



铁死亡调控蛋白GPX4的小分子抑制剂研究进展

刘汝雄, 杨万镇, 涂杰, 盛春泉

Research progress on small-molecule inhibitors of ferroptosis regulatory protein GPX4

LIU Ruxiong, YANG Wanzhen, TU Jie, SHENG Chunquan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202312075>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

钾离子竞争性酸阻滞剂的药学特征研究进展

Progress on pharmaceutical characteristics of potassium-competitive acid blocker

药学实践与服务. 2024, 42(7): 278-284 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202306040](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202306040)

山楂酸药理作用的研究进展

Research progress on the pharmacological effects of maslinic acid

药学实践与服务. 2024, 42(5): 185-189 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202307052](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202307052)

肠道菌群参与糖尿病肾病的机制研究进展

Research progress on the mechanism of gut microbiota participating in diabetes nephropathy

药学实践与服务. 2024, 42(5): 181-184, 197 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202312023](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202312023)

食管癌的靶向治疗与免疫治疗研究进展

Research progress on targeted therapy and immunotherapy for esophageal cancer

药学实践与服务. 2024, 42(6): 231-237 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202306008](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202306008)

侧流免疫层析定量检测方法的研究进展

Research progress on quantitative detection methods of lateral flow immunochromatography assay

药学实践与服务. 2024, 42(7): 273-277, 284 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202307037](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202307037)

全反式维甲酸对肝星状细胞活化及氧化应激的作用和机制探索

Exploration of the role and mechanism of all-trans retinoic acid on activation and oxidative stress of hepatic stellate cell

药学实践与服务. 2024, 42(7): 291-296 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202312054](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202312054)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 综述 ·

铁死亡调控蛋白 GPX4 的小分子抑制剂研究进展

刘汝雄, 杨万镇, 涂杰, 盛春泉 (海军军医大学药理学系药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 铁死亡(ferroptosis)是2012年新发现的一种非凋亡坏死的细胞死亡方式,其主要特征为脂质活性氧增多以及细胞内亚铁离子累积。谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)是含硒GPx家族第4位成员,是细胞清除脂质过氧化物的关键蛋白,也是铁死亡的重要调节因子。靶向GPX4小分子抑制剂能诱导铁死亡发生,为治疗耐药性癌症和神经退行性疾病提供了新的策略。主要介绍GPX4蛋白的结构和功能,并综述GPX4小分子抑制剂最新前沿进展,为开发基于GPX4抑制的铁死亡诱导剂提供研究基础。

[关键词] GPX4; 小分子抑制剂; 铁死亡; 谷胱甘肽; 脂质过氧化

[文章编号] 2097-2024(2024)09-0001-04 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202312075

Research progress on small-molecule inhibitors of ferroptosis regulatory protein GPX4

LIU Ruxiong, YANG Wanzhen, TU Jie, SHENG Chunquan (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Ferroptosis, discovered in 2012, is a newly form of non-apoptotic and non-necrotic cell death, which is characterized by an increase in lipid peroxidation and accumulation of intracellular iron ions. Glutathione peroxidase 4 (GPX4) is the fourth member of the selenoprotein GPx family and plays a crucial role in clearing lipid peroxides in cells, making it an important regulator of ferroptosis. Small molecule inhibitors targeting GPX4 can induce ferroptosis, offering a new strategy for treating drug-resistant cancers and neurodegenerative diseases. The protein structure and function of GPX4 were primarily discussed, and the latest advances in small molecule inhibitors of GPX4 were summarized, which provided a research foundation for developing ferroptosis inducers based on GPX4 inhibition.

[Key words] ferroptosis; GPX4; small molecule inhibitors; glutathione; lipid peroxidation

1 GPX4 是重要的铁死亡调控蛋白

铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖性,区别于细胞凋亡、细胞坏死和细胞自噬新型细胞程序性死亡方式^[1]。细胞中铁过量时,可通过芬顿反应产生羟自由基,这些自由基直接会与细胞膜中多不饱和脂肪酸反应,产生大量脂质活性氧,从而诱导细胞死亡。铁死亡在细胞内受到多种代谢途径调控。其中就包括一个重要的抗氧化系统——谷胱甘肽系统。谷胱甘肽可以在还原态(G-SH)和氧化态(G-S-S-G)之间循环,使其能够参与细胞内的氧化还原生物化学反应。正常情况下,细胞内谷胱甘肽以还原态为主^[2]。谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4),分子量约为19 000,由170个氨基酸组成,是含硒GPx家族第4位成员。目前已在哺乳动物中发现

