

二氢叶酸还原酶抑制剂的高效毛细管电泳法 筛选模型的建立与应用

贾蕊, 栗娜, 朱若华

(首都师范大学化学系, 北京 100037)

摘要 :建立了一种采用毛细管电泳法(CE)测定二氢叶酸还原酶(DHFR)反应动力学参数的新方法。以含0.002% Brij-35的50 mmol/L的硼砂缓冲溶液(pH 9.18)作为电泳介质,检测波长280 nm,于19 min内实现了体系中各组分的基线分离。根据酶反应过程中反应物和反应产物的浓度变化计算有关反应动力学参数。将已知的氨甲喋呤、甲氧苄胺嘧啶和叶酸3种抑制剂作用于所建立的二氢叶酸还原酶体系,测得抑制剂的半数抑制浓度与文献值相接近,证明本体系可用于二氢叶酸还原酶抑制剂(DHFRI)的筛选。

关键词 :高效毛细管电泳法;二氢叶酸还原酶;抑制剂

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)02-0189-04 栏目类别 :研究论文

Development and Application of Screening Method for Steroid Dihydrofolate Reductase Inhibitors by High Performance Capillary Electrophoresis

JIA Rui, LI Na, ZHU Ruohua

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract : A novel screening method for dihydrofolate reductase inhibitors (DHFRI) using high performance capillary electrophoresis (HPCE) was developed. The separation was performed in a fused silica capillary column using disodium tetraborate (50 mmol/L, pH 9.18) buffer solution with 0.002% Brij-35. The separation temperature was controlled at 25 °C and a voltage of 25 kV was applied. The detection wavelength was 280 nm. Five μ L of various concentrations of inhibitor was added to the enzyme reaction system consisting of 25 μ L of 50 mmol/L pH 6.0 potassium phosphate buffer, 10 μ L of 0.025 mg/mL dihydrofolate (FH_2), 10 μ L of dihydrofolate reductase (DHFR) (0.25 unit) and 5 μ L of 0.5 mg/mL NADPH in a 300- μ L sample tube, then mixed for 1 min and incubated for 30 min at room temperature. The reaction mixture injections were performed by pressure at 3.45 kPa (0.5 psi) for 10 s. With the developed CE method the substrate and product were baseline resolved within 19 min. The time course of the reaction was studied to show excellent correlation. Quantitative analysis of DHFR inhibition was performed by determining its dynamic parameters. The difference of peak areas between FH_2 and FH_4 was used to calculate the inhibitory rate. Three inhibitors, amethopterin, trimethoprim and folic acid, were used in the enzyme reaction system to test this method and their IC₅₀ values determined were close to the literature values. It was demonstrated that the developed method is suitable for screening DHFRIs.

Key words : high performance capillary electrophoresis; dihydrofolate reductase; inhibitor

二氢叶酸还原酶(DHFR)在人体中能参与癌细胞的繁殖和复制,其主要功能是将二氢叶酸(FH_2)还原为四氢叶酸(FH_4),进而合成四氢叶酸

类辅酶,参与体内核酸和氨基酸的合成,促进癌细胞的生长和成熟。因此抑制DHFR的催化活性,可以达到防止癌扩散,治疗癌症的目的。二氢叶酸还原

酶抑制剂大都具有与二氢叶酸类似的结构,可以竞争性地结合酶蛋白,使酶蛋白的活性降低,从而阻止二氢叶酸被还原成四氢叶酸,抑制癌细胞的生长。目前常见的二氢叶酸还原酶抑制剂有氨甲喋呤、甲氧苄胺嘧啶等。测定二氢叶酸还原酶活力及其抑制剂抑制率的常规方法有紫外分光光度法^[1]、同位素检测法^[2]、荧光光度法^[3]和高效液相色谱法(HPLC)^[4,5]等。这些方法都存在一些不足,如紫外分光光度法的方法灵敏度低,荧光光度法需要试剂用量较大,同位素检测法操作繁琐,而高效液相色谱法需要引入大量的有机溶剂。高效毛细管电泳(HPCE)是近年来发展起来的一种新型高效的分离分析技术,在生物分析和生命科学领域中有极为广阔的应用前景^[6,7]。毛细管电泳法的分离效率高,分析速度快,试剂用量很少,因而比较经济。目前尚未见用毛细管电泳法对二氢叶酸还原酶体系的研究报道。本文选用二氢叶酸还原酶、FH₂和NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸,还原辅酶II)作为反应体系,采用毛细管电泳法,反应物(DHFR、FH₂和NADPH)和产物(FH₄和NADP(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸,辅酶II))能够在19 min内基线分离,因此可以利用反应物和产物的峰面积和峰高的变化来研究在酶反应过程中反应物和反应产物的浓度变化,据此计算有关反应动力学参数。将该体系用于二氢叶酸还原酶抑制剂(DHFR I)的筛选,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 毛细管电泳仪(Beckman Coulter),配备二极管阵列检测器;熔融石英毛细管柱(河北永年锐洋色谱器件公司,60 cm × 75 μm,有效长度50 cm);XK96-B 快速混匀器(江苏新康医疗器械有限公司)。

