

醌氧化还原酶 1 催化三甲基锁醌丙酸还原机制的理论研究

范文程, 任婷, 孙国辉, 张娜, 赵丽娇*, 钟儒刚

(北京工业大学 化学与生命科学学院 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室, 北京 100124)

摘要: 低氧激活前药 (HAP) 是靶向肿瘤低氧微环境的重要治疗策略。三甲基锁醌丙酸 (Q₃PA) 作为一种醌类 HAP, 可在肿瘤低氧条件下经醌氧化还原酶-1 (NQO1) 还原, 触发分子内环化并释放活性药效团, 已被广泛用于抗肿瘤前药和荧光探针的设计。然而, 其具体的酶催化还原机制尚不明确, 限制了进一步的理性优化。采用密度泛函理论 (DFT) 和分子对接方法, 系统探讨了辅酶还原型黄素二核苷酸 (FADH₂) 介导的 Q₃PA 双电子还原机理及其与 NQO1 活性中心的相互作用模式。通过构建四条可能的反应路径并计算各驻点的结构与能量, 明确了反应的优势路径: 首先由 FADH₂ 向 Q₃PA 的羰基氧原子传递 2e⁻/1H⁺, 生成半醌阴离子中间体; 随后由组氨酸残基提供第二个质子, 生成对氢醌结构; 最后经分子内环化形成内酯, 释放药效团。分子对接结果显示, Q₃PA 的对苯醌部分以平行方式堆叠于 FADH₂ 异咯嗪环上方, 形成稳定的 π - π 堆积作用; 其羰基与 Tyr126 和 Tyr128 形成氢键, 同时与 Pro68、Trp105、Phe106、His161 和 Phe178 等残基产生疏水相互作用, 确保了底物在活性中心的准确定位。本研究从原子层面揭示了 Q₃PA 在 NQO1 催化下的还原路径及关键结构特征, 明确了反应优势路径及控速步骤, 阐明了底物与酶的识别机制, 为设计新型的靶向性抗癌药物提供了理论依据。

关键词: 三甲基锁醌丙酸; 还原机制; 醌氧化还原酶 1; 低氧激活; 密度泛函理论; 分子对接

中图分类号: O62 文献标识码: A 文章编号: 0258-3283 (2025) --

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2025.0078

Reduction Mechanism of Trimethylquinone Propionic Acid Catalyzed by Quinone Oxidoreductase 1: A DFT

Investigation FAN Wen-cheng, REN Ting, SUN Guo-hui, ZHANG Na, ZHAO Li-jiao*, ZHONG Ru-gang (Beijing Key Laboratory of Environmental & Viral Oncology, Faculty of Chemistry & Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: Hypoxia-activated prodrugs (HAPs) represent an important therapeutic strategy targeting the hypoxic tumor microenvironment. Trimethyl lock quinone propionic acid (Q₃PA), a quinone-based HAP, can be reduced by quinone oxidoreductase-1 (NQO1) under tumor hypoxia, triggering intramolecular cyclization and the release of active pharmacophores. It has been widely employed in the design of antitumor prodrugs and fluorescent probes. However, the specific enzymatic reduction mechanism of Q₃PA remains unclear, limiting its further rational optimization. In this study, density functional theory (DFT) and molecular docking methods were employed to systematically investigate the two-electron reduction mechanism of Q₃PA mediated by the coenzyme reduced flavin adenine dinucleotide (FADH₂) and its interaction mode within the NQO1 active center. By constructing four possible reaction pathways and calculating the structures and energies of each stationary point, the dominant reaction pathway was elucidated: Initially, FADH₂ delivers 2e⁻/1H⁺ to the carbonyl oxygen atom of Q₃PA, generating a semiquinone anion intermediate. Subsequently, a histidine residue provides a second proton to form the hydroquinone structure. Finally, intramolecular cyclization yields a lactone, releasing the pharmacophore. Molecular docking results revealed that the benzoquinone moiety of Q₃PA stacks parallelly above the isoalloxazine ring of FADH₂, forming stable π - π interactions. Its carbonyl groups form hydrogen bonds with Tyr126 and Tyr128, while hydrophobic interactions with residues including Pro68, Trp105, Phe106, His161, and Phe178 further ensure precise substrate positioning within the active center. This study elucidates the reduction pathway and key structural features of Q₃PA catalyzed by NQO1 at the atomic level, identifies the dominant pathway and rate-determining step, and clarifies the substrate-enzyme recognition mechanism, providing a theoretical basis for the design of novel hypoxia-targeted antitumor drugs.

Keywords: trimethylquinone propionic acid; reduction mechanism; quinone oxidoreductase 1; hypoxia activation; density functional theory; molecular docking

低氧激活前药 (HAP) 是一种重要的肿瘤靶向治疗策略, 在肿瘤低氧区域可被高表达的还原酶激活, 释放具有细胞毒性的药物, 从而发挥靶向抗肿瘤作用^[1,2]。HAP 主要包括氮氧化物、醌、硝基化合物和金属络合物^[3]。其中, 醌类化合物常见于天然或合成的抗癌和抗菌剂, 可通过一步两电子或两步一电子的机制还原为氢醌。醌氧化还原酶-1 (NQO1) 是催化醌类化合物体内还原反应的主要生物酶, 其作用机制主要是以还原型黄素腺嘌呤二核苷酸 (FADH₂) 作为辅助因子催化醌的双电子还原^[4]。NQO1 主要位于细胞的胞质溶胶中, 也存在

于细胞核、内质网、细胞膜和线粒体以及细胞外^[5-8]。NQO1 在某些癌症肿瘤组织如甲状腺、肾上腺、乳腺、卵巢、结肠和非小细胞肺癌中过表达^[9,10], 使其成为开发抗肿瘤药物和前药的理想靶标^[10-13]。NQO1 能够选择性的在肿瘤低氧条件下将醌还原为对应的酚, 从而导致抗肿瘤药物的释放。

