

低毒烟曲霉素类药物在医药领域的研究进展

王彬¹,王碧¹,陈旺^{1,2,3},胡代花^{1,2,3},段丛雪¹,赵正栋^{1,3,4},冯自立^{1,2,4}

(1 陕西理工大学生物科学与工程学院,汉中 723000; 2 秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室,汉中 723000; 3 陕西萃程生物医药科技有限公司,汉中 723000; 4 汉中市天然药物基础与应用重点实验室,汉中 723000)

[摘要] 烟曲霉素是从烟曲霉菌的液体发酵培养液中分离纯化得到的一种天然不溶于水的抗生素。烟曲霉素及其衍生物具有抗肿瘤、抗肥胖和治疗微孢子虫病等多种生物活性,被广泛应用于医药领域。本文主要综述了烟曲霉素及其基于 C6 位结构修饰的几种常见衍生物 Fumagillin B, TNP-470, CKD-732 及 PPI-2458 的分子结构性质、生物活性、应用及作用机制等,并对其分离纯化工艺、活性研究和应用前景进行了展望,以期对低毒性烟曲霉素类药物在医药治疗和临床研究领域的进一步应用提供参考。

[关键词] 烟曲霉素;烟曲霉素衍生物;抗肿瘤;抗肥胖;作用机制;甲硫氨酸氨基肽酶-2

[中图分类号] R963 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)18-1850-08

Research progress in application of low toxic fumagillin in medicine field

WANG Bin¹, WANG Bi¹, CHEN Wang^{1,2,3}, HU Dai-hua^{1,2,3}, DUAN Cong-xue¹,
ZHAO Zheng-dong^{1,3,4}, FENG Zi-li^{1,2,4}

(1 School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2 State Key Laboratory of Qinba Bioresources and Eco-Environment, Hanzhong 723000, China; 3 Shaanxi Cuicheng Biomedical Technology Co., Ltd., Hanzhong 723000, China; 4 Hanzhong Key Laboratory of Natural Medicine Foundation and Application, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] Fumagillin is a natural insoluble antibiotic isolated and purified from the liquid fermentation medium of *Aspergillus fumigatus*. Fumagillin and its derivatives have been found to have a variety of biological activities such as anti-tumor, anti-obesity and anti-microsporidiosis, so they are widely used in the field of medicine. The molecular structure properties, biological activity, application and mechanism of action of fumagillin and its several common derivatives based on C6 site modification, such as fumagillin B, TNP-470, CKD-732 and PPI-2458 are reviewed in this article, and the separation and purification process, activity research and application prospect are prospected in order to provide reference for the further application of low toxic fumagillin and its derivatives in clinical practice and research.

[Key words] fumagillin; fumagillin derivatives; anti-tumor; anti-obesity; mechanism of action; type 2 methionine aminopeptidase

烟曲霉素(fumagillin)别名夫马吉林、夫马菌素,性状为淡黄色针状结晶,属于有机酸性物质。烟

曲霉素是一种从烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)的发酵培养液中提取、分离、纯化得到的具有多种生物活性的霉菌毒素,也是一种抗生素^[1-2]。烟曲霉素作为一种天然的不溶于水的抗生素,最初被广泛应用于治疗蜜蜂及鱼类的微孢子虫病的抗生素类特效药^[3-4]。Ingber等^[5]于1990年研究发现烟曲霉素具有抗肿瘤血管生成活性,其通过切断肿瘤细胞周围的血液供给达到抗肿瘤的作用。因此,烟曲霉素

[基金项目] 陕西省科技厅计划项目(2022SF406);陕西理工大学博士启动基金资助项目(SLGQD2017-11)

[作者简介] 王彬,男,硕士研究生,主要从事天然药物生物技术。
E-mail:1095344707@qq.com。

[通讯作者] 冯自立,男,教授,主要从事天然药物分离纯化及构效关系研究。E-mail:fengzili@snut.edu.cn。

作为血管生成抑制剂存在巨大的潜在医用价值。An 等^[6]研究发现烟曲霉素还具有诱导体重减轻达到抗肥胖的作用。烟曲霉素由于其毒性而不能被广泛使用,现已基于烟曲霉素 C6 位进行结构修饰,开发出一些毒性较小且稳定性更佳半合成衍生物,已在临床应用领域代替烟曲霉素。本文综述烟曲霉素及其几种半合成衍生物的结构性质、作用机制及其在抗肿瘤和抗肥胖等方面的作用,旨在为烟曲霉素类药物应用于我国医药领域提供参考。

1 烟曲霉素及其衍生物的分子结构与生物活性

1.1 烟曲霉素的分子结构性质及生物活性

烟曲霉素(见图 1)是烟曲霉菌天然分泌的一种抗生素,分子量为 $458.54 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。其主要生物活性部位为环己烷部分,环己烷上的三元环氧化物结构的完整性为烟曲霉素是否具有活性的主要结构^[7-8],环己烷还具有通过酯键连接到环己烷的癸四烯二酸、甲氧基和脂肪族链,该脂肪族链衍生自萜烯并含有另一种环氧化物。

