重组人和大鼠醇脱氢酶、醛-酮还原酶的克隆表达及应用

高凌波1, 王金朝1,2, 曾苏1*

- (1. 浙江大学药学院药物分析与代谢研究室, 浙江 杭州 310058;
- 2. 浙江华海药业股份有限公司质量控制部, 浙江 台州 317024)

摘要: 克隆、表达人和大鼠醇脱氢酶 (ADH)、醛-酮还原酶 (AKR) 基因全长 cDNA, 研究扁桃酸 (MA) 代谢机制。设计引物,利用 RT-PCR 克隆人和大鼠醇脱氢酶、醛-酮还原酶基因全长 cDNA。测序正确的 cDNA 被克隆到表达载体 pET-28a (+)上并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中稳定表达。利用亲和色谱纯化相应的酶,通过检测其在 340 nm 吸收度值的变化进行酶活性测定。获得的醇脱氢酶与扁桃酸,醛-酮还原酶与苯乙酮酸 (PGA) 共孵育,采用 HPLC 分析其代谢和转化情况。通过测序,目的蛋白的 cDNA 序列完全正确,在宿主菌中获得良好的可溶性表达,经 Ni²⁺亲和柱纯化后目的蛋白达到了电泳纯,具有较好的催化活性。人 ADH2 对扁桃酸的代谢具有立体选择性,优先代谢 S-MA,对 S-MA 的代谢能力较强。大鼠 ADH1 对扁桃酸无代谢活性,人和大鼠 AKR 对苯乙酮酸均无代谢。成功构建人和大鼠醇脱氢酶、醛-酮还原酶的表达质粒,获得高活性的蛋白。这些重组酶模型可以用于由醇脱氢酶和醛-酮还原酶介导的药物代谢研究。

关键词: 乙醇脱氢酶; 醛-酮还原酶; 扁桃酸; 立体选择性代谢; 手性转化

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0778-07

Cloning, expression and the application of human, rat alcohol dehydrogenase and aldo-keto reductase

GAO Ling-bo¹, WANG Jin-zhao^{1, 2}, ZENG Su^{1*}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Quality Control, Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd, Taizhou 317024, China)

Abstract: This study is aimed to clone and express human, rat alcohol dehydrogenase (ADH) and aldo-keto reductase. Then the enantioselective metabolism of mandelic acid (MA) was studied. Human alcohol dehydrogenase 2, rat alcohol dehydrogenase 1, human and rat aldo-keto reductase 1A1 were amplified using RT-PCR from human and rat liver samples. Then subcloned into pET-28a (+) and expressed in *E.coli* BL21 (DE3) stably. The protein was induced with IPTG and purified by affinity chromatography. Then the enzyme activities were measured. MA enantiomers were incubated with rat, human ADH and phenylglyoxylic acid (PGA) with AKR1A1, respectively. The metabolism was analyzed with HPLC. The proper genes were cloned and purified and proteins were obtained. All of the proteins obtained showed good activity. Stereoselective-metabolism of MA was observed in human ADH2, which favors for S-MA metabolism. The expression plasmids are constructed and the recombinant proteins are expressed successfully. The recombinant alcohol dehydrogenase and aldo-keto reductase have been employed to study MA metabolism.

Key words: alcohol dehydrogenase; aldo-keto reductase; mandelic acid; enantioselective metabolism; chiral inversion

收稿日期: 2008-12-12.

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (20080431320).

*通讯作者 Tel/Fax: 86-571-88208407, E-mail: zengsu@zju.edu.cn

乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, EC1.1.1.1, ADH) 是一类锌离子依赖型的金属结合酶, 存在于大部分哺乳动物肝、肾、肺细胞的可溶部分中, 是催

化醇类代谢初始反应的重要酶[1], 是生物体内重要的 氧化还原催化剂之一, 在生物催化、生物医学领域都 有较为广泛的应用。主要以 NAD+为辅因子, 能够可 逆地催化醇脱氢形成醛 (或酮),参与醇的发酵。其基 本反应式如下: CH₃CH₂OH + NAD⁺ → CH₃CHO + NADH + H⁺。ADH 同时能够催化可逆的醇与醛或是 醇与酮之间的互变。底物专一性较广, 亦作用于其他 的醇。根据酶学及 DNA/蛋白质序列上的差异, 人类 ADH 被分为 5 类^[2]、其中 I 类 ADH 由 ADH1、ADH2 和 ADH3 组成, 在乙醇代谢中发挥主要作用[3]。ADH 是二聚体, 由 3 种亚单位 α 、 β 、 γ 组成, α 、 β 、 γ 分别 由 ADH1、ADH2、ADH3 基因编码。成人主要是 β 链二聚体。现已发现 ADH2 和 ADH3 位点均存在基 因多态性,从而使所编码酶在乙醇代谢过程中表现 不同的催化速率。大鼠的 I 类 ADH 仅由 ADH1 组 成, 在大鼠肝脏中大量表达, 对醇类代谢起重要的作 用[4]。