三甲基锁醌丙酸 (Q₃PA, 分子结构如图 1 所示) 是一类代表性的醌类 HAP, 能够在 NQO1 的触发下释放具有抗肿瘤活性的药效团。Mendoza 等^[4]开发了一种可被 NQO1 还原激活的醌丙酸触发基团, 醌环上取代基的变化能够显著影响催化反应

收稿日期: 2025-11-08; 修回日期: 2025-12-29; 接受日期: 2026-03-12

基金项目: 北京市教委北京市重点实验室建设项目 (PXM2015_014204_500175)。

作者简介: 范文程 (2000-), 男, 山东潍坊人, 硕士生, 主要研究方向为抗肿瘤药物开发。

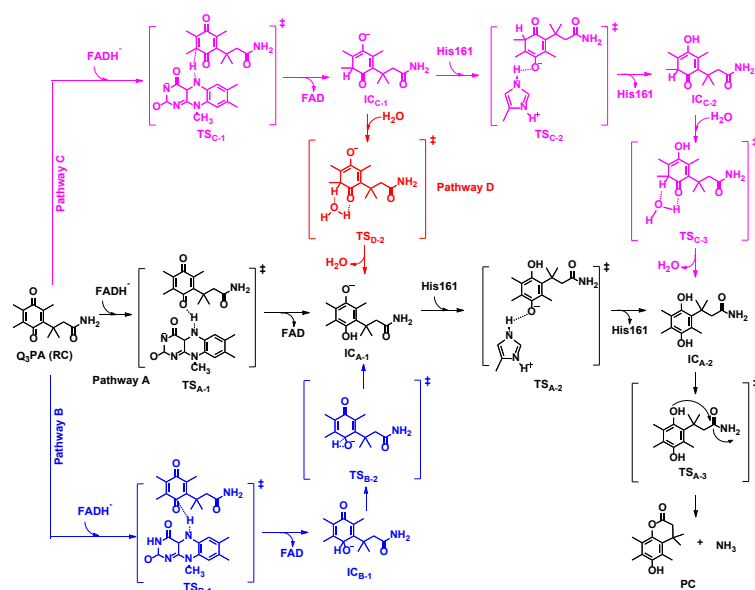
通讯作者: 赵丽娇, E-mail: zhaolijiao@bjut.edu.cn。

中的米氏常数和催化效率等。 Q_3PA 还被应用于抗肿瘤前药和荧光探针的设计中。Zhang 等^[14]将 Q_3PA 与 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 连接合成了一种新型 HAP 用于癌症靶向治疗, 该化合物比传统 5-FU 类药物表现出更高的抗肿瘤活性和安全性。Qu 等^[15]将 Q_3PA 与鬼臼毒素 (PPT) 连接合成的一种新型化合物能够在 NQO1 的作用下释放 PPT, 从而靶向性的杀死肿瘤细胞。康普瑞汀 A4(CA4)是一种有效的微管蛋白抑制剂, 将其与 Q_3PA 连接所形成的化合物对缺氧暴露下的 A549 和 HepG2 细胞表现出显著毒性^[16]。Park 等^[17]合成了一种由 Q_3PA 连接聚己内酯和聚乙二醇的共聚物, 将其通过自组装形成纳米胶束用于阿霉素的靶向递送。上述研究报道的化合物均具有醌丙酸的“三甲基锁”结构, 在 NQO1 催化下, 醌被还原为酚, 继而引发快速内酯化和一系列多米诺分解反应, 最终释放出活性药物。尽管 Q_3PA 在一系列临床前研究中表现出了良好的肿瘤

低氧激活响应性, 然而到目前为止, 尚未见关于 NQO1 催化 Q_3PA 还原机理的研究, 其低氧响应机制尚不明确。因此, 本文对 NQO1 催化 Q_3PA 还原的反应机理进行了深入探讨, 以期设计开发新型的低氧靶向性醌类抗肿瘤药物提供理论依据。

1 模型及计算方法

以辅酶 $FADH_2$ 和 Q_3PA 为计算模型, 探讨了 NQO1 中辅酶 $FADH_2$ 介导的 Q_3PA 双电子还原机理。根据以往的研究^[18-20], 为了简化计算模型以节约计算成本, 将 $FADH_2$ 分子结构中异咯嗪环上的磷酸尾链用甲基替代, 并将异咯嗪环羟基上的质子用酪氨酸残基 (Tyr155) 脱去使其成为 $FADH^-$ 。 Q_3PA 经 $FADH^-$ 介导的双电子还原假设机理如图 1 所示, 共包括 4 条反应路径。 Q_3PA 首先被 $FADH^-$ 还原为 Q_3PA 半醌阴离子 (IC_{A-1}); 然后进一步被组氨酸残基还原, 生成对氢醌结构



途径 A: $RC \rightarrow TS_{A-1} \rightarrow IC_{A-1} \rightarrow TS_{A-2} \rightarrow IC_{A-2} \rightarrow TS_{A-3} \rightarrow PC$; 途径 B: $RC \rightarrow TS_{B-1} \rightarrow IC_{B-1} \rightarrow TS_{B-2} \rightarrow IC_{A-1} \rightarrow TS_{A-2} \rightarrow IC_{A-2} \rightarrow TS_{A-3} \rightarrow PC$; 途径 C: $RC \rightarrow TS_{C-1} \rightarrow IC_{C-1} \rightarrow TS_{C-2} \rightarrow IC_{C-2} \rightarrow TS_{C-3} \rightarrow IC_{A-2} \rightarrow TS_{A-3} \rightarrow PC$; 途径 D: $RC \rightarrow TS_{D-1} \rightarrow IC_{D-1} \rightarrow TS_{D-2} \rightarrow IC_{A-1} \rightarrow TS_{A-2} \rightarrow IC_{A-2} \rightarrow TS_{A-3} \rightarrow PC$

