

A Review of Studies on Urease Inhibitors

Xiaojing Wu, Rui Shi, Wanchun Nie, Xiaolin Zhang, Jie Qin*

School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo Shandong
Email: *295722387@qq.com

Received: Nov. 20th, 2018; accepted: Dec. 5th, 2018; published: Dec. 12th, 2018

Abstract

Urea in soil can be decomposed into ammonia under the action of urease, which reduces the utilization rate of nitrogen. Urease in human body causes various diseases. The structure of urease active centers from different sources and the binding modes of several inhibitors with active centers are introduced. The urease inhibitors of metal ions, hydroxamic acids, phosphoramides, phosphates, heterocyclic compounds and metal complexes are reviewed; the problems and prospect are put forward.

Keywords

Urease, Urease Active Center, Urease Inhibitor

脲酶抑制剂的研究综述

吴孝婧, 石蕊, 聂琬纯, 张晓琳, 秦洁*

山东理工大学, 生命科学学院, 山东 淄博
Email: *295722387@qq.com

收稿日期: 2018年11月20日; 录用日期: 2018年12月5日; 发布日期: 2018年12月12日

摘要

土壤中的尿素在脲酶的作用下能够被分解为氨气, 致使氮利用率降低, 人体中的脲酶会引起各种疾病。本文介绍了不同来源的脲酶活性中心的结构及若干抑制剂与活性中心的结合方式, 综述了金属离子类、羟肟酸类、磷酰胺类、磷酸盐类、杂环化合物、金属配合物等脲酶抑制剂的研究进展和存在的问题。

关键词

脲酶, 脲酶活性中心, 脲酶抑制剂

*通讯作者。



1. 引言

脲酶是一种含镍的寡聚酶，它普遍存在于细菌、真菌、动物以及人体中，相比在无催化剂的条件下，它能够以 10^{14} 倍的速率催化尿素分解为二氧化碳和氨气。在农业上，土壤中的脲酶可以分解尿素，从而降低了植物对含氮化合物的利用率，同时释放出来大量的氨气，对环境造成了损害例如土壤污染和水体富营养化[1] [2]；在医学上，菌类来源的脲酶与一些临床症状比如肾盂肾炎、肝昏迷、消化溃疡和感染引起的尿结石的发病机理有着密不可分的关系[3] [4]；在畜牧业方面，在反刍动物的生产过程中，利用非蛋白氮(尿素)喂养反刍动物能够缓解蛋白饲料紧缺的问题；在动物体内，尿素被微生物源的脲酶分解为氨，然后再与有效酮酸结合生成氨基酸并进一步合成蛋白质，但是由于脲酶分解尿素的速率比动物吸收的速率快，体内挥发性氨会造成动物的氨中毒，甚至引起死亡[5]。由于脲酶催化尿素带来的一系列的问题，不少研究人员和学者一直致力于对脲酶抑制剂的开发和研究。

2. 脲酶结构与抑制剂的结合方式

脲酶在动物植物微生物中均存在，然而不同来源的脲酶在单体结构，数目与类型上均有差异，但脲酶的氨基酸序列却有高度的保守性(相似性在 50%以上) [6] [7]，经过 X-单晶衍射对巴氏杆菌脲酶进行结构分析，脲酶的活性中心有两个镍离子，它们的距离通常在 $3.5\text{\AA}\sim 3.7\text{\AA}$ 。Ni1 为五配位的准四方锥构型，Ni2 是六配位的准八面体构型。活性中心的两个镍离子分别与赖氨酸的两个 O 原子配位，Ni1 与两个组氨酸(His136、His138)的 N 和一分子 H_2O (w1)进行配位，Ni2 通过 N 与两个组氨酸(His248、His274)、一分子 H_2O (w2)配位的同时又与一个天冬氨酸(Asp362)相互作用。不同的抑制剂与脲酶的活性中心的结合方式不同(图 1) [8]。

