

# 黄酮类化合物对细胞色素 P450 CYP1A2 的抑制作用及其构效关系研究

李建康<sup>1</sup>, 和 凡<sup>1</sup>, 毕惠嫦<sup>1</sup>, 左 中<sup>2</sup>, 刘柏东<sup>1</sup>, 罗海彬<sup>1\*</sup>, 黄 民<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学 药学院, 广东 广州 510080; 2. 香港中文大学 药剂学院, 香港 沙田)

**摘要:** 利用本实验室已建立的体外肝微粒体模型, 测定 36 个黄酮类单体化合物对人细胞色素 P450 CYP1A2 的抑制活性, 并使用三维定量构效关系方法研究化合物的分子结构参数与其抑制活性之间的关系。CoMSIA 模型证实黄酮类化合物的结构参数与其 CYP1A2 抑制活性存在明显的相关性(模型的相关系数  $R^2$  为 0.948), 且有良好的预测能力(交叉验证相关系数  $q^2$  为 0.630), 同时使用“留五法”证实模型的稳定性和可靠性。结果表明, 相对于黄酮,  $\alpha$ -萘黄酮的  $\pi$ - $\pi$  共轭体系更有利于提高化合物的抑制活性。根据获得的模型的三维等势图, 在  $\alpha$ -萘黄酮基础上, 6,3',4' 位引入带正电基团或是疏水基团, 同时 5 位引入带负电基团, 能有效改善化合物的 CYP1A2 抑制活性。

**关键词:** 细胞色素 P450 CYP1A2; 抑制活性; 黄酮类化合物; 定量构效关系; 药物设计

中图分类号: R916.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)12-1198-07

## Inhibition of human cytochrome P-450 CYP1A2 by flavonoids: a quantitative structure-activity relationship study

LI Jian-kang<sup>1</sup>, HE Fan<sup>1</sup>, BI Hui-chang<sup>1</sup>, ZUO Zhong<sup>2</sup>, LIU Bai-dong<sup>1</sup>,  
LUO Hai-bin<sup>1\*</sup>, HUANG Min<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;  
2. School of Pharmacy, the Chinese University of Hong Kong, Shatin, N. T., Hong Kong, China)

**Abstract:** The inhibition activity of 36 flavonoids against CYP1A2 was determined by our previously developed *in vitro* method. The Comparative Molecular Similarity Indexes Analysis (CoMSIA) approach was used to probe the quantitative relationships between the flavonoids' molecular structural descriptors and their inhibitory activities. A reliable CoMSIA model with the combined electrostatic and hydrophobic fields was derived with the regression coefficient  $R^2$  of 0.948 and the cross-validation regression coefficient  $q^2$  of 0.630, separately, which is capable of elucidating the quantitative relationship between the 3D structural descriptors of the flavones and their bioactivities. Comparing with flavone, the larger  $\pi$ - $\pi$  conjugated system of  $\alpha$ -naphthoflavone significantly improved the biologically inhibitory ability. Based on the core structure of the latter, either electropositive substituents or hydrophobic groups at the 6, 3', and 4' ring positions or electronegative counterparts at the 5 ring position, can enhance the inhibitory potency against CYP1A2 according to the CoMSIA contour maps.

**Key words:** cytochrome P-450 CYP1A2; inhibition; flavonoids; quantitative structure-activity relationship; drug design

CYP1A2 亚家族是近年来药物代谢研究领域备受关注的热点之一, 该酶主要在肝脏表达, 其含量

占 CYP450 总量的 13%, 仅次于 CYP3A 和 CYP2C, 代谢临床上 5% ~ 10% 的常规应用药物, 与许多药物的相互作用有关<sup>[1]</sup>。CYP1A2 参与多种与癌症发生密切相关的化学性毒物的代谢, 包括各种前致癌剂, 如黄酮酶毒素、芳香化合物、芳香胺和杂环胺等氨基化合物主要依靠 CYP1A2 代谢并激活, 生成

收稿日期: 2008-07-07.

\* 通讯作者 Tel: 86-20-39943011,  
E-mail: huangmin@mail.sysu.edu.cn  
Tel: 86-20-39943031,  
E-mail: hbluo2005@yahoo.com.cn

有致癌性的物质<sup>[2-4]</sup>。CYP1A2 还与癌症、炎症、心肌梗死等疾病的发病易感性相关<sup>[5]</sup>。而在我国, 某些癌症如原发性肝癌、食道癌的发病率都相对高于欧美国家, 其发生与化学致癌因素密切相关, 因此深入研究抑制剂对 CYP1A2 的抑制活性特点具有重要的意义, 也为有效地预防和治疗环境致癌物、化学毒物和药物等外源化合物引起的癌症提供一定的临床指导。

