

# 微生物来源的 HLE 抑制剂 N01WA-735E 的研究 N01WA-735E , a Human Leukocyte Elastase Inhibitor from Metabolites of Microorganisms

魏亚闪<sup>1</sup>, 张 华<sup>2</sup>, 路新华<sup>2</sup>, 董悦生<sup>2</sup>, 赵宝华<sup>1\*</sup>

WEI Ya-Shan<sup>1</sup>, ZHANG Hua<sup>2</sup>, LU Xin-Hua<sup>2</sup>, DONG Yue-Sheng<sup>2</sup> and ZHAO Bao-Hua<sup>1\*</sup>

1 河北师范大学 生命科学学院, 石家庄 050016

2 华北制药集团 新药研发中心, 石家庄 050015

1 College of Life Science, Hebei Normal University Shijiazhuang 050016, China

2 New Drug Research & Development Center of North China Pharmaceutical Group Corporation,  
National Microbial Medicine Engineering & Research Center, Shijiazhuang 050015, China

**摘 要** 人白细胞弹性蛋白酶抑制剂为筛选炎症和癌症的重要靶点。应用白细胞弹性蛋白酶抑制剂高通量的筛选模型对数千株放线菌进行筛选, 发现了阳性菌株 N01WA-735。首先通过形态学和化学分类学鉴定其为链霉菌属。采用有机溶剂提取、硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和结晶等方法对该菌株的发酵产物进行了分离纯化, 得到活性单体化合物 N01WA-735E。通过对 N01WA-735E 的理化性质和波谱数据分析, 确定其结构与文献报道的化合物 BE-52440A 相同。该化合物对人白细胞弹性蛋白酶有很强的抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 为 3.02 μmol/L。该化合物对人白细胞弹性蛋白酶的抑制活性国内外未见报道。

**关键词** 微生物, 炎症, 人白细胞弹性蛋白酶抑制剂, BE-52440A, 链霉菌

中图分类号 R971 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1112-04

**Abstract** Human leukocyte elastase is an important selection target of inflammation and cancer. In this paper, a high throughput screening model was established for screening human leukocyte elastase inhibitors from thousands of strains of actinomycetes. As a result, a strain, N01WA-735 with potent suppression activity was isolated. Firstly, the strain N01WA-735 was identified as *Streptomyces* according to morphology and biochemical analysis. The *Streptomyces* N01WA-735 was processed by solvent extraction, silica column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and crystallization to get a pure active compound named N01WA-735E. Its chemical structure was elucidated as the same as that of the compound named BE-52440A by physicochemical properties and spectral data of UV, MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR respectively. The compound showed a strong inhibitory activity against human leukocyte elastase with IC<sub>50</sub> of 3.02 μmol/L. The compound is reported as a human leukocyte elastase inhibitor for the first time.

**Key words** microorganisms, inflammation, human leukocyte elastase inhibitor, BE-52440A, *Streptomyces*

HLE(人白细胞弹性蛋白酶, human leukocyte elastase), 是多形核白细胞 (polymorphonuclear leukocytes, PMNL) 因受炎症刺激而释放出的一种破

坏性丝氨酸蛋白酶。由于其能水解诸如弹性蛋白、粘蛋白和某些胶原蛋白等组织连接成分, 而被认为可能参与类风湿性关节炎的发病过程。此外, HLE

Received: March 19, 2007; Accepted: April 30, 2007.

This work was supported by a Grant from the National Key Sciences and Technologies R&D Program (No. 2002BA711A16).