GPX1-GPX8等多个GPx家族成员,然而仅有GPX4表现出对于膜脂过氧化氢产物的清除能力,这与GPX4独特的氨基酸序列以及空间结构相关。GPX4能够以谷胱甘肽或其他硫氧化还原蛋白作为电子供体,将氢过氧化物(R-OOH)还原为对应的醇(R-OH),从而限制铁离子依赖的毒性自由基生成,抑制脂质过氧化,使得细胞膜免受氧化损伤,是铁死亡的重要调节蛋白^[3]。

近年来,大量研究表明通过抑制GPX4蛋白来诱导细胞发生铁死亡,在克服肿瘤细胞耐药、治疗脂质过氧化相关神经退行性疾病等方面极具前景^[4]。本文介绍了GPX4蛋白结构及其功能,并重点综述了目前GPX4小分子抑制剂最新研究进展,为开发基于GPX4蛋白功能抑制的铁死亡诱导剂提供研究基础。

2 GPX4 的蛋白结构及功能

GPX4是一种由170个氨基酸组成的单体蛋

[作者简介] 刘汝雄, 硕士研究生, 研究方向: 抗真菌药物研究, Email: 752410737@qq.com

[通信作者] 盛春泉, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗真菌和靶向蛋白降解药物研究, Email: shengcq@smmu.edu.cn

白质,显示出典型的硫氧还蛋白基序,由四个定位在蛋白质表面 α 螺旋和七条 β 链组成。GPX4含有在其他GPX硒酶中存在的保守催化活性四分体,由硒代半胱氨酸(Sec46)、谷氨酰胺(Gln81)、色氨酸(Trp136)和天冬酰胺(Asn137)组成,见图1A。Sec46、Gln81和Trp136三个氨基酸残基之间可以发生氢键相互作用和静电相互作用,这种相对牢固的空间排列对GPX4催化活性至关重要^[5]。其中,Sec46是催化活性必需的,Sec46突变为半胱氨酸会使GPX4催化活性大幅降低。Sec46催化氧化还原反应是由3个连续反应组成的循环反应,见图1B:第一步,过氧化物与离子化的GPX4反应,产生GPX4硒酸衍生物;第二步,GPX4硒酸衍生物与还原型谷胱甘肽反应,还原型谷胱甘肽通过硫与GPX4的硒共价结合形成GPX4-谷胱甘肽复合物;催化循环最后一步,GPX4-谷胱甘肽复合物通过与另一个还原型谷胱甘肽反应分离为GPX4和一分子氧化型谷胱甘肽^[2]。与其他GPx同工酶相比,GPX4表现出3种特性:一是该酶具有广泛的底物,即使是在高度结构化脂质蛋白组装体中,如生物膜和脂蛋白中,GPX4也能够减少复杂的脂质过氧化物;二是GPX4不仅可以将还原型谷胱甘肽作为氢供体,也可以接受蛋白质硫醇和其他还原等价蛋白;三是GPX4除了以单体形式存在以外,在精子细胞中还能以蛋白质聚集体的形式存在,这一特性影响了精子发育过程中线粒体膜的形成^[6]。

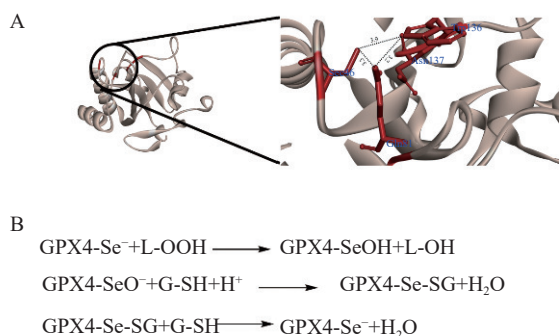


图1 GPX4蛋白结构及其功能

A.GPX4的蛋白晶体结构,红色部分为活性位点氨基酸残基;