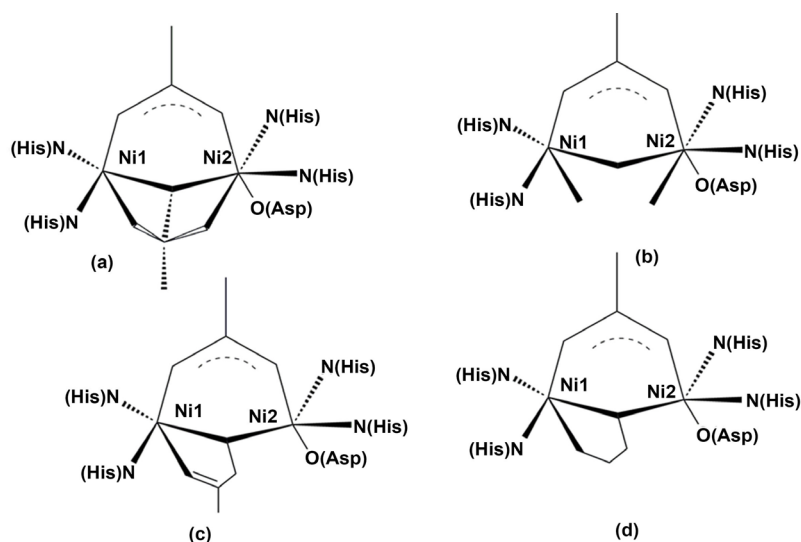


Figure 1. Schemes for active site Ni coordinations of ureases. (a) Phosphate inhibited Jack bean urease; (b) Native BPU; (c) AHA inhibited BPU; (d) BME inhibited BPU

图 1. 脲酶活性中心镍离子的配位情况。(a) 磷酸盐抑制剑刀豆脲酶；(b) 野生型巴氏杆菌脲酶；(c) 乙酰氧肟酸抑制巴氏杆菌脲酶；(d) 巯基乙醇抑制巴氏杆菌脲酶

3. 脲酶抑制剂的种类

3.1. 重金属离子类

脲酶对微量的金属离子是十分敏感的,有许多关于过渡金属离子抑制脲酶活性的报导, J. B. Sumner [9]等人发现重金属离子能够使高纯化的脲酶蛋白失活, Ambrose [10]团队报道了关于银离子抑制脲酶活性的研究, SHAW 等人的研究表明过渡金属离子能够与脲酶活性中心部位的巯基反应,从某种意义上讲,与形成硫化物相似。

3.2. 羟肟酸类

在 Kobashi K. [11]等人的研究发现羟肟酸是一种特异性并且很高效的脲酶抑制剂,这些抑制剂能够与脲酶活性位点的巯基基团结合。在对来自于日本的剑刀豆脲酶抑制活性研究当中,乙酰氧肟酸的 K_i 大约为 2.2×10^{-7} M, -CONHOH 是作为脲酶抑制剂的一个不可缺少的基团,羟肟酸对脲酶的抑制程度也跟酰基连接的基团有着密切的关系。

Fishbein 和 Carbone [12]在洋刀豆和茵源脲酶的研究中,羟肟酸可以作为一种潜在的非竞争性抑制的脲酶抑制剂,后来又被发现羟肟酸及其衍生物是可逆的,慢结合(数小时)抑制剂。Benini [13]利用 X 射线衍射技术,在 1.55\AA 分辨率下得到了杆菌脲酶与 AHA 的结合模型。Mishra [14]对二肽氧肟酸抑制幽门螺旋杆菌进行了一个分子立场的比较分析,在三维结构和抑制活性的关系提出了自己的见解。Fishbein W. N. 等人[12]试图将乙酰氧肟酸用于临床治疗肝昏迷,该方法是将乙酰氧肟酸用不同的给药方式注入体内水解 ^{14}C 标记的尿素产生二氧化碳,通过测量产生的 $^{14}\text{CO}_2$ 来评价乙酰氧肟酸的抑制效果,实验的数据表明,不论是从口腔注射,皮下注射还是腹膜,乙酰氧肟酸在体内都是一个很好的抑制尿素分解的药物。Griffith D. P. [15]等人研究发现乙酰氧肟酸在治疗由脲酶分解杆菌引起的泌尿系统感染疾病上有着潜在的应用价值,乙酰氧肟酸被应用于尿素分解杆菌引起的泌尿系统感染可以减小感染有机体的致病性,同时还可以防止泌尿结的形成或者溶解结石。Phillips [16]等人研究了乙酰氧肟酸对幽门螺旋杆菌的杀菌抑菌作用,并发现了乙酰氧肟酸与抗菌药物作用于幽门螺旋杆菌的相互作用。在对八个菌株进行测试,乙酰氧肟酸的存在能够降低四环素、甲硝唑、阿莫西林、胶态果胶铋的 MIC,在体外测试,乙酰氧肟酸与其他抗菌药物连用,同样有着抗菌的活性。Kosikowska P. [17]对脲酶抑制剂,其中包括羟肟酸及其衍生物的专利进行了回顾整理。

