

3 - 脱氧葡萄糖醛酮还原酶药物筛选体系的建立及应用

江国荣 张露蓉* 姚 霏

(南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009)

摘要: 目的 从鸡肝中提取 3 - 脱氧葡萄糖醛酮(3 - DG) 还原酶, 并建立 3 - DG 还原酶体外反应体系筛选药物。方法 以辅酶 NADPH 的消耗量为评价指标来表示 3 - DG 还原酶的活性, 通过对反应体系底物 3 - DG、辅酶 NADPH、酶量和反应时间的优化, 考察温度等影响因素, 建立 3 - DG 还原酶体外反应体系并应用于寻找提高 3 - DG 还原酶活性的药物。结果 优化后的反应体系为: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 - DG 溶液、250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NADPH、酶液各 20 μL , 用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH6.4) 调反应体系至 200 μL 混合物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 min; 以 NADPH 的消耗量来定义 3 - DG 还原酶的酶活单位, 并应用于 17 种药物的筛选。结论 该反应体系可用辅酶 NADPH 的消耗来反映体系中 3 - DG 还原酶的活性, 并能为寻找提高 3 - DG 代谢酶活性的药物提供方法。

关键词: 3 - 脱氧葡萄糖醛酮还原酶; 反应体系; 药物筛选

中图分类号: R96

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2011) 05 - 0441 - 03

Establishment and preliminary application of the 3 - deoxyglucosone reductase enzymatic drug screening system

JIANG Guo - rong ZHANG Lu - rong* , YAO Fei

(Suzhou Hosptial of Traditional Chinese Medicine , Suzhou , Jiangsu , 215009 P. R. China)

Abstract: OBJECTIVE To establish a reaction system with the 3 - deoxyglucosone(3 - DG) reductase which extracted from chick - en liver *in vitro* and use for medicine screening. **METHODS** The activity of 3 - DG reductase enzymes was detected based on the change of nicotinamide - adenine dinucleotide phosphate (NADPH) concentration in the reaction system by the absorbance at 340 nm. In the system , every factor which would affect the result such as the concentration of NADPH and 3 - DG and enzyme protein was optimized in different conditions. **RESULTS** The ideal system was found as follows: 20 μL 3 - DG(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL NADPH(250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL 3 - DG reductase , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer(pH6.4) 140 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ reacting 40 min. At last , 17 samples were screened by the 3 - DG reductase enzymatic medicine screening system. **CONCLUSION** The method could be used to reflex the enzymes activity by detecting the change of NADPH and it can be used for medicine screening.

Key words: 3 - DG reductase; Reaction system; Medicine screening

CLC number: R96

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2011) 05 - 0441 - 03

3 - 脱氧葡萄糖醛酮(3 - deoxyglucosone , 3 - DG) 为二羰基类化合物, 在衰老、糖尿病、尿毒症等疾病的发生发展中起着重要的作用^[1]。在正常人的体内 3 - DG 可在其代谢酶的作用下, 生成无生物活性的 3 - 脱氧果糖和 3 - 脱氧葡萄糖醛酸, 随尿液排出体外, 维持体内 3 - DG 较低水平(ng 级) 的正常生理平衡^[2]。而在糖尿病及尿毒症患者的血清中, 3 - DG 含量要比正常人高 3 ~ 5 倍^[3], 这可能与这些患者的 3 - DG 代谢酶系统代谢能力下降有关^[4 - 5]。现从鸡肝中提取得到了 3 - DG 还原酶, 并建立了 3 - DG 还原酶的体外反应体系, 为寻找提高 3 - DG 代谢酶活性的药物提供了方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SpectraMax M2e 微孔板检测系统酶标仪(美国 Molecular Devices) 。3 - 脱氧葡萄糖醛酮(3 - DG , 苏州中医院研究所, 批号: 090831) ; NADPH(Shang - hai Mdmy Sci & Technologies , 批号: 10621706001) ; 其余试剂为分析纯; 筛选药物为黄酮类成分(中国药品生物制品检定所) 。

