

文章编号: 1001-8689(2018)01-0035-05

PTP1B抑制活性真菌F956的鉴定和代谢产物研究

霍培元 徐岩[#] 林洁 李业英 郑海洲 沈文斌 任晓 石英 崔晓兰 郑智慧 路新华^{*} 张雪霞

(微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心,

华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 石家庄 050015)

摘要: **目的** 研究PTP1B抑制活性真菌菌株F956及其代谢产物。**方法** 通过形态观察及ITS序列系统发育分析鉴定活性菌株F956; 对其发酵产物进行分离纯化获得单体化合物并通过综合波谱解析确定代谢产物的化学结构。对得到的化合物进行分子对接及PTP1B抑制活性评价。**结果** F956鉴定为*Mucor fragilis*(易脆毛霉); 从其代谢产物中得到2个具有PTP1B抑制活性的化合物F956-5和F956-6, 其中F956-5与化合物JBIR-12相同, F956-6为JBIR-12的13位羟基甲基化衍生物, 分子对接结果显示F956-6可占据PTP1B的活性位点; 其对PTP1B的IC₅₀分别为7.12和13.92μg/mL。**结论** 化合物F956-5(JBIR-12)和F956-6由易脆毛霉产生及其对PTP1B的抑制活性均为首次报道。

关键词: 真菌; 易脆毛霉; ITS序列分析; PTP1B抑制剂**中图分类号:** R915 **文献标志码:** A

Identification of fungus F956 and its metabolites with PTP1B inhibitory activity

Huo Pei-yuan, Xu Yan, Lin Jie, Li Ye-ying, Zheng Hai-zhou, Shen Wen-bin, Ren Xiao, Shi Ying, Cui Xiao-lan,
Zheng Zhi-hui, Lu Xin-hua and Zhang Xue-xia(National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology
Research Center, New Drug Research & Development Company of NCPC, Shijiazhuang 050015)

Abstract Objective To identify a filamentous strain F956 and study the activity of its metabolites. **Methods** The strain was identified by the cultural and morphological characteristics and phylogenetic analysis based on ITS rDNA; Active constituents were isolated and purified by various chromatographic techniques and the chemical structures were elucidated on the basis of comprehensive spectral data analysis. The inhibition of the compounds to PTP1B and molecular docking were evaluated. **Results** The strain F956 was identified as *Mucor fragilis*. Two compounds F956-5 and F956-6 were isolated from the metabolites. F956-5 was the same as compound JBIR-12. F956-6 was a new compound. Molecular docking showed F956-6 could occupy the active site of PTP1B. They exhibited significant inhibition to PTP1B with IC₅₀ values of 7.12 and 13.92μg/mL. **Conclusion** F956-5(JBIR-12) and F956-6 were isolated from *Mucor fragilis* firstly and reported as specific PTP1B inhibitors for the first time.

Key words Fungi; *Mucor fragilis*; ITS; PTP1B inhibitors

收稿日期: 2017-02-20

基金项目: 河北省科技条件建设项目(No. 169676404G)

作者简介: 霍培元, 女, 生于1983年, 硕士, 工程师, 研究方向为天然产物分离纯化, E-mail: huopeiyuancmu@sina.com

[#]并列第一作者, 徐岩, 男, 生于1978年, 学士, 工程师, 研究方向为天然产物提取纯化, E-mail: avar.xuyan@gmail.com^{*}通讯作者, E-mail: luxinhua89@hotmail.com

蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)参与调节多种细胞的生长、增殖、分化和代谢等过程^[1], 其中PTP1B是蛋白酪氨酸磷酸酶家族中一个经典的非受体型酪氨酸磷酸酶^[2]。PTP1B由435个氨基酸组成, 分子量约为50kD, 在肝脏、肌肉和脂肪等组织器官中大量表达^[3]。研究表明PTP1B在胰岛素信号通路中具有重要的逆向调节作用, 可通过使胰岛素受体及其底物酪氨酸去磷酸化而阻断胰岛素的信号传导^[4]。因此PTP1B被认为是治疗2型糖尿病和代谢综合症一个很有吸引力的药物靶标, PTP1B抑制剂有望成为有效的抗糖尿病/肥胖症治疗药物, ISIS制药公司研发的反义寡核苷酸类化合物ISIS-113715已进入II期临床^[5]。目前已发现的PTP1B抑制剂主要包括*N*-草酰胺苯甲酸类、取代苯乙酮类、二氟亚甲基磷酸盐类、水杨酸类、取代丙二酸-酪氨酸类、氨基磺酸类和噻吩类及多肽类等, 但因为其受困于细胞膜的通透性和选择性, 目前进入临床试验的小分子抑制剂很少^[1-6]。因此开发其他更为安全、有效的新型PTP1B小分子抑制剂具有重要意义。

