

结核分枝杆菌蛋白磷酸酶及其抑制剂研发进展

滕铁山¹, 王洪海², 谢建平^{1,2*}

- (1. 西南大学生命科学学院现代生物医药研究所, 三峡库区生态环境与生物资源省部共建国家重点实验室, 重庆 400715;
2. 复旦大学生命科学学院遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要: 可逆的蛋白磷酸化调控多种生化反应。蛋白磷酸酶是结核分枝杆菌的关键分子, 不仅调控许多微生物自身的代谢, 而且还可能干扰宿主细胞的信号传导。在结核分枝杆菌逃避宿主细胞的杀灭、阻止吞噬体与溶酶体融合中蛋白磷酸酶也起着重要的作用。选择性抑制这些信号途径可能是抗结核药物研发的新思路。本文综述了结核分枝杆菌蛋白磷酸酶 MptpA、MptpB、MstP、SapM 及其底物、磷酸酶表达调控基因和网络、抑制剂研发进展, 以期为新抗生素靶标提供信息。

关键词: 蛋白磷酸酶; 结核分枝杆菌; 药物靶标

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1420-09

Advances in the study of *Mycobacterium tuberculosis* protein phosphatase and its inhibitors

TENG Tie-shan¹, WANG Hong-hai², XIE Jian-ping^{1,2*}

- (1. Institute of Modern Biopharmaceuticals, State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environment and Bio-Resource of the Three Gorges Area, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Reversible protein phosphorylation regulates multiple biochemical events. *Mycobacterium tuberculosis* phosphatases play important roles in regulating the pathogen physiology and interference of host signaling. They are also involved in the evasion of host immune response and blockage of the phagosome-lysosome fusion. Selective inhibition of phosphatase represents an ideal new avenue of anti-tuberculosis drug design. In this paper, we update the progresses about the regulation network of *Mycobacterium tuberculosis* phosphatases including MptpA, MptpB, MstP, SapM and their inhibitors. These serve as the basis for further anti-tuberculosis drug target.

Key words: protein phosphatase; *Mycobacterium tuberculosis*; drug target

致病菌进入宿主后, 为了保持自身的存活与繁殖, 逃避宿主免疫机制, 会采取干扰宿主信号传导、破坏宿主细胞结构及干扰其正常生理功能等方法,

以加强其自身毒力。蛋白磷酸化在细胞信号传导中占重要地位, 很多致病菌通过向宿主分泌蛋白磷酸酶干扰宿主的信号传导, 引发致病菌逃避宿主免疫效应, 如: *Yersinia pseudotuberculosis* 分泌蛋白磷酸酶 YopH 到宿主细胞中, 干扰细胞骨架的重排, 抑制吞噬作用, 发挥毒力效应。分泌到宿主中的蛋白磷酸酶主要在羟基氨基酸 (Ser、Thr 和 Tyr) 上去磷酸化, 这种去磷酸化效应与细菌毒力之间存在紧密关系。同源性分析也显示, 蛋白磷酸酶的致病效应在生物界普遍存在, 是致病的关键因素之一。因此, 蛋白磷酸酶

收稿日期: 2011-05-23.

基金项目: 国家重要传染病科技重大专项 (2012ZX10003-003, 2008ZX10003-001); 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2009A003); 重庆市自然科学基金 (CSTC, 2010BB5002); 国家自然科学基金资助项目 (81071316); 西南大学优秀博士基金 (kb2009010, ky2009009).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68367108,

E-mail: georgex@swu.edu.cn, jianpingxie@vip.sina.com

的研究可以揭示致病菌的分子致病机制, 并为药物筛选提供新靶标。作为结核病的病原菌, 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染人巨噬细胞时, 也会分泌蛋白磷酸酶到宿主细胞中, 干扰宿主免疫机制。蛋白磷酸酶是 MTB 在宿主中滞留、抑制吞噬体与溶酶体融合、逃避宿主杀灭的重要效应因子, 逐渐成为近年来 MTB 的研究热点之一, 并取得了一系列成果。

1 蛋白磷酸酶的分类

根据蛋白磷酸酶底物特异性、对金属离子的依赖性以及对抑制剂敏感性的差异, 将蛋白磷酸酶分为: PPP (phosphoserine and phosphothreonine residues phosphatases, PPP) 家族、PPM (Mg^{2+} dependent phosphoserine and phosphothreonine residues phosphatases, PPM) 家族及 PTP (phosphotyrosine residues phosphatases) 家族。其中 PPP 和 PPM 家族又属于 Ser/Thr 蛋白磷酸酶家族, PPM 家族包括蛋白磷酸酶 2C (PP2C) 和位于线粒体的丙酮酸脱氢酶。PTP 家族大部分属于酪氨酸蛋白磷酸酶 (表 1), 但还包含能使 Tyr 和 Ser/Thr 去磷酸化的双底物特异性蛋白磷酸酶 (dual specificity protein phosphatases, DSPs)^[1]。

MTB 基因组编码的蛋白磷酸酶包括: MptpA、MptpB、MstP 以及一个以磷酸肌醇为底物的酸性磷酸酶 SapM。其中 MptpA 和 MptpB 是分泌蛋白, 属于 PTP 家族, 是 MTB 的毒力因子。MstP 是跨膜蛋白, 属于 PPM 家族——PP2C 亚家族中的一员, 在 MTB 的 STPK-EmbR 信号传导中发挥重要作用^[2]。