二氢叶酸还原酶(美国Sigma公司,0.25 unit);二氢叶酸(Fluka公司,≥88.8%,enzym.纯);四氢叶酸(Fluka公司);NADPH(Fluka,≥90.0%,HPLC纯);氨甲喋呤(MTX)、甲氧苄胺嘧啶、叶酸为分析纯(Sigma公司);四硼酸钠(化学试剂公司,分析纯);Brij-35(Sigma公司,分析纯);2-巯基乙醇(天津市福晨化学试剂厂,分析纯)。

二氢叶酸标准溶液:准确称取二氢叶酸粉末5 mg,加入适量含0.02%(体积分数)巯基乙醇的50 mmol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液使其溶解,并稀释至1 mL,配成5 mg/mL标准溶液,使用时逐级稀释至所需浓度。

四氢叶酸标准溶液:准确称取四氢叶酸粉末25 mg,加入适量含0.02%巯基乙醇的50 mmol/L pH 9.3 硼酸盐缓冲溶液使其溶解,并稀释至25 mL,配成1 mg/mL标准溶液,使用时稀释至所需浓度。

NADPH标准溶液:准确称取NADPH粉末5 mg,加入0.04 mmol/L氢氧化钠溶液使其溶解,并稀释至1 mL,配成5 mg/mL标准溶液,使用时稀释至所需浓度。氨甲喋呤、甲氧苄胺嘧啶、叶酸等抑制剂均用水配制。所用水为二次去离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 毛细管电泳分离条件

运行缓冲液为含0.002%(质量分数)Brij-35的pH 9.18 50 mmol/L的硼砂缓冲溶液,分离温度25 °C,分离电压25 kV,进样压力3.45 kPa(0.5 psi),进样时间10 s,检测波长280 nm,电流135 μA。

新毛细管在使用前用1 mol/L NaOH溶液活化1 h。每次进样前分别用0.1 mol/L NaOH溶液、二次去离子水和运行缓冲液依次冲洗1 min,1 min和3 min。每进样两次后更换缓冲溶液。使用后,分别用0.1 mol/L NaOH和超纯水冲洗5 min,然后将毛细管吹干保存。

1.2.2 时间进程曲线的测定

于300 μL样品管中依次加入30 μL 50 mmol/L pH 6.0 磷酸盐缓冲溶液,10 μL 0.025 mg/mL二氢叶酸溶液,10 μL二氢叶酸还原酶(0.25 unit)5 μL 0.5 mg/mL NADPH溶液,充分混匀1 min,分别在室温下放置,反应不同时间(7, 15, 30, 40, 60 min),同时做空白实验(即不加二氢叶酸还原酶的体系),进行毛细管电泳分析,计算反应不同时间的四氢叶酸和二氢叶酸峰面积的差值。

1.2.3 抑制剂半数抑制浓度(IC₅₀)的测定

于300 μL样品管中依次加入25 μL 50 mmol/L pH 6.0 磷酸盐缓冲溶液,5 μL不同浓度的抑制剂,10 μL 0.025 mg/mL二氢叶酸溶液,10 μL二氢叶酸还原酶(0.25 unit),5 μL 0.5 mg/mL NADPH溶液,反应总体积55 μL。充分混匀1 min,于室温下放置30 min。同时以5 μL 50 mmol/L pH 6.0 磷酸盐缓冲溶液代替抑制剂做对照实验,以不加二氢叶酸还原酶的体系做空白实验,毛细管电泳自动进样分离,以四氢叶酸和二氢叶酸峰面积的差值计算半数抑制浓度。

