论文

胞内 SOD1 活性的 ATSM 抑制对 ERK 信号通路的影响

张哲, 陈欢欢, 杨婵丽, 章丹, 刘春荣, 刘长林*

农药与化学生物学教育部重点实验室; 华中师范大学化学学院, 武汉 430079

*通讯作者, E-mail: liuchl@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2015-05-04; 接受日期: 2015-06-16; 网络版发表日期: 2015-07-20

doi: 10.1360/N032015-00060

摘要 铜锌超氧化物歧化酶(SOD1)是胞内分布最广的最重要的抗氧化酶之一, 其功能是催化超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)歧化为过氧化氢(H_2O_2), 维持胞内 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的内稳态浓度. 高浓度的 H_2O_2 通过可逆氧化修饰信号蛋白(如磷酸酶)活性部位的半胱氨酸残基, 导致胞内活性氧(ROS)信号通路异常. 以对 Cu^{2+} 有高亲和力的 ATSM 为螯合剂, 夺取 SOD1 活性部位中的铜, 使其失活. 在不影响细胞内 SOD1 表达的情况下, ATSM 有效抑制了 SOD1 的活性, 改变了胞内 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的相对浓度, 降低了 MAPK 信号通路中 ERK 的磷酸化水平.

关键词ATSM
SOD1
信号转导
磷酸化
活性氧(ROS)

1 引言

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种广泛存在于动植物及微生物细胞内的金属抗氧化酶之一, 催化超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)歧化为 H_2O_2 和 O_2 , 维持胞内活性氧物种($O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2)的内稳态^[1,2]. 处于内稳态浓度的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 是维持胞内正常的氧化还原信号通路所必需的信号物质^[3~5]. 局部高浓度的 H_2O_2 至少引起两种效应: (1) 导致信号通路特异的 IKKK (I κ B 激酶, I κ B 表示 NF- κ B 的抑制蛋白)活化, 激活胞内 κ 基因结合核因子(NF- κ B)信号转导^[6]; (2) 氧化活性部位保守的半胱氨酸残基(产物为 $-SO_{1/2/3}H$, $-SOH$ 与 $-SH$ 反应形成 $-S-S-$), 使蛋白质酪氨酸磷酸酶(PTP)等信号蛋白失活, 激活促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导^[7].

铜锌超氧化物歧化酶(SOD1)是 SOD 家族最重要的成员之一, 主要存在于真核细胞的细胞核、细胞质、线粒体膜间隙中, 动物红细胞中 SOD1 含量较高^[1,2,8]. SOD1 的活性中心含 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} (图 1), 其中

Cu^{2+} 是不可替代的, 否则 SOD1 将失去催化活性; Cu^{2+} 不仅起催化作用, 而且对 SOD1 的结构起到稳定作用; Zn^{2+} 也起稳定 SOD1 结构的作用^[9]. 研究已发现, SOD1 活性过高与癌症等重大疾病的发生和发展有密切关系, 因此, SOD1 已成为一些正在进行临床实验和正在开发中的抗癌药物的作用靶标^[10~12].

维持胞内 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 处于内稳态浓度的关键是调控胞内 SOD1 的活性. 细胞自身通过抑制 SOD1 表达, 使其活性保持在合适的水平^[1]. 使用铜螯合剂螯