1.1 MptpA 与 MptpB 的同源性及进化分析 MTB 含有两个酪氨酸蛋白磷酸酶基因: *mptpA* (Rv2234) 和

mptpB (Rv0153c)^[3], 其编码蛋白都能分泌到巨噬细胞胞质中, 磷酸化修饰巨噬细胞内特定蛋白, 调控宿主和病原体相互作用^[4]。氨基酸序列同源性分析显示: MptpA 拥有蛋白磷酸酶保守的 CX₃R 序列, 这是蛋白磷酸酶的典型特征。除 *M. smegmatis* 外, 结核分枝杆菌属中 CX₃R 序列是保守的 CTGNICR。MptpA 与人低分子量酪氨酸蛋白磷酸酶 (LMW-PTP) 有 37% 序列同源性及其很高的结构相似性^[5], 在分枝杆菌属内及其他致病菌 (如 *Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas solanacearum*) 中 MptpA 也有较高的序列同源性 (表 1)。MptpA 较低的蛋白特异性显示其作为药物靶标会有一定的局限性。Cys11、Arg17 和 Asp126 是 MptpA 的活性位点, 突变会导致 MptpA 活性丧失^[6]; 但这 3 个活性位点在分枝杆菌属、其他致病菌及 LMW-PTP 中也同样存在 (图 1)。

MptpB 也有 PTP 家族典型的 CX₃R 基序, 在分枝杆菌属中这个序列是保守的 CFAGKDR。CFAGKDR 在三级结构上会形成 P 环以结合磷酸基团。P 环上的 Cys160、Lys164、Asp165 及 Arg166 是 MptpB 的活性位点, 这 4 个活性位点在分枝杆菌属内及 *S. aureus*、*S. pneumoniae* 等致病菌内的蛋白磷酸酶中严格保守, 但在人蛋白磷酸酶 SHP-1 中没有 Lys164 和 Asp165 活性位点 (图 2)。晶体结构及缺失突变显示: Asp165 为催化残基, Lys164 为识别底物特异性的残基^[7]。序列同源性分析显示: MptpB 与人体 SHP-1 蛋白同源性不高, 显示其作为药物靶标有潜在优势。在牛分枝杆菌及 BCG 中, MptpB 只有 1 个氨基酸突变 (D105G), 显示其在结核类分枝杆菌中严格保守。*M. marinum* 与 *M. ulcerans* 中该同源蛋白的氨基酸序列严格保守, 与

表 1 微生物酪氨酸蛋白磷酸酶的功能、分泌特性及同源性分析。 “+” 表示存在, “-” 表示不存在

微生物	酪氨酸蛋白磷酸酶	是否进入宿主	MTB 氨基酸序列的同源性	功能	分泌系统
<i>Coxiella burnetii</i>	Acp	+	假设蛋白 (Rv2719c) 13/28 (46%)	抑制人体中性粒细胞	
<i>Escherichia coli</i> K-30	Wzb	-	MptpA (Rv2234) 46/145 (32%)	荚膜装配	
<i>Helicobacter pylori</i>	CagA	+	假设蛋白 (Rv2148c) 18/57 (32%)	肌动蛋白重排及细胞形态	IV 型分泌系统
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yor5	-	MptpA (Rv2234) 41/140 (29%)	荚膜合成	
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	EpsP	-	MptpA (Rv2234) 48/149 (32%)	表多糖运输	
<i>Salmonella typhimurium</i>	SptP	+	DNA 聚合酶 III β 亚基 (Rv0002) 20/68 (29%)	肌动蛋白重排	III 型分泌系统
<i>Staphylococcus aureus</i>	CapC	-	假设蛋白 (Rv2140c) 17/65 (26%)	荚膜合成	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Stp1	-	MstP (Rv0018c) 78/225 (35%)	必需毒力因子	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CpsB	-	-	荚膜合成	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YopH	+	PknD (Rv0931c) 18/43 (42%)	细胞骨架重排, 抑制吞噬作用	III 型分泌系统

<i>M. tuberculosis</i>	1	MSDPLHVT <u>FVCTGNICRSPMAE</u> KMFAQLRHRGLGDAVRVTSAGTGNWHVG...ALDVEDP	127
<i>M. bovis/BCG</i>	1	MSDPLHVT <u>FVCTGNICRSPMAE</u> KMFAQLRHRGLGDAVRVTSAGTGNWHVG...ALDVEDP	127
<i>M. smegmatis</i>	4	LHVT <u>FVC+GNICRSPMAE</u> KMFA Q+ RGL D VRVTSAGTG+WH ... DVEDP	124
<i>S. aureus</i>	2	+ V <u>FVC GNICRSPMAE</u> + Q+L+ R + D ++V S GTG+W++G... DV DP	117
<i>S. pneumoniae</i>	4	+ <u>FVC GNICRSPMAE</u> + + D + S T +W G... V DP	110
LMW-PTP	8	V <u>FVC GNICRSP</u> +AE +F + + + + + S +W+VG... L +EDP	127
		* * *	

图1 MptpA的活性位点和保守残基。加下划线的氨基酸残基是蛋白磷酸酶的保守序列——CX₅R;加“*”的氨基酸残基是MptpA活性位点——Cys11、Arg17和Asp126,在分枝杆菌属及其他致病菌中具有保守性

