

钒化合物的靶点蛋白及其生物效应

杨雪¹ 张铄¹ 黄东娜² 赵琳¹ 王婉盈¹ 王宇传^{1*}

(¹华北理工大学基础医学院 河北省慢性疾病重点实验室 唐山 063210; ²深圳市第二人民医院 深圳 518035)

摘要 作为一种生物相关的金属元素,基于钒的金属化合物在糖尿病、癌症、阿尔茨海默症、神经炎症等疾病的治疗方面表现出独特的潜在应用价值。现阶段研究表明,钒发挥其生物活性主要源于钒酸根作为磷酸根类似物对细胞内磷酸转移反应的影响,及钒在细胞内经氧化还原转化产生的活性氧物质对相关信号通路的调节;而钒化合物与细胞内靶点蛋白的相互作用亦被认为是发挥其治疗作用的关键因素。本文就钒的化学性质、钒化合物与血清蛋白的结合、钒化合物对细胞内效应靶点蛋白及其作用通路的调控、细胞内金属药物靶点蛋白分析鉴定等几方面,对近年来取得的相关研究的进展进行综述,以系统性阐释钒化合物用于疾病治疗的生物活性机制,并对进一步揭示钒化合物作用机理的探索方向及其药用前景进行展望。

关键词 钒化合物 靶点蛋白 抗糖尿病效应 神经保护机制 金属蛋白质组学

Protein Targets of Vanadium Compounds and Their Biological Effects

Yang Xue¹, Zhang Shuo¹, Huang Dongna², Zhao Lin¹,
Wang Wanying¹, Wang Yuchuan^{1*}

(¹ Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, 063210; ² Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, 518035)

Abstract Being a biological relevant element, vanadium-based therapeutic compounds have shown unique potential application value in the treatment of different types of diseases such as diabetes, cancer, Alzheimer's disease and neuroinflammation. Research progresses at current stage indicate that, the biological effects exerted by vanadium is mainly due to the influence of vanadate as a phosphate analogue on the intracellular phosphate transfer reaction, as well as the regulation effect of reactive oxygen species produced by the redox conversion of vanadium inside cells. The interactions of vanadium compounds with their intracellular target proteins are also considered to be a crucial factor in their therapeutic action. In this review, we summarize the chemical properties of vanadium, the research progresses in the interactions of vanadium compounds with serum proteins, the regulations of vanadium compounds on their intracellular target proteins and the relevant signaling pathways, as well as the progresses in the identification of cellular metalloprotein-binding proteins, in order to systematically reveal the bioactive mechanisms of vanadium compounds in disease treatment. The directions of further exploring the action mechanisms of vanadium compounds and their medicinal prospects are also discussed.

Keywords Vanadium compounds, Target proteins, Antidiabetic effects, Neuroprotective mechanisms, Metalloproteomics

上个世纪,研究人员在发现钒酸盐对 ATP 酶的抑制作用后又发现了钒的类胰岛素作用。随后,众多研究结果表明钒化合物能够有效降低血糖,其多样性的生物效应吸引着越来越多研究者的关注^[1-3]。钒化合物分为无机钒化合物和有

机钒化合物两大类,其中无机钒化合物代表如硫酸氧钒 (Vanadyl sulfate)、偏钒酸钠 (Sodium metavanadate)、正钒酸钠 (Sodium orthovanadate) 等,而有机钒化合物包括乙酰丙酮氧钒 (Vanadyl acetylacetonate, VO(acac)₂)、双(麦芽醇)氧钒

* 联系人,王宇传 女,博士,副研究员,主要从事生物医药研究,E-mail: wangych@ncst.edu.cn

河北省高校基本科研业务费(JQN2022026)资助

2022-05-18 收稿,2022-07-06 接受

(Bis(maltolato) oxovanadium (IV), BMOV)、乙基麦芽酚氧钒(Bis(ethylmaltolato) oxovanadium (IV), BEOV)等^[4-6]。近年来,氧钒化合物的低毒性和其发挥的抗糖尿病和抗癌等效应,使其有机配位化合物成为研究主体^[7,8]。2000年,英国 Medeval 公司完成了钒化合物 BEOV 的一期临床试验,对 BEOV 用于糖尿病治疗的安全性、耐药性、药代动力学和生物利用度等方面进行了评估^[9]。除抗糖尿病效应外^[10,11],钒化合物的药用价值还体现在癌症治疗^[12]、神经保护作用^[13,14]等方面。钒化合物的药理作用主要包括细胞信号转导过程的调节和细胞保护作用两方面,而其金属毒性主要表现在对细胞氧化还原的影响及诱导活性氧产生^[15]。

钒化合物的抗糖尿病效应源自多种作用机制。如乙酰丙酮氧钒可以在胰岛 β 细胞受到破坏时保护胰岛细胞膜不被破坏,促进受损的胰岛 β 细胞恢复以及胰岛 β 细胞增殖^[16]。钒化合物还可以作用于胰岛素受体,如钒酸钠可以通过刺激胰岛素受体磷酸化水平,激活胰岛素受体,促进胰岛素对葡萄糖的降解^[17]。在胰岛素信号转导过程中,钒化合物 BMOV 可高效抑制细胞内蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (Protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 的活性,减轻胰岛素抵抗,起到降糖作用^[18]。钒化合物还具有抗癌效应。相比于人正常肝细胞,钒化合物对人肝癌细胞 HepG2 具有更强的抑制作用,可高强度激活胞外信号调节激酶 (Extracellular signal-regulated protein kinase, ERK),从而引起 G1/S 细胞周期阻滞^[19]。钒酸根可以通过诱导前列腺癌细胞 PC-3 以及 DU145 产生活性氧,从而抑制细胞周期调控蛋白 Cdc25C (Cell division cycle 25C) 的活性,最终导致 G2/M 细胞周期阻滞,发挥抗癌效应^[12]。近来报道的膜渗透性钒配合物可透过血脑屏障发挥对脑部肿瘤的靶向治疗作用,有望发展成为瘤内注射型的癌症治疗药物^[20]。此外,钒化合物发挥神经保护效应的作用机制仍尚未完全明确,大多数研究认为,其神经保护作用与其作为蛋白酪氨酸磷酸酯酶抑制剂对 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路的激活有关^[8],近期研究表明钒化合物通过过氧化物酶体增殖物激活受体 (Peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 依赖的作用机制缓解神经炎症及神经元凋亡^[21,22]。

因钒化合物对机体具有一定毒性,存在一些

潜在风险。如在动物实验中,大鼠大量服用时,会导致钒在体内积累,产生金属毒性反应,影响大鼠的生殖能力^[23];同时有些钒化合物会产生过多的活性氧,增加氧化应激反应^[8],进而可能诱发其他疾病产生。因此对钒化合物在疾病治疗方面的潜在应用仍需要更加深入的探索。本文将结合国内外最新研究进展,从钒及其化合物的化学性质、靶点蛋白及作用通路等方面探讨钒化合物的作用机制。

1 钒化合物的化学性质

钒作为第 V 主族的过渡金属,有 d 轨道的特殊性,使其有不同于其他金属的性质。本节从以下几个方面详述钒的化学性质:(一)钒的氧化还原性质;(二)钒酸根与磷酸根的相似性;(三)钒的配位性质。

1.1 钒的氧化还原性质

钒为第 V 主族的过渡元素,其氧化还原性、配位化学、酸碱性及与酞聚合性决定了钒在水溶液中的存在形式。在生理条件下,钒的主要存在形式是 V(IV) 和 V(V)。V(IV) 以阳离子形式存在,V(V) 主要存在形式是酸根离子。生物体内存在的还原剂如 NADH,可以把 V(V) 还原,生成 V(IV)。而 V(IV) 到 V(V) 的氧化过程伴随 O_2 被还原成超氧阴离子 $\cdot O_2^-$ (图 1(A))。

