

水杨酸及其类似物抑制 β -内酰胺酶的构效关系研究

杨再昌^{1,2}, 杨小生^{1*}, 王伯初², 孙黔云¹

(1. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要: 目的 检测水杨酸及水杨酸的 19 个类似物对分离自铜绿假单胞菌的 β -内酰胺酶的抑制活性, 初步探讨它们的构效关系。方法 采用 Nitrocefin 法。结果 水杨酸对该酶的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 为 $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4 个类似物的 IC_{50} 比水杨酸低, 其余类似物的活性比水杨酸差。结论 水杨酸苯环上的羧基及邻位羟基是活性基团之一。水杨酸邻位上的羟基被羧基取代后能提高抑制活性。在水杨酸的苯环上增加磺酸基或硝基能提高抑制活性。苯环上的氨基可降低水杨酸的抑制活性。在苯甲酸的苯环上连接氯或氟与抑制活性无关。

关键词: 水杨酸; β -内酰胺酶; 构效关系

中图分类号: R916.2 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)03 - 0230 - 03

Structure-activity relationships of salicylic acid and its analogs in the inhibitory action on β -lactamase

YANG Zai-chang^{1,2}, YANG Xiao-sheng^{1*}, WANG Bo-chu², SUN Qian-yun¹

(1. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550004, China; 2. Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: **Aim** Nineteen compounds related to salicylic acid were evaluated for their *in vitro* activity of inhibiting β -lactamase isolated from a resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*, and their structure-activity relationships were examined. **Methods** Nitrocefin method was used. **Results** The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of salicylic acid inhibiting β -lactamase was $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; four analogs had IC_{50} lower than that of salicylic acid; fifteen analogs had IC_{50} higher than that of salicylic acid. **Conclusion** Examination of the structure-activity relationships of the compounds revealed that carboxyl group and adjoining hydroxyl group were active group, and replacement of adjoining hydroxyl by carboxyl increased activity nearly 4-fold. Moreover, addition of a sulfonic group at C-5 and nitro group at C-3, 5 of benzoic ring of salicylic acid resulted in a 2-fold to 3-fold increase in activity, addition of an amino group at C-5 of benzoic ring of salicylic acid decreased activity, add addition of -Cl or -F at C-2, 4 position of benzoic ring of benzoic acid did not show activity.

Key words: salicylic acid; β -lactamase; structure-activity relationships

β -内酰胺类抗生素在临床上广泛用于细菌感染的治疗, 由于耐药病原菌的出现, 这类抗生素的使用受到了挑战。细菌产生 β -内酰胺酶 (β -lactamase) 水解 β -内酰胺类抗菌素是引起耐药的主要原因。根据水解机制及氨基酸顺序, β -内酰胺酶可分为 4 类,

A, C, D 类酶的催化部位有一个起关键作用的亲核丝氨酸残基, B 类酶是一个金属蛋白, 需要 1 至 2 个锌离子参与才能发挥水解作用^[1]。

克拉维酸 (clavulanic acid) 能抑制 A, C, D 类酶的活性, 与阿莫西林等 β -内酰胺类抗生素组成复合制剂, 已应用于临床。然而, 克拉维酸不能抑制 B 类酶的活性, 并且已出现耐克拉维酸的菌株, 这些因素促使人们寻找新的 β -内酰胺酶抑制剂。迄今, 又发现了琥珀酸类、联苯四唑类、硫醇类、碳(杂)青霉

收稿日期: 2005-07-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30460150).

* 通讯作者 Tel: 86 - 851 - 3805459,

E-mail: yang_xiaosheng@yahoo.com

烯类、三氟甲基乙醇类和氧肟酸盐类化合物对 β -内酰胺酶有抑制作用^[2]。

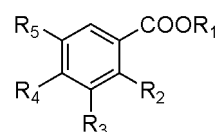
作者从一株对 β -内酰胺类抗生素及克拉维酸均耐药的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中分离了 β -内酰胺酶,通过筛选发现,水杨酸对该酶具有抑制活性,为设计新的 β -内酰胺酶抑制剂,本文初步对水杨酸及其类似物进行了构效关系分析。

