

- methionine aminopeptidases in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 398:87.
- [17] Dummitt B, Micka WS, Chang YH. N-terminal methionine removal and methionine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89:964.
- [18] Cutforth T, Gaul U. A methionine aminopeptidase and putative regulator of translation initiation is required for cell growth and patterning in *Drosophila* [J]. *Mech Dev*, 1999, 82:23.
- [19] Griffith EC, Su Z, Turk BE, et al. Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin [J]. *Chem Biol*, 1997, 4:461.
- [20] Zhou G, Tsai CW, Liu JO. Fumagillone, a reversible inhibitor of type 2 methionine aminopeptidase and angiogenesis [J]. *J Med Chem*, 2003, 46:3452.
- [21] Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth [J]. *Nature*, 1990, 348:555.
- [22] Han CK, Ahn SK, Choi NS, et al. Design and synthesis of highly potent fumagillin analogues from homology modeling for a human MetAP-2 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10:39.
- [23] Keding SJ, Dales NA, Lim S, et al. Synthesis of (3R)-amino-(2S)-hydroxy amino acids for inhibition of methionine aminopeptidase-1 [J]. *Synth Commun*, 1998, 28:4463.
- [24] Lowther WT, Zhang Y, Sampson PB, et al. Insights into the mechanism of *Escherichia coli* methionine aminopeptidase from the structural analysis of reaction products and phosphorus-based transition-state analogues [J]. *Biochemistry*, 1999, 38:14810.
- [25] Luo QL, Li JY, Liu ZY, et al. Discovery and structural modification of inhibitors of methionine aminopeptidase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Med Chem*, 2003, 46:2631.
- [26] Douangamath A, Dale GE, D'Arcy A, et al. Crystal structures of *Staphylococcus aureus* methionine aminopeptidase complexed with keto heterocycle and aminoketone inhibitors reveal the formation of a tetrahedral intermediate [J]. *J Med Chem*, 2004, 47:1325.
- [27] 南发俊, 叶其壮, 李佳, 等. 甲硫氨酰氨肽酶(MetAPs)抑制剂的设计与合成 [A]. 见: 2003 年后基因组时代新药研发国际学术讨论会论文集 [C]. 北京: 中国药学会, 2003.
- [28] Chen LL, Li J, Li JY, et al. Type 1 methionine aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae* is a potential target for antifungal drug screening [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25:907.
- [29] Zhang Y, Griffith EC, Sage J, et al. Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:6427.
- [30] Yeh JR, Mohan R, Crews CM. The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21<sup>CIP/WAF</sup> for endothelial cell growth arrest [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:12782.
- [31] Li JY, Chen LL, Cui YM, et al. Characterization of full length and truncated type 1 human methionine aminopeptidases expressed from *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 2004, 43:7892.

(收稿日期: 2003-11-05)

## 磷酸二酯酶 5 抑制剂研究进展

方玉春, 李英霞 (中国海洋大学药物所, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 目的 介绍近 5 年来磷酸二酯酶 5 抑制剂研究新成果。方法 根据国内外文献, 对磷酸二酯酶 5 抑制剂化学结构类型、作用特点、构效关系进行总结评价。结果与结论 磷酸二酯酶 5 抑制剂类药物随着磷酸二酯酶基础生物学研究的深入, 正不断向结构新颖、活性更强、选择性更高的方向发展。

**关键词:** 磷酸二酯酶; 磷酸二酯酶 5 抑制剂; 勃起功能障碍

**中图分类号:** R969 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-2494(2004)11-0808-04

磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 是生物体中广泛存在, 分布在不同组织中的核苷酸代谢酶系, 有多种生物功能。目前人们已发现 11 种 PDE 家族<sup>[1-2]</sup> (表 1)。

**表 1** 磷酸二酯酶种类及作用

名称	底物专一性	生理作用
PDE1	cAMP, cGMP	升高血压
PDE2	cAMP, cGMP	嗅觉
PDE3	cAMP, cGMP	心律失常
PDE4	cAMP	呕吐、抗炎
PDE5	cGMP	勃起、血管收缩、血小板聚集
PDE6	cGMP	视觉障碍
PDE7	cAMP	激活 T 细胞、肌肉代谢
PDE8	cAMP	激活 T 细胞
PDE9	cGMP	未知
PDE10	cAMP, cGMP	未知
PDE11	cAMP, cGMP	未知