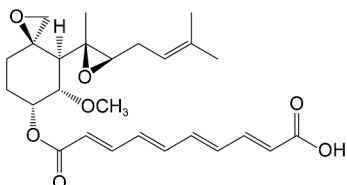
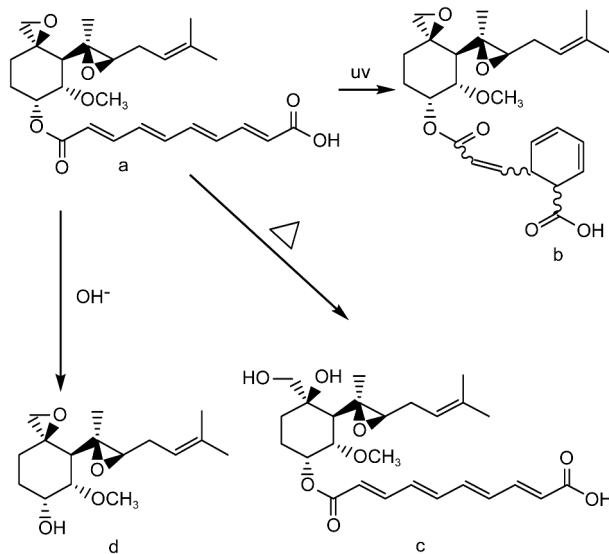


图 1 烟曲霉素的化学结构式

烟曲霉素起初主要应用于治疗由各种蜜蜂及鱼类引起的微孢子虫病。1990 年,研究发现烟曲霉素具有抗肿瘤血管生成活性^[5]。1997 年,研究确定了烟曲霉素的分子靶标为 2 型甲硫氨酸氨基肽酶(methionine aminopeptidase-2, MetAP-2)。因此,血管生成受到 MetAP-2 的调节。此外, MetAP-2 抑制剂已被证明可以减轻肥胖小鼠和人类的体重^[9-11]。烟曲霉素及其衍生物通过环己烷上环氧化物的氧环结构,以共价键结合到 MetAP-2 的活性部位组氨酸 His²³¹ 上,是 MetAP-2 的不可逆抑制剂,但不抑制 MetAP-1。

烟曲霉素的分子结构性质不稳定,在紫外光(UV)照射、加热及碱性条件下均容易发生降解(见图 2)^[12-13]。烟曲霉素的生物活性与环己烷骨架上的三元环氧化物结构的完整性密切相关,加热导致环氧结构开环,因此,热降解产物无活性^[7];而 UV 降解产物是烟曲霉素分子的烯炔侧链异构化和环化

形成的,其环氧化结构未被破坏,仍然具有活性^[14]。此外,烟曲霉素在碱性条件下的水解产物也具有生物活性,但其活性约为烟曲霉素的 10%。在对烟曲霉素光稳定性的更深度研究中, Kochansky 等^[14]将 50% 的乙醇溶液和含有烟曲霉素的糖浆样品暴露于日光和荧光灯下,发现烟曲霉素在日光下的降解速度比在荧光灯下快,并且表现出首先呈指数级衰减,然后再线性下降。Dmitrovic 等^[15]研究还发现,在日光下,烟曲霉素在乙腈溶液中的降解速度比在实验室荧光灯下更快。Van Den Heever 等^[13]的研究表明烟曲霉素热降解中,在 21 °C(黑暗中和暴露于光线下)和 34 °C 黑暗(模拟蜂巢条件)下监测蜂蜜样品中的烟曲霉素含量变化,以研究蜂巢条件下烟曲霉素的降解。发现在光照条件下 21 °C 时的降解速度最快,并且在黑暗条件下 34 °C 时的降解速度远超过于 21 °C。还研究了 4 种温度(4 °C, 22 °C, 30 °C 和 40 °C)下蜂蜜样品中烟曲霉素的残留量,并发现糖浆中烟曲霉素的降解速率随温度的增加而增加,尤其是在 40 °C 下的样品中,约 20 d 后烟曲霉素完全降解。以上证明光照和加热可加速烟曲霉素的降解。



a: 烟曲霉素; b: UV 降解产物; c: 热降解产物; d: 烟曲霉醇

图 2 烟曲霉素的降解产物

1.2 烟曲霉素衍生物的分子结构及生物活性

1.2.1 烟曲霉素 B(fumagillin B) 烟曲霉素 B 是一种烟曲霉素双环己胺盐,目前未被食品和药物管理局完全批准使用,仅在美国、加拿大等少数国家批

准局部使用,医学上通常用于治疗蜜蜂与鱼类的微孢子虫病感染^[16]。商业合成的烟曲霉素 B 化合物是将烟曲霉素与二环己基胺(DCH)以 1:1 的形式合

成的胺盐(见图 3),易溶于糖浆^[4]。Huang 等^[17]研究证明,烟曲霉素 B 与烟曲霉素相比,其毒性降低并且稳定性增强。

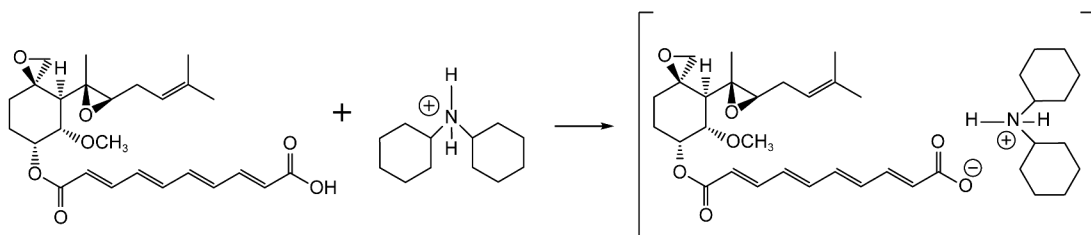


图 3 烟曲霉素 B 的合成路线

1.2.2 TNP-470 TNP-470 为烟曲霉素在碱性条件下水解后,再经过耦合反应得到的一种烟曲霉醇类化合物(见图 4)^[5]。与烟曲霉素相比,TNP-470 的一个侧链由癸二烯二酸官能团变为氯乙酰氨基甲酸酯官能团。TNP-470 已经在临床癌症治疗中使用,已经证明其在体外和体内都具有很高的抑制内皮细

