

栗色鼠尾草中抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 的活性成分

胡辛欣, 杨雁芳, 张英涛*

(北京大学药学院, 北京 100191)

摘要:目的 探讨栗色鼠尾草 *Salvia castanea* 抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 的活性成分及其可能的作用机制。方法 采用分子克隆技术构建人源 PTP1B 的体外抑制活性筛选模型, 利用该模型对 HPLC 分离的栗色鼠尾草提取物进行活性成分的追踪分析并进行结构确认, 采用分子模拟方法分析其作用机制。结果 从栗色鼠尾草根的甲醇提取物中鉴定获得了 2 个活性化合物, 分别为已知化合物二氢丹参酮 I 与丹参酮 II_A, 其 IC₅₀ 分别为 34.01 μmol/L 和 44.16 μmol/L。分子模拟对接分析揭示了两个化合物的立体构型及作为氢键受体的邻醌结构均有利于与 PTP1B 的活性位点口袋产生亲和作用。结论 丹参酮类化合物对 PTP1B 具有竞争性抑制作用, 并可能成为开发 2 型糖尿病治疗药物的新资源。

关键词:栗色鼠尾草; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B); 2 型糖尿病; 二氢丹参酮 I; 丹参酮 II_A

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)12-1869-04

蛋白酪氨酸磷酸化是一种重要的调节信号转导的翻译后修饰方式。在体内, 酪氨酸的磷酸化是可逆的动态过程, 其磷酸化和去磷酸化分别由蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinases, PTKs) 和蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatases, PTPs) 家族调节, 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 是 PTPs 家族中的重要成员, 通过催化活化的胰岛素受体酪氨酸残基的去磷酸化对胰岛素信号转导起重要的负调控作用^[1]。临床研究表明, 2 型糖尿病患者、肥胖相关胰岛素抵抗患者中普遍存在 PTP1B 的过度表达^[2]; 相关的基因敲除研究证明 PTP1B 缺失小鼠表现出显著增强的胰岛素敏感性, 且对高脂饮食诱导的肥胖和甘油三酯水平升高具有明显的抗性^[3], 因此使 PTP1B 成为近年广受关注的抗 2 型糖尿病药物研发的新靶点。该靶点受到关注的另一个重要原因在于 PTP1B 敲除小鼠具有接近正常的表型并可产生健康的子代, 预示了 PTP1B 的特异性抑制剂可能成为 2 型糖尿病的理想治疗药物。

唇形科鼠尾草属 *Salvia* L. 药用植物资源非常丰富, 其中丹参是著名的活血化瘀中药, 在应用中药复方治疗 2 型糖尿病及其并发症中具有广泛的应用。本课题组前期对于该属药用植物的活性研究证实了该属多种药用植物的根提取物具有不同程度的 PTP1B 抑制活性^[4], 其中栗色鼠尾草 *S. castanea* Diels 表现出较好的抑制活性, 并且其在我国西南地

区具有非常丰富的分布资源。本实验采用分子克隆技术获得了人 PTP1B 的 cDNA 并进行了原核细胞的 His 标签融合表达与亲和纯化, 采用该纯化蛋白构建了人 PTP1B 的体外活性筛选模型, 结合 HPLC 制备技术对栗色鼠尾草根提取物的活性成分进行了追踪分析, 从中鉴定获得了两个已知的活性化合物二氢丹参酮 I 与丹参酮 II_A。

1 材料与方法

1.1 样品制备与分离: 栗色鼠尾草 *S. castanea* Diels 采集自云南玉龙山, 凭证标本由北京大学药学院张英涛副教授鉴定, 保存于北京大学药学院植物标本馆。栗色鼠尾草根甲醇提取物制备见文献方法^[4]。取提取物适量, 加入甲醇溶解至质量浓度为 5 mg/mL 用于 HPLC 制备, 色谱条件: 日本岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪; 二极管阵列检测器 (DAD); Alltima C₁₈ 色谱柱 (10 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (80 : 20); 体积流量 2.0 mL/min; 检测波长 270 nm。按色谱峰收集各主要馏份, 40 °C 减压蒸干, 精确称质量后用适量 DMSO 溶解, -20 °C 保存备用。

