

• 专论与综述 •

昆虫蜕皮激素类似物的定量构效关系及其受体三维结构研究进展

阴 斌, 张 莉*, 崔紫宁, 凌 云, 杨新玲*

(中国农业大学 理学院 应用化学系 / 农业部农药化学与应用重点开放实验室, 北京 100193)

摘 要: 蜕皮激素及其类似物具有调节昆虫蜕皮、变态和繁殖的功能。蜕皮激素类似物在农业生产, 尤其是鳞翅目害虫的防治中发挥着重要作用。总结近期的文献, 同时结合课题组的工作, 综述了蜕皮激素类似物的定量构效关系、蜕皮激素受体三维结构的研究进展。

关键词: 蜕皮激素; 双酰肼; 定量构效关系; 蜕皮激素受体

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.04.02

中图分类号: TQ450.11; TQ453.8

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2010)04-0383-08

Progress on quantitative structure-activity relationship of ecdysone analogues and the three-dimensional structure of ecdysone receptor

YIN Bin, ZHANG Li*, CUI Zi-ning, LING Yun, YANG Xin-ling*

(Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application, Ministry of Agriculture, Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Ecdysteroids and ecdysone analogues have the function of regulating insects' molting, metamorphosis and reproduction. Ecdysone analogues play important roles in agricultural production, especially in the management of Lepidoptera pests. Based on the recent researches, the progress in quantitative structure-activity relationship of ecdysone analogues and the three-dimensional structure of ecdysone receptor is reviewed.

Key words: ecdysone; diacylhydrazine; quantitative structure-activity relationship (QSAR); ecdysone receptor (EcR)

蜕皮激素是由昆虫前胸腺分泌的能调节昆虫蜕皮的一种内源激素, 在昆虫的蜕皮、变态过程中起着显著的调节作用。1954年, Butenandt等^[1]从家蚕蛹中最先分离得到昆虫蜕皮激素。1965年, Hoppe等^[2]鉴定其分子结构为 α -蜕皮素(1), 并从蚕蛹及烟草天蛾 *Manduca sexta* 中分离鉴定出 β -蜕皮素

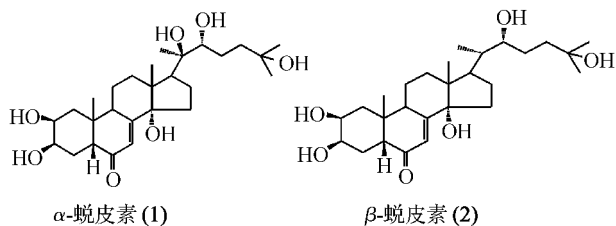
(即20-羟基蜕皮素 20E) (2)。迄今为止, 已有几十种天然蜕皮激素的结构得到鉴定^[3]。

高剂量的蜕皮激素能扰乱昆虫体内的正常新陈代谢, 使昆虫提早蜕皮或变态成为微小的成虫或畸形幼体^[4]。1967年, Milton^[5]首先提出了将蜕皮激素用作杀虫剂的设想。但天然蜕皮激素结构复杂,

收稿日期: 2010-06-21; 修回日期: 2010-09-25。

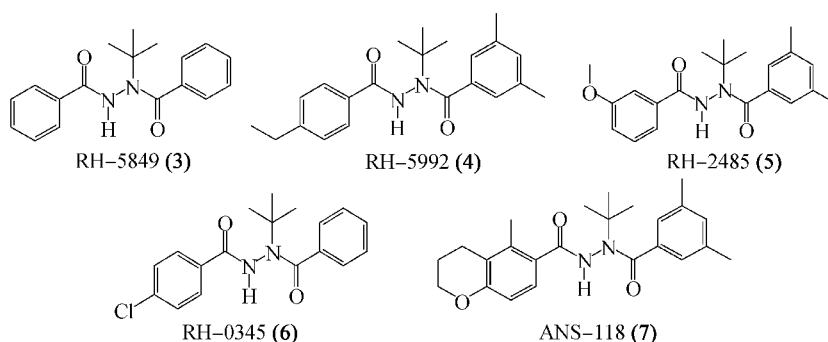
作者简介: 阴斌(1987-), 男, 山东济南人, 硕士, 主要从事新型蜕皮激素类似物的设计与合成工作; * 通讯作者 (Author for correspondence): 张莉(1976-), 女, 湖北枣阳人, 博士, 讲师, 主要从事农药分子设计与合成研究, 电话: 010-62731730, E-mail: zhang_li@cau.edu.cn; 杨新玲(1967-), 女, 河南叶县人, 博士, 教授, 主要从事农药分子设计与合成研究, 电话: 010-62732223, E-mail: yangxl@cau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(20802089); 农药与化学生物学教育部重点实验室开放基金(200803A02); 元素有机化学国家重点实验室开放基金(0805); 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2010CB126104)资助。



极性基团多,难以通过表皮进入昆虫体内,在实际应用上存在很大困难。因此,人们一直致力于发现和合成结构不同却同样具有蜕皮激素活性的蜕皮激素类似物。1988年,美国 Rohm-Hass 公司^[6-7]开发出第一个与天然蜕皮激素结构不同、却同样具有蜕皮

