

· 综 述 ·

## 二氢乳酸脱氢酶的结构特征和催化循环研究进展

任小利<sup>1</sup>, 罗芬<sup>2</sup>, 李希希<sup>1</sup>, 易莎<sup>1</sup>, 杨兵<sup>1</sup>, 江志勇<sup>1</sup>

1 重庆化工职业学院 环境与质量检测学院 食品药品教研室, 重庆 401228

2 陆军军医大学 大坪医院 野战外科研究所, 重庆 400042

任小利, 罗芬, 李希希, 等. 二氢乳酸脱氢酶的结构特征和催化循环研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2732-2740.  
Ren XL, Luo F, Li XX, et al. Structural characteristics and catalytic cycle of dihydroorotate dehydrogenase—a review. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2732-2740.

**摘要:** 二氢乳酸脱氢酶是黄素依赖的线粒体酶, 它催化嘧啶从头合成的第4步反应, 将二氢乳酸氧化为乳酸。通过选择性抑制二氢乳酸脱氢酶, 从而抑制嘧啶的合成, 已被开发用于治疗癌症、自身免疫性疾病、细菌或病毒感染以及寄生虫疾病等。抑制剂的开发需详细了解二氢乳酸脱氢酶的结构特征和催化循环机制。因此, 文中主要从这两个方面进行了综述, 并展望了该酶的抑制剂在临床应用中的前景。

**关键词:** 二氢乳酸脱氢酶, 结构特征, 催化循环, 类风湿性关节炎, 新型冠状病毒

## Structural characteristics and catalytic cycle of dihydroorotate dehydrogenase—a review

Xiaoli Ren<sup>1</sup>, Fen Luo<sup>2</sup>, Xixi Li<sup>1</sup>, Sha Yi<sup>1</sup>, Bing Yang<sup>1</sup>, and Zhiyong Jiang<sup>1</sup>

1 Food and Drug Teaching and Research Department, School of Environment and Quality Testing, Chongqing Chemical Industry Vocational College, Chongqing 401228, China

2 Research Institute of Surgery and Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

**Abstract:** Dihydroorotate dehydrogenase is a flavin-dependent mitochondrial enzyme to catalyze the fourth step of the *de novo* synthesis of pyrimidine and to oxidize dihydroorotate to orotate. By selectively inhibiting dihydroorotate dehydrogenase, thereby inhibiting pyrimidine synthesis, the enzyme has been developed for the treatment of cancer, autoimmune diseases, bacterial or viral infections, parasitic diseases and so on. The development of inhibitory drugs requires a detailed understanding of the structural characteristics and catalytic cycle mechanism of dihydroorotate dehydrogenase. Therefore, this paper reviews these two aspects, and indicates perspectives of these inhibitors in clinical application.

**Keywords:** dihydroorotate dehydrogenase, structure characteristics, catalytic cycle, rheumatoid arthritis, novel coronavirus

**Received:** March 27, 2020; **Accepted:** July 14, 2020

**Supported by:** Science and Technology Research Project of Chongqing Education Commission (No. KJQN202004503).

**Corresponding authors:** Xiaoli Ren. Tel/Fax:+86-23-81886076; E-mail: Xiaoliren628@163.com  
Bing Yang. Tel/Fax:+86-23-81886076; E-mail: 776021761@qq.com

重庆市教育委员会科学技术研究项目 (No. KJQN202004503) 资助。

网络出版时间: 2020-08-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200812.1048.006.html>

二氢乳清酸脱氢酶 (Dihydroorotate dehydrogenase, DHODH) 是一种含铁的黄素依赖的线粒体酶, 它主要存在于线粒体内膜上, 是嘧啶核苷酸从头合成途径第 4 步的关键酶, 它能催化氧化二氢乳清酸, 使其脱氢转变为乳清酸。抑制 DHODH 则可阻止 DNA、RNA、糖蛋白的合成, 从而调节细胞的异常代谢和增殖, 最终达到治疗疾病的目的<sup>[1]</sup>。近年来, DHODH 已被确认为多种疾病的治疗靶点, 如类风湿性关节炎、多发性硬化症、癌症、病毒性感染等<sup>[2-9]</sup>。近期有研究发现 DHODH 抑制剂可抑制新型冠状病毒, 主要通过抑制病毒复制和调节免疫两种途径发挥广谱抗病毒药效, DHODH 抑制剂也有望成为抗新型冠状病毒的候选药<sup>[10]</sup>。充分了解酶的结构特征和催化循环机制有助于更好地开发抑制剂, 因此, 本文就这两个方面作一综述, 希望能对后续抑制剂的开发提供帮助。

## 1 DHODH 的结构特征

二氢乳清酸脱氢酶分为两大家族, 第一家族和第二家族, 第一家族又分为 1A 类、1B 类、1S 类。1A 类是由 *pyrD* 基因编码的同源二聚体蛋白, 位于细胞溶质中, 可在革兰氏阳性细菌中发现<sup>[11]</sup>。1B 类是一种异二聚体的二聚体, 由 *pyrD* 和 *pyrK* 基因编码的两种不同蛋白质组成, 位于细胞溶质中, 普遍存在于革兰氏阳性细菌中<sup>[12]</sup>。1S 类是一种异聚酶, 由 *pyrD* 基因编码的催化亚单位和由 *orf* 基因编码的电子受体亚单位组成, 存在于古细菌硫化叶菌中, 目前四级结构仍不清楚<sup>[13]</sup>。第二家族是单体蛋白, 主要位于真核生物的线粒体内膜上<sup>[5]</sup>, 也有部分位于原核生物的细胞质膜上, 主要存在于人、褐家鼠、恶性疟原虫、大肠杆菌、结核杆菌中。