黄酮类化合物 (flavonoids) 是一类在自然界广泛分布的多酚类抗氧化剂, 存在于蔬菜、水果、草药等植物中, 是植物在长期自然生长过程中产生的次级代谢产物。到目前为止, 已发现几百种不同类型的黄酮类化合物拥有广泛的生物活性和药理活性, 例如降血脂、调节心血管系统、清除自由基、抗氧化、抗炎, 抗突变、抗肿瘤、调节免疫、防治动脉硬化、降血糖、抗 HIV 活性等<sup>[6-12]</sup>。大量的研究证实, 黄酮类化合物对 CYP1A2 有明显的抑制作用, 如  $\alpha$ -萘黄酮 ( $\alpha$ -naphthoflavone) 和呋拉茶碱 (furfurylline) 能特定地抑制 CYP1A2, 并随后抑制来自食物的致癌物质的致突变性<sup>[13-15]</sup>。

比较分子场分析法 (CoMFA) 和比较分子相似因子分析 (CoMSIA)<sup>[16-19]</sup> 是目前应用最为广泛的三维定量构效研究方法 (3D-QSAR)。CoMFA 方法基于如下假设: 化合物的生物活性取决于化合物与受体分子之间的立体和静电等非共价键作用。CoMFA 分析方法通过研究化合物分子周围的空间场和静电场的分布特征, 比较不同化合物分子周围力场分布特征的差异, 进而建立化合物力场分布与生物活性的定量相关关系。

本研究通过体外人肝微粒体法检测黄酮类化合物对 CYP1A2 的抑制活性, 采用 3D-QSAR 方法 (包括 CoMFA 和 CoMSIA) 研究黄酮类化合物分子结构参数与对 CYP1A2 抑制活性之间的三维定量关系, 建立相应的结构活性关系模型, 并结合 CYP1A2 晶体结构分析, 以期深入了解其抑制机制, 为设计高活性 CYP1A2 抑制剂提供理论参考。

## 材料与方 法

**材料** 5,7-双羟基黄酮 (5,7-dihydroxy-flavone, 2)、黄酮 (flavone, 4)、7-单羟基黄酮 (7-monohydroxy-flavone, 5)、汉黄芩素 (wogonin, 6)、5-单羟基黄酮 (5-monohydroxy-flavone, 7)、3-单羟基黄酮 (3-monohydroxy-flavone, 8)、千层纸黄素 (oroxylin, 9)、7,8-双羟基黄酮 (7,8-dihydroxy-flavone, 11)、3,7-双羟基

黄酮 (3,7-dihydroxy-flavone, 12)、7,2'-双羟基黄酮 (7,2'-dihydroxy-flavone, 13)、7,3'-双羟基黄酮 (7,3'-dihydroxy-flavone, 14)、6-单羟基黄酮 (6-monohydroxy-flavone, 16)、4'-单羟基黄酮 (4'-monohydroxy-flavone, 18)、3'-单羟基黄酮 (3'-monohydroxy-flavone, 20)、2'-单羟基黄酮 (2'-monohydroxy-flavone, 21)、7,4'-双羟基黄酮 (7,4'-dihydroxy-flavone, 24)、6,7-双羟基黄酮 (6,7-dihydroxy-flavone, 25)。以上标准品由香港中文大学药剂学院左中教授提供, 纯度 > 99%。高良姜素 (galangin, 3)、芹菜素 (apigenin, 10)、山柰甲黄素 (kaempferide, 15)、山柰酚 (kaempferol, 17)、异鼠李素 (isorhamnetin, 19)、槲皮素 (quercetin, 22)、黄芩素 (baicalein, 23)、柚皮素 (naringenin, 26)、石吊兰素 (lysinotin, 27)、杜鹃素 (farrerol, 28)、桑黄素 (morin, 29)、橙皮素 (hesperetin, 30)、山姜素 (alpinetin, 31)、染料木素 (genistein, 32)、去水淫羊藿黄素 (anhydroicaritin, 33)、牡荆子黄素 (vitexicarpin, 34)、四甲基黄酮 (5,6,7,4'-tetramethoxyflavone, 35)、五甲基黄酮 (5,6,7,8,4'-pentamethoxy flavone, 36)。以上标准品均购自中国药品生物制品检定所, 纯度 > 99%。 $\alpha$ -萘黄酮 ( $\alpha$ -naphthoflavone, 99.99%, Sigma, 1)、非那西丁标准品 (phenacetin, 99.99%, Sigma)、扑热息痛标准品 (paracetamol, 99.99%, Sigma)、氯雷他定标准品 (loratadine, 99.4%, 中国药品生物制品检定所)、NADPH tetrasodium salt (AppliChem, 德国)。人肝源: 中山大学第一附属医院肝移植病人的受体肝, 取没有病灶的部分于 -80 °C 冰箱保存备用。Waters 2695-Quattro Micro 型液相色谱-质谱联用系统 (电喷雾离子化源、Surveyor 输液泵及自动进样器以及 MassLynx 数据处理软件)、C<sub>18</sub> XTerra MS 分析柱 (100 mm × 2.1 mm, 5  $\mu$ m, Waters, USA)。