醛-酮还原酶是一类具有广泛底物特异性的针对 羰基化合物的 NADPH 依赖型氧化还原酶。许多的人 醛-酮还原酶具有氧化反式二氢二醇和芳香族二氢二 醇底物的作用,人类基因组计划已经鉴别了人的 10 种醛-酮还原酶。醛-酮还原酶 1A1 (AKR1A1) 广泛 分布于哺乳动物中,并在人体中大量表达。它能够催 化多种醛,包括醛形式的葡萄糖以及具有芳香环结 构或脂肪链结构的醛,还原为它们相应的醇。醛-酮 还原酶的最显著的特征包括还原型辅酶专一性和对 芳香醛的高效性。其底物有苯甲酸、苯甲醛、硝基苯 甲醛、3-吡啶甲醛、4-吡啶甲醛、葡萄糖醛酸、短链 醛糖以及抗癌药多柔比星等^[5]。

扁桃酸 (mandelic acid, MA), 又名苦杏仁酸和 α-羟基苯乙酸, 是抗菌剂扁桃酸乌洛托品、末梢血管扩张剂环扁桃酸、滴眼药羟苄唑及阿托品类解痉剂的重要中间体, 同时也是苯乙烯的尿中主要代谢物^[6,7]。其结构式如图 1。

Figure 1 Structure of mandelic acid (MA)

1990 年 Drummond 等 $^{[8]}$ 报道了 MA 在 Wistar 大鼠中可发生立体选择性代谢以及 S-MA $\rightarrow R$ -MA 的手性转化。以消旋体 MA 给药后,尿中排泄量 MA 占

46.8%,苯乙酮酸 (PGA) 为 46.3%;而以 S-MA 给药后,尿中排泄量 MA 占 15.6%,PGA 为 79.8%。所排泄的 MA 经鉴定主要是 R 对映体。本实验室的研究发现^[9],MA在 SD 大鼠体内发生了很强的立体选择性代谢。SD 大鼠口服 100 mg·kg⁻¹ S-MA 后,不仅生成PGA 的数量较多,累积排泄量达 70.5%,还发生了手性转化,尿中 R-MA 占 18.8%,S-MA 占 5.7%;而口服 R 型对映体后代谢成 PGA 的能力较弱,累积排泄量仅为 10.8%,并且不发生手性转化,尿中未发现 S-MA,R-MA 占 46.5%。

研究药物的立体选择性代谢,不但可以认清手性药物体内处置过程的本质,正确指导合理用药,而且对手性药物是否要以单一对映体形式开发上市,以及手性药物制剂的合理设计均有指导作用。同时将有助于深入了解这一类药物的体内代谢途径,提高我国药物代谢的学术水平,具有较高的学术价值,为设计高效低毒新药和临床合理用药提供科学依据。另外,由于扁桃酸是评价环境污染物苯乙烯危害人体的标志物,所以研究其立体选择性代谢和毒理学,指导苯乙烯职业病预防与治疗工作,具有重大的理论意义和应用价值。

MA 在哺乳类动物中的立体选择性代谢机制至今尚不清楚,人体中 MA 是否也会发生立体选择性代谢,也有待研究。根据扁桃酸的分子结构及前期研究普遍认为醇脱氢酶介导了 MA 在哺乳类动物中的立体选择性代谢,并且醇-酮转化机制可能是扁桃酸手性转化机制之一,提出了如下假设: MA 经醇脱氢酶氧化生成 PGA,优先代谢 S-MA (底物立体选择性);而 PGA 经醛-酮还原酶还原为 MA 的过程中,酮在过渡状态自身重排,以使取代基与酶的相互作用最小,优先生成 R-MA (产物的立体选择性),由此底物和产物的立体选择性导致了 S-MA 的生物手性转化。

关于乙醇脱氢酶和醛-酮还原酶的克隆表达,国内尚无此类报道。这 2 种酶的获得是深入研究乙醇脱氢酶和醛-酮还原酶介导的药物代谢反应的基础,具有重要的应用价值。本文通过体外克隆表达大鼠醇脱氢酶 1 (rADH1)、醛-酮还原酶 1A1 (rAKR1A1) 和人醇脱氢酶 2 (hADH2)、醛-酮还原酶 1A1 (hAKR1A1)来研究扁桃酸的立体选择性代谢和手性转化机制,探讨人体 MA 立体选择性代谢和手性转化是否存在及其过程的机制。