### 1 PDE5 的结构及作用机制

在众多磷酸二酯酶家族中, PDE5 的研究和应用最引人注目。它是由两个相同的含 875 个氨基酸亚基组成的二聚体, 相对分子质量约为 20 万。PDE5 主要存在于阴茎海绵体、平滑肌及血小板等中, 能特异性地与环鸟苷酸 (cGMP) 结合, 是阴茎中 cGMP 代谢失活主要同工酶<sup>[3]</sup>。1998 年 Pfizer 公司在全球首次成功上市的治疗勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 口服药物西地那非 (sildenafil, 万艾可, Viagra), 使得人们开始关注这类新型药物。Murad<sup>[4]</sup> 所揭示的 NO 信号传导途径, 使阴茎勃起的生理过程得以明确: NO 激活体内鸟苷酸环化酶, 鸟苷三磷酸 (GTP) 在此酶作用下, 转化为 cGMP, 后者通过降低血管平滑肌中的钙离子浓度产生强大的舒张血管作用使得阴茎动脉血流增加, 阴茎容积扩大, 内压升高而压迫阴茎白膜下静脉, 使静脉血回流减少, 阴茎膨胀, 从而

**基金项目:** 浙江省分析测试基金项目 (No. 00121 或 No. 02112)

**作者简介:** 方玉春, 男, 讲师, 硕士 Tel: (0532) 2032065 Fax: (0532) 2033054 E-mail: fycfhy@yahoo.com.cn

• 808 • Chin Pharm J, 2004 November, Vol. 39 No. 11

中国药学杂志 2004 年 11 月第 39 卷第 11 期

导致阴茎勃起。而 PDE5 使 cGMP 代谢失活,可终止上述过程。随着勃起生理作用机制的阐明,PDE5 抑制剂的研究大大加快,笔者综述了近 5 年来 PDE5 抑制剂研究新进展。

## 2 PDE5 抑制剂

### 2.1 vardenafil 与 tadalafil(结构见图 1)

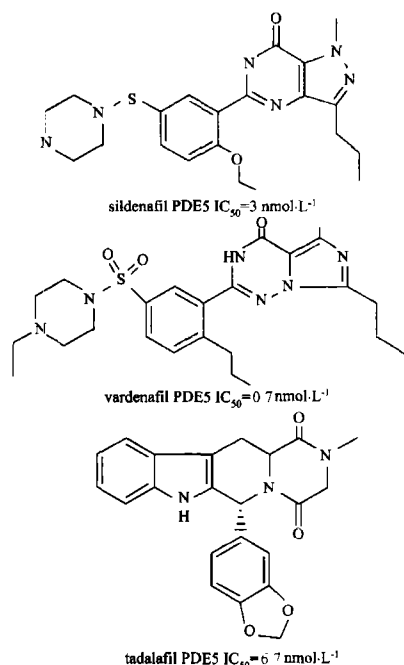


图 1 3 种 PDE5 抑制剂的结构

图 1 中后两个是完成 III 期临床已向 FDA 申报上市口服治疗 ED 的药物。vardenafil 是 Bayer 公司研发的新一代 PDE5 抑制剂, Porst 等<sup>[5]</sup>报道与安慰剂相比, 5, 10, 20 mg 剂量的药品均有明显作用(有效率分别为 66%, 76%, 80%, 安慰剂有效率为 30%)。文献报道<sup>[6-7]</sup>它体外作用强度及选择性高于 sildenafil, 并且头痛、脸红、消化不良、视觉障碍等不良反应都明显降低。它在代谢方面同 sildenafil 相似, 文献<sup>[8]</sup>报道它的半衰期为 4.4~4.8 h, 到达最大血药浓度时间 40 min。代号为 IC351 的 tadalafil 早期是由 Icos 公司筛选得到, 后与 Lilly 公司共同完成临床的另一个与 sildenafil 竞争治疗 ED 的药物。I 期健康志愿者临床试验表明其半衰期为 17.5 h, 到达最大血药浓度的时间为 2 h。临床报道<sup>[9-10]</sup>治疗 ED( $5 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 8 周, 病人 ED 症状明显改善, 加大剂量实验(最大为  $100 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 大部分患者疗效随剂量增加而加强, 勃起时间长达 24~36 h。