图 1 NQO1 中 $FADH^-$ 介导的 Q_3PA 双电子还原假设机理

Fig.1 Hypothesis mechanism of $FADH^-$ mediated two electron reduction of Q_3PA in NQO1

(IC_{A-2}); 最后经过分子内环化形成内酯 (PC), 导致药物的释放。在整个反应过程中, 第一步由 $FADH^-$ 提供 2 个电子和 1 个质子 ($2e^-/1H^+$), 第二步由组氨酸残基提供 1 个质子, 一共经过了 $2e^-/2H^+$ 的转移。

所有反应物、中间体、过渡态和产物的结构均采用密度泛函 (DFT) M062X 方法^[21], 在 6-31+G(d,p)

水平上进行几何结构优化; 并在相同水平上计算振动频率, 均得到无虚频的稳定结构或有唯一虚频的过渡态结构。为模拟催化 Q_3PA 发生还原反应的 NQO1 酶活性中心的蛋白环境, 采用了 SMD 溶剂模型, 以氯苯和乙腈为溶剂, 在更高精度的 SMD-M062X/6-311+G(3df,2p) 水平上计算了各驻点的单点能。上述计算均使用 Gaussian 16 程序完成。

在分子对接中, 首先将底物在 M062X/6-31+G(d,p)水平上进行结构优化, 得到无虚频的稳定结构后, 与 NQO1 晶体结构 (PDB ID:1DXO) 进行分子对接。所有对接均使用 GOLD 5.2 软件包, 选择导向模式, 移除 NQO1 蛋白中的水分子并补全氢原子, 选择酶活性口袋中 FADH2 异咯嗪环的 N5 作为对接中心, 设置 10Å 球形区域为活性口袋边界。采用“GoldScore”作为打分函数, 选用细胞色素 P450 模式进行对接。对接结果的分子结构采用 PyMOL 软件进行可视化。

2 结果与讨论

2.1 Q₃PA 双电子还原机理

如图 1 所示, Q₃PA 经 FADH⁻催化的双电子还原机理包括 4 条可能的反应路径。简单来说, 2e⁻/1H⁺由 FADH⁻异咯嗪环的 N5 分别经途径 A、B 和 C 向 Q₃PA 的羰基氧原子、α 碳原子或 β 碳原子传递; 或者在生成中间体 IC_{C-1} 后, 再通过途径 D 发生 H₂O 介导的质子转移。各路径最终均经过最后一步分子内环化形成目标产物。图 2 为在 M062X/6-31+G(d,p)水平上优化得到的 Q₃PA 双电子还原路径中涉及的过渡态结构及相关参数。

途径 A 中, FADH⁻异咯嗪环 N5 位的 H 向 Q₃PA 的氧原子发生转移, 该步骤经历过渡态 TS_{A-1} 并且在 1266.73i cm⁻¹ 处有唯一虚频, 振动模式对应 N5-H 键的断裂与 H-O1 键的形成, 得到中间体 IC_{A-1}, 本步的反应能垒为 10.57 kcal/mol (文中所提及的能量均为气相中计算所得的数值)。N5-H 键长由 RC 中的 1.02Å 增加到 TS_{A-1} 中的 1.24Å, H-O1 键长由 TS_{A-1} 中的 1.22Å 缩短至 IC_{A-1} 中的 0.98Å, 键角 N5-H-O1 为 157.5°。接下来, 组氨酸残基 (His161) 继续向中间体 IC_{A-1} 进行 1H⁺ 的传递, 组氨酸残基 N1 位的 H 传递至中间体 IC_{A-1} 另一侧的羰基氧原子上, 该步骤经历过渡态 TS_{A-2} 并在 455.98i cm⁻¹ 处有唯一的虚频, 振动模式对应 N1-H 键的断裂与 H-O2 键的形成, 本步的反应能垒为 15.49 kcal/mol。N1-H 键长由 IC_{A-1} 中的 1.02Å 增加到 TS_{A-2} 中的 1.07Å, H-O2 键长由 TS_{A-1} 中的 1.55Å 缩短至 IC_{A-2} 中的 0.99Å, 键角 N1-H-O2 为 155.0°。

途径 B 共经历了 4 步反应, 与途径 A 不同的是, 反应物经历了两步反应生成半醌阴离子中间体 (即途径 A 中的 IC_{A-1})。在生成 IC_{A-1} 后, 途径 B 与途径 A 经历了相同的反应历程, 因此, 仅对途径

B 中的前两步进行讨论。该途径的前两步经历了两个过渡态 TS_{B-1} 和 TS_{B-2}, 这两个过渡态均具备唯一的虚频, 分别是 440.83i cm⁻¹ 和 1621.59i cm⁻¹ 其中, 第一步反应为 FADH⁻异咯嗪环 N5 位的 H 向 Q₃PA 的羰基 α 碳原子发生转移, 过渡态振动模式对应 N5-H 键的断裂与 H-C1 键的形成; 第二步反应为中间体 IC_{B-1} 的异构化, H 原子由 C1 原子转移至 O1, 振动模式对应 C1-H 键的断裂与 H-O1 键的形成。两步的反应能垒分别为 36.60 kcal/mol 和 43.04 kcal/mol, 可见反应物经途径 B 生成 IC_{A-1} 的能垒明显高于途径 A (仅为 10.57 kcal/mol), 这表明途径 B 在动力学上明显不如途径 A 有利。此外, 通常认为酶催化反应体系的能垒一般低于 30 kcal/mol^[22], 因此反应物也几乎不可能通过途径 B 发生反应。

