

· 研究简报 ·

共表达 PXRLBD 和 SRC88 以及 PXR 配体筛选的平衡透析模型的建立

叶姗姗, 俞春娜, 陈 静, 孙红颖, 陈枢青*

(浙江大学 药理毒理与生化药学研究所, 浙江 杭州 310058)

关键词: 孕烷 X 受体; 甾体受体辅活化因子; 共表达; 配体; 透析; 高效液相色谱法

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)04-0427-04

Coexpression of PXRLBD with SRC88 and construction of equilibrium dialysis model of screening PXR ligands

YE Shan-shan, YU Chun-na, CHEN Jing, SUN Hong-ying, CHEN Shu-qing*

(Institute of Pharmacology and Toxicology and Biochemical Pharmacy,
College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The aim of this study was to obtain the soluble protein of human pregnane X receptor ligand binding domain (PXRLBD) through the coexpression of PXRLBD and 88 amino acids of steroid receptor coactivator-1 (SRC88) and apply the protein to constructing a new model of screening PXR ligands. Expression plasmid of pETDuet-1-SRC88-PXRLBD was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) to coexpress PXRLBD and SRC88 via induction by IPTG at low temperature. Then an equilibrium dialysis model was constructed to study the interaction between PXRLBD and drugs including clotrimazole and dexamethasone, using HPLC as the analysis method. The results showed that the soluble protein of PXRLBD was obtained and the HPLC data indicated that clotrimazole bound to PXRLBD, while dexamethasone did not bind to PXRLBD, which indicated the successful establishment of a new method for studying the interaction between PXR and drugs. The new method may be useful in the screening of PXR ligands *in vitro*.

Key words: PXR; SRC; coexpression; ligand; dialysis; HPLC

孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR), 属核受体 NR1I 亚家族。PXR 可由配体活化, 当配体 (如外源药物) 与其配体结合域 (ligand binding domain, LBD) 结合后, PXR 被活化, 招募辅调控因子 (如人甾体受体辅活化因子-1, steroid receptor coactivator-1, SRC-1) 形成复合物, 通过其 DNA 结合域 (DNA binding domain) 结合到药物代谢酶基因启动子的特定 DNA 序列上, 从而调控 CYP3A4 等药物代谢酶基

因的转录^[1,2]。外源药物通过充当配体活化 PXR, 诱导或抑制药物代谢酶基因的表达, 从而影响联合用药的代谢, 导致临床上药物-药物相互作用^[3-5]。因此, PXR 和配体药物的相互作用是药物代谢调控的重要分子机制之一。本研究通过共表达载体 pETDuet-1 在 *Escherichia coli* 中共表达 SRC-1 的 88 个氨基酸 (简称 SRC88) 和 PXRLBD, 获得了可溶性表达的 PXRLBD, 并根据 PXR 与配体的结合特性, 采用平衡透析模型和高效液相色谱法, 初步建立了体外研究 PXR 和药物相互作用的新方法, 为体外筛选 PXR 的配体药物提供了新模型。

收稿日期: 2007-09-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472171).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-571-88208411,

E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn

材料与amp;方法

仪器和试剂 French Pressure Cell Press(Thermo 公司);DNA 相对分子质量 Marker,限制性内切酶 [TAKARA Biotechnology(Dalian) Co., Ltd.];100 bp DNA ladder (CHIMERx);500 bp DNA ladder(上海申能博彩生物科技有限公司);琼脂糖(Oxoid 公司);蛋白质相对分子质量 Marker(MBI Fermentas); His·Bind Resin(Novagen 公司);Waters 2695/2487 型高效液相色谱仪;C₁₈色谱柱(Diamonsil 200 mm × 4.6 mm, 5 μm);克霉唑(ICN Biomedicals Inc.);地塞米松(美国 Sigma 公司);透析袋(相对分子质量 3 000,杭州华东医药股份有限公司)。

菌株和质粒 *Escherichia coli* DH5α, *Escherichia coli* Rosetta (DE3, 本实验室保存); pETDuet-1 (Novagen 公司)。