**人肝微粒体的制备** 人肝组织的收集得到中山大学医学伦理委员会的批准。肝微粒体的制备采用超高速离心法: 取没有病灶的肝组织, 剪碎 (4 °C 冰浴), 并用生理盐水、蔗糖溶液洗涤至无血色, 匀浆, 在 4 °C、16 000 × g 条件下离心 20 min; 取上清液, 在 4 °C、100 000 × g 条件下离心 60 min; 取沉淀用焦磷酸钾溶液混悬均匀, 再于 4 °C、100 000 × g 条件下离心 60 min, 弃上清液, 沉淀用含 20% 甘油的 Tris-HCl 缓冲液重悬并混匀, Lowry 法测定肝微粒体蛋白质浓度, -80 °C 保存备用。

**体外人肝微粒体模型考察黄酮类化合物对 CYP1A2 的抑制活性** 本法是在本实验室建立的体

外肝微粒体模型的基础上,通过检测黄酮类化合物对 CYP1A2 的特异性探针底物非那西丁在体外人肝微粒体中产生代谢产物扑热息痛的抑制程度,从而测定黄酮类化合物对 CYP1A2 的抑制活性<sup>[20]</sup>。人肝微粒体孵育体系总体积 500  $\mu\text{L}$ ,反应体系中包含 NADPH( $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、微粒体蛋白( $0.25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、磷酸盐缓冲液( $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4),内含  $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  非那西丁,一系列浓度的黄酮类化合物抑制剂。反应体系中有有机溶剂的含量小于 0.5%。反应在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  水浴中进行,预孵 5 min,加入 NADPH 启动反应,一定时间后,加冰乙酸乙酯 2 mL 终止反应。加入  $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯雷他定内标液  $10\text{ }\mu\text{L}$ ,漩涡振荡 2 min,  $2\ 500 \times g$  离心 10 min,转移上层有机相至 10 mL 离心管,真空挥干,残渣用甲醇-超纯水(80:20,  $v/v$ )  $500\text{ }\mu\text{L}$  复溶,漩涡混合 2 min,  $9\ 000 \times g$  离心 5 min,取上清液  $350\text{ }\mu\text{L}$  加入进样瓶,进样  $10\text{ }\mu\text{L}$  分析代谢产物扑热息痛的浓度。以代谢产物的生成速率 [ $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{protein}) \cdot \text{min}^{-1}$ ] 表示 CYP1A2 亚型的活性。代谢产物扑热息痛的分析方法为 LC-MS/MS 法,扑热息痛肝微粒体标准曲线浓度范围为 0.075、0.15、0.3、0.6、1.2、2.4 及  $4.8\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,低、中、高的扑热息痛的质控样品浓度为 0.15、0.6 及  $2.4\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。液相色谱条件:分离柱  $\text{C}_{18}$  XTerra MS 分析柱( $100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ , Waters, USA);流动相为甲醇-水(含 0.1% 甲酸,70:30,  $v/v$ ),流速  $300\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温为室温。分析时间为 2.8 min。质谱条件:离子源为电喷雾电离源( $\text{ESI}^+$ );电喷雾电压为  $3\ 500\text{ V}$ ;加热毛细管温度为  $350\text{ }^\circ\text{C}$ ;鞘气( $\text{N}_2$ )压力为 30 psi,辅气( $\text{N}_2$ )压力为 10 psi;扫描峰宽为 0.7 Th;扫描时间为 0.1 s。采用选择反应监测模式(SRM),监测离子为:  $m/z\ 152 \rightarrow 110$ (扑热息痛),  $m/z\ 383 \rightarrow 266$ (内标)。

每个黄酮类化合物先配制为 1、10 及  $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  等 3 种浓度进行实验,初步确定其  $\text{IC}_{50}$  值的范围,根据此范围再合理配制 6 个浓度点,每个浓度平行 3 个样本进行实验。阴性对照则用等量的缓冲液代替。探针代谢产物的峰面积值和浓度经自带的 MassLynx 数据处理软件进行处理,最后通过 GraphPad Prism 5.0 软件的 Sigmoidal dose-response 模式,计算黄酮类化合物抑制 CYP1A2 的  $\text{IC}_{50}$  值。