途径 C 经历的反应历程与途径 A 和 B 有比较明显的差异, 除了最后一步内脂化反应, 前期的 2e⁻/1H⁺ 转移机制完全不同于途径 A 和 B。因此, 对途径 C 经过 3 步反应生成对氢醌结构 (即 IC_{A-2}) 的过程进行详细探讨。FADH⁻异咯嗪环 N5 位的 H 向 Q₃PA 的羰基 β 碳原子发生转移, 该步骤经历过渡态 TS_{C-1} (唯一虚频 1204.88i cm⁻¹) 生成中间体 IC_{C-1}。接下来, 组氨酸残基 (His161) 向中间体 IC_{C-1} 传递 1 个氢质子至 IC_{C-1} 另一侧的羰基氧原子上生成中间体 IC_{C-2}, 该步骤经历过渡态 TS_{C-2} (唯一虚频 864.8i cm⁻¹)。第三步为 IC_{C-2} 经水分子介导的氢转移, 即 C2 位的 H1 原子通过水分子的氢桥键转移至 O1 位, 生成中间体 IC_{A-2}。该步骤经历过渡态 TS_{C-3} 并在 1595.48i cm⁻¹ 处有唯一的虚频。该步骤也计算了未经水分子介导的直接分子内氢转移机制, 但获得的反应能垒高达 52.56 kcal/mol, 这明显高于正常的酶催化反应能垒, 因此在后续氢转移反应中均采用了水分子介导的机制。水不仅可以作为反应物和酶的良好分散介质, 还能在催化过程中充当辅助因子, 协助质子转移^[23-25]。这 3 步反应的能垒分别为 26.24、2.82 和 29.53 kcal/mol, 可见虽然第二步反应的能垒极低, 但是由于第一步和第三步的能垒明显高于途径 A 生成 IC_{A-2} 的能垒, 因此途径 C 也不如途径 A 具有能量上的优势。

途径 D 与途径 A 和 C 相近, 其第一步与途径 C 完全相同, 即 2e⁻/1H⁺ 由 FADH⁻向 Q₃PA 转移生成中间体 IC_{C-1}。然后, IC_{C-1} 经水分子介导发生分子内的氢转移, 即 C2 位的 H1 原子通过水分子形成的氢桥键转移至 O1 位, 生成中间体 IC_{A-1}。该步

骤经历过渡态 TS_{D-2} 并在 $1693.55i\text{ cm}^{-1}$ 处有唯一的虚频, 振动模式对应 $C2-H1$ 键和 O_W-H_W 键的断裂, 以及 $H1-O_W$ 键与 H_W-O1 键的形成。本步的反应能垒为 26.15 kcal/mol 。此后的反应途径与途径 A 完

全相同, 故不再予赘述。可见, 与途径 A 和 C 相比, 途径 D 经历的唯一不同步骤 (即第二步的分子内氢迁移反应) 的活化能也明显高于途径 A 的两步反应能垒, 因此也不如途径 A 有利。