激素活性的双酰肼类化合物 RH-5849 (抑食肼) (3)。该公司通过对双酰肼结构的进一步修饰改造,又先后成功发现了一系列双酰肼类蜕皮激素类似物如 RH-5992 (虫酰肼) (4)、RH-2485 (甲氧虫酰肼) (5)、RH-0345 (氯虫酰肼) (6)。20 世纪 90 年代,日本化药公司 (Nippon Kayaku Co. Ltd) 和三共公司 (Sankyo Co. Ltd) 合作开发出环虫酰肼 (ANS-118) (7)^[8]。此外,我国的农药工作者也先后发现了很多高活性的双酰肼类化合物,如 JS-118^[9]、CAU-Y02^[10] 以及南开大学汪清民课题组^[11-13]开发的一系列具有硫酰基取代的化合物。



双酰肼类蜕皮激素类似物属于昆虫生长调节剂,其作为农药具有突出的优点:作用机制独特,可干扰昆虫内分泌系统,使昆虫因不能完全蜕皮或提前蜕皮而死亡;对害虫天敌或非靶标生物无毒或低毒,有突出的选择性;对某些抗性害虫有效。因此,在新一代农药开发中,昆虫蜕皮激素及其类似物已成为农药研究的热点之一,迄今已成功开发出多个商品化品种。但这些品种仅限于双酰肼的骨架,结构相对单一,因此开发新结构的蜕皮激素类似物成为发展趋势。了解计算机辅助分子模拟技术在蜕皮激素类似物结构改造中的研究进展,对指导开发结构新颖的蜕皮激素类似物是非常必要的。笔者在文献调研的基础上,结合本课题组的工作,针对蜕皮激素类似物的定量构效关系 (quantitative structure-activity relationship, 以下简称 QSAR) 和蜕皮激素受体三维结构的最新研究进展进行了简要综述。

1 蜕皮激素类似物定量构效关系的研究进展

QSAR 是一种借助分子的理化性质参数或结构参数,以数学和统计学手段定量研究有机小分子的结构与生物活性之间相互关系的研究方法,广泛用于医药、农药、化学毒剂等生物活性分子的合理设计。该方法也为蜕皮激素类似物的结构改造提供了

思路 and 依据。毛春晖等^[14]从分子骨架和取代基种类的角度对蜕皮激素类似物的定性结构-活性关系进行了综述。近年来,蜕皮激素类似物的定量构效关系研究有了很大发展,本文主要介绍它们在 2D-QSAR 和 3D-QSAR 方面的研究进展。

1.1 蜕皮激素类似物的二维构效关系 (2D-QSAR) 研究

在双酰肼结构中,通常将靠近 *N*-叔丁基的苯环 (或杂环) 记为 A 环,另一个苯环 (或杂环) 记为 B 环,见图 1。

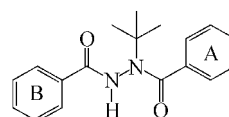


图 1 双酰肼类化合物中 A 环和 B 环

Fig. 1 A-ring and B-ring of diacylhydrazines

Oikawa 等^[15]探讨了 A 环上具有不同取代基的双酰肼类化合物对水稻二化螟 *Chilo suppressalis* 杀虫活性的影响,并采用化合物的疏水系数 ($\log P$)、邻位取代基的吸电子能力 (σ^{ortho})、取代基的范德华体积 (ΔV) 值构建了这类化合物结构与生物活性间的相关方程,见式 1。

$$\begin{aligned} \text{pLD}_{50} = & 0.98(\pm 0.31) \log P + 1.28(\pm 0.74) \sigma^{\text{ortho}} - \\ & 0.48(\pm 0.27) \Delta V^{\text{meta}} - 0.89(\pm 0.29) \Delta V^{\text{para}} + \\ & 3.61(\pm 0.28) \\ n = & 27 \quad s = 0.300 \quad r = 0.899 \end{aligned}$$

式 1 Oikawa 等建立的 A 环构效关系方程

Eq. 1 Equation of A-ring's SAR constructed by Oikawa etc.

结果表明: 分子的疏水系数 ($\log P$)、邻位取代基的吸电子能力 (σ^{ortho}) 和对位取代基的范德华体积 (ΔV^{para}) 是影响活性的关键因素。

在此基础上, 他们固定 A 环对位为氯原子取代, 改变 B 环上的取代基, 并利用 Hanch 方法构建了这一类化合物的构效关系方程^[16], 见式 2。

$$\begin{aligned} \text{pLD}_{50} = & 0.72(\pm 0.21) \log P - \\ & 0.88(\pm 0.22) \Delta L^{\text{ortho}} - 0.98(\pm 0.24) \Delta V^{\text{meta}} - \\ & 0.59(\pm 0.19) \Delta L^{\text{para}} + 4.92(\pm 0.26) \\ n = & 30 \quad s = 0.254 \quad r = 0.912 \end{aligned}$$

式 2 Oikawa 等构建的 B 环构效关系方程

Eq. 2 Equation of B-ring's SAR constructed by Oikawa etc.

结果表明, B 环取代基的影响因素较复杂, 分子的疏水系数 ($\log P$), 间位取代基的空间范德华体积 (ΔV^{meta}) 和邻位取代基的 STERIMOL 参数 (ΔL^{ortho}) 对活性有重要影响。

综合上述工作, Oikawa 等^[17]通过固定 B 环上最有利的取代基 (4-Et 4-*i*-Pr) 进一步优化了 A 环, 通过在间位引入卤素和甲基这样既有疏水性, 体积又是中等大小的取代基, 发现了一系列的高活性化合物, 其中部分化合物的杀虫活性是 RH5849 的 20 倍。Rohm-Hass 公司开发成功并商品化了其中的一个化合物, 即 RH-5992。这是采用定量构效关系方法指导化合物结构优化的典型例子。

