

以莽草酸激酶为靶点的新型抗结核先导化合物的发现

王霞[#], 朱宁屿[#], 姜威^{*}, 司书毅^{*}

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所 国家新药(微生物)筛选实验室, 北京 100050)

摘要: 莽草酸激酶是莽草酸途径中的关键蛋白, 对结核分枝杆菌的生存至关重要。本研究首先建立了结核分枝杆菌莽草酸激酶 (*Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase, *MtSK*) 抑制剂筛选模型, 然后与耻垢分枝杆菌表型筛选方法联用, 对 12 万个化合物进行筛选, 最终发现了 1 个对 *MtSK* 蛋白有抑制作用且同时抑制耻垢分枝杆菌生长的化合物—IMB-T5297 [(*E*)-3-(3-(3-氯-5-甲氧基-4-(丙-2-炔-1-基氧基)苯基)丙烯酰基)-6-甲基-2*H*-吡喃-2,4(3*H*)-二酮]。体外酶促反应抑制实验表明, 化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 的半数抑菌浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 1.745 μg·mL⁻¹。表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 实验结果显示化合物 IMB-T5297 与 *MtSK* 蛋白的亲和力 K_D 值为 2.151×10^{-5} mol·L⁻¹。通过计算机软件模拟化合物与蛋白的分子对接模型, 初步分析了化合物 IMB-T5297 与 *MtSK* 的作用位点, 并对其中预测的 5 个关键氨基酸位点进行了突变研究。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-*H*-tetrazolium bromide, MTT] 实验表明, 化合物 IMB-T5297 对哺乳动物细胞的毒性很低。体外抗结核活性实验表明, 化合物 IMB-T5297 对结核分枝杆菌标准株 H37Rv 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 49.723 μg·mL⁻¹。综上所述, 虽然化合物 IMB-T5297 的抗结核活性较弱, 但对 *MtSK* 抑制作用较强, 通过结构改造可能成为新的抗结核先导化合物。

关键词: 结核分枝杆菌; 莽草酸激酶; 药物筛选; 抗结核药物

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0878-09

Identification of novel anti-tuberculosis lead compound targeting shikimate kinase

WANG Xia[#], ZHU Ning-yu[#], JIANG Wei^{*}, SI Shu-yi^{*}

(National Laboratory for Screening New Microbial Drugs, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Shikimate kinase is a key protein of the shikimic pathway, which is essential for the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. In this study, a screening assay for *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase (*MtSK*) inhibitor was developed. A 120 000-compound library was screened by the enzyme assay and the phenotype screening using *Mycobacterium smegmatis*. A hit compound named IMB-T5297 [(*E*)-3-(3-(3-chloro-5-methoxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)acryloyl)-6-methyl-2*H*-pyran-2,4(3*H*)-dione] was identified to be a selective inhibitor of *MtSK* with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 1.745 μg·mL⁻¹, which also showed antibacterial activity. The interaction between compound and protein was analyzed by surface plasmon resonance (SPR) experiment, which showed the K_D value was 2.151×10^{-5} mol·L⁻¹. The binding

收稿日期: 2018-03-31; 修回日期: 2018-05-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573474); 北京协和医学院小规模特色办学专项青年教师培养项目 (2015zlgc0745).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63022609, E-mail: imbjiangv@163.com;

Tel / Fax: 86-10-63180604, E-mail: sisymb@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0284

model of *MtSK* and compound was simulated by the computer program. Five key amino acids in the binding pocket were indispensable site-directed mutated to verify the model. IMB-T5297 inhibited *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of $49.723 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and displayed low cytotoxicity to mammalian cells. In this study, IMB-T5297 was identified as a selective inhibitor of *MtSK* enzyme with anti-tuberculosis activity. With additional structural modification, the compound has a potential to become a novel anti-tuberculosis compound.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; shikimate kinase; drug screening; anti-tuberculosis drug

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的一种慢性致死性疾病, 目前是世界十大致死疾病之一^[1]。近年来, 由于抗结核药物的大量使用、抗结核作用位点的突变、艾滋病和结核耐药菌株的出现等原因, 抗结核治疗面临严峻挑战。据世界卫生组织估算, 2016 年全球有 1040 万人患有结核病, 170 万人因该病死亡 (包括 40 万艾滋病病毒感染者), 有 60 万利福平耐药新发病例, 其中有 49 万耐多药结核病患者^[1]。耐多药结核病 (MDR-TB) 和广泛耐药结核病 (XDR-TB) 是控制和治疗结核病的重大挑战, 是结核病相关研究者的关注重点^[2-4]。然而, 近几十年来仅有强生公司的新型结核分枝杆菌 ATP 合成酶抑制剂贝达喹啉 (bedaquiline) 和日本大冢公司的德拉马尼 (delamanid) 两种抗结核药物被批准上市, 而且目前已有耐药菌株出现及引起不良反应的报道^[5]。因此, 寻找新的抗结核药物作用靶点, 开发新型抗结核药物迫在眉睫。

莽草酸途径广泛存在于自然界中, 是细菌、真菌、藻类和高等植物合成芳香族氨基酸、叶酸、泛醌、分枝菌酸等必需物质的一条重要代谢途径。共有 7 种酶参与了该途径催化反应, 分别是: 3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸-7-磷酸合酶、3-脱氢奎尼酸合酶、脱氢奎尼酸脱氢酶、莽草酸脱氢酶、莽草酸激酶、5-烯醇酮莽草酸-3-磷酸合酶和分支酸合酶^[6]。实验证明, 在细菌不补充外源芳香化合物的条件下, 该通路被阻断的突变株生长受到抑制, 证明该通路在维持细菌生命活动中起到至关重要的作用^[7, 8]。由于人体内不存在莽草酸途径, 所以该通路中的相关蛋白是有潜在吸引力的抗菌靶标^[7]。