材料与方 法

β -内酰胺酶的分离纯化 对 β -内酰胺类抗生素及克拉维酸均耐药的铜绿假单胞菌菌株由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提供。用普通肉汤培养铜绿假单胞菌,在 37 °C 摇床 (150 r·min⁻¹) 中培养 18 h 后加入青霉素钠至 100 μ g·mL⁻¹,继续培养 6 h,得到菌液 5 L。经离心处理得沉淀物,用 0.05 mol·L⁻¹ PBS 液 (pH 7.0) 洗 3 次后配成 50% (w/v) 的菌液,菌液反复冻融,离心 (12 000 r·min⁻¹) 得上清液,即为粗酶液。用葡聚糖凝胶 (Sephadex G-75) 柱色谱 (1 × 120 cm) 分离纯化 β -内酰胺酶。粗酶液上样后,用含 NaCl 0.15 mol·L⁻¹ 的 PBS 液 (0.05 mol·L⁻¹ pH 7.0) 洗脱,流速 30 mL·h⁻¹,每份收集 2 mL,用 Nitrocefin (Calbiochem 公司产品) 做活性跟踪,用 SDS-PAGE 检测纯度及相对分子质量 (分子 Marker 为 Amersham Biosciences 公司产品),用碘量法定性确定酶的类型及反应条件。纯酶透析除盐,冷冻干燥后称重,置 4 °C 冰箱保存备用。

供筛样品 (图 1) 水杨酸 (salicylic acid)、5-氨基水杨酸 (5-amino salicylic acid)、4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)、苯甲酸 (benzoic acid)、水杨酸甲酯 (methyl salicylate)、水杨酸乙酯 (ethyl salicylate)、3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid)、5-磺氨基水杨酸 (5-sulfosalicylic acid)、4-磺氨基邻苯二甲酸 (4-sulfophthalic acid)、邻苯二甲酸 (phthalic acid)、邻苯二甲酸酐 (phthalic anhydride)、没食子酸 (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)、水杨酸钠 (salicylic acid sodium salt)、2-氯苯甲酸 (2-chlorobenzoic acid)、对甲基苯甲酸 (*p*-toluic acid)、2-硝基苯甲酸 (2-nitrobenzoic acid)、4-氯苯甲酸 (4-chlorobenzoic acid)、对硝基苯甲酸 (*p*-nitrobenzoic acid)、间羟基苯甲酸钠 (sodium *m*-hydroxy benzoate) 和 4-氟苯甲酸 (4-fluorobenzoic acid) 共 20 个小分子化合物均为 Sigma 公司产品,用 DMSO 配成 100 mmol·L⁻¹ 的母液置 -20 °C 冰箱保存备用。

酶动力学试验 Nitrocefin 作为报告底物 (reporter substrate),用紫外分光光度计 (HP8453) 在 486 nm 波长下检测 β -内酰胺酶水解 Nitrocefin 后的 A 值。水杨酸及其类似物对 β -内酰胺酶的抑制活性按文献 [3] 方法完成。反应在 0.05 mol·L⁻¹ PBS 液 (pH 7.0) 中进行,反应温度 25 °C,总体积为 2 mL,酶的终浓度为 0.5 nmol·L⁻¹, Nitrocefin 的终浓度接近 K_m (80 μ mol·L⁻¹),各化合物做 2 倍稀释,终浓度分别为 100, 50, 25, 12, 6, 3, 1.5 mmol·L⁻¹。按 Berkson Logit 方法计算半数抑制浓度 IC₅₀。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Salicylic acid	H	OH	H	H	H
5-Amino salicylic acid	H	OH	H	H	NH ₂
4-Hydroxybenzoic acid	H	H	H	OH	H
Benzoic acid	H	H	H	H	H
Methyl salicylate	Me	OH	H	H	H
Ethyl salicylate	Et	OH	H	H	H
3,5-Dinitrosalicylic acid	H	OH	NO ₂	H	NO ₂
5-Sulfosalicylic acid	H	OH	H	H	SO ₃ H
4-Sulfophthalic acid	H	COOH	H	H	SO ₃ H
Phthalic acid	H	COOH	H	H	H
3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	H	H	OH	OH	OH
Salicylic acid sodium salt	Na	OH	H	H	H
2-Chlorobenzoic acid	H	Cl	H	H	H
<i>p</i> -Toluic acid	H	OH	Me	H	H
2-Nitrobenzoic acid	H	NO ₂	H	H	H
<i>p</i> -Chlorobenzoic acid	H	H	H	Cl	H
<i>p</i> -Nitrobenzoic acid	H	H	H	NO ₂	H
Sodium <i>m</i> -hydroxy benzoate	Na	H	OH	H	H
<i>p</i> -Fluorobenzoic acid	H	H	H	F	H
Phthalic anhydride					

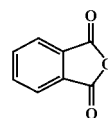


Figure 1 The molecular structures of salicylic acid and molecules analogous to salicylic acid

结果

粗酶液经分离纯化后得到 2 mg 纯酶, SDS-PAGE 分析结果显示一条带,分子质量约为 24 kD。该酶能水解 Nitrocefin、青霉素、氨苄西林、阿莫西林、头孢氨苄、克拉维酸,不被乙二胺四乙酸 (EDTA) 所抑制,0.05% 氯化汞能抑制其活性, pH 在 5 ~ 8 时或温度在 5 ~ 45 °C 时有活性。除不被克拉维酸抑制外,这些特征与 A 类酶相符合。