\* Corresponding author. Tel: +86-311-86268434; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

国家科技攻关计划资助项目 (No. 2002BA711A16)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

还可能与肺气肿、囊性纤维化、慢性支气管炎、急性呼吸窘迫综合症及肾小球肾炎等炎症性疾病有关<sup>[1]</sup>。HLE 还参与急性肺损伤( ALI ) 的病理生理过程, 因此弹性蛋白酶抑制剂是治疗急性肺损伤的潜在药物<sup>[2]</sup>。另外, 由于弹性蛋白酶可以破坏胶原纤维及组织基底膜层, 在肿瘤的形成和肿瘤转移方面起关键作用, 所以弹性蛋白酶又成为了研发抗癌药物的新靶点<sup>[3,4]</sup>。可见, 弹性蛋白酶抑制剂具有很高的潜在应用价值。

本研究参照文献报道<sup>[5]</sup>的微量、高效的体外 HLE 抑制剂筛选模型从已建立的微生物代谢产物库中对数千株放线菌进行筛选, 发现了阳性菌株 N01WA-735, 并从其发酵产物中分离纯化得到有较强活性的化合物 N01WA-735E。本文报道了 N01WA-735E 产生菌鉴定, 及其筛选、发酵、分离纯化、结构鉴定和生物学活性测定。

1 材料与方法

1.1 筛选样品

筛选样品为采集自云南的土壤中放线菌菌株的代谢产物。

1.2 试剂及仪器

人白细胞弹性蛋白酶( Human Leukocyte Elastase, HLE )购自 Sigma 公司; 多肽底物( N-

Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide )购自 Sigma 公司; Victor<sup>2</sup> 1420 多功能测定仪( 美国 PE 公司 ); HPLC 分析系统( 美国 Waters 公司 ); HPLC 色谱柱( Kromasil 100Å C<sub>18</sub> 4.6mm × 250mm ); ZMD Micromass 质谱仪( 美国 Waters 公司 ); INOVA - 500MHz 核磁共振仪( Varian 公司 )。

1.3 培养基

斜面培养基( 0.4% 酵母粉, 0.4% 葡萄糖, 0.5% 麦芽膏, 2% 琼脂粉, 0.01% 微量盐, pH7.0 )

种子培养基( 2.4% 淀粉, 0.1% 葡萄糖, 0.3% 蛋白胨, 0.3% 牛肉膏, 0.5% 酵母粉, 0.4% CaCO<sub>3</sub>, pH7.0 )

发酵培养基( 4.0% 可溶性淀粉, 2.0% 脱脂大豆粉, 0.05% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% KCl, pH6.5 )

1.4 HLE 抑制剂活性测定方法

HLE 活性检测方法参照文献<sup>[5]</sup>报道的方法进行。

1.5 N01WA-735 的培养

N01WA-735 菌株斜面培养 14 d, 然后用 2mL 无菌水冲洗下, 按 5% 的接种量接种到含有 120mL 种子培养基的 500mL 三角瓶中, 于 28℃ 培养 3d。最后按 5% 的接种量将一级种子接种于装有 20L 发酵培养基的发酵罐中, 于 28℃ 振摇培养 6d。

表 1 N01WA-735E and BE-52440A 的<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 光谱数据  
Table 1 <sup>13</sup>C-NMR and <sup>1</sup>H-NMR data of N01WA-735E and BE-52440A

Position	N01WA-735E( in DMSO )		BE-52440A( in CDCl <sub>3</sub> )	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1, 1'	72.7	3.97( 1H, q, J = 7.0Hz )	74.4	4.10( 1H, q, J = 7.3Hz )
3, 3'	62.5	4.07( 1H, m )	63.0	3.92( 1H, m )
4, 4'	27.4	2.16( 2H, m )	27.8	2.25( 2H, m )
4a, 4a'	61.5		61.3	
5, 5'	189.7		189.4	
5a, 5a'	133.0		133.1	
6, 6'	119.7	7.70( 1H, dd, J = 7.6, 1.6Hz )	120.3	7.73( 1H, dd, J = 7.6, 1.6Hz )
7, 7'	137.3	7.79( 1H, t, J = 8Hz )	137.5	7.76( 1H, t, J = 7.6Hz )
8, 8'	124.1	7.21( 1H, dd, J = 7.6, 1.6Hz )	124.1	7.28( 1H, dd, J = 7.6, 1.6Hz )
9, 9'	160.4	11.17( 1H, s )	161.9	11.3( 1H, s )
9a, 9a'	114.2		114.5	
10, 10'	197.1		195.7	
10a, 10a'	75.9	3.64( 1H, s )	76.1	3.65( 1H, s )
11, 11'	14.7	1.07( 3H, dd, J = 7.0Hz )	14.2	1.16( 3H, dd, J = 7.3Hz )
12, 12'	40.0	2.38( 1H, dd, J = 15.5, 10Hz ) 2.41( 1H, dd, J = 15.5, 3.5Hz )	39.6	2.51( 1H, dd, J = 15.3, 9.4Hz ) 2.59( 1H, dd, J = 15.3, 3.0Hz )
13, 13'	170.4		170.6	
OCH <sub>3</sub>	51.4	3.64( 3H, s )	51.8	3.76( 3H, s )