材料与方法

材料与试剂 大肠杆菌 DH5α、表达宿主菌 BL21 (DE3)、表达载体 pET-28a (+) 均为我室保存, 克隆载 体 pMD18-T 购自 Takara 公司。高保真 KOD-Plus DNA 聚合酶为 TOYOBO 公司产品, 限制性内切酶 EcoRI、 BamHI 和 HindIII、T4DNA 连接酶为 MBI Fermentas 公司产品; IPTG 和琼脂糖购自 BBI 公司; PCR 引物由 上海生工生物工程技术服务有限公司代为合成; DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成; Ni-NTA Agarose 亲和色谱柱材料为 Invitrogen 公司 产品; 进行 Western blotting 的抗 His 一抗、辣根过氧 化物酶标记的山羊抗小鼠二抗为 Jackson Immuno Research 公司产品, 质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收 试剂盒购自爱思进生物技术有限公司, ECL 显影购自 LumiGlo 公司。β-NADPH、β-NAD、PGA 购自 Sigma 公司, MA 对映体由江苏一鸣精细化工有限公司提供 (纯度>99.5%), 其他试剂和药品均为分析纯。

引物的设计与合成 根据人 *ADH2* mRNA 序列 (PubMed ACCESSION: NM_000668) 1128 bp, 设计 引物, 合成的引物序列如下: 上游引物 Up-5' <u>GGA TCC</u> ATG AGC ACA GCA GGA AAA GTA AT 3', 下游引物 Down-5' <u>AAG CTT</u> TCA AAA CGT CAG GAC GGT ACG 3'。其中上游引物 5' 端引入 *BamH*I 酶切位点,下游引物 5' 端引入 *Hind*III 酶切位点。

根据人 *AKR1A1* mRNA 序列 (PubMed ACCESSION: J04794) 978 bp, 设计引物, 合成的引物序列如下:上游引物 Up-5' <u>GCA TCC</u> ATG GCG GCT TCC TGT GTT CTA CTG 3', 下游引物 Down-5' GGCG <u>AAG CTT</u> TCA GTA CGG GTC ATT AAA GGG 3'。其中上游引物 5' 端引入 *BamH*I 酶切位点,下游引物 5' 端引入 *Hind*III 酶切位点。

根据大鼠 *ADH1* mRNA 序列 (PubMed ACCESSION: NM_019286) 1 131 bp, 设计引物, 合成的引物序列如下:上游引物 Up-5' GC <u>GAA TTC</u> ATG AGC ACA GCT GGA AAA G 3',下游引物 Down-5' <u>AAG CTT</u> TCA GAA CGT CAG GAC GGT ACG GATA C 3'。其中上游引物 5' 端引入 *EcoRI* 酶切位点,下游引物 5' 端引入 *Hind*III 酶切位点。

根据大鼠 *AKRIA1* mRNA 序列 (PubMed ACCESSION: NM_031000) 978 bp, 设计引物, 合成的引物序列如下: 上游引物 Up-5' <u>GAA TTC</u> ATG ACG GCC TCC AGT GTC CTC 3', 下游引物 Down-5' GCG <u>AAG CTT</u> TC AGT ATG GGT CAT TAA AGG 3'。其中上游引物 5' 端引入 *EcoRI* 酶切位点, 下游引

物 5' 端引入 HindIII 酶切位点。

目的基因片段的扩增、克隆及序列鉴定 提取人和 SD 大鼠肝脏组织总 mRNA, 进行 cDNA 的合成。然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。

hADH2 和 hAKR1A1 反应体系 100 μL: 10×反应缓冲液 10 μL, MgSO₄ (25 mmol·L⁻¹) 7 μL, dNTP (2 mmol·L⁻¹) 15 μL, 模板 5 μL, 上游引物 (10 μmol·L⁻¹) 3 μL, 下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 3 μL, KOD-Plus 聚合酶 1 μL, 补水至 100 μL, 分装成 4 × 25 μL 体系。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 32 个循环 (94 $^{\circ}$ C 45 s, 62 $^{\circ}$ C (hAKR1A1) 或 58.5 $^{\circ}$ C (hADH2) 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min。