Nakagawa 等^[18]综合考虑了 A、B 环的取代基对双酰胺类化合物离体活性的影响。通过测定不同取代基的双酰胺类化合物对细胞的活性, 使用 Hanch 方法构建了如下的构效关系方程, 见式 3, 其中, X 代表 A 环取代基影响, Y 代表 B 环取代基影响。

$$\begin{aligned} \text{pEC}_{50} = & 1.02(\pm 0.30) \log P + 1.40(\pm 0.99) \sigma^{\text{ortho}}(X) - \\ & 0.52(\pm 0.35) \Delta V^{\text{meta}}(X) - \\ & 1.08(\pm 0.36) \Delta V^{\text{para}}(X) - 0.90(\pm 0.33) V^{\text{ortho}}(Y) - \\ & 1.77(\pm 0.35) \Delta V^{\text{meta}}(Y) - \\ & 0.77(\pm 0.33) \Delta V^{\text{para}}(Y) + 4.06(\pm 0.85) \end{aligned}$$

$$n = 37 \quad s = 0.339 \quad r = 0.900$$

式 3 Nakagawa 构建的 A、B 环的构效关系方程

Eq. 3 Equation of A and B-ring's SAR constructed by Nakagawa

方程表明: 综合考虑 A、B 环取代基对活性的影响与单独分析 A 环或 B 环所得的结果类似, 即分子的疏水系数 ($\log P$)、A 环邻位取代基的吸电子能力 (σ^{ortho})、对位取代基的范德华体积 (ΔV^{para}) 以及 B 环间位取代基的空间范德华体积 (ΔV^{meta}) 是影响活性的最关键因素。

Ogura 等^[19]测定了一系列 A 环邻位为氯原子, B 环对位为不同取代基的双酰胺类化合物与昆虫 Sf-9 细胞的结合能力。结果表明, 在 B 环的对位引入疏水基团和供电子基团可以提高化合物的活性。2007 年, Fujita 等^[20]同时测定了一系列双酰胺类化合物的活体生物活性和与不同细胞表达系统的结合能力, 并对离体与活体活性数据之间的异同进行了活性-活性关系研究 (activity-activity relationship, AAR), 见式 4:

$$\begin{aligned} \text{pEC}_{50} = & 1.20(\pm 0.19) \text{pIC}_{50}(\text{intact}) - \\ & 1.34(\pm 1.31) \\ n = & 34 \quad s = 0.38 \quad r = 0.92 \end{aligned}$$

式 4 Fujita 等构建的活性-活性关系方程

Eq. 4 Equation of AAR constructed by Fujita etc.

式 4 表示双酰胺类化合物对水稻二化螟 *C. suppressalis* 致死中浓度与对 sf-9 细胞的抑制中浓度之间的关系, 可以看出, 二者之间有一定的对应关系, 但并非“一一对应”。由此 Fujita 等人推断, 对同一化合物而言, 其活体、离体活性的影响因素应该是不同的^[20]。

这些工作不仅对化合物的结构改造提供了依据, 同时也对进一步研究双酰胺类化合物与蜕皮激素受体之间的作用机理提供了参考。

此外, Qian^[21]采用分子模拟方法, 选取与化合物三维结构相关的原子间距 r (靠近 B 环的酰基与 A 环上取代基之间的距离) 参数, 确立了芳环上卤素由单取代到多取代的 *N*-叔丁基二芳酰胺的定量构效关系, 见图 2。研究发现, 具有 *N*-叔丁基二芳酰胺结构的化合物的生物活性与 r 之间存在很好的抛物线关系: 当 r 增大到一定值时, 活性达到最高点, r 继续增加时活性下降。说明 r 具有某一最适值, 此时化合物的活性最高。

虽然 2D-QSAR 为蜕皮激素类似物的结构改造

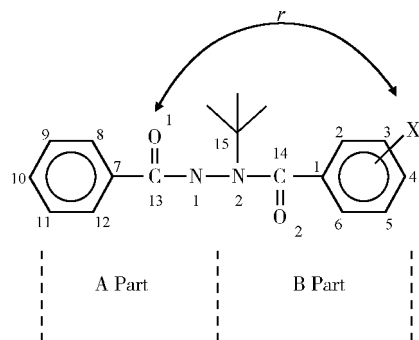


图2 Qian 在构效关系研究中使用的参数 r 示意图^[21]

Fig. 2 Diagram of the parameter r in Qian's QSAR study^[21]

提供了一定的思路,但由于药物分子与受体的相互作用具有一定的三维空间要求,因而用 2D-QSAR 方法得到的相关方程无法反映药物分子与受体在三维空间的互补性。为了更准确地表达药物与受体之间的相互作用,许多研究者从三维空间角度探讨了蜕皮激素类似物分子结构与活性之间的关系。

1.2 蜕皮激素类似物的三维定量构效关系(3D-QSAR)研究

1998 年, Nakagawa 等^[22] 合成了包括 *N*-烷基基、*N*-苯甲酰基双酰胺类似物在内的一系列化合物,用以比较双酰胺类化合物中苯环和羰基对活性的影响。使用比较分子力场法分析(Comparative Molecular Field Analysis,简称 CoMFA)发现,双酰胺类化合物中的两个羰基可能分别对应 20E 中 20 位羟基和 22 位羟基,而靠近叔丁基的苯基对保持化合物的活性也有重要作用。之后 Nakagawa 等^[23-26] 又探讨了具有不同取代基团的双酰胺类化合物的活体生物活性(水稻二化螟 *C. suppressalis*、科罗拉多马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 等)、离体生物活性(包括与昆虫组织、细胞和蛋白质特异性结合)的异同,并使用 CoMFA 和比较分子相似性指数法(CoMSIA)探讨了结构与活性之间的关系,以及活体活性与离体活性之间的关系。这一系列工作为探讨双酰胺类化合物与蜕皮激素受体(EcR)之间的作用机理和规律提供了重要的借鉴意义。

