生物体系中还原裂解氮氮双键的研究进展

雷华军¹, 莫蒙武², 孔德佳¹, 何裕建², 郑鹏武^{1*}, 吴丽^{2,3*}

1. 江西科技师范大学药学院, 南昌 330013

2. 中国科学院大学化学科学学院, 北京 100049

3. 北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

*通讯作者, E-mail: zhengpw@126.com; wuli@ucas.ac.cn

收稿日期: 2018-06-16; 接受日期: 2018-08-14; 网络版发表日期: 2018-10-08

国家自然科学基金(编号: 21778054, 51772289)、国家重点研究发展计划(编号: 2016YFF0203703)、中国科学院分子科学科教融合创新项目(编号: Y82901NED2)、中国科学院大学校部青年教师科研启动基金(编号: Y55103HY00)、中国科学院大学大学生创新实践训练计划(编号: 118900EA12)和北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室开放课题(编号: K20150204)资助项目

摘要 氮氮双键作为反应活性位点, 可被广泛地应用到多种领域. 通过氮氮双键的引入, 可在原有体系单一功能的基础上使得多种功能有机结合. 前期的研究主要集中在偶氮苯类物质光异构化性能及应用, 近年来氮氮双键的还原裂解反应因其在生物体内的应用而备受关注. 本文主要介绍了谷胱甘肽、连二亚硫酸钠及偶氮苯还原酶还原裂解氮氮双键的原理和特点, 并阐述了其对偶氮苯类物质的还原裂解性能及其在生物领域的研究进展, 并对未来的发展前景进行了展望.

关键词 氮氮双键, 还原裂解, 偶氮苯类物质, 偶氮苯还原酶

1 引言

广义上将含有氮氮双键的有机化合物统称为偶氮化合物, 目前偶氮化合物中被研究最多的是偶氮苯类物质. 早在1937年研究者就发现氮氮双键的光异构化现象^[1]. 偶氮苯类物质可在紫外光照射下由反式构型向顺式构型转化, 而在可见光或加热条件下重新使得其顺式构型向反式构型转变. 这种光异构化性能带来结构上很大的差异且异构化效率高^[2], 所以偶氮苯类物质被广泛应用于前药^[3]、光控催化^[4,5]、药物递送系统^[6,7]、光控RNA消化^[8,9]、可逆光调控发卡DNA的稳定性^[10]以及偶氮苯修饰的反义核酸在生物和纳米技

术等领域^[11]. 考虑到长时间的光照射会对组织及细胞产生一定的副作用, 因而这类光响应型物质在生物体系内的应用受到了一定的限制.

随着对生物体内高表达酶等物质的开发和对氮氮双键的应用, 研究者开发出一种基于酶等生理活性物质发挥作用的模式. 目前酶响应型化合物的报道相对较多, 此种体系多建立在组织或细胞中特有的酶等活性物质的前提下, 并使得某一类化学键被裂解, 从而实现其在生物领域的应用. 酶等活性物质响应的反应具有一些优良的性质, 如具有底物高选择性、底物特异性、高催化性能以及反应条件温和等优点^[12-14]. 因此, 利用还原性物质(谷胱甘肽、连二亚硫酸钠、偶氮

引用格式: Lei H, Mo M, Kong D, He Y, Zheng P, Wu L. Research progress on reduction cleavage of azo bonds in biological systems. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 256–265, doi: 10.1360/N032018-00142

苯还原酶)作为响应机制对氮氮双键的还原裂解成为关注的热点. 为了便于学者对偶氮类物质的还原裂解有更好的了解, 本文主要按照裂解偶氮双键的物质来源进行分类介绍其对氮氮双键还原裂解的原理和特点, 并通过筛选一些有代表性的例子, 介绍了偶氮苯类物质的还原裂解性能及其在生物领域的研究进展, 并对未来的发展前景进行了展望.

2 谷胱甘肽介导氮氮双键的还原裂解

谷胱甘肽(glutathione, GSH)是一种广泛存在于细胞内, 由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的含巯基的三肽类物质(1~10 mM)^[15], 其在人体生命历程中扮演着重要的角色, 如参与DNA及蛋白质的合成, 作为清除有毒物质的第一道防线^[16-19]. 同时, 还原型的谷胱甘肽具有抗氧化和清除自由基的作用. 目前, 谷胱甘肽裂解二硫键的研究被广泛应用于纳米材料、缀合物及递药系统等领域. 1976年, Kosower等^[20]开展了谷胱甘肽还原裂解偶氮键的研究. 随后, 他们在偶氮键的两侧分别引入不同的取代基, 通过研究不同取代的偶氮化合物与谷胱甘肽的作用, 发现在偶氮六元杂环化合物模型中($X(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCON}=\text{NCON}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{X}$), 当X被吸电子基团取代时, 偶氮苯消失的速率增加. 同时还发现谷胱甘肽还原偶氮二羧酸衍生物存在pH依赖性. 在中性或碱性条件下, 谷胱甘肽与此类物质反应的机理被认为是硫醇阴离子加成到氮氮双键上形成过渡态, 紧接着硫醇阴离子进一步与中间体发生反应得到氧化型的谷胱甘肽GSSG和相应胺类还原产物(图1).