rADH 反应体系 100 μL: 10×反应缓冲液 10 μL, MgSO₄ (25 mmol·L⁻¹) 8 μL, dNTP (2 mmol·L⁻¹) 15 μL, 模板 6 μL, 上游引物 (10 μmol·L⁻¹) 2 μL, 下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 2 μL, 下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 2 μL, KOD-Plus 聚合酶 1 μL, 补水至 100 μL, 分装成 4×25 μL 体系。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 32 个循环 (94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min。

rAKR1A1 反应体系 100 μL: 10×反应缓冲液 10 μL, MgSO₄ (25 mmol·L⁻¹) 8 μL, dNTP (2 mmol·L⁻¹) 10 μL, 模板 6 μL, 上游引物 (10 μmol·L⁻¹) 2 μL, 下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 2 μL, κOD-Plus 聚合酶 1 μL, 补水至 100 μL, 分装成 4×25 μL 体系。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 32 个循环 (94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物胶回收,然后与 pMD18-T 载体 4 $^{\circ}$ 连接过夜,将连接产物转化入用 CaCl₂ 方法制备的 DH5 α 感受态细胞,通过氨苄青霉素抗性筛选和蓝白筛选,挑选阳性克隆提取质粒后用相应内切酶进行双酶切鉴定。取酶切鉴定正确的克隆进行测序,然后用 CloneManager 软件将序列与 GeneBank 中的基因进行比较,以确定 PCR 扩增是否正确。

目的序列在 pET-28a (+) 载体中的亚克隆和诱导表达 大量提取测序正确的重组载体质粒,用相应内切酶酶切出目的片段纯化后,连入带有编码 6个组氨酸的核苷酸序列的 pET-28a (+) 载体,转化感受态细胞 DH5 α ,构建的表达质粒相应的命名为hADH2-pET28a、hAKR1A1-pET28a、rADH1-pET28a、rAKR1A1-pET28a。酶切鉴定正确后用提取的质粒再次转化表达宿主 BL21 (DE3)。挑取阳性菌株在含卡那霉素 (15 mg·L $^{-1}$)的LB培养基中37 $^{\circ}$ 无病荡培养过夜,次日按1%接种于新鲜的2×YT培养基中,37 $^{\circ}$ 无振荡培养3 h 至吸收度为 0.5 $^{\circ}$ 1,加入 100 mmol·L $^{-1}$

IPTG至终浓度为 0.3 mmol·L⁻¹, 28 ℃诱导 7 h (hAKR1A1 诱导 12~16 h)。

目的蛋白的亲和色谱纯化 收获的菌液于 4 ℃, 6 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀按每毫升培养物用 50 μ L 冰预冷的 Native Binding Buffer (50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, pH 8.0) 重悬。先用大型细胞破碎仪 (French Press) 破碎菌体 3 次, 再置冰上超声 10 min, 每 10 s 间隔 5 s, 13 000 r·min⁻¹, 4 ℃离心 15 min, 取上清液与沉淀进行 SDS-PAGE 分析表达产物的浓度与溶解性^[10]。

取处理好的菌体蛋白溶液, $0.45~\mu m$ 滤膜过滤后 按操作说明手工上样至预平衡的 Ni^{2+} 亲和色谱柱中, $4~^{\circ}$ C结合 $30\sim60~min$ 后依次用 20~mL Native Wash Buffer 1 ($50~mmol\cdot L^{-1}~NaH_2PO_4$, $0.5~mol\cdot L^{-1}~NaCl$, pH 8.0, $20~mmol\cdot L^{-1}~WeW$)、Native Wash Buffer 2 ($50~mmol\cdot L^{-1}~NaH_2PO_4$, $0.5~mol\cdot L^{-1}~NaCl$, pH 8.0, $40~mmol\cdot L^{-1}~WeW$)、Native Wash Buffer 3 ($50~mmol\cdot L^{-1}~WeW$)、Native Wash Buffer 3 ($50~mmol\cdot L^{-1}~WeW$) 冲洗柱子,最后用 12~mL Native Elution Buffer ($50~mmol\cdot L^{-1}~NaH_2PO_4$, $0.5~mol\cdot L^{-1}~NaCl$, pH 8.0, $250~mmol\cdot L^{-1}~WeW$) 洗脱目的蛋白。收集每一步的洗脱液,SDS-PAGE 分析蛋白的纯化状况。纯化蛋白经脱盐柱脱盐,冷冻干燥后储存于 $20~^{\circ}$ C。以紫外分光光度计测浓度,SDS-PAGE 分析纯度。

Western blotting 评价重组酶的相对表达水平 破菌处理后的每种重组酶上清、沉淀及纯化蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后湿法转移到 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉封闭, 依次以小鼠抗 his 标签抗体 (1:3 000) 作为一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体 (1:5 000) 作为二抗处理, ECL 显色。

