen^a Wang, Jiankun^b Zhen, Le^{*,b} Wang, Guangji^{*,a,b}^(a) College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 51000^(b) Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The unique chemical structure endowed small-molecular hydropersulfides (RSSH) with unclear but fascinating biological activities, which have been attracted much attention. The donors that could release RSSH smoothly *in situ* under physiological or pathological conditions will become powerful chemical tools for exploring the physiological functions, mechanism of action, and potential therapeutic benefit of RSSH. Over the past five years, a substantial breakthrough had been achieved in the design and development of RSSH donors, which is summarized in this perspective. According to the activation patterns, the existing donors are divided into five categories, namely esterase-activated donor, ROS (reactive oxygen species)-activated donor, pH-dependent donor, light-activated donor, and nitroreductase-activated donor. All kinds of donors played ideal roles in improving the oxidative stress at the cellular level, part of which also show a positive therapeutic effect in the context of myocardial ischemia-reperfusion injury. Besides, the related release mechanisms and the proof of concept of the donors are briefly introduced. In the next five years, waves of novel donors are emerging. On one hand, diverse donors, with stable and controllable release rate, clear release process, and identified release components, will be designed. On the other hand, the indispensable toolbox of donors will be fully assembled for more in-depth and comprehensive biological activity researches.

Keywords hydropersulfides; donor; oxidative stress; esterase; sulfane sulfur

氢过硫化物(hydropersulfides)是哺乳动物体内普遍存在的一类活性硫物种(reactive sulfur species)^[1],其结构中含有两个共价结合的硫烷硫(sulfane sulfur)^[2];而该类硫原子处于 0 价或-1 价,具有较高的反应活性(图 1)^[3].硫醇仅具有亲核性,而与之不同的是,氢过硫化物兼具亲核性及亲电性^[4].氢过硫化物具有较低的 pK_a

值(比硫醇 pK_a 值低 1~2),在生理环境中往往以负离子形式存在,更易与亲电性物质发生反应.而非离子形式的氢过硫化物则具有亲电性,能与弱亲核试剂如 CN^- 、膦及硫醇等发生反应.此外,氢过硫化物的还原性也强于相应硫醇,其负离子形式可作为优良的单电子还原剂,而被氧化所形成的氢过硫化物自由基具有良好的稳

* Corresponding authors. E-mail: i_m_zhenle@163.com; guangjiwang@hotmail.com

Received January 5, 2021; revised March 18, 2021; published online April 16, 2021.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81973186, 81903707), the National Major Scientific & Technological Special Project for "Significant New Drugs Development" (No. 2019ZX09301-151), and the Jiangsu Provincial Funds for Excellent Young Scientists (No. BK20200081).

国家自然科学基金(Nos. 81973186, 81903707)、国家科技重大新药创制专项(No. 2019ZX09301-151)及江苏省优青(No. BK20200081)资助项目.

定性^[5]. 正是由于氢过硫化物具有独特的化学性质, 其生物学活性才愈发受到关注.

图1 氢过硫化物的化学特性
Figure 1 Chemical properties of RSSH

人体内源性氢过硫化物可分为小分子氢过硫化物(RSSH)和蛋白质氢过硫化物(PSSH). 常见的RSSH包括半胱氨酸氢过硫化物(CysSSH)、谷胱甘肽氢过硫化物(GSSH)等. 在人与小鼠的大脑中, GSSH浓度可达到150 $\mu\text{mol/L}$, 在其他主要器官中其浓度约为50 $\mu\text{mol/L}$; 而CysSSH在小鼠的不同组织中浓度约为1~4 $\mu\text{mol/L}$ ^[6]. CysSSH的内源性生成途径涉及三种酶: 胱硫醚- β -合成酶(CBS)、胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)以及半胱氨酰-tRNA合成酶(CARS)^[7-8]. 体内半胱氨酸(Cys)经氧化作用生成胱氨酸(CysSSCys), 并在CBS/CES作用下生成CysSSH. 而两分子Cys能够在半胱氨酰-tRNA合成酶(CARS)与磷酸吡哆醛的作用下生成CysSSH^[8]. GSSH的生成则可能来自于CysSSH与谷胱甘肽(GSH)之间发生的硫醇置换反应. 此外, GSSH可与谷胱甘肽二硫化物(GSSG)发生反应得到多硫化物, 多硫化物又可在谷胱甘肽还原酶作用下再次生成GSSH^[1,3,7].

内源性RSSH的生物学意义目前尚不明晰, 其与 H_2S 的生理功能存在一定的交互与重叠. 一方面, RSSH被认为是 H_2S 的前体, 许多 H_2S 产生的生理效应有可能源于RSSH^[7,9]. 而另一方面, RSSH也是线粒体硫氧化途径中的重要中间体, 硫醌氧化还原酶能够以GSH作为硫受体, 催化 H_2S 转化为GSSH^[10]. 此外, RSSH还可以直接参与细胞氧化还原稳态的调节^[11]. 例如, 8-硝基-cGMP是NO/ROS氧化还原信号通路中重要的第二信使, 而RSSH具有理想的还原性及亲核性, 能够取代8位硝基, 并进一步生成8-巯基-cGMP, 中止亲电性信号传导^[12].

越来越多的研究表明, 蛋白质过硫化在调节蛋白质功能中起到重要作用. Cys残基的翻译后修饰(如S-过硫化)被认为是生成PSSH的主要途径. 而近期研究表明, CysSSH可借助CARS生成S-过硫化半胱氨酰-tRNA, 并直接参与翻译过程, 表达过硫化的蛋白质^[8]. 聚焦近三年小分子氢过硫化物供体的研究进展进行综述, 有关蛋白质氢过硫化物已有许多优秀综述与文献, 在此不再赘述^[13].