随后, 此项研究逐渐吸引了大量的学者从事裂解偶氮键的研究, 同时也使得基于谷胱甘肽介导偶氮键还原裂解的研究被继续推进. 2007年, Moroder等^[21]将GSH与带有偶氮苯修饰的多肽进行孵育发现, GSH还原偶氮苯的难易程度受到化合物取代基电负性和偶氮苯衍生物顺反构型的影响. 结果表明顺式构型的偶氮苯类似物比反式构型更容易被GSH还原. 此项研究结果与作者1999年报道的结果^[22]相符. 同时, 还对GSH与小分子化合物反应的机理进行了解释(图2): GS^- 进攻氮氮双键形成亚磺酰基氢化偶氮苯中间体, 中间体在水的作用下形成偶氮苯类物质, 而进一步在GSH的作用下则形成氢化偶氮苯类物质.

2013年, Woolley等^[22,23]在偶氮苯化合物的4个邻

图1 GSH介导偶氮键还原裂解的机理^[20]

Figure 1 The mechanism of GSH mediated azo bond cleavage [20].

图2 GSH还原偶氮苯与多肽缀合物的机制^[21]

Figure 2 The mechanism of GSH reduction of azobenzene and polypeptide conjugates [21].

位引入了取代基, 发现偶氮键邻位被4个甲氧基取代比4个氯取代的偶氮苯更容易被GSH还原. 电子云密度较高的偶氮键更容易被质子化, 质子化后偶氮苯亲电性增加, 进而更容易受到硫基的进攻, 所以在偶氮键的邻位引入4个甲氧基时, 偶氮苯衍生物更容易被GSH还原. 计算机模拟显示, 多甲氧基取代的偶氮苯衍生物为平面分子, 这有助于氢键的形成. 而多氯取代的偶氮苯为扭曲的构型为非平面分子, 不利于偶氮键被质子化(图3).

GSH与偶氮类物质的反应速率主要取决于反应体系的pH、偶氮键周围的空间位阻以及被还原化合物整体的电子情况. 因为pH对偶氮化合物的质子化存在影响, 质子化的偶氮苯亲电性增加, 更容易受到亲核性基团的进攻.

然而与以上报道GSH还原裂解偶氮键不同, 最近, Kim等^[24]报道了硝基偶氮醚作为反应活性位点可被 GS^- 取代, 从而检测细胞线粒体内的GSH. 此荧光探针针对GSH具有显著的近红外荧光开关响应性, 为体内线

图3 (a) 多甲氧基取代的最小能量结构; (b) 多氯取代的最小能量结构; (c) 质子化后的多甲氧基取代化合物被硫醇进攻^[23] (网络版彩图)

Figure 3 (a) Calculated minimum energy structures of tetra-ortho-methoxy species. (b) Calculated minimum energy structures of tetra-ortho-chloro 4-substituted FK11 peptide. (c) The protonation of tetra-ortho-methoxy compound is expected to be attacked by thiols^[23] (color online).

粒体相关的疾病成像提供科学依据。

3 连二亚硫酸钠介导氮氮双键的还原裂解

连二亚硫酸钠俗称为保险粉, 分子式为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 是一种重要的强还原剂, 被广泛应用于氧化还原响应型和偶氮键还原裂解的研究^[25~27]。最近Castagner和Leroux等^[28]通过连二亚硫酸钠还原裂解细胞穿透肽上与赖氨酸残基及聚乙二醇偶联的偶氮苯, 获得活化后的细胞穿透肽-肽核酸聚合物(图4)。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析发现, 在连二亚硫酸钠作用下, 聚乙二醇消失。这表明了连二亚硫酸钠能够还原断裂偶氮键。此外, 缀合物的还原裂解程度与连二亚硫酸钠存在浓度依赖性。为了进一步检测连二亚硫酸钠裂解偶氮键的能力, 细胞实验表明细胞穿透肽-肽核酸在连二亚硫酸钠作用下释放肽核酸进而发挥特异性沉默荧光素酶的作用^[29]。

2017年, Kim和Khan等^[30]利用聚合物将抗癌药物多柔比星与对位带有聚乙二醇修饰的偶氮苯连接起来, 在连二亚硫酸钠的作用下聚合物中的偶氮键被还原裂解产生中间体, 中间体进一步通过1,6'消除电子级联反应^[31]产生带阳离子的聚合物, 从而使得带有抗癌药物的阳离子聚合物更好地进入癌细胞发挥抗肿瘤作用。紫外可见光谱和荧光光谱同时表明偶氮键能被连二亚硫酸钠还原裂解。通过进一步将偶氮苯模型与人结肠癌细胞(HT-29)孵育, 发现未经连二亚硫酸钠预处理的聚合物不能进入癌细胞, 预先经过连二亚硫酸

图4 连二亚硫酸钠还原裂解细胞穿透肽上与赖氨酸残基及聚乙二醇偶联的偶氮苯^[28] (网络版彩图)

Figure 4 Schematic illustration of colon-specific delivery with activatable cell penetrating peptide-peptide nucleic acid (CPP-PNA)^[28] (color online).