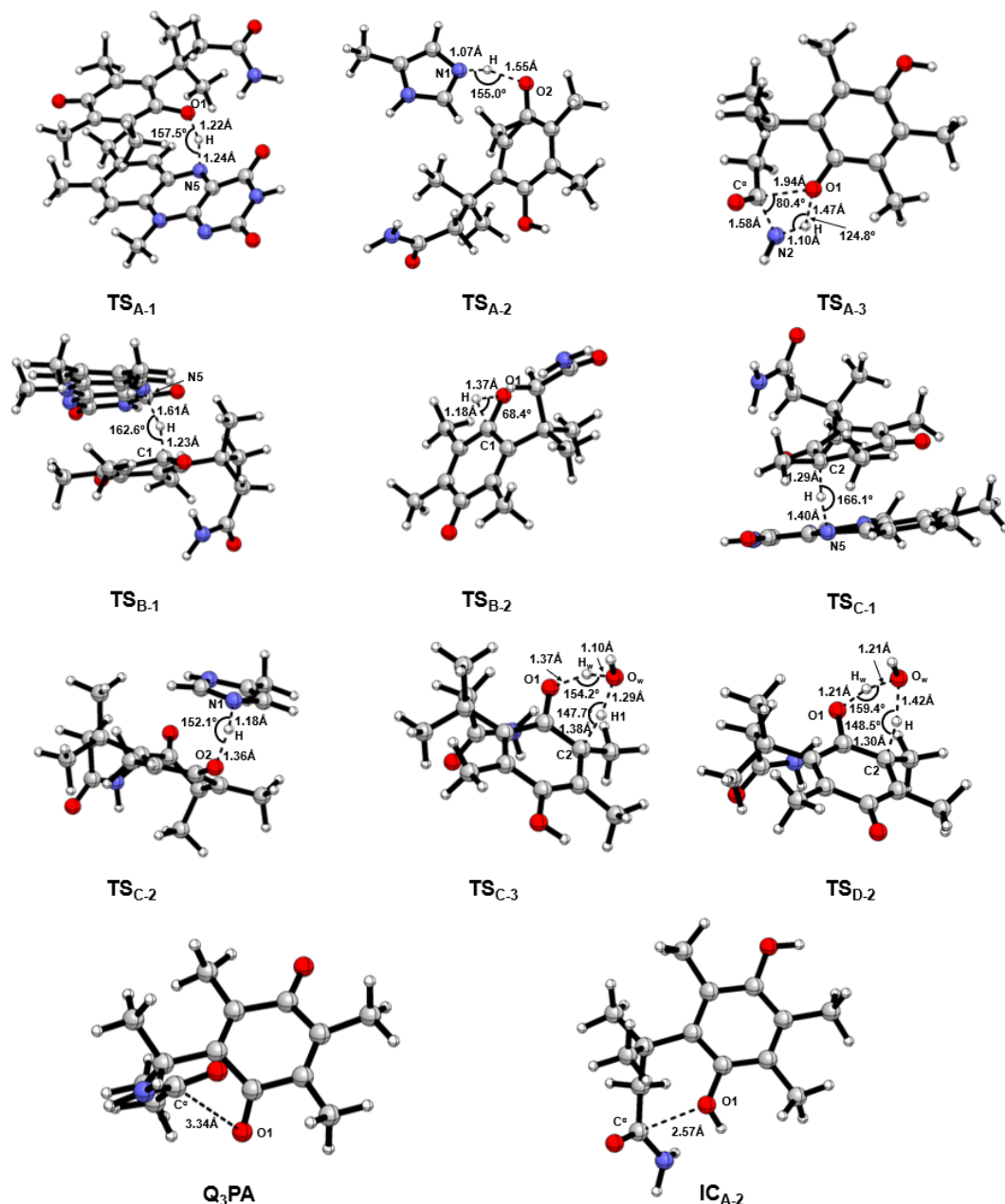


图 2 M062X/6-31+G(d,p)水平上优化得到 Q_3PA 双电子还原反应的过渡态结构与主要参数

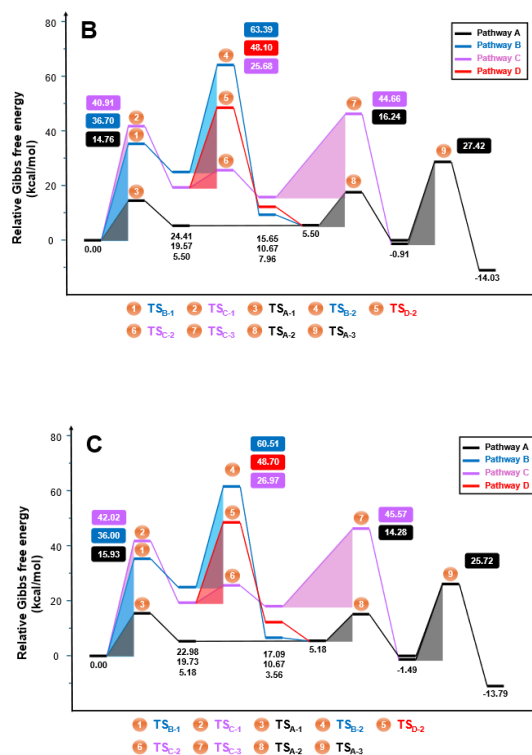
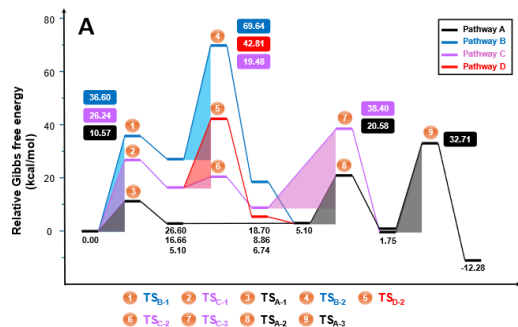
Fig.2 Optimized structures and parameters of TSs in reduction of Q_3PA Double Electron calculated at M062X /6-31+G(d,p) theoretical level

Q_3PA 经过上述 4 条途径均生成了对氢醌结构, 即中间体 IC_{A-2} 。通过分子结构可以看出, IC_{A-2} 分子中 $C1$ 位上的羟基氧原子比 Q_3PA 中 $C1$ 位的羰基氧原子更加靠近酰胺基的碳原子 (如图 2 所示, IC_{A-2} 中 $O1...C^a$ 距离为 2.57Å , Q_3PA 中 $O1...C^a$ 距

离为 3.34Å), 而且 3 个甲基之间的相对空间位置也较还原之前更为拥挤。这些结构特征都导致了 IC_{A-2} 分子的快速内酯化, 从而使得酰胺键发生断裂并释放出氨基上连接的活性药效团。该步骤经历过渡态 TS_{A-3} 并在 $653.69i\text{ cm}^{-1}$ 处有唯一的虚频, 振动

模式对应 C^{α} -N2 键的断裂与 C^{α} -O1 键的形成, O1-H 键的断裂与 N2-H 键的形成。本步的反应能垒为 30.96 kcal/mol。