NAD(P)H/NAD(P)⁺ 和 V(V)/V(IV) 两个电子对间在细胞内互相促进的转化关系是一个产生各种氧自由基的复杂过程,而钒在其中可视为生物还原剂氧化的催化剂。首先,V(IV) 与氧气结合并发生反应,生成 $V^{5+}-O_2^-$,在这个过程中发生电荷转移;在 O_2 的参与下,NAD(P)H 把与 V(V) 结合的 $\cdot O_2^-$ 还原成配位的氢过氧化物 $V^{5+}-OOH$, O_2 被还原成 $\cdot O_2^-$;而后与 H_2O_2 发生类 Fenton 反应生成 $\cdot OH$,继而触发自由基转化的级联反应。以 NAD(P)H 为底物的 NAD(P)H 氧化酶被激活,推动 H_2O_2 的形成,而 H_2O_2 通过类 Fenton 反应把进入细胞的 VO^{2+} 氧化为 VO_3^- 。即,在细胞内 V(V) 被还原的同时,进入细胞的 V(IV) 可在 NAD(P)H 氧化酶的推动下,通过自氧化作用转化为 V(V)。在体内很多蛋白质分子是 V(V) 的还原剂,蛋白质中存在的巯基可以使体内的 V(V) 转变为 V(IV)。综上所述,体内 V(V) 与 V(IV) 在一定程度上保持着动态平衡的状态(图 1(A))^[24]。

1.2 钒酸根作为磷酸根类似物

磷酸盐在生物系统中具有非常重要的作用,从提供核酸的主链,到驱动细胞的能量源,磷酸盐是关键的生物结构单元,是很多生命反应的必需分子。从分子层面看,钒酸根和磷酸根具有很高的相似性(图 1(B)),包括二者构型相同、电荷和离子半径相近以及质子亲和力相近,但钒酸盐在其配位构型中表现出更好的灵活性^[25]。由于与磷酸根类似性,钒酸根可以影响许多有磷酸根参与的生化反应,特别是与磷酸转移反应有关的酶,包括蛋白酪氨酸磷酸酶、核糖核酸酶、磷酸二酯酶、磷酸葡萄糖醛酸酶和葡萄糖-6 磷酸酶等^[26-30]。钒酸根干预磷酸酶的机理主要包括两类,一是钒酸根作为磷酸转移反应中的过渡态的类似物影响磷酸转移酶的活性。对钒酸根和磷酸根进行 X 射线衍射分析,结果显示,钒酸根以三角双锥构型占据酶活性位点,和酶结合,形成稳定的中间产物^[25,31]。二是钒酸根结合在酶蛋白链受磷酸化的残基上,从而影响该处的磷酸转移^[24]。钒酸根抑制磷酸酯酶的热力学原因是蛋白质的钒酸酯键的稳定性比蛋白质的磷酸酯键的稳定性高得多(平衡常数 K 高 4 个数量级以上),因此形成竞争性抑制的效果^[32]。其不同蛋白的活性位点结构基本都是钒酸根以变形的三角双锥结构结合,这是抑制动力学的差异的基础。

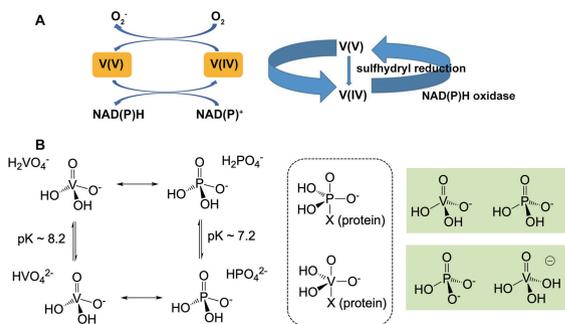


图 1 钒的化学性质:(A)钒在生物体系中的氧化还原转化;

(B)钒酸盐和磷酸盐的结构类比^[23,24]

Fig. 1 The chemical properties of vanadium ions. (A) The redox conversion of vanadium ions in biological systems; (B) The structural analogy between vanadate, phosphate and vanadyl ions^[23, 24]

钒酸盐(V)与磷酸盐也存在许多不同之处。由于二者 pK_a 值存在差异,在生理 pH 及离子强度的条件下,钒酸盐(V)大部分以 $H_2VO_4^-$ 的形式存在,而 HPO_4^{2-} 与 $H_2PO_4^-$ 近似以等量存在;在磷酸转移反应的过渡态中磷为五配位,而钒可以五

或六配位形成稳定化合物,因而钒一旦取代磷酸转移反应过程中的磷,很可能对酶的活性产生抑制作用;钒比磷的亲电性更强,V—O 键较 P—O 键的共价性弱,与 P—O 键相比键长长约 15%^[33]。

除此之外,其他研究表明,四价钒即氧钒离子 VO^{2+} 也可以发挥抑制酶活性的作用。其作用机制可能为,在浓度较低的弱酸及碱性(pH > 6)溶液中, VO^{2+} 的存在形式为 $VO(OH)_3^-$,其结构的存在形式与钒酸根结构具有相似性^[25],即证明其可能也会有三角双锥的构型,与钒酸盐(V)类似(图 1(B)),和酶的活性位点结合从而抑制酶的活性^[31]。

综上所述,钒的两种主要离子存在形式:钒酸根(V)和有机氧钒(IV)配合物,都可以在磷酸根介导的磷酸化反应中形成五配位三角双锥的中间产物,从而发挥抑制酶活性的作用。

1.3 钒酸根和氧钒离子的配位性质

根据上文得知,从基本化学性质的角度,钒酸根和磷酸根类似,例如:钒酸根可以与醇反应生成酯。但是由于钒属于过渡金属元素,有 d 轨道的配位键合特性,其成酯反应具有不同于磷酸根的配位性质。钒与醇羟基的成酯在本质上是 VO^{2+} 或 VO^{3+} 与羟基的配位反应。具有生物意义的是钒酸根与核苷的成酯反应,形成结构稳定的化合物,可以看作是单核苷酸的类似物。钒酸根以氧合钒(V)阳离子形式配位结合表现出比磷更强的亲疏性质^[24]。

V(V)和 V(IV)都易与氧配位结合,也能与氮和硫配位形成稳定的配位化合物。 VO^{2+} 在阳离子酸度指标上处于金属离子 Ca^{2+} 和 Fe^{3+} 之间,能够与 CO_3^{2-} 、 PO_4^{3-} 、含氮杂环、去质子的巯基、氨基酸、核苷酸等众多生物配体结合。此外, VO^{2+} 具有类似 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的亲氧结合特性,如 BiP/GRP78 是一种 Ca^{2+} 结合蛋白,钒化合物可以促进该蛋白在细胞内的表达^[16]。并且, VO^{2+} 能够结合在一些需要 Mg^{2+} 离子激活的结合位点上^[34,35],起到对酶活性的调控作用。

2 钒化合物的靶点蛋白及作用通路

钒虽然属于人体的微量元素,但是钒及其化合物在细胞内有众多靶点蛋白,这些靶点蛋白起着运输钒或者调节机体生理活动等功能。随着钒化合物靶点蛋白的不断发现及其相关信

号通路研究的不断深入,钒化合物与靶点蛋白之间的相互作用可能为相关疾病治疗提供新的思路和方法。

2.1 钒在血液中的运输和存储

钒化合物进入血液后会与血清蛋白相互作用,包括转铁蛋白、白蛋白、免疫球蛋白和血红蛋白。钒与血清蛋白相互作用的研究对其在生物体内的运输和存储有重要意义,也是近年的研究热点^[36]。