1 小分子氢过硫化物供体研究进展

RSSH的生物活性及机制研究方兴未艾, 如何提供稳定可控的RSSH分子亦成为领域热点. 内源性RSSH

不易分离纯化, 更加难以储存及递送; 而可分离纯化的RSSH往往含有大位阻烷基取代, 水溶性差且稳定性不理想^[14]. 双烷基三硫化物(DATS)可作为RSSH供体, 但其产生的含硫物种十分复杂^[15]. 因此, 研究RSSH生物学功能的一大障碍就是缺乏化学工具分子, 而设计生理或病理条件下即可实现原位释放的RSSH供体成为解决这一问题的关键.

1.1 酯酶激活型氢过硫化物供体

理想的酯酶激活型RSSH供体应在生理条件下保持稳定, 而在特定酯酶作用下释放RSSH. 2017年, 王炳和团队^[16]借助半缩醛的解离设计了供体1和2(图2). 供体1或2在猪肝脂酶(PLE)的催化下生成关键中间体A; A自发解离并释放出一分子过硫化物B及一分子醛. 而在释放体系中加入N-乙酰半胱氨酸(NAC)能够将B衍生化为二硫化物C, 并释放一分子 H_2S . 该研究通过HPLC对产物C及醛类化合物进行定性及定量分析, 并用亚甲基蓝法检测 H_2S , 揭示了供体的释放动力学. 实验表明, 供体能够有效地释放RSSH, $T_{1/2}$ 仅为12至145 s. 随后, 研究者借助2,4-二硝基氟苯(FDNB)捕获过硫化产物B, 实现了对B的直接定量.

图2 供体1与2的释放机制及捕获剂结构
Figure 2 Donors 1 and 2, their mechanisms of release, and the trapping agents

甲烷磺酸甲酯(MMTS)曾被认为是一种RSH选择性封闭试剂; 由于前期RSSH的生成体系较为复杂, 导致MMTS是否可衍生化RSSH一直存在争议. 而王炳和等借助供体1证明了MMTS能够在生理条件下对RSSH进行烷基化.

供体2水溶性较好且副产物较低, 其作为候选化合物在心肌缺血再灌注模型(MI/R)中表现出了保护作用. 实验通过闭塞左冠状动脉(LCA)诱导小鼠心肌缺血; 缺血45 min后实施再灌注, 供体2伴随再灌注给药; 再灌注24 h后再次闭塞LCA, 并用Evans Blue及三苯基四唑氯化物(TTC)对心肌双染, 以评价2对危险区(AAR)及梗死面积(INF)的影响. 研究结果表明, 供体干预组较

对照组的梗死风险(INF/AAR)显著减低. 此外, 通过比对急性心肌梗死标志物肌钙蛋白 I (cardiac troponin I) 的浓度同样验证了 **2** 对 MI/R 的保护作用.

GSSH 是生理条件下含量最丰富的小分子 RSSH. 2018 年, 王炳和课题组^[17]开发了首个 GSSH 供体 **3** (BW-GP-401, 图 3). **3** 在 PLE 的水解作用下释放出游离酚羟基, 并借助偕二甲基产生的 Thorpe-Ingold 效应实现分子内环化, 释放 GSSH 的同时生成内酯副产物. 研究者对内酯产物进行 HPLC 定量以预测 GSSH 的释放. 研究表明, 供体在无 PLE 的磷酸盐缓冲液(PBS)中保持稳定; 而加入 PLE 后内酯的释放量在 30 min 内可达到 80%. 随后的 FDNB 捕获实验中, 研究者发现 GSSH 的衍生化率并不高, 这是由于 GSSH 释放的同时也伴随着自身歧化以及与硫醇(如 NAC)的偶联, 最终导致 H₂S、多硫副产物 GSSSG 及 GSSNAC 的产生. 对释放过程中产生的 H₂S 进行定量后发现, PLE 是 H₂S 释放的必要条件, 而增加 NAC 有利于 H₂S 更快速的释放.

图 3 供体 **3** 及其释放机制

Figure 3 Donor **3** and its mechanism of release

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是经典的糖酵解酶, 包含三个 Cys 残基, 分别为 C152、C156 及 C247, 其中 C152 被认为是保持酶催化活性的必需位点. C152 残基的氧化、亚硝化或过硫化均会导致酶的失活; 而抗氧化剂及二硫键还原酶则促进酶恢复活性^[18]. 为此, 王炳和等探究了 **3** 对 GAPDH 活性的影响. 研究表明, **3** 对 GAPDH 的抑制作用呈剂量依赖性, 且在二硫键还原试剂 DTT 的作用下减弱, 因此可以推测 GSSH 通过 Cys 残基的过硫化作用抑制 GAPDH 的活性. 在 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞氧化应激模型中, **3** (50 μmol/Lol/L) 所产生的细胞保护作用要显著优于 Na₂S (150 μmol/L) 和 GSH (150 μmol/L), 且呈浓度依赖性.

延长 RSSH 释放的半衰期对慢性炎症有潜在的积极作用. 基于此, Matson 课题组^[19]于 2020 年设计了酯酶激活型供体 **4** 以及与嵌段共聚物偶联而成的多聚供体 **5** (图 4), 探究了延长 RSSH 释放时间所产生的生物学活性.

4 被酯酶水解释放出酚氧负离子, 随后经“1,6-消除”释放出 *N*-乙酰半胱氨酸氢过硫化物(NAC-SSH). 作者以 PLE 激活供体, 并以 FDNB 作为捕获剂, 最终验证了供体的释放. HPLC 分析结果显示, **4** 在 PLE 作用下逐

渐分解, 捕获产物 NAC-SS-DNB 逐渐生成. 供体 **5** 是将供体 **4** 与 poly(HEMA-co-OEGMA) 缀合而成, 其在 ¹H NMR 释放实验中的半衰期为 36 h, 远远大于供体 **4** 的释放半衰期(1.6 h).