2001 年, Malini 等^[27] 利用黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 B II 细胞作为基因表达系统,对 71 个天然甾醇类蜕皮激素及双酰胺类化合物进行了活性测定,在此基础上结合 CoMFA 和 CoMSIA 计算结果构建了三维药效团模型。认为: C-2、C-22 位的羟基是氢键受体,有利于配体和受体间的结合;

C-12 上取代基的疏水系数同样会影响配体与受体间的结合能力,疏水值越大,结合能力越强;而在 C-17 上增加取代基则有利于配体与受体的结合。

2002 年,邹霞娟等^[28] 进行了含吡嗪酮基双酰胺类化合物的 3D-QSAR 研究,使用 CoMFA 方法构建了 3D-QSAR 模型,发现立体效应是影响这一类化合物对黄瓜子叶生根活性的关键因素。

2005 年, Noel 等^[29] 引入半经验的量子力学方法,进行了大量双酰胺类化合物 3D-QSAR 和 4D-QSAR 的研究。引入量子力学方法能更精确地描述分子中电子密度的分布情况。Noel 等构建的模型不仅提供了更精确的构效关系,而且通过 3D 和 4D-QSAR 模型的比较,可以证实某些基团对化合物活性的影响很小。

Wheelock 等^[30] 选取 172 个双酰胺类化合物,用高通量筛选技术测定了其在家蚕 *Bombyx mori* 细胞的有效抑制中浓度(EC_{50}),基于这些数据构建了双酰胺类化合物结构与活性间的 3D-QSAR 模型。发现与其他的体系不同的是,在这一体系中电子效应和空间效应是影响化合物活性最重要的因素,而疏水效应的影响较小。这一研究结果说明,化合物的疏水系数($\log P$)对化合物能否穿透昆虫的表皮进入昆虫体内有重要的作用,而对配体与受体的直接结合能力影响较小。

Hormann 等^[31] 测定了 77 个双酰胺类化合物对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、二化螟 *C. suppressalis* 以及科罗拉多马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 的致死中浓度(LD_{50}),并建立了 CoMFA 模型。推测同一化合物对不同种属昆虫的活性差异主要归因于昆虫体内蜕皮激素受体晶体结合域的序列不同。

2009 年, Arai 等^[32] 通过对 52 个双酰胺类似物在 sf-9 细胞中与 ponasterone A 的竞争性表达,结合 2D-QSAR 和 CoMFA 研究,发现 B 环上的 3 位和 4 位是立体化学取代有利的区域,而 2 位是不利于取代的位置;在羰基附近和 B 环上的 4 位增加原子的电子密度可以提高化合物的活性。

本课题组^[33] 也一直致力于双酰胺类化合物的结构优化研究,合成了一系列的含咪喃环的双酰胺类化合物。3D-QSAR 研究结果表明,化合物的立体场对其活性的影响远大于其他分子场,在进一步的结构优化中可着重考虑对该类化合物取代基空间体积的改造。2010 年,本课题组^[34] 报道了使用密度泛函理论(DFT)方法对 27 个含 5-取代芳基-2-咪喃基且不含叔丁基的双酰胺类化合物进行的 2D-

QSAR 和 3D-QSAR 研究。DFT 方法是目前多种领域中电子结构计算的领先方法,与传统的半经验方法相比,DFT 方法能更准确地描述化合物的电子密度和表征空间效应。研究结果显示:化合物的电子效应和疏水系数是影响活性的关键因素;由于呋喃环中的氧原子具有强烈的给电子性质,因而对化合物活性具有突出影响。

上述 QSAR 研究为蜕皮激素类似物的结构改造提供了重要的理论指导。随着蛋白质三维结构解析技术的进步,结合计算机辅助分子模拟技术,蜕皮激素受体三维结构的研究有了飞速发展,为进一步研究蜕皮激素类似物与受体的作用机理提供了基础。

2 蜕皮激素受体三维结构的研究进展

蜕皮激素作用靶标由蜕皮激素受体(EcR)和超气门蛋白(USP)组成。至今已对双翅目、鳞翅目、同翅目、鞘翅目和直翅目等 20 余种昆虫的 EcR 和(或) USP 基因进行了克隆测序^[35]。EcR 具有共同的结构特征,自 N 端起均由 A/B 域(转录激活域 trans-activation domain)、C 域(DNA 结合域 DNA-binding domain, DBD)、D 域(铰链域 hinge region)、E 域(配体结合域 ligand binding domain, LBD)和 F 域 5 部分组成,各部分都有特殊的结构和功能^[36]。近年来,针对昆虫蜕皮激素及其类似物与受体的作用机制,EcR/USP 三维结构的研究进展十分迅速。刘永杰等^[37]综述了 2007 年前报道的昆虫蜕皮激素受体的晶体结构,并对已报道的蜕皮激素类似物的杀虫机制进行了总结。研究 EcR/USP 的结构对新型蜕皮激素类似物的创制、解释双酰胺类化合物为何对鳞翅目昆虫具有高活性和高选择性等问题有着重要的意义。笔者将从 EcR/USP 三维结构的同源模建和晶体结构的解析两个方面对这一领域的最新进展进行综述。