胞生长的作用,具有抗肿瘤血管生成活性。TNP-470 还是一种具有较高 MetAP-2 抑制活性的烟曲霉素类似物抑制剂,亚毒性剂量的 TNP-470 显著减少了胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)细胞系的迁移和侵袭^[18],且其不良反应较少。

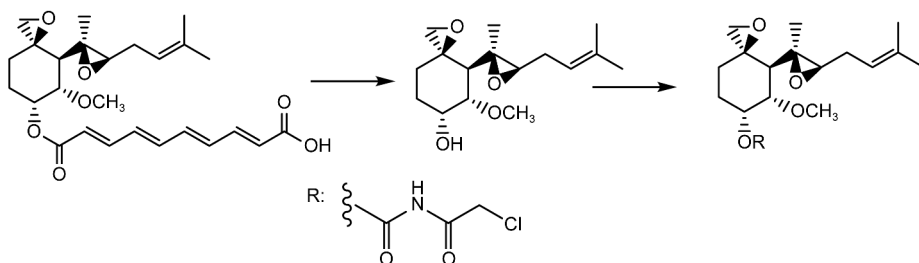


图 4 TNP-470 的合成路线

1.2.3 CKD-732 CKD-732[6-O-(4-二甲基氨基乙氧基)肉桂酰烟曲霉醇半草酸盐,见图 5]是一种新的烟曲霉素类抗癌药物,具有抗肿瘤血管生成作用,属于血管生成抑制剂^[19]。在体内和体外生物学抗肿瘤活性评价中,CKD-732 对 MetAP-2 的亲合力优于 TNP-470,其抗肿瘤活性更好,且 CKD-732 对一般行为、运动协调、平均动脉压和心脏等功能均无影响,其安全性优于其他烟曲霉素衍生物^[19-20]。

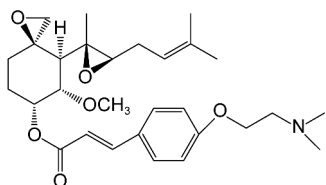


图 5 CKD-732 的化学结构式

1.2.4 PPI-2458 PPI-2458(见图 6)是由 Pracecis

制药公司研发的一种具有口服活性的烟曲霉素类药物,且是 MetAP-2 的不可逆抑制剂^[21]。当口服给药 PPI-2458 时,以剂量依赖性方式抑制小鼠中的 B16F10 黑色素肿瘤细胞生长,且数据表明 PPI-2458 在体外和体内对 B16F10 黑色素瘤细胞均具有有效的抗增殖活性,这 2 种活性都与 MetAP-2 的抑制水平直接有关^[22]。同时,PPI-2458 作为 MetAP-2 的不可逆抑制剂,还可以改善类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)^[23]。

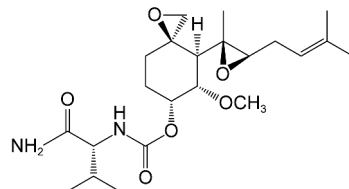


图 6 PPI-2458 的化学结构式

2 烟曲霉素及其衍生物的应用

2.1 烟曲霉素及其衍生物的抗肿瘤作用

2.1.1 烟曲霉素的抗肿瘤作用 烟曲霉素的分子靶标为 MetAP-2,其通过共价结合并修饰该酶的活性位点 His²³¹,使 MetAP-2 不可逆地失去活性。MetAP-2 是调节内皮细胞增殖的重要酶,烟曲霉素的抗肿瘤活性与 MetAP-2 的抑制水平有关。Sheen 等^[24]在烟曲霉素抗血管生成治疗大鼠肝癌细胞 (hepatocellular carcinoma, HCC) 研究中,将 3 组大鼠分别进行处理, A 组为空白对照组, B 组大鼠每天分别给予二乙基亚硝胺 5 mg·kg⁻¹, C 组大鼠每天进行二乙基亚硝胺 5 mg·kg⁻¹和腹腔注射烟曲霉素 30 mg·kg⁻¹处理。结果显示 A 组大鼠的肝脏中未发现肿瘤,到第 18 周时,所有 B 组和 C 组大鼠的肝脏中都出现了弥漫性肿瘤。但 C 组大鼠肝脏在出现肿瘤 2~6 周后,其肝肿瘤细胞出现坏死和出血现象, B 组无变化。烟曲霉素可有效抑制大鼠体内 HCC 的生长和扩散转移。Winter 等^[25]研究结果表明, $\alpha_v\beta_3$ -靶向烟曲霉素纳米颗粒可以提供一种安全有效的方法来单独或与免疫疗法联合递送 MetAP-2 抑制剂,且微量的 $\alpha_v\beta_3$ -靶向烟曲霉素纳米颗粒可破坏兔 V_x-2 肿瘤血管的生成和发育。