## 1.6 形态学观察

菌株埋片接种于 ISP2 培养基平板, 28℃ 培养, 分别于 14d、21d、28d 时在光学显微镜下进行形态观察。选取形态特征典型的样本进行拍照。

## 1.7 化学分类

细胞壁化学分析: 参照 Hasegawa<sup>[6]</sup> 和王平<sup>[7]</sup> 的细胞壁化学组分的分析方法以及 Lechevalier<sup>[8]</sup> 的纯细胞壁分析方法。

磷酸类脂分析: 参照 Lechevalier 等<sup>[8]</sup> 的方法进行。

甲基萘醌分析: 参照 Collins<sup>[9]</sup> 的方法进行。

## 1.8 N01WA-735E 的分离纯化

发酵样品的预处理方法: 取菌株 N01WA-735 的发酵液 15L, 离心后上清液加乙酸乙酯萃取, 菌体用丙酮浸泡 2.0h, 再离心, 上清减压蒸掉溶剂后加入乙酸乙酯进行萃取, 合并两部分乙酸乙酯相, 最后减压浓缩得到油状粗提产物。

油状粗提产物进一步的分离纯化方法: 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, 减压浓缩。该活性组分经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以氯仿: 甲醇 1:1 洗脱纯化, 最后用氯仿: 甲醇 (1:1) 结晶得到活性化合物。

化合物的 HPLC 检测方法: 流动相为  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (70:30 V/V), 流速为 1mL/min, 检测波长为 233nm, 经 HPLC 面积归一化法测定纯度。

# 2 结果

## 2.1 HLE 抑制剂阳性菌株的筛选

对数千株放线菌进行筛选得到阳性菌株 N01WA-735。

## 2.2 菌株形态学特征

菌株 N01WA-735 在 ISP2 培养基上基内菌丝生长良好, 气丝丰富, 形成孢子链 (见图 1)。符合

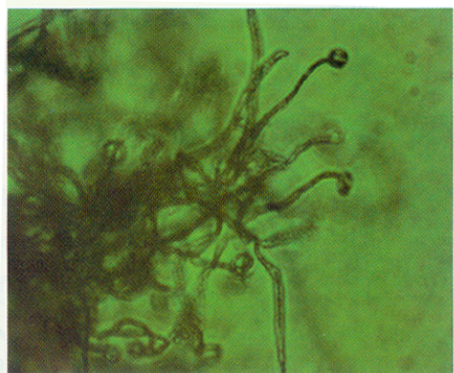


图 1 菌株 N02-421 的光学显微镜照片

Fig. 1 Optical microscope photograph of strain N02-421 (300 $\times$ )

链霉菌属 (*Streptomyces*) 的形态分类特征。

## 2.3 化学分类

菌株 N02-421 细胞壁含有 L-2, 6-二氨基庚二酸 (LL-DAP), 甘氨酸, 胞壁类型为 I 型, 糖型 C, 无特征性糖; 磷酸类脂 P II 型。符合链霉菌属 (*Streptomyces*) 的化学分类特征。