1.2 人 PTP1B cDNA 的克隆: 采用常规方法^[5]从 HeLa 细胞中提取总 RNA 并纯化, 采用北京全式金生物技术有限公司提供的 Transcript First-Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录, 取少量产物作为模板进行 PCR 扩增, 引物序列分别为 PTP-F: 5'-

收稿日期: 2009-04-22

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT0502)

作者简介: 胡辛欣 (1985—), 女, 北京人, 北京大学药学院天然药物学系硕士研究生, 从事鼠尾草属药用植物的资源与活性研究。

E-mail: huxfirefly@163.com

* 通讯作者 张英涛 Tel: (010) 82801559 E-mail: zhang_yingtao@yahoo.com.cn

GAGATGGAAAAGGAGTTCGAGCAG-3', PTP-R: 5'-GTTGTGTGGCTCCAGGATTCGT-3', 扩增产物纯化后直接克隆到北京全式金生物技术有限公司提供的 T/A 质粒 pEASY-E1, 该载体的上游含有 6×His 标签用于重组蛋白的亲纯化。重组体转化到大肠杆菌 TOP10 细胞中进行氨苄青霉素抗性筛选, 挑选重组克隆采用质粒 T7 promoter 引物与 PTP-R 引物进行 PCR 鉴定与 DNA 测序。

1.3 人 PTP1B 重组蛋白的表达与纯化: 采用常规方法从鉴定的 TOP10 阳性克隆中分离纯化质粒, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 菌株中(北京全式金生物技术有限公司), 抗性筛选后进行 PCR 鉴定, 阳性克隆用于重组蛋白的分离纯化。将重组的 BL21(DE3)pLysS 细胞培养于 LB 氨苄青霉素液体培养基中, 加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 30 °C 诱导表达 2 h, 离心分离菌体后冻融破碎细胞, 用 His GraviTrap 蛋白纯化柱(GE Healthcare)分离纯化可溶性 His 标签蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳检测。纯化蛋白定量后以 pNPP(北京普博欣生物科技有限责任公司)为底物进行磷酸酶活性检测。

1.4 栗色鼠尾草各分离组分的抑制活性分析: 在 200 μL 的反应体系中(pH 6.0, 50 mmol/L citrate, 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT)分别加入用 DMSO 溶解的栗色鼠尾草各分离组分及人重组 PTP1B 蛋白(10 μg/mL), 加入反应底物 pNPP 至 10 mmol/L 开始反应, 37 °C 保温 30 min。加入 20 μL 10 mol/L NaOH 终止反应, 405 nm 波长下测定吸光度值, 以不加 PTP1B 为空白对照, 以原钒酸钠为阳性对照药物, 测定样品在不同浓度下的抑制率, 计算样品的半数抑制浓度(IC₅₀), 采用计算公式 $K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_m)$ 计算化合物的抑制常数 K_i , 其中[S]为底物 pNPP 浓度, K_m 为文献报道的 pNPP 的米氏常数 0.38 mmol/L^[6]。

1.5 栗色鼠尾草活性成分的结构鉴定与分子模拟对接分析: 将活性较好的组分进行 ESI 质谱与 400 MHz 核磁共振氢谱分析, 获得数据与文献比较进行化合物结构推断。采用 gNMR 5.0 软件进行氢谱模拟计算验证结构推断的正确性。采用分子对接软件 Autodock Vina 1.0 beta 04 (<http://vina.scripps.edu/>)进行化合物与 PTP1B 的分子模拟对接分析, 应用其最低对接自由能按下式计算化合物在室温下的理论亲和常数 K_d : $G_{dock} = RT \ln K_d$ [其中 G_{dock} 为对接自由能, $T = 298.15$ K, $R = 1.987$ 19 cal/(mol·K)]。

2 结果

2.1 人 PTP1B 的克隆与重组表达: 按照 Genbank 中收载的人 PTP1B cDNA(NM_002827)序列设计了特异性的 PCR 引物, 通过 RT-PCR 操作成功从 HeLa 细胞的总 RNA 中扩增获得了一个长度接近 1kb 的片段(图 1-a), 插入到 pEASY-E1 质粒后转化 TOP10 细胞获得了重组克隆, PCR 鉴定结果发现有部分克隆含有完整的插入方向正确的重组子(图 1-b), DNA 测序结果表明插入片段的长度为 960 bp, 序列与 Genbank 收载的序列相一致, 对应于人 PTP1B 蛋白催化活性区的 2-321 aa。