3.3. 磷酰胺型抑制剂

磷酰胺型脲酶抑制剂有许多种[18] N-丁基硫代磷酰三胺(NBPT)、环乙基磷酸三酰胺(CNPT)、硫代磷酰三胺(TPT)、磷酰三胺(PT)等。有报道磷酸氨对脲酶是可逆性抑制, $K_i = 1.9$ Mm,解离速率为 $8.4 \times 10^{-4}/\text{sec}$ [19]正丁基硫代磷酰三胺(NBPT)是一种高效的土壤脲酶抑制剂,在农业畜牧业有着广泛的作用,它可以与硝化抑制剂联用达到氮素流失分解的目的,同时又可以与尿素混合使用,能够增加肥料中氮素的利用率,是减肥增效的一个重要的措施。在 NBPT 被发现之前许多科研工作者[20]对大量的抑制剂进行了测试,虽然起到了一定的抑制效果,但是由于其低效,药效短,稳定性差等原因而不能广泛使用,值得注意的是, NBPT 以非常低的浓度在混在尿素里面表现出很好的效果[21]。

尽管在实验室研究当中,脲酶具有抑制脲酶分解尿素的作用,但是在牧场的环境条件下来测试脲酶抑制剂的活性比较少见, D. B. Parker 等人测试脲酶抑制剂 NBPT 在饲料厂牛棚的条件下减少 NH_3 排放的效果,6个棚圈分别以 0、1、2、4、8、40 Kg/ha NBPT 的量作用 42 天,实验结果表明氨气排放成对数正态分布,剂量为 2、40 Kg/ha 分别比对照组多出 9%和 20%的总氮。

Bremner 和 Chai [22]发现 NBPT 能够显著降低各种土壤中尿素的水解速率,当含有 NBPT: 尿素的质量比为 0.46%的混合物在 30℃ 的温度下进行培养时,尿素水解速率的减小促使了 NH_3 流失的大大减少[23]。

3.4. 磷酸盐脲酶抑制剂

1949 年,研究者报道了磷酸盐抑制洋刀豆脲酶属于竞争性抑制[24],磷酸盐竞争性抑制克氏杆菌脲酶跟环境的 pH 有关,尤其是在较低的 pH 值[25],但是 pH 依赖性的抑制类型没有在植物源脲酶中得到证实。

3.5. 杂环类化合物

苯丙咪唑类化合物是一类被广泛应用于质子泵抑制剂的药物,苯丙咪唑类药物能够抑制强烈胃分泌,它们(奥美拉唑、兰索拉唑、雷贝拉唑)能够治疗和防治十二指肠溃疡和消化道溃疡、胃食管反流病、幽门螺旋杆菌感染[26],T. C. Kühler [27]等人的研究表明,奥美拉唑以及类似物能够作为脲酶抑制剂,是因为它能够在胃的酸性环境中转化成次磺酰胺,能够与脲酶活性中心的金属以及半胱氨酸残基作用,从而在活性中心形成了一个空间位阻。另一种脲酶抑制剂是含有硝基咪唑基团衍生物的药物,它们是抗菌和抗原生动物的药物[28]。

3.6. 金属配合物

氮杂环有着良好的配位能力,能够与金属离子进行自组装,可以作为一类配合物脲酶抑制剂进行研究,小分子化合物和金属离子结合能够更好地发挥脲酶抑制效果。秦洁[29]团队研究了基于脲配体的单核 Cu(II)配合物的生物学特征,并发现配合物显示出对脲酶具有显著的抑制潜力。钱绍松[30]等人报道关于新型过渡金属配合物与配体的合成,动力学研究表明,配合物是脲酶的竞争性抑制剂,具有强的白蛋白结合特性,对正常细胞具有低毒性,可作为良好的有效脲酶抑制剂候选物。金属离子通过自组装反应制备的配合物具有较好脲酶抑制活性。