钠处理的聚合物可以进入细胞。同时, 酰胺键在癌细胞的酸性条件下易水解, 从而释放抗癌药DOX发挥应有的抗肿瘤作用(图5)。

最近, Kumar等^[32]使用偶氮苯连接单元合成制备了多刺激响应型自组装纳米结构, 用于结肠药物的递送。将载药后的纳米结构与连二亚硫酸钠孵育7 h, 通过紫外可见光谱分析, 发现偶氮苯的特征吸收峰的吸光度明显降低。同时, 反应体系的颜色逐渐褪去。这说明了偶氮键已被连二亚硫酸钠还原裂解。

Yao等^[25]利用连二亚硫酸钠将亲和素与生物素系统中的偶氮键接头还原裂解, 使得反应前后物质的荧光强度存在差异, 实现了对原位蛋白靶标的确证和研究。Kumar等^[27]将治疗肠炎药物柳氮磺胺吡啶与聚乙二醇单甲醚缀合形成两亲性纳米胶束结构, 在模拟偶氮苯还原酶的条件下, 通过连二亚硫酸钠将偶氮键还原裂解进而释放药物, 从而达到结肠靶向递送药物的目的。2018年, Liu等^[33]在激光和连二亚硫酸钠的共同作用下, 使偶氮键和光敏分子二氢卟吩形成的纳米共聚物包载的抗癌药物释放, 实现了光动力治疗和化疗药物的有效结合, 达到了缺氧响应型药物在光照下释放的目的。结合上述连二亚硫酸钠介导氮氮双键的还原裂解研究, 我们发现此还原剂在一定程度上可以使偶氮键还原裂解, 但同时也存在一些不足, 如连二亚硫酸钠具有易潮解等特性, 当加热到50℃以上时会分解放热并放出二氧化硫^[34]。因此, 在生物体系内使用连二亚硫酸钠作为还原剂具有一定的局限性, 选择内源性的具有裂解氮氮双键的物质具有更广泛的应用

图 5 聚合物-药物缀合物的化学结构以及通过侧链偶氮苯基团的裂解而引发细胞摄取^[30] (网络版彩图)

Figure 5 Chemical structure of the polymer-drug conjugate and the concept of triggered cellular uptake through cleavage of the side-chain azobenzene groups [30] (color online).

前景.

4 偶氮苯还原酶介导氮氮双键的还原裂解

偶氮苯还原酶是一类能够还原裂解氮氮双键酶系的统称, 其广泛存在于结肠、微生物以及肝脏中^[35,36]. 偶氮苯还原酶可分别在辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH, 还原性辅酶II)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH, 又称为还原型辅酶I)和黄素单核苷酸(FMN)的共同作用下切割偶氮键.

4.1 鼠结肠及粪便内容物介导氮氮双键的还原裂解

环孢多肽A (CsA)为免疫抑制剂, 其主要功能是防止器官或组织移植引起的免疫排斥反应. 为了增强CsA的水溶性, 2000年, Kopecek等^[37]以偶氮苯为桥梁将具有氨基修饰的CsA与甲基丙烯酸酐(HPMA)连接形成共聚物, 共聚物中的偶氮键在结肠部位能够选择性地被还原裂解从而释放治疗结肠疾病的药物. 在模拟生理条件下, 将共聚物与鼠盲肠提取物孵育6 h, 通过紫外/可见吸收光谱(UV-Vis)及基质辅助激光解吸电

离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)等手段都证明了偶氮苯还原酶参与了偶氮键的还原裂解.

结肠疾病的治疗可通过结肠部位高表达的酶实现对前药共聚体系中偶氮键的切割^[38]. 鼠和人的盲肠及粪便都含有大量的厌氧细菌, 大约每克鼠的肠内溶物和人的肠内溶物分别含有 $10^8 \sim 10^9$ 个和 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个细菌^[39]. Sharma等^[40]以偶氮键作为反应位点, 将原料药5-氨基水杨酸类似物的氨基与载体通过偶联反应制备成带偶氮键的前药类似物. 通过紫外分析和细胞毒性试验表明前药类似物与鼠粪便提取物孵育24 h偶氮键被偶氮苯还原酶还原裂解(图6).

4.2 细菌提取物介导偶氮键的还原裂解

目前偶氮苯还原酶来源于细菌的报道相对较多^[41-44], 但并非所有的细菌都能脱色降解偶氮类物质. 一般来说, 偶氮类物质对需氧菌群不敏感, 在多数情况下不能被需氧菌还原裂解^[45,46]. 然而, 2013年, Gilbert等^[47]发现在低氧浓度下甲基红(methyl red, MR)几乎不与偶氮苯还原酶反应, 然而在最佳氧浓度下, 过渡表达偶氮苯还原酶的基因能够弥补丢失的偶氮苯还原酶. 因此, 氧浓度对于微生物介导氮氮双键的裂解反应

图6 基于偶氮的前体药物的图解机制方法^[40] (网络版彩图)

Figure 6 Diagrammatical mechanistic approach for azo based pro-drugs [40] (color online).

不容忽视. 这一发现是不同于以往研究者报道的厌氧菌不能还原偶氮苯类物质.

偶氮苯还原酶在以偶氮类物质作为底物时, 通常都需要在辅酶NADH、NADPH存在下或依赖于NADH和FMN提供电子的情况下才能使氮氮双键还原裂解.

