

## 人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂的高通量筛选

庞晓斌<sup>1,2</sup>, 谢欣梅<sup>2</sup>, 王守宝<sup>1</sup>, 杜冠华<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所国家新药筛选中心, 北京 100050;

2. 河南大学药学院, 河南 开封 475004)

**摘要:** 本研究拟建立体外人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂高通量筛选模型, 用于 PTP1B 抑制剂的发现。利用大肠杆菌重组表达 PTP1B, 以对硝基苯磷酸二钠 (PNPP) 为特异性的底物, 建立了基于酶反应速率的 384 孔微板为载体的 PTP1B 抑制剂高通量筛选模型 ( $Z' = 0.78$ )。选择 24 240 个样品进行筛选, 对抑制率大于 70% 的 80 个样品作为活性样品进行复筛, 最终确定 6 个具有较强的抑制活性的化合物 J5753、J10550、J10551、J10583、J10585 和 J11101, 其  $IC_{50}$  值分别为 21.58、18.39、15.37、11.92、37.27 和 36.61  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果表明, 所建立的 PTP1B 抑制剂高通量筛选模型具有快速、灵敏、稳定、重复性好的特点。

**关键词:** 蛋白酪氨酸磷酸酶; 抑制剂; 高通量筛选

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 09-1058-07

## High-throughput screening of human soluble protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors

PANG Xiao-bin<sup>1,2</sup>, XIE Xin-mei<sup>2</sup>, WANG Shou-bao<sup>1</sup>, DU Guan-hua<sup>1\*</sup>

(1. National Center for Pharmaceutical Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Institute of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** To screen potential human soluble protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors, a high-throughput screening (HTS) model in 384-well microplate with total volume of 50  $\mu\text{L}$  was established. Recombinant PTP1B was cloned and expressed in *E. coli* with its specific substrate 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (PNPP). The HTS model was based on enzyme reaction rate with enhanced sensitivity and specificity ( $Z' = 0.78$ ). A total of 24 240 samples were screened, among them 80 samples with inhibition greater than 70% were selected for further rescreening. Finally, six compounds with high inhibitory activity were identified, whose  $IC_{50}$  values were 21.58, 18.39, 15.37, 11.92, 37.27, and 36.61  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , separately. The results indicated that the method was stable, sensitive, reproducible and also suitable for high-throughput screening.

**Key words:** soluble protein tyrosine phosphatase 1B; inhibitor; high-throughput screening

蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1, PTP1B, EC:3.1.3.48) 是在体内广泛分布的酪氨酸磷酸酶, 约为 36 kD, 主

要通过对胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 和胰岛素受体底物-2 (IRS-2) 的脱磷酸化作用, 调节胰岛素受体信号的传导<sup>[1-3]</sup>。研究表明, 重组表达的 PTP1B 具有很好的酪氨酸磷酸酶活性, 在体外使胰岛素受体去磷酸化<sup>[4,5]</sup>。细胞学实验表明, PTP1B 的特异性抗体能明显增加肝癌细胞 (KRC-7) 中胰岛素受体的酪氨酸磷酸化水平<sup>[6]</sup>。另外, 对缺失 PTP1B 小鼠的研究发现,

收稿日期: 2011-02-25.

基金项目: 重大新药创制“科技重大专项”(2009ZX09302-003); 国际科技合作项目“新药重大创新”(2009DFA32010).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

胰岛素敏感性明显增加, 靶组织肝脏及肌肉中的胰岛素受体磷酸化水平增强<sup>[7-9]</sup>, 而 PTP1B 的过表达则可引起胰岛素抵抗、瘦素 (leptin) 抵抗及影响脂代谢等而导致肥胖症和 2 型糖尿病的发生<sup>[10-12]</sup>。由此可见, PTP1B 与胰岛素信号途径和糖代谢有着密切的关系, 抑制 PTP1B 活性是防治糖尿病及肥胖等代谢性疾病的有效途径。

PTP1B 抑制剂作为治疗糖尿病的潜在药物, 引起了广泛关注。目前已发现的 PTP1B 抑制剂主要包括: *N*-草酰胺苯甲酸类、取代苯乙酮类、二氟亚甲基磷酸盐类、水杨酸类、取代丙二酸-酪氨酸类、氨基磺酸类、噻吩类及多肽类等<sup>[5, 13-16]</sup>; 但大多数抑制剂因为作用强度和特异性等因素, 不具备药物开发的潜力, 如二氟亚甲基磷酸盐类因为分子中电荷太多, 细胞膜通过性差, 取代丙二酸-酪氨酸类生物活性差等因素被淘汰。迄今为止, Merck & Co 的 ISIS-113715 是目前唯一进入临床研究的 PTP1B 抑制剂<sup>[17, 18]</sup>。在这种背景下, 开发其他更为合理、安全、有效的新型 PTP1B 抑制剂具有重要意义和广阔的应用前景。