4. 结语

综上所述,脲酶抑制剂种类很多,作用效果也有所不同。就目前来看,对磷酸盐型抑制剂中的 NBPT 研究最多,其也具有低浓度效果。但对金属配合物的研究发现其具有较好脲酶抑制活性,因此对于金属配合物类的脲酶抑制剂的研究前景十分广阔。

国内外许多研究者已经对脲酶抑制剂有了很长时间的研究,许多脲酶抑制剂也已经投入生产并推广。可现实却是,在农业方面,仅仅有一部分抑制剂在防止氮素流失上表现出可观的前景,研究最多的是 NBPT;在医药行业,乙酰氧脲酸及其衍生物因其表现出能够不同程度地抑制脲酶活性而被广泛地研究与应用,但它作为药物应用时也存在许多副作用。由于目前可用的脲酶抑制剂有着低效率和副作用的缺点,继续广泛地去探索与开发潜在脲酶抑制剂,不仅对农业方面有着重要意义,医学行业的研究人员对其也有着极大的兴趣。

参考文献

- [1] Ervin, G.N. and Wetzel, R.G. (2003) An Ecological Perspective of Allelochemical Interference in Land-Water Interface Communities. *Plant and Soil*, **256**, 13-28. <https://doi.org/10.1023/A:1026253128812>
- [2] Gross, E.M. and Sütfield, R. (1993) Polyphenols with Algicidal Activity in the Submerged Macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, **381**, 710-716.
- [3] Collins, C.M. and D'Orazio, S.E.F. (1993) Bacterial Ureasases: Structure, Regulation of Expression and Role in Pathogenesis. *Molecular Microbiology*, **9**, 907-913. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01220.x>