重组酶的活性测定 冻干蛋白用相应缓冲液溶解后,蛋白质浓度测定按照 Lowry 法^[11]进行, BSA 作为标准。分别以乙醇、正丙醇和正丁醇作为醇脱氢酶的底物,以苯乙酸、*p*-硝基苯甲醛作为醛-酮还原酶的底物,测定 340 nm 波长处吸收度的变化以反映反应体系中 NAD(P)H 量的增减,检测醇脱氢酶和醛-酮还原酶的活性。以失活的酶与底物共孵育作为空白试验。

醇脱氢酶孵育体系^[12]: pH 7.5 的 100 mmol·L⁻¹ K_2HPO_4 缓冲液、2.3 mmol·L⁻¹ NAD^+ ,醇 500 μmol·L⁻¹,酶浓度 1 mg·mL⁻¹,37 ℃孵育 2 h。

醛-酮还原酶孵育体系 $^{[5]}$: pH 7.0 的 100 mmol·L $^{-1}$ K₂HPO₄缓冲液、180 μ mol·L $^{-1}$ NADPH,底物1 mmol·L $^{-1}$,

酶浓度 1 mg·mL⁻¹, 37 ℃孵育 2 h。

MA 与醇脱氢酶及 PGA 与醛—酮还原酶的代谢转化试验 氧化反应孵育体系: 分别取 MA 单个对映体适量, 醇脱氢酶适量, 加 pH 7.5 的 100 mmol·L⁻¹ K_2 HPO₄缓冲液使总体积为 250 μ L, 底物终质量浓度为 20 μ g·mL⁻¹, 酶终质量浓度为 1 mg·mL⁻¹, 混匀, 于 37 °C振荡水浴中孵育 5 min 后立即加入 NAD⁺ (终浓度 2.3 mmol·L⁻¹) 启动反应。反应 120 min 后,以等体积冷甲醇沉淀蛋白终止反应, HPLC 测定 MA 和 PGA。

还原反应孵育体系: 底物为 PGA, 酶为醛-酮还原酶, 加 pH 7.0 的 100 mmol·L $^{-1}$ K $_2$ HPO $_4$ 缓冲液使总体积为 250 μ L, 加 NADPH (终浓度 180 μ mol·L $^{-1}$) 启动反应, 其他操作均与氧化孵育体系相同。反应 120 min 后, 以等体积冷甲醇沉淀蛋白终止反应, HPLC 测定 MA 和 PGA。

PGA 与醇脱氢酶的代谢试验 有文献^[13]报道 ADH 同时能够催化可逆的醇与醛或是醇与酮之间的 互变, 因此进行 PGA 与醇脱氢酶的代谢试验: PGA 分别与人和大鼠醇脱氢酶共孵育, 除辅因子为 NADH外, 其他操作均同MA与醇脱氢酶的氧化反应 孵育体系。HPLC 检测 MA 的生成和 PGA 的变化。

HPLC 分析 参考 Laffon^[14]的方法并做了相应 改进。分析柱: Dikma Platisil-ODS C₁₈柱 (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm), 流动相: pH 2.5 磷酸二氢钾缓冲液-甲醇 (85:15), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μL。

结果

1 表达质粒的构建与测序

PCR 扩增出大小分别为 978 bp、1 128 bp、1 131 bp 的特异性片断,与预计的大小基本一致 (图 2)。4 种表达质粒经相应双酶切后得到相应目的片段 (图 3),大小与 PCR 获得的片断一致。获得的阳性克隆测序结果表明 4 种片断序列与 GenBank 中的目的序列完全一致。

2 目的蛋白的表达与纯化

转化有目的重组质粒宿主菌经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 结果显示该菌体有一条明显的融合蛋白表达条带, ADH M_r 为 40 kD, AKR M_r 为 37 kD, 与预期大小相符。目的蛋白在裂解后的菌体蛋白上清液中含量较多, 而沉淀中很少, 具有良好的水溶性。表达的重组蛋白经 Ni²⁺亲和色谱纯化后在 SDS-PAGE 中显示为单一条带(图 4、5)。

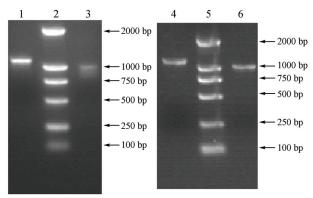


Figure 2 PCR amplification of *hADH2*, *hAKR1A1*, *rADH1*, *rAKR1A1* gene. 1: PCR products of rat *ADH1* gene; 2: DNA marker DL2000; 3: PCR products of rat *AKR1A1* gene; 4: PCR products of human *ADH2* gene; 5: DNA marker DL2000; 6: PCR products of human *AKR1A1* gene