图 4 供体 **4** 与 **5** 及其释放机制

Figure 4 Donors **4** and **5**, and their mechanisms of release

细胞活性实验中, 研究者首先考察供体是否对 H₂O₂ 刺激的 H9C2 心肌细胞具有保护作用, 结果显示给药组细胞存活率有所改善, 且短效供体 **4** 药效优于长效供体 **5**. 5-氟尿嘧啶(5FU)被认为是慢性的 ROS 诱导剂, 其刺激 H9C2 细胞 4 h 后导致细胞存活率下降, 而 **5** 能明显减少细胞毒性, 且药效优于 **4**. 值得注意的是, 两供体均无法减缓 5FU 对 MCF-7 细胞所产生的毒性, 作者推测 RSSH 供体有望与化疗药物联合用药, 在不影响药效的基础上, 降低化疗药对瘤外组织的毒副作用.

1.2 ROS 激活型氢过硫化物供体

2018 年, Matson 课题组^[20]开发了一类选择性响应 ROS 的 RSSH 供体 **6** (BDP-NAC). 该供体结构中的芳基硼酸频哪醇酯与 HOO⁻ 结合后发生 Baeyer-Villiger 重排, 生成的酚盐氧负离子经 1,6-消除释放出 NAC-SSH (图 5)^[21]. 研究者通过液质联用(LCMS)及 ¹H NMR 发现, **6**

图5 供体6与探针7及其释放机制

Figure 5 Donor 6 and probe 7, and their mechanisms of release

在 H_2O_2 作用下逐渐降解, 并伴随 NAC-SSH 及对羟基苯甲醇的生成. 此外, 作者还设计并合成了荧光探针 7 (BDP-Flour). 7 被 H_2O_2 激活后生成过硫化物中间体, 经分子内环合释放 7-羟基香豆素(7-HCm). 通过比较荧光强度的变化可以发现, 该类苯硼酸酯供体能够被 H_2O_2 选择性激活.

在 H_2O_2 诱导的 H9C2 细胞氧化应激损伤模型中, H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 导致细胞生存率降至约 30%; 而 6 能够发挥剂量依赖性的细胞保护作用, 给药 200 $\mu\text{mol/L}$ 后细胞生存率提升至 100%. 同样条件下, 抗氧化剂 NAC、 H_2S 供体 Na_2S 及 GYY4137 均未能表现出理想的保护作用. 作者进一步猜测 NAC-SSH 比 H_2S 更能维持细胞的氧化还原稳态. 该项工作提供了 RSSH 供体的全新模式, 为后续研究 RSSH 介导的生物学功能提供了设计思路.

考虑到上述 1,6-消除副产物亚甲基苯醌(QM)的潜在毒副作用^[22], Chakrapani 课题组^[23]于 2018 年发展了一类基于 1,4-消除的 RSSH 供体 8. 该供体同样具有硼酸酯基团, 在释放 RSSH 的同时产生安全无毒的肉桂醛(图 6).

图6 供体8及其释放机制

Figure 6 Donor 8, and its mechanism of release

在供体的释放研究中, 研究者将 8 与 10 equiv. 的 H_2O_2 共孵, 利用 HPLC 检测 8 的降解及肉桂醛的生成. 供体降解过程符合一级动力学, 速率常数 $k_1 = 5.3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; 而肉桂醛的释放速率常数与之接近 ($4.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$). 研究者随后分别选用 FDNB 及单溴二胺(mBB)对生成的 RSSH 进行捕获, 两者的捕获速率相当. 值得注意的是, 肉桂醛与 RSSH 亦会发生 Michael 加成, 对此该研究指出, 细胞内的硫醇(如 GSH)会竞争性地与肉桂醛结合, 进而保证足量的 RSSH 发挥生物学功能.

生物活性研究选用甲萘醌及胡桃醌衍生物(JCHD)诱导 DLD-1 结肠癌细胞产生氧化应激, 细胞存活率降低; 而同时给予供体化合物后, 细胞存活率显著提升, 且呈现剂量依赖性, 这说明 RSSH 的释放能有效的缓解细胞氧化应激状态.

2020 年, Lukesh 等^[24]再次选择苯硼酸酯作为 ROS 特异性触发基团, 并借助“trimethyl lock”前药策略, 设计了一类新型 RSSH 供体 9 (RAH393), 其释放过程与供体 3 类似(图 7). 为了验证这一设计的合理性, 研究者将供体离去基团替换为 7-HCm 与试卤灵(Resorufin), 合成了荧光探针 10 (RAH225)及 11 (RAH2115), 两类探针的激活均呈现较好的 H_2O_2 特异性. 释放实验在考察了相对荧光强度后发现, 50 equiv. H_2O_2 能够驱动 10 在 1 h 内逐步释放出 7-HCm. 该研究还通过阐明 10 及其类似物的构效关系, 证明了硼酸酯与偕甲基对荧光基团的释放至关重要. 由于 11 具有较长的激发/发射波长, 因此应用于指示百草枯所导致的 Hela 细胞内源性 H_2O_2 累积. 此外, 研究者借鉴探针 7 的结构, 设计了含有二硫键的荧光探针 12, 通过测定荧光强度随时间的变化, 计算出探针的释放半衰期为 60.5 min, 表观速率常数为 $1.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; 此外, 作者还通过质谱学手段验证了环状二硫化物的生成.