结核分枝杆菌莽草酸激酶 (*MtSK*) 蛋白分子质量为 18.58 kD, 由 *aroK* 基因 (Rv2539c) 编码, 该蛋白催化莽草酸途径的第五步反应, 使磷酸基团从 ATP 转移至莽草酸, 生成 3-磷酸莽草酸并释放出 1 个 ADP 分子 (图 1)。实验发现, *aroK* 基因缺失导致 MTB 无法生长, 当回补外源性的 *aroK* 基因时, 突变株得以存活, 证明 *MtSK* 是维持 MTB 生长的必需蛋白^[9]。

本研究以 *MtSK* 为靶点, 克隆和表达 *MtSK* 蛋白并优化其测活方法, 建立了 *MtSK* 抑制剂筛选模型, 并对国家新药 (微生物) 筛选实验室化合物库进行筛选, 寻找结构新颖的抗结核先导化合物, 为抗结核药物的研发奠定基础。

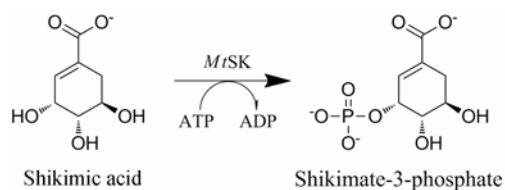


Figure 1 *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase (*MtSK*) catalyzes the formation of shikimate-3-phosphate from shikimic acid using ATP as co-substrate

材料与amp;方法

菌株与载体 大肠埃希菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 为本室保存; 耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 (ATCC 700084) 由本室保存; 结核分枝杆菌 H37Rv (ATCC 27294) 和临床耐药菌株 XDR-FJ05195 由中国疾控中心结核病室提供。pET30a 质粒由本实验室保存; T1 simple 质粒购买自北京全式金生物技术有限公司。人癌细胞 HeLa 和人胚胎肾细胞 HEK 293 为本室保存。

试剂与试剂盒 氨苄西林、Tris-HCl、四甲基二乙酸 (TEMED) 和异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl thiogalactoside, IPTG) 购自 Amresco 公司; 莽草酸、咪唑 (imidazole) 购自美国 Sigma 公司; 蛋白 Marker 购自 BIO-RAD 公司; 30% 丙烯酰胺-双丙烯酰胺溶液、4 \times 分离胶缓冲液、4 \times 浓缩胶缓冲液、R-250 考马斯亮兰染色液购自北京普利莱公司; 7H9 液体培养基和 ADC 增菌液购自 BD 公司。DNA Marker、胶回收试剂盒 EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit、质粒小提试剂盒 EasyPure[®] Plasmid MiniPrep Kit、突变试剂盒 Fast Mutagenesis System、蛋白质浓度测定试剂盒 BCA[™] Protein Assay Kit 购自 Thermo 公司; ATP 酶检测试剂盒 Kinase-Glo[®] Plus Luminescent Kinase Assay

购自 Promega 公司。

化合物库 筛选所用化合物库来自国家新药(微生物)筛选实验室, 纯度>95%, 可商业购买。

仪器 ÄKTA 蛋白层析系统、BIACORE T200、His trap™ HP 亲和层析柱为美国 GE Health 产品; 酶标仪为美国 Perkin Elmer 公司的 EnVision2014 型。

MtSK 蛋白的克隆、表达与纯化 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增基因 MtSK。引物使用 Primer 5.0 软件设计, 上游引物: 5'-GTTAC CATATGGCACCCAAAGCGGTTC-3' (*Nde* I), 下游引物: 5'-CGATACTCGAGTGTGGCCGCCTCGCT-3' (*Xho* I)。扩增体系 50 μL , 扩增的条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min。经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后, 连接到 pET30a 载体, 再转化 DH5 α 感受态细胞。经 PCR 和酶切法验证后, 进行测序。选取序列完全正确的质粒转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。挑取单克隆, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养。第二天以 1:100 比例转接于含 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基, 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8 时, 加入终浓度为 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG, 20 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 诱导表达 10 h。

离心收集菌体, 用裂解上样缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.8) 重悬, 采用压力破碎法裂解菌体, 20 Kpsi 压力下破碎 3 个循环, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 $\times g$ 将菌体离心 30 min, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤。由于表达的重组 MtSK 蛋白带有 His-tag 标签, 所以将所得滤液用 Ni²⁺ 螯合的 HisTrap™ HP 亲和层析柱进行亲和层析。用洗脱缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.8) 洗脱, 收集洗脱峰, 对纯化所得蛋白进行蛋白定量。

MtSK 蛋白活性的测定 根据 MtSK 催化莽草酸途径第 5 步反应的反应机制, 本研究使用了 Promega 公司开发的 Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay 试剂盒, 利用荧光法检测反应体系中 ATP 的消耗量, 对体外表达蛋白的活性进行了测定。该试剂盒通过检测反应体系中剩余的 ATP 含量来测定 MtSK 蛋白活性。底物中的昆虫萤光素酶能够消耗 ATP 催化相应的底物产生发光物质。如果激酶蛋白活性越强, 则酶促反应结束后剩余的 ATP 量越少, 萤光素酶催化生成的发光物质也就越少。当 ATP 浓度在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内时, 发光强度与体系中 ATP 浓度存在线性关系, 与激酶活性呈负相关。