**计算方法** 在 Linux Redhat 9.0 平台上,使用 Tripos 公司的 SYBYL 7.3 分子模拟软件包完成所有分子模型构建和统计分析工作。黄酮类化合物的抑

制活性数据( $\text{IC}_{50}$ )来源于体外抑制实验,见表 1,模型构建中所有生物活性数据采用黄酮类化合物对 CYP1A2 抑制活性的负对数( $\text{pIC}_{50}$ )。下面计算如非特别说明,均使用 SYBYL 构造程序缺省参数。

**化合物活性构象的确定及分子系列叠合** 确定模板分子的活性构象是 CoMFA 分析的首要 and 关键步骤。提取 CYP1A2 复合物(PDB,晶体代码为 2HI4)中的  $\alpha$ -萘黄酮(1,表 1)作为初始构象,其他化合物在此基础上通过修改或增加相应的原子或基团进行搭建。对所有化合物均采用 Tripos 力场进行结构优化,荷载 MMFF94 电荷。优化过程中采用 Powell 能量梯度法,收敛限定为  $0.01\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$ 。以生物活性最高的分子  $\alpha$ -萘黄酮(1)作为模板,去掉 5,7 位并的苯环以及 2 位连接的苯环,最后去掉 2 和 3 位的所有原子,所得结构作为最大共同子结构,进行叠合。

**CoMFA/CoMSIA 与 PLS 分析** CoMFA 分析由 SYBYL 7.3 中的 QSAR 模块完成。分析力场包括立体场和静电场,把前面叠合好的所有分子放入  $x, y, z$  正负方向长度为  $-13/11\text{ \AA}$ 、 $-10/10\text{ \AA}$ 、 $-8/7\text{ \AA}$  的三维网格中,以  $\text{sp}^3$  杂化碳原子为探针原子计算力场能量,步长为  $1\text{ \AA}$ ,立体场能能量阈值为  $25\text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,电场能阈值为  $25\text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。其余选项均采用默认值。对化合物的结构参数以及相对应的  $\text{pIC}_{50}$  值进行偏最小二乘回归分析(PLS),过程使用“留一法”(Leave-One-Out, LOO)交叉检验方式,以获得最大交叉验证系数  $q^2$ ,同时确定最佳主成分数(PC)。然后使用非交叉验证的偏最小二乘法建立比较分子力场模型。

CoMSIA 选取默认值 0.3 作为实验衰减因子(attenuation factor)值。CoMSIA 场的类型共有 5 种,包括立体场(S)、静电场(E)、疏水场(H)、氢键给体场(D)和氢键受体场(A)。分子与网格边界间的距离、格点大小与 CoMFA 方法设置相同,方程拟合步骤也相同。

## 结果

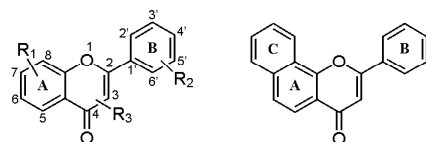
### 1 黄酮类化合物对 CYP1A2 的抑制活性

从表 1 的活性数据可以看出,羟基取代的位置对黄酮类化合物的活性有显著的影响。相对于黄酮(4,表 1),单羟基取代都使得化合物的抑制活性降低, $\text{IC}_{50}$  值趋势按 7、5、3、6、4'、3'、2' 位取代递增,如化合物 **5** ( $0.240\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) < **7** ( $0.314\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) < **8** ( $0.357\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) < **16** ( $1.282\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$L^{-1}$ ) < **18** (1.648  $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ ) < **20** (1.977  $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ ) < **21** (2.323  $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ ), 尤其是 6、4'、3'、2' 位单取代羟基明显降低化合物的活性。对于 A 环的单羟基或双羟基取代, 抑制活性整体上比 B 环

好。同在 A 环上的取代, 6 位的羟基取代活性比 5、7、3 位显著降低, 如 7-单羟基黄酮 (0.240  $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ , **5**)、5-单羟基黄酮 (0.314  $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ , **7**)、3-单羟基黄酮 (0.357  $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ , **8**) 的抑制活性分别是

**Table 1** The experimental  $IC_{50}$  values ( $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ ) of flavonoids against CYP1A2