图7 供体9、探针10~12及其释放机制

Figure 7 Donor 9, probes 10~12, and their mechanisms of release

基于荧光探针的释放验证实验,作者利用捕获剂FDNB对*N*-乙酰基半胱氨酸进行衍生化,并通过LCMS对其定量,进一步阐明了9的释放。9 (200 $\mu\text{mol/L}$)在 H_2O_2 (1 mmol/L)中存在稳定释放,反应15 min后生成量约为62.9 $\mu\text{mol/L}$ (产率 31.4%)。而不含硼酸酯结构的对照化合物并未检测到释放RSSH。随后的细胞活性研究中, H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$)导致HeLa细胞存活率降至33%;而提前1 h给予供体后, H_2O_2 造成的细胞损伤明显降低,细胞存活率接近100%。

另外值得注意的是,9具有酰基过硫化物结构,在体内硫醇RSH作用下容易降解为硫代羧酸。而采用亚甲基蓝法研究发现,9在RSH存在下还表现为一类有效的 H_2S 供体。

超氧离子(superoxide anion, SOA)作为一类ROS,主要由线粒体的呼吸作用产生。而线粒体功能障碍往往导致SOA内稳态被破坏,造成细胞损伤^[25]。2020年,Matson课题组^[26]设计了一类SOA特异性响应的RSSH供体13 (SOPD-NAC, 图8)。该供体结构中的二苯基次膦酸酯能够捕获SOA并水解出氧负离子,后者经历1,6-消除释放NAC-SSH(参见供体4~6)。

图8 供体13与14
Figure 8 Donor 13 and 14

自组装肽能够自发形成纳米结构或水凝胶,具有优良生物降解性和生物相容性。鉴于Matson等已成功将 H_2S 供体与自组装肽结合,研究者将SOPD结构缀合至自组装肽(Bz-Cys-Phe-Phe-Glu)得到短肽供体14 (SOPD-Pep, 图8),以期改善水溶性及细胞靶向性。该短肽具有两亲性,透射电镜观察表明其能够自发形成纳米带,具有理想的组装性质。

生物活性研究中,研究者采用丁硫氨酸-亚砷亚胺耗竭H9C2细胞内GSH以提高SOA水平,同时给予 H_2S 探针WAP-5以及供体13或14。结果显示,14干预组荧光强度最高,说明SOA促进了RSSH的释放。而同样条件下,将荧光探针更换为二氢乙锭,以指示胞内氧化应激水平。结果显示,模型组ROS含量明显高于供体干预组。随后,作者选用佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯去诱导RAW 264.7巨噬细胞产生炎症损伤,而建模后给予供体能够显著改善细胞存活率。此外,供体对细胞的保护作用要优于 H_2S 供体GYY4137及 Na_2S 。

1.3 pH依赖型氢过硫化物供体

2013年, Galardon等^[27]发现乙酰二硫化物能够与胺发生分子间乙酰基转移,生成乙酰基过硫化物AcSSH (图9, box)。在此基础上,该课题^[28]于2014年报道了RSSH供体15。在Tris缓冲液(pH=7.4)中,供体15的氨基盐酸盐逐渐游离,亲核性氨基借助偕二甲基效应自发进行分子内加成-消除反应,实现*N*-甲氧羰基转移并暴露出过硫化基团。该转移过程与pH值密切相关,通过对比供体在pH为8.5、7.4及6.5时的表现速率常数发现,碱性越强,释放速率越快;而供体在酸性缓冲液(pH=2.7)中比较稳定,120 min内仅降解不到5%。此外,供体15的*N*-乙酰化衍生物无法游离出过硫化基团,证明甲氧羰基转移是供体发挥作用的关键,而并非依赖甲氧羰基水解。研究者使用*N*-乙基马来酰亚胺(NEM)作为捕获剂,借助LCMS确证了捕获产物RSS-NEM的结构。

图9 供体 15 及其释放机制

Figure 9 Donor 15 and its mechanism of release

氢过硫化物是一类亚稳定结构, 研究人员发现供体 15 释放过硫化基团后, 会发生自身二聚反应; 但值得注意的是, 供体 15 浓度升高至 100 mmol/L 后, 仍未检测到 H_2S 的释放. 以上结果一方面排除了过硫化基团是自身歧化所产生, 一方面说明 15 能够避免 H_2S 的干扰, 适合于研究硫烷类化合物的生物学活性. 随后的活性研究中, 15 能以较高收率将 8-硝基-cGMP 转化为 8-巯基-cGMP. 此外, 15 可将三价铁细胞色素 C 定量转化为亚铁细胞色素 C, 而经典的硫醇如 GSH 或青霉胺则无法实现这一过程, 可见 RSSH 是一类生物体内高效的单电子还原剂.

2018 年, Xian 课题组^[29]开发了一系列含有 *O*-硅烷基的 RSSH 供体 16, 其机理与供体 1 类似, 均是基于 1,2-*O,S*-消除机制释放(图 10). 由于酸性条件下硅醚容易解离, 研究人员对不同 pH 下 RSSH 的释放速率进行了考察. 研究表明, 供体释放过程呈现 pH 值依赖性, pH 值越低则释放速率越快; 含有三甲基硅基(TMS)的供体在弱酸性条件(pH=5.0/6.0)下即可释放; 而在 pH=7.4 时释放速率变慢, 同时得到二硫化物或三硫化物的混合物. 连接三乙基硅基(TES)的供体相对稳定, 在不同 pH 缓冲系统中均无明显释放.

此外, 研究者还考察了 16 在氟离子(F⁻)存在下的释放. 含 TES 的供体在氟离子存在下能够缓慢释放, 但释放速率远远小于含 TMS 的供体.