本实验室建立了PTP1B抑制剂的高通量筛选模型, 对2500株真菌代谢产物乙酸乙酯提取物(浓度为1mg/mL)进行筛选, 选取抑制率大于80%的样品, 得到活性菌株F956。本文报道活性菌株F956的形态及分子鉴定、代谢产物研究及活性评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 微生物菌株

真菌菌株F956分离自云南采集的土壤样品。

1.1.2 主要仪器与试剂

试剂: 色谱乙腈(Merck公司); 4-硝基苯磷酸二钠(pNPP, 江莱生物); PDA(Oxoid); 重组人PTP1B由本实验室用基因工程的方法在大肠埃希菌中表达提纯得到; 酵母基因组DNA提取试剂盒DP307-2(离心柱型, 天根生化科技服务有限公司); pGEM-T easy vector; T4 DNA ligase(Promega公司); *Taq* DNA聚合酶, DNA Marker DL 2000及胶回收试剂盒(TaKaRa公司); 人胚肾细胞HEK293来源于美国ATCC。

仪器: 中压层析系统(德国Buchi公司); 高压液相系统(Waters公司515泵和PDA检测器); 核磁共振波谱仪500MHz(Inova); 质谱仪(Autospec-Ultima); Synergy2多功能酶标仪; 光学显微镜(Olympus CX31); 恒温式电热水浴锅(Pharmacia

Biotech); 电泳仪(Bio-Rad PAC300); 高速离心机(Eppendorf centrifuge 5415D); 梯度PCR仪(Eppendorf)等。

1.2 方法

1.2.1 F956的形态观察及ITS序列扩增及测定

将F956点种于PDA双碟, 置于25℃培养7d, 观察记录菌落直径及外观, 菌丝生长状态和孢子形态等特征。使用光学显微镜对F956的孢囊梗、孢囊和孢囊孢子等显微特征进行观察。根据参考文献[7]方法进行ITS序列的扩增并构建系统发育树。

1.2.2 菌株F956的培养

将菌株F956接种于种子培养基(淀粉2%, 葡萄糖1%, 黄豆饼粉0.2%, 麦芽粉0.6%, 酵母0.5%, CaCO_3 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, NaCl 0.2%, pH7.0), 26℃, 220r/min培养3d。按5%的接种量接种到固体培养基(大米97.5%, 黄豆饼粉2.5%) 26℃培养14d。

1.2.3 F956的提取与分离

F956固体培养物2kg, 加入2000mL乙酸乙酯萃取, 40℃减压浓缩获得褐色浸膏3g。上述粗提物经硅胶柱(2.6cm×50cm)色谱, 正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱, 每50mL收集1管, 对每管进行活性测定, 合并活性组分, 减压蒸干。活性物质部分用制备型HPLC, ODS反相柱(Phenomenex 20mm×250mm, 10μm)进行单组分的制备[流动相为 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (85:15, V/V), 流速16mL/min, 检测波长240nm], 得到化合物F956-5(34.0mg)和F956-6(25.0mg)。

1.2.4 活性测定方法

活性测定方法由本实验室建立, 原理是pNPP是PTP1B的有效底物, 其磷酸基团可被PTP1B脱去生成对硝基苯酚, 发生颜色变化, 对硝基苯酚在405nm处有吸收。光吸收度值代表对硝基苯酚的生成量, 按照酶反应速率法, 其生成速率可以反映酶的活力^[8]。

筛选体系为96孔板, 总反应体积为100μL。将2μL的测定样品和98μL含PTP1B的NaAC-HAC buffer混合液加入测定板, 加DMSO为空白对照孔, 不加样品孔为阳性对照孔。使用Synergy2多功能酶标仪在405nm波长处读取每孔A值(样品本底A); 加入pNPP 100μL, 37℃保温反应60min后再次读取每孔的A值, 并计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = [1 - (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100$$

1.2.5 分子对接研究

本实验室为发现更有意义的PTP1B小分子抑制

剂,为进一步进行分子改造提供有力依据,进行了分子对接研究。PTP1B晶体结构取自蛋白质数据库,提取代码为1NZ7^[9]。分子对接试验在Auto Dock 4.2程序上进行。对接算法使用拉马克遗传算法,对接循环数设置为50,其他采用默认设置。计算结果取聚类最多自由能最低的构象,使用Pymol进行图像显示。

2 结果及分析

2.1 F956的形态特征及ITS序列分析

菌株在PDA双碟上生长迅速,25℃培养7d,菌落直径达到86~88mm,质地疏松,呈棉絮状;菌落整体呈灰色。孢囊梗无色,直立,不分枝;孢子囊顶生,灰色。孢囊孢子无色,呈球形(图1)。