2.1.2 TNP-470 的抗肿瘤作用 已有研究证实, MetAP-2 在人胆管癌 (CCA) 组织中过度表达与肿瘤细胞生长和转移活性密切相关^[26]。癌细胞对化疗药物的耐药性是 CCA 化疗失败的主要原因,因此需要新的治疗策略来提高对 CCA 患者的疗效。Kidoikhamouan 等^[27]研究利用 CCA 细胞株考察 TNP-470 的抗肿瘤作用,并探讨 TNP-470 作为化学敏化剂在 CCA 细胞系中的潜在用途,使用流式细胞术和碘化丙啶染色评估 CCA 细胞系的细胞周期和凋亡,通过蛋白质印迹法测定细胞凋亡调节蛋白的表达,采用综合指数测定 TNP-470 的化学敏化作用。结果表明, TNP-470 可显著增加 4 种化疗药物 (5-氟尿嘧啶、蒽环抗生素、顺氯氨铂和吉西他滨) 对 2 种 CCA 细胞系 KKU-213 和 KKU-214 的抗肿瘤效率。Fan 等^[28]和 Nishimura 等^[29]研究血管生成抑制剂 TNP-470 与 5-氟尿嘧啶联合给药的抗肿瘤协同效应,结果显示联合给药以协同方式显著抑制人结肠癌细胞系 LOVO 和人胃癌细胞系 MKN-45 在体内和体外生长。这些研究结果表明 TNP-470 可作为潜在的化疗增敏剂用于癌症治疗。此外, Kidoikhamouan 等^[18]研究表明亚毒性剂量

的 TNP-470 通过抑制 *c-MYC*, *MMP2* 和 *MMP9* 基因的表达,显著降低了 CCA 细胞的转移和侵袭能力。

2.1.3 CKD-732 的抗肿瘤作用 CKD-732 是一种半合成的烟曲霉素衍生物, Kim 等^[19]研究发现 CKD-732 在体内和体外均表现出强效的抗血管生成活性。其抑制人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 增殖并诱导 G1 细胞周期阻滞,其活性是烟曲霉素的 1 000 倍 (IC₅₀ 为 4.36 × 10⁻³ ng·mL⁻¹),并且预期在临床治疗剂量 (1.75 mg·kg⁻¹) 下无不良反应。Shin 等^[30]进行了 CKD-732 的 I 期临床试验,选择了 19 例难治性实体瘤患者,采用剂量递增方案,CKD-732 的剂量水平范围为 1~15 mg·m⁻²,每周给药 2 次,持续 2 周,随后停药 1 周。结果显示, AUC 和 C_{max} 随剂量呈现出剂量依赖性增加,可溶性血管内皮生长因子受体-3 (sVEGF-3) 水平降低与肿瘤体积减小有关。Shin 等^[32]的进一步研究中,使用 CKD-732 与奥沙利铂联合卡培他滨 (XELOX) 给药进行胃肠道癌症 II 期临床试验,采用方法与 I 期临床试验相同。奥沙利铂 (oxaliplatin) 给药 1 d 后,再口服给药卡培他滨 (capecitabine) 14 d, 3 周为 1 个周期。结果显示, CKD-732 的 AUC 和 C_{max} 呈剂量依赖性增加趋势, CKD-732 对 XELOX 的药理学无显著性影响。因此,有必要在更大的研究人群中进一步研究 CKD-732 联合 XELOX 与其他治疗方法结合的作用。此外, Chun 等^[20]研究表明, CKD-732 在较低浓度 (2.5 nmol·L⁻¹) 下便可抑制 HUVEC 生长;在较高浓度 (25 nmol·L⁻¹) 下可明显诱导 HUVEC 凋亡, CKD-732 的抑制肿瘤效果优于 TNP-470。

2.1.4 PPI-2458 的抗肿瘤作用 烟曲霉素的半合成衍生物 PPI-2458 可快速使其分子靶标 MetAP-2 不可逆失活^[32]。Hannig 等^[22]研究证明, PPI-2458 可强效抑制 B16F10 黑色素瘤细胞的增殖,生长抑制浓度 (GI₅₀) 为 0.2 nmol·L⁻¹。此外, B16F10 细胞长时间暴露于较高浓度 (1 mol·L⁻¹) PPI-2458 时,未改变其对 PPI-2458 的生长抑制的敏感性且未观察到耐药性。在小鼠同系 B16F10 肿瘤中经口给药时, PPI-2458 以剂量依赖性方式显著抑制该肿瘤的生长, 100 mg·kg⁻¹ 时的最大抑制率为 62%。在人 UACC-62 黑色素瘤移植瘤和小鼠的若干其他实体瘤中,经口给予 PPI-2458 后观察到相似的结果。Cooper 等^[33]研究还发现, PPI-2458 在体外和体内均可抑制非霍奇金淋巴瘤 (non-hodgkin's lymphoma, NHL) 细胞增

殖。口服 PPI-2458 导致治疗动物淋巴组织的生发中心大小和数量减少, PPI-2458 与 MetAP-2 共价结合抑制的方式强效抑制了几种 NHL 细胞系的生长(GI_{50} 为 $0.2 \sim 1.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。此外, 研究还发现, 口服 PPI-2458 显著抑制重度联合免疫缺陷小鼠异种移植模型中培养的脊髓 (spinal cord, SR) 肿瘤增殖和体内 SR 肿瘤生长, 这与小鼠肿瘤 MetAP-2 的抑制相关^[18,20]。在多个动物模型中证实了疗效后, PPI-2458 已在 NHL 和实体瘤中推进至 I 期临床研究。

2.2 烟曲霉素及其衍生物的抗肥胖作用

2.2.1 烟曲霉素的抗肥胖作用

目前的肥胖干预措施缺乏持久的效果并有不良反应, MetAP-2 抑制剂已被证明可以减轻肥胖小鼠和人类的体重^[34]。An 等^[6]使用了大鼠饮食诱导的肥胖 (diet-induced obesity, DIO) 模型研究 MetAP-2 抑制剂烟曲霉素对减肥和能量平衡的影响, 采用喂食高脂饲料并补充烟曲霉素 (HF/FG) 和成对喂食 (HF/PF) 大鼠进行对照, 结果证明烟曲霉素比成对喂养引起的持续体重减轻更大。