## 2.4 化合物 N01WA-735E 的 HPLC 纯度验证

经过一系列分离纯化方法得到 1 个活性化合物 N01WA-735E (15.2mg), 用 HPLC 进行检测为单一化合物, 从色谱图 (见图 2) 可知保留时间为 22.5min, 经 HPLC 面积归一化法测定纯度达 99%。

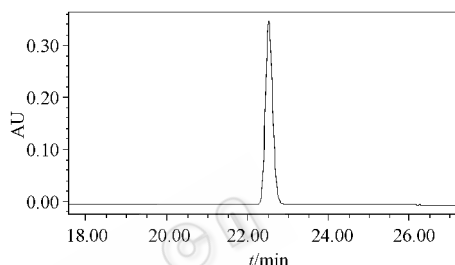


图 2 N01WA-735E 的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC Analyse of N01WA-735E

## 2.5 化合物 N01WA-735E 的理化性质和化学结构

单体化合物 N01WA-735E 为淡黄色结晶, 易溶于四氢呋喃和 DMSO, 微溶于氯仿和甲醇, 不溶于水 and 己烷。其紫外吸收  $\text{UV}\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 233, 256nm, 该化合物经过 TLC 展开后, 用无色亚甲蓝溶液显色, 发现样品在白色背景上作为蓝色斑点出现, 证明其为萘醌类化合物。ESI-MS 给出准分子离子峰为 721.2 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ), 说明该化合物的分子量为 698,  $^{13}\text{C}$ -NMR 显示 17 个碳信号,  $^1\text{H}$ -NMR 显示 17 个氢 (见表 1) 结合 NMR 数据提示该化合物含有对称结构, 该化合物的分子式为  $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_{14}\text{S}_6$ 。通过文献检索, 确定其化学结构与文献 [10] 报道的化合物 BE-52440A 相同, 其化学结构如图所示 (见图 3)。

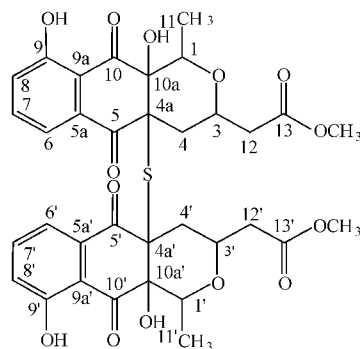


图 3 N01WA-735E 的化学结构

Fig. 3 The structure of N01WA-735E

2.6 化合物 N01WA-735E 对 HLE 的抑制活性

化合物 N01WA-735E 对 HLE 的抑制活性的测定结果见图 4,从该图可以看出,化合物 N01WA-735E 对 HLE 呈现出剂量依赖的抑制作用,其 IC<sub>50</sub> 值为 3.02μmol/L。

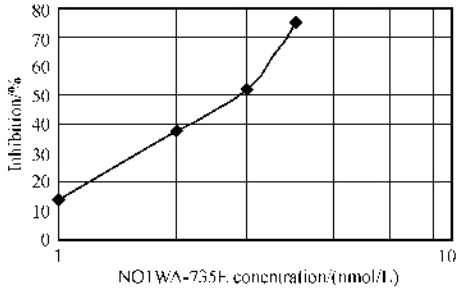


图 4 N01WA-735E 对 HLE 的抑制曲线  
Fig. 4 N01WA-735E restraint curve to HLE

3 讨论

HLE 抑制剂除了从动植物中提取和化学合成外,微生物来源的主要有链霉菌产生的 elastatinal<sup>[11]</sup>、elasnin<sup>[12]</sup>和 FR901277<sup>[13]</sup>以及曲挠杆菌产生的 FR901451<sup>[14]</sup>、YM 247141 和 YM 247142<sup>[15]</sup>,目前上述微生物产生的弹性蛋白酶抑制剂尚未应用于临床,全球惟一应用于临床的弹性蛋白酶抑制剂西维来司钠系化学合成产品,于 2002 年在日本上市,2003 年在我国进入临床研究阶段,用于治疗 SARS 引起的急性肺损伤。临床研究表明,它通过抑制中性粒细胞产生的弹性蛋白酶,改善患者的呼吸功能,使其尽早脱离危险期,降低死亡率。因此,从微生物中筛选到新的、强效低毒的弹性蛋白酶抑制剂是非常有意义的。