图 1 牛 SOD1 活性中心口袋结构以及 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 结合位点

合胞内的 Cu^{2+} (包括 SOD1 中的 Cu^{2+}) 或改变 Cu^{2+} 在 SOD1 中的配位是从胞外调控胞内 SOD1 活性的有效途径. 迄今为止, 仅发现两种螯合剂由螯合胞内的 Cu^{2+} 有效地抑制 SOD1 的活性: (1) 四硫代钼酸盐 (MoS_4^{2-}) 主要通过螯合细胞膜上铜传输蛋白中的 Cu^{2+} [13,14], 阻断新合成的 SOD1 获得 Cu^{2+} 而活化, 降低胞内 SOD1 的活性, 使 H_2O_2 水平下降和 PTP 活性上升, 从而调控胞内 MAPK 信号通路 [15]; (2) 二乙胺二硫代氨基甲酸盐 (DDC, 图 2) 也能通过螯合胞内的 Cu^{2+} 抑制 SOD1 的活性, 但具体的作用机理目前仍不清楚 [16]. 目前的研究结果还不能表明这两种螯合剂能选择性地螯合 SOD1 中的 Cu^{2+} , 使 SOD1 失活.

双缩氨基硫脲类化合物是一类对 Cu^{2+} 具有强螯合作用和较好选择性的螯合剂. 尽管它们与 Cu^{2+} 形成的电中性配合物在疾病的放射性诊断和神经退行性疾病的治疗中已获得应用 [17-21], 但迄今为止未见该类螯合剂作为 SOD1 抑制剂使用的报道. 2,3-丁二酮双缩氨基-*N*-甲基硫脲 (diacetylbis-*N*-(4)-methylthiosemicarbazone, ATSM) 是该类螯合剂中最重要的成员之一, 与 Cu^{2+} 配位的平衡常数达 $\sim 10^{18} \text{ L/mol}$ [18], 大于 Cu^{2+} 与 SOD1 结合的平衡常数 ($\sim 10^{14} \text{ L/mol}$) [22]. ATSM 由于较好的水溶性和良好的脂溶性, 能较容易地跨越细胞膜到达细胞内, 并且 ATSM 的分子结构呈一维线性, 具有良好的柔性, 且分子构型与 SOD1 活性区域的表面疏水空腔水分吻合, 因此能很好地“嵌合”到活性位点. 胞内的 ATSM 有可能通过选择性地螯合 SOD1 中的 Cu^{2+} , 从而抑制 SOD1 的活性. SOD1 的抑制导致胞内 H_2O_2 水平下降, PTP 信号上升, 以及信号蛋白质磷酸化水平下降, 从而调控涉及癌症等疾病的氧化还原信号通路. 这种对氧化还原信号通路的调控有可能为以 SOD1 为靶标的药物设计提供新的思路.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)购自武汉大学细胞典

图2 文献报道和本文使用的 SOD1 抑制剂分子结构

藏中心, DMEM 培养基(高糖)、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(1×PBS pH 7.4)购自 Gibco 公司(美国); 双抗(青霉素-链霉素)、0.25%胰酶购自武汉 Boster 公司(中国); DHE 荧光探针购自 Sigma 公司(美国); HT Superoxide Dismutase Assay Kit 购自 Trevigen 公司(美国); DCFH-DA 荧光探针、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒购自碧云天公司(中国); 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、滤纸、牛血清白蛋白(BSA)、Tween-20、四甲基二乙胺(TEMED)、过硫酸铵购自武汉三益公司(中国); HRP 标记的山羊抗兔二抗、兔抗 β -actin 抗体购自 Protein Tech 公司(美国); 兔抗 ERK1/2 多抗、兔抗 ERK1/2 (P-Thr202/Tyr204)多抗购自南京凯基公司(中国); 兔抗 SOD1 抗体购自 Abcam 公司(英国); 预染的蛋白质分子量标准购自 Thermo 公司(美国); High Pure RNA Isolation Kit、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit、FastStart Essential DNA Green Master 购自 Roche 公司(瑞士); PCR 引物购自 Invitrogen 公司(美国).