从经过鉴定的 TOP10 阳性克隆中提取的质粒成功转化了大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 表达菌株, 并对筛选鉴定的阳性克隆进行了表达诱导及重组蛋白的分离纯化工作, SDS-PAGE 分析表明该重组蛋白能够在该菌株中正常诱导表达(图 1-c), 采用 Ni 螯合的 His GraviTrap 蛋白亲和纯化柱从该菌株的可溶性蛋白部分成功纯化了带有 6×His 标签的重组蛋白(图 1-c), 该重组蛋白的相对分子质量约为 4×10^4 。

2.2 栗色鼠尾草抑制 PTP1B 的活性成分追踪与结构鉴定: 采用 HPLC 制备技术从栗色鼠尾草根的甲醇提取物中分离制备了 7 个馏份, 其中有两个馏份在活性检测中表现出了明显的抑制作用, 色谱分析表明这两个馏份是该提取物的主要成分, 且质量分数均在 99.99% 以上, 推测为单体化合物。前期研究表明这两个成分峰是多种具有 PTP1B 抑制活性的鼠尾草属药用植物的共有峰^[4], 因此推测其为已知化合物, 其紫外吸收光谱与质谱、核磁共振氢谱的检测数据如下。

化合物 A: UV λ_{max}^{MeOH} nm: 227, 293。 (+)ESI-MS m/z : 301[M+Na]⁺, 279[M+H]⁺。 ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.03 (3H, s, CH₃), 2.17 (5H, s, CH₃), 3.22 (2H, t, $J = 8.0$ Hz), 6.07 (1H, s), 7.54 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 8.04 (1H, s)。

化合物 B: UV λ_{max}^{MeOH} nm: 224, 250 (肩峰), 268。 (+)ESI-MS m/z : 317[M+Na]⁺, 295[M+H]⁺。 ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 1.28 (6H, s, CH₃), 1.61 (1H, s), 1.63 (1H, s), 1.71 (1H, s), 1.73 (1H, s), 2.17 (3H, t, $J = 1.2$ Hz, CH₃), 3.08 (2H, t), 7.58, 7.80 (2H, dd, $J = 8.0$ Hz), 7.71 (1H, d, $J = 1.2$ Hz)。