### 2.2 T-1032 与 E-4010(结构见图 2)

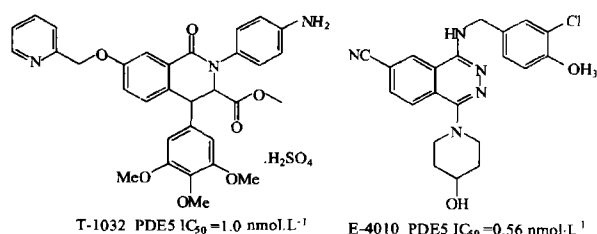


图 2 T-1032 与 E-4010 的结构

T-1032 与 E-4010 已进入临床评价的早期阶段<sup>[11]</sup>, Jun

中国药杂志 2004 年 11 月第 39 卷第 11 期

等<sup>[12]</sup>用色谱方法从狗的肺、视网膜分离纯化 PDE5, PDE6, 发现 T-1032 在很低浓度( $IC_{50}=1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 就能抑制 PDE5 对 cGMP 的水解, 而它对 PDE6 的选择性同 sildenafil 者相当。化合物 E-4010<sup>[13]</sup>在纳摩尔( $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 浓度水平抑制 PDE5, 而对 PDE1、PDE4 抑制都超过微摩尔( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 水平, 它们对 PDE5 的选择性至少大于 1 800, 目前 E-4010 作为治疗 ED 已进入 I 期临床研究。

### 2.3 $\beta$ -咔啉类( $\beta$ -carboline)

Pfizer 公司的 Graham 等<sup>[14]</sup>以 tadalafil 为先导化合物, 着重对 tadalafil 分子中的氮甲基进行不同取代研究, 得到几个活性强且水溶性有所改善的化合物, 其中以次甲基咪唑取代(化合物 1)活性最强( $IC_{50}=0.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对 PDE6 的选择性可达 640 倍(图 3)。

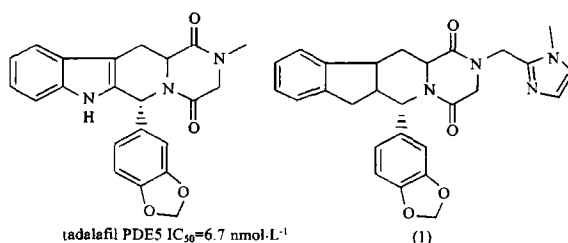


图 3  $\beta$ -咔啉类的结构

### 2.4 酞嗪类(phthalazines)

Watanabe 等<sup>[15]</sup>研究酞嗪类构效关系, 发现酞嗪环 6 位吸电子基团是化合物活性所必需的, 尤以氰基最佳。该结构中的卞胺侧链部分对 PDE5 选择性非常重要, 其中 3-氯-4-甲氧基对 PDE5 的选择性为 3,4-二甲氧基苯胺基的 10 倍。酞嗪环 1 位上的氯可被胺基取代, 表 2 列出了一些活性很强的以哌啶基(图 4)存在的胺基酞嗪类 PDE5 抑制剂。

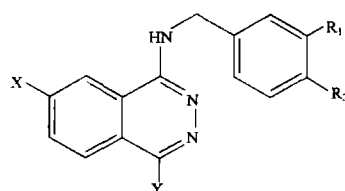


图 4 哌啶基结构

表 2 酞嗪类构效关系

化合物	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PDE5 $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
2	CN	Cl	Cl	-OMe	4.8
3	CN		Cl	-OMe	0.53
4	CN		Cl	-OMe	0.32
5	CN		Cl	-OMe	0.50

### 2.5 四环鸟嘌呤类(tetracyclic guanine)

Schering-Plough 公司研究了四环鸟氨酸衍生物构效关系<sup>[16]</sup>, 确定了 A 环的 2 位引入烷基能显著提高其对 PDE5 抑制作用, 并且在一定范围随碳链变长而逐渐增加其活性, 对 D 环修饰改造基本上不增加对 PDE5 抑制活性但却有利于选择性的提高, 这类化合物很多, 唯有化合物 6, 7(图 5)有进一步开发价值。