2.2.2 TNP-470 的抗肥胖作用

血管生成抑制剂 TNP-470 可以防止高脂肪饮食引起的肥胖。White 等^[9]研究报告了 TNP-470 可减少高脂肪喂养小鼠的热量摄入和体重增加。将 5 周龄 C57BL/6J 小鼠喂食高脂肪饲料 (45% 能量来自脂肪) 6.5 周, 并接受 TNP-470 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重) 或生理盐水给药, 设置 7 个平行组; 对照组小鼠喂食标准饲料, 并进行假注射, 设置 8 个平行组。观察发现 TNP-470 给药组的高脂肪喂养小鼠最初体重增加, 但到 d 5 体重显著低于高脂肪饲料喂养的小鼠, 与普通喂养的小鼠无差异, 且该效应维持至研究结束。与高脂肪喂养小鼠相比, TNP-470 处理的小鼠 24 h 的能量消耗大于高脂肪喂养小鼠和普通喂养小鼠。总之, 血管生成抑制剂 TNP-470 通过减少热量摄入和增加能量消耗减轻高脂肪喂养小鼠的体重增加。Brakenhielm 等^[35]研究了在鼠中递送血管生成抑制剂 TNP-470 可以预防饮食诱导肥胖的假设。研究发现, 全身给予选择性血管生成抑制剂 TNP-470 可预防高热量饲料饲养的野生型小鼠以及遗传瘦素缺陷突变小鼠的肥胖。此外, TNP-470 处理导致低密度脂蛋白胆固醇的血清水平和胰岛素水平降低, 且脂肪组织中血管的生成减少, 选择性地影响了脂肪组织的生长。研究结果表明, 与其他组织的生长

和器官形成类似, 脂肪组织的生长也依赖于血管生成。

2.2.3 CKD-732 的抗肥胖作用

在各种肥胖模型中, 已经证明了血管生成抑制剂 TNP-470 对饮食诱导肥胖模型的预防作用^[35]。在验证 CKD-732 的抗肥胖研究中^[36], 在各种动物模型中连续 7 d 皮下注射 CKD-732, 在弓状核 (hypothalamic arcuate nucleus, ARC) 病变小鼠和正常小鼠中通过侧脑室内注射, 评价 CKD-732 注射后下丘脑神经肽 mRNA 的调控。在肥胖且伴有 2 型糖尿病 (ostuka long-evans tokushima fatty, OLETF) 大鼠中, 采用氯化锂处理进行条件性味觉厌恶作为阳性对照。结果发现, CKD-732 可以显著降低肥胖和非肥胖动物模型的体重和摄食量。此前有研究表明, 由于非肥胖模型不受血管生成抑制剂的影响, 各种血管生成抑制剂主要在肥胖动物中通过降低胰岛素预防肥胖^[37]。此外, 在这些特定的肥胖模型中, 还发现 CKD-732 对低代谢和高脂肪饮食性肥胖均有相似作用, 证明 CKD-732 通过直接降低肥胖并诱发中枢性厌食症来显著降低食欲和体重。

2.3 烟曲霉素及其衍生物的其他作用

2.3.1 烟曲霉素在防治蜜蜂微孢子虫病中的作用

蜜蜂微孢子虫病对蜜蜂的健康发展造成极大的威胁, 是制约全世界养蜂业发展的主要原因之一^[38]。Mendoza 等^[39]比较 4 种不同烟曲霉素治疗的有效性, 并确定这种抗生素在冬季如何影响蜜蜂群落强度。结果发现, 在乌拉圭的 7 月份, 用烟曲霉素处理的蜜蜂群落在施药结束时表现出较少的孢子负荷。但烟曲霉素处理 2 个月, 处理和未处理的蜜蜂群落在群落强度和孢子丰度上没有差异。此外, 在人工感染蜜蜂微孢子虫病研究中也得到相似的结果^[38]。结果表明烟曲霉素处理可暂时改善蜜蜂微孢子虫病。

2.3.2 烟曲霉素 B 在防治微孢子虫病中的作用

微孢子虫容易引起蜜蜂和养殖鱼类感染微孢子虫病, 烟曲霉素 B 是治疗微孢子虫病常用的抗生素药物^[16]。Mendoza 等^[39]在实验室和田间比较了烟曲霉素 B、Nosemack 和巴龙霉素对蜜蜂微孢子虫的影响。对实验室的笼养蜜蜂和田间蜂群检测实验表明, 烟曲霉素 B 在不伤害蜜蜂的情况下控制了蜜蜂微孢子虫病, 而 Nosemack 和巴龙霉素仅轻微抑制了感染, 并且 Nosemack 对蜜蜂具有毒性。在烟曲霉素 B 防治养殖鱼类感染微孢子虫病研究中, 使用

烟曲霉素 B 喂养 24 条鲑鱼 44 d 后,22 条存活的鲑鱼均未出现微孢子虫病;而普通养殖存活的 21 条鲑鱼有 13 条感染了微孢子虫病。研究证明,烟曲霉素 B 可能是防治水生生物感染微孢子虫病的有效治疗药物。