DHODH 单体的整体结构为典型的  $\alpha/\beta$  桶状折叠, 中心桶状结构由 8 条平行的  $\beta$  折叠和 8 条  $\alpha$  螺旋组成。在桶的底部有 2 条 N 端反平行  $\beta$  折叠 (图 1), 其余的二级结构和环在桶的顶部形成

一个子域, FMN 位于桶顶部和子域之间。

### 1.1 结构特征

在 1A 类同源二聚体中, 单体由非晶体双重折叠轴连接。二聚体界面通过疏水、亲水、堆积相互作用而稳定<sup>[14]</sup>(图 1A), 参与二聚体作用的残基显示出高度的序列一致性。1A 类 DHODH 的复合物晶体结构显示, 底物和产物结合在相同的活性位点, 该活性位点主要由 43 位的赖氨酸、67 位的天冬酰胺、69 位的甲硫氨酸、70 位的甘氨酸、71 位的亮氨酸、127/132/193 位的天冬酰胺、194 位的丝氨酸组成, 它们与底物或产物通过氢键相互作用。该活性位点现已被开发用于设计 1A 类特异性抑制剂, 如苯甲酸嘧啶类似物和乳清酸类似物<sup>[15]</sup>, 均为拮抗二氢乳清酸的竞争性抑制剂。

1B 类异四聚体 (DHODH<sub>B</sub>) 由两种不同蛋白质 (PyrD 和 PyrK) 的二聚体和 3 种不同的辅因子 (FAD、FMN 和 2Fe-2S 簇) 组成。PyrK 属于 NADPH 依赖的铁氧化还原蛋白还原酶超家族, 并组成 3 个结构域: FAD 结合结构域 (N 端结构域)、具有类似于铁氧化还原蛋白还原酶家族 NAD 结合结构域的  $\alpha/\beta$  结构域、2Fe-2S 簇结合结构域 (C 端结构域)。活性位点 FAD 的结合口袋主要由 15 个氨基酸组成, 分别是 52、53、72、223 位的精氨酸、56、222 位的丝氨酸、63 位的缬氨酸、64 位的丙氨酸、65 位的谷氨酸、70 位的亮氨酸、77、80 位的苏氨酸、79 位的甘氨酸、120 位的异亮氨酸、224 位的甲硫氨酸, FAD 通过氢键与水分子和氨基酸形成相互作用。1B 类 DHODH 解析的唯一晶体结构来自于乳酸乳球菌<sup>[16]</sup>(图 1B)。

第二家族的单体包含两个不同的结构域: 一个 N 端螺旋结构域和一个 C 端由  $\alpha/\beta$  桶组成的结构域 (图 1C)。大约 40 个残基的 N 端延伸折叠成两个  $\alpha$  螺旋, 由短环连接, 并与膜结合 (图 1C)。在除恶性疟原虫以外的高等真核生物中, 螺旋结构域之前还存在 20-50 个残基, 这些残基作为一种信号肽, 将 DHODH 靶向于线粒体。所有第二家族酶中存在的两个  $\alpha$  螺旋形成了通向活性位点的

通道,并被描述为第二家族 DHODH 抑制剂的靶位点<sup>[17]</sup>。该靶位点主要由以下氨基酸组成:47 位的谷氨酰胺、55 位的丙氨酸、136 位的精氨酸、360 位的苏氨酸与抑制剂形成氢键相互作用,38、356 位的酪氨酸、43、111 位的甲硫氨酸、52、364 位的脯氨酸、56 位的组氨酸、59 位的丙氨酸、63 位的苏氨酸、67、68、359 位的亮氨酸、98 位的苯丙氨酸、134 位的缬氨酸与抑制剂形成疏水相互作用。事实上,在对特立氟胺 (A771726) 的动力学研究表明,它是一种拮抗泛醌的竞争性抑制剂,也是拮抗二氢乳清酸的非竞争性抑制剂,这表明螺旋结构域也是第二种底物醌的结合位点,但到目前为止,还没有醌的复合物晶体结构来验证这一假说。螺旋结构域 ( $\alpha A$  和  $\alpha B$ ) 的高度可变性被用来设计第二家族 DHODH 的选择性抑制剂。例如, A771726 类似物抑制人二氢乳清酸脱氢酶比抑制恶性疟原虫二氢乳清酸脱氢酶 (*Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase, *pfDHODH*) 更有效<sup>[18]</sup>,而一系列的三唑嘧啶是 *pfDHODH* 的选择性抑制剂,包括 DSM265, 临床研究中第一个靶向 DHODH 的抗疟药<sup>[19]</sup>。