2.1.1 转铁蛋白

转铁蛋白为单链糖蛋白,有约 700 个氨基酸,分子量约为 80kDa,其中最重要的是血清转铁蛋白(Transferrin, hTF)^[37],其主要功能是运输铁离子,参与细胞生长增殖与免疫系统调节,具有抗菌和抗肿瘤等潜在临床应用^[38]。但是在高等

动物中,血清转铁蛋白还可以结合并运输其他金属离子,如 Bi(III)、Ga(III)、Ru(II) 等及不同价态的钒^[36,39]。研究表明,在 V(IV) < 5mmol/L 的生理浓度下,进入血液中的大部分钒与 hTF 相结合,这对钒在血液中的运输具有重要意义^[3]。但近来有研究表明钒和转铁蛋白的结合可能阻碍钒的生物利用度并减弱其抗增殖活性^[40]。不同氧化态的钒对血清转铁蛋白有不同的亲和力,在 HCO₃⁻ 存在的情况下,钒氧化态与转铁蛋白的亲合顺序是 V(III) > V(IV) > V(V),在没有 HCO₃⁻ 的情况下,亲合顺序为 V(III) ~ V(IV) > V(V)^[26]。近期一项基于 QM/MM 和 DFT 理论计算的研究揭示了 VO²⁺ 与转铁蛋白 C 端两不同位点的结合模式(图 2(A)),且在 Fe³⁺ 存在的条件下该 C 端位点仍具有与 VO²⁺ 结合的能力^[41]。

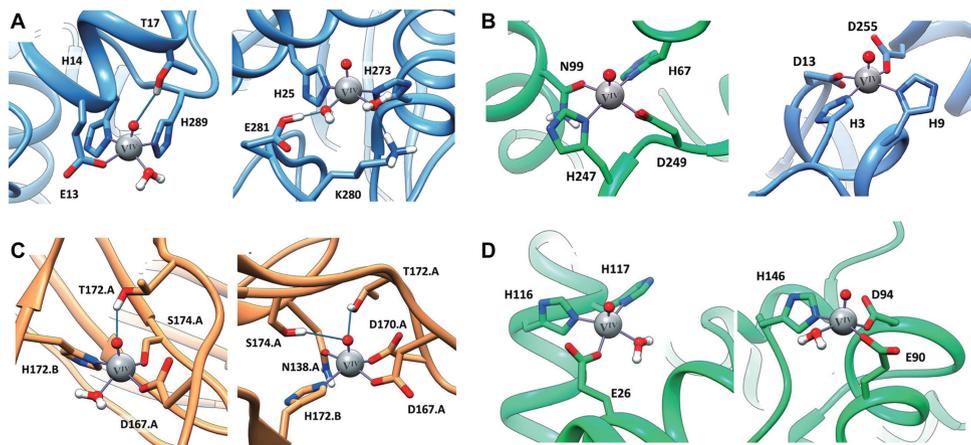


图 2 钒氧离子与血液蛋白相互作用的理论计算模拟:(A)与转铁蛋白 C 位点的结合模式;(B)与人血清白蛋白 MBS 及 NTS 位点的结合模式;(C)与免疫球蛋白不同位点的结合模式;(D)与血红蛋白不同位点的结合模式^[41,42]

Fig. 2 The binding modes of VO²⁺ to the site C of hTF (A), to the MBS and NTS sites of human serum albumin (B), and to the different sites of IgG (C) and hemoglobin (D) as revealed by computational studies^[41, 42]

2.1.2 白蛋白

人血清白蛋白(HSA)是人体血浆中最丰富的蛋白质,是血浆中金属的主要运输载体。白蛋白有两个金属结合位点,一个是 N 末端位点(N-terminal site, NTS),特异性结合 Cu²⁺ 和 Ni²⁺;另一个为多金属结合位点(Multi-metal binding site, MBS)主要结合 Zn²⁺ 和 Cd²⁺。另外还有非特异性位点 B 和 Cys34,前者有利于 Co²⁺ 和 Mn²⁺ 的结合,后者仅限于结合含软金属的物质如金和铂化合物^[36]。研究表明,白蛋白与 VO²⁺ 有一个高亲和力结合位点(Vanadium binding site 1, VBS1, 即 MBS)和至少 5 个相对低亲和力的结合位点(Vanadium binding site 2, VBS2)。电子顺磁共振

(EPR)实验表明,VO²⁺ 在白蛋白 NTS 位点的结合不同于 Cu²⁺ 和 Ni²⁺ 的结合位点,Cu²⁺ 或 Ni²⁺ 在 NTS 位点的竞争性结合使 VO²⁺ 的结合位点转移至 MBS 位点。VO²⁺ 在 MBS 位点的潜在配位模式为 His67, His247, Asp249, H₂O(图 2(B)) 和 His67, His247, Asn99-CO, Asp249, 而 VO²⁺ 在 NTS 位点的最稳定配位模式为 His3, His9, Asp13, Asp255(图 2(B))^[42]。V(V) 与白蛋白相互结合的研究结果不如 V(V) 与血清转铁蛋白那样清晰,但是,迄今为止许多实验都表明两者的结合是非特异性的弱结合^[43,44]。

2.1.3 免疫球蛋白和血红蛋白

免疫球蛋白(Immunoglobulins)是能对进入机

体的异物产生免疫反应的糖蛋白,其中 IgG 蛋白占总免疫球蛋白的 75%,因此 IgG 如 hTF 和 HAS 蛋白一样可参与血液中的钒的运输和存储^[45]。在生理 pH 条件下,通过 EPR 实验得到 VO^{2+} 与 IgG 蛋白的三个不同位点相结合^[46]。通过分子对接理论计算得到具体的位点配位信息:位点 2 的配位模式为 His172, Asp167, Asp170, Asn138-NCO,其中 Ser174 和 Thr172 残基与 V=O 形成氢键;而结合位点 1 是由位点 2 发展而来,通过醇化物-O⁻致使 Ser174 去质子化从而取代原位点 2 的 Asp170-COO⁻(图 2(C))^[37]。

血红蛋白(Hemoglobin, Hb)是红细胞内运输氧的特殊蛋白质。钒在红细胞内主要以 V(IV) 存在,与血红蛋白相结合。EPR 实验提示 Hb 蛋白中至少存在两个 VO^{2+} 结合位点,即 γ 和 β 位点,各包含两个及一个 His 残基,该结果随即被理论计算结果证实:其中, γ 位点的配位模式为 His116, His117, Glu26, H₂O; β 位点的配位模式为 His146, Glu90, Asp94, H₂O(图 2(D))。 VO^{2+} 与两位点结合具有相似的稳定性^[41]。

2.2 钒化合物在细胞内的靶点蛋白及其生物效应

近年来的研究揭示,钒化合物在细胞内作用于以下靶点蛋白,正向或者负向地调节该靶点蛋白的活性,从而进一步影响该蛋白所在信号通路的状态,发挥其抗糖尿病、抗癌以及神经保护等功能。

2.2.1 蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP1B

胰岛素是体内唯一降血糖的激素,其在细胞内的信号路径通过复杂的蛋白网络系统被高度调控。胰岛素通过与细胞表面胰岛素受体(Insulin receptor, IR)结合形成配体-受体复合物,产生调节胰岛素敏感的代谢酶信号,通过激活胰岛素信号通路中的关键酶,引发多种生物效应从而起到对血糖调节的作用^[47]。例如,胰岛素与其受体的结合可致胰岛素受体底物(Insulin receptor substrate-1, IRS-1)的磷酸化^[48],激活磷脂酰肌-3-激酶(Phosphatidylinositol-3-kinase, PI3-K)及磷脂酰肌醇依赖蛋白激酶(Phosphatidylinositol dependent kinase 1, PDK1),后者可使胰岛素信号通路中的关键蛋白激酶(Protein kinase B, PKB, 又称 AKT)磷酸化。激活的 PKB/AKT 可磷酸化多种蛋白,起到促进糖原合成、促进细胞增殖、维