<i>M. tuberculosis</i>	121	AATRYMTDEYRQFPTRNGAQRALHRVVTLAAGR <u>PVLTHCFAGKDR</u> TGFVVALVLEAVGL	180
<i>M. bovis</i>	121	AATRYMTDEYRQFPTRNGAQRALHRVVTLAAGR <u>PVLTHCFAGKDR</u> TGFVVALVLEAVGL	180
<i>M. smegmatis</i>	117	A RYMT+ Y +FPT GA A+ +VV+LLAAGR <u>PV+ HCFAGKDR</u> TGF VA VL+A G+	176
<i>Yersinia</i>	119	+M + Y + P + A + L ++ A+ PV+ <u>HC GKDR</u> TG ALVL A+G	193
SHP-1	438	R +L AG P++ <u>HC AG</u> RTG V+ +++E +GL	474
		* ***	

图2 MptpB中活性位点和保守残基。加下划线的序列是蛋白磷酸酶的保守序列——CX₅R,这个序列在分枝杆菌属中是保守的CFAGKDR;加“*”的氨基酸残基是MptpB活性位点——Cys160、Lys164、Asp165及Arg166,这些位点都在其保守序列CX₅R中;在Yersinia及人蛋白磷酸酶SHP-1中没有Lys164和Asp165

结核类分枝杆菌相比,都有115D、116G、117S、118N等4个氨基酸缺失,这与它们的进化关系较近有关。

1.2 MptpA的底物及其调控机制 MptpA是MTB的分泌性毒力蛋白,当MTB进入巨噬细胞后,MptpA表达量上调以应对宿主免疫效应。尽管缺乏一般的信号肽序列,在MTB培养基内仍然能检测到MptpA存在^[8],这表明其分泌机制比较特殊。转录子分析显示,MptpA启动子在缓慢生长的BCG中表达,在快速生长的*M. smegmatis*中不表达^[5],表明作为毒力因子,MptpA表达具有选择性。MTB在巨噬细胞中滞留,会暴露在活性氮与活性氧的压力下,MptpA存在2个丝氨酸残基(Cys¹¹与Cys¹⁶),在氧化还原压力下会形成分子内二硫键,避免Cys¹¹被不可逆氧化^[9,10]。

人C类囊泡分选蛋白(vacuolar protein sorting, VPS) VPS33B是MptpA的底物^[11]。作为膜转运和融合的关键调控子,VPS33B能促进吞噬体与溶酶体融合(图3)。另外,肌丝蛋白(F-actin)在吞噬体与溶酶体融合中也起着重要作用,用细胞松弛素D处理肌丝蛋白,会干扰早期吞噬体运动及早期吞噬体与溶酶体融合^[12,13]。在感染MTB的巨噬细胞内,MptpA表达量的上调会导致肌丝蛋白聚集,抑制吞噬体与溶酶体融合。敲除回补实验也验证了MptpA能引起肌丝蛋白在吞噬溶酶体表面聚集增加^[14]。由于宿主蛋白磷酸信号传递的复杂性,除了VPS33B及肌丝蛋白外,推测MptpA在宿主中还有其他底物,探索

MptpA在宿主中的完整功能,对进一步了解MptpA及药物靶标筛选有重要意义。

PtkA (Rv2232)原先被认为是盐酸脱卤素酶超

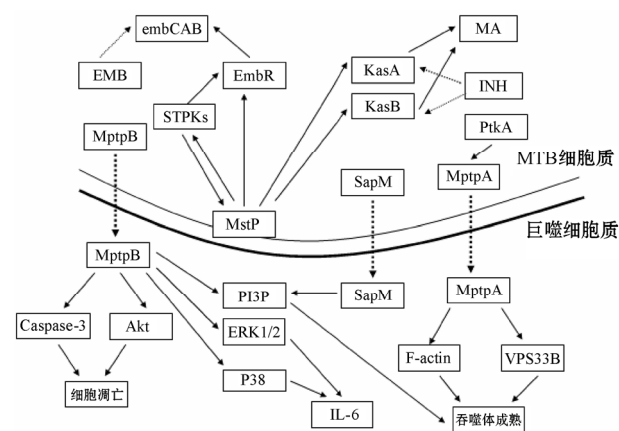


图3 MTB进入巨噬细胞后,MTB中的蛋白磷酸酶发挥作用的机制。MptpA进入巨噬细胞后,通过去磷酸化VPS33B、肌丝蛋白来抑制吞噬体与溶酶体结合(吞噬体成熟)。MptpB进入巨噬细胞后,干扰P38、ERK1/2,进而抑制了IL-6的产生;MptpB与SapM都能以PI3P为底物去磷酸化,抑制吞噬体成熟;MptpB还能调节Caspase-3及Akt的活性,抑制细胞凋亡进程。MstP与STPKs(丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)能以对方为底物进行磷酸化和去磷酸化,并都能以EmbR等转录因子为底物进行磷酸化调控基因表达;MstP还能以KasA、KasB为底物调控分枝杆菌(MA)的合成。P38:丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),ERK1/2:细胞外信号调节激酶,INH:异烟肼,EMB:乙胺丁醇。实线箭头表示分子间相互作用,粗虚线箭头代表分子分泌路线,细虚线箭头表示药物INH或EMB的药物靶标

家族中的一员, 与 MptpA 位于同一 ORF 并位于其上游, 能以 MptpA 为底物磷酸化其两个相邻的酪氨酸残基: Tyr128 和 Tyr129^[15]。但 MptpA 不能以 PtkA 为底物去磷酸化, 这符合 MptpA 作为一个巨噬细胞特异性蛋白的特征 (图 3)。值得思考的是, MptpA 被磷酸化的酪氨酸残基位点 Tyr128 和 Tyr129 离活性位点 Asp126 很近, MptpA 的磷酸化对其分泌特性或在宿主中发挥毒力功能应该有一定的影响, 但这种影响的具体机制还需要阐明。查耳酮是植物中黄酮类化合物合成过程中的代谢产物, 已证明是 MptpA 的抑制剂^[16]。