2 结果与讨论

2.1 毛细管电泳的分离条件及重现性实验

分别实验了不同浓度的pH 2.0 ~ 9.8的H₃PO₄-KH₂PO₄、CH₃COOH-CH₃COONa、NaH₂PO₄-

Na_2HPO_4 、Tris-NaOH、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 等几种运行缓冲溶液,发现 50 mmol/L 的 pH 9.18 的硼砂缓冲溶液可以实现二氢叶酸、四氢叶酸、NADP、NADPH 和蛋白酶 5 种组分离的基线分离。并且由于二氢叶酸还原酶属于碱性蛋白,容易在毛细管管壁产生吸附,导致蛋白峰的严重拖尾,因此在缓冲溶液中加入 0.002% Brij-35 非离子表面活性剂,使蛋白质的峰形良好。本文确定的毛细管电泳的最佳分离条件如下:运行缓冲液为含 0.002% Brij-35 的 pH 9.18 50 mmol/L 的硼砂缓冲溶液,分离温度 25 °C,分离电压 25 kV,进样压力 3.45 kPa,进样时间 10 s,检测波长 280 nm,电流 135 μA 。

于 300 μL 样品管中依次加入 30 μL 50 mmol/L pH 6.0 磷酸盐缓冲溶液,10 μL 0.025 mg/mL 二氢叶酸溶液,10 μL 二氢叶酸还原酶(0.25 unit) 5 μL 0.5 mg/mL NADPH 溶液。充分混匀 1 min,于室温下放置 30 min,按上述电泳条件平行测定 6 次,迁移时间、峰面积的重现性(以相对标准偏差(RSD)计)见表 1。

表 1 毛细管电泳法对体系底物和产物分离的重现性($n=6$)

Table 1 Reproducibility of the separation of substrates and products by CE ($n=6$)

Component	Migration time/min	RSD of Migration time/%	RSD of peak area/%
NADP	13.20	0.48	2.66
FH_4	14.06	0.52	3.41
FH_2	14.29	0.56	8.34
NADPH	17.23	0.49	0.98

由表 1 数据可以看出,该体系中各化合物迁移时间的重现性良好,二氢叶酸的峰面积的重现性相对较差。由于二氢叶酸不稳定,购买的试剂中含有一定量的四氢叶酸,需要扣除空白,步骤较为繁琐。因此在二氢叶酸还原酶抑制反应动力学的研究中,我们以四氢叶酸和二氢叶酸峰面积的差值来探讨抑制剂的抑制效果,6 次测定的相对标准偏差为 2.7%。

2.2 反应模式的选择

柱外反应模式为反应物在柱外反应一段时间后,加电进样分离。柱上反应模式又称电泳媒介微分析(EMMA)法,是将底物和酶注入毛细管(淌度较小的先进样),加一段低电压;由于电泳淌度不同,两区带相遇直至完全重叠;充分反应后,加高电压实现分离。如果反应介质与背景电解质不同,可以结合部分填充技术(partfilling),采用夹心式进样模式,进样端毛细管填充酶反应介质-酶-底物-酶-酶反应介质,其他部分填充背景电解质,用于底物和产物的分离。

实验中考察了柱外和柱上两种反应模式的反应效果并进行了比较,结果表明,虽然 EMMA 法较柱外反应法节省试剂,使反应物的用量由 μL 变为 nL 数量级,易控温,操作简便,省时,但是由于毛细管内径较细,柱内反应不够彻底,也不好控制,两段相差很大的电压使得基线不平,检测灵敏度降低,并且夹心式进样法由于扩散的影响,反应迁移时间和峰面积的重现性差。因此,最终选择了柱外反应模式,重现性好,易于控制。