持细胞存活、增加细胞对葡萄糖的摄入等作用(图 3(A))^[49]。

在胰岛素信号通路中,蛋白酪氨酸磷酸酶(Protein tyrosine phosphatase, PTP)能对胰岛素受体及底物上的酪氨酸残基去磷酸化,进而对胰岛素信号转导过程起负调控作用^[50]。PTP1B 作为非受体 PTPase 家族成员之一,是胰岛素信号途径的主要负调控因子,它可以作用于 IR 和 IRS 使其脱磷酸化引起胰岛素信号降低,被认为是治疗 II 型糖尿病以及胰岛素抵抗等相关疾病的重要靶点(图 3(B))^[51,52]。

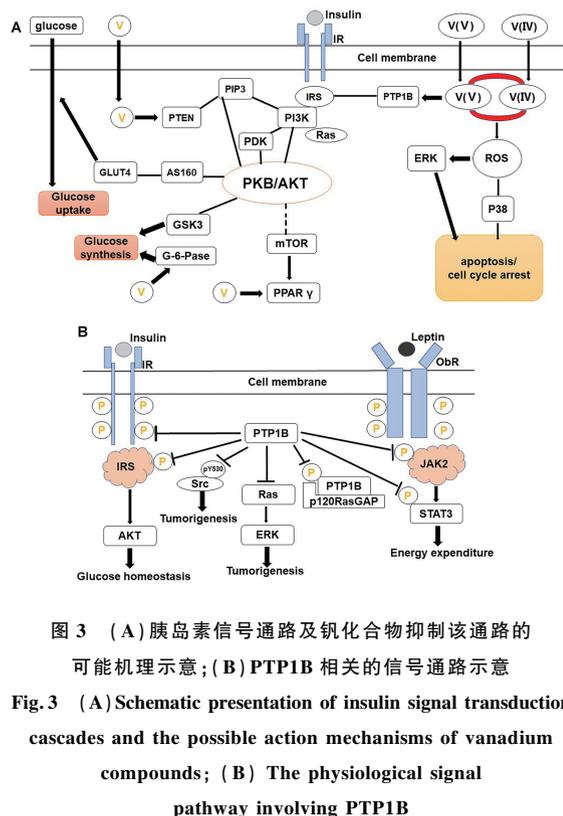


图 3 (A) 胰岛素信号通路及钒化合物抑制该通路的可能机理示意; (B) PTP1B 相关的信号通路示意

Fig.3 (A) Schematic presentation of insulin signal transduction cascades and the possible action mechanisms of vanadium compounds; (B) The physiological signal pathway involving PTP1B

目前认为钒化合物抑制 PTP1B 的机制为: (1) 基于钒酸根作为磷酸根类似物可以对磷酸根参与的反应进行干预,影响磷酸转移酶或磷酸酯酶的活性。从结构上看,原钒酸盐离子有一个四配位结构和一个负电荷,可以与 PTP 活性部位通过复杂的氢键网形成稳定的三角锥结构,从而成为有广泛特异性、可逆和竞争性的 PTP 抑制剂^[53]。(2) 基于钒化合物对细胞氧化还原状态的调节功能,即钒化合物通过形成活性氧物质(ROS)来抑制 PTP1B 的内源性可逆氧化。钒化合物在细胞内通过类 Fenton 反应使得钒离子在 +4 价(VO^{2+})和 +5 价(VO_4^{3-})之间转化,生成的 ROS 可以直接氧化半胱氨酸残基,包括 PTP 中关

键活性部位的半胱氨酸,或可导致不可逆性的酶失活,造成广泛的 PTP 抑制^[28,54]。

钒酸根与其靶肽模拟物可以在体内外特定抑制 PTPase 靶酶,对 PTP1B 的特异性抑制可产生胰岛素增敏作用,但并不能解释钒的其它抗糖尿病效应,所以钒化合物的抗糖尿病效应是一个钒多物种的整体作用^[55]。

2.2.2 同源磷酸酶-张力蛋白

磷酸化是主要的信号转导途径之一,在所有生物中都普遍存在。激酶和磷酸酶是磷酸化可逆反应中的关键酶,实现磷酸基团的添加和去除。酶的磷酸化/脱磷酸化可激活或抑制细胞内的多种信号通路,进而发挥生物效应^[56]。同源性磷酸酶-张力蛋白(Phosphatase and tensin homologue, PTEN)位于胰岛素信号通路关键激酶 AKT 激酶的上游(图 3(A)),因此近年来作为糖尿病、中风、心脏疾病的治疗靶点得到广泛关注^[57]。作为 PTPase 的一种,PTEN 可以作用于胰岛素信号通路中的磷脂信号分子 PIP3(Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate),使其脱磷酸化,从而导致胰岛素信号的降低^[58]。同 PTP1B 一样,PTEN 这种酯酶的活性位点存在半胱氨酸残基,可被内源性的 H₂O₂ 可逆氧化形成二硫键^[8,59]。因此,钒化合物可以通过产生 ROS 来造成 PTEN 活性位点半胱氨酸的瞬时氧化而抑制 PTEN 的活性,从而增强胰岛素信号通路的激活。研究报道一系列合成的有机钒化合物对 PTEN 活性有很好的抑制作用^[60-62]。其中,羟基吡啶酸钒化合物 VO-OHpic 在纳摩尔浓度级别即可对 PTEN 产生特异性抑制,增加脂肪细胞内 PIP3 浓度,致使蛋白激酶 AKT 磷酸化,并增加细胞对葡萄糖的吸收,表现出很好的药用价值^[61]。此外,在多项研究中,钒化合物表现出显著降低 PTEN 表达水平的作用,这可能是比直接抑制酶活性的作用更具意义^[57]。

2.2.3 葡萄糖-6-磷酸酶

葡萄糖-6-磷酸酶(Glucose-6-phosphatase, G6Pase),是胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发展的关键酶。其能在肝组织当中通过水解葡萄糖-6-磷酸(Glucose-6-phosphate, Glc-6-P)释放葡萄糖入血,是糖异生的关键酶,在血糖平衡中起着关键作用。G6Pase 也水解除磷酸糖外的底物,如焦磷酸和氨甲酰磷酸。此外,G6Pase 还表现出磷酸转移酶活性,能够从葡萄糖和各种磷酸盐供体如 PPI、甘露糖 6-磷酸(Mannose 6-phosphate, Man-6-P)、