紫外-可见分光光度计 (Analytik-jena SPECORD-210, Analytik Jena AG 公司, 德国); 离心机 (Scilogex D3024R, Scilogex 公司, 美国); 超纯水仪 (Millipore AQUELIX-5, Merck Millipore 公司, 美国); 细胞培养箱 (Hera Cell 150 型, Thermo Scientific 公司, 美国); 高压蒸汽灭菌锅 (SX-500 型, Tomy Seiko 公司, 日本); 酶标仪 (SpectraMax M5 型, Molecular Devices 公司, 美国); 倒置荧光显微镜 (DMI3000B, Leica 公司, 德国); 流式细胞分选仪 (BD FACSAria III, BD Biosciences 公司, 美国); 稳压稳流电泳仪 (DYY-III-4, 北京六一仪器, 中国); 凝胶成像分析系统 (Bio-Rad, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (LightCycler®96, Roche 公司, 瑞士).

2.2 实验方法

2.2.1 ATSM 的合成与表征

ATSM 参照文献 [23] 合成. 称取 2.10 g 4-甲基氨基硫脲 (0.02 mol) 和 0.86 g 2,3-丁二酮 (0.01 mol) 加入到 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 50 mL 乙醇, 恒温回流反应 4 h. 抽滤得到的粗产品, 用乙醇和 *N,N*-二甲基甲酰胺混合溶剂结晶并进行表征. 元素分析: 实际值: C 39.45, H 6.63, N 30.81; 计算值 $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_6\text{S}_2$: C 39.39, H 6.61, N 30.63. ^1H NMR (d_6 -DMSO, 500 MHz): δ 2.15 (3H, s, CH_3); 2.19 (3H, s, CH_3); 3.03 (3H, d, $^3J_{\text{HH}}=4.5 \text{ Hz}$, $\text{NH}-\text{CH}_3$); 3.27 (6H, s, $(\text{CH}_3)_2$); 8.36 (1H,

bq, $^3J_{\text{HH}}=4.5$ Hz, NH-CH₃); 9.49 (1H, bs, NH); 10.16 (1H, bs, NH). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125.7 MHz): $\delta=11.1$ (CH₃); 11.4 (CH₃); 31.2 (NH-CH₃); 42.3 ((CH₃)₂); 148.0 (C=N); 149.4 (C=N); 178.5 (C=S); 181.7 (C=S).

2.2.2 细胞孵育及条件

HeLa 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的高糖 DMEM 培养基悬浮后置于 37°C, 5% CO₂ 的培养箱中培养. 细胞在 ATSM 溶液处理前血清饥饿 24 h.

2.2.3 SOD1 活性的抑制

将生长状态良好的 HeLa 细胞接种于六孔板中, 每孔细胞数目约为 10^5 , 培养 24 h. 在孔内细胞贴壁达 90%左右后, 吸出原培养基, PBS 洗一次, 向每孔添加 2 mL 新鲜的无血清 DMEM 培养基, 然后向每孔中加入体积相同但浓度不同的 ATSM 溶液, 每个浓度设置 3 组平行样, 加入等体积的 DMSO (含量 $\leq 1\%$)作为对照组, 继续培养 24 h. 用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液裂解细胞, 4°C, 12000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上层清液, 用 BCA 标准蛋白试剂盒测定上层清液的蛋白浓度, 用 HT Superoxide Dismutase Assay Kit 检测各实验组中 SOD1 的活性.

在含 1 $\mu\text{mol/L}$ SOD1 的溶液中加入同体积不同浓度的 ATSM 溶液, 37°C 培养 30 min, 每个浓度设置 3 组平行样, 加入等体积的 DMSO (含量 $\leq 1\%$)作为对照组, 用 HT Superoxide Dismutase Assay Kit 检测各实验组中 SOD1 的活性.