图10 供体 16 及其释放机制

Figure 10 Donor 16 and its mechanism of release

Toscano 课题组^[30]于 2018 年报道了一类新型 RSSH 供体 17, 希望通过异硫脲结构的脱除实现 RSSH 的释放(图 11). 研究者选用 NEM 作为衍生化试剂, 通过 LCMS 及 ^1H NMR 对捕获产物 RSS-NEM 进行定量, 以研究 RSSH 的释放程度. 最初设计的化合物不含偕二甲基,

捕获实验中并没有检测到目标产物, 而是生成了两类副产物, 即三硫化物(RSSSR)与硫代亚磺酸酯(RS(O)-SR). 随后在供体结构中引入偕二甲基, RSS-NEM 的产率明显增加. 在进一步构效关系探索中, 羧酸甲酯的引入虽然减少了副产物 RS(O)SR 的生成, 但未能增加 RSSH 的释放. 而在异硫脲结构中引入 *N*-甲基后, RSS-NEM 的产率下降, 且仍伴随大量副产物 RS(O)SR 生成.

图11 供体 17 及其释放机制

Figure 11 Donor 17 and its mechanism of release

当在异硫脲结构中引入 *N*-苯基后, RSS-NEM 的产率显著提升, 在反应体系中也未检测到 RS(O)SR. 随后, 研究者对苯环取代基进行考察, 并用核磁定量的方法阐明了 RSSH 的产率及释放半衰期. 研究结果显示, 当苯基含有吸电子基团时, RSSH 产率均能大于 90%, 释放半衰期延长; 而当苯基对位含有甲氧基时, RSSH 产率下降至 75%, 释放半衰期稍有缩短.

值得注意的是, 供体释放过程并未检测到 *N*-苯基脲, 而是有大量苯基氰胺生成, 其机理如图 11 所示. 异硫脲盐在中性缓冲液中逐步转化为游离形式的供体 17F, 该中间体经历消除反应得到苯基氰胺及 RSSH. 当苯基上含有给电子基团时, 17 在缓冲液中转化为 17F 的程度降低, 因而释放产率下降; 而苯基上含有吸电子基团时, 17F 亚胺孤对电子不易发生消除反应, 因而半衰期延长.

成盐氨基可在中性缓冲液中逐渐解离, 利用游离氨基的亲核性是 pH 依赖型供体实现 RSSH 释放的关键. 2020 年, Toscano 课题组^[31]报道了具有硫代氨基甲酸酯结构的 RSSH 供体 18(图 12). 非亲核性的铵盐在生理条件下(pH=7.4)会产生游离氨基, 后经分子内环化-消除释放 RSSH.

图 12 供体 18 及其释放机制

Figure 12 Donor 18 and its mechanism of release

研究者对供体 **18** 进行了构效关系研究. 当供体为游离羧酸且无偕二甲基结构时, RSSH 以 NAC-SSH 形式释放, 与 HPE-IAM 竞争性的进攻 **18**, 生成的三硫化物 RSSSR 为主要产物. 而供体为羧酸甲酯衍生物且含偕二甲基结构时, RSSH 与 **18** 的反应性下降, RSS-HPE-AM 成为主产物. 当去除末端 *N*-甲基后, 伯胺亲核能力降低, 释放 RSSH 速率变小; 当两个氮原子之间的碳链延长后, 分子内环化的难度增加, 释放 RSSH 速率会进一步减缓. 含有羧酸甲酯的供体能够保证 RSSH 产率高于 90%, 而释放半衰期可以通过结构修饰进行调节, 这为后续供体的设计与相关生物学研究提供了重要参考.

此外, 若将末端氨基去除, 供体 **18** 无法释放 RSSH; 即使在释放实验中加入 5 equiv. 的正丁胺, 供体仍能稳定存在. 值得注意的是, 当外加 NAC 后, 硫代氨基甲酸酯结构并没有发生硫醇解, 而是产生了 H_2S 的前体物质硫化碳(COS). COS 的产生是否会干扰 RSSH 的释放呢? 作者通过 LCMS 检测伴生物 **18a** 后发现, 当供体释放速率较快时, RSSH 释放并不受外加硫醇的干扰; 而具有较长释放半衰期的供体, 其 RSSH 释放程度则明显降低. 另外, 该研究还直接借助膜进样质谱(MIMS)对生成的 COS 进行定量, 实验结果与上述一致.

在细胞保护作用的研究中, H9C2 细胞经供体预处理 2 h 后, 再进行 H_2O_2 刺激 2 h, 与空白组相比, 给药组能够明显提升细胞存活率. 在离体心脏 Langendorff 灌注模型中, 心脏缺血 20 min 后进行 90 min 再灌注, 前 7 min 再灌注伴随给予 **18** 或 KH 缓冲液. 再灌注结束后使用 TTC 染色发现, KH 缓冲液梗死面积为 42%, 而供体给药后梗死面积减小至 16%. **18** 表现出较好的抗氧化应激作用, 并能改善 MI/R.

1.4 光激活型氢过硫化物供体

光激活无需依赖机体内部化学环境的改变, 仅需借助自身光敏基团即可实现供体小分子的释放. 邻硝基苄基(ONB)作为经典的光敏基团, 不仅能够实现单光子激发, 且具有一定的双光子激发特征; 其在快速释放的同时不产生复杂副产物. 基于 ONB 的光敏特性, Singh 团队^[32]于 2019 年开发了首个光激活型 RSSH 供体 **19**(图 13). ONB 结构吸收特定波长光子后, 供体激发至三线态; 该状态下硝基发生抽氢反应形成 *aci*-硝基; 后者环化为苯并异噁唑中间体, 随后五元环裂解为羰基及亚硝基, 并释放出离去基团 NAC-SSH.