根据说明书及查阅 MtSK 活性测定相关文献^[10,11], 本研究设定酶活性检测体系如下: 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 莽草酸, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MtSK 蛋白。荧光测活体系反应体积为 50 μL , 反应在 96 孔板中进行。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 15 min 后, 加入等体积的 Kinase-Glo® Plus 检测试剂, 室温孵育 10 min, 使发光信号稳定, 将 96 孔板放入酶标仪中检测。同时设立不加 MtSK 组作为空白对照。

耻垢分枝杆菌 mc²155 对化合物库进行初筛 由于 MTB 生长速度过慢, 无法满足大量的体外筛选要求, 因此本研究选择与 MTB 高度同源的耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 作为体外筛选的模式菌, 对化合物库中 12 万个样品进行初步筛选。筛选方法如下: 在 96 孔板中进行, 耻垢分枝杆菌用 7H9 培养基 (含 10% ADC) 培养, 接菌量为 5 \times 10⁵ CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 200 μL 。化合物的筛选终质量浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 观察结果。将抑制耻垢分枝杆菌生长的化合物建立初筛阳性库。

MtSK 蛋白抑制剂高通量筛选模型的建立与筛选 运用上述酶活测定方法, 对建立的初筛阳性化合物库中样品以终质量浓度 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行筛选。同时设立空白对照: 以不加 MtSK 为阳性对照 (即酶活性完全被抑制), 以加入与化合物等体积的 DMSO 组为阴性对照 (即未加抑制剂)。抑制率计算公式: 酶抑制率 IP (%) = [1-($\Delta S_P - \Delta S_S$) / ($\Delta S_P - \Delta S_N$)] \times 100%。其中, ΔS_P 是不加 MtSK 对照孔的发光值, ΔS_N 是加入等体积 DMSO 对照孔的发光值, ΔS_S 是样品实验孔的发光值。

根据上述条件, 对建立的初筛阳性化合物库中样品进行筛选, 并按照相同的反应条件和方法进行复筛。经排除假阳性后, 得到抑制效果最好的活性化合物 IMB-T5297。

化合物 IMB-T5297 在耻垢分枝杆菌的 MIC 测定 在 96 微孔板中进行, 耻垢分枝杆菌用 7H9 培养基 (含 10% ADC) 培养, 接菌量为 5 \times 10⁵ CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 200 μL 。化合物的终质量浓度为 0、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 观察结果, 以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

化合物在 MtSK 蛋白抑制剂模型上的 IC₅₀ 测定 将筛选得到的活性化合物 IMB-T5297 溶于 DMSO 中, 配置成 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 母液, 将化合物倍比稀释, 分别获

得不同浓度条件下的抑制率, 以抑制剂浓度的对数为横坐标, 抑制率为纵坐标, 利用 Graphpad prism 5 软件计算半数抑菌浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

HPLC 方法验证化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 蛋白的抑制作用 *MtSK* 催化莽草酸途径第 5 步反应时会生成 3-磷酸莽草酸并释放出 1 个 ADP 分子。根据此反应机制, 参考 Tan 等^[12]建立的 HPLC 法测定术后疲劳综合征大鼠骨骼肌 ATP、ADP 和 AMP 含量的方法, 利用 HPLC 法测定反应中生成的 ADP 含量, 验证化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 蛋白的抑制作用。

HPLC 法采用色谱柱 Agilent ZORBAX SB-Aq (4.6 mm×150 mm, 5 μ m), 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流动相为 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (含 12 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二钠和 88 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠, pH 6.5)-甲醇 (体积比 99.9 : 0.1); 流速 1 mL·min⁻¹; 紫外检测波长为 254 nm; 进样量为 10 μ L。

IMB-T5297 对 *MtSK* 蛋白的抑制作用的酶动力学性质研究 筛选条件下, 分别将底物莽草酸的浓度、化合物 IMB-T5297 的浓度进行倍比稀释, 分别获得不同莽草酸浓度条件下不同化合物浓度的抑制率。采用 Lineweaver-Burk 作图法以莽草酸浓度的倒数为横坐标, 反应速度的倒数为纵坐标作图, 采用多个抑制剂浓度, 得出不同抑制剂浓度的直线, 由这些直线的交点位置推测抑制剂的类型。

SPR 实验检测 IMB-T5297 与 *MtSK* 蛋白的结合情况 表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 实验是利用表面等离子体共振现象和 SPR 谱峰对金属表面上电介质变化敏感的特点, 通过将受体蛋白固定在金属膜上, 检测受体蛋白与液相中配体小分子的特异性结合。由于 *MtSK* 蛋白在酸性条件下可以保持稳定, 因此可以使用 CM5 芯片进行 SPR 实验。实验缓冲溶液系统为 PBS-P⁺缓冲液, 由 Biacore T200 System (GE Healthcare) 仪器完成。

***MtSK* 蛋白突变** 采用 Discovery Studio 4.0 软件对化合物 IMB-T5297 与 *MtSK* (PDB ID: 2IYQ) 进行分子对接, 根据打分最高的对接模型分析化合物作用机制。本研究通过对对接模型推测了一些影响化合物和蛋白结合的关键氨基酸位点, 并选取其中 5 个关键氨基酸进行突变: Asp34→Ala34、Arg58→Ala58、Gly81→Ala81、Arg117→Ala117、Arg136→Ala136。按照突变试剂盒说明书对 PET30a-*MtSK* 质粒进行定点突变, 突变后的质粒分别命名为 PET30a-*MtSK*-