分析表明, 化合物 A 与文献报道的二氢丹参酮 I (1,2-dihydrotanshinone I) 数据相一致^[7], 其分

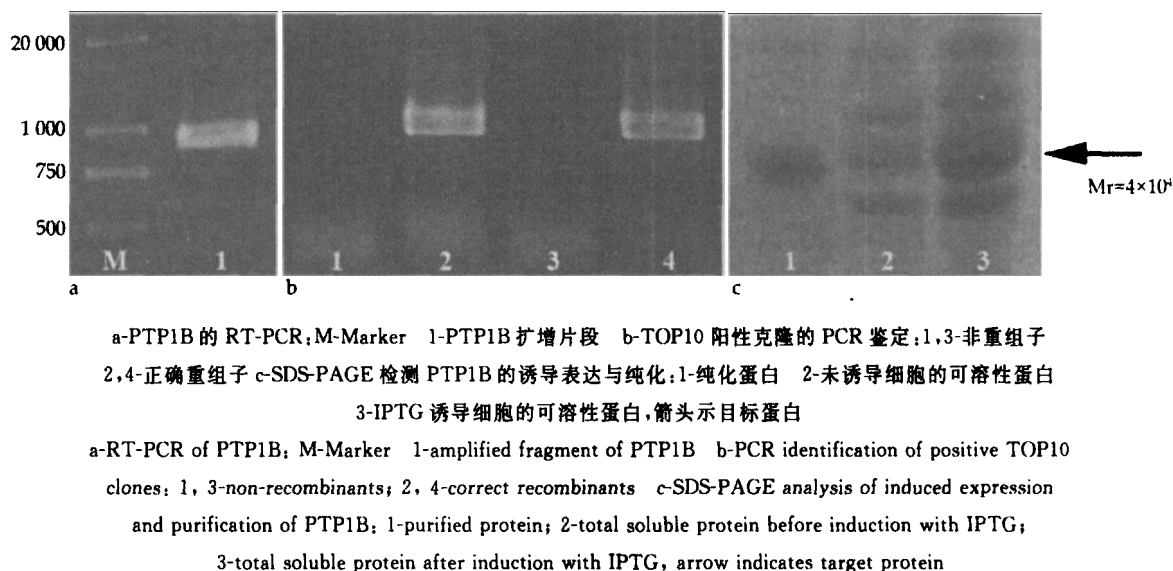


图 1 人 PTP1B 的克隆与重组表达

Fig. 1 Cloning and recombinant expression of human PTP1B

子式为 $C_{18}H_{14}O_3$; 化合物 B 与文献报道的丹参酮 II_A (tanshinone II_A) 数据相一致^[7], 其分子式为 $C_{19}H_{18}O_3$ 。采用 gNMR 50.0 软件对两个化合物进行的¹H-NMR模拟计算获得的理论数值与实验结果基本吻合, 间接证实了结构推断的正确性。通过多浓度的抑制活性分析及回归计算得到化合物 A 与 B 对 PTP1B 的 IC₅₀ 值分别为 34.01 μmol/L 和 44.16 μmol/L, 计算获得的抑制常数 Ki 分别为 1.25 μmol/L 和 1.62 μmol/L。

2.3 活性化合物的分子模拟对接分析: 从蛋白质数据库 RCSB 网站 (<http://www.rcsb.org/>) 下载了人 PTP1B 催化活性区 1-321 aa 的三维分子结构 (ID: 1BZC), 采用 AutoDockTools-1.5.2 对该蛋白的活性位点口袋进行了格化, 采用 AutoDock Vina 软件分别对二氢丹参酮 I 及丹参酮 II_A 与 PTP1B 进行了分子对接分析, 结果表明两个化合物均能很好地伸入 PTP1B 的活性位点口袋 (图 2-a), 其最低对接自由能分别为 -8.5 与 -8.4 kcal/mol, 计算获得的室温下 (25 °C, 298.15 K) 理论亲和常数 Kd 分别为 0.59 μmol/L 与 0.70 μmol/L, 与实验条件下 (37 °C, 310.15 K) 获得的抑制常数 Ki 相接近。相互作用分析表明两个化合物的立体结构适于纳入 PTP1B 的活性位点口袋并与周边的氨基酸残基发生范德华力相互作用, 同时其共有的邻醌结构作为氢键受体与 LYS120 残基的氨基氢形成两个氢键 (图 2-b)。对于具有对醌结构的其他丹参酮类化合物的对接分析表明其与 PTP1B 具有类似的相互作用, 但通常只有一个醌基氧参与氢键的形成。

3 讨论

在前期研究中发现鼠尾草属的多种药用植物具有明显的 PTP1B 抑制活性^[4], 其中栗色鼠尾草是活性显著的样品之一, 初步的 HPLC 分析提示了该抑制活性可能与多种鼠尾草的共有成分密切相关。为了进一步探明该属药用植物抑制 PTP1B 的主要活性成分, 针对栗色鼠尾草的 7 个 HPLC 制备组分进行了活性追踪分析, 并对其中活性较高的两个组分进行了结构鉴定, 最终确定为 2 个已知化合物二氢丹参酮 I 与丹参酮 II_A。文献检索表明这两种化合物普遍存在于鼠尾草属药用植物中, 证实了之前的推测。

含有丹参的多种中药复方在中医临床上广泛用于 2 型糖尿病及其并发症的治疗, 然而与丹参及丹参酮类化合物的活血化瘀作用相比, 丹参的抗糖尿病作用相关的药理学研究与活性成分研究却相当缺乏。近年 Han 等^[8]对于丹参提取物的 PTP1B 抑制活性分析发现了具有对醌结构的丹参酮类二萜醌化合物具有明显的活性, 而在本研究中从栗色鼠尾草中分离获得的具有邻醌结构的两个丹参酮类化合物也表现出了显著的抑制活性, 因此预示了丹参酮类化合物可能普遍具有不同程度的 PTP1B 抑制活性, 这也与在活性跟踪研究过程中发现的实验现象相符。通过分子模拟对接分析了本研究鉴定的两个丹参酮类化合物及其他具有对醌结构的丹参酮类化合物的可能作用机制, 结果表明丹参酮类化合物普遍具有与 PTP1B 的活性位点口袋相适应的立体结构, 同时其含有醌基氧也参与了氢键的形成, 因此说明了多种丹参酮类化合物均具有 PTP1B 抑制活性的实验现象。