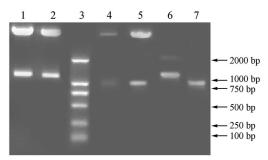


Figure 3 Electrophoresis identification of recombinant plasmid digested by double endonucleases. 1: Recombinant hADH2-pET28a digested by *BamH*I and *Hind*III; 2: Recombinant rADH1-pET28a digested by *E.coR*I and *Hind*III; 3: DNA marker DL2000; 4: Recombinant hAKR1A1-pET28a digested by *BamH*I and *Hind*III; 5: Recombinant rAKR1A1-pET28a digested by *EcoR*I and *Hind*III; 6: PCR products of *hADH* gene; 7: PCR products of *hAKR1A1* gene

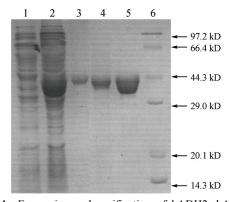


Figure 4 Expression and purification of hADH2, hAKR1A1. 1: Supernatant of the blank *E. coli* BL21; 2: Supernatant of the *E. coli* BL21 of pET28a-hADH2; 3: Purified hADH2; 4: Supernatant of the *E. coli* BL21 of pET28a-hAKR1A1; 5: Purified hAKR1A1; 6: Protein molecular mass marker

3 hADH2, hAKR1A1, rADH1, rAKR1A1 的 Western blotting 检测

纯化后的目的蛋白经 Western blotting 检测, 表明为相应的 hADH2, hAKR1A1, rADH1, rAKR1A1 蛋

白 (图 6)。

4 酶的活性检测

以乙醇、正丙醇和正丁醇作为醇脱氢酶的底物, 37 ℃孵育2h后,以紫外分光光度计检测,340 nm 处 出现了吸收峰。以苯乙酸、*p*-硝基苯甲醛作为醛-酮 还原酶的底物,孵育2h后,340 nm 波长处吸收度有 不同程度的下降,说明所表达的人和大鼠醇脱氢酶 和醛-酮还原酶都具有活性 (表 1)。

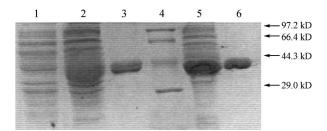


Figure 5 Expression and purification of rADH1, rAKR1A1. 1: Supernatant of the blank *E. coli* BL21; 2: Supernatant of the *E. coli* BL21 of pET28a-rADH1; 3: Purified rADH1; 4: Protein molecular mass marker; 5: Supernatant of the *E. coli* BL21 of pET28a-rAKR1A1; 6: Purified rAKR1A1

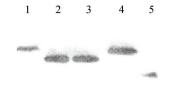


Figure 6 Western blotting analysis of hADH2, hAKR1A1, rADH1, rAKR1A1. 1: Purified hADH2; 2: Purified hAKR1A1; 3: Purified rAKR1A1; 4: Purified rADH1; 5: Positive control (protein with His-tag)

Table 1 The activity assay of recombinant hADH2, hAKR1A1, rADH1, rAKR1A1 (change of 340 nm absorbance)

Enzyme	Substrate	Zero time	Incubation (2 h)
hADH2	Ethanol	0.012 9	1.320 5
	n-Propanol	0.015 8	1.249 5
	n-Butyl alcohol	0.020 1	1.284 0
	S-MA	0.023 4	0.264 1
	R-MA	0.035 1	0.075 4
rADH1	Ethanol	0.033 3	1.974 6
	n-Propanol	0.033 4	1.852 2
	n-Butyl alcohol	0.033 1	1.774 9
	S-MA	0.022 3	0.025 4
	R-MA	0.021 5	0.026 7
hAKR1A1	Phenylacetic acid	1.361 3	0.516 2
	p-Nitrobenzaldehyde	1.780 5	0.541 9
	PGA	1.253 2	1.238 9
rAKR1A1	Phenylacetic acid	1.651 6	1.422 0
	p-Nitrobenzaldehyde	1.780 5	1.541 9
	PGA	1.354 7	1.345 8