2.1 蜕皮激素受体结构的同源模建

同源模建(homology modeling)技术是一类根据模板蛋白结构将一级序列转成 3D 结构的技术总称。针对 EcR/USP 的同源模建工作可以分为两个时期:一是在 EcR/USP 的晶体结构被解析前,同源模建的主要目的是预测鳞翅目、鞘翅目等常见害虫中 EcR/USP 的三维结构;二是在晶体结构解析后,其主要作用是解释 EcR/USP 与配体之间相互作用的问题及预测一些地域性较强的昆虫 EcR/USP 的结构。

2000 年,Wurtz 等^[38]以维甲酸和维生素 D 受体的晶体结构为模板,采用同源模建方法构建了摇蚊 *Chironomus tentans* 的 EcR 蛋白的配体结合域(LBD)模型,这是首次报道的 EcR 三维结构。通过不同双酰胺类化合物与此模型的分子对接分析发现,双酰胺类化合物在 LBD 内的结合方式是一致的。

RH-5849 和 RH-2485 对鳞翅目昆虫的活性有很大不同,Ana Cristina 等^[39]为了解释二者活性之间的差异,采用同源模建技术构建了鳞翅目和双翅目的 EcR 配体结合域的结构。将 RH-5849、RH-2485、20E 与模建结构进行分子对接,发现鳞翅目配体结合域中甲硫氨酸 368 残基与 RH-2485 分子中 B 环上的甲基之间存在空间位阻,而在双翅目配体结合域中相同位置的氨基酸残基为缬氨酸,位阻较小。表明由于空间位阻差异导致了 RH-2485 对鳞翅目昆虫活性较差,而对双翅目昆虫活性较好。

为了探讨天然蜕皮激素与 EcR 之间的作用方式,Kumar 等^[40]构建了云杉卷叶蛾 *Choristoneura burnijerana* 的 EcR(CfEcR)配体结合域的三维模型,通过该模型与 20E 的分子对接,发现了配体结合域中与 20E 有重要作用的 17 个氨基酸残基。Kasuya 等^[41]采用同源模建的方法构建了烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 EcR 配体结合域的三维结构模型,将 20E 与之进行分子对接。结果显示,配体结合域中存在 6 个与配体结合密切相关的氨基酸残基(苏氨酸 358、苏氨酸 361、苏氨酸 364、精氨酸 405、天冬酰胺 522、甲硫氨酸 525)。

随着 2003 年烟芽夜蛾 *H. virescens* EcR 的晶体结构被 Billas 等^[42]成功解析,基于 EcR/USP 晶体结构进行同源模建得到的模型的预测能力大大提高,成为了解释 EcR/USP 与配体之间作用机理及探讨其他种类昆虫 EcR/USP 三维结构的重要工具。2009 年,Harada 等^[43]通过同源模建和分子对接等方法,发现天然甾醇类蜕皮激素与 EcR 的结合能力取决于二者之间形成的氢键数目。这一结果为进一步筛选蜕皮激素类似物奠定了理论基础。之后,Yves 等^[44]克隆了褐虾 *Crangon caangon L* 的 EcR/USP 基因,采用同源模建方法构建了其三维结构;针对褐虾的高选择性蜕皮激素类似物的筛选工作尚在进行中。

2.2 蜕皮激素受体复合物的晶体结构

2003 年,Billas 等^[42]报道了黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和烟芽夜蛾 *H. virescens* EcR 的 E 域晶

体结构。这是首次报道的 EcR/USP 与小分子配体形成的复合物的晶体结构,对昆虫蜕皮激素领域的研究具有深远意义。在 EcR/USP 晶体结构中,E 域由 12 个 α -螺旋反向排列成类似“三明治”的 3 层结构,中间形成一个疏水的袋状空间,称为配体结合域。比较烟芽夜蛾 EcR/USP 杂二聚体分别与 PonA 和双酰肼类化合物 BYIO6830 形成复合物的晶体结构发现:EcR 配体结合域与 PonA 和 BYIO6830 结合后的形状及配体的结合位点均存在显著不同。其中 PonA 中的 2-OH、3-OH、6-羰基、14-OH 和 20-OH 分别与配体结合域中的谷氨酸 309、苏氨酸 343、苏氨酸 346、精氨酸 383、丙氨酸 398 和酪氨酸 408 形成 6 个氢键(14-OH 与两个苏氨酸 346 形成 2 个氢键)。而 BYIO6830 则是 2 个羰基($C=O$)及氮原子上的氢原子($N-H$)与苏氨酸 343、酪氨酸 408 和天门冬氨酸 504 形成 3 个氢键。对比结果表明,EcR 的配体结合域具有较强的柔性,可以根据配体的不同改变配体结合域的空腔大小。

2005 年,Carmichael 等^[45]报道了同翅目昆虫烟粉虱 *Bemisia tabaci* EcR/USP 与 PonA 复合物的配体结合域晶体结构。分析结果表明,PonA 与配体结合域内形成氢键的氨基酸顺序和种类与烟芽夜蛾中的完全相同。进一步分析已经测序的鳞翅目、鞘翅目、同翅目和双翅目昆虫的 EcR 氨基酸序列发现,PonA 与配体结合袋内形成氢键的氨基酸顺序和种类也完全相同,与形成范德华力的氨基酸顺序和种类也有很高的一致性。除 PonA 外,其他甾醇类昆虫蜕皮激素,如蜕皮酮、20E 等与 EcR 形成氢键的基团基本一致。