本实验组从微生物代谢产物中筛选得到对 HLE 具有较强抑制活性的化合物 N01WA-735E,与其它 HLE 抑制剂如 Equisetin<sup>[5]</sup>(IC<sub>50</sub> 为 22.1μmol/L)相比活性更好。其产生菌的形态学特征和化学分类学特征都符合链霉菌属特征。文献报道该化合物具有抗白血病、结肠癌、肺癌、胃癌细胞株的活性,但是 N01WA-735E 对白细胞弹性蛋白酶的抑制活性未见报道。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Safayhi H, Sailer ER, Anti-inflammatory actions of pentacyclic

triterpenes( review). *Planta Med*, 1997, **63**( 12 ): 487 – 493.

[ 2 ] Zeiher BG, Matsuo S, Kawabata K, et al. Neutrophil elastase and acute lung injury : prospects for sivelestat and other neutrophil elastase inhibitors as therapeutics. *Crit Care Med*, 2002, **30**( 5 ): S281 – 285.

[ 3 ] Dona M, Dell’Aica I, Pezzato E, et al. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*, 2004, **64**( 17 ): 6225 – 6229.

[ 4 ] Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol*, 2004, **5**( 3 ): 182 – 187.

[ 5 ] Ren X, Zheng ZH, Lu XH, et al. F01-221A, a human leukocyte elastase inhibitor from metabolites of microorganisms. *Chinese Journal of Antibiotics* ( 中国抗生素杂志 ), 2006, **31**( 8 ): 458 – 461.

[ 6 ] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, **29**( 5 ): 319 – 322.

[ 7 ] Wang p. A rapidTLC method to analysis amino acids and monosaccharide of actinomycetes. *Microbiology*( 微生物学通报 ), 1986, **13**( 5 ) 226 – 231.

[ 8 ] Lechevalier MP, Lechevalier HA. The chemotaxonomy of actinomycetes. In : Dietz and Thayer ( editors ), *Actinomycete taxonomy*, Special Publication 6, Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA, 1980, pp.227 – 291.

[ 9 ] Collins MD. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Lindon : Academic Press ,1985 pp. 267 – 285.

[ 10 ] Masao Tsukamoto, Shigeru Nakajima, et al. New cytotoxic, BE-52440A and B, produced by a *Streptomyces*. *J Antibiotics*, 2000, **53**( 7 ): 687 – 693.

[ 11 ] Hamao U, Takaaki A, Akira O, et al. Elastatinal, a new elastase inhibitor produced by *Actinomycetes*. *J Antibiot*, 1973, **26**( 12 ): 787 – 791.

[ 12 ] Hiroie O, Tsuneo S, Juichi A, et al. Isolation and characterization of elasnin, a new human granulocyte elastase inhibitor produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiotics*, 1978, **31**( 11 ): 1116 – 1119.

[ 13 ] Keiko F, Yasuhiko S, Hiroshi H, et al. FR901277, a novel inhibitor of human leukocyte elastase from *Streptomyces resistomy cifious*. *J Antibiot*, 1993, **46**( 6 ): 908 – 912.

[ 14 ] Takashi F, Hiroshi H, Kenichi H, et al. FR901451, a novel inhibitor of human leukocyte elastase from *Flexibacter* sp. I. Producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot*, 1994, **47**( 12 ): 1359 – 1362.

[ 15 ] Kenichi Y, Yasuto S, Mitsuyoshi S, et al. YM 247141 and 47142, new elastase inhibitors produced by *Flexibacter* sp. Q 17897. *J Antibiot*, 1995, **48**( 12 ): 940 – 945.