NADH参与型: NADH参与了偶氮苯还原酶介导偶氮类物质的降解, 其作为供电子体在脱色反应中扮演重要角色^[48~51]. 2015年, Xu等^[48]利用荧光传感器在活细胞中追踪检测到偶氮染料被微生物降解的全过程, 传感器示踪结果表明, 具有低极性且疏水性的偶氮染料可以进入细胞并被酶还原裂解. 通过高效液相色谱、荧光光谱、荧光共聚焦显微镜以及可视化等手段表明偶氮类物质已被还原酶裂解. 高效液相色谱及质谱分析表明, 偶氮键被还原断裂后进一步产生相应的胺类物质(图7). 研究者还发现甲基红(MR)及带修饰的甲基红(OG)与偶氮苯还原酶作用后的还原裂解速率存在差异. 因此, 研究者推测还原底物的分子大小和结构可能影响它们与酶的结合力.

NADPH参与型: NADPH为生命过程中一个不可或缺或递氢体, 参与了生物体内一系列化学反应. 2005年, Chen等^[52]发现来源于金黄色葡萄球菌的偶氮苯还原酶在NADPH提供电子的情况下能够降解偶氮染料. 通过高效液相色谱(HPLC)检测到甲基红被偶氮

苯还原酶还原裂解为相应的胺类物质(图8).

目前, 偶氮苯还原酶在肠道前药设计领域应用较多. 呋喃西林属于硝基芳香类药物, 是一种广谱抗生素. 2011年, Sim等^[53]从绿脓杆菌中提取的偶氮苯还原酶(paAzoR1)在辅酶NADPH的共同参与下, 将呋喃西林的硝基还原为羟胺, 而不是将偶氮苯或氢化偶氮苯还原裂解. 因为NADPH及呋喃西林与偶氮苯还原酶的结合存在竞争, 从而导致呋喃西林与偶氮苯还原酶反应的速率较低; 同时呋喃西林与paAzoR1反应的米氏常数(K_m)较低, 进而导致paAzoR1与偶氮化合物(甲基红)结合的能力比呋喃西林更强^[54].

FMN及NADH共同参与型: FMN是黄素蛋白的辅基, 在生物氧化过程中充当着传递电子的角色. 目前在两种辅酶的共同参与下利用偶氮苯还原酶还原裂解偶氮键的报道相对较少. 为了更好地研究偶氮苯还原酶还原裂解甲基红的还原机制, 2017年, Wang等^[55]构建了来源于Shewanella oneidensis MR-1 (soAzoR)菌种的偶氮苯还原酶的三级结构, 利用计算机模拟了FMN、NADH及偶氮染料甲基红与酶的结合方式. 在类似于生理条件下, 将甲基红、NADH及偶氮苯还原酶在30℃下孵育, 酶标仪测量结果显示野生型和突变型偶氮苯还原酶的活性都较低, 但突变型的偶氮苯还原酶活性相对于野生型较高, 只有9%的甲基红被偶氮苯还原酶还原降解, 甲基红的空间位阻妨碍了底物与酶的

图7 传感器的化学结构和微生物还原^[48] (网络版彩图)

Figure 7 Chemical structures of the sensors and microbial reduction [48] (color online).

图8 大肠杆菌表达金黄色葡萄球菌Azo1还原降解甲基红^[52]

Figure 8 Reductive degradation of methyl red by Azo1 of *S. aureus* expressed in *E. coli* [52].

结合, 从而导致酶活性较低. Urano等^[43]利用来源于大肠杆菌的偶氮苯还原酶开发了一种荧光报告系统. 研究者以罗丹明偶氮苯缀合物作为非荧光底物, 在辅酶 FMN、NADH和偶氮苯还原酶的共同作用下, 使偶氮键裂解从而释放罗丹明荧光染料, 实现了在单细胞水平上对偶氮苯还原酶的检测(图9).

4.3 肝微粒体介导偶氮键的还原裂解

肝微粒体酶又称为肝药酶, 主要存在于肝细胞内质网中. 在肝微粒体酶这个复杂的酶系统中, 发挥主要作用的是细胞色素P-450酶系^[56]. 20世纪末Levine等^[57]利用循环伏安法直接检测鼠肝微粒体细胞色素P-450还原偶氮染料(DAB)产生的中间体. 同时, 研究了偶氮染料的不同取代基对还原快慢存在影响, 发现当偶氮染料的电子云密度较低时, 不能被微粒体细胞色素P-450还原降解. 因为偶氮染料多为单电子或双电子还原, 底物接受一个电子形成带一个电荷的过渡态, 再进一步接受电子形成带两个电荷的过渡态, 然后还原性氢进攻过渡态生成中间体氢化偶氮类物质, 最终被肝微粒体酶还原裂解为相应的胺类物质(图10).