Asp34、PET30a-*MtSK*-Arg58、PET30a-*MtSK*-Gly81、PET30a-*MtSK*-Arg117、PET30a-*MtSK*-Arg136。把突变后的质粒转入 *E.coli* BL21 (DE3) 菌株, 将阳性菌株送到生物公司进行测序, 使用测序正确的菌株分别进行蛋白纯化, 并对突变蛋白活性进行测定。

MTT 比色法检测化合物 IMB-T5297 的细胞毒性 根据活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT) 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。采用 MTT 法来检测阳性化合物 IMB-T5297 对人癌细胞 HeLa 和人胚胎肾细胞 HEK293 存活的影响, 从而初步判断 IMB-T5297 对人体细胞是否有毒性。MTT 检测步骤见文献^[13]。

化合物 IMB-T5297 抗结核活性测定 应用 Lu 等^[14]建立的 Alamar Blue 法在无菌 96 微孔板中测定化合物 IMB-T5297 抗结核活性。接种菌株为结核杆菌标准株 H37Rv 和临床分离耐药株 XDR-FJ05195, 接菌量为 1×10^6 CFU·mL⁻¹, 每孔 100 μ L。化合物 IMB-T5297 的终质量浓度为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μ g·mL⁻¹。同时设置阳性对照孔 (不加化合物的培养基) 和阴性对照孔 (以蒸馏水取代培养基)。按 Alamar Blue 法进行培养, 观察各孔颜色的变化, MIC 定义为从蓝色变为粉红色的最低药物浓度。

结果

1 重组 *MtSK* 质粒 pET30a-*MtSK* 的构建与表达

MtSK PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测的结果与预期片段大小 (531 bp) 一致, 重组质粒 pET30a-*MtSK* 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后得到两条 DNA 片段, 大小分别与 *MtSK* 基因 (531 bp) 和 pET30a 载体 (5422 bp) 一致。经 DNA 测序结果证明, 重组质粒 pET30a-*MtSK* 构建成功。转入重组质粒 pET30a-*MtSK* 的大肠杆菌经 IPTG 诱导表达蛋白, 经 HisTrapTM HP 亲和层析柱纯化, 得到较高纯度的 *MtSK* 蛋白 (图 2)。

2 *MtSK* 蛋白的活性测定

使用商业化的荧光检测试剂盒 Kinase-Glo[®] Plus Luminescent Kinase Assay 测定 *MtSK* 酶活性, 确认表达纯化的 *MtSK* 蛋白是否具有活性。实验测定了 *MtSK* 浓度分别为 0、0.25、0.5、1、2、4 和 8 μ g·mL⁻¹, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min 时的发光值, 测定结果如图 3, 结果显示纯化得到的 *MtSK* 蛋白具有良好的催化活性。

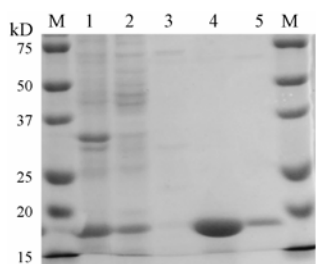


Figure 2 *MtSK* SDS-PAGE. M: Protein marker; 1: The proteins of whole bacteria; 2: The proteins of supernatant; 3: 20% elution fraction; 4: 60% elution fraction; 5: 100% elution fraction

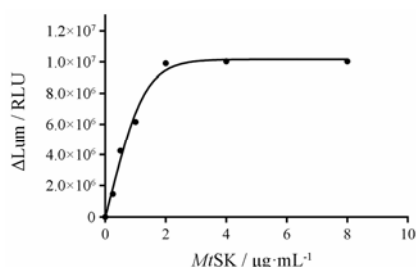


Figure 3 Change of luminescence value (Lum) of *MtSK* reaction. The luminescence value was measured when the reaction was carried out for 15 min with *MtSK* (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 or 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). RLU: Relative light units

3 耻垢分枝杆菌 mc²155 对化合物库进行初筛

用耻垢分枝杆菌对化合物库中 12 万个样品进行筛选, 若化合物抑制耻垢分枝杆菌生长, 则认为是初筛阳性化合物。经过筛选, 共得到 267 个初筛阳性化合物, 建立初筛阳性化合物库。

4 *MtSK* 蛋白抑制剂高通量筛选模型的评价

以酶活测定反应为基础建立高通量筛选模型, 经评价, 其 Z' 因子为 0.81, 信号噪音比、信号背景比均符合高通量筛选的要求。设定抑制率大于 50% 为初筛阳性化合物, 得到 5 个阳性化合物, 阳性率为 2%。通过进一步复筛, 选取抑制作用最强的化合物 IMB-T5297 进行深入研究。化合物 IMB-T5297 的结构如图 4A 所示。

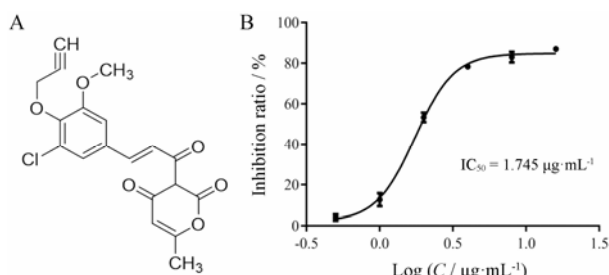


Figure 4 Characteristics of compound IMB-T5297. A: Chemical structure of compound IMB-T5297 [(*E*)-3-(3-(3-chloro-5-methoxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)acryloyl)-6-methyl-2*H*-pyran-2,4(3*H*)-dione]. B: Dose-response curve for the inhibition of *MtSK* by compound IMB-T5297. Different concentration of compound IMB-T5297 (16, 8, 4, 2, 1, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added in the system, and the IC_{50} value was plotted as the ratio of the radioactivity signal over the concentration of compound (log plot) that fitted to a variable-slope dose-response equation. The experiment was repeated three times