### 2.6 黄嘌呤类(xanthine analogues)

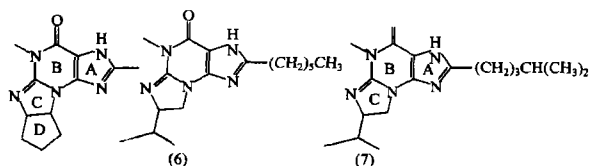


图5 四环鸟嘌呤类结构

Wang 等<sup>[17]</sup>研究了黄嘌呤衍生物(图6),合成一系列  $N_1$ ,  $N_3$ ,  $N_7$ ,  $C_8$  取代物,构效关系研究表明  $C_8$  位引入手性氨基醇基团反而降低抑制活性,用反应易得非手性环戊胺及环己胺取代,活性却大大增加。 $N_1$ ,  $N_3$  烷基取代乙基最佳(表3)。

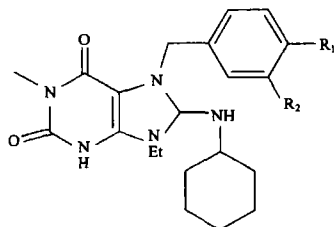


图6 黄嘌呤类衍生物

表3 黄嘌呤类构效关系

化合物	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PDE5 IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
7	H	OH	0.6
8	OH	H	1.2
9	Cl	OMe	0.58
10	F	OMe	0.30
11	F	OH	0.23

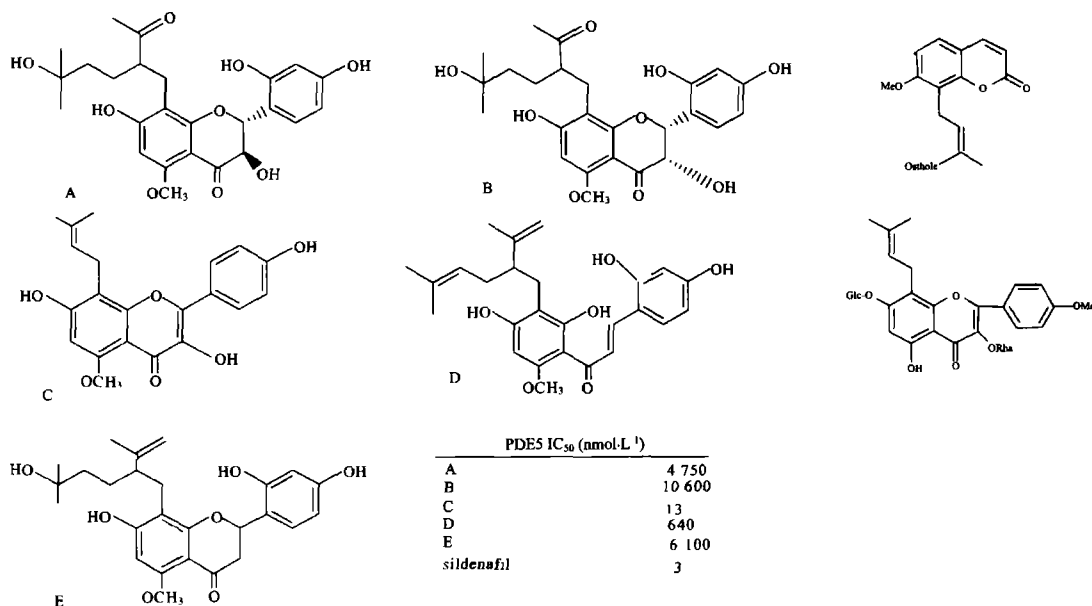


图7 天然产物类 PDE5 抑制剂

合物除对阴茎海绵体平滑肌有松弛作用外,有的还对肺和外周血管张力起到调节作用<sup>[25]</sup>。另有报道<sup>[26]</sup>, vardenafil 对大鼠空间记忆有促进作用。广泛的生理作用,丰富多样的先导结构预示 PDE5 抑制剂研究有着广阔前景。

#### 参考文献

- [1] Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, et al. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function and the contractile responses of trabeculae carneae and

$N_7$  位苄基上的取代基既改变 PDE5 活性和选择性,又对其代谢快慢产生影响。这些化合物在动物试验中显示良好的药动学特性和显著的药效作用。黄嘌呤的改造引起了 Novartis Horsham 研究中心的注意, Ruth Arnold 课题组<sup>[18]</sup>也成功地合成了 8 芳基取代的黄嘌呤衍生物 PDE5 抑制剂。

