

# 微生物来源的醛糖还原酶抑制剂 F01-195A 的研究

任 晓,董悦生,张 华,路新华,郑智慧,刘 梅,贺建功

(华北制药集团新药研究开发有限责任公司 微生物药物国家研究中心,河北 石家庄 050015)

**摘 要:**利用自建的高通量醛糖还原酶抑制剂的筛选方法,从数千株放线菌和真菌中筛选得到阳性菌株 F01-195. 对阳性菌株的发酵产物进行有机溶剂提取、硅胶柱色谱和 ODS HPLC 纯化,得到活性化合物 F01-195A,其对醛糖还原酶有较强的特异性抑制活性, $IC_{50}$  为  $57.2 \mu\text{mol/L}$ . 通过对 F01-195A 的紫外、质谱、核磁等理化数据的分析,鉴定了其化学结构与化合物 Flavomannin 相同,Flavomannin 已被报道作为抗疟疾药物的先导化合物.

**关键词:**微生物;醛糖还原酶抑制剂;高通量筛选;结构鉴定

中图分类号:Q 939.9

文献标识码:A

文章编号:1000-1565(2006)01-0007-04

## Study on F01-195A, an Aldose Reductase Inhibitor from Metabolites of Microorganisms

REN Xiao, DONG Yue-sheng, ZHANG Hua, LU Xin-hua, ZHENG Zhi-hui, LIU Mei, HE Jian-gong  
(National Microbial Medicine Engineering & Research Center,  
New Drug Research and Development Co., Ltd. of North China Pharmaceutical Corporation,  
Shijiazhuang 050015, China)

**Abstract:** A high throughput screening method established by us was applied for screening aldose reductase inhibitors from thousands of strains of actinomycetes and fungi, as a result, a strain, F01-195 with the positive activity was picked out. The culture broth of the positive strain was purified by solvent extraction, silica column chromatography and ODS HPLC to get an active compound named F01-195A. The compound showed strong specific inhibitor activity against aldose reductase with  $IC_{50}$  of  $57.2 \mu\text{mol/L}$ . By the physicochemical data of UV, MS, NMR and so on, the structure of F01-195A was determined as the same as Flavomannin, which was reported as a lead compound to promising drugs against the human malaria parasite.

**Key words:** microorganism; aldose reductase inhibitor; high throughput screening; structure determination

大量动物实验和临床研究表明醛糖还原酶(AR)抑制剂可有效地改善糖尿病患者聚醇代谢通路异常,从而达到预防与延缓糖尿病并发症的发生<sup>[1,2]</sup>.

目前,醛糖还原酶抑制剂(ARI)的来源主要有 3 个:化学合成、植物和微生物<sup>[2]</sup>. 据有关统计,近 100 多

收稿日期:2005-09-15

基金项目:国家科技部,创新药物筛选技术平台研究项目(2002AA2AZ343D)

作者简介:任 晓(1974-),女,河北石家庄人,华北制药集团新药研究开发有限责任公司工程师,硕士,主要从事微生物来源的创新药物的研发工作.

年来人们只分离到自然界实有微生物总数的 1%, 未知微生物是极为值得开发的资源<sup>[3]</sup>, 而我国尤其是云南、新疆等地的微生物资源为世界瞩目, 从中寻找高效、安全的 ARI 有很大的潜力。

为此, 采用本课题组建立的体外醛糖还原酶抑制剂的高通量筛选模型, 对分离自云南、新疆等地的土壤样品中的数千株菌株的代谢产物进行了筛选, 获得了对醛糖还原酶具有明显特异性抑制活性的单体化合物 F01-195A。本文对该化合物的筛选、发酵、分离纯化、结构鉴定和生物学活性进行报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 供筛选用样品

放线菌和真菌菌株采集自云南、新疆等地的土壤, 筛选样品为上述菌株的代谢产物。

### 1.2 主要试剂和仪器

醛糖还原酶(由本实验组从猪晶状体中提取, 经硫酸铵分级沉淀和 DEAE-cellulose 柱色谱纯化得到); 辅酶 NADPH(北京欣经科生物技术公司); 硫酸锂和甘油醛均购自 Sigma 公司。