1.2 方法与结果

1.2.1 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(PBS) 和 3 - DG 还原酶的制备 参照文献^[1], 分别配制 50、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液。按文献^[6]方法, 取新鲜鸡

基金项目: 苏州市科技局科教兴卫青年科技项目(SWKQ0821)

作者简介: 江国荣(1963 —) , 男, 江苏苏州, 博士, 主任药师, 从事中药药理的研究工作。Email: guorongjiang@ yahoo. com

* 通信作者(Correspondent author) , Email: zhanglurong@ yahoo. com. cn

肝匀浆液加入冷丙酮(1:4)中,抽滤后粉饼再用冷丙酮同法处理,制成粉末,冷冻干燥2.0~2.5 h。冻干粉末与0.1% 2-巯基乙醇 PBS 缓冲液(10 mmol·L⁻¹, pH7.4)在冰浴中混悬1 h,混悬液于4℃、7×10³ r·min⁻¹离心20 min。取上清液分别用45%、70%饱和度硫酸铵分离。沉淀用0.1% 2-巯基乙醇 PBS 缓冲液(10 mmol·L⁻¹, pH7.4)溶解,于4℃透析12 h以上,得3-DG 还原酶酶液,分装后于-20℃保存。酶液用紫外分光光度法于280 nm处测定,其蛋白质浓度为1.193 mg·mL⁻¹。

1.2.2 3-DG 还原酶活性的测定 参考文献^[6-7],采用3-DG 还原酶体外反应体系:100 μg·mL⁻¹ 3-DG 溶液、250 μg·mL⁻¹ NADPH、酶液各20 μL,用50 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄ 缓冲液(pH7.4)调反应体系至200 μL,混合物于37℃反应40 min。用酶联免疫检测仪测定NADPH在340 nm处的吸光度。计算NADPH的消耗量,以此评价3-DG 还原酶的活性。以不加酶液的反应体系为空白组。空白组和反应组消耗酶活分别为0.0622±0.0382、5.2061±0.0200 U·mL⁻¹(*P*<0.01),表明从鸡肝脏中提取的酶具有活性。此实验条件下,3-DG 还原酶的酶活单位(U)定义为:37℃下,每分钟消耗1 nmol NADPH 所需要的酶量。

1.2.3 反应条件的优化 按“1.2.2”项方法改变底物3-DG 的浓度,观察不同浓度3-DG 对反应体系的影响(图1A)。根据Lineweaver-Burk 双倒数作图法,得线性方程为:1/V = 28.435(1/S) + 144.28(*r*=0.9979),并得到3-DG 还原酶的米氏常数K_m=0.197 μmol·mL⁻¹(3.2 μg·mL⁻¹)。在酶活测定中,一般要求底物浓度过量,且应大于10倍K_m值。故选用线性期顶端100 μg·mL⁻¹ 3-DG 作为反应体系的底物浓度。选取此3-DG 浓度,改变NADPH 浓度,观察不同浓度NADPH 对反应体系的影响。反应体系中,随着NADPH 浓度的增加,辅酶的消耗逐渐上升,当NADPH 为250 μg·mL⁻¹时,辅酶的消耗趋于平稳。在酶活测定中,要求辅酶浓度过量,因此,选用此辅酶浓度(图1B)。再选取实验得到的3-DG 和NADPH 浓度,观察反应体系对不同酶量和反应时间的影响。随着酶量的增加,相同反应时间的辅酶消耗量逐渐增加;随着反应时间的延长,辅酶消耗量在增加,逐步趋向平台。综合上述结果,考虑建立的筛药反应体系主要在于寻找促进3-DG 还原酶的促进剂,因此,选用10 μL·(100 μL)⁻¹酶量浓度,反应时间40 min 作为体系的条件(图1C)。