## 1.2 异同点

通过结构对比,发现不同类别的 DHODH 活性位点的相同点如下:(1) 两类 DHODH 中, FMN 和乳清酸都是平行的,它们与 DHODH 形成复杂且保守的氢键网络和疏水作用(图 2);(2) 虽然两个家族的序列同源性较低,但 FMN 和底物结合所涉及的大多数二级结构和残基在两类 DHODH 中都是保守的<sup>[15-17]</sup>。第二家族 DHODH 的 C 端结构域类似于第一家族 DHODH 的  $\alpha/\beta$  桶状折叠(图 1A 和 C),两个家族的不同点可区分第二家族和第一家族:(1) 第二家族的螺旋  $\eta 1$  位于桶的底部,而在第一家族中却被短环取代;(2) 在第一家族 DHODH 中有  $\beta e$ 、 $\beta f$ 、 $\beta g$ 、 $\beta h$  和螺旋  $\eta 1$  结构,而在第二家族却没有观察到此结构(图 1A 和 C),事实上,第一家族这种凸起的结构是

形成二聚体的主要原因,这种特征只在第一家族 DHODH 中观察到(图 1A)<sup>[15-17]</sup>。

充分了解 DHODH 抑制剂的结构特征和蛋白质活性口袋周围的氨基酸特点有助于抑制剂的结构优化,我们可根据氨基酸的亲水或疏水作用来对抑制剂进行改造设计,从而让抑制剂更好地与蛋白质结合,进而提高抑制剂的抑制能力和活性,最终达到有效治疗疾病的目的。

来氟米特又名爱若华,是第一个批准上市的人二氢乳清酸脱氢酶 (Human dihydroorotate dehydrogenase, *hDHODH*) 抑制剂,在临床上主要用于治疗类风湿性关节炎。该药是一个前体药物,在体内被代谢为特立氟胺 (A771726),特立氟胺与 *hDHODH* 的共晶结构已经被解析 (PDB ID: 1D3H)<sup>[20]</sup>。该结构中抑制剂的亲水端与 47 位的谷氨酰胺、136 位的精氨酸、356 位的酪氨酸、360 位的苏氨酸形成氢键相互作用,抑制剂的疏水端与蛋白质的疏水区域形成疏水相互作用,使抑制剂与蛋白质之间牢固结合,从而提高抑制剂的活性,达到治疗疾病的目的。

*hDHODH* 的另一个重要抑制剂是布喹那,布喹那的体外抑制作用很强,  $IC_{50}$  为 10 nmol/L,曾在临床上主要用于治疗癌症。该抑制剂与 *hDHODH* 的共晶结构已经被解析 (PDB ID: 1D3G)<sup>[20]</sup>。抑制剂的亲水端与 47 位的谷氨酰胺、136 位的精氨酸、360 位的苏氨酸形成氢键相互作用,抑制剂的疏水端与蛋白质的疏水区域形成疏水相互作用,各种相互作用使抑制剂与蛋白质牢固结合,从而提高抑制活性,增强治疗作用。

## 2 DHODH 的催化循环

已知 DHODH 是催化嘧啶从头合成途径第 4 步氧化还原反应的黄素酶,选择性将左旋二氢乳清酸 (L-dihydroorotate, DHO) 氧化成乳清酸 (Orotate, ORO),同时伴随着辅酶 FMN 的还原(图 3)。