1.3 MptpB 的底物及其调控机制 MptpB 最适 pH 为 5.6, 类似细胞溶酶体的环境。MTB 进入宿主后, 作为必须毒力因子的 MptpB 会分泌到巨噬细胞胞质内, 介导 MTB 在宿主中存活。MptpB 突变株在激活的巨噬细胞中存活受限, 在未激活的巨噬细胞内存活不受影响^[17]。晶体结构显示, MptpB 有 2 个不同的磷酸化酪氨酸结合位点及 1 个双螺旋盖子结构。双螺旋盖子保护 MptpB 免受宿主活性氮及活性氧的压力^[18]。MptpB 除了以磷酸化的丝氨酸/苏氨酸为底物去磷酸化外, 还能以磷酸肌醇-3-磷酸 (phosphatidylinositol 3 phosphate, PI3P) 为底物去磷酸化。MptpB 的这种去磷酸化功能显示了其干扰宿主正常功能的巨大作用。同时, 以 MptpB 为药物靶标进行新药开发也具有重要意义。

在感染 MTB 的巨噬细胞内, γ 干扰素不能发挥杀灭胞内致病菌的作用^[19]。预示 MTB 干扰了 γ 干扰素的细胞信号传导。用 γ 干扰素处理巨噬细胞, 能激活细胞质激酶 JAK2、STAT1、ERK1/2、P38 及 JNK (图 3), 另外白细胞介素 6 (IL-6) 也会增加。IL-6 是巨噬细胞分泌的关键细胞因子, 能提高巨噬细胞的杀菌活性, 能介导对 MTB 的初始免疫。用 γ 干扰素处理重组表达 MptpB 的巨噬细胞, IL-6 水平没有变化, 表明 MptpB 通过某种途径干扰了 IL-6 的表达, 影响了宿主的初始免疫。通过检测这些细胞质激酶的磷酸化状态发现: ERK1/2 和 P38 的磷酸化水平下降, JAK2、STAT1 及 JNK 的磷酸化状态没有变化, 表明 MptpB 可能通过下调 ERK1/2 和 P38 的活性来抑制 IL-6 的产生, 这与 ERK1/2 和 P38 能促进 IL-6 表达的结果吻合 (图 3)。

MTB 有其他细菌少有的磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 从头合成途径, 预示 PI 在 MTB 生理功能中的重要作用。PI 在调控受体介导的信号传导、肌动蛋白变型及膜动力学等方面发挥重要作

用^[20], 是吞噬体成熟必需因子。MptpB 通过扰乱宿主 PI 代谢, 也能达到阻碍吞噬体与溶酶体融合的目的, 并介导 MTB 在宿主中的存活^[7]。此外, MptpB 能通过去磷酸化作用, 提高蛋白激酶 B (Akt) 的活性、降低 Caspase-3 的活性, 以抑制巨噬细胞凋亡, 达到自身正常生长和繁殖的目的 (图 3)。Akt 与 Caspase-3 分别在细胞增殖、细胞分化、细胞存活的信号传导及细胞程序性死亡中起着关键作用^[21]。MptpB 的多功能效应显示其在调控宿主正常生理功能时的强大作用, 研究并探索 MptpB 在宿主中的完整功能, 特别是对其调控线路中上游或下游的关键蛋白进行研究, 对开拓药物靶标的筛选有重要作用。

1.4 MstP (Rv0018c) 的底物及其调控机制 MstP 是 PPM/PP2C 的家族成员, 有 1 个含 237 个氨基酸的磷酸酶区域, 后面跟 1 个含 67 个氨基酸的跨膜螺旋及 1 个含 191 个氨基酸的胞外域。MstP 有 3 个保守氨基酸残基: Arg20 是磷酸酶水解活性位点, Asp38 与 Asp229 是必须的 Mn^{2+} 结合位点。D38G 及 D229G 突变会使其活性降到最低, R20G 突变会降低其 40% 的活性^[22]。MstP 与其他 PP2C 家族成员一样, 需要二价金属离子 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 作为辅因子。但 MstP 有第 3 个 Mn^{2+} 结合域, 而一般 PP2C 家族成员只有 2 个 Mn^{2+} 结合域, 这归结于 MstP 结合 2 个 Mn^{2+} 后, 其结构发生显著变化, 暴露出了第 3 个 Mn^{2+} 结合域。MstP 是 MTB 内 11 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine threonine protein kinase, STPKs) 的对抗物, 能去磷酸化 PknA、PknB、PknD、PknE、PknF、PknH 及其底物。最新研究发现, MstP 所在的基因簇中包含两个 STPKs: PknA 和 PknB, MstP 也能被 PknA 和 PknB 磷酸化^[22] (图 3)。MstP 和 STPKs 是 MTB 中蛋白磷酸化水平的关键调控者, 这种反馈调控现象——磷酸酶被激酶磷酸化并反过来去磷酸化同样的激酶——在其他生物中也存在, 如: 鼠依赖 Mg^{2+} 蛋白磷酸酶 α 与酪蛋白激酶 II 之间也存在这种磷酸化的反馈调节现象^[23]。