5 化合物在 *MtSK* 蛋白抑制剂模型上的 IC_{50} 测定

化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 活性抑制作用如图 4B 所示, 随着化合物 IMB-T5297 浓度的增高, 对 *MtSK* 活性抑制作用越来越强, 表现出明显的剂量依赖性。通过 Graphpad prism 5 软件拟合曲线得知, 化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 酶活性 IC_{50} 约为 $1.745 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

6 HPLC 方法验证化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 蛋白的抑制作用

为了验证 HPLC 方法的可行性, 首先配制了 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ADP 对照品储备液, 用超纯水将对照品储备液分别稀释成 2560、1280、640、320、160、80、40、20、10 和 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在与样品相同条件下进行测定。结果表明 ADP 在 $5\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好, 样品的检测浓度在线性范围内 (图 5A)。

HPLC 分别检测了在 2 和 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP 浓度下, 浓度分别为 0、2、4、8 和 $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 的抑制作用, 再次证明 IMB-T5297 对 *MtSK* 的抑制作用具有浓度依赖性, 同时说明 ATP 浓度影响较小 (图 5B)。

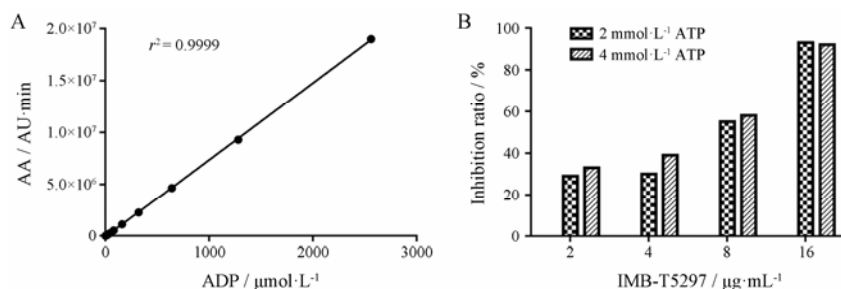


Figure 5 Detecting interaction between compound IMB-T5297 and *MtSK* by HPLC. A: The standard curve of ADP. B: Inhibition rate of compound IMB-T5297 under different ATP concentration to *MtSK* ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). AA is the peak area of ADP. AU: Absorbance unit

7 化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 蛋白抑制作用的酶动力学性质研究

对 *MtSK* 蛋白具有抑制作用的阳性化合物酶动力学性质进行研究, 在不同浓度抑制剂的作用下, 反应速度随底物浓度的变化, 采用 Lineweaver-Burk 作图法以莽草酸浓度的倒数为横坐标, 反应速度的倒数为纵坐标作图。结果显示, 不同浓度化合物抑制率的直线大致交于纵轴正半轴, 推测化合物 IMB-T5297 可能为莽草酸的竞争性抑制剂 (图 6)。

8 SPR 实验证明化合物 IMB-T5297 与 *MtSK* 蛋白的结合

经反复实验发现, *MtSK* 蛋白在 pH 5 酸性条件下可以保持稳定, 所以选用 CM5 芯片进行 SPR 实验, 缓冲溶液系统为 PBS-P⁺ 缓冲液, 实验由 BIACORE T200 仪器完成。首先通过 CM5 芯片表面与 *MtSK* 蛋白 His 标签的螯合作用捕获目标蛋白, 控制蛋白结合信号在 7 500 RU 左右。化合物 IMB-T5297 溶解在运行缓冲液中, 配制成浓度梯度。在运行缓冲液 PBS-P⁺ 缓冲液中加入 2% DMSO, 增加化合物溶解性。IMB-T5297 浓度从低到高分别为 1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验结果显示, 化合

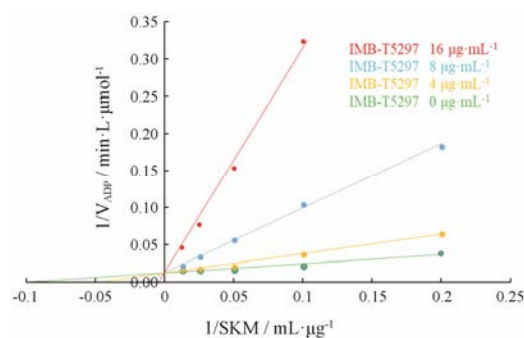


Figure 6 *In vitro* mode of inhibition graphs of compound IMB-T5297 against substrate of shikimic acid (SKM). Lineweaver-Burk plot of $1/V_{\text{ADP}}$ ($\text{min}\cdot\text{L}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) against $[\text{SKM}^{-1}]$ ($\text{mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) at 0, 4, 8, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of IMB-T5297

物 IMB-T5297 能够以剂量依赖性方式与 *MtSK* 蛋白发生结合 (图 7A)。拟合曲线表明, 该实验可信度较高, 化合物 IMB-T5297 与 *MtSK* 蛋白结合的 K_D 值为 2.151×10^{-5} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 亲和力较高 (图 7B)。