氨甲酰磷酸等合成 Glc-6-P。另外,研究观察到 G6Pase 催化葡萄糖和 Glc-6-P 之间的交换反应,首次证明该酶形成磷酸酶中间体,这一机制也与多种磷酸转移酶活性一致^[63]。G6Pase 是胰岛素作用的目标,在高血糖状态下它被抑制以阻止葡萄糖的产生。在 II 型糖尿病患者中检测到 G6Pase 的表达量升高,导致内源性葡萄糖生成增加^[64]。虽然 II 型糖尿病的治疗现存多种疗法,但对于以血糖控制为主的疗法仍有发展的潜力。由于 G6Pase 在血浆葡萄糖平衡中的作用,它赋予了磷酸转移酶抑制剂控制高血糖的能力^[65]。而钒酸盐是一种众所周知的磷酸酶抑制剂,可形成磷酸酶中间体,从而具有抑制 G6Pase 的磷酸水解酶和磷酸转移酶活性的可能。研究发现,两种钒化合物硫酸氧钒(VOSO₄)和乙酰丙酮氧钒(VO(acac)₂)对 G6Pase 存在抑制作用:VOSO₄ 是 G6Pase 的竞争性抑制剂,而 VO(acac)₂ 是 G6Pase 的非竞争性(non-competitive)抑制剂和无竞争性(uncompetitive)抑制剂的混合剂。VOSO₄ 与底物葡萄糖-6-磷酸竞争性结合 G6Pase 的相同位点,因此是 G6Pase 的竞争性抑制剂;而 VO(acac)₂ 对 G6Pase 有抑制作用,数据表明其有无竞争性抑制剂的特性,但随着 VO(acac)₂ 浓度的增加,会改变反应的平衡,形成更多的酶-底物复合物,表明也存在非竞争性抑制,这使得 VO(acac)₂ 作为 G6Pase 抑制剂表现出混合作用^[30]。

2.2.4 过氧化物酶体增植物激活受体

在糖尿病相关的转录因子中,过氧化物酶体增植物激活受体(PPARs)在参与葡萄糖/脂质代谢和炎症过程的基因调控及相关的信号转导中发挥重要作用,已成为代谢性疾病药物研发的重要靶点蛋白^[66-68]。PPAR γ 是脂质体激活的转录因子,属于核受体超家族。在几类中枢神经系统疾病模型中观察到 PPAR γ 的激活可调节炎症反应^[69]。研究表明,钒化合物可通过抑制 PPAR γ 的降解,上调 PPAR γ 表达^[70],调控 PPAR γ 作用于相应的受体或细胞通路来发挥其抗糖尿病^[71]和神经保护^[21]等作用。

脂联素(Adiponectin)是一种主要通过脂肪细胞合成的蛋白质激素,在抑制可能导致 2 型糖尿病、肥胖和动脉粥样硬化的代谢紊乱中发挥作用。脂联素形成的多聚体可以改善葡萄糖稳态的生物活性形式,发挥降血糖作用。PPAR γ 是调节脂联素表达、自我组装和分泌的主要参与者,PPAR γ

的激活可通过促进脂联素基因转录或通过转录后机制上调脂联素的水平和分泌^[72]。研究表明,乙酰丙酮氧钒可上调 PPAR γ 表达,从而促进脂联素的表达和多聚化^[70]。而钒化合物对 PPAR γ 的调控机制可能与钒诱导 Hsp60 与 PPAR γ 相互作用从而阻止 PPAR γ 的降解有关^[71]。钒化合物处理未增加 PPAR γ 在细胞内的转录表达,因而可能是通过翻译后修饰机制对其进行调控。实验表明,乙酰丙酮氧钒可促进 PPAR γ Ser122 位点的磷酸化,但磷酸化蛋白占总 PPAR γ 蛋白的比例没有显著变化,且未对胰岛素诱导的 PPAR γ 磷酸化水平产生影响。表明钒化合物不会改变 PPAR γ 磷酸化调节的内在平衡,而是增强胰岛素或其它 PPAR γ 配体诱导的 PPAR γ 活化^[71]。此外,研究发现 AKT/mTOR (mammalian target of rapamycin) 信号通路可对 PPAR γ 水平进行调节^[73],因此可以解释此前的研究报道钒化合物可通过 AKT 依赖的转导途径调控脂联素的释放和其细胞含量^[74]。AKT 的激活可能导致 PPAR γ 水平的提升,进而上调脂联素的细胞水平和释放。以上研究进展为钒化合物通过 PPAR γ 依赖的调控通路来发挥其抗糖尿病活性的机制提供了新的见解(图 4(A))。

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种严重的神经退行性疾病,其进展与衰老密切相关^[75,76]。随着 AD 患者病情的发展,内质网应激 (Endoplasmic reticulum stress, ER stress) 在神经元凋亡中起着关键作用^[77,78]。PPAR γ 作为一种配体激活的转录因子,参与调节 AD 的内质网应激^[79]。其激活被认为对许多关键的中枢神经系统疾病具有保护作用,因此是被看作是一个较有前景的 AD 治疗靶点^[80]。近期研究揭示,钒化合物

物 BEOV 可改善三重转基因 AD 模型小鼠 (3 \times Tg-AD) 的认知能力;显著降低 AD 小鼠脑内 ER 应激蛋白 Bip 水平,抑制 ER 应激相关 eIF2 α /ATF4/CHOP 信号通路,从而抑制 AD 小鼠脑内 ER 应激的升高;调节凋亡相关蛋白的表达,包括 cleaved-caspase12、cleaved-caspase3、Bax 蛋白水平的降低和抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平的增高;并在 BEOV 抑制内质网应激的体外细胞实验中得到类似的结果。使用 PPAR γ 抑制剂阻断其活性,则 BEOV 不再具有神经保护作用,表明 BEOV 通过 PPAR γ 介导其神经保护功能(图 4(B))^[22]。

在脑神经炎症方面,由过量的 A β 引起的活化小胶质细胞超负荷会引发毒性促炎症反应,在神经退行性疾病的病理生理学中起着关键的作用^[81]。许多研究表明,PPAR γ 具有神经保护和抗炎活性,如 PPAR γ 激动剂可缓解 A β 或 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞炎症^[82,83]。近期研究发现钒化合物 BEOV 对 A β 刺激的 BV2 小胶质细胞系和 APP^{swe}/PS1E9 转基因小鼠大脑中的神经炎症均有抑制作用,可显著降低细胞中的促炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (Interleukin-6) 和白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β) 的水平,降低促炎症介质合成酶,包括诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达,抑制 A β 诱导的 NF- κ B 促炎转录因子信号通路的激活,并上调 PPAR γ 蛋白的表达水平。PPAR γ 通过负向调节 NF- κ B 转录因子,显著降低其信号通路中 I κ B- α 的磷酸化,并阻断了 NF- κ B p65 蛋白的磷酸化和核转位,减少促炎介质和细胞因子的产生,从而改善 A β 刺激的神经炎症^[21](图 4(C))。

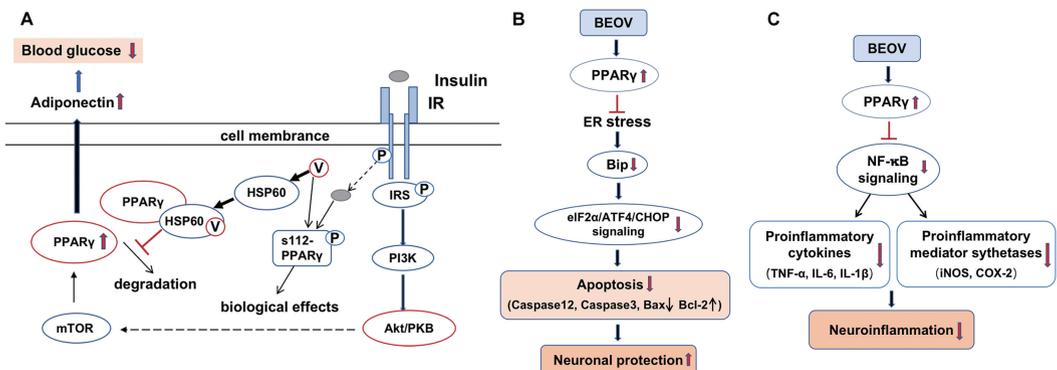


图 4 钒化合物通过 PPAR γ 蛋白依赖的机制发挥抗糖尿病 (A)、神经保护 (B) 及神经炎症抑制 (C) 作用的机理示意

Fig. 4 Possible PPAR γ -dependent mechanisms of the anti-diabetic (A), neuronal protective (B) and anti-inflammatory effects (C) exerted by vanadium compounds