菌株的构建 SRC88 片段通过 *Nco* I 和 *Hind* III 位点的介导插入 pETDuet-1 载体的多克隆位点-1, PXRLBD 片段通过 *Nde* I 和 *Xho* I 位点的介导插入 pETDuet-1 载体的多克隆位点-2(PXRLBD C-端设计 His-tag 以便于蛋白纯化)。此亚克隆过程在 *Escherichia coli* DH5α 中完成,经限制性内切酶消化确证和 DNA 序列测定确证后,转化表达宿主 *Escherichia coli* Rosetta(DE3)。

原核表达 在 500 mL 含 1% 葡萄糖, 100 mg · L⁻¹ 氨苄青霉素, 34 mg · L⁻¹ 氯霉素的新鲜 LB 培养基中, 接种带有 pETDuet-1-SRC88-PXRLBD 重组子的 Rosetta(DE3)。培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右, 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 去除上清液。用 500 mL 含 50 μmol · L⁻¹ IPTG 的 2 × YT 培养基重悬细菌沉淀, 20 ~ 25 °C, 200 r · min⁻¹ 诱导培养 10 h。离心去除上清培养基后, 用 1 × PBS 重悬细菌沉淀物。细菌

经 French Pressure Cell Press 破碎后, 超声破碎, 随即高速离心取上清液纯化。纯化操作按 His·Bind Resin 产品说明书进行。

平衡透析模型的建立 取长为 10 cm 的分子截止量为 3 000 的透析袋 2 个, 一端扎紧, 袋内均加入纯化的 PXRLBD 溶液 2 mL, 将透析袋 I 放入盛有 18 mL 含 11.1 μmol · L⁻¹ 克霉唑的 1 × PBS 缓冲液试管中, 将透析袋 II 放入盛有 18 mL 含 11.1 μmol · L⁻¹ 地塞米松的 1 × PBS 缓冲液试管中, 其余操作相同^[6]。试管内(透析袋外)加入磁子, 然后在磁力搅拌器上 4 °C 透析一定时间, 使袋内外药物浓度达到平衡。分别取两组透析袋内外的溶液, 加蛋白酶 K 4 °C 消化 1 h 后, 加甲醇沉淀蛋白, 并用高效液相色谱法进行含量分析。通过测定同一透析袋内外药物峰面积, 比较袋内和袋外药物浓度。

高效液相色谱法分析 克霉唑色谱条件 流动相: 甲醇-10 mmol · L⁻¹ K₂HPO₄ (pH 6.0) (80:20, v/v), 流速: 1 mL · min⁻¹, 进样量: 20 μL, 柱温: 25 °C, 检测波长: 215 nm^[7]。地塞米松色谱条件 流动相: 甲醇-水 (60:40, v/v), 流速: 1 mL · min⁻¹, 进样量: 20 μL, 柱温: 25 °C, 检测波长: 240 nm^[8]。

结果

1 重组表达质粒的鉴定

pETDuet-1-SRC88-PXRLBD 重组质粒进行 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切, 预测获得 SRC88-PXRLBD 片段, 大小为 1.36 kb, 该片段经 *Hind* III 和 *Nde* I 双酶切后预测可得到 SRC88 和 PXRLBD 片段, 大小分别为 267 bp 和 933 bp, 琼脂糖电泳鉴定 SRC88-PXRLBD 片段及其酶切片段大小正确。DNA 序列测定表明 SRC88-PXRLBD 片段的 SRC88 部分与 SRC88 的

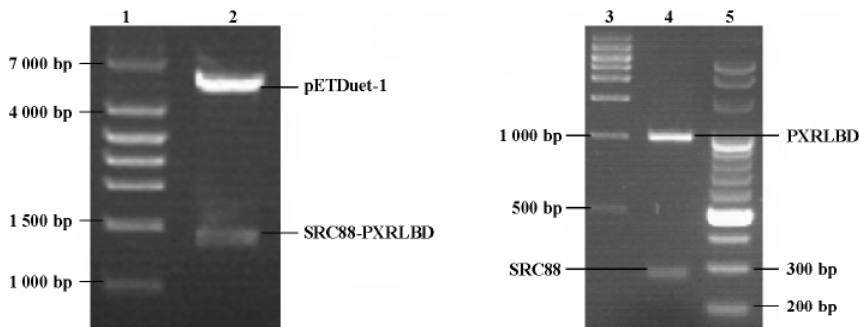


Figure 1 Electrophoretic analysis of pETDuet-1-SRC88-PXRLBD expression plasmid digested by restriction enzyme. 1: 500 bp DNA ladder; 2: pETDuet-1-SRC88-PXRLBD expression plasmid digested by *Nco* I and *Xho* I; 3: 500 bp DNA ladder; 4: SRC88-PXRLBD fragment digested by *Hind* III and *Nde* I; 5: 100 bp DNA ladder