9 *MtSK* 突变蛋白活性分析

化合物 IMB-T5297 与 *MtSK* 蛋白的对接结果如图 8 所示, 化合物与 *MtSK* 蛋白 58、81、117、136 位

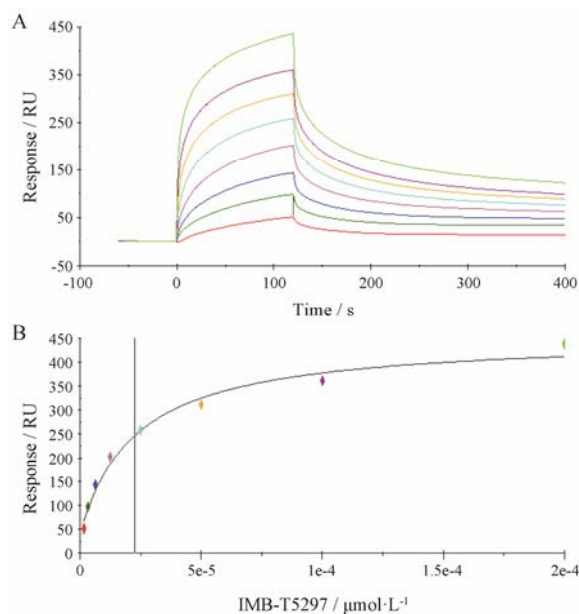


Figure 7 Detecting interaction between compound IMB-T5297 and *MtSK* by surface plasmon resonance (SPR). A: Compound IMB-T5297 binding towards *MtSK* determined by Biacore surface plasmon resonance. A sensor chip coated with purified *MtSK* was exposed to various concentrations of IMB-T5297. Sensorgrams generated by gradient concentrations of compound IMB-T5297 using the SPR aptasensor. The concentration from bottom to top was 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. B: Fitting curve of compound IMB-T5297 and *MtSK*. SPR responses generated from gradient concentrations of compound IMB-T5297 using the SPR aptasensor. The concentration of compound IMB-T5297 from left to right was 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. RU: Response unit

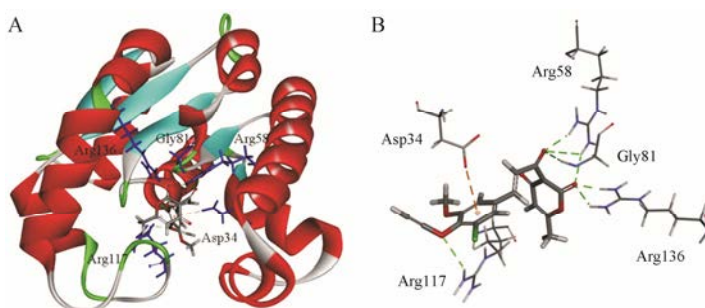


Figure 8 Molecular docking of *MtSK* (PDB ID: 2IYQ) and compound IMB-T5297 by Discovery Studio 4.0. A: Overview of the active pocket of *MtSK* bound to IMB-T5297. IMB-T5297 is represented by a stick model. The blue sticks represent the amino acid residues interacting with IMB-T5297; B: The hydrogen bond formed between amino acid residues (Arg58, Gly81, Arg117, Arg136) and compound IMB-T5297 is marked green color line. The Pi-anion interaction formed between amino acid residue (Asp34) is marked orange color line

氨基酸之间存在结合力较强的氢键, 与 34 位氨基酸之间形成 Pi-anion 相互作用, 推测这 5 个位点的氨基酸可能是化合物 IMB-T5297 与 *MtSK* 蛋白结合的关键氨基酸。

本研究使用点突变试剂盒把以上 5 个位点的氨基酸分别突变为丙氨酸, 突变完成的质粒分别标记为 PET30a-*MtSK*-Asp34、PET30a-*MtSK*-Arg58、PET30a-*MtSK*-Gly81、PET30a-*MtSK*-Arg117、PET30a-*MtSK*-Arg136。将突变完成的质粒转入表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行表达, 经 HisTrap™ HP 亲和层析柱纯化蛋白, 得到较高纯度的 *MtSK* 突变蛋白 (图 9A)。用上述 *MtSK* 酶活测定方法对纯化得到的 5 个突变蛋白进行活性测定, 结果表明仅有 Arg58 突变对酶活性影响较小 (图 9B)。分别测定化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 原蛋白及 *MtSK*-Arg58 突变蛋白的抑制率 (图 10), 结果显示化合物 IMB-T5297 对 *MtSK*-Arg58 突变蛋白的 IC_{50} ($2.992 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 高于对 *MtSK* 原蛋白 IC_{50} ($1.507 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 说明相同浓度的化合物对 *MtSK* 原蛋白的抑制作用更强。因此推测, Arg58 很有可能是 *MtSK* 与化合物 IMB-T5297 结合的关键位点。