比较上述各还原反应路径, 第一步均为 $2e^-/1H^+$ 转移, 在优化得到的 3 个过渡态 (TS_{A-1} 、 TS_{B-1} 和 TS_{C-1}) 中, 反应物的醌环均以相对平行的空间位置堆叠于 FADH⁻ 异咯嗪环的上方, 可推测此种反应模式有利于 FADH⁻ 中 N5 的离域与醌环中 O 的离域发生轨道重叠, 从而在 FADH⁻ 中的 N5 位和醌环之间发生 $2e^-/1H^+$ 的转移。文献中有关醌环也是以相对平行的空间位置堆叠于 FADH⁻ 异咯嗪环上方的。例如, Zhang 等^[16]使用 NQO1 晶体结构 (PDB ID: 3JSX) 来探究 CA-4 和 NQO1 之间的潜在结合模式, 发现 CA-4 的醌环结构平行于 FADH⁻ 异咯嗪环上方的; Liu 等^[26]将雷公藤甲素 (TP) 与 Q₃PA 连接合成 CX-23, 将其与 NQO1 晶体对接也证明了这一点。各途径的势能曲线如图 3 所示, 各驻点的相对能量列于表 1。从表 1 所示 M062X/6-31+G(d,p) 水平上气相中各驻点的相对能量值分析可知, 各路径第一步的羟基化反应 (TS_{A-1} 、 TS_{B-1} 、 TS_{C-1}) 为吸热反应, 其中 TS_{A-1} 的反应能垒为 10.57 kcal/mol, 而 TS_{B-1} 与 TS_{C-1} 的反应能垒分别为 36.60 和 26.24 kcal/mol, 后者能垒较高, 表明在第一步的还原过程中, FADH⁻ 中 N5 位和醌环中 O 原子之间更容易发生 $2e^-/1H^+$ 的耦合转移。而在第二步的组氨酸残基质子化过渡态 (TS_{A-2} 、 TS_{C-2}) 均为放热反应, 其中 TS_{A-2} 的反应能垒为 15.49 kcal/mol, 而 TS_{C-2} 的反应能垒为 2.82 kcal/mol, 后者能垒较低, 表明反应 TS_{C-2} 更容易发生。在路径 B 中设计了互变异构化反应 TS_{B-2} 但其能垒高达 43.04 kcal/mol, 能垒较高, 不容易发生反应。在路径 C 经过过渡态 TS_{C-1} 生成中间体 IC_{C-1} 后, 经过过渡态 TS_{D-2} , 由 H₂O 作为质子转移通道生成羟基



a. 气相条件下的势能曲线; b. 氯苯条件下的势能曲线; c. 乙腈条件下的势能曲线

图 3 M062X/6-311+G(3df,2p)//M062X/6-31+G(d,p) 水平计算所得 FADH⁻ 介导 Q₃PA 还原反应势能曲线

Fig.3 Energy profile of the reduction of Q₃PA mediated by FADH⁻ calculated at M062X /6-311+G(3df,2p)// M062X /6-31+G(d,p) theoretical level

化产物 IC_{A-1} 的反应能垒是 26.15 kcal/mol, 高于过渡态 TS_{A-1} 的反应能垒, 表明中间体 IC_{A-1} 的生成更倾向于经过路径 A。在生成中间体 IC_{C-2} 后经过过渡态 TS_{C-3} 由 H₂O 介导质子转移, 其能垒为 29.53 kcal/mol, 高于过渡态 TS_{A-2} 的能垒, 表明 IC_{A-2} 更倾向于通过路径 A 中的过渡态 TS_{A-2} 生成。结果表明, 虽然过渡态 TS_{C-2} 的能垒比过渡态 TS_{A-2} 的能垒低 12.67 kcal/mol, 但是路径 A 中的过渡态 TS_{A-1} 的能垒比过渡态 TS_{C-1} 的能垒低 15.67 kcal/mol 且只需要两步反应。总体来说, 路径 A 为 Q₃PA 双电子还原的优势路径, 过渡态 TS_{A-3} 为其控速步骤, 反应能垒为 30.96 kcal/mol。为了模拟酶体系中的反应环境, 采用 SMD 隐式溶剂模型在氯苯和乙腈两种不同介质中计算了各驻点的能量, 结果表明在溶剂中反应的能量变化趋势与气相中是一致的。

表 1 FADH⁻ 介导的 Q₃PA 还原反应的相对能量 (E)、焓 (H) 和吉布斯自由能 (G) 注

Tab.1 Relative energies (E), enthalpies (H) and Gibbs free energies (G) for the reduction of Q₃PA mediated by FADH⁻ (kcal/mol)

Summary of energetics	$E_{0K}^{1)}$	$E_{298K}^{1)}$	$H_{298K}^{2)}$	$G_{298K}^{3)}$	$G^{4)}$	
					Chlorobenzene	Acetonitrile
RC	0	0	0	0	0	0
TS _{A-1}	9.52	8.78	8.78	10.57	14.76	15.93
IC _{A-1}	5.32	5.05	5.05	5.1	5.5	5.18
TS _{A-2}	20.1	19.73	19.73	20.58	16.24	14.28
IC _{A-2}	2.72	3.02	3.02	1.75	-0.91	-1.49
TS _{B-1}	35.6	34.91	34.91	36.6	36.7	36
IC _{B-1}	27.45	27.27	27.27	26.6	24.41	22.98
TS _{B-2}	70.81	71	71	69.64	63.39	60.51
IC _{B-2}	20.1	20.5	20.5	18.7	7.96	3.56
TS _{C-1}	23.51	22.51	22.51	26.24	40.91	42.02
IC _{C-1}	14.9	14.29	14.29	16.66	19.57	19.73
TS _{C-2}	18.13	17.65	17.65	19.48	25.68	26.97
IC _{C-2}	7.98	8.16	8.16	8.86	15.65	17.09
TS _{C-3}	36.3	35.44	35.44	38.4	44.66	45.57
IC _{C-3}	-1.8	-1.48	-1.48	-0.91	4.79	5.57
TS _{D-2}	39.96	38.45	38.45	42.81	48.1	48.7
IC _{D-2}	5.25	4.88	4.88	6.74	10.67	10.61
TS _{E-3}	60.09	60.14	60.14	61.42	67.7	69.17
IC _{E-3}	-3.85	-3.79	-3.79	-2.26	3.45	4.38
TS _{A-3}	32.73	32.54	32.54	32.71	27.42	25.72
PC	-10.25	-9.18	-9.18	-12.28	-14.03	-13.79

注：1) 在 M062X/6-31+G(d,p)水平上计算的气相中各驻点相对能量；2) 在 M062X/6-31+G(d,p)水平上计算的气相中各驻点的焓；3) 在 M062X/6-31+G(d,p)水平上计算的气相中各驻点的吉布斯自由能；4) 在 SMD-M062X/6-311+G(3df,2p)/M062X/6-31+G(d,p)水平上计算的不同溶剂模型中各驻点的吉布斯自由能。