623 ~ 710 位氨基酸的对应基因序列 (GenBank Accession No: U59302) 一致, 该片段 PXRLBD 部分与 PXR 的 130 ~ 434 位氨基酸的对应基因序列 (GenBank Accession No: AF061056) 一致, pETDuet-1-SRC88-PXRLBD 重组质粒构建正确。琼脂糖电泳鉴定结果见图 1。

2 PXRLBD 蛋白的表达分析

pETDuet-1-SRC88-PXRLBD Rosetta (DE3) 经 IPTG 诱导表达的产物, 用 His · Bind Resin 纯化后获得纯化液 8 mL 进行 SDS-PAGE, 在分子质量 34 kD 附近出现明显的 PXRLBD 表达条带, 在分子质量 10 kD 附近出现明显的 SRC88 表达条带, 结果见图 2。纯化液经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测得纯化液质量浓度为 $(0.411 \pm 0.005) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

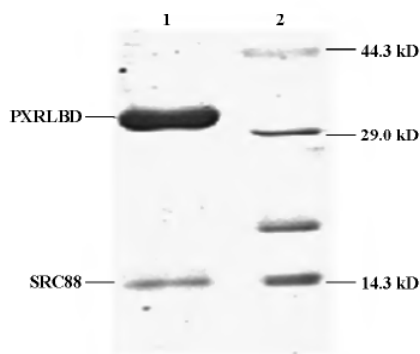


Figure 2 SDS-PAGE analysis of PXRLBD and SRC88 purified by His · Bind Resin. 1: PXRLBD and SRC88 purified by His · Bind Resin; 2: Molecular weight marker

3 克霉唑和地塞米松在 HPLC 上的鉴定

采用“高效液相色谱分析法”项下的方法, 获得的克霉唑和地塞米松的 HPLC 图 (图 3)。

4 平衡透析时间的考察

本实验考察了克霉唑和地塞米松的平衡透析时间。透析袋内用 His · Bind resin elute buffer 2 mL 代替 PXRLBD 溶液 2 mL, 其余操作同“平衡透析模型的建立”, 于 6、12、24 和 36 h 分别取样, 采用高效液相色谱法进行含量分析。比较透析袋内外溶液中药物的峰面积, 结果表明: 克霉唑组平衡透析 12 h, 透析袋内外液中药物浓度达到平衡; 地塞米松组平衡透析 24 h, 透析袋内外液中药物浓度达到平衡。本研究选择克霉唑的平衡透析时间为 12 h, 而地塞米松的平衡透析时间为 24 h。

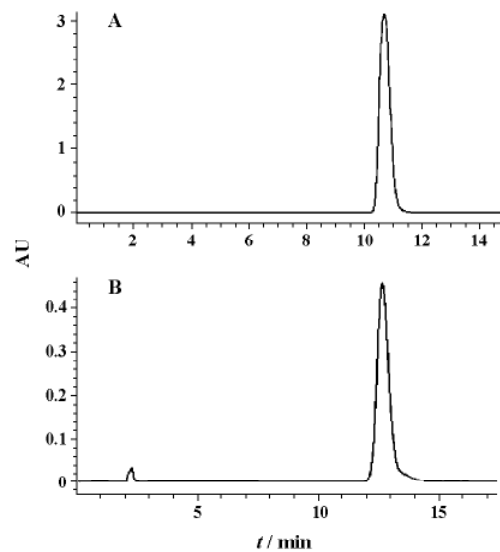


Figure 3 HPLC chromatograms of clotrimazole and dexamethasone standard substance. A: Clotrimazole ($4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); B: Dexamethasone ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