5 MA和醇脱氢酶及PGA和醛-酮还原酶的代谢孵育

S-MA、R-MA 分别与人醇脱氢酶 (hADH2)、大鼠醇脱氢酶 (rADH1) 共孵育, PGA 与人和大鼠醛-酮还原酶 hAKR1A1、rAKRA1 共孵育, HPLC 检测代谢情况,以外标法测定 MA 与 PGA 的量, MA 的准确度在 96.3%~100.1%之间, PGA 的准确度在 96.5%~99.9%之间, RSD 均小于 7.6%。结果显示在相同的底物浓度下,孵育相同的时间后, S-MA 在人醇脱氢酶中代谢较 R-MA 快得多,生成的 PGA 也较多 (图 7,表 2)。而 MA 对映体与大鼠醇脱氢酶, PGA 与人和大鼠醛-酮还原酶孵育都未检测到代谢产物。提示大鼠ADH1 不代谢 MA 对映体,人和大鼠 AKR1A1 均不代谢 PGA。

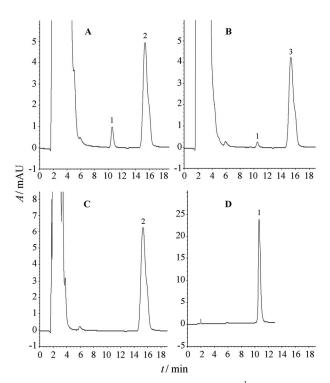


Figure 7 HPLC chromatograms of 20 μg·mL⁻¹ MA incubated with expressed human alcohol dehydrogenase 2 (ADH2). A: *S*-MA incubated with hADH2; B: *R*-MA incubated with hADH2; C: Blank incubation spiked with standard of *S*-MA; D: Standard of PGA. 1: PGA; 2: *S*-MA; 3: *R*-MA

Table 2 Amount of MA remained and PGA produced after incubating with human alcohol dehydrogenase 2 (n = 3, mean \pm SD)

Substrate /20 µg⋅mL ⁻¹	$MA / \mu g {\cdot} mL^{-1}$	$PGA/\mu g{\cdot}mL^{-1}$
S-MA	15.08 ± 0.13	3.79 ± 0.16
R-MA	17.93 ± 0.16	$0.48 \pm 0.15\square$

6 PGA 与醇脱氢酶的代谢试验

HPLC 分析未见 MA 生成, PGA 也无减少。说明人和大鼠醇脱氢酶并不参与PGA 转变成 MA 的过程。

讨论

本实验选用在 E.coli 中克隆表达重组蛋白功能最强大的系统——pET 系统及相应的 Ni-NTA 蛋白纯化系统实现了目标蛋白 cDNA 的稳定表达及纯化,选择 His-tag 作为纯化标签可以使重组蛋白最低程度引入外源氨基酸而不需要额外的切除步骤,并且可以实现一步纯化。经酶活力检测,发现纯化的重组酶具有良好的活性,从而为今后进一步研究其功能、催化机制和醇脱氢酶、醛-酮还原酶介导的药物代谢奠定了坚实的基础。

研究结果显示, MA 在体外能被人醇脱氢酶 2 (ADH2) 代谢, 并且具有立体选择性, ADH2 优先代谢 S-MA, 对 S-MA 的代谢能力较强, 对 R-MA 的代谢则较弱, 说明在人体内 MA 能够发生立体选择性代谢, 能否发生 S-MA 向 R-MA 的手性转化则是未知的。而大鼠 ADH1 对 MA 无代谢, 这提示 MA 代谢过程可能存在着种属差异性。MA 在哺乳动物中的立体选择性代谢主要是负责代谢的酶对底物的亲和力不同造成的, 从本实验结果来看, 可能参与的酶有几种。在人体中, 醇脱氢酶参与了该立体选择性过程, 但在大鼠中, 可能是其他酶参与了代谢, 具体是哪种酶有待更深入的研究。

Drummond 等^[8]研究大鼠口服 PGA 48 h 后尿中的排泄量,发现 *S*-MA 仅占口服剂量的 0.1%, *R*-MA 占 0.9%, PGA 占 55%。由此可见 PGA 在大鼠体内转化成 MA 是缓慢且少量的。大鼠体内负责代谢 PGA 成 MA 的酶是肝脏中除 AKR1A1 之外的其他酶,并且该酶对 PGA 的亲和力较低。