目前, 广大科研工作者在 PTP1B 抑制剂发现的领域展开了大量研究, 建立了多种 PTP1B 酶活性测定方法, 如比色法、荧光法、亲和闪烁法 (scintillation proximity assay, SPA) 等<sup>[19-21]</sup>, 而且多采用基于 96 孔微板的终点测定法<sup>[22, 23]</sup>, 在高通量筛选应用方面存在着不同程度的局限性。在此基础上, 本研究建立了以 384 孔微板为载体、以酶反应速率为观察指标的高通量筛选模型, 增加了灵敏性和稳定性, 并对本中心样品库部分样品进行筛选, 寻找 PTP1B 抑制剂。

## 材料与方法

**样品与试剂** 高通量筛选样品由中国医学科学院药物研究所国家新药筛选中心样品库提供; 重组 PTP1B 蛋白表达菌株 pET-32a/PTP1B *Transtetta* 由本实验室保种; 对硝基苯磷酸二钠 (PNPP) 和钒酸钠 ( $\text{NaVO}_4$ ) 购自 Amresco 公司; 抗体 PTP1B (sc-1719) 购自 Santa Cruz 公司。

**实验仪器** SpectraMax M5 型连续光谱酶标测试仪 (SoftMax Pro Software 软件, 美国); EDR-384S 型自动分液系统 (日本); Costar 384 孔微板 (Corning Incorporated 公司, 美国); Hamilton Microlab<sup>®</sup> STARplus 自动工作站 (Hamilton Company, 瑞士)。

**人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 重组蛋白制备** 以人源肝癌细胞 (huh-7) 总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 获得长度大约为 1 300 bp 的特异性扩增片段, 与理论值 1 308 bp 基本相符。将获得的 PTP1B cDNA 与 pGEM-T 载体连接后转化 Top10 *E. coli*, 进行蓝白斑筛选。从中挑取白斑, 接种 LB 培养基中振荡培养, 用菌落 PCR 方法筛选阳性克隆, 并取阳性克隆质粒用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定, 证明目的基因已经连接到 pGEM-T 载体上。最后取质粒进行测序 (上海生工生物工程技术服务公司), 证明阳性克隆序列正确。然后构建 pET-32a/PTP1B 表达质粒, 转入大肠杆菌 *Transtetta* 菌株中, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导表达 8 h, 取菌体超声破碎, 15 000×g 离心 10 min; 取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤, 加载 Ni-IDA 高亲和力纯化柱, 咪唑梯度洗脱, 测定 280 nm 处吸收度监测各部分洗脱液, 将含有目标蛋白的部分进行合并, 使用 Millipore Amicon Ultra-15 离心超滤管 (截留分子质量为 10 kD) 进行浓缩, 蛋白定量后 -80 °C 保存。临用时现配制工作液, 其中酶工作液 A 质量浓度为 500 μg·mL<sup>-1</sup>, 置冰上待加样用。

**人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 生物活性测定** PNPP 是 PTP1B 的有效底物, 其磷酸基团被 PTP1B 脱去后生成对硝基苯酚, 发生颜色反应, 对硝基苯酚在 405 nm 处有吸收。动力学监测模式连续读取各时间点的光吸收度 (*A*) 值, 代表产物对硝基苯酚的生成量, 按照酶反应速率法, 其产物生成速率可以反映酶的活力<sup>[24]</sup>。

**人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂高通量筛选模型的建立** 根据酶反应动力学原理, 利用反应速率法测定 PTP1B 的酶活性。在反应曲线上选取初始阶段最接近直线的一段, 即可计算其反应初速度  $V_{\max}$  (标示酶活性水平)。求出各样品处理后酶的  $V_{\max}$ , 然后与正常对照进行比较, 计算出各样品的百分抑制率。