10 MTT 比色法检测化合物 IMB-T5297 的细胞毒性

采用 MTT 法检测化合物 IMB-T5297 对人宫颈癌

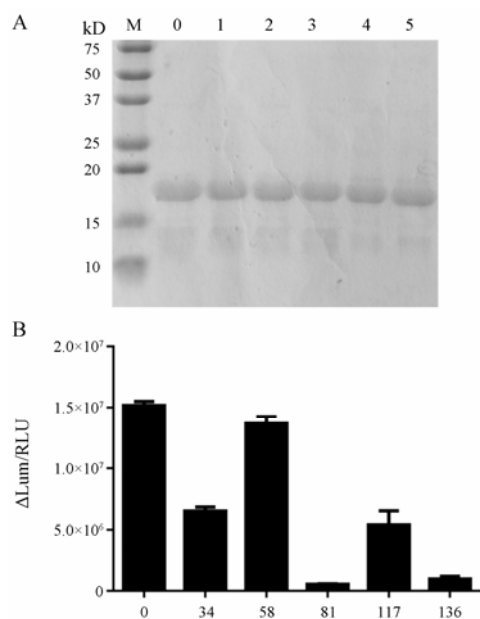


Figure 9 Characteristics of *MtSK* protein and mutant proteins. A: SDS-PAGE of *MtSK* protein and mutant proteins. M: Protein marker; 0: *MtSK*; 1: *MtSK*-Asp34; 2: *MtSK*-Arg58; 3: *MtSK*-Gly81; 4: *MtSK*-Arg117; 5: *MtSK*-Arg136. B: Comparison of activity of *MtSK* protein and mutant proteins. 0, 34, 58, 81, 117, 136 on the axis of abscissa represented *MtSK* protein, *MtSK*-Asp34 protein, *MtSK*-Arg58 protein, *MtSK*-Gly81 protein, *MtSK*-Arg117 protein, *MtSK*-Arg136 protein, respectively

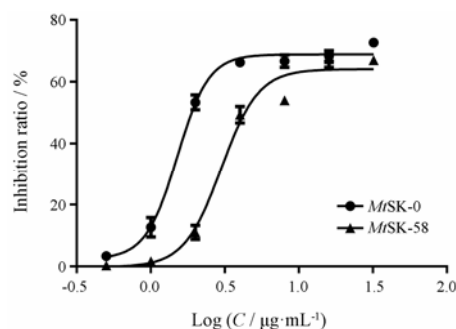


Figure 10 Dose-response curve for the inhibition of *MtSK*-0 and *MtSK*-58 by compound IMB-T5297. Different concentration of compound IMB-T5297 (32, 16, 8, 4, 2, 1, $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added in the system, and the IC_{50} value was plotted as the ratio of the radioactivity signal over the concentration of compound (log plot) that fitted to a variable-slope dose-response equation. The IC_{50} of compound IMB-T5297 to *MtSK*-0 and *MtSK*-58 are 1.507 and $2.992 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively

细胞 HeLa 和人胚胎肾细胞 HEK 293 的毒性影响。结果显示, 化合物 IMB-T5297 在质量浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对 HeLa 细胞和 HEK293 细胞的生长均无明显影响, 说明化合物 IMB-T5297 对细胞毒性较小或无毒。

11 化合物 IMB-T5297 抗菌活性

化合物 IMB-T5297 对耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* mc²155)、结核分枝杆菌标准株 H37Rv (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) 和临床分离耐药株 XDR-FJ05195 的 MIC 分别为 20、49.723 和 $47.754 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (表 1)。

Table 1 Anti-tuberculosis activity of compound IMB-T5297

Strain	Minimum inhibitory concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	IMB-T5297	Rifampicin	Isoniazid
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	20	0.5	0.5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	49.723	0.25	0.25
XDR-FJ05195	47.754	>256	4

讨论

根据结核分枝杆菌 *MtSK* 晶体结构数据 (PDB: 2IYQ) 与相关文献^[15]报道, *MtSK* 蛋白拥有一个盖子结构域 (Gly112-Asp124) 和一个 NMP 结合域 (Thr33-Glu61)。后者是该蛋白的主要活性区域, 也是莽草酸分子的结合口袋。莽草酸分子的羧基与 Arg58 和 Arg136 作用, 3 号位的羟基与 Asp34、Gly80 残基作用, 同时 2 号位的羟基与 Asp34 也有相互作用^[16]。本文通过对 *MtSK* 原蛋白及 5 个突变蛋白进行酶活性分析, 发现 Asp34、Arg117、Gly81、Arg136 对维持 *MtSK* 的蛋白活性具有重要作用, 但由于突变蛋白活性较

低, 无法测定这些氨基酸是否对化合物与蛋白的结合起到关键作用。而 Arg58 突变蛋白仍保留大部分活性, 所以本文比较了化合物 IMB-T5297 对 *MtSK* 原蛋白及 *MtSK*-Arg58 突变蛋白的抑制率, 结果显示化合物对 *MtSK*-Arg58 突变蛋白的抑制率明显降低, 说明化合物很可能与 Arg58 形成氢键并与莽草酸竞争性结合蛋白的活性位点, 进而抑制了蛋白的催化活性。

过去大多数对 *MtSK* 抑制剂的研究停留在通过计算机辅助药物设计, 合成天然底物类似物阶段^[17-19]。近年来, 由于 *MtSK* 具有良好的成靶潜力, 人们对其抑制剂进行了更深入研究。Mulabagal 和 Calderón^[10]首次使用超滤液相色谱/质谱 (UF-LC/MS) 和液质联用 (LC/MS) 方法筛选 *MtSK* 抑制剂, 评估了 4 个化合物对 *MtSK* 蛋白的抑制作用, 其中 3 个化合物是吡啶啉酮类似物, 一个是星形孢菌素。Masoko 等^[20]首次从传统草药 *Sutherlandia frutescens* 中分离得到 *MtSK* 抑制剂—— α -亚麻酸, 该化合物是一种含有 3 个双键的多元不饱和脂肪酸。Mehra 等^[21]首次报道了 *MtSK* 变构位点的抑制剂——苯并噻唑类化合物 5489375, 该化合物可能主要与莽草酸结构域的残基结合, 与残基 Arg43、Ile45 和 Phe57 形成重要的相互作用, 从而阻止了 Arg117 的胍基基团与 3-磷酸莽草酸的磷酸基团之间形成强的盐桥相互作用, 影响了产物的释放。Simithy 等^[22]使用 LC/MS 方法检测了来自美国国家过敏症和传染病研究所 (NIAID) 的 404 个抗结核化合物对 *MtSK* 蛋白的抑制作用, 得到 14 个对 *MtSK* 有抑制作用的化合物, 这些化合物的骨架结构均为噁二唑-酰胺或 2-氨基苯并噻唑。但在最新研究中, Alturki 等^[23]利用液质联用、质谱、动态光散射和透射电子显微镜等实验技术对 Simithy 等^[22]得到的 14 个化合物进行研究, 发现这 14 个化合物是通过形成聚集体而抑制 *MtSK* 活性, 是 *MtSK* 的非特异性抑制剂。以上结果提示, 在研究以噁二唑-酰胺或 2-氨基苯并噻唑为骨架的化合物作为 *MtSK* 抑制剂时, 要注意排除假阳性。本文筛选得到的化合物 IMB-T5297 是一个含有苯环的二酮类化合物, 与上述所有研究者得到的 *MtSK* 抑制剂结构不同, 具有较强的新颖性, 为 *MtSK* 抑制剂的结构优化提供了参考。