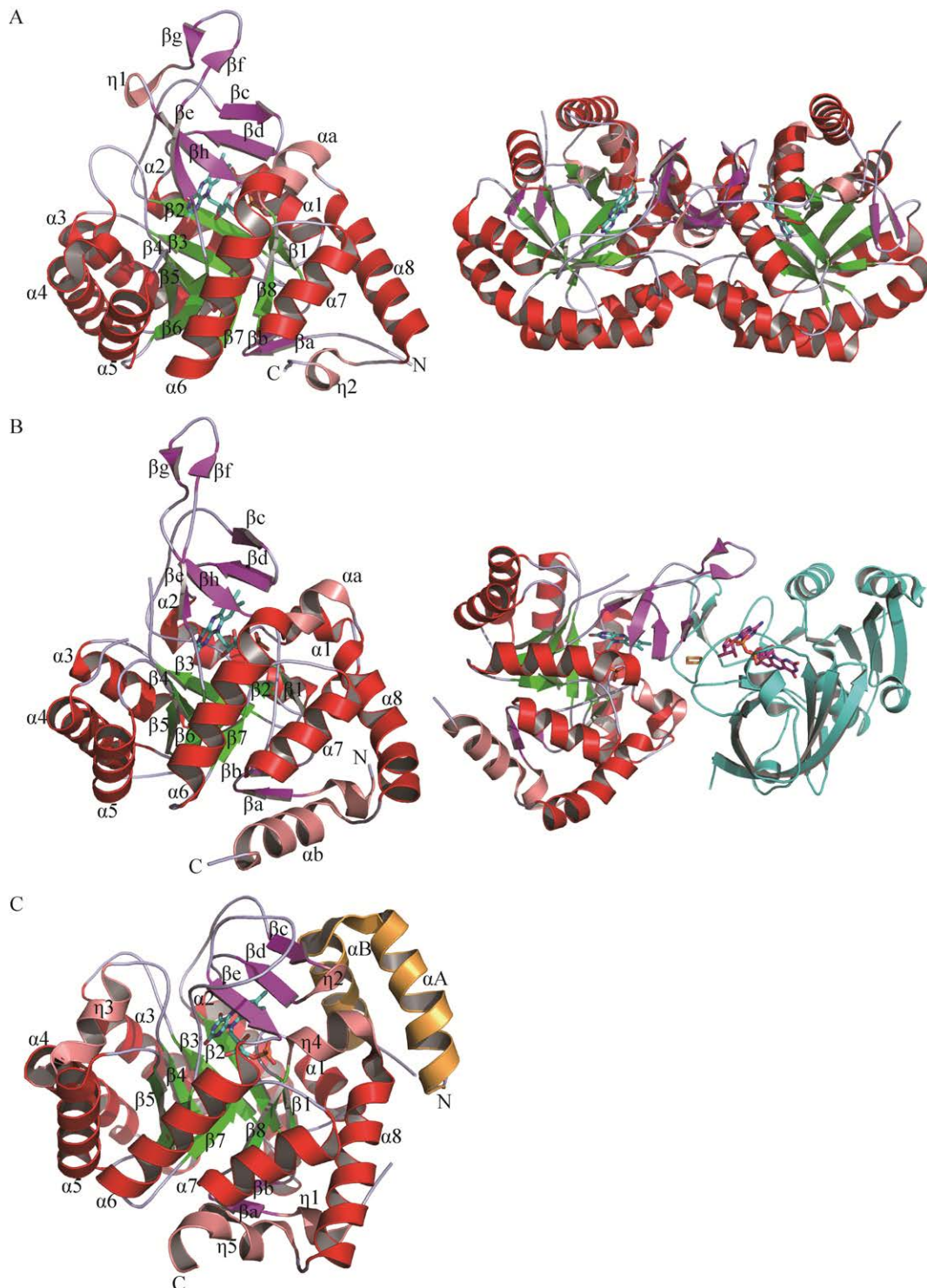


图1 DHODH的晶体结构图(A为1A类DHODH单体(左)和二聚体(右)(PDB ID: 3TQ0)<sup>[14]</sup>, B为1B类DHODH单体(左)和异二聚体(右)(PDB ID: 1EP2)<sup>[16]</sup>, C为第二家族的DHODH(PDB ID: 1D3H)<sup>[20]</sup>)

Fig. 1 Crystal structures of DHODHs. (A) Overall structure of the class 1A DHODH monomer (left) and functional dimer (right). The PDB ID code 3TQ0 was used as a model<sup>[14]</sup>. (B) Overall structure of the class 1B DHODH monomer (left) and heterodimers (right). The PDB ID code 1EP2 was used as a model<sup>[16]</sup>. (C) Overall structure of class 2 DHODH functional monomer. The PDB ID code 1D3H was used as a model<sup>[20]</sup>.