分枝菌酸 (mycolic acid, MA) 对 MTB 在宿主中存活有重要作用。MstP 是分枝菌酸合成必须的调控因子。MTB 通过 II 型脂肪酸合成系统 (type II fatty acid syntheses system, FAS-II) 合成分枝菌酸, KasA 和 KasB 是合成分枝菌酸必须的酶。KasA 延长脂肪酸链, 磷酸化使其酶活性减弱; KasB 终止脂肪酸链延长, 磷酸化加强其酶活性。在霉菌酸酯合成时, MstP 通过去磷酸化 KasA 和 KasB 来发挥调节作用, 促进全长分枝菌酸的合成^[24]。KasA 和 KasB 同时也

是异烟肼 (isonicotinic acid hydrazide, INH) 的靶标 (图 3)。

MstP 定位于细胞膜, 在体外也能去磷酸化所有 STPKs 及其磷酸化的底物^[25]。EmbR 是 MTB 的转录调控子, 是 MstP 和 STPKs 的共同底物^[26]。EmbR 被 PknH、PknA 或 PknB 磷酸化而激活, 促进 embCAB 操纵子的转录。embCAB 是抗结核药物乙胺丁醇 (ethambutol, EMB) 的药物靶标, 其转录加强会降低乙胺丁醇的药效^[27]。MstP 通过去磷酸化 STPKs 和 EmbR, 降低 EmbR 的 ATP 酶活性及与 DNA 结合活性^[28], 对抗 STPK-EmbR 信号传导。定位在细胞膜上的 MstP 可以使作用在 DNA 上的转录因子去磷酸化。目前还没有关于这种空间上看似不可能的现象的合理解释 (也许存在某种中间产物)。

1.5 酸性磷酸酶 SapM (Rv3924) 的底物及作用机制
SapM 以 PI3P 为底物, 最适 pH 为 2.5, 属于酸性磷酸酶家族, 具有该家族保守的 RHFXXR 序列。SapM 对 MTB 在宿主中存活是必须的。SapM 活性位点为 His¹⁷ 和 His³⁰³, 其只在致病性分枝杆菌基因组中存在, 且在一定的 pH 环境下选择性表达, 与其他分枝杆菌无同源蛋白。其生化特征类似于细菌非特异性酸性磷酸酶, 但其基因序列与真菌有高同源性而与细菌无同源性, 推测 SapM 是一类新的细菌酸性磷酸酶^[29]。生物信息学分析 SapM 与人没有同源性, 可以作为药靶进行前期研究。

PI3P 是 SapM 的底物, 在吞噬体与溶酶体融合过程中发挥重要作用。MTB 进入巨噬细胞后, 后者会形成包裹 MTB 的吞噬体, MTB 从吞噬体中释放时, PI3P 也会不断被排出, 预示 PI3P 与 MTB 在宿主中滞留密切相关^[19]。MTB 为逃避进入宿主溶酶体中被杀灭, 会分泌 SapM 去磷酸化 PI3P, 阻止吞噬体与溶酶体融合, 使 MTB 在巨噬细胞内滞留^[20, 30]。小鼠实验表明: Rv3924 缺失型 BCG 比野生型 BCG 免疫力更强, 缺失型 BCG 能影响树突状细胞转移, 激活树突状细胞, 使其发挥其成熟细胞功能^[31]。这种必需毒力因子缺失反而增强 BCG 免疫活性的现象, 对认识 Rv3924 的作用是一个新的突破, 这种现象和机制值得对 MTB 的其他相关基因进行类似研究和探索。

2 对 MptpA/MptpB 分泌系统的认识

MptpA 的 N 末端不含信号肽序列, 不能通过 Sec 或 Tat 分泌系统。Yersinia 与 *P. aeruginosa* 中也存在同样现象。在 *P. aeruginosa* 中, PpkA 能磷酸化 Fah1 蛋白, 磷酸化的 Fah1 蛋白招募 IV 型分泌系统组分, 从而分泌另外一个无信号肽序列的蛋白 Hcp1^[32]。

Yersinia 能通过 Sec 分泌系统分泌 Yops 蛋白到宿主中, 对抗宿主免疫应答。Yops 在 N 末端也没有典型信号肽序列, 但在 yopH 基因下游有一个基因能编码 16 kD 酸性蛋白, 这个酸性蛋白是 YopH 的伴侣蛋白, 能帮助 YopH 分泌到胞外。伴侣蛋白突变会导致 YopH 在胞质中累积^[33]。MTB 中是否存在类似于 *P. aeruginosa* 或 Yersinia 的分泌机制, 将 MptpA/MptpB 分泌到宿主中, 值得认真考虑和研究。针对其分泌系统开展更深入的研究, 对未来结核病控制新措施可能颇具启发。

3 MptpA 与 MptpB 抑制剂的最新研究进展

传统抗结核药物通过抑制细胞壁合成或细菌生长来杀灭 MTB, 但同时会产生 MTB 选择性压力。靶向分泌型毒力因子的药物有效解决了这个问题, 也避免了药物通过细胞壁时产生渗透性障碍。对于免疫系统受到损害的患者 (如 HIV 感染者) 及高风险感染 TB 的医务工作者, 这些药物也能降低感染几率。此类抑制剂与传统的抗生素联用还可以有效清除感染, 减少 MTB 抗性产生^[34]。MptpA/MptpB 是 MTB 的分泌型毒力因子, 以 MptpA/MptpB 为药物靶标筛选出很多有应用前景的抑制剂, 预示着未来 TB 治疗的可选择性。