2.2.4 ATSM 对 SOD1 表达的影响

将生长状态良好的 HeLa 细胞接种于 50 mL 培养瓶中, 每瓶细胞数目约为 10^6 , 培养 24 h. 在瓶内细胞贴壁达 90%左右后, 吸出原培养基, PBS 洗一次, 后加入 4 mL 新鲜的无血清 DMEM 培养基, 再加入体积相同但浓度不同的 ATSM 溶液, 加入等体积的 DMSO (含量 $\leq 1\%$)作为对照组, 继续培养 24 h. 用 High Pure RNA Isolation Kit 提取总 RNA, 紫外测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 以确定其纯度和浓度; 用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 将上述总 RNA 逆转录成 cDNA; 用 FastStart Essential DNA Green Master 试剂盒检测结果. RNA 的提取和 cDNA 合成等实验操作根据试剂盒说明书进行. 每组设置 4 个平行样, 其

中目标引物序列 SOD1: 5'-AAGGC CGTGT GCGTG CTGAA-3'和 5'-GGCCC ACCGT GTTTT CTGGA-3'; 内参引物序列 β -actin: 5'-CCACA CCTTC TACAA TGAGC-3'和 TGAGG TAGTC AGTCA GGTCC-3'.

2.2.5 流式细胞术测定胞内活性氧水平

将生长状态良好的 HeLa 细胞接种于六孔板中, 每孔细胞数目约为 10^5 , 培养 24 h. 在孔内细胞贴壁达 90%左右后, 吸出原培养基, PBS 洗一次, 向每孔添加 2 mL 新鲜的无血清 DMEM 培养基, 再向每孔中加入体积相同但浓度不同的 ATSM 溶液, 每个浓度设置 3 组平行样, 加入等体积的 DMSO (含量 $\leq 1\%$)作为对照组, 继续培养 24 h. 在流式细胞仪上用荧光探针 DCFH-DA 检测胞内 H₂O₂ 水平, 用荧光探针 DHE 检测胞内 O₂⁻水平.

2.2.6 Western Blot 检测 ERK1/2 磷酸化

将生长状态良好的 HeLa 细胞接种于六孔板中, 每孔细胞数目约为 10^5 , 培养 24 h. 在孔内细胞贴壁达 90%左右后, 吸出原培养基, PBS 洗一次, 向每孔添加 2 mL 新鲜的无血清 DMEM 培养基, 饥饿培养 24 h. 再吸出原培养基, PBS 洗一次, 向每孔添加 2 mL 新鲜的无血清 DMEM 培养基. 最后向每孔中加入体积相同但浓度不同的 ATSM 溶液, 加入等体积的 DMSO (含量 $\leq 1\%$)作为对照组, 继续培养 24 h. 用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液裂解细胞, 4°C, 12000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上清液, 用 BCA 标准蛋白试剂盒测定上清液的蛋白浓度, 并用裂解液调整到各组浓度相同. 制备十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, 分离胶 10%, 积层胶 5%), 将等体积的蛋白样和 2 $\times$ 上样缓冲液混合煮沸 10 min 后上样, 垂直电泳分离蛋白质, 然后将蛋白电转至经甲醇活化处理过的 PVDF 膜上. 室温下用含 5% BSA 的 TBS-T 溶液(10 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)封闭 2 h, 弃去封闭液后分别加入兔抗 ERK1/2 (P-Thr202/Tyr204)、兔抗 ERK1/2、 β -actin 抗体, 4°C 缓摇过夜. 次日用 TBS-T 溶液于室温下洗膜 3 次, 每次 10 min, 再加入辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔 IgG 抗体, 室温下缓摇 2 h 后用 TBS-T 溶液洗膜 3 次(方法同前). 最后按照增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒显色.

3 结果与讨论

3.1 ATSM 对 SOD1 活性的抑制

ATSM 是一种亲脂性配体, 在溶液中溶解性较差, 在培养基中可以溶解的最大浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$, 再结合双缩氨基硫脲配合物的细胞毒性^[24], 我们选择胞内最大作用浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$. 从实验结果可以看出, ATSM 进入细胞对 SOD1 活性有抑制作用, 随着 ATSM 作用浓度的增大, SOD1 的活力不断降低, 半抑制浓度(IC_{50})为 $7.30\ \mu\text{mol/L}$ (图 3(a)).