图 13 供体 19 及其释放机制

Figure 13 Donor 19 and its mechanism of release

研究者首先确定了供体 **19a** 与 **19b** 在含 10% 胎牛血清或 10 equiv. 硫醇(NAC 或 GSH)的混合溶剂(乙腈/PBS, $V:V=3:7$, pH=7.4)中均具有良好的稳定性. 随后, 分别利用 HPLC 及 1H NMR 验证了供体在 365 nm 单光子激发下存在光解现象, 并借助 LCMS 捕获到了光解产物. 供体 **19a** 与 **19b** 的光解量子产率分别为 0.07 与 0.36; 而 **19a** 的双光子吸收截面约为 0.033 GM, 730 nm 双光子激发下的光解速率常数为 $k_{obs}=6.1 \times 10^{-4}$.

在 RSSH 捕获实验中, 利用 mBB 捕获不同时间点释放的 NAC-SSH, 随着照射时间的延长, 455 nm 特征性荧光强度逐渐增加; 而以 FDNB 为捕获剂时, 通过对照 NAC-SS-DNB 标准品, 利用 HPLC 对 RSSH 的释放进行定量. 与此同时, FDNB 捕获 NAC-SSH 的过程中给予明暗交替刺激(ON-OFF), 实验结果再次确证只有光照才能形成 NAC-SS-DNB.

细胞实验中, HeLa 细胞分别给予供体 **19a**、**19b**、GSH、NAC、HCys 及 Na_2S , 随后再进行 H_2O_2 刺激. 结果显示, 供体的细胞保护能力优于其它给药组. 此外, 二氯荧光黄双乙酸盐(DCFDA)活性氧染色实验同样验证了上述结论.

1.5 硝基还原酶激活型氢过硫化物供体

越来越多的实验证据表明, 肠道微生物组(gut mi-

crobiome)与人类的健康及疾病息息相关^[33]. 为了探究外源性活性硫物种, 尤其是 RSSH 对肠道微生物组的作用, Matson 课题组^[34]于 2021 年设计并合成了可于肠道内释放的新型供体 **20** (NDP-NAC, 图 14). 该供体能够借助哺乳动物肠道内细菌源硝基还原酶(nitroreductase, NR)实现特异性激活.

图 14 供体 **20** 及其释放机制

Figure 14 Donor **20** and its mechanism of release

在 NR 与 NADH 的共同作用下, 供体结构中的硝基被还原为含亚硝基或氨基结构的中间体, 这类中间体随即发生 1,6-消除, 释放 NAC-SSH 及副产物对氨基苯甲醇. 作者首先选用 FDNB 为捕获剂, 在含有 NR(大肠杆菌源)及 NADH 的 PBS 溶液(pH=8.0)中验证了 NAC-SSH 的释放; 随后, 利用 ¹H NMR 考察了供体的降解动力学以及 Cys 存在下的稳定性.

在生物活性研究中, 供体对 H9C2 细胞的安全性良好, 也不影响大肠杆菌的活力, 但能够剂量依赖性的抑制两类条件致病菌[李斯特菌(*L. monocytogenes*)及金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)]的增殖. 通过 MALDI-TOF 鉴定小鼠粪便细菌后发现, 与 PBS 组相比, 给药组细菌种类发生明显变化. 通过气相色谱对粪便样本中的短链及中链脂肪酸分析可知, 给药组菌群变化诱导了庚酸含量的大幅增加. 随后, 根据细菌分类丰度进行样品聚类分析可知, 与 PBS 组相比, 供体组菌群种类在 Phylum 水平上存在显著差异, 其中孢子形成菌 *T. sanguinis* 存在大量增殖, 而厌氧性条件致病菌 *Synergistales* 数量下降. 作者还采用鸟枪法宏基因组学(shotgun metagenomics)预测微生物蛋白功能及其对机体的影响. 分析结果表明, 给予供体后菌群的变化很有可能影响到机体遗传信息的处理与翻译, 以及脂质代谢功能, 并与代谢性疾病相关.

2 总结与展望

RSSH 是一类含有硫烷硫结构的活性分子, 兼具亲核性、亲电性及还原性; 独特的化学结构赋予其多元的生物活性; 探究其生物功能及作用机制富有吸引力与挑战性, 近年来已逐渐成为领域内深入探索的热点. 近三年间, 新型 RSSH 供体的发现如雨后春笋, 借助供体

已实现了单一组分 RSSH 的原位释放, 这为后续研究其生物学活性提供了关键策略. 现有研究围绕多样化的生理或病理条件, 设计了多种供体激活模式; 根据激活模式的不同, 我们将目前所报道的供体分为五类, 即酯酶激活型、ROS 激活型、pH 依赖型、光激活型及硝基还原酶激活型. 现有研究通过 NMR、HPLC、LC-MS 以及荧光探针合成等手段验证了供体在生物缓冲体系内的释放, 并在细胞水平明确了供体理想的抗氧化应激活性; 此外, 部分供体(如供体 **2** 与 **18**)已经应用于心肌缺血再灌注动物模型的干预, 并取得了积极效果.

RSSH 供体与经典的气体信号分子(如 NO、H₂S、CO 等)供体类似, 其释放过程需要具备可控性, 即供体能够在合适的靶部位以适宜的速率实现 RSSH 的释放. 现有供体已在体外缓冲系统中验证了 RSSH 的释放; 而对于其在细胞内甚至体内的释放过程还需要在未来的研究中进一步阐明. 随着研究的深入, 新一代 RSSH 供体将在特定内环境中具备稳定可控的释放速率、明确的释放组分以及清晰的释放过程. 另一方面, 现有供体大部分表现出在细胞层面的抗氧化应激活性, 这有助于揭示供体的胞内作用机制; 而供体化合物在体内疾病模型中是否同样具有干预作用, 这也将成为今后研究的重点.

总之, 在未来的五年间, 我们相信这一领域还会有新的亮点交相绽放, RSSH 供体有潜力成为探究 RSSH 生物学功能及机制的必备分子, 而设计结构新颖且体内外释放机制明确的供体有望为生物活性研究提供更多的选择.