目前很多 MptpA/MptpB 的抑制剂有进一步发展的潜力。新发现的有双位点活性的 isoxazole-salicylate 化合物具有细胞活性, 在感染 MTB 的巨噬细胞内证明了其治疗效应。与对照相比, 消减了巨噬细胞内 MTB 90% 的生长^[35]。其独特双位点结合抑制模型是其较高活性及选择性的结构基础, 这种结构也为以后设计新抑制剂提供了思路。但是, 更多的抑制剂由于缺乏晶体结构信息, 阻碍了它们的进一步优化。作为判断治疗药物的标准, 对抑制剂与靶标结合复合物进行晶体结构研究及动物模式实验是目前急需的。见表 2^[36-49]。

近年来, 随着多重耐药结核病 (MDR-TB)、广泛耐药结核病 (XDR-TB) 及与 HIV 共感染结核病的出现^[50], 使结核病疫情在世界范围内有回升趋势, 又成为危害人类健康的主要传染病之一。以蛋白磷酸酶为抗结核药物靶标的研究, 揭示了 TB 新的发病机制, 为 TB 治疗展现了新前景。MTB 通过分泌毒力因子来阻碍吞噬体与溶酶体融合, 保持在宿主细胞内滞留, 这种致病机制在其他胞内病原菌中也同样存在, 显示该机制进化的保守性。与 MptpA/MptpB 一样, MTB 中的蛋白激酶 PknG 也能分泌到巨噬细胞, 与 MptpA/MptpB 发挥协同作用, 共同干扰巨噬细胞的

信号传导, 以蛋白激酶为靶标进行药物筛选也同样有重要意义。MTB 通过表达、分泌毒力因子来适应宿主环境的调控机制是十分复杂的, 继续完善其调控机制的研究会为抗结核药物靶标的筛选提供更精确的方向, 拓展人们对蛋白磷酸酶完整功能的认识。

表 2 MptpA 与 MptpB 抑制剂的名称及抑制效果。注: “*”表示 K_i 值

抑制剂名称	MptpA $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MptpB $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Macrolines	$>100^{[36]}$	4.71 ± 1.14
Naphthalene acid derivatives		$0.16 \pm 0.01^{[37]*}$
Indole quinoline derivatives		$1.13 \pm 0.63^{[38]}$
I-A09	$77.3 \pm 5.1^{[21]}$	1.26 ± 0.22
Stevastelins	$8.8 \pm 5.9^{[39]}$	
Chalcones	$8.4 \pm 0.9^{[40]}$	
Benzoic acids competitive	$1.6 \pm 0.4^{[41]}$	
Difluoromethylphosphonic acid (DFMP)	$1.4 \pm 0.3^{[42]*}$	>100
Indolizines	$74.9 \pm 8.8^{[43]}$	7.5 ± 1.9
Indolo quinolizidines	$>100^{[38]}$	0.36 ± 0.12
Polyketides		$11.5 \pm 1.3^{[44]}$
Brunsvicamides	$>100^{[45]}$	7.3
Isoxazole carboxylic acids	$>50^{[46]}$	0.22 ± 0.3
Isoxazole/azides		$0.55 \pm 0.3^{[47]}$
		$0.15 \pm 0.03^*$
Soxazole/azides		$0.64 \pm 0.09^{[47]}$
		$0.17 \pm 0.01^*$
Oxalylamino-methylene-thiophene sulphonamide (OMTS)		$0.44 \pm 0.05^{[48]}$
		0.17^*
Isoxazole-salicylate		$7.0 \pm 0.4^{[35]}$
Chalcone analogs	$4.9 \pm 1.0^{[49]*}$	

在巨噬细胞与 MTB 相互作用的过程中, 巨噬细胞内也有适应 MTB 进入宿主的效应蛋白, 如 GTP 水解酶 LRG47、质膜成分胆固醇^[51]、冠蛋白 1^[52]等。这些蛋白被 MTB 效应蛋白激活后, 都参与了 MTB 逃避宿主免疫效应的过程。定向地以这些宿主蛋白磷酸酶为药物靶标, 可以为抗结核药物靶标筛选提供新的思路。

许多蛋白磷酸酶在肿瘤信号传导过程中也发挥了关键作用, 如 PTP-PEST^[53]、PTP α ^[54]、PRL-3^[55]; 有些蛋白磷酸酶还作为抑癌因子而存在, 如 PP2A^[56]、PTEN^[57, 58]、SHP-1^[59]。用合适的抑制剂干扰或逆转肿瘤信号传导, 取得了很好的治疗效果。这种药物筛选方法也使抗肿瘤药物在过去 15 年有了巨大的发展^[60], 如已在临床上应用的、以蛋白磷酸酶 SHP-2 为药靶的抗癌药物磷酸雌莫司汀 (estramustine

phosphate)^[61]。在 MTB 入侵宿主细胞后, 蛋白磷酸酶 SHP-1^[59]、PTP α ^[62]、PTP1C^[63]等表达异常, 显示其在 MTB 感染的过程中也起到了某种作用, 继续研究其具体机制, 也是抗结核药物研究努力的方向。目前研究的比较清楚的是 SHP-1, 其被脂阿拉伯甘露聚糖 (lipoarabinomannan, LAM) 激活后, 有促进 MTB 在宿主细胞中滞留, 逃避宿主免疫机制的效力^[64]。模式动物肿瘤模型中的研究发现: 过量表达无活性的 PTP1B, 能竞争性抑制细胞内源性 PTP1B 的活性, 有效抑制了 PTP1B 介导的肿瘤信号传导。在 MTB 感染过程中, 能否过表达其无活性关键毒力蛋白来对关键信号途径进行抑制, 进而达到结核治疗的目的。