B.催化循环反应过程

GPX4主要功能是利用谷胱甘肽作为辅助因子来降低脂质过氧化,从而保护细胞膜的完整性。GPX4作为一种关键的抗过氧化物酶,可还原膜和脂蛋白中的磷脂氢过氧化物(PLOOH)。GPX4不仅可以利用谷胱甘肽消除毒性PLOOH,还可以通过减少胸腺嘧啶氢过氧化物、胆固醇氢过氧化物和脂肪酸氢过氧化物,保护细胞免受氧化损伤。除了

还原氢过氧化物以外,GPX4还具有抑制花生四烯酸脂氧合酶(ALOX)活性的功能^[6]。此外,与其他GPx家族成员相比,GPX4另一个独特功能是调节哺乳动物的胚胎发育^[2]:在GPX4基因敲除小鼠模型中,小鼠胚胎在妊娠中期就在子宫内死亡,与此相反,GPX1、GPX2或GPX3敲除小鼠不会产生胚胎致死性。

3 GPX4小分子抑制剂研究进展

3.1 氯乙酰胺弹头共价抑制剂

迄今为止,已报道的GPX4小分子抑制剂大部分都包含与催化硒代半胱氨酸发生共价结合的反应弹头,其中最早发现的抑制剂就是以氯乙酰胺为共价结合弹头的化合物。RSL3(图2,化合物1)是最具有代表性的GPX4小分子抑制剂,最初被Yang^[7]等人从47725种化合物中筛选出来,发现其具有抑制RAS突变肿瘤细胞增殖的效果。该团队发现RSL3诱导的细胞死亡与凋亡、坏死和自噬均不同。该研究团队进一步开展研究^[8],通过化学蛋白质组学来筛选鉴定RSL3靶标蛋白,确定了GPX4是其作用的靶蛋白,并发现RSL3氯乙酰胺部分对其活性至关重要,即1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,GPX4抑制率为(17.08 \pm 0.40)%,更换为其他亲电弹头取代时,会导致活性丧失。Hengrui团队从晶体结构角度进一步阐述了GPX4和RSL3的结合方式,发现RSL3结合位点是半胱氨酸66(Cys66)而不是GPX4的催化活性位点Sec46^[9]。

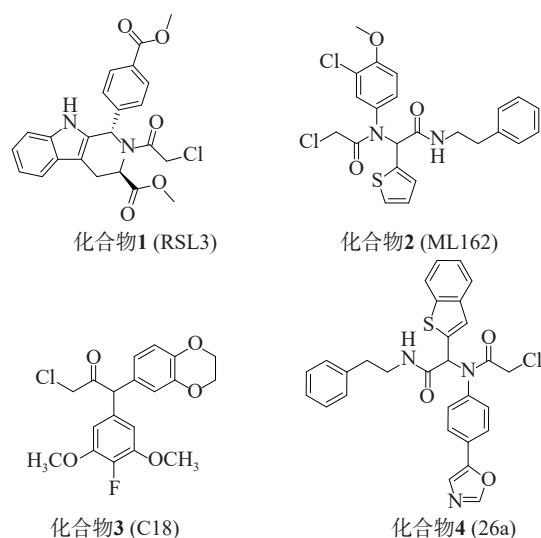


图2 氯乙酰胺弹头共价抑制剂的化学结构

Michel团队^[10]对303282种化合物进行了高通量筛选,得到了对RAS突变细胞具有优秀抑制活性的化合物ML162(图2,化合物2)。该化合物

同样含有氯乙酰胺基团,与RSL3相比显示出更好抑制率,其在1.0 μmol/L浓度下,GPX4抑制率为(27.0±0.9)%。Chen的团队^[11]在ML162和RSL3的基础上,设计得到了一系列新型GPX4共价抑制剂,其中,化合物C18(图2,化合物3)表现出优于RSL3和ML162的GPX4抑制率[1.0 μmol/L浓度下,GPX抑制率为(98.8±1.5)%],能抑制三阴性乳腺癌细胞生长(IC₅₀=0.012 μmol/L)。Xu的团队^[12]以RSL3

多环的刚性骨架为切入点,以RSL3为先导化合物,将分子骨架中的哌啶环打开,并基于此继续进行结构优化,设计合成了一系列衍生物(图3)。其中化合物26a(图2,化合物4)表现出优秀的GPX4蛋白抑制活性[1.0 μmol/L浓度下,GPX抑制率为(71.7±1.7)%],能诱导三阴性乳腺癌细胞死亡(IC₅₀=0.78 μmol/L)。