在溶液中, 将不同浓度的 ATSM 与 SOD1 保温 30 min 之后再测定 SOD1 的活力, 得到了类似结果. SOD1 的活力随着 ATSM 与 SOD1 摩尔比的增大而减小, IC_{50} 为 $2.71\ \mu\text{mol/L}$ (图 3(b)).

细胞中的 IC_{50} 比溶液中的偏大. 这是因为在细胞中 ATSM 并不是全部作用于 SOD1, 在从细胞膜到胞浆中 SOD1 的传输过程中损耗了一部分, 而在溶液

图3 ATSM 对 SOD1 活性的抑制. (a) 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ ATSM 与 HeLa 细胞共培养 24 h 后使 SOD1 活性降低; (b) 浓度为 3、5 $\mu\text{mol/L}$ ATSM 与 1 $\mu\text{mol/L}$ SOD1 溶液共孵育 30 min 后使 SOD1 活性降低($n=3$, 对照组为 DMSO, 均与对照组比较, $**P<0.01$)

中则是直接相互作用, 所以溶液中的 IC_{50} 比细胞内的小.

3.2 ATSM 对 SOD1 表达的影响

用不同浓度的 ATSM 处理细胞 24 h 后, RT-PCR 检测到处理组的 SOD1 mRNA 表达水平与对照组相比没有明显差异(图 4(a)); Western Blot 观察到处理组的 SOD1 蛋白质表达水平和对照组相比也没有明显差异(图 4(b)). 两组实验结果共同说明, ATSM 对胞内 SOD1 的表达没有影响. 结合前文 ATSM 能够使 SOD1 的活力降低这一事实, 说明 ATSM 降低 SOD1 的活性是因为它螯合了 SOD1 活性部位的 Cu^{2+} , 使得 SOD1 失活.

ATSM 与铜离子形成的配合物的稳定常数 K_a 约为 10^{18} ^[18], 理论上只要蛋白质与 Cu^{2+} 的结合常数小于 10^{18} , ATSM 就能螯合掉其结合中的 Cu^{2+} . 因此, 进入细胞内的 ATSM 不仅螯合 SOD1 中的 Cu^{2+} , 还可能去除其他蛋白质中的 Cu^{2+} .

3.3 细胞内活性氧水平的变化

用 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 ATSM 处理细胞 24 h 后, 用流式细胞仪分析胞内活性氧水平的变化, 发现 H_2O_2 的水平

图4 ATSM 对胞内 SOD1 表达的影响. (a) 采用 RT-PCR 的方法测定 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ ATSM 对 HeLa 细胞中 SOD1 表达的影响; (b) 采用 Western Blot 的方法测定 0.1、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ ATSM 对 HeLa 细胞中 SOD1 表达的影响

相对于对照组明显降低,说明 ATSM 通过抑制 SOD1 的活性降低 H_2O_2 的水平(图 5(a));但是胞内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 水平的变化不明显(图 5(b)). 导致这种现象的发生有以下两种可能性: (1) $\text{O}_2^{\cdot-}$ 极不稳定,在溶液中的存在时间仅为 1 s,从染色到消化再到最后的检测时间超过 2 h,使得捕捉到的荧光信号偏低; (2) 机体内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生机制很复杂,主要在线粒体电子传递链、还原型分子自氧化反应、酶促反应、内质网等多种部位产生,当 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的浓度达到一定程度时,对其产生机制带来反馈作用,从而维持 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的浓度平衡.

3.4 ATSM 对细胞内 ERK 磷酸化水平的影响

研究发现, MAPK 信号通路在肿瘤发生、发展中发挥了重要作用^[25]. MAPK 采用了进化保守的三级激

图 5 10 $\mu\text{mol/L}$ ATSM 与 HeLa 细胞共培养 24 h 后胞内 H_2O_2 (a) 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (b) 的水平($n=3$, 对照组为 DMSO, ** $P<0.01$)

致谢 本工作得到国家自然科学基金(21271079, 21302059)资助, 特此致谢.