2.2.5 丝裂原活化蛋白激酶

丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 级联反应通路是在进化过程中显著保守的蛋白激酶信号转导通路,其作用是向细胞内传递各类胞外信号,参与细胞增殖、分化、应激反应及凋亡等多种细胞进程。在 MAPKs 家族中,应激激活蛋白激酶 (Stress-activated protein kinases, SAPK)/氨基末端激酶 (Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 和细胞外信号相关激酶 (Extracellular signal-related kinase, ERK) 是研究最多的^[84]。钒酸盐在细胞内发生还原反应产生的 ROS 可能作为第二信使发挥信号通路调节作用^[85],而 MAPKs 可以被多种包括 ROS 在内的压力信号激活^[86]。研究表明,偏钒酸钠能够诱导 A549 细胞生长停滞在 G2/M 期,其可能的作用机制为:钒酸盐刺激细胞产生的 ROS 作用于 ERK 和 p38 上游,引起这些 MAPKs 蛋白激酶的磷酸化;激活的 ERK 和 p38 影响细胞生长调节蛋白 p21、phos-pho-cdc2 和 cdc25c 的表达及稳定性,导致细胞生长停滞^[87]。

另有研究显示,钒化合物在同一生物系统中可同时激活 ERK 和 AKT 通路。如钒化合物对 ERK 信号在 HepG2 细胞中的过度激活,可促进细胞周期依赖性激酶抑制剂 p21 的表达,并致视网膜母细胞瘤抑制蛋白 pRb (Retinoblastoma tumor suppressor protein) 的磷酸化水平降低,引起 G1/S 细胞周期阻滞;而钒化合物致使 AKT 蛋白的磷酸化水平随时间变化持续升高,可能是 HepG2 细胞抵抗钒化合物促凋亡作用的原因^[19]。在另一项钒化合物抑制人胰腺癌细胞 AsPC-1 的研究中发现,钒化合物通过活性氧诱导的 MAPK/ERK 通路的持续激活而非 AKT 途径造成 G2/M 细胞周期阻滞,从而导致肿瘤抑制;而保留的 AKT 活性可以避免正常组织中 AKT 途径被抑制后的高糖血症和葡萄糖耐受^[88]。上述结果表明钒化合物具有同时作为抗糖尿病和抗癌药物用于疾病的预防和治疗的的前景。

3 细胞内金属药物靶点蛋白的金属蛋白质组学分析

由于金属与生物大分子相互作用的复杂性,大多数金属药物的生物功能并未得到详尽阐释,原因在于缺乏对细胞/组织内的金属蛋白质组进行全域性的分析表征。金属组学 (Metalloproteomics) 是

继基因组学、蛋白质组学和代谢组学之后提出的一种新的“组学”研究方向。该领域作为与化学生物学、功能蛋白质组学、结构生物学等领域具有交叉性的综合学科,以生物体中所有金属和类金属为研究对象,目标在于阐明金属物质参与的生物分子的组成、结构、功能及其在生命体系中的作用^[89]。作为金属组学的重要分支,金属蛋白质组学 (Metalloproteomics) 领域的发展为系统性分析细胞内金属与蛋白质的相互作用进而揭示金属的生物功能提供了大量实用的研究工具^[90]。金属蛋白质组学研究在生物体内金属蛋白鉴定方面可发挥重要作用。作为一种整体性的研究策略,金属蛋白质组学方法着眼于在全蛋白质组层面探索金属与蛋白的相互作用,为全面理解和阐释金属药物的生物靶点和未知金属蛋白的生物功能提供有利线索^[91]。迄今为止已经发展出了多种生物分析化学方法或基于化学探针的方法,用于金属/金属药物在细胞内结合靶点蛋白的分析鉴定,进而探讨金属的生物功能或金属药物的作用机理,有许多成功应用的实例。实验流程通常包括“金属结合蛋白的捕获-蛋白质组样品分离-金属蛋白检测鉴定-关键靶蛋白分析表征”几个步骤。

利用柱状凝胶电泳-电感耦合等离子体质谱在线联用技术 (GE-ICP-MS),研究人员成功实现对铋剂药物在幽门螺杆菌^[92,93]及银离子在大肠杆菌^[94]、金黄葡萄球菌^[95]中结合蛋白的全蛋白质组层面的表征;利用基于金属螯合亲和层析 (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 的金属蛋白捕获技术,研究人员成功实现对人肝癌细胞中的铜、锌结合蛋白^[96],人成神经瘤细胞中的汞结合蛋白^[97],及铜绿假单胞菌中的镓结合蛋白的鉴定^[98];利用基于非变性条件下的二维液相蛋白质组分离并对各蛋白质组分进行金属含量检测,结合主成分分析法,研究人员鉴定出蓝细菌 *Synechocystis* PCC 6803 中的主要铜结合蛋白 CucA 及锰结合蛋白 MncA,并发现两类金属蛋白的金属选择性与蛋白在细胞中的折叠位置相关^[99];此外,激光剥蚀电感耦合等离子体质谱 (LA-ICP-MS) 及同步辐射 X 射线荧光光谱 (SRXRF) 被成功用于分析固体生物样品如蛋白凝胶或组织器官切片表面的金属分布^[100,101];而近年来,利用化学合成技术,将金属化合物发展成具有光亲和性质的化学探针或适用于固相 Pull-down 实验的探针化合物,可靶向识别细胞内的金

属化合物特定结合蛋白,已成功用于铈、钕、金类药用化合物在细胞内的结合靶点蛋白鉴定^[102-104]。我国学者对于钒化合物在细胞内的靶点蛋白鉴定已见诸报道。借助体积排阻色谱分离、质谱鉴定及免疫分析技术,已明确热休克蛋白 Hsp60 为氧钒离子在线粒体中的高亲和蛋白^[105],而氧钒离子与热休克蛋白家族的相互作用参与了其抗糖尿病活性及神经保护作用^[71,106]。此外,在全蛋白质组层面对钒化合物在细胞内的靶点蛋白进行分离鉴定仍有进一步探索的空间。上述金属蛋白质组学研究策略大多具有较强普适性,可拓展用于多种不同类型的生物体系中金属靶蛋白的系统性挖掘,并有助于对钒化合物在细胞内的靶点蛋白进行全面深入的分析和探讨,同时结合生物信息学技术分析钒化合物的关键靶点蛋白,有望在钒化合物生物功能机制研究方面取得新突破。

4 结语

近年来,关于钒化合物对机体生命活动影响的研究日益增加,这说明越来越多人注意到钒化合物在临床疾病治疗中的潜在应用^[107,108]。微量金属物质的理化性质与药理学、毒理学作用密切相关。除了作为生物化学试剂的应用,现有的研究证实了钒化合物可以作为多种酶的激活剂或抑制剂,通过对不同细胞信号通路的调控在抗氧化、抗糖尿病、抗癌以及神经保护过程中发挥重要作用。钒为第 V 主族的过渡金属,虽属人体的微量元素,但是钒及其化合物在体内与众多靶点蛋白存在相互作用,这些靶点蛋白起着运输钒或者调节机体生理活动等功能。此外,钒化合物可以通过与膜磷脂作用影响膜结合物的 G 蛋白信号转导,这种间接与靶蛋白的作用是钒化合物作用的一个新形式^[109]。