ITS序列经测定长度为640bp。将测得的ITS序



图1 F956的孢囊梗及孢囊孢子
Fig. 1 Micro characteristics of F956

列在NCBI数据库中使用BLASTn程序进行比对,发现F956同GenBank中*Mucor fragilis*的序列相似性达到99%。将序列提交NCBI获得GenBank登录号为KY348868,参考文献[10]构建F956与毛霉属下相关菌株的系统发育树(图2)。

由ITS序列的系统发育树可以看出,F956与*Mucor fragilis*的系统发育关系最近。因此根据系统发育分析并结合宏观及显微形态学特征,将F956鉴定为*Mucor fragilis*(易脆毛霉)。

2.2 F956-5和F956-6的理化性质及结构

F956-5红色粉末,易溶于甲醇、丙酮和氯仿,UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 为314和243nm。ESI-MS的测定结果显示该化合物的分子量为444.2,分子式为C₂₄H₂₈O₈,¹H和¹³C NMR数据见表1,经紫外、质谱和核磁等理化数据分析与文献[11]对照,确定该化合物为JBIR-12,化学结构见图3。

F956-6为红色粉末,易溶于甲醇、丙酮和氯仿,UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 为313和241nm。ESI-MS测定结果显示该化合物的分子量为458.6,分子式为C₂₅H₃₀O₈,¹H和¹³C NMR数据见表1,经与文献[11]对照确定化学结构见图3,命名为13-O-methely- JBIR-12。

2.3 F956-5和F956-6的生物活性

利用本实验室建立的筛选模型,测定了化合物F956-5和F956-6对PTP1B的抑制活性,结果显示其在0.01~20μg/mL浓度下对PTP1B的抑制活性存在很好的量效关系,IC₅₀分别为7.12和13.92μg/mL。并且本实验室依照文献[12]中提到的MTT法对这两个化合物进行



图2 F956与毛霉属下相关菌株构建的ITS 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree inferred from neighbour-joining analysis of ITS rDNA sequences of F956 and related species of genus Mucor

表1 F956-5在氘代丙酮中和F956-6在氘代甲醇中的¹³C NMR(125MHz)和¹H NMR(500 MHz)数据

Tab. 1 ¹³C NMR(125MHz) and ¹H NMR(500MHz) NMR date for F956-5 in acetone-*d*₆ and F956-6 in MeOD

No.	¹³ C NMR		¹ H NMR	
	F956-5	F956-6	F956-5	F956-6
1	75.99	76.16	-	-
2	205.53	206.62	-	-
3	84.94	85.46	-	-
4	192.01	194.17	-	-
5	121.57	121.67	-	-
6	124.17	128.30	-	-
7	145.68	146.28	-	-
8	151.14	152.88	-	-
9	112.65	112.60	7.35, s	7.18, s
10	139.66	140.42	-	-
11	34.08	33.56	1.63, s	1.57, s
12	23.68	23.98	1.52(s)	1.50, s
13	68.45	57.80	4.92, d, 7.5 5.01, d, 7.5	4.81, d, 7.5 4.51, d, 7.5
14	58.62	-	3.38, s	-
1'	165.36	166.78	-	-
2'	119.29	119.05	6.05, d, 7.5	6.08, d, 7.5
3'	147.27	148.27	7.38, dd, 12.5, 2.5	7.31, dd, 10, 5
4'	128.80	129.03	6.44, dd, 12.5, 2.5	6.32, dd, 12.5, 2.5
5'	143.22	143.97	6.75, dd, 12.5, 2.5	6.61, dd, 12.5, 2.5
6'	129.41	129.77	6.25, dd, 12.5, 2.5	6.14, dd, 12.5, 2.5
7'	147.20	147.91	5.94, dd, 10, 5	5.83, dd, 10, 5
8'	39.52	40.17	2.19, m	2.10, m
9'	29.00	30.59	1.39, m	1.33, m
10'	11.98	12.11	0.87, t, 7.5	0.83, t, 7.5
11'	20.00	20.21	1.03, d, 5	0.94, d, 5

“-”表示在图谱中没有信号

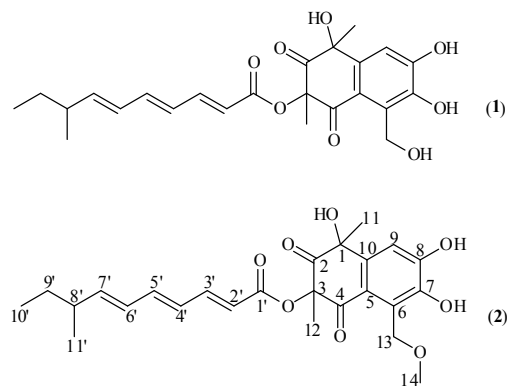


图3 F956-5和F956-6的结构

Fig. 3 Structures of F956-5(1) and F956-6(2)