2013年, ElSayed等^[58]通过偶氮苯连接单元将抗癌药物多柔比星(DOX)与纳米材料缀合, 利用肝癌细胞中高表达的偶氮苯还原酶裂解偶氮键, 实现多柔比星的可控释放(图11). 实验结果表明, 将人肝微粒体及NADPH与携带抗癌药物多柔比星(DOX)的纳米缀合物孵育数小时, 通过紫外可见光谱分析反应体系吸光度发生明显变化, 同时, 利用HPLC表征DOX从缀合物中释放的程度. 结果表明, 缀合物中带有供电子基的偶氮苯有利于DOX的释放. 他们在测定体系吸光度过程中使用盐酸消除NADPH对反应体系吸光度的影响, 但有研究表明盐酸对偶氮苯类物质的紫外吸收也存在影响, 因为酸性条件下偶氮键可以被质子化, 导致偶氮类物质的吸光度降低^[23], 从而很难通过体系吸光度的变化来反映偶氮类物质还原裂解的情况.

一般而言, 带有亲水性和疏水性的聚合物在水中可自组装成胶束. 迄今为止, 以偶氮苯为反应活性位点的研究多用于药物递送方面. 一旦包载抗癌药物的胶束进入高表达偶氮苯还原酶的细胞, 胶束将会被酶还原裂解, 释放抗癌药物, 从而实现定点释放抗癌药物的目的. 2013年, Khan等^[36]将电子云密度高的偶氮苯衍生物与聚乙二醇连接, 其亲水性和疏水性部分在

图9 基于偶氮苯还原酶报告系统的荧光底物的设计合成^[43] (网络版彩图)

Figure 9 Designt of an Azoreductase-based reporter system with synthetic fluorogenic substrates ^[43] (color online).

图10 推测的谷胱甘肽还原裂解偶氮染料的机理^[57]

Figure 10 Proposed mechanism of reductive cleavage of azobenzene dye by glutathione ^[57].

图11 缀合物的结构设计及其在肝癌细胞中内化和活化的示意图^[58] (网络版彩图)

Figure 11 A schematic drawing showing the structure, internalization, and activation of G5-L(X)-DOX conjugates in hepatic cancer cells ^[58] (color online).

水中会自发形成胶束(图12). 生理条件下, 胶束与酶作用后, 将导致偶氮键断裂, 从而促进胶束裂解. 通过核磁共振氢谱(¹H NMR)、原子力显微镜(AFM)、透射电子显微镜(TEM)、动态光散射(DLS)和紫外/可见吸收光谱(UV-Vis)等手段证明了偶氮键能被偶氮苯还原酶还原裂解.

图12 胶束在偶氮苯还原酶及辅酶NADPH下裂解的示意图^[36] (网络版彩图)

Figure 12 Schematic of the micellar cleaved by azobenzene reductase and coenzyme NADPH ^[36] (color online).

与他们前期研究的胶束在酶作用下裂解的过程相反, Khan等^[35]利用聚苯乙烯在氯化亚铜的作用下与偶氮苯酯反应形成一个疏水性的缀合物, 此时, 胶束很难形成. 当利用偶氮苯还原酶及辅酶NADPH将缀合物中的偶氮键还原裂解, 通过1°消除级联反应^[31]裸露出亲水端, 从而促使聚合物亲水部分和疏水部分在水中自组装形成胶束(图13). 胶束的制备相对简单, 但能够在酶响应的条件下自发形成胶束相对较难. 此体系可用于包载抗癌药物, 开发出具有控释或缓控释性能的纳米制剂, 这样既可减少药物的给药次数, 又能提高患者的顺应性.

为了克服抗癌药物在水中溶解度差和血液循环不稳定等问题. 2017年, Zhou等^[59]利用喜树碱(CPT)与单甲基聚乙二醇通过二硫键连接, 而酶响应型的聚合物通过偶氮苯将亲水性的聚乙二醇与亲脂性的聚己内酯连接, 两种聚合物在溶液中自组装成具有主动靶向能力的双响应型胶束, 实现了细胞内快速释放抗癌药物的目的. 在类似于生理条件下, 将前药与偶氮苯还原酶孵育5 h, 通过核磁共振氢谱分析表明此化合物内的偶氮键已被偶氮苯还原酶还原裂解. 细胞毒性试验也表明, 在双响应型条件下胶束发生裂解从而释放抗癌药物. 将此胶束称之为双响应型体系, 是因为二硫键与CPT相连作为胶束的中心, 二硫键很容易被谷胱甘肽还原裂解; 与偶氮苯相连的部分构成胶束, 分布在外层, 一旦外层与偶氮苯还原酶接触将会触发偶氮键断裂进而释放内层物质(图14).

最近Sharma等^[60]将偶氮苯与阳离子缀合物相连, 再将其与抗生素氨基糖苷连接, 研发了一种具有自组装性能的智能两亲性纳米结构用于药物递送体系. 将纳米粒子与偶氮苯还原酶孵育6 h, 通过多重光散射仪

图13 聚合物结构单元及其在水中酶促活化后自组装成纳米胶束结构^[35] (网络版彩图)

Figure 13 Polymer building block and its assembly into a micellar nanostructure upon enzymatic activation in water ^[35] (color online).

图14 活性靶向聚合物胶束的酶和氧化还原双触发细胞内释放以提高癌症治疗的示意图设计^[59] (网络版彩图)

Figure 14 Schematic design of enzyme and redox dual-triggered intracellular release from actively targeted polymeric micelles to enhance cancer treatment ^[59] (color online).