本模型采用透明 Costar 384 孔微板, 反应体系 50 μL, 温度 37 °C, 在此基础上对底物浓度、酶浓度、反应时间等进行了优化。

**人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 高通量筛选模型的评价及验证** *Z'* 因子是评估高通量筛选模型优劣的一种重要方法<sup>[25, 26]</sup>, 可根据公式计算:  $Z' = 1 - 3 \times (\text{SD}_{\text{sig}} + \text{SD}_{\text{back}}) / (M_{\text{sig}} - M_{\text{back}})$ , SD: 标准差, *M*: 均值; 其中“sig”代表信号, 孔中加入 PTP1B 蛋白和底物进行反应; “back”代表背景, 孔中不加 PTP1B

蛋白 (只含底物和缓冲液)。384 孔板中各取 80 个孔的数据进行分析和计算。

另外, 为了进一步验证本模型的可靠性, 采用本模型对已获得一致认可的 PTP1B 特异性抑制剂  $\text{NaVO}_4$  进行了  $\text{IC}_{50}$  测定。

**人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂高通量筛选** 按照建立的 HTS 实验方法, 对 24 240 种样品进行初筛, 选择抑制率大于 70% 的样品作为活性样品进行复筛, 复筛程序同前。根据复筛结果, 选择抑制率大于 70% 的样品, 3 倍比依次稀释 8 个浓度: 100、30、10、3、1、0.3、0.1 和 0.03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 最后根据测定结果利用软件 Origin 7.0 计算  $\text{IC}_{50}$ 。

**统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 均数的显著性统计采用 SPSS11.0 的 ANOVA 进行分析。

## 结果

### 1 人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 重组蛋白制备

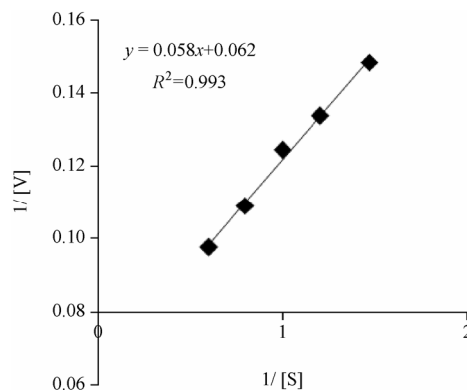
大肠杆菌表达的 PTP1B 蛋白是一个融合蛋白, 除了目的蛋白外, 它的蛋白序列上还包含 Trx 蛋白、S-tag 及 His-tag, 所以经计算该融合蛋白的分子质量约为 52 kD。用 Ni-IDA 高亲和力纯化柱对诱导表达的重组 PTP1B 进行纯化, 咪唑洗脱结合的蛋白, 测定 280 nm 处吸收度 ( $A_{280}$ ) 值代表不同管洗脱液中的蛋白洗脱量。收集  $A_{280}$  值高于空白的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 发现所洗脱的蛋白呈单一条带, 经分析鉴定目的蛋白纯度大于 90%。然后用特异性的 PTP1B 抗体对细菌裂解物进行了 Western blotting 分析, 在 52 kD 处有一明显条带, 同目标蛋白相一致。

### 2 底物浓度的确定

本实验以 PNPP 为底物, 选择一系列底物浓度 0.68、0.83、1、1.25 和 1.66  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、酶终质量浓度 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、50  $\mu\text{L}$  缓冲体系的 384 孔微板条件下, 测定 PTP1B 的活性。用 Lineweaver-Burk 的双倒数法作图, 求得米氏常数  $V_{\max}$  和  $K_m$ 。结果 (图 1) 表明,  $V_{\max}$  为 16.13  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $K_m$  为 0.935  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。底物浓度选择  $K_m$  值的 10 倍时最大反应速度可达  $V_{\max}$  的 90%, 确定反应体系中最适底物浓度为 9.35  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 3 酶用量及监测时间的确定

根据酶动力学研究, 确定 50  $\mu\text{L}$  反应体系中底物 PNPP 的最适浓度为 9.35  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验中以透明



**Figure 1** The Lineweaver-Burk curve of PTP1B. The concentration of PNPP varied as following: 0.68, 0.83, 1, 1.25, and 1.66  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The fixed concentration of PTP1B is 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