No.	Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$IC_{50}$ / $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$	95% Confidence interval
1	$\alpha$ -Naphthoflavone	C <sub>ring</sub>	-	-	0.049	0.033 - 0.065
2	5,7-Dihydroxy-flavone	5-OH,7-OH	-	-	0.054	0.035 - 0.073
3	Galangin	5-OH,7-OH	-	3-OH	0.153	0.097 - 0.208
4	Flavone	-	-	-	0.234	0.182 - 0.286
5	7-Monohydroxy-flavone	7-OH	-	-	0.240	0.174 - 0.306
6	Wogonin	5-OH,7-OH,8-OCH <sub>3</sub>	-	-	0.248	0.177 - 0.320
7	5-Monohydroxy-flavone	5-OH	-	-	0.314	0.256 - 0.372
8	3-Monohydroxy-flavone	-	-	3-OH	0.357	0.311 - 0.404
9	Oroxylin	5-OH,7-OH,6-OCH <sub>3</sub>	-	-	0.579	0.456 - 0.702
10	Apigenin	5-OH,7-OH	4'-OH	-	0.597	0.431 - 0.763
11	7,8-Dihydroxy-flavone	7-OH	-	8-OH	0.631	0.499 - 0.764
12	3,7-Dihydroxy-flavone	7-OH	-	3-OH	0.703	0.612 - 0.794
13	7,2'-Dihydroxy-flavone	7-OH	2'-OH	-	1.113	0.910 - 1.317
14	7,3'-Dihydroxy-flavone	7-OH	3'-OH	-	1.174	0.923 - 1.425
15	Kaempferide	5-OH,7-OH	4'-OCH <sub>3</sub>	3-OH	1.265	1.108 - 1.422
16	6-Monohydroxy-flavone	6-OH	-	-	1.282	1.095 - 1.470
17	Kaempfero	5-OH,7-OH	4'-OH	3-OH	1.489	1.225 - 1.754
18	4'-Monohydroxy-flavone	-	4'-OH	-	1.648	1.512 - 1.784
19	Isorhamnetin	5-OH,7-OH	3'-OCH <sub>3</sub> ,4'-OH	3-OH	1.698	1.481 - 1.915
20	3'-Monohydroxy-flavone	-	3'-OH	-	1.977	1.651 - 2.303
21	2'-Monohydroxy-flavone	-	2'-OH	-	2.323	1.851 - 2.793
22	Quercetin	5-OH,7-OH	3'-OH,4'-OH	3-OH	2.978	2.428 - 3.528
23	Baicalein	5-OH,6-OH,7-OH	-	-	3.069	2.661 - 3.477
24	7,4'-Dihydroxy-flavone	7-OH	4'-OH	-	3.404	2.642 - 4.166
25	6,7-Dihydroxy-flavone	7-OH	-	6-OH	9.120	7.235 - 11.005
26	Naringenin <sup>a</sup>	5-OH,7-OH	4'-OH	-	23.174	18.065 - 28.283
27	Lysionotin	5-OH,7-OH, 6-CH <sub>3</sub> ,8-CH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	-	24.150	20.121 - 28.178
28	Farrerol <sup>a</sup>	5-OH,7-OH, 6-CH <sub>3</sub> ,8-CH <sub>3</sub>	4'-OH	-	24.570	19.230 - 29.911
29	Morin	5-OH,7-OH	2'-OH,4'-OH	3-OH	25.410	20.119 - 30.701
30	Hesperetin	5-OH,7-OH	2'-OH,3'-OCH <sub>3</sub>	-	25.527	18.526 - 32.528
31	Alpinetin <sup>a</sup>	7-OH,5-OCH <sub>3</sub>	-	-	29.170	26.458 - 31.881
32	Genistein <sup>b</sup>	5-OH,7-OH	4'-OH	-	31.915	28.147 - 35.683
33	Anhydroaicitin	5-OH,7-OH, 8-CH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	3-OH	31.990	27.836 - 36.145
34	Vitexicarpin	5-OH,6-OCH <sub>3</sub> ,7-OCH <sub>3</sub>	3'-OH,4'-OCH <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	35.660	31.864 - 39.456
35	5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone	5-OCH <sub>3</sub> ,6-OCH <sub>3</sub> , 7-OCH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	-	40.580	31.089 - 50.071
36	5,6,7,8,4'-Pentamethoxyflavone	5-OCH <sub>3</sub> ,6-OCH <sub>3</sub> , 7-OCH <sub>3</sub> ,8-OCH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	-	49.450	35.238 - 63.662

<sup>a</sup>There is not a double bond between the ring positions 2 and 3. <sup>b</sup>The B ring is linked to the ring position 3

6-单羟基黄酮 ( $1.282 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **16**) 的 5、4、3.5 倍。但是,某些位置的双羟基取代对活性有一定提高,例如 5,7-双羟基黄酮 ( $0.054 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **2**) 的抑制活性仅次于  $\alpha$ -萘黄酮 ( $0.049 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **1**)。可能适当位置上两个羟基同时取代可以起到协同的效果。

如果化合物在 2 和 3 位的碳碳双键打开成单键,破坏了黄酮的共轭体系,则大大降低了化合物的抑制活性,如化合物柚皮素 ( $23.174 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **26**)、杜鹃素 ( $24.570 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **28**)、山姜素 ( $29.170 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **31**)。

甲氧基取代的效果优于羟基,如异鼠李素 ( $1.698 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **19**) 和槲皮素 ( $2.978 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **22**)。异黄酮(3-位苯基, B 环)的抑制能力远小于黄酮(2-位苯基),如染料木素 ( $31.915 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **32**) 和芹菜素 ( $0.597 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , **10**)。