本研究获得了一个 *MtSK* 的选择性抑制剂 IMB-T5297。该化合物表现出一定的体外抗结核活性, 与 *MtSK* 亲和力较好, 抑制作用较强, 且没有明显的细胞毒性, 通过结构改造有可能成为抗结核先导化合物, 为发现新机制的抗结核药物提供了有价值的新思路。

References

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report [R]. Geneva: WHO Press, 2017: 1–10.
- [2] Lu Y, Qiao F, You XF, et al. Research progresses of *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450s as a potential drug target [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 427–434.
- [3] Yang X, Zang X. Recent advances in study of mycobacterial membrane protein large 3 inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1379–1386.
- [4] Gunther G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges [J]. *Clin Med (Lond)*, 2014, 14: 279–285.
- [5] Hoffmann H, Kohl TA, Hofmann-Thiel S, et al. Delamanid and bedaquiline resistance in *Mycobacterium tuberculosis* ancestral Beijing genotype causing extensively drug-resistant tuberculosis in a Tibetan refugee [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193: 337–340.
- [6] Kapnick SM, Zhang Y. New tuberculosis drug development: targeting the shikimate pathway [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2008, 3: 565–577.
- [7] Ducati RG, Basso LA, Santos DS. Mycobacterial shikimate pathway enzymes as targets for drug design [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8: 423–435.
- [8] Starcevic A, Akthar S, Dunlap WC, et al. Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 2533–2537.
- [9] Parish T, Stoker NG. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbiology*, 2002, 148: 3069–3077.
- [10] Mulabagal V, Calderón AI. Development of an ultrafiltration-liquid chromatography/mass spectrometry (UF-LC/MS) based ligand-binding assay and an LC/MS based functional assay for *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase [J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 3616–3621.
- [11] Simithy J, Gill G, Wang Y, et al. Development of an ESI-LC-MS-based assay for kinetic evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase activity and inhibition [J]. *Anal Chem*, 2015, 87: 2129–2136.
- [12] Tan SJ, Yu Z, Du L, et al. HPLC determination of ATP, ADP and AMP in skeletal muscle of rats of postoperative fatigue syndrome [J]. *Chin J Pharm Anal (药分析杂志)*, 2011, 31: 2025–2029.
- [13] Kanamaru T, Nakano Y, Toyoda Y, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of TAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Antimicrob Agents*

- Chemother, 2001, 45: 2455–2459.
- [14] Lu Y, Wang B, Zheng M, et al. Study of Alamar blue and MTT assays for determining the MIC of anti-tuberculosis drugs [J]. Chin J Antituberc (中国防痨杂志), 2007, 29: 499–501.
- [15] Gan J, Gu Y, Li Y, et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase in complex with shikimic acid and an ATP analogue [J]. Biochemistry, 2006, 45: 8539–8545.
- [16] Pereira JH, de Oliveira JS, Canduri F, et al. Structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the binding of shikimic acid [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004, 60: 2310–2319.
- [17] Kumar M, Verma S, Sharma S, et al. Structure-based in silico design of a high-affinity dipeptide inhibitor for novel protein drug target shikimate kinase of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chem Biol Drug Des, 2010, 76: 277–284.
- [18] Vianna CP, de Azevedo WF Jr. Identification of new potential *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitors through molecular docking simulations [J]. J Mol Model, 2012, 18: 755–764.
- [19] Blanco B, Prado V, Lence E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitors: design and simulation studies of the catalytic turnover [J]. J Am Chem Soc, 2013, 135: 12366–12376.
- [20] Masoko P, Mabusa IH, Howard RL. Isolation of alpha-linolenic acid from *Sutherlandia frutescens* and its inhibition of *Mycobacterium tuberculosis*' shikimate kinase enzyme [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 366.
- [21] Mehra R, Rajput VS, Gupta M, et al. Benzothiazole derivative as a novel *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitor: identification and elucidation of its allosteric mode of inhibition [J]. J Chem Inf Model, 2016, 56: 930–940.
- [22] Simithy J, Reeve N, Hobrath JV, et al. Identification of shikimate kinase inhibitors among anti-*Mycobacterium tuberculosis* compounds by LC-MS [J]. Tuberculosis (Edinb), 2014, 94: 152–158.
- [23] Alturki MS, Fuanta NR, Jarrard MA, et al. A multifaceted approach to identify non-specific enzyme inhibition: application to *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28: 802–808.