Victor2 1420 多功能测定仪(美国 PE 公司); 中压色谱分离制备系统(瑞士 BUCHI 公司); HPLC 高效液相分析和半制备系统(美国 Waters 公司); ZMD Micromass 质谱仪(ESI-MS, 美国 Waters 公司); INOVA-500 MHz 核磁共振仪(Varian 公司)。

### 1.3 醛糖还原酶抑制剂活性测定

1.3.1 醛糖还原酶活性测定原理 将文献[4]报道的方法改进, 使之适合于高通量筛选。测定原理是: 在 NADPH 的存在下, AR 催化 DL-甘油醛还原为甘油, 同时 NADPH 转化为  $\text{NADP}^+$ , 而还原态 NADPH 在 340 nm 处有特征吸收, 可以测定 340 nm 处光密度的下降速率, 间接测定 AR 的活性。在实验条件下, 每 min 减少 0.001 单位的吸光度定义为一个酶活力(u)。

1.3.2 醛糖还原酶抑制剂活性测定方法 从猪晶状体中提取醛糖还原酶用于筛选<sup>[5]</sup>。反应在 96 孔板中进行。样品孔中加入 NaPi 缓冲液(60 mmol/L, pH 6.2)、适量的酶液和样品的 DMSO 溶液, 共 50  $\mu\text{L}$ ; 对照孔以 DMSO 代替样品的 DMSO 溶液; 空白孔以 DMSO 代替样品的 DMSO 溶液并以 NaPi 缓冲液代替酶液。在 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 15 min, 各孔加入 33.5  $\mu\text{L}$   $\text{Li}_2\text{SO}_4$  (1.2 mol/L), 8.5  $\mu\text{L}$  DL-甘油醛(36 mmol/L)和 8.5  $\mu\text{L}$  NADPH (1.5 mmol/L), 开始反应。用 Victor2 1420 多功能测定仪测定 340 nm 处每 min OD 值的减少量  $\Delta A$ 。

$$I = [(\Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{样品}}) / (\Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

### 1.4 真菌 F01-195 的培养

将菌株 F01-195 斜面接种于种子培养基(质量分数分别为: 淀粉 2%, 葡萄糖 1%, 黄豆饼粉 0.2%, 麦芽粉 0.6%, 酵母 0.5%,  $\text{CaCO}_3$  0.2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{NaCl}$  0.2%, pH 7.0), 27  $^{\circ}\text{C}$ , 220 r/min 培养 3 d。按 1% 接种量接种到固体培养基(质量分数为大米 97.5%, 黄豆饼粉 2.5%) 27  $^{\circ}\text{C}$  培养 14 d。

### 1.5 F01-195 的提取分离

F01-195 的固体培养物 2 kg, 用 6 L 乙酸乙酯萃取, 减压蒸去溶剂得到深褐色油状物 11 g。上述粗提物经硅胶柱( $\phi 3.6 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ )色谱, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 合并活性组分, 减压蒸干。该活性组分再通过半制备型 ODS HPLC 进行单组分的制备[流动相为  $\text{CH}_3\text{CN} + \text{H}_2\text{O}$  (35+65), 流速为 6 mL/min, 检测波长为 281 nm], 得到 1 个活性化合物 F01-195A (62 mg)。利用 HPLC 分析, 在 210 nm 处采用面积归一化法测得 F01-195A 纯度为 98%。

## 2 实验结果

### 2.1 醛糖还原酶活性测定结果

在最佳底物浓度和最佳反应温度条件下, 通过改变醛糖还原酶的质量浓度测得酶活曲线, 见图 1。结果表明, 醛糖还原酶的质量浓度在 0~1.00 g/L 内与酶活力(u)呈良好的线性关系,  $R^2 = 0.9973$ , 据曲线选定反

应体系中酶的质量浓度为 0.36 g/L.