2.3 时间进程曲线

时间进程曲线反应了体系在不同时间内反应的状态。图 1 为反应 7,30 和 60 min 后的电泳谱图。图 2 为体系中加入 10 μL 酶的时间进程曲线,即按照“1.2.2”节中所述的实验方法,以不同反应时间的峰面积的差值对反应时间做曲线。曲线方程为: $Y = 106.3 + 172.9X - 0.71X^2$ (相关系数为 0.9991),其中 X 为反应时间(min), Y 为四氢叶酸和二氢叶酸的峰面积差。

由图 2 的时间进程曲线可知,在反应开始到 40

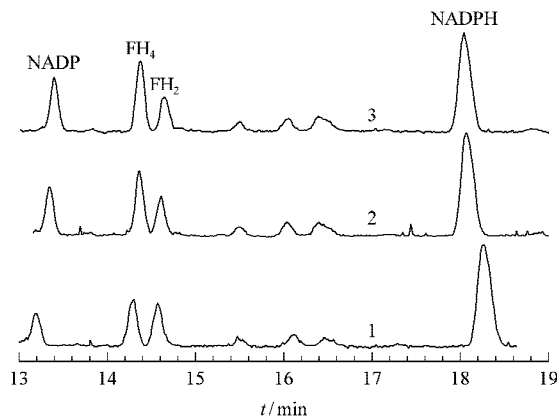


图 1 不同反应时间条件下体系的电泳谱图

Fig. 1 Electropherograms of reaction system under different reaction times

Chromatogram 1: 7 min; chromatogram 2: 30 min; chromatogram 3: 60 min.

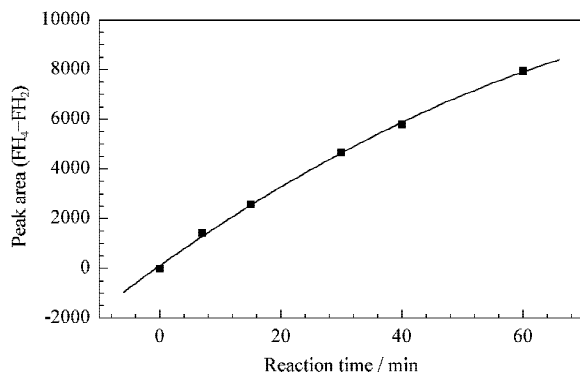


图 2 时间进程曲线

Fig. 2 Time course for the enzymatic reaction

min 时间内, 酶促反应保持一定的速率, 产物的生成浓度与反应时间成正比, 随着反应时间的不断增加, 反应物 FH_2 的浓度不断减少, 当底物浓度减少到一定程度时, FH_4 的浓度增加的趋势渐缓, 反应速度降低, 曲线逐渐偏离直线。

2.4 二氢叶酸还原酶抑制剂的筛选

对常见的几种二氢叶酸还原酶抑制剂的抑制效果进行了实验, 计算抑制剂的半数抑制浓度。抑制剂的抑制率用公式(1)进行计算。

$$R = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中 R 为抑制剂对二氢叶酸还原酶的抑制率; A 为对照组四氢叶酸和二氢叶酸峰面积的差值; B 为添加抑制剂之后二氢叶酸和四氢叶酸峰面积的差值。

抑制剂的半数抑制浓度(IC_{50})为抑制率达到 50% 时的抑制剂浓度, 以抑制率 R 对抑制剂的浓度做标准曲线, 由线性方程可求得半数抑制浓度。

氨甲喋呤、甲氧苄胺嘧啶和叶酸是二氢叶酸还原酶常见的抑制剂, 用二次去离子水配制不同浓度的抑制剂溶液, 按照“ 1.2.3 ”节中所示的实验方法进行毛细管电泳分离, 根据式(1)计算各种抑制剂对二氢叶酸还原酶反应的抑制率, 由抑制率对抑制剂浓度作图, 得到抑制剂的抑制曲线, 由此计算抑制剂的半数抑制浓度。图 3 为加入氨甲喋呤抑制剂后的电泳谱图和抑制曲线。计算结果见表 2。

表 2 二氢叶酸还原酶抑制剂的抑制效果

Table 2 The potency of dihydrofolate reductase inhibitors

Inhibitor	Inhibitory equation	r	$IC_{50}/(mol/L)$
Amethopterin	$Y = 35.65 + 7.71X_1$	0.9990	1.69×10^{-8}
Folic acid	$Y = -5.69 + 7.16X_2$	0.9979	7.07×10^{-7}
Trimethoprim	$Y = 1.06 + 12.52X_3$	0.9996	3.55×10^{-4}

Y : the inhibitory rate, %; X : concentration; the unit of X_1 : 10^{-7} mol/L; the unit of X_2 : 10^{-6} mol/L; the unit of X_3 : 10^{-3} mol/L.