## 2 CoMFA/CoMSIA 模型

表 2 显示了 CoMFA 和 CoMSIA 采用不同分子场时得到的构效关系模型的统计结果。从交互验证回归系数(通常要求  $q^2$  必须大于 0.5)来看,考虑立体场、静电场和疏水场的 CoMSIA 模型明显优于 CoMFA 模型,CoMSIA 模型对未测试化合物具有较好的活性预测能力。在前期的工作中,作者已经证明了采用 CoMSIA 往往会比 CoMFA 得到更优的结构活性关系模型<sup>[21,22]</sup>。CoMFA 分析得到统计学参数:交叉验证系数  $q^2$  为 0.373,最佳主成分数为 8,非交叉验证的相关系数  $R^2$  为 0.967,估算的标准误差  $s$  为 0.183,统计量方差  $F$  为 97.7。CoMFA 模型中,立体场和静电场对构效方程的贡献分别为

39.9% 和 60.1%,说明静电场对化合物抑制活性占主导作用。

只考虑立体场和静电场时,CoMSIA/S + E 模型的  $q^2$  为 0.512,优于 CoMFA 模型。在此基础上,再引入疏水场时,所获得 CoMSIA/S + E + H 模型具有较好的统计学结果 ( $q^2 = 0.611$ ,  $PC = 7$ ,  $R^2 = 0.945$ ,  $F = 68.9$ ,  $s = 0.230$ ),且立体场、疏水场和静电场对模型贡献分别为 12.2%、32.2% 和 55.6%。很明显,对黄酮类化合物抑制活性的影响,静电场因素的贡献最大(超过 55%),疏水场因素的贡献次之,而立体场因素贡献最小。

注意到 CoMSIA/S + E + H 模型中立体场的贡献只有 12.2%,删除立体场后得到的 CoMSIA/E + H 模型,其统计学参数 ( $q^2 = 0.630$ ,  $PC = 8$ ,  $R^2 = 0.948$ ,  $F = 61.3$ ,  $s = 0.229$ ) 稍高于 CoMSIA/S + E + H 模型,其中静电场和疏水场的贡献分别为 62.3% 和 37.7%。这两个 CoMSIA 模型都说明,黄酮类化合物对 CYP1A2 的抑制作用主要由疏水场和静电场占主导地位,其中静电场的作用均大于 55%。CoMSIA/E + H 和 CoMSIA/S + E + H 模型在预测能力上 ( $q^2$ ) 明显高于 CoMFA 所得到的构效关系模型。相对于 CoMFA 模型,CoMSIA/E + H 和 CoMSIA/S + E + H 考虑疏水场对抑制活性的影响,从而提高模型的准确性和预测能力,可以更清楚地解释影响化合物抑制活性的因素。图 1 是化合物的实验 CYP1A2 抑制活性和预测抑制活性之间的线性拟合图。

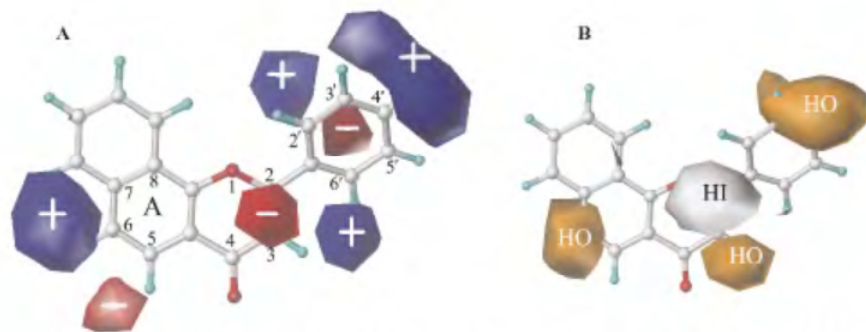
## 3 CoMSIA 模型的三维等势图

图 2 是 CoMSIA/S + E + H 模型的三维系数等势图,参照分子为活性最高的化合物  $\alpha$ -萘黄酮(**1**)。

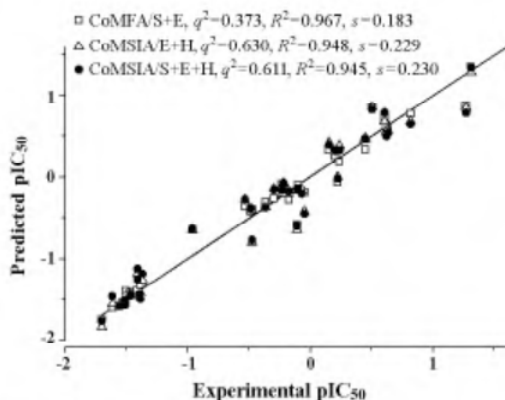
Table 2 Summary of the partial-least-squares analyses