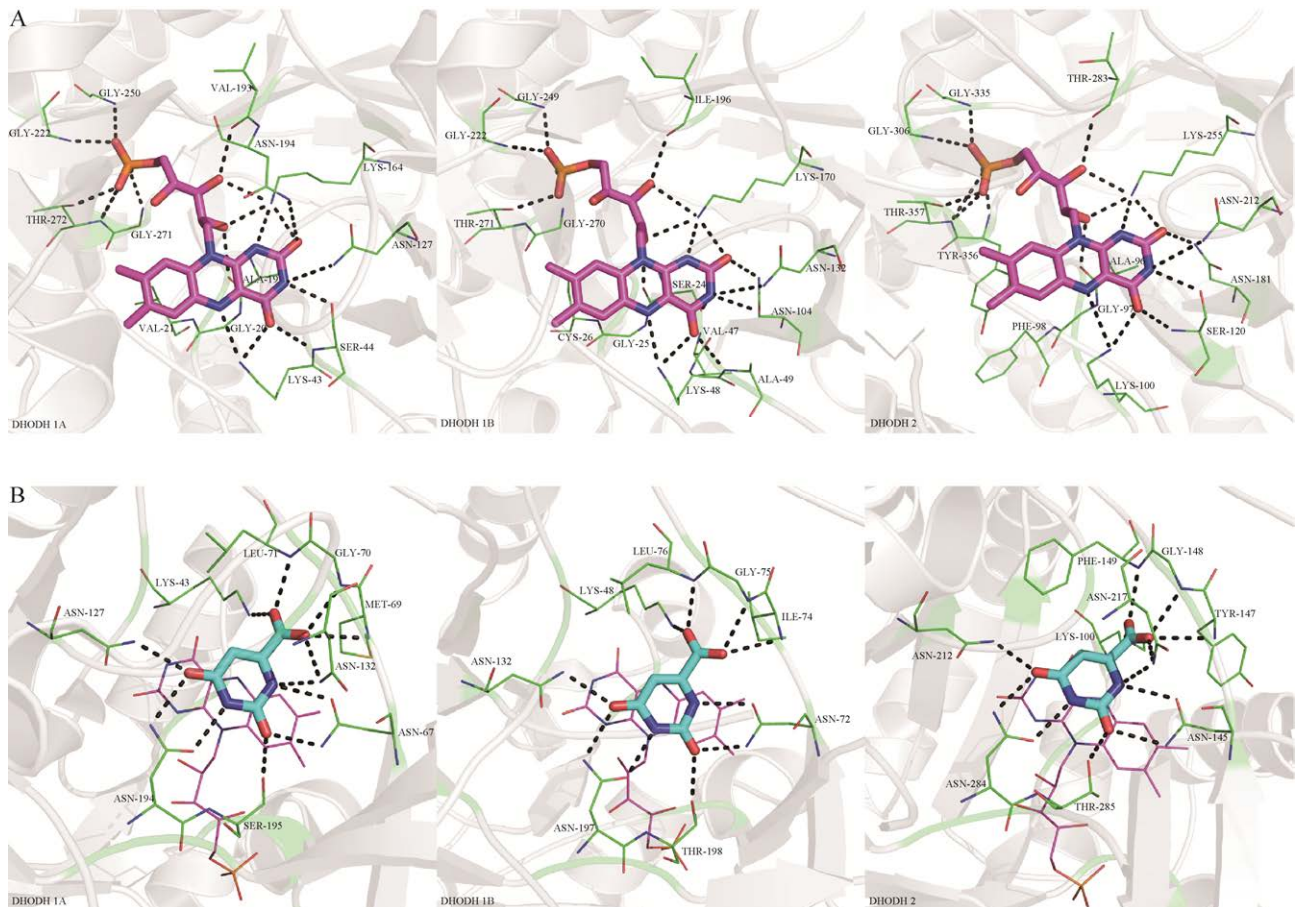


图 2 DHODH 的活性位点 (A 为 FMN 的结合位点, B 为 ORO 的结合位点. 从左向右 PDB ID 依次为 2E6A<sup>[21]</sup>、1EP2<sup>[16]</sup>和 1D3H<sup>[20]</sup>)

Fig. 2 Active site of DHODHs. (A) FMN binding site. (B) Orotate binding site. TcDHODH (PDB 2E6A), LIDHODHb (PDB 1EP2) and HsDHODH (PDB 1D3H) were used as models to represent class 1A, class 1B and class 2 DHODHs, respectively.

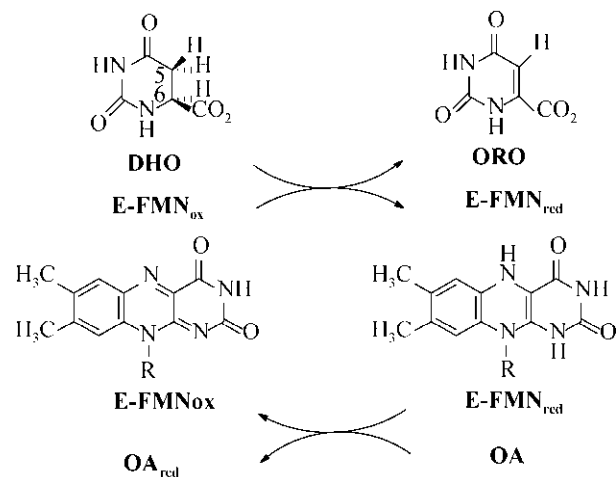


图 3 DHODH 的整体催化循环<sup>[20]</sup>

Fig. 3 Overall catalytic cycle for DHODH<sup>[20]</sup>.

这是一个依赖于 FMN 的过程, 其催化循环由两个独立的半反应组成<sup>[22]</sup>。在第一个还原半反应中, 辅酶 FMN 被 DHO 还原, 在第二个氧化半反应中, FMN 被底物 (OA) 氧化再生 (图 4)。第

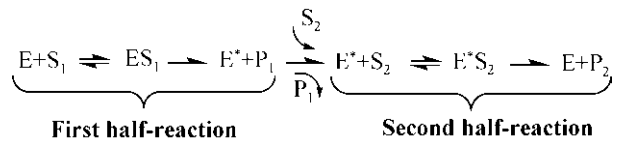


图 4 DHODH 的催化乒乓机制 (也称为双置换反应)<sup>[22]</sup>

Fig. 4 DHODHs are known to follow the Ping-Pong mechanism of catalysis, also called the double displacement reaction<sup>[22]</sup>. In this mechanism, the first product, orotate ( $P_1$ ), has to be released before the second substrate, the oxidizing agent ( $S_2$ ), binds the enzyme. This reaction is characterized by the existence of an enzyme intermediate,  $E^*$ , in which the enzyme is temporarily modified.