2007 年,Iwema 等^[46]报道了赤拟谷 *T. castaneum* EcR/USP 与 PonA 形成的复合物的晶体结构。赤拟谷 EcR 的晶体结合域的结构与黑腹果蝇和烟芽夜蛾等几乎一致,这与 EcR 晶体结合域基因的高度保守性相一致。他们在进行结构鉴定的过程中,发现 EcR 晶体结合域的构象取决于小分子配体的形状,而 USP 的构象在这一过程中也发生了变化,对 EcR/USP 与不同类型小分子结合起到了重要的作用。

同年,Browning 等^[47]报道了鳞翅目昆虫烟芽夜蛾 *H. virescens* EcR/USP 杂二聚体的配体结合域与 20-羟基蜕皮酮(20E)的复合物晶体结构,分辨率提高到 2.4 Å (0.24 nm)。发现除了与 PonA 形成相似的氢键外,在配体结合域中还存在 2 个水分子参与氢键作用:20-OH、22-OH、25-OH 与 H₂O-9517、

酪氨酸 408、缬氨酸 416、亮氨酸 500、天冬酰胺 504、谷氨酰胺 503 构成氢键网络。另外 20E 分子中的环状结构形成的疏水中心与苯丙氨酸 397 的苯环之间存在疏水作用。

2009 年,拜耳公司^[48]成功开发了一系列结构与传统双酰肼类化合物完全不同的新型蜕皮激素类似物。同时,拜耳公司与 Dino Moras 课题组合作,成功解析了该类化合物与 EcR/USP 形成的复合物的晶体结构,发现该类化合物与 EcR/USP 结合的方式与天然甾醇类、双酰肼类也存在不同,再一次说明了 EcR/USP 的晶体结合域具有较强的柔性,其结构和形状可根据不同小分子配体进行变化。

目前,本课题组以 2007 年 Browning 等^[47]报道的 EcR/USP 与不同配体形成的复合物的晶体结构为基础,通过分析 EcR 配体结合域的结构及其与不同小分子之间的结合方式,初步推断其中存在 3 个关键氨基酸残基和特定的疏水作用位点,构建了蜕皮激素配体-受体作用模型。这些研究为后续开展新型蜕皮激素类似物的结构设计和筛选工作提供了理论指导,为进一步创制新型蜕皮激素类似物奠定了基础。

对蜕皮激素受体复合物晶体结构的解析,为基于受体结构合理设计新型蜕皮激素类似物提供了依据,同时也为不同来源的蜕皮激素受体对蜕皮激素类似物的选择性,以及从分子水平阐述昆虫对蜕皮激素类似物产生抗药性等问题的研究提供了参考。

3 展望

蜕皮激素类似物作为昆虫生长调节剂的一类,凭借其独特的作用方式和高效、低毒等特性而日益受到重视,但不可否认,目前以双酰肼类化合物为代表的蜕皮激素类似物作为农药还存在内吸活性不足和速效性差等缺点,同时一些害虫已经对双酰肼类化合物产生了一定的抗药性^[49]。为了克服上述缺点,仍有许多工作需要进一步开展和完善。如:1) 突破现有双酰肼骨架结构,以期发现结构新颖、活性更高的化合物;2) 建立和改进基于受体水平的生物活性方法,更加快速、准确地获取化合物的离体活性数据,为建立可靠的构效关系模型提供保证;3) 借助计算机辅助药物设计方法,如构象关系研究、蛋白质结构同源建模及虚拟筛选等,进一步拓展蜕皮激素类似物创制工作的思路及提升整个创制工作的效率。

谨以此文敬贺李正名院士八十华诞!

参考文献:

- [1] BUTENANDT A ,KARLSON P. The isolation in crystalline form of a metamorphosis hormone of insects[J]. *Z Naturforsch* ,1954 , 9b: 389 – 391.
- [2] HOPPE W ,HUBER R. Chemistry of ecdysone. II . Determination of the sterol structure and of its orientation by diffuse X-ray scattering in ecdysone crystals [J]. *Chem Ber* ,1965 ,98: 2353 – 2360.
- [3] XU Xiu-ying (胥秀英) ,ZHENG Yi-min (郑一敏) ,WANG Long (王龙) . 植物蜕皮激素的研究进展 [J]. *J Biology* (生物学杂志) 2005 22 (2) : 12 – 14.
- [4] WU Wen-jun (吴文君) ,LIU Hui-xia (刘惠霞) ,ZHU Jing-bo (朱靖博) . Natural Product Insecticide—Theory ,Method and Practice (天然产物杀虫剂——原理、方法、实践) [M]. Xi' an (西安) : Shaanxi Science and Technology Press (陕西科学与技术出版社) ,1998: 12 – 16.
- [5] MILTON W. Third-generation pesticides [J]. *Scientific American* ,1967 217 (1) : 13 – 17.
- [6] WING K D ,SLAWECKI R A ,CARLSON G R. RH-5849 , a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval *Lepidoptera* [J]. *Science* ,1988 241: 470 – 472.
- [7] WING K D. RH-5849 , a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line [J]. *Science* ,1998 241: 467 – 469.
- [8] NIE Kai-sheng (聂开晟) ,HOU Chun-qing (侯春青) ,LIU Chang-ling (刘长令) . 新型昆虫生长调节剂——环虫酰肼 [J]. *Pesticide* (农药) 2001 40 (2) : 42 – 43.
- [9] ZHANG Xiang-ning (张湘宁) ,LI Yu-feng (李玉峰) ,ZHU Li-mei (朱丽梅) . 作为杀虫剂的二酰肼类化合物及制备此种化合物的中间体以及它们的制备方法: CN 1313276 [P]. 2001–09-19.
- [10] YANG Xin-ling (杨新玲) ,QIAN Jian-hong (钱建宏) ,CHEN Fu-heng (陈馥衡) ,et al. 具有抑制蚊幼虫活性的芳基酰肼类化合物: CN 1370405A [P]. 2002-09-25.
- [11] ZHAO Q Q ,SHEN J ,HUANG Z Q ,et al. Synthesis and insecticidal activities of novel *N*-sulphenyl-*N'*-*tert*-butyl-*N* , *N'*-diacylhydrazines. 2. *N*-Substituted phenoxysulfenyl derivatives [J]. *J Agric Food Chem* 2008 56 (12) : 4529 – 4533.
- [12] HUANG Z Q ,ZhAO Q Q ,HUANG R Q ,et al. Design and synthesis of novel *N'*-*tert*-butyl-*N'*-substitutedbenzoyl-*N*-[dihydrobenzofuran (chroman)] carbonylhydrazide derivatives as potential insect growth regulators [J]. *Lett Org Chem* ,2009 ,6: 29 – 36.
- [13] HUANG Z Q ,CUI Q M ,XIONG L X ,et al. Synthesis and insecticidal activities and SAR studies of novel benzoheterocyclic diacylhydrazine derivatives [J]. *J Agric Food Chem* ,2009 ,57: 2447 – 2456.
- [14] MAO Chun-hui (毛春晖) ,WANG Qing-min (汪清民) ,HUANG Run-qiu (黄润秋) . 二芳酰肼类昆虫生长调节剂的构效关系研究进展 [J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报) 2004 6 (2) : 1 – 8.
- [15] OIKAWA N , NAKAGAWA Y , NISHIMURA K , et al. Quantitative structure-activity analysis of larvicidal 1-(substitute benzoyl) -2-benzoyl-1-*tert*-butylhydrazines against *Chilo suppressalis* [J]. *Pestic Sci* ,1994 41: 139 – 148.
- [16] NAKAGAWA Y , OIKAWA N , NISHIMURA K , et al. Quantitative structure-activity relationships and designed synthesis of larvicidal *N* , *N'*-dibenzoyl-*N*-*tert*-butylhydrazines against *Chila suppressalis* [J]. *Pestic Sci* ,1995 44: 102 – 105.
- [17] OIKAWA N , NAKAGAWA Y , NISHIMURA K , et al. Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators X. Substituent effects on larvicidal activity of 1-*tert*-butyl-1-(2-chlorobenzoyl) -2-(substituted benzoyl) hydrazines against *Chilo suppressalis* and design synthesis of potent derivatives [J]. *Pest Biochem Physiol* ,1994 48: 135 – 144.
- [18] NAKAGAWA Y , SOYA Y , NAKAI K , et al. Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators. XI. Stimulation and inhibition of *N*-acetylglucosamine incorporation in a cultured integument system by substituted *N*-*tert*-butyl-*N* , *N'*-dibenzoylhydrazines [J]. *Pestic Sci* ,1995 43: 339 – 345.
- [19] OGURA T ,NAKAGAWA Y ,MINAKUCHI C ,et al. QSAR for binding affinity of substituted dibenzoylhydrazines to intact Sf-9 cells [J]. *J Pestic Sci* 2005 30: 1 – 6.
- [20] FUJITA T ,NAKAGAWA Y. QSAR and mode of action studies of insecticidal ecdysone agonists [J]. *SAR and QSAR in Environmental Research* 2007 18: 77 – 88.
- [21] QIAN X H. Molecular modeling study on the structure activity relationship of substituted dibenzoyl-1-*tert*-butylhydrazines and their structural similarity to 20-hydroxyecdysone [J]. *J Agric Food Chem* ,1996 44: 1538 – 1542.
- [22] NAKAGAWA Y ,HATTORI K ,SHIMIZU B ,et al. Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. V. Substituted pyridyloxyphenyl and related derivatives [J]. *Pestic Sci* ,1998 53: 267 – 277.
- [23] NAKAGAWA Y , SMAGGHE G , KUGIMIVA S , et al. Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators. XII. Substituent effects of dibenzoylhydrazines on the insecticidal activity to Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *Pestic Sci* ,1999 55: 909 – 918.
- [24] NAKAGAWA Y ,SMAGGHE G ,VAN P M ,et al. Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators. XIII. Effects of substituents on the aromatic moiety of dibenzoylhydrazines on larvicidal activity against the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *Pest Manag Sci* 2001 57: 858 – 865.
- [25] NAKAGAWA Y ,SMAGGHE G ,TINY L ,et al. Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators. XIV. Effects of substituents on the aromatic moiety of dibenzoylhydrazines on larvicidal activity against the beet armyworm *Spodoptera exigua* [J]. *Pest Manag Sci* 2001 58: 131 – 138.
- [26] NAKAGAWA Y , TAKAHASHI K , KISHIHAWA H , et al. Classical and three-dimensional QSAR for the inhibition of [3H] ponasterone a binding by diacylhydrazine-type ecdysone agonists to insect Sf-9 cells [J]. *Bioorg Med Chem* 2005 13 (4) : 1333 –