Model	$R^2$	$q^2$	$F$	$s$	PC	Contribution to the model/%				
						S	E	H	A	D
CoMFA										
S + E	0.967	0.373	97.7	0.183	8	39.9	60.1	-	-	-
CoMSIA										
S + E	0.937	0.512	72.4	0.242	6	26.0	74.0	-	-	-
S + H	0.920	0.464	39.0	0.283	8	23.4	-	76.6	-	-
S + E + H	0.945	0.611	68.9	0.230	7	12.2	55.6	32.2	-	-
E + H	0.948	0.630	61.3	0.229	8	-	62.3	37.7	-	-
A + D	0.131	-0.146	5.1	0.832	1	-	-	-	26.0	74.0
S + E + H + A + D	0.940	0.439	62.8	0.241	7	9.8	35.9	24.4	8.7	21.2
E + H + D	0.940	0.464	63.1	0.240	7	-	44.5	29.8	-	25.7
E + H + A	0.941	0.550	64.1	0.238	7	-	50.8	34.9	14.3	-

$R$ ,  $q$ ,  $F$ ,  $s$ , and PC are the conventional Pearson regression coefficient, cross-validated regression coefficient, statistical  $F$  value, standard error of estimate, and optimal number of principal components, respectively. S: Steric; E: Electrostatic; H: Hydrophobic; A: H-Bond acceptor; D: H-Bond donor



**Figure 2** Contour maps of the CoMSIA models with the combined electrostatic and hydrophobic fields based on the biologically inhibitory activities against CYP1A2. Contour plots elucidate the electrostatic and hydrophobic features in (A–B), separately. In (A), blue (labeled as “+”) and red (“-”) contours refer to regions where electropositive substituents are favorable (w. r. t. stronger inhibition) and unfavorable, respectively, whereas in (B), orange (“HO”) or grey (“HI”) contours indicate regions where hydrophobic or hydrophilic groups are favorable. Please refer to the web-version for the alternative color interpretation



**Figure 1** Plots of predicted versus experimental biological activities for 36 flavonoids. S: Steric; E: Electrostatic; H: Hydrophobic

图 2A 中红色表示在该区域引入负电性基团对提高抑制活性有利,蓝色则表示增加正电荷取代基有利于活性的提高;2B 中橙色表示在该区域引入疏水基团有利于提高化合物的抑制活性,灰色则表示亲水基团对活性有利。

## 讨论

CoMSIA/E + H + D、CoMSIA/E + H + A、CoMSIA/S + E + H + A + D 模型的分析表明,当考虑氢键场以后,所获得 3 个模型的交互验证回归系数均明显降低,可能由于氢键与静电场之间存在一定的影响,从而导致了模型的不稳定性,加入氢键场以后反而不能得到好的预测结果。

为了验证模型的可靠性,作者分别对 CoMSIA/S +

E + H 和 CoMSIA/E + H 模型使用“留五法”(Leave-Five-Out, 每次随机删除 5 个化合物)<sup>[23]</sup>交叉检验方式进行 PLS 分析。30 次模建的平均结果( $q^2$ )分别为 0.615 和 0.628,与现有的结果非常相近(0.611 和 0.630),从另一侧面证实 CoMSIA/S + E + H 和 CoMSIA/E + H 模型的稳定性和可靠性。

从图 2A 可以看出,除小部分红色区域,6、7、2'、3'、4'、5'、6'位置附近都为大面积蓝色区域,在这些区域添加带负电基团(如-OH,其 MMFF94 电荷均为  $-0.083|e|$ )则使化合物的抑制活性降低,尤其 6、4'、3'、2'位单取代羟基明显增高化合物的  $IC_{50}$  值,如化合物 16、18、20、21;反之在这些区域添加带正电基团,如将 6-单羟基黄酮(16)的羟基取代成甲基(其 MMFF94 电荷为  $0.280|e|$ ),则可能增加化合物的抑制活性。

在 6、7、3、3'、4'、5'等 6 个取代位置有明显的橙色区域,说明在这些区域引入疏水性较强的基团(如苯基、烷基等等)有利于提高分子的生物活性。接上疏水基团,这也从另外一个侧面说明 6-单羟基黄酮(16)的羟基取代成甲基可能增加化合物的抑制活性。比较化合物 19 和 22,将后者在 3'位的羟基替换成甲基后,前者的抑制活性优于后者。

相对于未取代黄酮(4), $\alpha$ -萘黄酮(1)在 7 和 8 位连接苯环后活性的得到明显提高。通过  $\alpha$ -萘黄酮和 CYP1A2 的晶体结构分析,连接的苯环使  $\alpha$ -萘黄酮共轭体系增大,更容易与 CYP1A2 的残基 PHE226 发生共轭作用,从而使  $\alpha$ -萘黄酮的抑制活性远大于未取代黄酮。柚皮素( $23.174 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 26)在 2