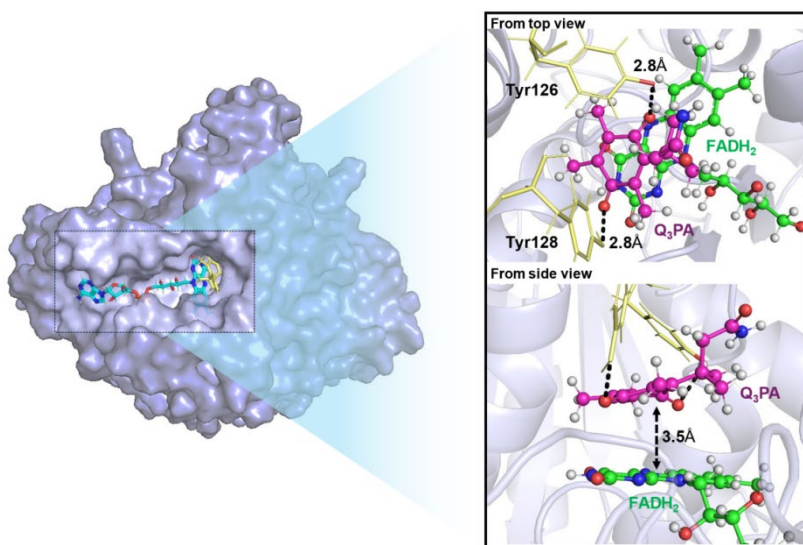
2.2 Q₃PA 与 NQO1 蛋白的相互作用

图 4 为经分子对接得到的 Q₃PA 与 NQO1 的复合物结构。结果表明，Q₃PA 进入了 NQO1 蛋白的活性口袋，底物对苯醌部分平行于 FADH₂ 的异咯嗪环，形成了 π - π 堆积。Q₃PA 两侧的羰基和酪氨酸残基 (Tyr126 和 Tyr128) 分别形成了一个氢键，酪氨酸残基芳香环与配体疏水区域形成疏水夹心结构，协同氢键作用进一步稳定了配体在酶活性中心的结合。FADH₂ 与配体的紧密接触有利于调节电子传递路径，或通过空间位阻效应影响底物进入活性位点的取向，从而参与催化反应的调控^[27]。值得注意的是 Q₃PA 与 FADH₂ 异咯嗪环的 N5 位距离 3.5Å。Fraaije 等^[28]报导在配体与黄素的异咯嗪环发生 π - π 堆积时，还原位点通常距离黄素的 N5 位 3.5Å 左右，这与本文分子对接得到的结果相吻合。

Q₃PA-NQO1 复合物活性中心底物、氨基酸残基及辅酶之间相互作用的二维模型分析如图 5A 所示。除了上文中提到的形成了两个氢键，底物与酶活性中心之间还存在多种相互作用：Tyr126 与 Q₃PA 之间存在 Pi-Sigma 相互作用；FADH₂ 不仅与 Q₃PA 形成 π - π 堆积，还与其形成烷基相互作用；此外，多个氨基酸残基与底物形成烷基相互作用，包括 Pro68、Trp105、Phe106、Tyr128、His161 和 Phe178。本文还对 Q₃PA 与 NQO1 活性中心的疏水相互作用进行了分析。如图 5B 所示，辅酶 FADH₂ 与底物之间存在明显的疏水相互作用，已有研究表明 FADH₂ 的异咯嗪环被 His161、Tyr126 和 Tyr128 等残基包裹，通过疏水作用维持其在疏水口袋中的结合^[14]。多个氨基酸残基参与了与底物之间的疏水相互作用，包括 Trp105、Phe106、Tyr126、Tyr128、

His161 和 Phe178。这些残基中的苯环结构常通过 π - π 堆积和疏水作用参与稳定局部构象。总之，上述这些结构特点确保了底物能够稳定的结合于酶

活性中心，进而与辅酶相互靠近并发生多步还原反应。



右图为从分子对接的俯视图与侧视图，其中 Q₃PA 用紫色显示，与配体形成氢键的残基用黄色显示，FADH₂ 用绿色显示，氢键相互作用用黑色虚线表示，距离以 Å 为单位

图 4 Q₃PA 与 NQO1 酶分子对接的结构

Fig.4 Structure of molecular docking of Q₃PA and NQO1 enzyme

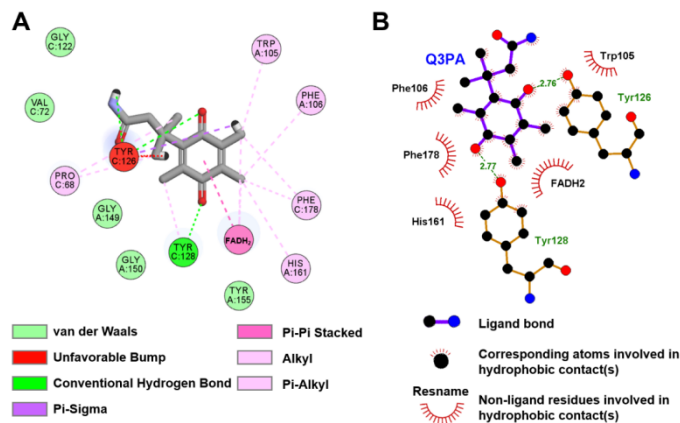


图 5 Q₃PA 与 NQO1 酶的二维模型分析图 (A) 和 Q₃PA 与 NQO1 酶的疏水相互作用分析图 (B)

Fig.5 2D model analysis of Q₃PA and NQO1 enzyme (A) and Hydrophobic interaction analysis of Q₃PA and NQO1 enzyme (B)