参考文献

- Yue WS, Isabel AA, Diane EC, Michael JM, Anne FM. Superoxide dismutase and superoxide reductase. *Chem Rev*, 2014, 114: 3854–3918
- 袁勤生, 王凤山, 李素霞, 张元民. 超氧化物歧化酶. 上海: 华东理工大学出版社, 2009

酶级联形式转导信号: 细胞受刺激后激活 MAPK 激酶的激酶, 进而激活 MAPK 激酶(MKK), MKK 激活后通过双位点磷酸化 MAPK. 磷酸化的 MAPK 转入细胞核, 相继激活早期原癌基因导致细胞恶性转化, 调节细胞的生长、分化、分裂、死亡以及细胞间功能同步化等多种过程^[26]. MAPK 主要有 4 条通路, 胞外信号调节激酶 ERK 是这些通路的关键节点, 因此, 我们测定了 ERK 磷酸化水平的变化, 以探讨 ATSM 对与 SOD1 相关的信号通路的影响.

结果表明, 随着 ATSM 作用浓度的增大, 胞内磷酸化的 ERK1/2 水平降低. 这说明 ATSM 螯合了 SOD1 中的 Cu^{2+} 使其活性降低后, 胞内 H_2O_2 的水平降低到不能够氧化 PTP 所需的水平, PTP 保持活性, 使 ERK1/2 磷酸化水平降低(图 6), 这与流式检测 ATSM 对胞内 H_2O_2 水平的影响结果相符.

4 结论

双缩氨基硫脲类螯合剂 ATSM 进入细胞, 螯合胞内关键抗氧化物酶 SOD1 活性部位的 Cu^{2+} , 抑制 SOD1 的活性, 导致细胞内 H_2O_2 水平降低, 使 MAPK 信号通路中关键激酶 ERK 的磷酸化程度降低. ATSM 通过抑制 SOD1 的活性影响 MAPK 信号通路, 这为以 SOD1 为靶标的药物设计提供了新的思路.

图 6 采用 Western Blot 的方法测定不同浓度 ATSM 与 HeLa 细胞共培养 24 h 后胞内 ERK 和磷酸化 ERK 水平(pERK1/2)的变化(对照组为 DMSO)