二家族的酶用醌来氧化再生 FMN, 1A 类酶用延胡索酸来作为氧化剂, 1B 类酶用  $\text{NAD}^+$  来作为氧化剂。在涉及两个底物的非顺序机制中, 提出了催化产物 ORO, 它在第二底物、氧化剂与酶结合前被释放。一系列实验研究表明, 每一类 DHODH 催化循环的详细机理是不同的。

## 2.1 DHODH 催化的还原半反应

在第一个还原半反应中, DHO 与所有 DHODH 的小嘧啶结合位点结合。DHO 向 ORO 的转化伴随着辅酶 FMN 的还原, DHO 的氧化涉及两个碳氢键的断裂。DHO 五位上的碳通过催化发生去质子化, 第二家族的丝氨酸或者第一家族的半胱氨酸位于柔性环中, 氢化物或者相当于氢化物从 DHO 六位上的碳转移到 FMN 五位上的氮(图 5)。以乳酸乳球菌 DHODH(*Lactococcus lactis* DHODH, *L*/DHODH)模型的位点直接突变研究表明丝氨酸和半胱氨酸是不可互换的<sup>[23]</sup>。

DHO 的氧化有两种机制, 一种是键在同一时间断裂的协同机制, 另一种是键顺序断裂的逐步机制。在厌氧停流实验中, 研究者通过动力学同位素对黄素还原的影响, 研究了第二家族和 1A 类的详细反应机理<sup>[23]</sup>。这些研究表明, 来自大肠杆菌和人源的第二家族酶使用的是逐步机制, 而乳酸乳球菌的 1A 类使用的是协同机制。由此可见, 两类二氢乳清酸脱氢酶已经分化, 并通过不同的机制执行相同的化学反应<sup>[23]</sup>。

虽然已经有大量的工作详细说明了 DHODH 的催化反应, 但能够解释第一家族和第二家族机理差异的问题依然没有解决。在第二家族的 DHO 催化氧化中, 既没有动力学也没有结构数据来支持键断裂的正确顺序, 这些问题还有待进一步研究。

## 2.2 DHODH 催化的氧化半反应

DHODHs 催化的第二个半反应研究较少, 主要困难在于, 第二家族 DHODH 的生理氧化底物泛醌不溶于水, 需要在体外实验, 此外, 实验必须在厌氧条件下进行, 因为 DHODH 需缓慢地与分子氧反应。

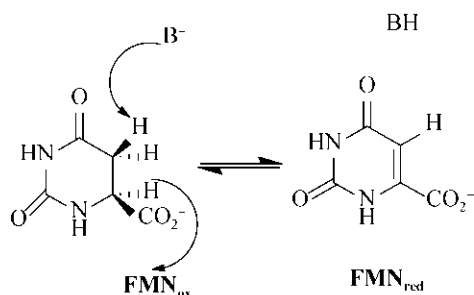


图 5 DHODH 催化氧化 DHO<sup>[23]</sup>

Fig. 5 DHO oxidation catalyzed by DHODH<sup>[23]</sup>. B is the catalytic base, either serine in class 2 or cysteine in class 1, that deprotonates C5 of DHO while a hydride or hydride equivalent is transferred from C6 of DHO to N5 of the isoalloxazine moiety as indicated by black arrows. The scission of the two bonds occurs in either a concerted or stepwise mechanism.

在第二个半反应中, 不同种类的 DHODHs 的催化性能发生了显著的变化。1A 类 DHODHs 的两个半反应包含了一个活性位点, 而第二家族的 DHODHs 包含了两个氧化还原位点。两个家族相似的是, 第一个底物 DHO 都结合在桶中央的顶部。第二家族 DHODH 醌的结合位点位于 N 末端结构域的两个螺旋之间的疏水处<sup>[24-27]</sup>, 对于醌类化合物的黄素氧化可以设想两种机制: 氢离子直接从黄素转移到醌, 或通过半醌黄素转移两个单电子。FMN 5 位上的氮是黄素氢化物转移反应的反应区域, 然而, 黄素 5 位上的氮不易被底物醌接近, 因此, 黄素的氧化必须由两个单电子转移机制发生, 即使没有直接证据证明黄素半醌中间体的存在。

在 1B 类 DHODH 中, 使用更复杂的途径将电子转移到最终受体。1B 类酶是异四聚体 (*PyrD*-*PyrK* 亚基), 不仅含有 FMN 和所有其他 DHODH, 还含有 FAD 和  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  簇, 最终电子受体是  $\text{NAD}^+$ 。在这种情况下, 电子沿着一条从 FMN 结合位点 (*PyrD* 亚基) 开始的转移途径, 通过铁硫簇 (*PyrK* 亚基) 到达 FAD, 再到达  $\text{NAD}^+$  电子受体,  $\text{NAD}^+$  结合位点位于 *PyrK* 亚基上。

## 2.3 氧化还原半反应之间的中间步骤

停流实验监测 DHODH 的第一个半反应证明了存在黄素还原后的第二个缓慢阶段, 该阶段的

特征是在 500 nm 附近有一个额外的吸收带,它与还原 FMN 和反应产物 ORO 之间的堆叠排列形成电荷转移复合物有关<sup>[28]</sup>。尽管 1A 类和第二家族的 DHODH 与 ORO 的结合相似,但快速动力学实验比较表明,这两类 ORO 从 DHODH-ORO 复合物解离的机制上存在差异。在大肠杆菌的第二家族 DHODH 中,发现 ORO 从还原 FMN 中解离太慢,不能作为整个催化循环速率的决定因素。而在 1A 类利什曼虫 DHODH (*Leishmania major* DHODH, *Lm*DHODH) 中,两种底物的活性位点相同,发现乳清酸的释放速率常数在催化速度常数的相同范围内,并被认为是整个反应速率的限速步骤<sup>[28]</sup>。1A 类和第二家族活性位点柔性结构的不同可解释这种差异。在 1A 类 DHODH 中,由于 DHO 和电子受体使用的是同一结合位点,因此活性环运动对控制活性位点的访问起着关键作用。在第二家族的 DHODH 中不需要相同的反应,因为它有两个结合位点,即氧化剂的结合位点和 DHO 的结合位点<sup>[28]</sup>。