384 孔微板为载体进行考察, 各反应孔依次加入酶反应液 A 的体积为: 0、1、2、4、6、8、10、12 及 14  $\mu\text{L}$ , 其余则以反应缓冲液补足。37  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 每隔 5 min 测定  $A_{405}$  值。结果 (图 2) 可见, 当酶用量为 0  $\mu\text{L}$  时, 反应基本没有变化, 随着酶用量的增加, 反应曲线的斜率也在稳步上升, 但是在 4  $\mu\text{L}$  时酶相对于底物基本呈现饱和, 酶反应曲线在 30 min 内基本达峰, 6、8、10、12 及 14  $\mu\text{L}$  曲线亦证实了这一点。为保持底物的过量, 反应体系中酶工作液 A 的用量以 4  $\mu\text{L}$  最佳, 即 50  $\mu\text{L}$  反应体系中, 酶反应最佳浓度为 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

### 4 $\text{NaVO}_4$ 对模型的作用

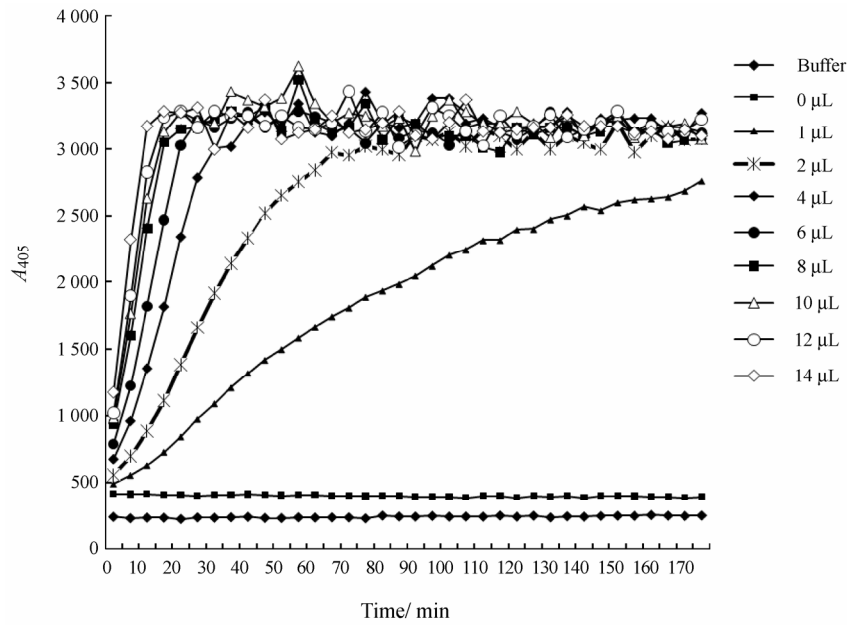
$\text{NaVO}_4$  作为 PTP1B 的已知抑制剂, 在本实验中作为工具药物, 研究它抑制 PTP1B 酶对其底物 PNPP 的水解作用, 同时也验证已建立 PTP1B 酶抑制剂高通量筛选模型的可行性。结果 (图 3) 显示,  $\text{NaVO}_4$  的  $\text{IC}_{50}$  为 0.090 12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $\text{NaVO}_4$  对 PTP1B 酶活性的抑制呈剂量依赖性。

### 5 DMSO 对模型的影响

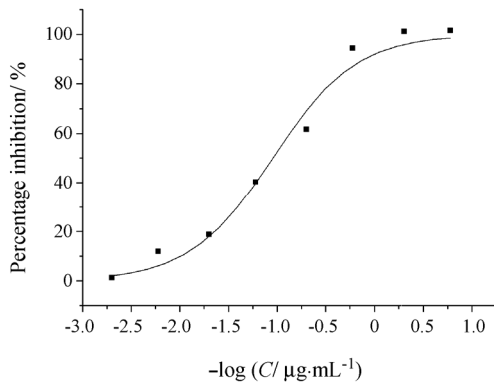
DMSO 对于化合物有着良好的溶解性。在高通量筛选中, 通常采用 DMSO 来溶解样品。该模型采用 384 孔微板, 每孔反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 其中 DMSO 含量最大不超过 1  $\mu\text{L}$ , 本检测体系中 DMSO 的含量为 2%, 超过初筛 0.1% 和复筛 1% 的水平, 结果 (图 4) 显示, 2% DMSO 对酶反应活性没有明显影响。