随着钒化合物靶点蛋白的不断发现及其相关信号通路研究的不断深入,钒化合物与其靶点蛋白之间相互作用的系统性研究可能为相关疾病治疗提供新的思路和方法。目前,钒化合物的药物开发仍有较大的空间,本篇综述丰富了我们对钒化合物的理化性质、配位特性以及抗疾病作用机制的认知。由于糖尿病、癌症在疾病的发生发展过程中利用的代谢途径有一定的相似性,钒化合物是少数的同时对多种疾病有效的药物之一。深入研究用于糖尿病治疗的作为蛋白磷酸酶抑制剂

的钒化合物对抗癌剂的研发也可能有所发现。此外,钒化合物由于其氧化还原性质,可以调节细胞的氧化还原状态,参与多种靶点蛋白活性的调节,在疾病进程中具有重要意义。但是同时过高剂量的钒化合物及产生的过多的自由氧对机体有细胞毒性作用,这阻碍了钒化合物在疾病治疗方面的发展。关于钒化合物对人体各器官的毒性副作用,需要进一步研究以期待解决问题。同时,利用金属蛋白质组学研究技术对钒化合物在细胞内新的结合靶点蛋白的发掘,并对钒与细胞内生物活性分子之间相互作用机理进行进一步探索,将有助于推动基于金属钒化合物的药物设计研发及其在相关疾病治疗中的准确应用。

参 考 文 献

- [1] Cantley L C Jr, Josephson L, Warner R, et al. *J. Biol. Chem.*, 1977, 252(21): 7421~7423.
- [2] Thompson K H, Lichter J, LeBel C, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103(4): 554~558.
- [3] Treviño S, Díaz A, Sánchez-Lara E, et al. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2019, 188(1): 68~98.
- [4] Althumairy D, Murakami H A, Zhang D, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2020, 203: 110873.
- [5] Mehdi M Z, Srivastava A K. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, 440(2): 158~164.
- [6] Parma L, Peters H A B, Johansson M E, et al. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(13): 4643.
- [7] 邹亚丽,王婷婷,唐慧安,等. *天水师范学院学报*, 2019, 39(2): 36~39.
- [8] 杨晓改,李逸,刘会雪,等. *中国科学:化学*, 2017, 47(2): 144~154.
- [9] Thompson K H, Orvig C. *J. Inorg. Biochem.*, 2006, 100(12): 1925~1935.
- [10] Pessoa J C, Etcheverry S, Gambino D. *Coord. Chem. Rev.*, 2015, 301-302: 24~48.
- [11] Storr T, Thompson K H, Orvig C. *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35(6): 534~544.
- [12] Petanidis S, Gabriel C, Kioseoglou E, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 2015, 301-302: 87~105.
- [13] He Z, Han S, Wu C, et al. *Metallomics*, 2020, 12(4): 474~490.
- [14] He Z, Han S, Zhu H, et al. *Front. Mol. Neurosci.*, 2020, 13: 21.
- [15] 董雅琼,张悦,杨晓达. *药学进展*, 2020, 44(4): 256~268.
- [16] Gao Z, Zhang C, Yu S, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, 16(5): 789~798.
- [17] 陈彬,许霖水,吴喜贵. *第三军医大学学报*, 1999(1): 28~30.
- [18] Li M, Ding W, Baruah B, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102(10): 1846~1853.

- [19] Fu Y, Wang Q, Yang X G, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, 13(6): 1001~1009.
- [20] Levina A, Vieira A P, Wijetunga A, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 59(37): 15834~15838.
- [21] He Z, Li X, Han S, et al. *Metallomics*, 2021, 13(7): mfab036.
- [22] He Z, Song J, Li X, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2021, 26(5): 551~568.
- [23] 张天宝, 杨在昌, 孙棉龄, 等. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 02: 75.
- [24] 杨晓改, 杨晓达, 王夔. 化学进展, 2002, 14(4): 279~286.
- [25] Rehder D. *Future Med. Chem.*, 2012, 4(14): 1823~1837.
- [26] Costa Pessoa J, Garribba E, Santos M F A, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 2015, 301-302: 49~86.
- [27] Crans D C, Smee J J, Gaidamauskas E, et al. *Chem. Rev.*, 2004, 104(2): 849~902.
- [28] Irving E, Stoker A W. *Molecules*, 2017, 22(12): 2269.
- [29] McLaughlan C C, Hooker J D, Jones M A, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2010, 104(3): 274~281.
- [30] Shehzad S. *Bioscience Horizons*, 2013, 6. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzt002>.
- [31] Peters K G, Davis M G, Howard B W, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2003, 96(2-3): 321~330.
- [32] Tracey A S, Gresser M J. *PNAS*, 1986, 83(3): 609~613.
- [33] Samart N, Althumairy D, Zhang D, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 2020, 416: 213286.
- [34] Houseman A L, Morgan L, LoBrutto R, et al. *Biochemistry*, 1994, 33(16): 4910~4917.
- [35] Zimmermann J L, Schneider B, Morlet S, et al. *Spectrochim. Acta A*, 2000, 56(2): 285~299.
- [36] Pessoa J C, Santos M F A, Correia I, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 2021, 449: 215192.
- [37] Macgillivray R T, Mendez E, Shewale J G, et al. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258(6): 3543~3553.
- [38] Gomme P T, McCann K B, Bertolini J. *Drug Discov. Today*, 2005, 10(4): 267~273.
- [39] Sun H, Li H, Sadler P J. *Chem. Rev.*, 1999, 99(9): 2817~2842.
- [40] Levina A, Lay P A. *Inorg. Chem.*, 2020, 59(22): 16143~16153.
- [41] Sciortino G, Garribba E. *Chem. Commun.*, 2020, 56(81): 12218~12221.
- [42] Sciortino G, Sanna D, Lubinu G, et al. *Chem. Eur. J.*, 2020, 26(49): 11316~11326.
- [43] Heinemann G, Fichtl B, Mentler M, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2002, 90(1-2): 38~42.
- [44] Jakusch T, Dean A, Oncsik T, et al. *Dalton Transac.*, 2010, 39(1): 212~220.
- [45] Hamilton R G. *Clin. Chem.*, 1987, 33(10): 1707~1725.
- [46] Sanna D, Micera G, Garribba E. *Inorg. Chem.*, 2011, 50(8): 3717~3728.
- [47] Petersen M C, Shulman G I. *Physiol. Rev.*, 2018, 98(4): 2133~2223.
- [48] Copps K D, White M F. *Diabetologia*, 2012, 55(10): 2565~2582.
- [49] 杨晓改, 王琴, 刘竟成, 等. 化学进展, 2009, 21(5): 890~895.
- [50] Tonks N K. *FEBS J.*, 2013, 280(2): 346~378.
- [51] Kennedy B P. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, 60(7): 877~883.
- [52] He R J, Yu Z H, Zhang R Y, et al. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2014, 35(10): 1227~1246.
- [53] McLaughlan C C, Peters B J, Willsky G R, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 2015, 301-302: 163~199.
- [54] Huyer G, Liu S, Kelly J, et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(2): 843~851.
- [55] Feng B, Dong Y, Shang B, et al. *Adv. Funct. Mater.*, 2022, 32: 2108645.
- [56] Ardito F, Giuliani M, Perrone D, et al. *Int. J. Mol. Med.*, 2017, 40(2): 271~280.
- [57] Pulido R. *Molecules*, 2018, 23(2): 285.
- [58] Maehama T, Dixon J E. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(22): 13375~13378.
- [59] Mahadev K, Wu X, Zilbering A, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(52): 48662~48669.
- [60] Mak L H, Woscholski R. *Methods*, 2015, 77-78: 63~68.
- [61] Rosivatz E, Matthews J G, McDonald N Q, et al. *ACS Chem. Biol.*, 2006, 1(12): 780~790.
- [62] Schmid A C, Byrne R D, Vilar R, et al. *FEBS Lett.*, 2004, 566(1-3): 35~38.
- [63] van Schaftingen E, Gerin I. *Biochem. J.*, 2002, 362(3): 513~532.
- [64] Clore J N, Stillman J, Sugerma H. *Diabetes*, 2000, 49(6): 969~974.
- [65] Rines A K, Sharabi K, Tavares C D, et al. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2016, 15(11): 786~804.
- [66] Ahmadian M, Suh J M, Hah N, et al. *Nat. Med.*, 2013, 19(5): 557~566.
- [67] Sugii S, Olson P, Sears D D, et al. *PNAS*, 2009, 106(52): 22504~22509.
- [68] 环奕, 彭军, 潘璇, 等. 药学报, 2021, 56(2): 352~359.
- [69] Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, 1812(8): 1007~1022.
- [70] Wu Y, Huang M, Zhao P, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, 18(6): 623~631.
- [71] Zhao P, Yang X. *Metallomics*, 2013, 5(7): 836~843.
- [72] Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. *Diabetes*, 2001, 50(9): 2094~2099.
- [73] Joshi S K, Liu X, Samagh S P, et al. *J. Orthop. Res.*, 2013, 31(5): 724~730.
- [74] Seale A P, de Jesus L A, Park M C, et al. *Pharmacol. Res.*, 2006, 54(1): 30~38.
- [75] Hullinger R, Puglielli L. *Behav. Brain Res.*, 2017, 322(Pt B): 191~205.
- [76] Fish P V, Steadman D, Bayle E D, et al. *Bioorg. Med.*