- [4] Mora, D. and Arioli, S. (2014) Microbial Urease in Health and Disease. *PLoS Pathogens*, **10**, Article ID: 1004472. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004472>
- [5] 周延州, 周献民, 陈安国. 脲酶抑制剂在家禽生产中的研究进展[J]. 中国家禽, 2005, 27(14): 49-51.
- [6] Dixon, N.E., Hinds, J.A., Fihelly, A.K., *et al.* (1980) Jack Bean Urease (EC 3.5. 1.5). IV. The Molecular Size and the Mechanism of Inhibition by Hydroxamic Acids. Spectrophotometric Titration of Enzymes with reversible Inhibitors. *Canadian Journal of Biochemistry*, **58**, 1323-1334. <https://doi.org/10.1139/o80-180>
- [7] Das, N., Kayastha, A.M. and Srivastava, P.K. (2002) Purification and Characterization of Urease from Dehusked Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Seeds. *Phytochemistry*, **61**, 513-521. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00270-4)
- [8] Jabri, E., Carr, M.B., Hausinger, R.P., *et al.* (1995) The Crystal Structure of Urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science*, **268**, 998. <https://doi.org/10.1126/science.7754395>
- [9] Sumner, J.B. and Howell, S.F. (1936) Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *Journal of Bacteriology*, **32**, 227.
- [10] Ambrose, J.A. and Barua, R.S. (2004) The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease: An Update. *Journal of the American College of Cardiology*, **43**, 1731-1737. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.12.047>
- [11] Kobashi, K., Hase, J. and Uehara, K. (1962) Specific Inhibition of Urease by Hydroxamic Acids. *Biochimica et biophysica acta*, **65**, 380. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)91067-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)91067-3)
- [12] Fishbein, W.N. and Carbone, P.P. (1965) Urease Catalysis II. Inhibition of the Enzyme by Hydroxyurea, Hydroxylamine, and Acetohydroxamic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, **240**, 2407-2414.
- [13] Benini, L. and DeMicheli, G. (2012) Dynamic Power Management: Design Techniques and CAD Tools. Springer Science & Business Media, Berlin.
- [14] Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M.M., Ma, Q., Kelly, C., Mori, K., *et al.* (2005) Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Biomarker for Acute Renal Injury after Cardiac Surgery. *The Lancet*, **365**, 1231-1238. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74811-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74811-X)
- [15] Griffith, D.P., Musher, D.M. and Itin, C. (1976) The Primary Cause of Infection-Induced Urinary Stones. *Investigative Urology*, **13**, 346-350.
- [16] Phillips, J.M. and Hayman, D.S. (1970) Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. *Transactions of the British Mycological Society*, **55**, 158-161. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- [17] Kosikowska, P. and Berlicki, L. (2011) Urease Inhibitors as Potential Drugs for Gastric and Urinary Tract Infections: A Patent Review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **21**, 945-957.
- [18] 傅丽, 苏壮, 石元亮, 王玲莉, 李梦娟, 赛丹. 脲酶抑制剂(NBPT)与不同硝化抑制剂组合对土壤尿素氮转化的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2010, 41(3): 339-341.
- [19] 周旋, 吴良欢, 戴锋, 董春华. 生化抑制剂组合与施肥模式对黄泥田稻季氨挥发的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008(2): 399-408.
- [20] 何威明, 保万魁, 王旭. 氮肥增效剂及其效果评价的研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2011(3): 7.
- [21] 尤洪星, 庄文明, 李秀芹, 朱孔杰. 脲酶抑制剂 NBPT 的研究综述[J]. 河南化工, 2016, 33(4): 18-20.
- [22] Chai, H.S. and Bremner, J.M. (1987) Evaluation of Some Phosphoroamides as Soil Urease Inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, **3**, 189-194. <https://doi.org/10.1007/BF00640628>
- [23] 杨杉, 吴胜军, 王雨, 周文佐, 程辉, 叶飞, 黄平. 三峡库区农田氨挥发及其消减措施研究进展[J]. 土壤, 2014, 46(5): 773-779.
- [24] Todd, M.J. and Hausinger, R.P. (1989) Competitive Inhibitors of *Klebsiella Aerogenes* Urease. Mechanisms of Interaction with the Nickel Active Site. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 15835-15842.
- [25] Krajewska, B. and Zaborska, W. (1999) The Effect of Phosphate Buffer in the Range of pH 5.80-8.07 on Jack Bean Urease Activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **6**, 75-81.
- [26] Dajani, E.Z. and Klamut, M.J. (2000) Novel Therapeutic Approaches to Gastric and Duodenal Ulcers: An Update. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **9**, 1537-1544. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.7.1537>
- [27] Kuhler, T.C., Fryklund, J., Bergman, N., Fryklund, J., Bergman, N.K., Weilitz, J., Lee, A. and Larsson, H. (1995) Structure-Activity Relationship of Omeprazole and Analogs as *Helicobacter pylori* Urease Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **38**, 4906-4916. <https://doi.org/10.1021/jm00025a008>
- [28] Silva, A., Munhoz, A., Santos, J., *et al.* (2009) Antibacterial and/or Antiprotozoal Nitromidazole Derivative Compounds with Urease Inhibitor Activity, Process for Preparing These Compounds and Use in Pharmaceutical Compositions and Medicines. U.S. Patent 7,608,724. 2009-10-27.

-
- [29] Qin, J., Zhao, S.-S., Liu, Y.-P., Man, Z.-W., Wang, P., Wang, L.-N., Xu, Y. and Zhu, H.-L. (2016) Preparations, Characterization, and Biological Features of Mononuclear Cu (II) Complexes Based on Hydrazone Ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **26**, 4925-4929. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.09.015>
- [30] Chen, Z.-J., Chen, Y.-N., Xu, C.-N., Zhao, S.-S., Cao, Q.-Y., Qian, S.-S., Qin, J. and Zhu, H.-L. (2016) Synthesis, Crystal Structures, Molecular Docking, and *in Vitro* Biological Activities Evaluation of Transition Metal Complexes with 4-(3, 4-dichlorophenyl) Piperazine-1-Carboxylic Acid. *Journal of Molecular Structure*, **1117**, 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.03.084>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2331-8287, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjmce@hanspub.org