2.2 化合物 F01-195A 的理化性质和化学结构

F01-195A 为黄色粉粒,易溶于甲醇、乙腈、丙酮、氯仿.ESI-MS 的测定结果显示该化合物的相对分子质量为 546.由<sup>1</sup>H NMR,<sup>13</sup>C NMR,DEPT,HSQC,HMBC 和相对分子质量推测,该化合物可能具有由 2 个相同部分组成的对称结构,每部分包含 13 个 H,15 个 C,其中有 3 个连氧的芳香或双键碳,7 个芳香或双键碳,1 个连氧季碳,2 个 CH<sub>2</sub>,1 个 CH<sub>3</sub> 和 1 个  $\text{C}=\text{O}$ .经紫外、质谱、核磁等理化数据分析并与文献[6-7]对照,确定 F01-195A 分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>,化学结构与已知的化合物 Flavomannin 相同,Flavomannin 已被报道作为了抗疟疾药物的先导化合物.该化合物对醛糖还原酶的抑制活性未见国内外报道,其化学结构见图 2,化学名为 6,6',7,7'-Tetrahydro-1,1',3,3',6,6',9,9'-octahydroxy-6,6'-dimethyl[2,2'-bianthracene]-8,8'(5,5'H)-dione.F01-195A 与 Flavomannin 的<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR 数据比较见表 1,它们的理化性质比较见表 2.

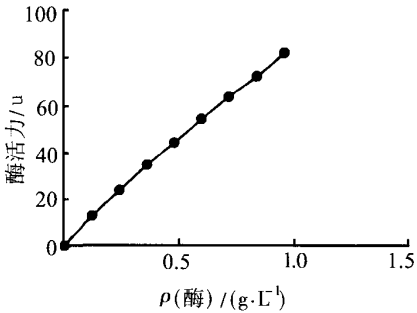


图 1 酶活性曲线  
Fig.1 Enzyme activity curve

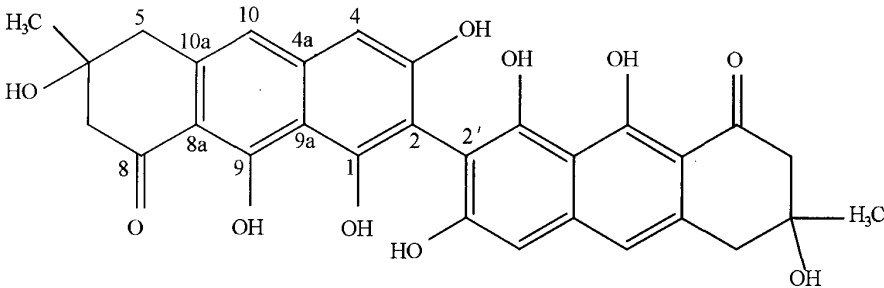


图 2 F01-195A 的化学结构式  
Fig.2 Structural formula for F01-195A

表 1 F01-195A 和 Flavomannin 的<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR 数据(DMSO-*d*<sub>6</sub>)  
Tab.1 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of F01-195A and Flavomannin(DMSO-*d*<sub>6</sub>)

位置	δ <sub>H</sub> (F01-195A)	δ <sub>C</sub> (F01-195A)	δ <sub>H</sub> (Flavomannin)
1		156.9	
2		107.3	
3		160.8	
4	6.645(1H, s)	101.6	6.60
5	2.919(1H, d, 15 Hz), 3.008(1H, d, 15 Hz)	42.4	2.89
6		69.6	
7	2.686(1H, d, 17 Hz), 2.922(1H, d, 17 Hz)	50.3	2.72
8		202.8	
9		166.0	
10	6.860(1H, s)	116.0	6.78
4a		139.8	
8a		107.6	
9a		106.0	
10a		136.6	
6-CH <sub>3</sub>	1.307(3H, s)	28.9	1.27
1-OH	9.875(1H, s)		
3-OH	10.061(1H, s)		10.12
6-OH	4.898(1H, s)		
9-OH	16.503(1H, s)		

表 2 F01-195A 和 Flavomannin 的理化性质

Tab.2 Physico-chemical properties of F01-195A and Flavomannin

化合物	外观	$\lambda_{\text{Max}}(\text{EtOH})/\text{nm}$	MS ( $m/z$ )	分子式
F01-195	黄色粉粒	236, 281, 326, 337, 417	547.4 (M+H)(ESI)	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$
Flavomannin	黄色粉粒	236, 281, 326, 337, 417	546(M)(EI)	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$

2.3 化合物 F01-195A 对醛糖还原酶的抑制活性

化合物 F01-195A 对醛糖还原酶的抑制活性的测定结果见图 3,从图 3 可以看出,化合物 F01-195A 对醛糖还原酶呈现出剂量依赖的抑制作用,其  $\text{IC}_{50}$  为  $57.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ .

3 讨论

近年来 ARI 的研究成了糖尿病治疗药物开发的新热点.已上市的 ARI 有索比尼尔、托瑞司他、依帕司他等,其中大部分来自化学合成,而且由于它们在临床上表现出不同程度的毒副作用,应用受到限制<sup>[1-2]</sup>,所以利用我国得天独厚的微生物资源研制高效低毒的 ARI 具有较广阔前景.

为了从微生物代谢产物库中筛选新的醛糖还原酶抑制剂,建立了这个体外的醛糖还原酶抑制剂的高通量筛选模型,将原来的单个比色皿法改为 96 孔板法,工作效率提高了数 10 倍.用该法筛选得到对醛糖还原酶有特异性抑制作用的化合物 F01-195A, $\text{IC}_{50}$  为  $57.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ .通过对该化合物的紫外、质谱、核磁等理化数据分析,确定了其化学结构,其结构与已知化合物 Flavomannin 相同.据报道,该化合物具有抗疟原虫活性,作为疟疾的防治药物进行研发<sup>[8]</sup>.

该化合物的产生菌种被鉴定为邬氏黄丝曲霉(*Talaromyces wortmannii* (Klöcker)),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC 1224.该菌种为云南野生菌,且培养条件为通用条件,化合物 F01-195A 产量已较高,相信对该菌种和培养条件进行优化,有相当的产业化潜力.

迄今,化合物 F01-195A 对醛糖还原酶的抑制活性国内外均未见报道.它的药理和毒理性质以及醛糖还原酶抑制剂的构效关系有待进一步研究,希望它能作为先导化合物为开发防治糖尿病并发症的药物打下一定的基础.

参 考 文 献:

[1] 张礼萍,龚炳永. 醛糖还原酶抑制剂的研究:上[J]. 国外医药抗生素分册,1997,18(1):5-8.  
[2] 张礼萍,龚炳永. 醛糖还原酶抑制剂的研究:下[J]. 国外医药抗生素分册,1997,18(3):206-208.  
[3] 姜成林,徐丽华. 微生物资源学[M]. 北京:科学出版社,1997.  
[4] MATSUMOTO K, NAGASHIMA K, KAMIGAUCHI T, et al. Salfredins, new aldose reductase inhibitors produced by *Cribulium* sp. RF-3817[J]. J Antibiot, 1995,48(6):439-446.  
[5] HAYMAN S, KINOSHITA J H. Isolation and properties of lens aldose reductase[J]. J Biol Chem, 1965, 240(2):877-882.  
[6] ATHERTON J, BYCROFT B W, JOHN C, et al. Studies in mycological chemistry. Part XXIII. The structure of Flavomannin, a metabolite of *Penicillium wortmanni* Klock[J]. J Chem Soc, 1968, Section C (20):2560-2564.  
[7] STEGLICH W, TOPFER-PETERSEN E, REININGER W. Isolation of Flavomannin-6, 6'-dimethyl ether and one of its racemates from higher fungi[J]. Phytochemistry, 1972,11:3299-3304.  
[8] FRANCOIS G, STEENACKERS T, ASSI L A, et al. Vismione H and structurally and related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure-activity relationships[J]. Parasitol Res, 1999,85(7):582-588.

(责任编辑:赵藏赏)

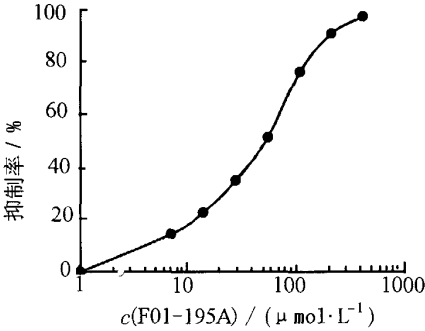


图 3 F01-195A 对醛糖还原酶的抑制活性

Fig.3 Inhibition activity of F01-195A to aldose reductase