### 6 高通量筛选模型评价及验证

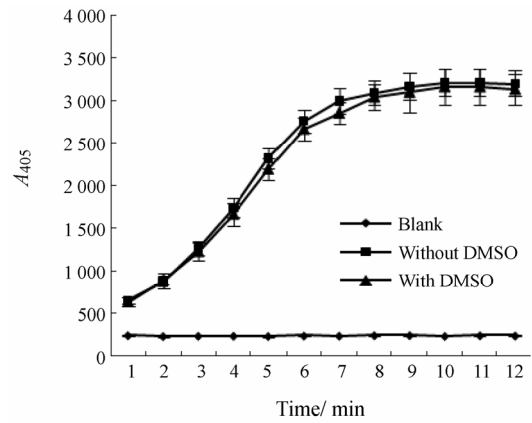
采用酶工作液 B, 分别测定 80 个正常对照孔 (control: buffer 5  $\mu\text{L}$ , enzyme 25  $\mu\text{L}$ , PNPP 20  $\mu\text{L}$ ) 和 80 个空白对照孔 (blank: buffer 30  $\mu\text{L}$ , PNPP 20  $\mu\text{L}$ )



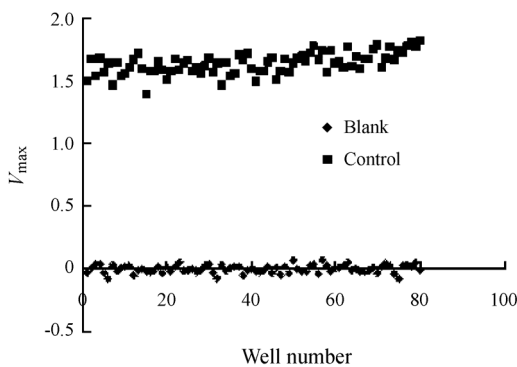
**Figure 2** The time-relative  $A_{405}$  of 50  $\mu\text{L}$  reaction volume in 384-well microplate. The volume of PTP1B varied as following: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14  $\mu\text{L}$ . The fixed concentration of PNPP is  $9.35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .  $n = 4$



**Figure 3** Inhibitive effects of  $\text{NaVO}_4$  on PTP1B activity. The concentration of  $\text{NaVO}_4$  varied as following: 6, 2, 0.6, 0.2, 0.06, 0.02, 0.006, and 0.002  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The fixed concentration of PNPP is  $9.35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The fixed concentration of PTP1B is  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .  $n = 4$



**Figure 4** The time-relative  $A_{405}$  of 50  $\mu\text{L}$  reaction volume with or without 2% DMSO in 384-well clear microplate. The fixed concentration of PNPP is  $9.35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the fixed concentration of PTP1B is  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 50  $\mu\text{L}$  reaction volume.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$



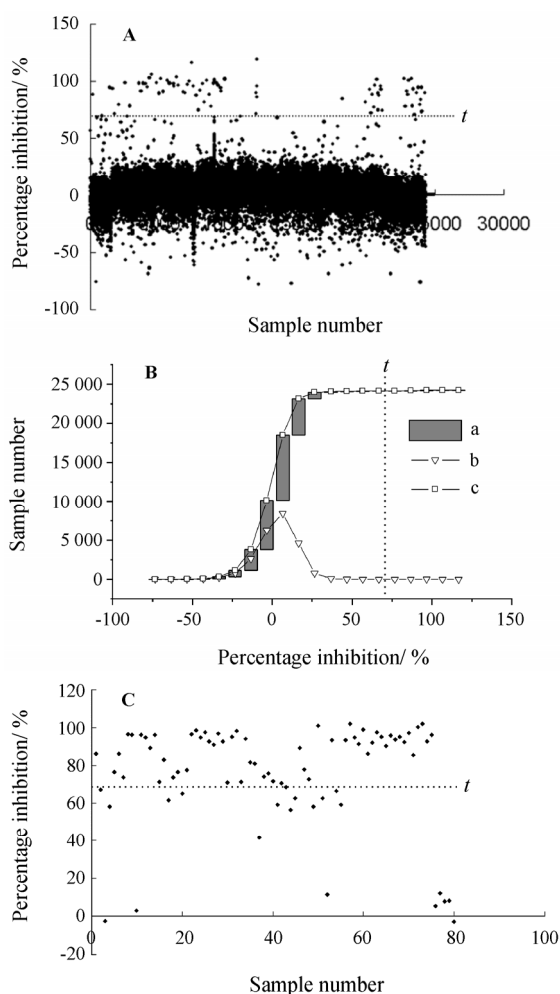
**Figure 5** The  $V_{\text{max}}$  values of 80 control wells and 80 blank wells. Control: Buffer 5  $\mu\text{L}$  + PTP1B 25  $\mu\text{L}$  + PNPP 20  $\mu\text{L}$ ; Blank: Buffer 30  $\mu\text{L}$  + PNPP 20  $\mu\text{L}$