详细了解各类 DHODH 的催化循环机制,有助于理解抑制剂与 DHODH 的反应过程和作用机理,从而更好地帮助抑制剂的设计。如 *h*DHODH 抑制剂来氟米特,它抑制人二氢乳清酸脱氢酶的活性,使二氢乳清酸无法脱氢转变为乳清酸,从而无法合成嘧啶,使 DNA、RNA 的合成受阻,进而使细胞无法快速增殖,最终达到治疗炎症的目的。又如 *p*fDHODH 抑制剂 DSM265,它通过抑制恶性疟原虫二氢乳清酸脱氢酶的活性,使恶性疟原虫二氢乳清酸无法转变为乳清酸,导致其无法合成嘧啶,致使 DNA、RNA 合成障碍,最终使恶性疟原虫无法完成自身代谢而达到治疗疟疾的目的。通过了解 DHODH 与抑制剂的作用机理和反应过程,期待能有更多更好的抑制剂被设计出来,用于治疗临床的各类疾病。

### 3 总结与展望

随着对 DHODH 的深入研究, DHODH 已成

为治疗多种疾病的靶点,如类风湿性关节炎、肿瘤、癌症、病毒感染等<sup>[29-32]</sup>,近期有研究发现人源 DHODH 可作为急性髓细胞白血病体内分化的治疗靶点。DHODH 抑制剂来氟米特现已在临床上作为重要药物用于治疗类风湿性关节炎,且近期研究表明来氟米特可抗新型冠状病毒,细胞实验证明药效优于法匹拉韦,现已申请抗新冠肺炎的临床试验。除此之外,笔者前期基于人源 DHODH 结构开发的抑制剂 S312 抗新型冠状病毒细胞实验证明其药效优于法匹拉韦,后期经课题组优化后的抑制剂 S416 的细胞测试结果表明药效比瑞德西韦还强 45 倍,有望成为抗新型冠状病毒的特效药<sup>[10]</sup>。癌细胞具有分化和增殖异常、生长失去控制等生物学特征,它主要依赖于嘧啶的从头合成途径来满足自身的生长需求,而人源 DHODH 抑制剂则可抑制嘧啶的从头合成途径,使细胞内嘧啶耗竭,控制癌细胞异常增殖的状态,从而使细胞恢复到正常增殖状态,起到治疗癌症的效果,因此, DHODH 抑制剂也有望成为治疗癌症的有效药物。

为了更好地开发 DHODH 抑制剂,需深入了解它的结构特征和催化循环机制,但到目前为止,仍然有尚待解决的问题,如没有醌的复合物晶体结构来证明它的结合位点,也没有实验能够证明第二家族 DHODH 催化循环正确的断键顺序,更没有实验能够解释第一家族和第二家族催化循环机理差异的原因,因此仍需进一步开展相关研究解决问题。相信在不久的将来,随着技术的不断完善和改进,结构生物学和分子生物学技术将进一步发展,可解决 DHODH 尚待解决的结构和催化循环机理问题,从而更好地推进抑制剂的开发,为临床各种疾病的治疗提供更多的候选药物。

### REFERENCES

- [1] Boukalova S, Hubackova S, Milosevic M, et al. Dihydroorotate dehydrogenase in oxidative phosphorylation and cancer. *Biochim Biophys Acta*