MA 在哺乳动物中的手性转化发现至今, 其手性转化内在的根本原因却始终未得以诠释, 对其手性转化也鲜有更深入的报道。手性药物发生构型转化主要由两个原因造成。第一个是非酶因素, 即手性药物本身不稳定, 在一定的条件下 (如极端 pH 或强光照)会发生消旋化。例如司替戊醇在酸性环境中和沙利度胺在碱性环境中都会发生消旋化[15,16]。第二个是酶介导的转化, 两种代谢途径具有相反的结果, 或者代谢途径是可逆的, 引起差向立体异构化, 最终导致一种对映体转化为另一种对映体。本实验室的前期研究模拟胃中和肠道 pH 环境来考察 MA 手性转化, 结果表明两个pH条件下MA两个对映体均未发生手性转化,说明该手性转化是由大鼠体内酶催化介导的。本实验结果提示 S-MA 在大鼠体内的手性转化可能不是由醇脱氢酶和醛—酮还原酶介导的醇—酮转化, 而是由

其他机制介导,需要更深入的探讨。MA 的手性部位结构与布洛芬类似,其差别在于手性碳原子上连接的为羟基 (布洛芬为甲基)。迄今为止,布洛芬手性转化机制研究得较为深入,辅酶 A 合成酶立体选择性地将 R-布洛芬转化成 R-布洛芬-CoA 硫酯,在乙酰基α位与高酸性的次甲基形成中间体。在此位置可发生脱质子和重新质子化的差向立体异构化,变为 S-布洛芬-CoA 硫酯,再水解产生 S-布洛芬^[17]。MA 的手性转化机制是否与布洛芬手性转化机制相同还是未知的,后续研究将会立足于此,希望最终可以阐明MA 的手性转化机制,丰富手性转化代谢的理论,加深手性药物构型转化机制的认识,为设计高效低毒新药和临床合理用药,为指导苯乙烯职业病防治提供科学和实验依据。

References

- [1] Tsukahara M, Yoshida A. Chromosomal assignment of the alcohol dehydrogenase cluster locus to human chromosome 4q21-23 by *in situ* hybridization [J]. Genomics, 1989, 4: 218-220.
- [2] Edenberg HJ. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes [J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2000, 64: 295–341.
- [3] Smith M, Hopkinson DA, Harris H. Alcohol dehydrogenase isozymes in adult human stomach and liver: evidence for activity of the ADH 3 locus [J]. Ann Hum Genet, 1972, 35: 243-253.
- [4] Badger TM, Hoog JO, Svensson S, et al. Cyclic expression of class I alcohol dehydrogenase in male rats treated with ethanol [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274: 684-688.
- [5] Nisha TP, Michael EB, Ronald GH, et al. The ubiquitous aldehyde reductase (AKR1A1) oxidizes proximate carcinogen trans-dihydrodiols to o-quinones: potential role in polycyclic aromatic hydrocarbon activation [J]. Biochemistry, 2001, 40: 10901–10910.
- [6] Manini P, Andreoli R, Poli D, et al. Liquid chromatography/ electrospray tandem mass spectrometry characterization of

- styrene metabolism in man and in rat [J]. Rapid Commun Mass, 2002, 16: 2239–2248.
- [7] Wang JZ, Wang XJ, Tang YH, et al. Simultaneous determination of mandelic acid enantiomers and phenylglyoxylic acid in urine by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 840: 50-55.
- [8] Drummond L, Caldwell J, Wilson HK. The stereoselectivity of 1, 2-phenylethanediol and mandelic acid metabolism and disposition in the rat [J]. Xenobiotica, 1990, 20: 159–168.
- [9] Wang JZ. Study on the Stereoselective Metabolism of Styrene in SD Rat (苯乙烯在 SD 大鼠中的立体选择性代谢研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.
- [10] Wang JZ, Fan M. Handbook of Protein Technique (蛋白质技术手册) [M]. Beijing: Science Press, 2002: 77-100.
- [11] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 2651.
- [12] Hellgren M, Strömberg P, Gallego O, et al. Alcohol dehydrogenase 2 is a major hepatic enzyme for human retinol metabolism [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64: 498-505.
- [13] Julià P, Farrés J, Parés X. Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties [J]. Eur J Biochem, 1987, 162: 179–189.
- [14] Laffon B, Lema M, Méndez J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure [J]. J Chromatogr B, 2001, 753: 385–393.
- [15] Zhang K, Tang C, Rashed M, et al. Metabolic chiral inversion of stiripentol in the rat. I. Mechanistic studies [J]. Drug Metab Dispos, 1994, 22: 544–553.
- [16] Reist M, Carrupt PA, Francotte E, et al. Chiral inversion and hydrolysis of thalidomide: mechanisms and catalysis by bases and serum albumin, and chiral stability of teratogenic metabolites [J]. Chem Res Toxicol, 1998, 11: 1521–1528.
- [17] Wsol V, Skalova L, Szotakova B. Chiral inversion of drugs, Coincidence or principle? [J]. Curr Drug Metab, 2004, 5: 517-533.