水杨酸及其类似物对该酶的抑制活性见表 1。

20个化合物中,4磺酸基邻苯二甲酸对该β-内酰胺酶的抑制活性最强,依次为邻苯二甲酸、3,5-二硝基水杨酸、5磺酸基水杨酸、水杨酸、2硝基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、对硝基苯甲酸、苯甲酸和没食子酸。5-氨基水杨酸、水杨酸甲酯、水杨酸乙酯、邻苯二甲酸酐、水杨酸钠、2氯苯甲酸、对甲基苯甲酸、4氯苯甲酸、间羟基苯甲酸钠和4氟苯甲酸对该β-内酰胺酶无抑制作用。

Table 1 Inhibition of β-lactamase by salicylic acid and molecules analogous to salicylic acid

Compd.	IC ₅₀ of β-lactamase /mmol·L ⁻¹
Salicylic acid	22
5-Aminosalicylic acid	>1 000
4-Hydroxybenzoic acid	46
Benzoic acid	63
Methyl salicylate	>1 000
Ethyl salicylate	>1 000
3,5-Dinitrosalicylic acid	8
5-Sulfosalicylic acid	12
4-Sulphthalic acid	3
Phthalic acid	6
Phthalic anhydride	>1 000
3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	84
Salicylic acid sodium salt	>1 000
2-Chlorobenzoic acid	>1 000
<i>p</i> -Toluic acid	>1 000
2-Nitrobenzoic acid	28
4-Chlorobenzoic acid	>1 000
<i>p</i> -Nitrobenzoic acid	46
Sodium <i>m</i> -hydroxy benzoate	>1 000
4-Fluorobenzoic acid	>1 000

讨论

Nitrocefin几乎能被所有的β-内酰胺酶水解,并伴随着由黄色变成红色的颜色变化,因此Nitrocefin被用于检验细菌是否产生β-内酰胺酶,同时作为报告底物,被广泛用于β-内酰胺酶抑制剂的筛选^[1]。本实验分离得到的酶经Nitrocefin水解试验及碘量法检测,表明系β-内酰胺酶。根据该酶对β-内酰胺类抗菌素的水解特征,基本确定为A类β-内酰胺酶,但A类酶一般能被克拉维酸抑制,故有待运用N端序列测定及分子生物学技术进一步确证。

水杨酸对该β-内酰胺酶表现出抑制活性(IC₅₀ 22 mmol·L⁻¹),对另外19个水杨酸类似物进行试

验,发现它们具有不同的抑制活性,体现出以下构效关系:(1)水杨酸苯环上的羧基及邻位羟基是活性基团之一。水杨酸甲酯、水杨酸乙酯、邻苯二甲酸酐和水杨酸钠的羧基被取代,因此缺乏抑制活性。间位、对位上的羟基对酶抑制活性的贡献不大,3,4,5-三羟基苯甲酸及4羟基苯甲酸的活性不如水杨酸。(2)水杨酸邻位上的羟基被羧基取代后能提高抑制活性,邻苯二甲酸的抑制活性超过水杨酸。(3)在水杨酸的苯环上增加磺酸基或硝基能提高抑制活性。(4)苯环上的氨基可降低水杨酸的抑制活性,5-氨基水杨酸基本没有活性。(5)在苯甲酸的苯环上连接氯或氟与抑制活性无关。

琥珀酸具有2个羧基基团,据报道^[4]对B类酶中的IMP-1具有抑制活性(IC₅₀ 6.3 mmol·L⁻¹),在本试验中邻苯二甲酸对A类酶的IC₅₀为6 mmol·L⁻¹,与琥珀酸的抑制活性相当。尽管A和B两类酶的活性中心不同,但氨基酸序列存在保守性,空间构象基本一致^[1],说明邻苯二甲酸、琥珀酸对β-内酰胺酶的抑制作用存在共性。对琥珀酸进行化学修饰,在其2,3位碳上连接苯的衍生物后,其活性提高了几万倍^[4]。因此,对水杨酸的化学修饰也可以借鉴琥珀酸的结构改造思路。由于化合物的数量有限,本文只进行了初步的构效关系分析,有待获得更多的水杨酸类似物,并对不同的β-内酰胺酶展开研究,才能为设计新的β-内酰胺酶抑制剂提供更多信息。

References

- [1] Kaern B, George AJ, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39: 1211 - 1233.
- [2] Mollard C, Moali C, Papamichael C, et al. Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc β-lactamases [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 45015 - 45023.
- [3] Siemann S, Evanoff DP, Marrone L, et al. *N*-Arylsulfonylhydrazones as inhibitors of IMP-1 metallo-β-lactamase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 2450 - 2457.
- [4] Toney JH, Hammond GG, Fitzgerald PM, et al. Succinic acids as potent inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo-β-lactamase [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 31913 - 31918.