测定反应体系粒径和电位的变化及紫外可见光谱表征体系吸光度的变化说明了还原酶能够还原裂解偶氮键, 细胞毒性实验表明, 纳米胶束可以进入HeLa细胞, 并抑制肿瘤细胞生长, 实现了此类胶束携载原料药氨基糖苷在肿瘤细胞释放的目的.

目前偶氮苯还原酶响应型结构的设计多集中在纳米胶束^[27]、前药^[61]以及荧光探针^[62,63]等领域. 对于偶氮苯还原酶响应的纳米胶束而言, 聚合物一般在酶还原裂解氮氮双键后使得亲水端或疏水端裸露, 从而在反应体系中自组装形成胶束; 对于偶氮苯还原酶响应的前药而言, 通常将带有氨基的原料药与芳香胺类物质偶联从而引入偶氮键, 在高表达偶氮苯还原酶的细胞内偶氮键被还原裂解, 从而释放原料药, 实现治疗疾病的目的; 对于偶氮苯还原酶响应的荧光探针而言,

此类设计多基于与偶氮苯还原酶反应前后反应物与产物的荧光强度存在显著差异, 此外, 通常情况下在偶氮苯与聚合物的连接处都会引入酰胺键, 在还原剂的作用下偶氮键断裂生成芳香胺基, 并进一步自发的发生1'6消除的电子级联反应^[31], 从而实现抗癌药物的定点释放, 这将促使偶氮类物质应用到更广的领域当中。

5 结论与展望

综上所述, 氮氮双键的还原裂解作为一种还原响应刺激模型的发现和深入研究, 弥补了小分子化合物及其大分子物质依赖于光、温度及pH响应型在生物体内的调控, 并为近年来生物体系中纳米材料的应用注入了新的活力。目前氮氮双键的还原裂解主要依赖谷胱甘肽、连二亚硫酸钠、偶氮苯还原酶等还原性物质。几乎所有的细胞都含有一定量的谷胱甘肽(GSH), 且癌细胞内的GSH含量比正常细胞高。目前GSH响应体系多集中于引入二硫键作为反应活性位点^[64-66], 然而考虑到偶氮类物质具有易被癌细胞高表达GSH还原的特性, 因此基于偶氮类物质可开发出对GSH响应的模型, 包括前药、纳米胶束、纳米缀合物、寡核苷酸甚至蛋白质等体系, 从而实现在肿瘤细胞中对带有偶氮修饰的体系进行还原裂解调控的目的。近年来利用酶作为一种还原响应刺激成为可能。目前偶氮苯还原酶主要来源于微生物, 而这些微生物主要来源于土壤、动物粪便或存在于动物某一组织的菌群。考虑到偶氮类物质广泛用于纺织品、食品、化妆品和前药等领域^[32,67], 且大多数偶氮染料具有致癌性和致突变性^[68]。利用微生物对偶氮类物质的高效还原降解是非常必要的。这不仅可以解决偶氮类物质在自然条件下难降解的问题, 还有助于偶氮类物质在其他领域如纳米胶束、载药共聚物、前药以及荧光探针等方面的应用。肝微粒体具有丰富的代谢酶, 且肝癌细胞(HepG2)

内存在一定量的偶氮苯还原酶。利用肝癌细胞具有偶氮苯还原酶这一特性, 可以开发多种依赖于裂解氮氮双键的给药系统。

目前对于氮氮双键的还原裂解在生物体系内的应用仍处于起步阶段, 有关还原降解偶氮类物质的酶或还原剂较多, 但仍存在一些不足。(1) 对于GSH介导偶氮苯类物质的还原裂解而言, 尽管GSH是生物体内重要的抗氧化剂, 但GSH对于氧化性物质的还原存在非选择性, 这使得基于GSH响应的偶氮类物质被还原裂解的程度降低。(2) 连二亚硫酸钠作为还原剂裂解偶氮键也存在一些不足, 此还原剂还原性极强且具有易吸湿等缺点, 从而限制了其在生物体内的应用。(3) 来源于微生物的偶氮苯还原酶在应用方面存在一些不足, 如酶的稳定性和可重复性很难被保证^[69]。同时, 尽管此类酶可以用于降解废水中的偶氮类物质, 但从微生物中提取酶的操作繁琐且成本较高, 因此限制了其在生物体内的应用。(4) 对于肝微粒体介导偶氮键的还原裂解而言, 还原裂解效率还有待于通过改善还原底物结构等因素进一步提高。

为了充分了解偶氮苯还原裂解的机理及性能等, 并进一步发掘其与纳米材料结合作为前药的优异性能和应用潜能, 需要进一步系统探索氮氮双键的还原裂解的新方法和新还原性物质。通过反应控制实现对结构的精确裁剪, 深入研究偶氮苯基团类型、接枝位点位置、官能化度等因素对纳米材料结构和性能的影响。探索利用偶氮类物质的取代基及偶氮键电子云密度等方面筛选出最佳的偶氮分子结构及纳米组装结构, 以便开发出对还原剂高响应的偶氮类物质。此外, 与医学领域结合, 探索更多含有裂解氮氮双键的还原性物质的生物组织, 为实现氮氮双键的还原裂解在生物体系内的应用及实现带偶氮修饰的体系靶向治疗癌症奠定坚实的基础, 也为诸多学科合理应用偶氮类物质提供了参考。