- 1340.
- [27] MALINI R ,ANTON J ,ROBERT E ,*et al.* 4D-QSAR analysis of a set of ecdysteroids and a comparison to CoMFA modeling[J]. *J Chem Inf Comput Sci* 2001 ,41: 1587 – 1604.
- [28] ZOU Xia-juan(邹霞娟) ,LAI Lu-hua(来鲁华) ,JIN Gui-yu(金桂玉) ,*et al.* 新型含哒嗪酮基双酰胺类化合物的 3D-QSAR 研究[J]. *Acta Phys-Chim Sin*(物理化学学报) ,2002 ,18(6) : 513 – 516.
- [29] NOEL F ,JUAN E T ,THOMAS R ,*et al.* Structure-activity analysis on ecdysteroids: a structural and quantum chemical approach based on two biological systems[J]. *J Mol Structure* , 2006 ,758(2 – 3) : 263 – 274.
- [30] WHEELOCK C E ,NAKAGAWA Y ,HARADA T ,*et al.* High-throughput screening of ecdysone agonists using a reporter gene assay followed by 3-D QSAR analysis of the molting hormonal activity[J]. *Bioorg Med Chem* 2006 ,14: 1143 – 1159.
- [31] HORMANN R E , SMAGGHE G , NAKAGAWA Y . Multidimensional quantitative structure-activity relationships of diacylhydrazine toxicity to lepidopteran and coleopteran insect pests[J]. *QSAR & Combinatorial Sci* 2008 ,27: 1098 – 1112.
- [32] ARAI H W ,ATANABE B ,NAKAGAWA Y ,*et al.* Synthesis of ponasterone A derivatives with various steroid skeleton moieties and evaluation of their binding to the ecdysone receptor of *Kc* cells[J]. *Steroids* 2009 ,73: 1452 – 1464.
- [33] CUI Zi-ning(崔紫宁) ,ZHANG Li(张莉) ,HUANG Juan(黄娟) ,*et al.* 含咪唑环双酰胺类衍生物的三维定量构效关系研究[J]. *Acta Chimica Sinica*(化学学报) ,2008 ,66(12) : 1417 – 1423.
- [34] ZHANG L ,CUI Z N ,YIN B ,*et al.* QSAR and 3D-QSAR studies of the diacyl-hydrazine derivatives containing furan rings based on the density functional theory [J]. *Science China(Series B: Chemistry)* 2010 ,53(6) : 1322 – 1331.
- [35] ZHOU B H ,HIIRUMA K ,JINDRA M ,*et al.* Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm ,*Manduca sexta* ,during larval molting and metamorphosis[J]. *Dev Biol* , 1998 ,193: 127 – 138.
- [36] DHADIALLA T S ,CARLSON G R ,LE D P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity [J]. *Annu Rev Entomol* ,1998 ,43: 545 – 569.
- [37] LIU Yong-jie(刘永杰) ,XU Peng-jun(徐蓬军) ,LI Yan-wei(李艳伟) ,*et al.* 昆虫蜕皮激素受体及其类似物的杀虫机制研究进展[J]. *Acta Ento Sin*(昆虫学报) ,2007 ,50(1) : 67 – 73.
- [38] WURTZ J M ,GUILLOT B ,FAGART J ,*et al.* A new model for 20-hydroxyecdysone and dibenzoylhydrazine binding: a homology modeling and docking approach[J]. *Protein Sci* 2000 ,9: 1073 – 1084.
- [39] ANA CRISTINA S S ,CARLOS M R S. 20-Hydroxyecdysone receptor binding domain: 1. A semiempirical study of dibenzoylhydrazines selectivity [J]. *J Mol Struct* 2001 ,585: 61 – 68.
- [40] KUMAR M B ,FUJIMOTO T ,POTTER D W ,*et al.* A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: implications for gene switch applications [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ,99: 14710 – 14715.
- [41] KASUYA A ,SAWADA Y ,TSUKAMOTO Y ,*et al.* Binding mode of ecdysone agonists to the receptor: comparative modeling and docking studies[J]. *J Mol Model* 2003 ,9: 58 – 65.
- [42] BILLAS I M L ,IWEMA T ,GAMIER J M ,*et al.* Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor[J]. *Nature* 2003 ,426: 91 – 96.
- [43] HARADA T ,NAKAGAWA Y ,AKAMUSTSU M ,*et al.* Evaluation of hydrogen bonds of ecdysteroids in the ligand-receptor interaction using a protein modeling system [J]. *Bioorg Med Chem* 2009 ,17: 5868 – 5873.
- [44] YVES V ,KOEN P ,LUC S ,*et al.* The brown shrimp (*Crangon caangon* L.) ecdysteroid receptor complex: cloning ,structural modeling of the ligand-binding domain and functional expression in an EcR-deficient *Drosophila* cell line [J]. *Genaral Compe Endocrino* 2010 ,168(3) : 415 – 423.
- [45] CARMICHAEL J A ,LAWRENCE M C ,GRAHAM L D ,*et al.* The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain: comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design [J]. *J Biol Chem* 2005 ,280: 22258 – 22269.
- [46] IWEMA T ,BILLAS I M ,BECK Y ,*et al.* Structural and functional characterization of a novel type of ligand-independent RXR-USP receptor[J]. *Embo J* 2007 ,26: 3770 – 3782.
- [47] BROWNING C ,MARTINE ,LOCH C ,*et al.* Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor[J]. *J Bio Chem* 2007 ,282: 32924 – 32934.
- [48] GRAHAM H ,MICHAEL S. Protein based rational design of ecdysone agonists [J]. *Bioorg Med Chem* ,2009 ,17: 4064 – 4070.
- [49] LIU Yong-jie(刘永杰) ,SHEN Jin-liang(沈晋良) ,MA Hai-qin(马海芹) . 酰胺基类杀虫剂毒理机制与抗药性研究进展 [J]. *J Shandong Agric Univ: Nat Sci*(山东农业大学学报: 自然科学版) 2004 ,35(4) : 629 – 632.

(责任编辑: 金淑惠)