2.3.3 TNP-470 的抗血管病变作用 Denton 等^[40]研究证明 TNP-470 作为血管生成抑制剂,可减弱心脏同种异体移植血管病变(cardiac allograft vasculopathy,CAV)。对心脏同种异体移植的 Fischer 大鼠使用 TNP-470 治疗,与未治疗的受体大鼠相比,单独使用 TNP-470 或环孢素(cyclosporin A,CsA)只能暂时延长移植物的存活时间且出现明显的 CAV 病变。当 TNP-470 在 CsA 停药后 d 30 至 d 120 给药时,CAV 程度显著降低。因此,TNP-470 在移植后晚期给药可中断 CAV 病变。Joussen 等^[41]为确定 TNP-470 抑制炎症性角膜血管生成的作用,在体外评估了 TNP-470 对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)刺激的牛毛细血管内皮(bovine capillary endothelial,BCE)细胞增殖的影响。对 C57BL6 小鼠的角膜或边缘上皮进行机械清创,在体内诱导角膜新生血管形成。结果显示,TNP-470 通过直接抑制内皮细胞增殖来减少炎症性角膜血管生成,还可降低在新生血管形成过程中的 VEGF 水平。以上研究均证明了 TNP-470 具

有一定的抗血管病变作用。

2.3.4 PPI-2458 在改善 RA 中的作用 RA 是以侵袭性滑膜增生和病理性新生血管为特征。有研究报告了 PPI-2458 可强效抑制 RA 患者来源的人成纤维样滑膜细胞(human fibroblast-like synoviocytes,HFLS-AR)的增殖^[42],其 GI_{50} 为 $0.04 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时最大抑制率 $>95\%$,且其生长抑制与 MetAP-2 酶抑制有关,证明了 PPI-2458 在体外对 HFLS-AR 和 HUVEC 的高选择性和强效抗增殖活性,显著改善中枢神经系统(central nervous system,CNS)毒性特征,将 PPI-2458 用于治疗 RA 患者。Lazarus 等^[23]研究 MetAP-2 在治疗 RA 患者中的作用,用肽聚糖-多糖(peptidoglycan-ploysaccharide,PG-PS)诱导大鼠关节炎,在疾病的 3 个不同阶段,每隔 1 d 经口给予 PPI-2458 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,发现 MetAP-2 抑制使踝关节肿胀减轻,PPI-2458 给药后,踝关节的组织病理学改善,骨结构也显著改善。因此,MetAP-2 在 PG-PS 关节炎生理疾病过程中的作用为 PPI-2458 抗 RA 提供了强有力的证据。

3 烟曲霉素的作用机制

1997 年确定了烟曲霉素的分子靶标为 MetAP-2 酶后,烟曲霉素的抗肿瘤及抑制蜜蜂微孢子虫增殖等的作用机制开始逐渐被揭示。基于 MetAP-2-烟曲霉素复合物的 X-射线结构,提出了烟曲霉素的结合模式(见图 7)^[43-44]。

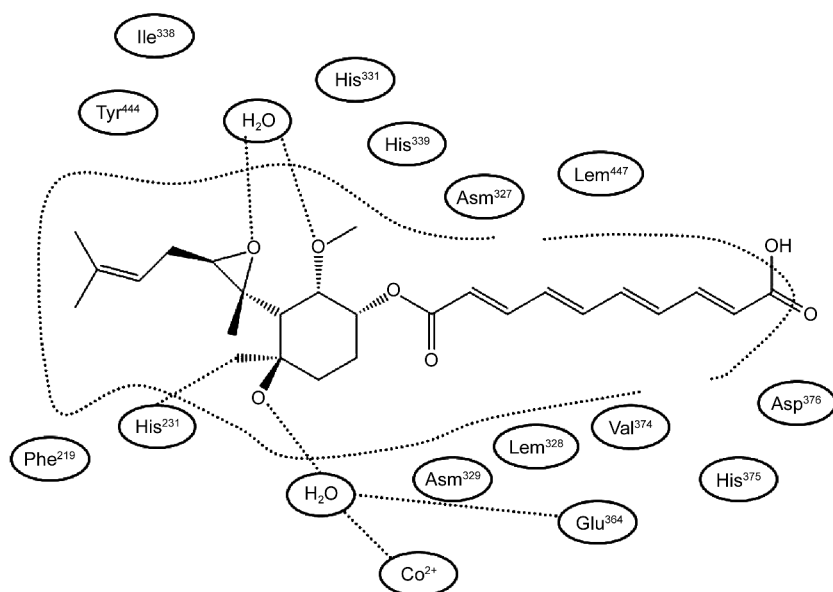


图 7 烟曲霉素与 MetAP-2 的作用机制

其作用机制为烟曲霉素及其衍生物通过环己烷上 C3 位的环氧化物结构与 MetAP-2 酶上的活性位点组氨酸残基 (His²³¹) 形成共价键发挥作用, 导致 MetAP-2 酶的结构被破坏^[43]。而该酶的作用是移除新合成的蛋白质 N 端的蛋氨酸, 让蛋白质可以进行正常的后续修饰功能。因此, MetAP-2 酶结构被破坏造成一些必要的蛋白修饰功能丧失, 从而影响蜜蜂微孢子虫等生物体内的代谢过程。同时, His²³¹ 可以从水分子中捕获一个质子, 有利于其攻击易断裂的酰胺键。烟曲霉素与 MetAP-2 酶结合后, His²³¹ 就作为亲核试剂打开环氧化物^[44], 使烟曲霉素环氧化物结构不可逆开环, 其生物活性急剧丧失。因此, 烟曲霉素及其衍生物对 His²³¹ 的共价修饰有助于其不可逆地阻断 MetAP-2 酶的活性位点, 阻止酶与底物结合和催化。