#### 2.7 黄酮醇类及其他天然产物类

上述的  $\beta$ -咔啉类、酞嗪类、黄嘌呤类等都是合成的 PDE5 抑制剂,且结构中都含有氮原子。韩国的 Hye 等<sup>[19-20]</sup>用甲醇提取苦参中活性成分,发现醋酸乙酯萃取浸膏具有较强的 PDE5 抑制作用,继续硅胶色谱和凝胶色谱分离纯化得到的如下黄酮类物质(图7),其中化合物 C 活性最强,且对 PDE3、PDE4 有一定的选择性(分别为 31.5 倍、196.2 倍)。车前子、淫羊藿、人参是传统的滋补壮阳中药,人参中的  $R_g1$  也能抑制 PDE5 活性( $IC_{50} = 724 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),车前子中香豆素甲氧基欧芹酚(osthole),能使兔阴茎平滑肌松弛<sup>[21]</sup>。淫羊藿中的淫羊藿苷(icariin)<sup>[22-24]</sup>也有报道能选择性抑制 PDE5( $PDE5 \text{ IC}_{50} = 432 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $PDE4 \text{ IC}_{50} = 73 \text{ 500 nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),提高阴茎海绵体平滑肌 cGMP 浓度。

#### 3 展望

Viagra 成功的开发促使 PDE5 抑制剂研究热潮,几年来人们以不同的分子为先导合成及分离了成百上千个新化合物,筛选得到了许多活性更强,选择性(主要增加了其对 PDE1、PDE3、PDE6 的选择性)更高的新型 PDE5 抑制剂,为开发疗效显著、不良反应小的治疗 ED 的药物提供了保障,同时这些化

aortic rings in vitro[J]. Am J Cardiol, 1999, 83(Suppl 5A):3.

- [2] Jackie DC, Sharron HF, David JW. phosphodiesterase type5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction[J]. Urology, 2002, 30: 4.
- [3] Cobin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase5: Target of Sildenafil[J]. J Biol Chem, 1999, 274(20): 13729.
- [4] Ferid M. Awarded nobel prize in medicine[J]. Texas medical center news, 1998, 20: 19.
- [5] Porst H, Rosen R, Goldstein I, et al. The efficacy and tolerability of vardenafil, a new, oral, selective phosphodiesterase type5 inhibitor in pa-

中国药学杂志 2004 年 11 月第 39 卷第 11 期

- tients with erectile dysfunction: the first at-home clinical trial[J]. *Int J Impot Res*, 2001, 13: 192.
- [6] Rosen RC. Vardenafil significantly improves ability to successfully complete intercourse population[EB/OL]. <http://www.prous.com>, 2001-04-17.
  - [7] Porst H, Young JM, Schmidt A. Efficacy and tolerability of vardenafil for treatment of erectile dysfunction in patient subgroups[J]. *Urology*, 2003, 62(3): 519.
  - [8] Porst H, Giuliano F, Meuleman E, et al. Daily IC351 treatment of ED[J]. *Int J Impot Res*, 2000, 12(Suppl. 3): Abst B1.
  - [9] Stark S, Sache R, Liedl T, et al. Vardenafil increase penile rigidity and tumescence in men with erectile dysfunction after single dose[J]. *Eur Urol*, 2001, 40: 181.
  - [10] Porst H, Padma N, Harin GF, et al. Efficacy of tadalafil for the treatment of erectile dysfunction at 24 and 36 hours after dosing: a randomized trial[J]. *Urology*, 2003, 62(1): 121.
  - [11] Michine T, Hideki M, Tsunehisa N, et al. Pharmacological profile of T-1032, a novel specific phosphodiesterase type 5 inhibitors, in isolated rat aorta and rabbit corpus cavernosum[J]. *Eur Pharm*, 2001, 411: 161.
  - [12] Jun K, Kotomi F, Michibata H, et al. Characterization and effects of T-1032, a novel potent inhibitor of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5)[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60: 1333.
  - [13] Ginny D, Hone L, Silverman D, et al. Synthesis and evaluation of potent cGMP phosphodiesterase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 7.
  - [14] Graham NM, Charlotte MN, Allerton EG, et al. Design, synthesis and biological activity of  $\beta$ -carboline-based type-5 phosphodiesterase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(11): 1425.
  - [15] Watanabe N, Itaru T, Hideyuki A, et al. Phthalazines derivatives and remedies for erectile dysfunction[P]. WO9942452, 1999-08.
  - [16] Ginny D, Lisa S, Ana B. Synthesis and evaluation of potent and selective c-GMP phosphodiesterase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 7.
  - [17] Wang Yugu, Smuel C, Hu ZY, et al. Design and synthesis of xanthine analogues as potent and selective PDE5 inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 3149.
  - [18] Ruth A, David B, Gurdip B. 8-Aryl Xanthines potent Inhibitors of phosphodiesterase 5[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 2587.
  - [19] Hye JS, Hyoung J, Kwak JH, et al. A prenylated flavanol, sophoflavescenol[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 2313.
  - [20] Eun R, Woo J, Hwan K, et al. A new prenylated flavanol from the roots of *sophora flavescens*[J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 1552.
  - [21] Chen J, Chiou WF, Chen CF. Effect of the plant extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue *in vitro*[J]. *J Urol*, 2000, 163: 1975.
  - [22] Xin ZC, Kim EK, Lin CS. Effects of icariin on cGMP-specific PDE5 and cAMP specific PDE4 activities[J]. *Asian Androl*, 2003, 5(1): 15.
  - [23] Qizhen D, Ming X, Yoichiro I. Purification of icariin from the extract of *Epimedium sagittatum* using high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatogr*, 2002, 962: 239.
  - [24] 郝顺祖, 孙晓春, 钱辉, 等. 人参皂苷对体外磷酸二酯酶 5 活性的影响[J]. *江苏大学学报*, 2004, 14(1): 11.
  - [25] Hideki M, Hirota I, Michino T, et al. Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors showed a different vasorelaxant property in the isolated rat aorta[J]. *Eur Pharm*, 2002, 440: 45.
  - [26] Pricketts WG, Van S, Wada CG, et al. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat[J]. *Neuroscience*, 2002, 113: 351.