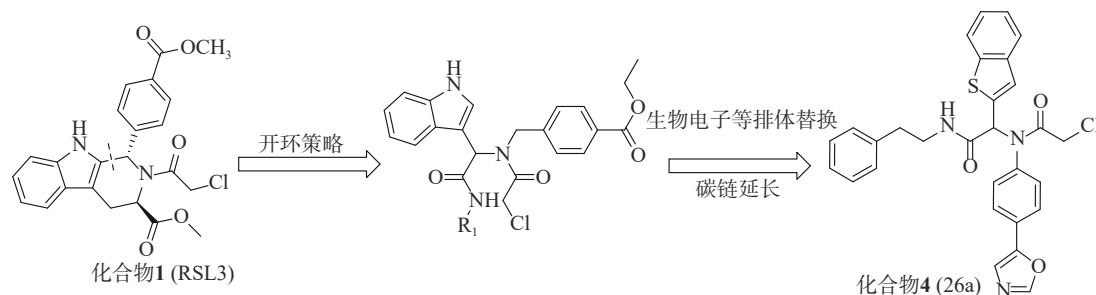


图3 化合物26a的设计思路

3.2 掩蔽氧化脒共价抑制剂

目前报道GPX4抑制剂主要是通过氯乙酰胺基团与GPX4进行共价结合来抑制其活性。然而,这些化合物中的氯乙酰胺基团不仅与GPX4的半胱氨酸残基共价结合,还可能与其他氨基酸残基发生结合,从而降低了它们对GPX4的特异性。鉴于此,研究人员正致力于寻找能够更特异地与GPX4结合的化学结构。Michel^[10]团队发现,不含亲电弹头的化合物ML210(图4,化合物5)在1.0 μmol/L浓度下对GPX4的抑制率高达(34.8±0.5)%。Eaton^[13]等研究者揭示了ML210的作用机制(图4):ML210中的硝基异噁唑基团在细胞内转化为氧化脒基团,进而与GPX4中的半胱氨酸残基形成共价结合。同样的机制也在化合物二酰基咪唑(图4,化合物6)中观察到^[14],其结构中的噁二唑基团能在细胞内转化为氧化脒基团,从而抑制GPX4,1.0 μmol/L浓度下抑制率为(34.8±0.5)%。不同于RSL3和ML162

这类作用于多种蛋白质的抑制剂,ML210和二酰基咪唑可专一性地作用于GPX4,说明掩蔽脒氧化物是一种高特异性的GPX4靶向结构。

3.3 间接抑制剂

除了直接与GPX4发生共价结合外,某些化合物可通过非直接途径抑制GPX4蛋白。例如Shimada^[15]团队从3169种化合物中筛选出FIN56(图5,化合物7),该化合物并不具有亲电弹头,但能导致GPX4失活。FIN56会增加细胞内活性氧的含量,但其作用速度明显慢于直接作用于GPX4的抑制剂RSL3。研究表明,经FIN56处理的细胞中GPX4丰度显著下降,但是其转录水平却显著增加,这种现象在RSL3处理的细胞中并未观察到。因此,研究者推测FIN56可能通过促进GPX4的降解来发挥作用,但具体机制尚不明确。另一种由Micheal^[16]报道的非共价GPX4抑制剂是FINO2(图5,化合物8),其结构中的过氧键能直接氧化亚铁离子,导致GPX4失活。这些分子的发现为GPX4小分子抑制剂的开发提供了新的视角。