4 展望

烟曲霉素是一种霉菌毒素, 主要是从烟曲霉的液体发酵液中分离纯化得到的一种天然不溶于水的抗生素。目前, 烟曲霉生产烟曲霉素的普遍效价偏低, 稳定在 $1.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 有待于筛选高产菌株来提高效价。且由于其分子结构上存在不稳定性结构, 使其对紫外光、加热及碱性溶液的耐受性较差, 容易降解或侧链发生异构化而产生副产物。因此, 烟曲霉素的分离纯化条件较为苛刻, 分离纯化难度较大, 需进一步优化烟曲霉素的分离纯化工艺。

烟曲霉素及其衍生物具有多种生物活性, 最初被广泛应用于蜜蜂及水生生物的微孢子虫病的防治。烟曲霉素及其衍生物的主要活性部位为环己烷上 C3 位的环氧化物结构, 因此, 烟曲霉素衍生物的开发要在保留其活性部位的基础上进行。在逐渐了解其结构和与分子靶标 MetAP-2 上活性位点组氨酸残基 His²³¹ 的结合机制后, 烟曲霉素及其衍生物开始用于治疗多种癌症和肥胖疾病的研究, 并且其衍生物对治疗 RA、中枢神经、心血管及呼吸系统方面的疾病也具有一定的作用。

烟曲霉素及其衍生物通过共价修饰 MetAP-2 上组氨酸残基 His²³¹, 实现不可逆结合, 阻断相关蛋白质的后续修饰功能, 从而抑制新细胞形成达到治疗微孢子虫病、癌症及肥胖病的作用。但目前大量研究未应用于临床实践, 还停留在试验阶段, 且其在体内的作用机制及不良反应尚未完全清楚。大部分研究是在动物体内或体外进行的, 还不能应用于人体中。因此, 需要加快其研究进程, 研发烟曲霉素的低

毒性替代衍生物, 寻找高效、安全的方案解决长期困扰人类的癌症等疾病难题。

[参 考 文 献]

- [1] 曹葳蕤, 薛晓峰, 吴黎明. 烟曲霉素及其防治蜜蜂微孢子虫病的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(2): 52-58.
- [2] GURUCEAGA X, EZPELETA G, MAYAYO E, *et al.* A possible role for fumagillin in cellular damage during host infection by *Aspergillus fumigatus* [J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 1548-1561.
- [3] 汪燕, 熊亮, 彭青春, 等. 综述蜜蜂孢子虫病的防治方法[J]. 蜜蜂杂志, 2019, 39(5): 8-11.
- [4] VAN DEN HEEVER JP, THOMPSON TS, CURTIS JM, *et al.* Fumagillin: an overview of recent scientific advances and their significance for apiculture [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(13): 2728-2737.
- [5] INGBER D, FUJITA T, KISHIMOTO S, *et al.* Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth [J]. *Nature*, 1990, 348(6301): 555-557.
- [6] AN J, WANG LP, PATNODE ML, *et al.* Physiological mechanisms of sustained fumagillin-induced weight loss [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(5): e99453.
- [7] HIGES M, NOZAL MJ, ALVARO A, *et al.* The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions [J]. *Apidologie*, 2011, 42(3): 364-377.
- [8] ZHANG P, NICHOLSON DE, BUJNICKI JM, *et al.* Angiogenesis inhibitors specific for methionine aminopeptidase 2 as drugs for malaria and leishmaniasis [J]. *J Biomed Sci*, 2002, 9(1): 34-40.
- [9] WHITE HM, ACTON AJ, CONSIDINE RV. The angiogenic inhibitor TNP-470 decreases caloric intake and weight gain in high-fat fed mice [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2012, 20(10): 2003-2009.
- [10] SHOEMAKER A, PROIETTO J, ABUZZAHAB MJ, *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of beloranib for the treatment of hypothalamic injury-associated obesity [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19(8): 1165-1170.
- [11] MCCANDLESS SE, YANOVSKI JA, MILLER J, *et al.* Effects of MetAP2 inhibition on hyperphagia and body weight in Prader-Willi syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19(12): 1751-1761.
- [12] LIN HC, TSUNEMATSU Y, DHINGRA S, *et al.* Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(11): 4426-4436.
- [13] VAN DEN HEEVER JP, THOMPSON TS, CURTIS JM, *et al.* Stability of dicyclohexylamine and fumagillin in honey [J]. *Food Chem*, 2015, 179(2): 152-158.
- [14] KOCHANSKY J, NASR M. Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the active ingredient of Fumidil B1 [J]. *Apidologie*, 2004, 35(3): 301-310.
- [15] DMITROVIC J, DURDEN DA. Analysis of fumagillin in honey by LC-MS/MS [J]. *J AOAC Int*, 2019, 96(3): 687-695.
- [16] LEFKOVE B, GOVINDARAJAN B, ARBISER JL. Fumagillin: an anti-infective as a parent molecule for novel angiogenesis inhibitors [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2007, 5(4): 573-579.
- [17] HUANG WF, SOLTER LF, YAU PM, *et al.* *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(3): e1003185.
- [18] KIDOIKHAMMOUAN S, SEUBWAI W, TANTAPOTINAN N, *et al.* TNP-470, a methionine aminopeptidase-2 inhibitor, inhibits