5 PXRLBD 与药物相互作用的研究

透析平衡后, 袋内游离药物浓度等于袋外游离药物浓度 (即袋外药物总浓度), 因此透析袋袋内与 PXRLBD 结合的药物浓度等于袋内药物总浓度减去袋内游离药物浓度即袋内药物总浓度减去袋外药物总浓度。以袋内药物峰面积与袋外药物峰面积的比值 A 作为表征, 克霉唑组 A 大于 1, 表明袋内药物总浓度高于袋外药物浓度, 即 PXRLBD 与克霉唑结合; 地塞米松组 A 等于 1, 表明袋内药物总浓度等于袋外药物浓度, 即 PXRLBD 未与地塞米松结合, 模型建立成功。结果见表 1。

Table 1 Interaction of PXRLBD with cotrimazole or dexamethasone in equilibrium dialysis model ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Drug	A
Clotrimazole	1.382 ± 0.086
Dexamethasone	1.004 ± 0.012

A : Ratio of drug peak area between the inside and outside of bag filter

讨论

本研究最初构建 pGEX-4T-1-PXRLBD 表达载体, 并在 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) 中表达 GST-PXRLBD 蛋白, 但获得的 GST-PXRLBD 可溶性差。

文献报道, 通过两个相容性表达载体在 *Escherichia coli* 中共表达 SRC88 和 PXRLBD, 可实现 PXRLBD 的可溶性表达应用于 PXR 与配体相互作用的研究^[4,9]。本研究在共表达载体 pETDuet-1 的两个多克隆位点分别插入 SRC88 和 PXRLBD 片断, 构建共表达载体 pETDuet-1-SRC88-PXRLBD, 并在 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) 中共表达 SRC88 和 PXRLBD, 获得了可溶性的 PXRLBD。

克霉唑是 hPXR 的经典配体, 而地塞米松是非 hPXR 配体^[10]。报告基因试验、GST pull-down 试验、闪烁接近竞争结合试验等表明 hPXR 和克霉唑结合后被活化, 诱导 CYP3A4 等药物代谢酶基因的表达, 而地塞米松不能活化 hPXR^[3,4,10~12]。因此, 本实验选择克霉唑作为阳性对照药物, 地塞米松作为阴性对照药物。

联合用药在临床治疗中普遍存在, 某些药物可作为配体活化 hPXR, 调控药物代谢酶基因的表达, 影响联合用药的代谢, 可能产生有害的药物-药物相互作用。如圣约翰草的抗抑郁活性成分贯叶金丝桃素可通过活化 hPXR 诱导 CYP3A4 的表达, 从而促进免疫抑制剂环孢菌素、HIV 蛋白酶抑制剂印地那韦、抗凝固剂华法林和强心剂地高辛等药物的代谢^[13]。因此, 研究 PXR 和药物的相互作用, 筛选 PXR 的配体药物对于开发安全、有效的药物具有重要意义。本研究初步建立了体外研究 PXR 和药物相互作用的新方法, 该方法避免了经典模型 (GST pull-down 试验和闪烁接近竞争结合试验^[3,4]) 必须使用放射性标记技术等缺陷, 为体外筛选 PXR 的配体药物开辟了新思路。

References

- [1] Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20: 689-725.
- [2] Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism [J]. *Endocrine Rev*, 2002, 23: 687-702.
- [3] Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, et al. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102: 1016-1023.
- [4] Jones SA, Moore LB, Shenk JL, et al. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14: 27-39.
- [5] Wang YG, Wang SQ, Gao Y. The induction of CYP3A regulated by pregnane X receptor and its significance in drug metabolism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 1-6.
- [6] Qi LW, Li P, Sheng LH. A new method to identify active components of traditional Chinese medicine using dialysis and high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2006, 34: 196-199.
- [7] Zhang Y, Sun YQ, Wang L, et al. Determination of clotrimazole in clotrimazole solution by RP-HPLC [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2005, 8: 635-636.
- [8] Chen XL. Determination of chloramphenicol and dexamethasone liniment by HPLC [J]. *Chin Med Stand (中国药品标准)*, 2006, 7: 49-50.
- [9] Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, et al. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity [J]. *Science*, 2001, 292: 2329-2333.
- [10] Johnson DR, Li CW, Chen LY, et al. Regulation and binding of pregnane X receptor by nuclear receptor corepressor silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT) [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69: 99-108.
- [11] Moore LB, Parks DJ, Jones SA, et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 15122-15127.
- [12] Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, et al. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 12208-12213.
- [13] Moore LB, Goodwin B, Jones SA, et al. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7500-7502.