了体外细胞毒实验，结果显示它们在浓度为50μg/mL时都对人胚肾细胞HEK293无显著的细胞毒作用。

2.4 分子对接结果(图4)

F956-6的双环部分占据了活性催化位点P loop(His214-Arg221)，能与残基Lys116、Trp179、Asp181和Arg221形成稳定氢键，并与Arg221形成阳离子-π相互作用。长链部分则占据了PTP1B的第2结合位点，能与残基Arg24、Tyr46、Ile219、Arg254、Met258、Gly259和Gln262等形成范德华作用。

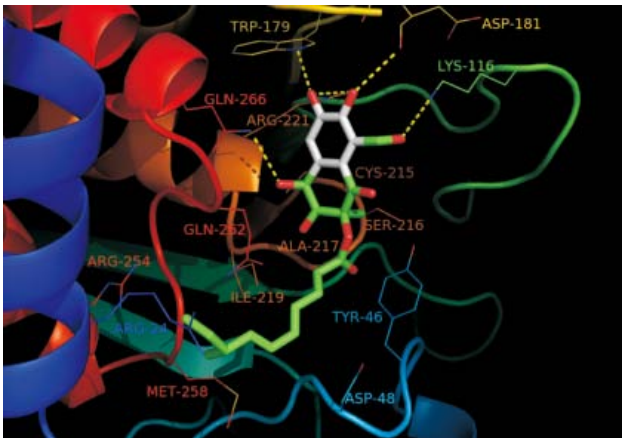


图4 化合物F956-6与PTP1B活性位点对接示意图

Fig. 4 Schematic diagram of docking of compound F956-6 with PTP1B active site

3 讨论

本文从丝状真菌易脆毛霉F956的发酵产物中分离得到两个化合物。其中化合物F956-5鉴定为JBIR-12，它最早是由Izumikawa^[11]从青霉属真菌的发酵液中分离得到。而由青霉属以外的易脆毛霉产生该化合物还是第一次报道。其1, 3, 8'位的3个手性中心的立体结构待进一步研究。化合物F956-6为JBIR-12的13位羟基甲基化衍生物，未见文献报道，经活性测定发现2个化合物对PTP1B都具有抑制活性，且对人胚肾细胞HEK293无显著的体外细胞毒作用。

PTP1B的活性位点包括主要催化位点P loop(His214-Arg221)、WPD loop(Trp179-Val184)和第二结合位点(包括Arg24、Arg254、Met258、Gly259和Gln262)。本文对接结果揭示化合物能够占据PTP1B的催化位点，与活性部位关键残基Asp181和Arg221形成稳定氢键，干扰了PTP1B正常的生理催化功能，从而达到抑制其活性的作用。这些研究发现丰富了PTP1B小分子抑制剂的结构，为进一步研究新型PTP1B抑制剂提供了基础。

参考文献

- [1] Seo C, Yim J H, Lee H K, *et al.* PTP1B inhibitory secondary metabolites from the Antarctic lichen *Lecidella carpathica*[J]. *Mycology*, 2011, 2(1): 18-23.
- [2] 王生育, 颜江华, 潘阳霖, 等. 蛋白酪氨酸磷酸酶PTP1B催化活性区的原核表达及活性分析[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(4): 553-557.
- [3] 张薇. 蛋白酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B)小分子抑制剂的发现及研究[D]. 上海: 中国科学院上海生命科学研究院, 2006: 1-52.
- [4] Stein U, Walther W, Arlt F, *et al.* MACC, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(1): 59.
- [5] Tonks N K, Diltz D C, Fischer E H. Purification of the major protein tyrosine phosphatases[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(14): 6722-6725.
- [6] 孙洪雁. 蛋白质酪氨酸磷酸酶1B抑制剂的筛选[D]. 吉林: 吉林大学生命科学院, 2006: 1-37.
- [7] 李业英, 石英, 路新华, 等. 一株产蛇孢假单壳素真菌 F02Z2172 的形态和分子鉴定[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(8): 1205-1210.
- [8] 庞晓斌, 谢欣梅, 王守宝, 等. 人源蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP1B)抑制剂的高通量筛选[J]. *药科学报*, 2011, 46(9): 1058-1064.
- [9] Xin Z, Oost T K, Abad-Zapatero C. *et al.* Potent, selective inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 1887-1890.
- [10] 周火祥, 冯晓虎, 宋涛, 等. 一株高产油脂丝状真菌的形态学及rDNA-ITS2分子鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(6): 988-992.
- [11] Izumikawa M, Nagai A, Takayuki M, *et al.* JBIR-12, a novel antioxidative agent from *Penicillium* sp. NBRC 103941[J]. *J Antibiot*, 2009, 62: 177-180.
- [12] 任晓, 郑智慧, 路新华, 等. 次黄嘌呤核苷酸脱氢酶抑制剂 N01WB-352A, B的研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(5): 362-365.