- its cell proliferation, migration and invasion of human cholangiocarcinoma cells *in vitro*[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13 (Suppl): S155 – S160.
- [19] KIM EJ, SHIN WH. General pharmacology of CKD-732, a new anticancer agent; effects on central nervous, cardiovascular, and respiratory system[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(2): 217 – 223.
- [20] CHUN E, HAN CK, YOON JH, *et al.* Novel inhibitors targeted to methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) strongly inhibit the growth of cancers in xenografted nude model[J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(1): 124 – 130.
- [21] BERNIER SG, TAGHIZADEH N, THOMPSON CD, *et al.* Methionine aminopeptidases type I and type II are essential to control cell proliferation[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(6): 1191 – 1203.
- [22] HANNIG G, LAZARUS DD, BERNIER SG, *et al.* Inhibition of melanoma tumor growth by a pharmacological inhibitor of MetAP-2, PPI-2458[J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(4): 955 – 963.
- [23] LAZARUS DD, DOYLE EG, BERNIER SG, *et al.* An inhibitor of methionine aminopeptidase type-2, PPI-2458, ameliorates the pathophysiological disease processes of rheumatoid arthritis[J]. *Inflamm Res*, 2008, 57(1): 18 – 27.
- [24] SHEEN IS, JENG KS, JENG WJ, *et al.* Fumagillin treatment of hepatocellular carcinoma in rats; an *in vivo* study of antiangiogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(6): 771 – 777.
- [25] WINTER PM, SCHMIEDER AH, CARUTHERS SD, *et al.* Minute dosages of alpha(nu)beta3-targeted fumagillin nanoparticles impair Vx-2 tumor angiogenesis and development in rabbits[J]. *FASEB J*, 2008, 22(8): 2758 – 2767.
- [26] SAWANYAWISUTH K, WONGKHAM C, PAIROJKUL C, *et al.* Methionine aminopeptidase 2 over-expressed in cholangiocarcinoma: potential for drug target[J]. *Acta Oncol*, 2007, 46(3): 378 – 385.
- [27] KIDOIKHAMMOUAN S, SEUBWAI W, SILSIRIVANIT A, *et al.* Blocking of methionine aminopeptidase-2 by TNP-470 induces apoptosis and increases chemosensitivity of cholangiocarcinoma [J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15(1): 148 – 152.
- [28] FAN YF, HUANG ZH, NIE J. Inhibitory effects of TNP-470 in combination with 5-fluorouracil on growth of human colon cancer [J]. *Ai Zheng*, 2002, 21(12): 1319 – 1323.
- [29] NISHIMURA K, OHNO M, CHUNG-KANG C, *et al.* Antitumor effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 and 5-FU combined therapy on human gastric cancer xenograft[J]. *Hepatogastroenterology*, 2008, 55(82 – 83): 774 – 778.
- [30] SHIN SJ, JEUNG HC, AHN JB, *et al.* A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of CKD-732, an antiangiogenic agent, in patients with refractory solid cancer[J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28(5): 650 – 658.
- [31] SHIN SJ, AHN JB, PARK KS, *et al.* A Phase Ib pharmacokinetic study of the anti-angiogenic agent CKD-732 used in combination with capecitabine and oxaliplatin (XELOX) in metastatic colorectal cancer patients who progressed on irinotecan-based chemotherapy[J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(2): 672 – 680.
- [32] ARICO-MUENDEL CC, BELANGER B, BENJAMIN D, *et al.* Metabolites of PPI-2458, a selective, irreversible inhibitor of methionine aminopeptidase-2: structure determination and *in vivo* activity[J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(4): 814 – 826.
- [33] COOPER AC, KARP RM, CLARK EJ, *et al.* A novel methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, inhibits non-Hodgkin's lymphoma cell proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(8): 2583 – 2590.
- [34] HUANG HJ, HOLUB C, ROLZIN P, *et al.* MetAP2 inhibition increases energy expenditure through direct action on brown adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(24): 9567 – 9575.
- [35] BRÄKENHJELM E, CAO RH, GAO BH, *et al.* Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice[J]. *Circ Res*, 2004, 94(12): 1579 – 1588.
- [36] RUPNICK MA, PANIGRAHY D, ZHANG CY, *et al.* Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(16): 10730 – 10735.
- [37] KIM YM, AN JJ, JIN YJ, *et al.* Assessment of the anti-obesity effects of the TNP-470 analog, CKD-732[J]. *J Mol Endocrinol*, 2007, 38(4): 455 – 465.
- [38] PAXTON RJ. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? [J]. *J Apic Res*, 2010, 49(1): 80 – 84.
- [39] MENDOZA Y, DIAZ-CETTI S, RAMALLO G, *et al.* *Nosema ceranae* winter control; study of the effectiveness of different fumagillin treatments and consequences on the strength of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies[J]. *J Econ Entomol*, 2017, 110(1): 1 – 5.
- [40] DENTON MD, MAGEE C, MELTER M, *et al.* TNP-470, an angiogenesis inhibitor, attenuates the development of allograft vasculopathy[J]. *Transplantation*, 2004, 78(8): 1218 – 1221.
- [41] JOUSSEN AM, BEECKEN WD, MOROMIZATO Y, *et al.* Inhibition of inflammatory corneal angiogenesis by TNP-470[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(11): 2510 – 2516.
- [42] BERNIER SG, LAZARUS DD, CLARK E, *et al.* A methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(29): 10768 – 10773.
- [43] GRIFFITH EC, SU Z, NIWAYAMA S, *et al.* Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15183 – 15188.
- [44] LIU S, WIDOM J, KEMP CW, *et al.* Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin[J]. *Science*, 1998, 282(5392): 1324 – 1327.

编辑:毕晓帆/接受日期:2022 – 11 – 03