参考文献

- 1 Hartley GS. *Nature*, 1937, 140: 281
- 2 Bandara HMD, Burdette SC. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 1809-1825
- 3 Sandborn WJ. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97: 2939-2941
- 4 Göstl R, Senf A, Hecht S. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 1982-1996
- 5 Stoll RS, Hecht S. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 5054-5075

- 6 Li X, Liu D, Wang Y, Xu S, Liu H. *Colloids Surfs A*, 2018, 555: 55–62
- 7 Ye L, Liu X, Ito K, Feng Z. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 5746–5757
- 8 Kong D, Mo M, Ji H, Lei H, Chen L, Li Y, He Y, Tang X, Zheng P, Wu L. *Sci Sin Chim*, 2018, doi: 10.1360/N032018-00045 (in Chinese) [孔德佳, 莫蒙武, 季禾茗, 雷华军, 陈露, 李元昊, 何裕建, 汤新景, 郑鹏武, 吴丽. 中国科学: 化学, 2018, doi:10.1360/N032018-00045]
- 9 Wu L, He Y, Tang X. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26: 1070–1079
- 10 Wu L, Koumoto K, Sugimoto N. *Chem Commun*, 2009, 99: 1915–1917
- 11 Li J, Wang X, Liang X. *Chem Asian J*, 2014, 9: 3344–3358
- 12 Hahn ME, Gianneschi NC. *Chem Commun*, 2011, 47: 11814–11821
- 13 Hu J, Zhang G, Liu S. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 5933–5949
- 14 Zelzer M, Todd SJ, Hirst AR, McDonald TO, Ulijn RV. *Biomater Sci*, 2013, 1: 11–39
- 15 Smith CV, Jones DP, Guenther TM, Lash LH, Lauterburg BH. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 140: 1–12
- 16 Dickinson DA, Forman HJ. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64: 1019–1026
- 17 Dringen R. *Prog Neurobiol*, 2000, 62: 649–671
- 18 Markovic J, Mora NJ, Broseta AM, Gimeno A, de-la-Concepción N, Viña J, Pallardó FV. *PLoS One*, 2009, 4: e6413
- 19 Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57: 145–155
- 20 Kosower EM, Kanety-Londner H. *J Am Chem Soc*, 1976, 98: 3001–3007
- 21 Boulègue C, Löweneck M, Renner C, Moroder L. *ChemBioChem*, 2007, 8: 591–594
- 22 Behrendt R, Schenk M, Musiol HJ, Moroder L. *J Peptide Sci*, 1999, 5: 519–529
- 23 Samanta S, Beharry AA, Sadovski O, McCormick TM, Babalhavaeji A, Tropepe V, Woolley GA. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 9777–9784
- 24 Lim SY, Hong KH, Kim DI, Kwon H, Kim HJ. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 7018–7025
- 25 Liew SS, Du S, Ge J, Pan S, Jang SY, Lee JS, Yao SQ. *Chem Commun*, 2017, 53: 13332–13335
- 26 Offenloch JT, Willenbacher J, Tzvetkova P, Heiler C, Mutlu H, Barner-Kowollik C. *Chem Commun*, 2017, 53: 775–778
- 27 Priyam A, Shivhare K, Yadav S, Sharma AK, Kumar P. *Colloids Surfs A*, 2018, 547: 157–167
- 28 Lee SH, Moroz E, Castagner B, Leroux JC. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 12868–12871
- 29 Dean D. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 44: 81–95
- 30 Eom T, Yoo W, Lee YD, Park JH, Choe Y, Bang J, Kim S, Khan A. *J Mater Chem B*, 2017, 5: 4574–4578
- 31 Carl PL, Chakravarty PK, Katzenellenbogen JA. *J Med Chem*, 1981, 24: 479–480
- 32 Yadav S, Deka SR, Tiwari K, Sharma AK, Kumar P. *IEEE Transon NanoBiosci*, 2017, 16: 764–772
- 33 Zhang X, Wu M, Li J, Lan S, Zeng Y, Liu X, Liu J. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 21909–19
- 34 Gong Y, Wu Y. *Sichuan Chem Ind*, 2013, 16: 9–12 (in Chinese) [龚远平, 伍勇. 四川化工, 2013, 16: 9–12]
- 35 Rao J, Hottinger C, Khan A. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 5872–5875
- 36 Rao J, Khan A. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 14056–14059
- 37 Lu ZR, Gao SQ, Kopecková P, Kopecek J. *Bioconjugate Chem*, 2000, 11: 3–7
- 38 Chourasia MK, Jain SK. *J Pharm Pharm Sci*, 2003, 6: 33–66
- 39 Smith HW. *J Pathol*, 1965, 89: 95–122
- 40 Sharma R, Rawal RK, Gaba T, Singla N, Malhotra M, Matharoo S, Bhardwaj TR. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 5332–5338
- 41 D'Souza E, Fulke AB, Mulani N, Ram A, Asodekar M, Narkhede N, Gajbhiye SN. *Environ Earth Sci*, 2017, 76: 721
- 42 Huang W, Chen J, Hu Y, Zhang L. *Electrochim Acta*, 2018, 260: 196–203
- 43 Shin N, Hanaoka K, Piao W, Miyakawa T, Fujisawa T, Takeuchi S, Takahashi S, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Tahara T, Tanokura M, Nagano T, Urano Y. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 558–563
- 44 Whangsuk W, Toewiwat N, Dubbs J, Sallabhan R, Mongkolsuk S, Loprasert S. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502: 9–14
- 45 Morrison JM, Wright CM, John GH. *Anaerobe*, 2012, 18: 229–234
- 46 Stolz A. *Appl Microbiol Biotech*, 2001, 56: 69–80
- 47 Mercier C, Chalansonnet V, Orenge S, Gilbert C. *J Appl Microbiol*, 2013, 115: 1012–1022
- 48 Liu F, Xu M, Chen X, Yang Y, Wang H, Sun G. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 11356–11362
- 49 Ooi T, Shibata T, Sato R, Ohno H, Kinoshita S, Thuoc TL, Taguchi S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 377–386