的  $V_{\text{max}}$ 。结果 (图 5) 表明, 正常对照孔的  $V_{\text{max}}$  值为  $1.64 \pm 0.09$ , 而空白对照孔的  $V_{\text{max}}$  值为  $0.0017 \pm 0.031$ , 计算  $Z$  值为 0.78。另外, 本模型测定 PTP1B 特异性抑制剂 PNPP 的最适浓度为  $9.35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与文献报道基本平行。因此, 可以认为本模型是一种灵敏度高、稳定性好的高通量筛选方法。

### 7 人源蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂高通量筛选

按照建立的 HTS 实验方法对 24 240 种样品进行了筛选, 然后对抑制率大 (等) 于 70% 的 80 个样品

进行了复筛, 结果显示 77% (62/80) 样品的抑制率大于 70%, 说明该模型重复性较好 (图 6)。同时, 选择活性较高、量效关系较好的样品进行 IC<sub>50</sub> 的测定, 确定 J5753、J10550、J10551、J10583、J10585 和 J11101 等 6 个化合物对人源 PTP1B 有较强的抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 21.58、18.39、15.37、11.92、37.27 和 36.61 μg·mL<sup>-1</sup> (图 7)。



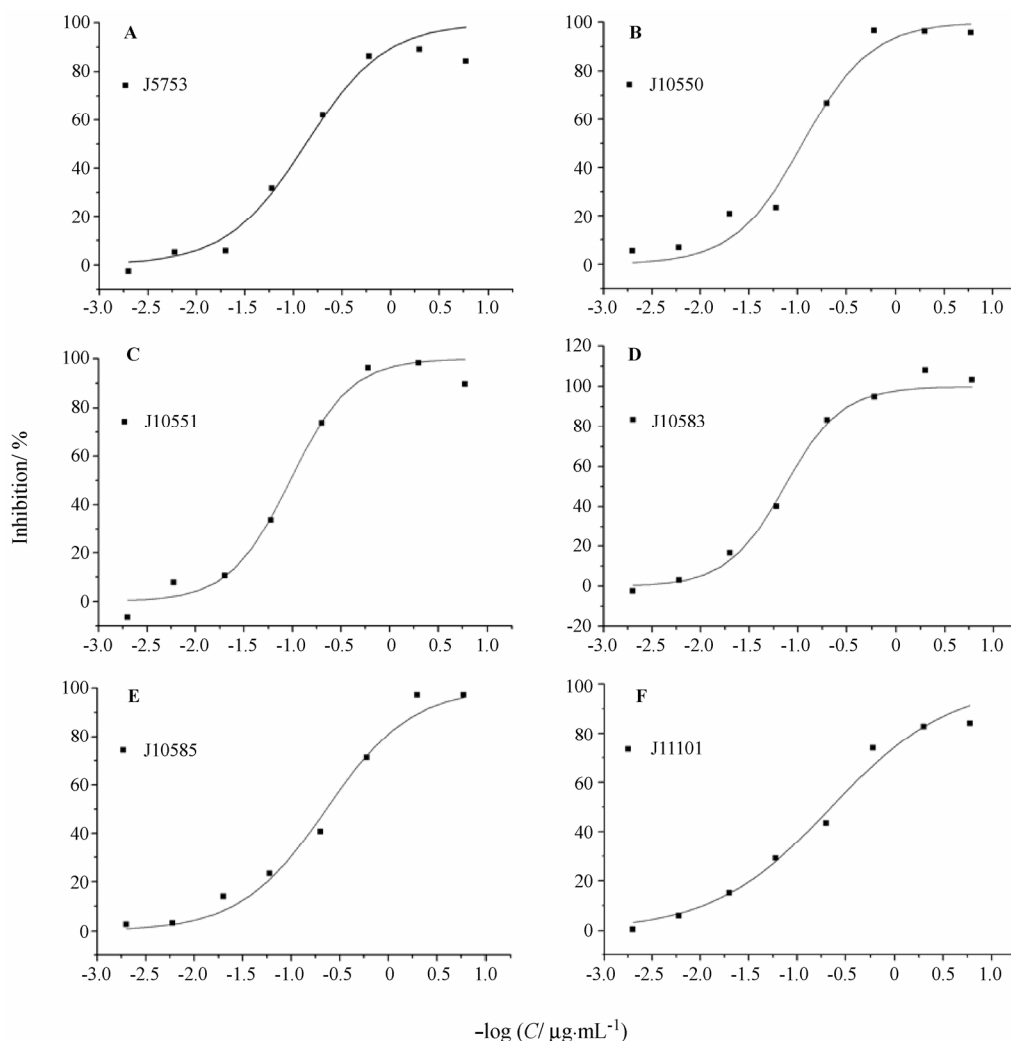
**Figure 6** The distribution of inhibitory activities of 24 240 samples on PTP1B. A: The scatter curve of inhibitory activities of 24 240 samples on PTP1B; *t* marked the threshold inhibition ratio of 70% which 80 hits exceeded in the initial screening. B: Floating column a and line b presented the accumulated distribution curve of 24 240 samples on percentage inhibition; line c presented an approximate normal distribution curve of 24 240 samples on percentage inhibition; C: The scatter curve of inhibitory activities of 80 samples on PTP1B in the second screening; *t* marked the threshold inhibition ratio of 70% which 62 hits exceeded in the second screening