由测定结果可知, 氨甲喋呤、甲氧苄胺嘧啶和叶酸 3 种已知的抑制剂均可以有效地抑制二氢叶酸还原酶的活性。文献[8]采用紫外分光光度法, 在 37 °C、pH 7.3 的条件下, 对从大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达体系中提纯得到的人二氢叶酸还原酶进行了测定, 氨甲喋呤和甲氧苄胺嘧啶的半数抑制浓度分别为 1.20×10^{-9} mol/L 和 8.25×10^{-5} mol/L。本实验的测定值与文献值较为接近, 表明该体系可用于二氢叶酸还原酶抑制剂的筛选。

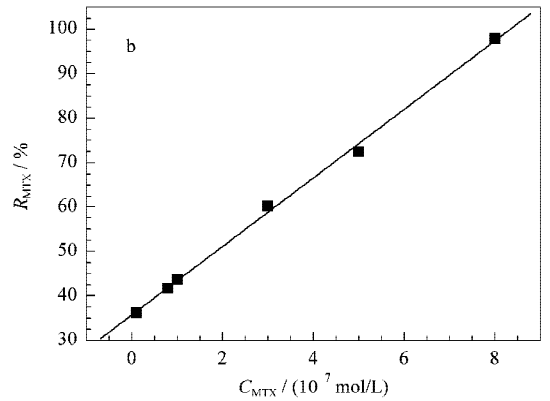
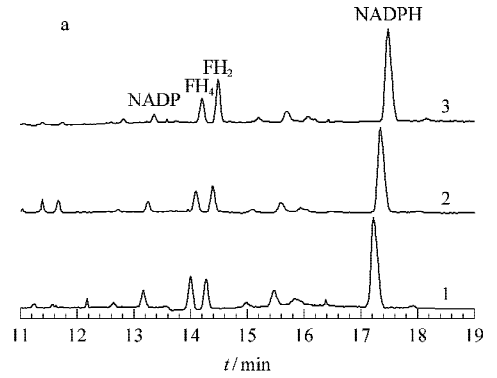


图 3 (a)加入不同浓度的氨甲喋呤后体系的电泳谱图和(b)氨甲喋呤的抑制曲线

Fig. 3 (a) Electropherograms with various amounts of amethopterin and (b) inhibition of amethopterin in enzyme reaction

a. the concentration of amethopterin in chromatogram 1: 1×10^{-8} mol/L, the concentration of amethopterin in chromatogram 2: 3×10^{-7} mol/L, the concentration of amethopterin in chromatogram 3: 8×10^{-7} mol/L; b. the concentration of amethopterin: $1 \times 10^{-8} - 8 \times 10^{-7}$ mol/L.

参考文献:

- [1] Mathews C K, Huennekens F M. *J Biol Chem*, 1963, 238 (10): 3 436
- [2] Hashimoto Y, Shiotani T, Weber G. *Anal Biochem*, 1987, 167 : 340
- [3] Blanco C C, Carretero A S, Gutierrez A F, Ceba M R. *Anal Lett*, 1994, 27(7): 1 339
- [4] Aiso K, Nozaki T, Shimoda M, Kokue E. *Anal Biochem*, 1999, 272(2): 143
- [5] Su H, Chen T L, Hausheer F H, Rowinsky E K. *J Chromatogr: Biomed Sci Appl*, 1997, 695(2): 401
- [6] Xin Z H, Ma H L, Wu S Y, Dai C H. *Acta Pharmaceutica Sinica* (辛志宏, 马海乐, 吴守一, 代春华. 药学学报), 2003, 38(11): 843
- [7] Belenky A, Hughes D, Korneev A, Dunayevskiy Y. *J Chromatogr A*, 2004, 1 053 : 247
- [8] White E L, Ross L J, Cunningham A, Escuyer V. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232(1): 101