- Chem. Lett., 2019, 29(2): 125~133.
- [77] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. *Nature*, 2000, 403(6765): 98~103.
- [78] Fonseca A C, Ferreira E, Oliveira C R, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1832(12): 2191~2203.
- [79] Lin C H, Nicol C J B, Cheng Y C, et al. *Exp. Cell. Res.*, 2018, 370(2): 312~321.
- [80] Landreth G, Jiang Q, Mandrekar S, et al. *Neurotherapeutics*, 2008, 5(3): 481~489.
- [81] Heneka M T, Carson M J, El Khoury J, et al. *Lancet Neurol.*, 2015, 14: 388~405.
- [82] Han Q, Yuan Q, Meng X, et al. *Oncotarget*, 2017, 8: 42001~42006.
- [83] Wang Z F, Li J, Ma C, et al. *Biochem. Pharmacol.*, 2020, 171: 113674.
- [84] Wilkinson M G, Millar J B. *FASEB J.*, 2000, 14(14): 2147~2157.
- [85] Huang C, Ding M, Li J, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(25): 22397~22403.
- [86] Tibbles L A, Woodgett J R. *Cell Mol. Life Sci.*, 1999, 55(10): 1230~1254.
- [87] Zhang Z, Leonard S S, Huang C, et al. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 34(10): 1333~1342.
- [88] Wu J X, Hong Y H, Yang X G. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2016, 21(8): 919~929.
- [89] Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R. *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38(4): 1119~1138.
- [90] Wang Y, Li H, Sun H. *Inorg. Chem.*, 2019, 58(20): 13673~13685.
- [91] Wang H, Zhou Y, Xu X, et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2020, 55: 171~179.
- [92] Hu L, Cheng T, He B, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52(18): 4916~4920.
- [93] Wang Y, Hu L, Xu F, et al. *Chem. Sci.*, 2017, 8(6): 4626~4633.
- [94] Wang H, Yan A, Liu Z, et al. *PLoS Biol.*, 2019, 17(6): e3000292.
- [95] Wang H, Wang M, Xu X, et al. *Nat. Commun.*, 2021, 12(1): 3331.
- [96] She Y M, Narindrasorasak S, Yang S, et al. *Mol. Cell. Proteomics*, 2003, 2(12): 1306~1318.
- [97] Li Y, He B, Hu L, et al. *Talanta*, 2018, 178: 811~817.
- [98] Wang Y, Han B, Xie Y, et al. *Chem. Sci.*, 2019, 10(24): 6099~6106.
- [99] Tottey S, Waldron KJ, Firkbank SJ, et al. *Nature*, 2008, 455(7216): 1138~1142.
- [100] Doble P A, de Vega R G, Bishop D P, et al. *Chem. Rev.*, 2021, 121(19): 11769~11822.
- [101] Pushie M J, Pickering I J, Korbas M, et al. *Chem. Rev.*, 2014, 114: 8499~8541.
- [102] Hu X, Li H, Ip T K, et al. *Chem. Sci.*, 2021, 12(32): 10893~10900.
- [103] Meier S M, Kreutz D, Winter L, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, 56(28): 8267~8271.
- [104] Fung S K, Zou T, Cao B, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, 56(14): 3892~3896.
- [105] Lei W H, Liu H X, Zhong L J, et al. *Chin. Sci. Bull.*, 2007, 52(20): 2775~2781.
- [106] Dong Y, Stewart T, Zhang Y, et al. *Sci. China Life Sci.*, 2019, 62(1): 126~139.
- [107] He Z, You G, Liu Q, et al. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(21): 11931.
- [108] Selvaraj S, Krishnan U M. *J. Med. Chem.*, 2021, 64(17): 12435~12452.
- [109] Samart N, Althumairy D, Zhang D, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 2020, 416: 213286.

(上接第 33 页)

- [61] Consoli G M L, Giuffrida M L, Satriano C, et al. *Chem. Commun.*, 2022, 58: 3126~3129.
- [62] Han C, Zhang X, Wang F, et al. *Carbon*, 2021, 183: 789~808.
- [63] Wu Y, Zou H, Zhang Y, et al. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2020, 20(2): 701~708.
- [64] 马园, 段倩倩, 张博叶, 等. *微纳电子技术*, 2019, 56(7): 509~514.
- [65] Ferreira B C L B, Liyanage P Y, Leblanc R M. *Anal. Chem.*, 2021, 93(44): 14773~14777.
- [66] Geng B, Li P, Fang F, et al. *Carbon*, 2021, 184: 375~385.
- [67] Zhang M, Zhai X, Ma T, et al. *Chem. Eng. J.*, 2021, 423: 130301.
- [68] Jian H J, Wu R S, Lin T Y, et al. *ACS Nano*, 2017, 11(7): 6703~6716.
- [69] Zhao C, Wang X, Yu L, et al. *Acta Biomater.*, 2022, 138: 528~544.
- [70] Liu Y, Xu B, Lu M, et al. *Bioact. Mater.*, 2022, 12: 246~256.
- [71] Zhao S, Yan L, Cao M, et al. *ACS Appl. Mater. Interf.*, 2021, 13(45): 53610~53617.
- [72] Wu J, Lei J H, He B, et al. *Aggregate*, 2021, 2(6): e139.
- [73] Yu Y, Song M, Chen C, et al. *ACS Nano*, 2020, 14(8): 10688~10703.
- [74] Hu X, Wang S, Luo Q, et al. *Chin. Chem. Lett.*, 2021, 32(7): 2287~2291.
- [75] Li B, Zhao S, Huang L, et al. *Chem. Eng. J.*, 2021, 408: 127245.
- [76] Zhao S, Yang K, Jiang L, et al. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2021, 4(10): 10528~10533.
- [77] Yue J, Li L, Jiang C, et al. *J. Mater. Chem. B*, 2021, 9(38): 7972~7978.
- [78] Yi S, Deng S, Guo X, et al. *Carbon*, 2021, 182: 155~166.