3 结论

本文对 NQO1 催化 Q₃PA 还原的机制进行了研究。首先，采用 DFT 方法探讨了 Q₃PA 在辅酶 FADH₂ 的作用下最终还原为相应的对氢醌结构并通过内酯化释放氨气的反应机理，明确了反应过程中的分子结构和能量变化趋势。结果表明，Q₃PA 首先接受来自 FADH₂ 的 2e⁻/1H⁺生成半醌中间体 IC_A-

1，然后对侧醛基接受来自组氨酸残基的 1H⁺生成对氢醌中间体 IC_A-2，最后经过内酯化反应生成产物。然后，通过分子对接探讨了 Q₃PA 与 NQO1 酶蛋白之间的相互作用，发现底物与酶活性中心通过氢键、疏水相互作用、 π - π 堆积等形成了紧密结合的复合物。总之，本文为阐明以 Q₃PA 为响应基团的 HAP 的靶向作用机制提供了理论依据，对设计开发新型靶向性抗肿瘤药物具有参考价值。

参考文献:

- [1] Hunter F W, Wouters B G, Wilson W R. *Br. J. Cancer*, 2016, **114**(10): 1071-1077.
- [2] Anduran E, Dubois L J, Lambin P, Winum J Y. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2022, **32**(1): 1-12.
- [3] Yu C S, Ouyang H G, Hu B, Weng Z B, Li Y Y. *Prog. Pharm. Sci.*, 2012, **36**(2): 65-72.
- 余长顺, 欧阳洪贵, 胡斌, 翁志斌, 李玉艳. *药学进展*, 2012, **36**(2): 65-72.
- [4] Mendoza M F, Hollabaugh N M, Hettiarachchi S U, McCarley R L. *Biochemistry*, 2012, **51**(40): 8014-8026.
- [5] Navarro F, Arroyo A, Martín S F, Bello R I, Cabo R, Burgess J R, Navas P, Villalba J M. *BioFactors*, 1999, **9**(2/3/4): 163-170.
- [6] Siegel D, McGuinness S M, Winski S L, Ross D. *Pharmacogenetics*, 1999, **9**(1): 113-122.
- [7] Winski S L, Koutalos Y, Bentley D L, Ross D. *Cancer Res.*, 2002, **62** (5): 1420-1424.
- [8] Siegel D, Ross D. *Free. Radic. Biol. Med.*, 2000, **29**(3/4): 246-253.
- [9] Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S, Margetts J P, Edmondson R J, Leung H Y, Knox R, Boddy A V. *Clin. Cancer Res.*, 2007, **13**(5): 1584-1590.
- [10] Danson S, Ward T H, Butler J, Ranson M. *Cancer Treat. Rev.*, 2004, **30**(5): 437-449.
- [11] Colucci M A, Couch G D, Moody C J. *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**(4): 637-656.
- [12] Volpato M, Abou-zeid N, Tanner R W, Glassbrook L T, Taylor J, Stratford I, Loadman P M, Jaffar M, Phillips R M. *Mol. Cancer Ther.*, 2007, **6**(12): 3122-3130.
- [13] Weerapreeyakul N, Anorach R, Khuansawad T, Yenjai C, Isaka M. *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, **55**(6): 930-935.
- [14] Zhang X, Li X, Li Z H, Wu X S, Wu Y, You Q D, Zhang X J. *Org. Lett.*, 2018, **20**(12): 3635-3638.
- [15] Qu Y, Zhang C, Ma X, Gao Y H, Liu J, Wu L Q. *Bioorg. Med. Chem.*, 2020, **28**(24): 115821.
- [16] Zhang C, Qu Y, Ma X, Li M P, Li S, Li Y, Wu L Q. *Bioorg. Chem.*, 2020, **103**: 104200.
- [17] Park J, Jo S, Lee Y M, Saravanakumar G, Lee J, Park D, Kim W J. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, **13**(7): 8060-8070.
- [18] Curtolo F, Arantes G M. *J. Chem. Inf. Model.*, 2020, **60**(12): 6282-6287.
- [19] Song J C, Zheng D W, Wang S B, Wang J J, Sun G H, Zhang N, Zhao L J, Zhong R G. *Chem. Reagents*, 2022, **44**(11): 1598-1604.
- 宋佳宸, 郑大威, 王圣博, 王娇娇, 孙国辉, 张娜, 赵丽娇, 钟儒刚. *化学试剂*, 2022, **44**(11): 1598-1604.
- [20] Wang S B, Wang J J, Ren T, Sun G H, Zhang N, Zhao L J, Zhong R G. *Chem. Reagents*, 2023, **45**(9): 29-37.
- 王圣博, 王娇娇, 任婷, 孙国辉, 张娜, 赵丽娇, 钟儒刚. *化学试剂*, 2023, **45**(9): 29-37.
- [21] Goerigk L, Grimme S. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**(14): 6670.
- [22] Huang W J, Gherib R, Gauld J W. *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**(30): 8916-8929.
- [23] Isaev A N. *Russ. J. Phys. Chem.*, 2003, **77** (11): 1821-1826.
- [24] Voehringer-martinez E, Hernandez-soto H. *Science*, 2007, **316** (5825): 691-691.
- [25] Liu K R, Badamdorj B, Yang F, Janik M J, Antonietti M. *Appl. Catal. B Environ.*, 2022, **316**: 121641.
- [26] Liu M L, Song W, Du X, Su J T, Dong K, Chen Y, Peng Z H. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2018, **9**(12): 1253-1257.
- [27] Dourado D F A R, Swart M, Carvalho A T P. *Chem*, 2018, **24**(20): 5246-5252.
- [28] Fraaije M W, Mattevi A. *Trends Biochem. Sci.*, 2000, **25**(3): 126-132.