a-二氢丹参酮 I 在 PTP1B 活性位点口袋中的最低能量对接姿态 b-二氢丹参酮 I 与 PTP1B 活性位点口袋发生范德华力相互作用并形成两个氢键

a-docking pose of 1, 2-dihydrotanshinone I with lowest docking energy in PTP1B active-site pocket b-interaction between 1, 2-dihydrotanshinone I and active-site pocket of PTP1B involves Van der Waals forces and two hydrogen bonds

图2 活性化合物二氢丹参酮 I 的分子模拟与对接分析

Fig. 2 Molecular modeling and docking analysis of active component 1, 2-dihydrotanshinone I

近期 Seung 等^[9]在细胞水平的研究中发现丹参酮 I、丹参酮 II_A 和 15,16-二氢丹参酮 I 可以通过提高胰岛素受体的酪氨酸磷酸化水平而增强胰岛素的作用,但并未阐明以上成分作用的确切靶点。而本研究获得的结果证明了丹参酮类化合物可能通过抑制 PTP1B 的活性来稳定活化的胰岛素受体水平,从而增强了胰岛素作用的敏感性。

由于中药丹参长期应用于临床治疗,尚未有实验证据表明丹参酮类化合物具有显著的毒性,因此若能从该类化合物中筛选获得高效特异性的 PTP1B 抑制剂将可能成为理想的 2 型糖尿病治疗药物,而鼠尾草属丰富的药用植物资源将可能成为丹参酮类化合物二次开发的基础。

本研究通过分子克隆技术重组表达了 PTP1B 蛋白的催化活性区,并采用 His 标签亲和纯化技术获得了重组蛋白,与前期研究中采用的进口重组蛋白相比明显降低了筛选成本,同时也避免了蛋白在运输过程中造成的失活以及质量不稳定等难以重复的影响因素,为进一步开展鼠尾草属药用植物资源的活性筛选奠定了基础。

参考文献:

- [1] Romsicki Y, Reece M, Gauthier J Y, *et al.* Protein tyrosine phosphatase-1B dephosphorylation of the insulin receptor occurs in a perinuclear endosome compartment in human embryonic kidney 293 cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 12868-12875.
- [2] Zhang S, Zhang Z. PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12(9/10): 373-381.
- [3] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene [J]. *Science*, 1999, 283: 1544-1548.
- [4] 胡辛欣, 杨雁芳, 张英涛. 鼠尾草属药用植物抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 活性初探 [J]. *药学报*, 2009, 44(4): 440-442.
- [5] Gauthier E R, Madison S D, Michel R N. Rapid RNA isolation without the use of commercial kits: application to small tissue samples [J]. *Pflugers Arch*, 1997, 433: 664-668.
- [6] Montalibet J, Skorey K, McKay D. Residues distant from the active site influence PTP1B inhibitor binding [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 5258-5266.
- [7] Lin Y L, Liu C Y, Chen T H, *et al.* Acetyl danshenxinkun a from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Chin Med*, 2003, 14: 123-128.
- [8] Han Y M, Oh H, Na M, *et al.* PTP1B Inhibitory effect of abietane diterpenes isolated from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(9): 1795-1797.
- [9] Seung H J, Hee J S, Su J J, *et al.* Insulin-sensitizing activities of tanshinones, diterpene compounds of the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16: 327-335.

《中草药》杂志售过刊信息

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1988-1993年(80元/年)、1996年、1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年)、2005年(260元/年)、2006年(280元/年)、2007年(280元/年)、2008年(280元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)、2006年增刊(65元)、2007年增刊(65元)、2008年增刊(55元)、2009年增刊(55元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821

传真:(022) 23006821

E-mail: zcyzzbjb@sina.com