References

- The representative reviews of hydrogen persulfides in recent years see:
 - Saund, S. S.; Sosa, V.; Henriquez, S.; Nguyen, Q. N. N.; Bianco, C. L.; Soeda, S.; Millikin, R.; White, C.; Le, H.; Ono, K.; Tantillo, D. J.; Kumagai, Y.; Akaike, T.; Lin, J.; Fukuto, J. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *588*, 15.
 - Kasamatsu, S.; Nishimura, A.; Morita, M.; Matsunaga, T.; Hamid, H. A.; Akaike, T. *Molecules* **2016**, *21*, 1721.
 - Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J.; Nagy, P.; Wink, D. A.; Kevil, C. G.; Feelisch, M.; Cortese-Krott, M. M.; Bianco, C. L.; Kumagai, Y.; Hobbs, A. J.; Lin, J.; Ida, T.; Akaike, T. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 2140.
 - Filipovic, M. R.; Zivanovic, J.; Alvarez, B.; Banerjee, R. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 377.
 - Lau, N.; Pluth, M. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *49*, 1.
 - Sawa, T.; Motohashi, H.; Ihara, H.; Akaike, T. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1245.
- Iciek, M.; Bilska-Wilkosz, A.; Gorny, M. *Acta Biochim. Pol.* **2019**, *66*, 533.
 - Shinkai, Y.; Kumagai, Y. *Toxicol. Sci.* **2019**, *170*, 3.
- Ono, K.; Akaike, T.; Sawa, T.; Kumagai, Y.; Wink, D. A.; Tantillo, D. J.; Hobbs, A. J.; Nagy, P.; Xian, M.; Lin, J.; Fukuto, J. M. *Free Radical Biol. Med.* **2014**, *77*, 82.
 - Park, C.-M.; Weerasinghe, L.; Day, J. J.; Fukuto, J. M.; Xian, M. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 1775.