- 3 Tohru F, Masuko UF. Superoxide dismutase: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 1583–1606
- 4 Amit RR, Valeria CC. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell*, 2013, 152: 224–235
- 5 Fredrick DO, Duane A, Qiang L, John FE. Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11: 1313–1333
- 6 Ashley EF, Laura F, Amanda M, Haidet P, Leah S, Lyndsey B, Carlos JM, Katherine JL, Adam KB, Kevin DF, Jonathan PG, Phillip GP, Denis CG, Brian KK. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 2014, 81: 1009–1023
- 7 Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, 2005, 120: 649–661
- 8 Joe MM, Irwin F. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythropoietin. *J Biol Chem*, 1969, 244: 6049–6051
- 9 Joan SV, Peter AD, Soshanna ZP. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Rev Biochem*, 2005, 74: 563–593
- 10 Thomas WM, Jeff I, David DR. Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling. *Chem Rev*, 2009, 109: 3099–3124
- 11 Peng H, Li F, Elizabeth AO, Michael JK, William P. SOD1 as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 2000, 407: 390–395
- 12 Romel S, Hedive EB, Erik L, David S, Willia WL, Guang LY, Chris S, Ouathek O, Paul JT, Hakim D, Harold EV. SOD1 is a target for a small molecule identified in a screen for inhibitors of the growth of lung adenocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108: 16375–16380
- 13 Hamsell MA, Yi X, Chandler DR, Mónica AC, Rebecca GM, Rebekah AK, Alfonso M, James EP, Thomas VO. Tetrathiomolybdate inhibits copper trafficking proteins through metal cluster formation. *Science*, 2010, 327: 331–334
- 14 Graham NG, Ingrid JP, Hugh HH, Jurgen G, Dominik K, Josef L, Karl-Heinz S. Tetrathiomolybdate causes formation of hepatic copper-molybdenum clusters in an animal model of Wilson’s disease. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 1704–1705
- 15 Juarez JC, Mari M, Mark EB, Oscar B, Benoit B, David ES, Nicholas KT, Andrew PM, Fernando D. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H₂O₂-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 7147–7152
- 16 Abraham W, Ilana R, Yogita P, Adam B, Lev W, Jonathan G. Copper-specific chelators as synergists to herbicides: 1. Amphiphilic dithiocarbamates, synthesis, transport through lipid bilayers, and inhibition of Cu/Zn superoxide dismutase activity. *Langmuir*, 2001, 17: 5621–5635
- 17 Beraldo H, Gambino D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini-Rev Med Chem*, 2004, 4: 31–32
- 18 Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, Ohtani H, Konishi O, Yokoyama A. Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J Nucl Med*, 1997, 38: 1155–1160
- 19 Rebekka H, Martin C, Jonathan RD, Garayoa EG, Gouverneur V, Jones MW, Maes V, Schibli R, Sun X, Tourwe DA. Bis(thiosemicarbazones) as bifunctional chelators for the room temperature 64-copper labeling of peptides. *Dalton Trans*, 2010, 39: 3620–3632
- 20 Brett MP, Donnelly PS. Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 3005–3018
- 21 David JH, Sin CL, Donnelly PS. Metal complexes designed to bind to amyloid- β for the diagnosis and treatment of Alzheimer’s disease. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 6701–6715
- 22 Lucia B, Ivano B, Simone CB, Kozyreva T, Zovo K, Palumaa P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*, 2010, 465: 645–648
- 23 Brett MP, John AK, Denis BS, Jonathan MW, Donnelly PS. Versatile new bis(thiosemicarbazone)bifunctional chelators: synthesis, conjugation to bombesin(7-14)-NH₂, and copper-64 radiolabeling. *Inorg Chem*, 2010, 49: 1884–1893
- 24 Bica L, Meyerowitz J, Parker SJ, Caragounis A, Du T, Paterson BM, Barnham KJ, Crouch PJ, White AR, Donnelly PS. Cell cycle arrest in cultured neuroblastoma cells exposed to a bis(thiosemicarbazonato) metal complex. *Biometals*, 2011, 24: 117–133
- 25 Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 2007, 26: 3100–3112
- 26 Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 1999, 79: 143–180

ATSM inhibition of intracellular SOD1 activity and its effect on ERK signaling pathway

Zhe Zhang, Huanhuan Chen, Chanli Yang, Dan Zhang, Chunrong Liu, Changlin Liu*

Key Laboratory of Pesticide & Chemistry Biology, Ministry of Education; School of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

*Corresponding author (email: liuchl@mail.ccnu.edu.cn)

Abstract: Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), one of the most important and widely distributed antioxidant enzymes, maintains the homeostasis of intracellular superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and peroxide hydrogen (H_2O_2) by catalyzing the dismutation of superoxide to peroxide hydrogen. When at high levels, H_2O_2 can inactivate signaling proteins by reversibly oxidizing their cysteine residues at active sites, resulting in an aberrant redox signaling network. Diacetyl-bis-*N*-(4-methylthiosemicarbazone) (ATSM), acting as a chelating agent for copper with high affinity, is available for inactivating SOD1 by chelating the copper from the active site. It can effectively inhibit the activity of SOD1 without affecting its expression, thereby changing the intracellular concentrations of $O_2^{\cdot-}$ and peroxide hydrogen, which finally leading to the decreasing of ERK phosphorylation in the relative signaling pathways.

Keywords: ATSM, SOD1, signal pathway, phosphorylation, ROS