- Mol Basis Dis, 2020, 1866(6): 165759.
- [2] Zhou JB, Quah JY, Ng Y, et al. ASLAN003, a potent dihydroorotate dehydrogenase inhibitor for differentiation of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2019, 230482.
- [3] Ladds MJGW, van Leeuwen IMM, Drummond CJ, et al. A DHODH inhibitor increases p53 synthesis and enhances tumor cell killing by p53 degradation blockage. *Nat Commun*, 2018, 9: 1107.
- [4] Fairus AKM, Choudhary B, Hosahalli S, et al. Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors affect ATP depletion, endogenous ROS and mediate s-phase arrest in breast cancer cells. *Biochimie*, 2017, 135: 154–163.
- [5] Sykes DB. The emergence of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Exp Opin Therapeut Targets*, 2018, 22(11): 893–898.
- [6] Li LN, Ng SR, Colón CI, et al. Identification of DHODH as a therapeutic target in small cell lung cancer. *Sci Transl Med*, 2019, 11(517): eaaw7852.
- [7] Christian S, Merz C, Evans L, et al. The novel dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitor BAY 2402234 triggers differentiation and is effective in the treatment of myeloid malignancies. *Leukemia*, 2019, 33(10): 2403–2415.
- [8] Koundinya M, Sudhalter J, Courjaud A, et al. Dependence on the pyrimidine biosynthetic enzyme DHODH is a synthetic lethal vulnerability in mutant kras-driven cancers. *Cell Chem Biol*, 2018, 25(6): 705–717.
- [9] Liu L, Dong Z, Lei Q, et al. Inactivation/deficiency of DHODH induces cell cycle arrest and programmed cell death in melanoma. *Oncotarget*, 2017, 8(68): 112354–112370.
- [10] Xiong R, Zhang LK, Li SL, et al. Novel and potent inhibitors targeting DHODH, a rate-limiting enzyme in de novo pyrimidine biosynthesis, are broad-spectrum antiviral against RNA viruses including newly emerged coronavirus SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.11.983056>.
- [11] Kubota T, Tani O, Yamaguchi T, et al. Crystal structures of FMN-bound and FMN-free forms of dihydroorotate dehydrogenase from *trypanosoma brucei*. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(4): 680–691.
- [12] Argyrou A, Washabaugh MW, Pickart CM. Dihydroorotate dehydrogenase from *Clostridium oroticum* is a class 1B enzyme and utilizes a concerted mechanism of catalysis. *Biochemistry*, 2000, 39(34): 10373–10384.
- [13] Sorensen G, Dandanell G. A new type of dihydroorotate dehydrogenase, type 1S, from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, 2002, 6(3): 245–251.
- [14] Cordeiro AT, Feliciano PR, Pinheiro MP, et al. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania major*. *Biochimie*, 2012, 94(8): 1739–1748.
- [15] Yoshino R, Yasuo N, Inaoka DK, et al. Pharmacophore modeling for anti-chagas drug design using the fragment molecular orbital method. *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0125829.
- [16] Rowland P, Nørager S, Jensen KF, et al. Structure of dihydroorotate dehydrogenase B: electron transfer between two flavin groups bridged by an iron-sulphur cluster. *Structure*, 2000, 8(12): 1227–1238.
- [17] Klotz L, Eschborn M, Lindner M, et al. Teriflunomide treatment for multiple sclerosis modulates T cell mitochondrial respiration with affinity-dependent effects. *Sci Transl Med*, 2019, 11(490): eaao5563.
- [18] Maetani M, Kato N, Jabor VAP, et al. Discovery of antimalarial azetidine-2-carbonitriles that inhibit *P. falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8(4): 438–442.
- [19] Kokkonda S, Deng XY, White KL, et al. Tetrahydro-2-naphthyl and 2-indanyl triazolopyrimidines targeting *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase display potent and selective antimalarial activity. *J Med Chem*, 2016, 59(11): 5416–5431.
- [20] Liu S, Neidhardt EA, Grossman TH, et al. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure*, 2000, 8(1): 25–33.
- [21] Inaoka DK, Sakamoto K, Shimizu H, et al. Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate



- oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry*, 2008, 47(41):10881–10891.
- [22] Alves CN, Silva JR, Roitberg AE. Insights into the mechanism of oxidation of dihydroorotate to orotate catalysed by human class 2 dihydroorotate dehydrogenase: a QM/MM free energy study. *Phys Chem Chem Phys*, 2015, 17(27): 17790–17796.
- [23] Fagan RL, Jensen KF, Björnberg O, et al. Mechanism of flavin reduction in the class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, 2007, 46(13): 4028–4036.
- [24] Zeng T, Zuo ZP, Luo YF, et al. A novel series of human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors discovered by *in vitro* screening: inhibition activity and crystallographic binding mode. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(8): 1348–1354.
- [25] Echizenya S, Ishii Y, Kitazawa S, et al. Discovery of a new pyrimidine synthesis inhibitor eradicating glioblastoma-initiating cells. *Neuro Oncol*, 2020, 22(2): 229–239.
- [26] Agoni C, Salifu EY, Munsamy G, et al. CF 3-Pyridinyl substitution on antimalarial therapeutics: probing differential ligand binding and dynamical inhibitory effects of a novel triazolopyrimidine-based inhibitor on plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase. *Chem Biodivers*, 2019, 16(12): e1900365.
- [27] Mule RV, Rochlani SP, Choudhari PB, et al. Multi-targeted design and development of dihydroisoquinolines as potent antimalarial. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2019, doi: 10.2174/1573409915666191017145833.
- [28] Reis RAG, Ferreira P, Medina M, et al. The mechanistic study of *Leishmania major* dihydro-orotate dehydrogenase based on steady- and pre-steady-state kinetic analysis. *Biochem J*, 2016, 473(5): 651–660.
- [29] Boschi D, Pippione AC, Sainas S, et al. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in anti-infective drug research. *Eur J Med Chem*, 2019, 183: 111681.
- [30] Brzezinka K, Nevedomskaya E, Lesche R, et al. Functional diversity of inhibitors tackling the differentiation blockage of mll-rearranged leukemia. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 66.
- [31] Chen SR, Ding SH, Yin YB, et al. Suppression of pyrimidine biosynthesis by targeting DHODH enzyme robustly inhibits rotavirus replication. *Antiviral Res*, 2019, 167: 35–44.
- [32] Hosseini M, Dousset L, Michon P, et al. UVB-induced DHODH upregulation, which is driven by STAT3, is a promising target for chemoprevention and combination therapy of photocarcinogenesis. *Oncogenesis*, 2019, 8(10): 52.

(本文责编 郝丽芳)