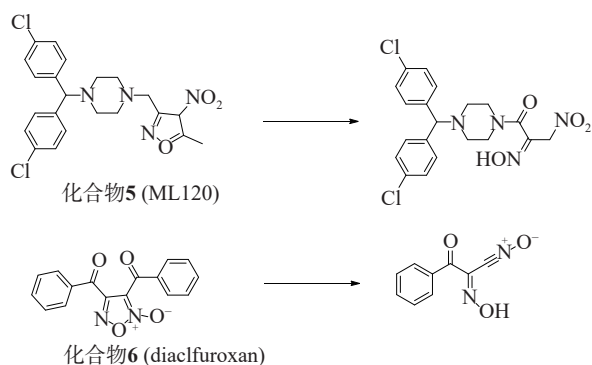


图4 掩蔽氧化脒共价抑制剂的化学结构及其在细胞的转化过程

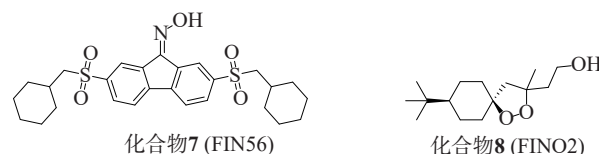


图5 GPX4间接抑制剂的化学结构

4 总结和展望

近年来,随着对铁死亡相关研究的进一步深

入,人们发现铁死亡与多种癌症以及神经性疾病等病理过程相关,为治疗这些疾病提供了新的解决策略。在铁死亡的发生过程中,GPX4 是关键的调控因子,它能够分解脂质过氧化物,维持脂质双分子层的稳定,反之,抑制 GPX4 可以诱导细胞发生铁死亡。目前,大多数已报道的 GPX4 小分子抑制剂为含有氯乙酰胺基团的共价抑制剂,这些化合物由于其强大的亲电性,可以与多种蛋白质结合,从而导致它们与 GPX4 结合的特异性不高。为解决这一问题,研究者们设计了含掩蔽氧化脒弹头的化合物,这种设计旨在通过减少细胞与高亲电性弹头的接触时间,提高靶向 GPX4 的特异性。这两类 GPX4 小分子抑制剂虽然具有较好的蛋白及细胞水平活性,但尚无候选分子进入临床试验。此外,还发现了一些非共价的 GPX4 小分子抑制剂,这些分子显示出抑制 GPX4 活性并能诱导细胞发生铁死亡,但其与 GPX4 具体的作用机制尚不清楚。因此,无论是基于关键调控蛋白 GPX4 探索高特异性的共价抑制剂,还是揭示 GPX4 非共价抑制剂的作用机制,都是铁死亡相关研究领域的热点问题,克服这些挑战是未来铁死亡诱导剂进入临床应用的关键一步。

【参考文献】

- [1] FORCINA G C, DIXON S J. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis[J]. *Proteomics*, 2019, 19(18) : e1800311.
- [2] XIE Y C, KANG R, KLIONSKY D J, et al. GPX4 in cell death, autophagy, and disease[J]. *Autophagy*, 2023, 19(10) : 2621-2638.
- [3] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.
- [4] ZHAO Y C, LI Y Q, ZHANG R F, et al. The role of erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5429-5441.
- [5] SCHEERER P, BORCHERT A, KRAUSS N, et al. Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4(GPx4) [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(31): 9041-9049.
- [6] SAVASKAN N E, UFER C, KÜHN H, et al. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function[J]. *Biol Chem*, 2007, 388(10): 1007-1017.
- [7] YANG W S, STOCKWELL B R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells[J]. *Chem Biol*, 2008, 15(3): 234-245.
- [8] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1-2): 317-331.
- [9] LIU H, FOROUHAR F, LIN A J, et al. Small-molecule allosteric inhibitors of GPX4[J]. *Cell Chemical Biology*, 2022, 29(12): 1680-93.
- [10] WEIWER M, BITTKER J A, LEWIS T A, et al. Development of small-molecule probes that selectively kill cells induced to express mutant RAS[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(4) : 1822-1826.
- [11] CHEN T T, LENG J F, TAN J, et al. Discovery of novel potent covalent glutathione peroxidase 4 inhibitors as highly selective ferroptosis inducers for the treatment of triple-negative breast cancer[J]. *J Med Chem*, 2023, 66(14): 10036-10059.
- [12] XU C J, XIAO Z H, WANG J, et al. Discovery of a potent glutathione peroxidase 4 inhibitor as a selective ferroptosis inducer[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(18): 13312-13326.
- [13] EATON J K, RUBERTO R A, KRAMM A, et al. Diacylfuroxans are masked nitrile oxides that inhibit GPX4 covalently[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(51): 20407-20415.
- [14] EATON J K, FURST L, RUBERTO R A, et al. Selective covalent targeting of GPX4 using masked nitrile-oxide electrophiles [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(5): 497-506.
- [15] SHIMADA K, SKOUTA R, KAPLAN A, et al. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(7): 497-503.
- [16] GASCHLER M M, ANDIA A A, LIU H R, et al. FINO₂ initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(5): 507-515.

[收稿日期] 2023-12-29 [修回日期] 2024-04-22

[本文编辑] 费永和