和 3 位只存在单键,破坏了黄酮( $0.234 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 4)的原有的共轭体系,抑制活性明显降低。

综上分析,相对于 CoMFA 分析方法,本文所获得的 CoMSIA 模型(考虑静电场和疏水场)不仅具有更良好的预测能力( $q^2 = 0.630$ ),而且对于影响化合物生物活性的因素的描述也更为详细而全面。研究显示,黄酮类化合物和受体的静电相互作用对化合物的抑制活性起支配作用。根据 CoMSIA 模型的三维等势图,可以得到具有高生物活性的分子结构需求,在  $\alpha$ -萘黄酮(1)基础上,6、2'、3'、4'等位置上添加带正电基团或在 5 位上接入负电性基团(如羟基);6、3'、4'等位置上增加疏水基团(如烷基),将增强化合物与受体之间的相互作用,从而增加化合物的抑制活性。 $\alpha$ -萘黄酮可以作为 CYP1A2 抑制剂的候选先导化合物,进行具有针对性的局部的结构改造和优化,有望开发出具有更高 CYP1A2 抑制活性的化合物。

## References

- [1] Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005, 97: 125 - 134.
- [2] Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, et al. Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 7696 - 7700.
- [3] Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, et al. Role of cytochrome P450IA2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity [J]. *Pharmacogenetics*, 1995, 5: 259 - 274.
- [4] Guengerich FP, Parikh A, Turesky RJ, et al. Inter-individual differences in the metabolism of environmental toxicants: cytochrome P450 1A2 as a prototype [J]. *Mutat Res*, 1999, 428: 115 - 124.
- [5] Song LH, Qin XP, Dai WM. The relation between cytochrome P450IA2 and malignant tumors [J]. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med (山西中医学院学报)*, 2000, 1: 26 - 28.
- [6] Wang CY, Wu HK, Yu CQ, et al. Research advance of flavonoids [J]. *J Heilongjiang August First Land Reclamation Univ (黑龙江八一农垦大学学报)*, 2007, 19: 75 - 78.
- [7] Huang HY, Zha XL. Development in research of antitumor effect of flavones compounds [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志)*, 2002, 21: 428 - 433.
- [8] Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13: 572 - 584.
- [9] Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, et al. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10: 2795 - 2802.
- [10] Lin YM, Flavin MT, Cassidy CS, et al. Biflavonoids as novel antituberculosis agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 2101 - 2104.
- [11] Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids [J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 90: 157 - 177.
- [12] Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism [J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20: 187 - 210.
- [13] Zhou S, Gao Y, Jiang W, et al. Interactions of herbs with cytochrome P450 [J]. *Drug Metab Rev*, 2003, 35: 35 - 98.
- [14] Sesardic D, Boobis AR, Murray BP, et al. Furofylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1990, 29: 651 - 663.
- [15] Cho US, Park EY, Dong MS, et al. Tight-binding inhibition by alpha-naphthoflavone of human cytochrome P450 1A2 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1648: 195 - 202.
- [16] Ekins S, de Groot MJ, Jones JP. Pharmacophore and three-dimensional quantitative structure activity relationship methods for modeling cytochrome p450 active sites [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29: 936 - 944.
- [17] Akamatsu M. Current state and perspectives of 3D-QSAR [J]. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2: 1381 - 1394.
- [18] Kim KH, Greco G, Novellino EA. Critical review of recent CoMFA applications: Vol 12 - 14 [M/OL]. Amsterdam: Springer Netherlands Press, 1998: 257 - 315 [2008 - 07 - 07]. <http://www.springerlink.com/content/r06273516671w130>.
- [19] Korhonen LE, Rahnasto M, Mahonen NJ, et al. Predictive three-dimensional quantitative structure-activity relationship of cytochrome P450 1A2 inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 3808 - 3815.
- [20] He F, Bi HC, Xie ZY, et al. Rapid determination of six metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput inhibition screening of terpenoids [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 635 - 643.
- [21] Luo HB, Cheng CQ, Cheng YK. The retention properties of nucleobases in alkyl  $C_8$ -/ $C_{18}$ - and IAM-chromatographic systems in relation to  $\log P_{ow}$  [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 847: 245 - 261.
- [22] Luo HB, Cheng CQ, Cheng YK. Complex retention behavior of pyrimidines on biomembrane-mimic immobilized-artificial-membrane phase [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 853: 114 - 122.
- [23] Golbraikh A, Tropsha A. Beware of  $q^2$ ! [J]. *J Mol Graph Model*, 2002, 20: 269 - 276.