### 讨论

本研究通过融合蛋白的形式进行重组表达人源 PTP1B 蛋白, 目标蛋白不仅表达量高, 而且只需一步纯化, 无须切割去除蛋白标签即可获得较高活性的酶, 该方法简单、快速, 大大提高酶制备效率, 是一种值得推荐的酶制备方法。

关于 PTP1B 抑制剂的筛选方法已有报道, 但文献中采用的方法仍存在一些不足。首先, 检测方法大多基于终点法, 以反应达到平台为限定条件, 孵育时间较长, 并需要额外加入终止液终止反应, 导致对时间点的控制要求较为严格, 单样次筛选时间较长, 操作繁琐, 结果易受到干扰, 增加假阳性实验结果的几率; 其次, 反应体系大多基于 96 孔微板, 酶和底物的用量较多, 增加了筛选成本。本研究根据酶活力与反应速率的关系以及酶促反应动力学原理, 采用动态检测方法, 测定反应初速率作为 PTP1B 蛋白活性的衡量指标, 降低了环境因素以及终止液等因素造成假阳性结果出现的可能性, 可快速确定样品对酶活性的影响, 大大缩短了检测耗时。另外, 该筛选体系将 96 孔微板改变为 384 孔微板, 降低了反应体系, 酶和底物的用量也相应减少, 降低筛选成本的同时提高了通量。总之, 本研究所建立的 PTP1B 抑制剂高通量筛选模型在灵敏性、稳定性以及筛选效率等方面都有大幅度的提高。

本研究挑选本中心样品库中 24 240 个化合物并应用该模型进行筛选, 初筛得到 80 个样品, 通过复筛, 确定 6 个活性化合物 J5753、J10550、J10551、J10583、J10585 和 J11101, 该化合物对重组人源 PTP1B 蛋白活性均具有较强的抑制作用, 且有良好的浓度依赖性。对于这 6 种活性化合物, 作者将在下一步的工作中, 结合生物学活性评价, 确证其作为先导化合物可能性, 并进行化学结构修饰和优化; 此外, 亦将借鉴系统生物学和多靶点药物治疗的新思路, 针对其他糖尿病治疗靶点诸如 LAR (protein tyrosine phosphatase, receptor type, F)、SOCS (suppressor of cytokine signaling 1)、JNK (c-Jun N-terminal kinase) 等进行系统研究<sup>[27-31]</sup>, 考察化合物是否能够从多个靶点、多个层次调控胰岛素受体信号传导, 从而寻找基于 PTP1B 的多靶点药物。



**Figure 7** The concentration-response curves of J5753 (A), J10550 (B), J10551 (C), J10583 (D), J10585 (E) and J11101 (F) on PTP1B. The IC<sub>50</sub> value were 21.58, 18.39, 15.37, 11.92, 37.27, and 36.61 μg·mL<sup>-1</sup>, separately