结核病作为全球性的公共健康问题, 通过借鉴抗癌药物研究成果及研究思路, 结合癌细胞中蛋白磷酸酶的信号机制及抑制剂筛选的方法, 有助于加速新的抗结核药物面市。

References

- [1] Bellinzoni M, Welhenkel A, Shepard W, et al. Insights into the catalytic mechanism of PPM Ser/Thr phosphatases from the atomic resolution structures of a mycobacterial enzyme [J]. *Structure*, 2007, 15: 863–872.
- [2] Pereira SF, Goss L, Dworkin J. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75: 192–212.
- [3] Singh R, Singh A, Tyagi AK. Deciphering the genes involved in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2005, 85: 325–335.
- [4] Wehenkel A, Bellinzoni M, Graña M, et al. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784: 193–202.
- [5] Cowley SC, Babakaiff R, Av-Gay Y. Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA [J]. *Res Microbiol*, 2002, 153: 233–241.
- [6] Madhurantakam C, Chavali VR, Das AK. Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: a low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* through site-directed mutagenesis [J]. *Proteins*, 2008, 71: 706–714.
- [7] Beresford N, Patel S, Armstrong J, et al. MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity [J]. *Biochem J*, 2007, 406: 13–18.
- [8] Bach H, Sun J, Hmama Z, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PtpA is an endogenous tyrosine phosphatase secreted during infection [J]. *Infect Immun*, 2006, 74: 6540–

- 6546.
- [9] Caselli A, Marzocchini R, Camici G, et al. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂ [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 32554–32560.
- [10] Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 941–949.
- [11] Bach H, Papavinasandaram KG, Wong D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3: 316–322.
- [12] Kjekens R, Egeberg M, Habermann A, et al. Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 345–358.
- [13] Guerin I, de Chastellier C. Pathogenic mycobacteria disrupt the macrophage actin filament network [J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 2655–2662.
- [14] Castandet J, Prost JF, Peyron P, et al. Tyrosine phosphatase MptpA of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages [J]. *Res Microbiol*, 2005, 156: 1005–1013.
- [15] Bach H, Wong D, Av-Gay Y. *Mycobacterium tuberculosis* PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA [J]. *Biochem J*, 2009, 420: 155–160.
- [16] Chiaradia LD, Mascarello A, Purificacao M, et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 6227–6230.
- [17] Singh R, Rao V, Shakila H, et al. Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 50: 751–762.
- [18] Ecco G, Vernal J, Razzera G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2010, 46: 7501–7503.
- [19] Vergne I, Chua J, Lee HH, et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4033–4038.
- [20] Hilbi H. Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8: 1697–1706.
- [21] Zhou B, He YT, Zhang X, et al. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 4573–4578.
- [22] Sajid A, Arora G, Gupta M, et al. Phosphorylation of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr phosphatase by PknA and PknB [J]. *Plos One*, 2011, 6: e17871.
- [23] Kobayashi T, Kanno S, Terasawa T, et al. Phosphorylation of Mg(2+)-dependent protein phosphatase alpha (type 2C alpha) by casein kinase II [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 195: 484–489.
- [24] Molle V. The Condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 30094–30103.
- [25] Chopra P, Singh B, Singh R, et al. Phosphoprotein phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis* dephosphorylates serine-threonine kinases PknA and PknB [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311: 112–120.
- [26] Molle V, Kremer L. Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 75: 1064–1077.
- [27] Sharma K, Gupta M, Pathak M, et al. Transcriptional control of the mycobacterial embCAB operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, *in vivo* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188: 2936–2944.
- [28] Sharma K, Gupta M, Krupa A, et al. EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *FEBS J*, 2006, 273: 2711–2721.
- [29] Saleh MT, Belisle JT. Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182: 6850–6853.
- [30] Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3: 399–407.
- [31] Festjens N, Bogaert P, Batni A, et al. Disruption of the SapM locus in *Mycobacterium bovis* BCG improves its protective efficacy as a vaccine against *M. tuberculosis* [J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3: 222–234.
- [32] Chao J, Wong D, Zheng XJ, et al. Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804: 620–627.
- [33] Wattiau P, Bernier B, Deslee P, et al. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:10493–10497.
- [34] Silva AP, Taberner L. New strategies in fighting TB: targeting *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases MptpA & MptpB [J]. *Future Med Chem*, 2010, 2: 1325–1337.
- [35] Beresford NJ, Mulhearn D, Szczepankiewicz B, et al. Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages [J]. *J*