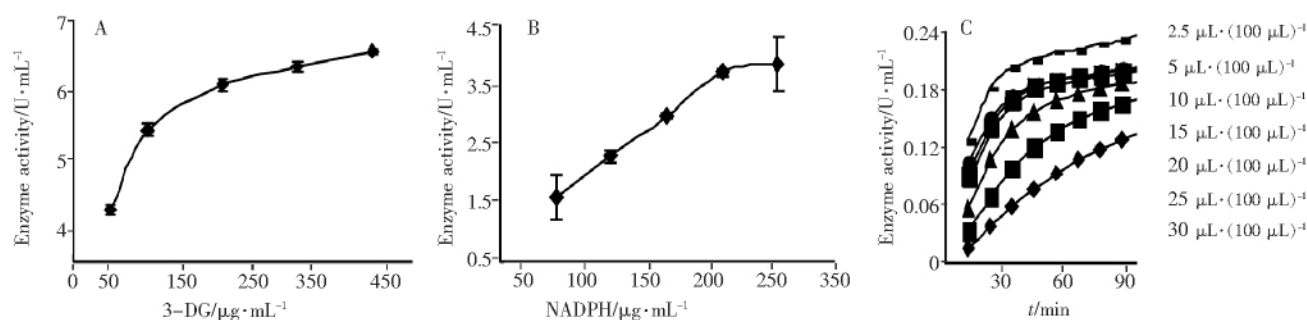


图1 底物3-DG 浓度(A)、NADPH 浓度(B)和3-DG 还原酶酶量(C)对3-DG 还原酶体外酶促反应体系的影响(*n*=3)

Fig 1 Effects of substrate concentration (A), NADPH concentration (B) and enzyme protein concentration (C) on the reaction system (*n*=3)

1.2.4 反应体系中影响因素的考察 在确定的反应体系条件下,选择反应温度为29、33、37、41、45℃,观察反应体系中温度对反应体系的影响(图2A)。3-DG 还原酶的酶活性随着温度的升高而增强,41℃时达到最高;但45℃开始下降,这可能与温度太高导致部分酶失活相关。考虑与人体条件的统一,选用37℃。在“1.2.3”项反应体系条件下,改变体系的pH 分别为6.4、6.9、7.4、7.9、8.4,观察其对反应体系的影响(图2B)。辅酶活性随着pH 增加而减小,表明3-DG 还原酶的活性在弱酸性下最好,体系最终选用pH6.4。

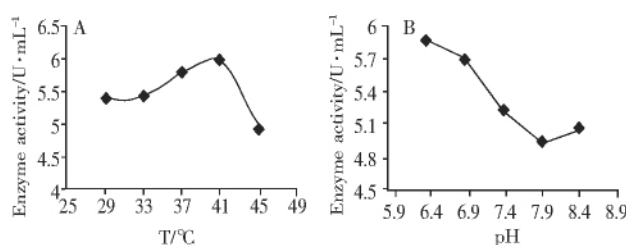


图2 温度(A)和pH(B)对3-DG 还原酶活性的影响

Fig 2 Effects of temperature (A) and pH (B) on the reaction system

1.2.5 药物的筛选 选用优化后的3-DG 还原酶反应体系,初筛20个黄酮类成分药物,其中3个药

物自身在 340 nm 有吸收,不能用本反应体系进行药物筛选,被作为异常数据排除。以 3-DG 还原酶活性增加,与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$)为促进作用;以 3-DG 还原酶活性减少,与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$)为抑制作用。图 3 为 17 个药物对 3-DG 还原酶活性影响的结果,其中 8 个药物对 3-DG 还原酶活性有抑制作用($P < 0.05$),3 个药物有促进作用($P < 0.05$),6 个药物无作用($P > 0.05$)。