- 50 Zhang X, Ng IS, Chang JS. *J Taiwan Institute Chem Eng*, 2016, 61: 97–105
- 51 Zhao M, Sun PF, Du LN, Wang G, Jia XM, Zhao YH. *Environ Sci Pollut Res*, 2014, 21: 6136–6145
- 52 Chen H, Hopper SL, Cerniglia CE. *Microbiology*, 2005, 151: 1433–1441
- 53 Ryan A, Kaplan E, Laurieri N, Lowe E, Sim E. *Sci Rep*, 2011, 1: 63–68
- 54 Wang CJ, Laurieri N, Abuhammad A, Lowe E, Westwood I, Ryan A, Sim E. *Acta Crystlogr F Struct Biol Cryst Commun*, 2010, 66: 2–7
- 55 Cao X, Di M, Wang J. *J Mol Graphics Model*, 2017, 78: 213–220
- 56 Zhao C, Mi H. *Trad Chin Drug Res Clin Pharm*, 2002, 13: 334–337 (in Chinese) [赵春梅, 宓穗卿, 中药新药与临床药理, 2002, 13: 334–337]
- 57 Zbaida S, Levine WG. *Chem Res Toxicol*, 1991, 4: 82–88
- 58 Medina SH, Chevliakov MV, Tiruchinapally G, Durmaz YY, Kuruvilla SP, Elsayed MEH. *Biomaterials*, 2013, 34: 4655–4666
- 59 Zhang L, Wang Y, Zhang X, Wei X, Xiong X, Zhou S. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 3388–3399
- 60 Deka SR, Yadav S, Mahato M, Sharma AK. *Colloids Surfs B-Biointerfaces*, 2015, 135: 150–157
- 61 Teruel AH, Pérez-Esteve É, González-Álvarez I, González-Álvarez M, Costero AM, Ferri D, Parra M, Gaviña P, Merino V, Martínez-Mañez R, Sancenón F. *J Control Release*, 2018, 281: 58–69
- 62 Chevalier A, Piao W, Hanaoka K, Nagano T, Renard PY, Romieu A. *Methods Appl Fluoresc*, 2015, 3: 044004
- 63 Tang J, Huang C, Shu J, Zheng J, Ma D, Li J, Yang R. *Anal Chem*, 2018, 90: 5865–5872
- 64 Kong F, Liang Z, Luan D, Liu X, Xu K, Tang B. *Anal Chem*, 2016, 88: 6450–6456
- 65 Liu Y, Zhu S, Gu K, Guo Z, Huang X, Wang M, Amin HM, Zhu W, Shi P. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 29496–29504
- 66 Pillow TH, Sadowsky JD, Zhang D, Yu SF, Del Rosario G, Xu K, He J, Bhakta S, Ohri R, Kozak KR, Ha E, Junutula JR, Flygare JA. *Chem Sci*, 2017, 8: 366–370
- 67 Hildenbrand S, Schmahl FW, Wodarz R, Kimmel R, Dartsch PC. *Int Arch Occup Environ Health*, 1999, 72: M052–M056
- 68 Adedayo O, Javadpour S, Taylor C, Anderson WA, Moo-Young M. *World J Microbiol Biotech*, 2004, 20: 545–550
- 69 Husain Q. *Crit Rev Biotech*, 2006, 26: 201–221

Research progress on reduction cleavage of azo bonds in biological systems

Huajun Lei¹, Mengwu Mo², Dejia Kong¹, Yujian He², Pengwu Zheng^{1*}, Li Wu^{2,3*}

¹ School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China

² School of Chemical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

*Corresponding authors (email: zhengpw@126.com; wuli@ucas.ac.cn)

Abstract: Azo bonds as reactive sites can be widely applied to many fields. Through the introduction of azo bonds, multiple functions can be commendably combined on the basis of the single function of the original system. Studies are focused on the photoisomerization properties and applications of azobenzene derivatives. However, the reduction and cleavage reactions of azo bonds have attracted more and more attention in recent years because of their application *in vivo*. This review mainly introduced the mechanism and properties of reductants that include glutathione, sodium dithionite and azoreductase. The reductive cleavage properties of azobenzenes and their research progress in the biological field are described, and the future development prospects are also discussed.

Keywords: azo bond, reductive cleavage, azobenzene derivatives, azoreductase

doi: [10.1360/N032018-00142](https://doi.org/10.1360/N032018-00142)