- Antimicrob Chemother, 2009, 63: 928–936.
- [36] Nören-Müller A, Wilk W, Saxena K, et al. Discovery of a new class of inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B by biology-oriented synthesis [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47: 5973–5977.
- [37] He RJ, Yu ZH, He YT, et al. Double click reaction for the acquisition of a highly potent and selective mPTPB inhibitor [J]. *ChemMedChem*, 2010, 5: 2051–2056.
- [38] Noren-Muller A, Reis-Correa I, Prinz H, et al. Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10606–10611.
- [39] Manger M, Scheck M, Prinz H, et al. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase A (MptpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach [J]. *Chembiochem*, 2005, 6: 1749–1753.
- [40] Marrapu VK, Chaturvedi V, Singh S, et al. Novel aryloxy azoyl chalcones with potent activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 4302–4310.
- [41] Kumar P, Narasimhan B, Yogeewari P, et al. Synthesis and antitubercular activities of substituted benzoic acid *N'*-(substituted benzylidene/furan-2-ylmethylene)-*N*-(pyridine-3-carbonyl)-hydrazides [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45: 6085–6089.
- [42] Rawls KA, Lang PT, Takeuchi J, et al. Fragment-based discovery of selective inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 6851–6854.
- [43] Weide T, Arve L, Prinz H, et al. 3-Substituted indolizine-1-carbonitrile derivatives as phosphatase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 59–63.
- [44] Seibert SF, Eguereva E, Krick A, et al. Polyketides from the marine-derived fungus *Ascochyta salicorniae* and their potential to inhibit protein phosphatases [J]. *Org Biomol Chem*, 2006, 4: 2233–2240.
- [45] Muller D, Krick A, Kehraus S, et al. Brunsvicamides A-C: sponge-related cyanobacterial peptides with *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase inhibitory activity [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 4871–4878.
- [46] Soellner MB, Rawls KA, Grundner C, et al. Fragment-based substrate activity screening method for the identification of potent inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* phosphatase PtpB [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 9613–9615.
- [47] Tan LP, Wu H, Yang PY, et al. High-throughput discovery of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B (MptpB) inhibitors using click chemistry [J]. *Org Lett*, 2009, 11: 5102–5105.
- [48] Grundner C, Perrin D, van Huijsduijnen RH, et al. Structural basis for selective inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB [J]. *Structure*, 2007, 15: 499–509.
- [49] Mascarello A, Chiaradia LD, Vernal J, et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 3783–3789.
- [50] Ahirrao P. Recent developments in antitubercular drugs [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8: 1441–1451.
- [51] Warner DF, Mizrahi V. The survival kit of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 282–284.
- [52] Trimble W, Grinstein S. TB or not TB: calcium regulation in *Mycobacterial* survival [J]. *Cell*, 2007, 130: 12–14.
- [53] Davidson D, Shi X, Zhong MC, et al. The phosphatase PTP-PEST promotes secondary T cell responses by dephosphorylating the protein tyrosine kinase Pyk2 [J]. *Immunity*, 2010, 33: 167–180.
- [54] Pallen CJ. Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalph): a Src family kinase activator and mediator of multiple biological effects [J]. *Curr Top Med Chem*, 2003, 3: 821–835.
- [55] Bardelli A, Saha S, Sager JA, et al. PRL-3 expression in metastatic cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5607–5615.
- [56] Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling [J]. *Biochem J*, 2001, 353: 417–439.
- [57] Li DM, Sun H. TEPI, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 2124–2129.
- [58] Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 13375–13378.
- [59] Knutson KL, Hmama Z, Herrera-Velit P, et al. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 645–652.
- [60] Hu J, Liu J, Ghirlando R, et al. Structural basis for recruitment of the adaptor protein APS to the activated insulin receptor [J]. *Mol Cell*, 2003, 12: 1379–1389.

- [61] Scott LM, Chen L, Daniel KG, et al. Shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor activity of estramustine phosphate and its triterpenoid analogs [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 730-733.
- [62] Herrera Abreu MT, Penton PC, Kwok V, et al. Tyrosine phosphatase PTPalpha regulates focal adhesion remodeling through Rac1 activation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294: C931-C944.
- [63] Prabhakar S, Qiao Y, Canova A, et al. IFN-alpha beta secreted during infection is necessary but not sufficient for negative feedback regulation of IFN-alpha beta signaling by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Immunol*, 2005, 174: 1003-1012.
- [64] Nandan D, Knutson KL, Lo R, et al. Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis [J]. *J Leukocyte Biol*, 2000, 67: 464-470.

欢迎订阅 2012 年《药学报》

《药学报》(CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870)是由中国药学会主办、中国医学科学院药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目:述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来,一直报道药学领域原始性、创新性科研成果,旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。

《药学报》为我国自然科学核心期刊,据中国科学引文数据库的数据库统计,在中国科技核心期刊排行榜中,《药学报》名列前茅,在药学类期刊中居首位;本刊已被世界主要检索系统收录,为我国药学界高水平的学术刊物,在国际上享有一定知名度。本刊 1999 年荣获首届“国家期刊奖”,2001 年入选中国期刊方阵“双高”(高知名度、高学术水平)期刊;2002 年被评为第二届“国家期刊奖百种重点科技期刊”,并荣获第三届“中国科技优秀期刊奖”二等奖;2002~2009 年连续 8 届荣获“百种中国杰出学术期刊”称号;2008~2010 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助(B类);2011 年荣获第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

本刊为 128 页,月刊,大 16 开本。每期定价 40 元,全年定价 480 元。国内邮发代码:2-233,国外代码:M105。欢迎广大作者踊跃投稿,欢迎广大读者订阅。可采用的订阅方式如下:

- 通过当地邮局;
 - 通过 E-mail (yxxb@imm.ac.cn) 或从网上 (www.yxxb.com.cn) 下载订阅单,填好后寄至编辑部;
 - 通过本刊编辑部,联系人:李淑芬、张晓晔
- 电话:86-10-63165208, 传真:86-10-63035012
编辑部地址:北京市先农坛街 1 号《药学报》编辑部
邮编:100050