(收稿日期: 2003-05-26)

## 缺血再灌注心肌细胞凋亡及 ACEI 的保护作用机制

宋君秋, 刘艳霞(天津医科大学基础医学院药理学教研室, 天津 300070)

**摘要:**目的 介绍细胞凋亡在心肌缺血再灌注损伤中的作用, 并阐述血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)类药物的保护作用机制。方法 根据近几年的文献资料对缺血再灌注心肌细胞凋亡及 ACEI 发挥保护作用方面的研究进行综述。结果与结论 细胞凋亡参与了心肌缺血再灌注损伤的发生过程, ACEI 可通过减少血管紧张素 II 生成、保存缓激肽活性、影响肾素血管紧张素系统和激肽系统之间相互作用、保护血管内皮细胞以及影响凋亡相关基因表达等机制发挥心脏保护作用。

**关键词:** 心肌缺血再灌注; 细胞凋亡; ACEI

**中图分类号:** R96

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-2494(2004)11-0811-04

“细胞凋亡”一词是由 Kerr 及其同事于 1972 年首先提出的, 是指一种由基因控制的细胞自主而有序的死亡方式。研究表明, 在心肌缺血再灌注损伤中, 不仅有坏死心肌细胞出现, 也存在凋亡的心肌细胞。血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)在临床广泛用于治疗高血压、心功能不全、心肌梗死等循环系统疾病。动物实验已经证实, ACEI 预处理具有对抗心肌缺血再灌注损伤的保护作用<sup>[1]</sup>。近来发现其不仅可以降低心肌细胞坏死程度, 而且可减少心肌细胞凋亡。笔者将就细胞凋亡在心肌缺血再

灌注损伤中的作用以及 ACEI 抗缺血再灌注心肌细胞凋亡的作用机制作一综述。

### 1 细胞凋亡的特征

细胞凋亡具有不同于细胞坏死的形态、生化代谢和基因改变。坏死是由某种理化因素或生物因素引起的细胞被动性死亡方式, 形态上表现为细胞肿胀, 膜通透性增加, 溶酶体破裂, 最后整个细胞破裂。由于胞浆外溢, 可引起周围组织炎症。细胞凋亡的形态特征为细胞皱缩, 胞膜起疱, 胞浆及核发生浓缩, 继而胞核断裂, 形成有膜包围的凋亡小体。由

**基金项目:** 天津市自然科学基金资助项目(003506811)

**作者简介:** 宋君秋, 男, 硕士研究生 Tel: (022)23542523 E-mail: song\_junqiu@eyou.com

中国药学杂志 2004 年 11 月第 39 卷第 11 期

*Chin Pharm J*, 2004 November, Vol. 39 No. 11 • 811 •