- (c) Cuevasanta, E.; Moller, M. N.; Alvarez, B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *617*, 9.
- [4] (a) Everett, S. A.; Folkes, L. K.; Wardman, P.; Asmus, K. D. *Free Radical Res.* **1994**, *20*, 387.
(b) Cuevasanta, E.; Lange, M.; Bonanata, J.; Laura Coitino, E.; Ferrer-Sueta, G.; Filipovic, M. R.; Alvarez, B. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 26866.
(c) Benchoam, D.; Semelak, J. A.; Cuevasanta, E.; Mastrogiovanni, M.; Grassano, J. S.; Ferrer-Sueta, G.; Zeida, A.; Trujillo, M.; Moller, M. N.; Estrin, D. A.; Alvarez, B. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 15466.
- [5] (a) Everett, S. A.; Wardman, P. *Method Enzymol.* **1995**, *251*, 55.
(b) Jin, F.; Asatryan, R.; Bozzelli, J. W. *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 1945.
(c) Alvarez, L.; Bianco, C. L.; Toscano, J. P.; Lin, J.; Akaike, T.; Fukuto, J. M. *Antioxid. Redox Signaling* **2017**, *27*, 622.
- [6] Ida, T.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tsuchiya, Y.; Watanabe, Y.; Kumagai, Y.; Suematsu, M.; Motohashi, H.; Fujii, S.; Matsunaga, T.; Yamamoto, M.; Ono, K.; Devarie-Baez, N. O.; Xian, M.; Fukuto, J. M.; Akaike, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 7606.
- [7] (a) Chen, X. L.; Jhee, K. H.; Kruger, W. D. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52082.
(b) Singh, S.; Padovani, D.; Leslie, R. A.; Chiku, T.; Banerjee, R. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22457.
(c) Mishanina, A. V.; Libiad, M.; Banerjee, R. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 457.
- [8] Akaike, T.; Ida, T.; Wei, F.-Y.; Nishida, M.; Kumagai, Y.; Alam, M. M.; Ihara, H.; Sawa, T.; Matsunaga, T.; Kasamatsu, S.; Nishimura, A.; Morita, M.; Tomizawa, K.; Nishimura, A.; Watanabe, S.; Inaba, K.; Shima, H.; Tanuma, N.; Jung, M.; Fujii, S.; Watanabe, Y.; Ohmuraya, M.; Nagay, P.; Feelisch, M.; Fukuto, J. M.; Motohashi, H. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1177.
- [9] (a) Toohey, J. I. *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 1.
(b) Greiner, R.; Palinkas, Z.; Baesell, K.; Becher, D.; Antelmann, H.; Nagy, P.; Dick, T. P. *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, *19*, 1749.
(c) Kimura, H. *Free Radical Biol. Med.* **2016**, *96*, S4.
(d) Yadav, P. K.; Martinov, M.; Vitvitsky, V.; Seravalli, J.; Wedmann, R.; Filipovic, M. R.; Banerjee, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 289.
- [10] (a) Hildebrandt, T. M.; Grieshaber, M. K. *FEBS J.* **2008**, *275*, 3352;
(b) Libiad, M.; Yadav, P. K.; Vitvitsky, V.; Martinov, M.; Banerjee, R. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 30901.
(c) Landry, A. P.; Moon, S.; Kim, H.; Yadav, P. K.; Guha, A.; Cho, U.-S.; Banerjee, R. *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 1515.
- [11] (a) Ihara, H.; Kasamatsu, S.; Kitamura, A.; Nishimura, A.; Tsutsuki, H.; Ida, T.; Ishizaki, K.; Toyama, T.; Yoshida, E.; Hamid, H. A.; Jung, M.; Matsunaga, T.; Fujii, S.; Sawa, T.; Nishida, M.; Kumagai, Y.; Akaike, T. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30*, 1673.
(b) Nishida, M.; Nishimura, A.; Matsunaga, T.; Motohashi, H.; Kasamatsu, S.; Akaike, T. *Free Radical Biol. Med.* **2017**, *109*, 132.
(c) Khan, S.; Fujii, S.; Matsunaga, T.; Nishimura, A.; Ono, K.; Ida, T.; Ahmed, K. A.; Okamoto, T.; Tsutsuki, H.; Sawa, T.; Akaike, T. *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25*, 1403.
(d) Kasamatsu, S. *Antioxid. Redox Signaling* **2020**, *33*, 1320.
(e) Kanda, H.; Kumagai, Y. *Yakugaku Zasshi* **2020**, *140*, 1119.
- [12] (a) Sawa, T.; Zaki, M. H.; Okamoto, T.; Akuta, T.; Tokutomi, Y.; Kim-Mitsuyama, S.; Ihara, H.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Fujii, S.; Arimoto, H.; Akaike, T. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 727.
(b) Fujii, S.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tong, K. I.; Ida, T.; Okamoto, T.; Ahtesham, A. K.; Ishima, Y.; Motohashi, H.; Yamamoto, M.; Akaike, T. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23970.
(c) Fujii, S.; Sawa, T.; Nishida, M.; Ihara, H.; Ida, T.; Motohashi, H.; Akaike, T. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *595*, 140.
- [13] (a) Abiko, Y.; Yoshida, E.; Ishii, I.; Fukuto, J. M.; Akaike, T.; Kumagai, Y. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 1301.
(b) Millikin, R.; Bianco, C. L.; White, C.; Saund, S. S.; Henriquez, S.; Sosa, V.; Akaike, T.; Kumagai, Y.; Soeda, S.; Toscano, J. P.; Lin, J.; Fukuto, J. M. *Free Radical Biol. Med.* **2016**, *97*, 136.
(c) Zivanovic, J.; Kouroussis, E.; Schott-Roux, S.; Filipovic, M. R. *Free Radical Biol. Med.* **2017**, *112*, 187.
(d) Ju, Y.; Fu, M.; Stokes, E.; Wu, L.; Yang, G. *Molecules* **2017**, *22*, 1334.
(e) Aroca, A.; Gotor, C.; Romero, L. C. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1369.
(f) Kimura, H. *Brit. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 720.
(g) Pedre, B.; Dick, T. P. *Biol. Chem.* **2021**, *402*, 223.
- [14] (a) Bailey, T. S.; Zalcharov, L. N.; Pluth, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10573.
(b) Bailey, T. S.; Pluth, M. D. *Free Radical Biol. Med.* **2015**, *89*, 662.
- [15] (a) Liang, D.; Wu, H.; Wong, M. W.; Huang, D. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4196.
(b) Cai, Y.-R.; Hu, C.-H. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 6359.
(c) Cerda, M. M.; Hammers, M. D.; Earp, M. S.; Zakharov, L. N.; Pluth, M. D. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2314.
(d) Nagai, S.; Yoshida, M.; Takigawa, Y.; Torii, S.; Koshiishi, I. *Food Chem.* **2020**, 128511.
- [16] Zheng, Y.; Yu, B.; Li, Z.; Yuan, Z.; Organ, C. L.; Trivedi, R. K.; Wang, S.; Lefer, D. J.; Wang, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 11749.
- [17] Yuan, Z.; Zheng, Y.; Yu, B.; Wang, S.; Yang, X.; Wang, B. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6364.
- [18] Jarosz, A. P.; Wei, W.; Gauld, J. W.; Auld, J.; Ozcan, F.; Aslan, M.; Mutus, B. *Free Radical Biol. Med.* **2015**, *89*, 512.
- [19] Dillon, K. M.; Carrazzone, R. J.; Wang, Y.; Powell, C. R.; Matson, J. B. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 606.
- [20] Powell, C. R.; Dillon, K. M.; Wang, Y.; Carrazzone, R. J.; Matson, J. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 6324.
- [21] Kuivila, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 870.
- [22] Monks, T. J.; Jones, D. C. *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 425.
- [23] Bora, P.; Chauhan, P.; Manna, S.; Chakrapani, H. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 7916.
- [24] Hankins, R. A.; Suarez, S. I.; Kalk, M. A.; Green, N. M.; Harty, M. N.; Lukesh, J. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 22238.
- [25] (a) Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18515.
(b) Bandyopadhyay, U.; Das, D.; Banerjee, R. K. *Curr. Sci.* **1999**, *77*, 658.
- [26] Wang, Y.; Dillon, K. M.; Li, Z.; Winckler, E. W.; Matson, J. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 16698.
- [27] Roger, T.; Raynaud, F.; Bouillaud, F.; Ransy, C.; Simonet, S.; Crespo, C.; Bourguignon, M.; Villeneuve, N.; Vilaine, J.; Artaud, I. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2268.
- [28] Artaud, I.; Galaron, E. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2361.
- [29] Kang, J.; Xu, S.; Radford, M. N.; Zhang, W.; Kelly, S. S.; Day, J. J.; Xian, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 5893.
- [30] Khodade, V. S.; Toscano, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 17333.
- [31] Khodade, V. S.; Pharoah, B. M.; Paolucci, N.; Toscano, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 4309.
- [32] Chaudhuri, A.; Venkatesh, Y.; Das, J.; Gangopadhyay, M.; Maiti, T. K.; Singh, N. D. P. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 11441.
- [33] Fan, Y.; Pedersen, O. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 55.
- [34] Dillon, K. M.; Morrison, H. A.; Powell, C. R.; Carrazzone, R. J.; Ringel-Scaia, V. M.; Winckler, E. W.; Council-Troche, R. M.; Allen, I. C.; Matson, J. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 6061.

(Lu, Y.)