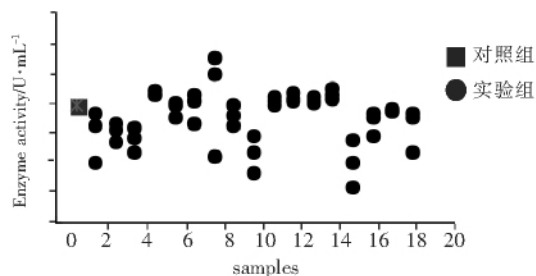


图3 药物对 3-DG 还原酶活性的影响

Fig 3 Effects of sample on the 3-DG reductase activity

2 讨论

文中优化的反应体系可用于药物筛选,既可表现出对 3-脱氧葡萄糖醛酮(3-DG)还原酶的促进作用,又可表现出抑制作用。在体外反应体系中,3-DG 还原酶活性除以辅酶 NADPH 消耗量(比色法检测)来表示外,还有用底物 3-DG 消耗量(HPLC 方法检测)来反映^[1]。其中,辅酶 NADPH 消耗的检测方法操作简便,试剂成本低,具有稳定性和动态实时跟踪的优势,适合于建立快速、高效的 3-DG 还原酶活性的药物高通量筛选;但其灵敏度较 HPLC 方法低,且无法应用于 340 nm 存在吸收干扰的药物筛选。3-DG 水平在糖尿病患者的血清和红细胞中明显增高^[8],且血清中 3-DG 水平的提高与糖尿病微血管病变之间存在一定相关性^[9]。血清中高 3-DG 水平可能与其代谢酶受损后导致的代谢能力下降相关^[10-12]。因此,围绕降低糖尿病患者血清中 3-DG 水平这一研究点,有利于寻找新

的、有效的防治糖尿病微血管病变的临床治疗手段。文中建立的 3-DG 还原酶体外反应体系,可作为一个新的靶点,用于寻找促进 3-DG 代谢的药物及其作用机制的实验研究。

参考文献:

- [1] 唐文敏,江国荣,张露蓉. 高效液相色谱法检测体外酶促反应体系中底物 3-脱氧葡萄糖醛酮[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(15): 1297-1299.
- [2] Fujii E, Iwase H, Karakasa I *et al.* The presence of 2-keto-3-deoxygluconic acid and oxoaldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 210(3): 852-857.
- [3] 梁敏,侯凡凡,张训. 活性羰基化合物对人血管内皮细胞黏附分子表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2001, 26(4): 259-261.
- [4] Stitt AW. The maillard reaction in eye diseases[J]. New York Academy of Sci, 2005, 1043: 582-597.
- [5] Hamada Y, Nakashima E, Naruse K *et al.* A copper chelating agent suppresses carbonyl stress in diabetic rat lenses[J]. J Diabetes Complications, 2005, 19(6): 328-334.
- [6] Sunshin H, Nishimura T, Hayase F *et al.* Purification and characterization of NADPH-dependent 2-oxoaldehyde reductase from chicken liver[J]. J Agric Biol Chem, 1991, 55(4): 957-966.
- [7] Zhiqun L, Hayase F, Nishimura T *et al.* Purification and characterization of NADPH-dependent 2-oxoaldehyde reductase from parsley[J]. J Agric Biol Chem, 1990, 55(4): 319-328.
- [8] Kusunoki H, Miyata S, Ohara T *et al.* Relation between serum 3-DG and development of diabetic microangiopathy[J]. Diabetes Care, 2003, 26(6): 1889-1894.
- [9] Beisswenger PJ, Howell SK, Nelson RG *et al.* Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(6): 1358-1363.
- [10] Stitt AW. The maillard reaction in eye diseases[J]. New York Academy Sci, 2005, 1043: 582-597.
- [11] Uchida Y, Kurano Y, Endo T *et al.* Immunochemical detection of 3-deoxyglucosone in serum[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325: 1090-1098.
- [12] Hamada Y, Nakashima E, Naruse K *et al.* A copper chelating agent suppresses carbonyl stress in diabetic rat lenses[J]. J Diabetes Complications, 2005, 19(6): 328-334.

收稿日期: 2010-12-20

《华西药理学杂志》继续入选2008年北大版

《全国中文核心期刊要目总览》之药理学类核心期刊

欢迎订阅! 欢迎投稿!