## References

- [1] 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.
- [2] Kasibhatla B, Wos J, Peters KG. Targeting protein tyrosine phosphatase to enhance insulin action for the potential treatment of diabetes [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8: 805–813.
- [3] Chen C, Zhang Y, Huang C. Berberine inhibits PTP1B activity and mimics insulin action [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397: 543–547.
- [4] Koizumi M, Takagi-Sato M, Okuyama R, et al. Direct comparison of *in vivo* antisense activity of ENA oligonucleotides targeting PTP1B mRNA with that of 2'-O-(2-methoxy)ethyl-modified oligonucleotides [J]. *Oligonucleotides*, 2006, 16: 253–262.
- [5] Kokil R, Rewatkar V, Verma A, et al. Pharmacology and chemistry of diabetes mellitus and antidiabetic drugs: a critical review [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 4405–4423.
- [6] Ahmad F, Li PM, Meyerovitch J, et al. Osmotic loading of neutralizing antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 20503–20508.
- [7] Delibegovic M, Zimmer D, Kauffman C, et al. Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress [J]. *Diabetes*, 2009, 58: 590–599.
- [8] Zhuang D, Pu Q, Ceacareanu B, et al. Chronic insulin treatment amplifies PDGF-induced motility in differentiated aortic smooth muscle cells by suppressing the expression and function of PTP1B [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295: H163–173.
- [9] Gao L, Zhang X, Wang FR, et al. Chronic ethanol consumption

- up-regulates protein-tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) expression in rat skeletal muscle [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 1576–1582.
- [10] Luo A, Fan Y, Luo A, et al. Research progress of the drug screening technology in type 2 diabetes mellitus [J]. *J Biomed Eng (生物医学工程学杂志)*, 2006, 23: 895–898.
- [11] Bence KK, Delibegovic M, Xue B, et al. Addendum: neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action [J]. *Nat Med*, 2010, 16: 237.
- [12] Lantz KA, Hart SGE, Planey SL, et al. Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice [J]. *Obesity*, 2010, 18: 1516–1523.
- [13] Koren S, Fantus IG. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2007, 21: 621–640.
- [14] Hill B, Ahmed V, Bates D, et al. Enantioselective synthesis of protected *L*-4-[sulfonamido(difluoromethyl)]phenylalanine and *L*-4-[sulfonamido(methyl)]phenylalanine and an examination of hexa- and tripeptide platforms for evaluating pTyr mimics for PTP1B inhibition [J]. *J Org Chem*, 2006, 71: 8190–8197.
- [15] Jiang ZX, Zhang ZY. Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27: 263–272.
- [16] Verma N, Mittal M, Verma RK. Docking of oxalyl aryl amino benzoic acid derivatives into PTP1B [J]. *Bioinformation*, 2008, 3: 83–88.
- [17] Geary RS, Bradley JD, Watanabe T, et al. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-*O*-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2006, 45: 789–801.
- [18] Liu G. Technology evaluation: ISIS-113715, Isis [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6: 331–336.
- [19] Shi L, Yu HP, Zhou YY, et al. Discovery of a novel competitive inhibitor of PTP1B by high-throughput screening [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29: 278–284.
- [20] Glickman JF, Schmid A, Ferrand S. Scintillation proximity assays in high-throughput screening [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2008, 6: 433–455.
- [21] Mattila E, Ivaska J. High-throughput methods in identification of protein tyrosine phosphatase inhibitors and activators [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11: 141–150.
- [22] Appiah KK, Kostich WA, Gerritz SW, et al. A high-throughput screen for receptor protein tyrosine phosphatase- $\gamma$  selective inhibitors [J]. *J Biomol Screen*, 2011, 16: 476–485.
- [23] Luo DX, He Y, Gao XP, et al. Establishment and application of high throughput screening model for PTP1B inhibitors [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2005, 17: 606–609.
- [24] Wang SB, Guo J, Yu XM, et al. High-throughput screening of human soluble epoxide hydrolase inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1367–1372.
- [25] Zhang DS, Zhang TT, Li SJ, et al. High throughput screening for glutathione S-transferase inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 108–112.
- [26] Zhang TT, Huang ZT, Dai Y, et al. Identification of ligands for human LOX-1 through fluorescence polarization-based high throughput screening [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 792–795.
- [27] Kaneto H. The JNK pathway as a therapeutic target for diabetes [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9: 581–592.
- [28] Welham SJ, Clark AJ, Salter AM. A novel liver specific isoform of the rat LAR transcript is expressed as a truncated isoform encoded from a 5'UTR located within intron 11 [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10: 30.
- [29] Liu J, Ghanim M, Xue L, et al. Analysis of *Drosophila* segmentation network identifies a JNK pathway factor overexpressed in kidney cancer [J]. *Science*, 2009, 323: 1218–1222.
- [30] Emanuelli B, Macotela Y, Boucher J, et al. SOCS-1 deficiency does not prevent diet-induced insulin resistance [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377: 447–452.
- [31] Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 980–985.