

Sorbinil 和 Zopolrestat 对酵母工程菌中人醛糖还原酶活性的抑制作用

翟 冰 刘 静 刘建伟 叶 玲

摘 要 目的 利用人醛糖还原酶基因(AR)及其与绿色荧光蛋白基因(GFP)融合的酵母细胞表达模型,选用两种经典的AR抑制剂(ARI) – Sorbinil 和 Zopolrestat,初步观察模型在药物筛选方面的功能。**方法** 复苏菌种并培养,在细胞培养液中加入ARI,观察细胞生长、GFP表达及荧光强度、AR蛋白表达及AR活性。**结果** GFP荧光表达及AR蛋白的表达不受影响,但AR活性可被Zopolrestat抑制。**结论** GFP标记的AR基因的酵母细胞模型可用于ARI的初步筛选,易重复,费用经济。Zopolrestat对酵母工程菌中表达的AR活性呈现出良好的抑制效应,可考虑作为该模型进行ARI筛选时的对照药物。

关键词 醛糖还原酶 酵母 绿色荧光蛋白 醛糖还原酶抑制剂 药物筛选

Inhibition of Human Aldose Reductase Activity in Engineering Yeast Strain by Sorbinil and Zopolrestat. Zhai Bing, Liu Jing, Liu Jianwei, Ye Ling. Department of Geriatric Hematology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract Objective To evaluate the inhibition effect of two classical aldose reductase inhibitors (ARIs), Sorbinil and Zopolrestat on a potential ARI screening platform. **Methods** Aldose reductase (AR) and AR – GFP fusion genes were inserted into the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, respectively. Sorbinil and Zopolrestat were added into the culture medium of the engineering XAR and XAG stains. The cell growth, GFP fluorescent signal, the target protein expression levels and AR activities were observed. **Results** The GFP fluorescent signal and protein level of AR was not inhibited by the ARIs. A relatively lower activity of AR was observed in Zopolrestat – treated group. **Conclusion** The yeast expression stain of AR tagged with GFP demonstrated a potential application in ARI screening. Zopolrestat showed a better inhibitory effect. Therefore it may be considered as the control drug for screening ARIs.

Key words Aldose reductase; Yeast; Green fluorescent protein; Aldose reductase inhibitor; Drug screening

醛糖还原酶(aldose reductase, AR)是糖尿病慢性并发症相关多元醇通路(polyol pathway, PP)的限速酶。PP在正常葡萄糖代谢过程中微不足道。糖尿病时细胞内高葡萄糖导致PP被激活,山梨醇大量产生,不能透过细胞膜,造成渗透性水肿从而导致损伤^[1,2]。人们对醛糖还原酶抑制剂(aldose reductase inhibitor, ARI)的研究已40余年,其在长期抑制及减缓糖尿病慢性并发症方面的作用被寄予厚望。但是已研发的诸多ARI临床效果有限^[3],不良反应较多,许多药物停留在临床试验阶段,没有得到广泛应用。此外,AR属人体内广泛表达的NADPH依赖型醛 – 酮还原酶家族,越来越多的证据表明AR在非糖尿病领域扮演了重要角色,如缺血、炎症及肿瘤,未来ARI

可能有更广阔的应用前景。ARI的筛选始终是研究的焦点^[4~6]。

酵母细胞做为一种常用的基因工程载体,生长速度快、繁殖周期短、培养成本低、易于操作,并且外源蛋白表达水平高,具有翻译后修饰功能,使表达的外源蛋白与天然蛋白质性质相似,特别是用于药物筛查易重复、费用经济。酵母细胞与人的AR基因具有高度同源性,葡萄糖在酵母细胞中的代谢与在动物细胞中的代谢相似^[7]。本实验室前期工作建立了AR的酵母细胞模型,将目的基因AR插入质粒pYEX – BX,并使用GFP标记,转化酵母细胞INVSc1,从mRNA和蛋白水平证实了目的基因的稳定表达,并测定了表达蛋白的酶活性^[8]。在此我们初步研究此模型在筛选AR抑制剂方面的作用。

材料与方法

1. 材料:(1)ARI:本研究使用两种经典ARI, Sorbinil及Zopolrestat,由辉瑞(Pfizer)公司Peter J. Oates博士馈赠,使用NaOH溶液配制,NaOH终浓度0.1L/mol。(2)酵母工程菌:首先,自含有人AR cDNA基因的质粒pBluescript II KS – hAR上

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472172)

作者单位:100853 北京,解放军总医院老年血液科(翟冰);解放军总医院老年医学研究所(刘静、刘建伟、叶玲)

通讯作者:叶玲,电子邮箱:lye301@yahoo.com.cn

使用酶切的方法得到目的片段 AR,将其与质粒 pGFP 上 GFP 片段连接,得到融合基因 AR::GFP。然后,将 AR 及 AR::GFP 基因片段分别插入质粒 pYEX-BX,获得重组质粒 pXAR 和 pXAG。最后将这两种质粒分别转化 INVSc1,得到酵母菌株 XAR、XAG。穿梭质粒 pYEX-BX 可以在大肠杆菌和酵母细胞中复制,它含有一个可被 Cu^{2+} 诱导的酵母 CUP1 启动子,并且利用 pYEX-BX 选择性标记 URA3 对 INVSc1 突变株的尿嘧啶缺陷型的互补作用,发生转化的酵母细胞可以在缺乏尿嘧啶营养成分的选择性培养基 SC-UD 上生长。XAR、XAG 菌株由本实验室前期工作^[8]构建。

2. 方法:(1)酵母细胞的诱导、生长及 GFP 荧光信号分析:复苏 XAR、XAG 两菌株,挑取单克隆菌落至 SC-UD 液体培养基,培养至细胞密度(A_{600})为 0.5,加入诱导剂 CuSO_4 (终浓度为 $150\mu\text{mol/L}$),在荧光显微镜下观察 XAG 荧光的表达。(2)ARI 对酵母细胞的影响:加入 CuSO_4 诱导后 3h 的时间点记为 0,此时在 XAR、XAG 培养瓶内加入 ARI (Sorbinil 或 Zopolrestat),使其终浓度为 $500\mu\text{mol/L}$,并设对照组,观察 ARI 对细胞生长及 XAG 荧光表达的影响,分别收集加入 ARI 后 3h 及 6h 的细胞,使用玻璃珠研磨法^[9]提取酵母细胞蛋白,Bradford 法^[10]蛋白定量,进行 Western blotting,并荧光法测定 AR 活性^[11]。Western blotting:调节各泳道总蛋白上样量均为 $15\mu\text{g}$,SDS-PAGE 变性电泳、湿式电转膜法将蛋白转印至 PVDF 膜上。封闭后加 1:500 羊源 AR IgG (一抗, Santa Cruz) 及 1:500 兔抗羊 IgG (二抗, 鼎国),化学发光法暗室操作曝光 X 线底片。AR 活性测定:反应体系包括:0.54mol/L 钠-钾缓冲液,2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.2mmol/L NADPH, DL-甘油醛及适量蛋白。反应后加强碱激发 NADP 荧光。在荧光分光光度计下记录荧光强度来表示 AR 活性。以每分钟产生 $1\mu\text{mol}$ NADP 为一个酶活性单位 (U),AR 比活性 = 酶活性单位 (U)/蛋白量 (g)。室温下平行测定 3 次,取均值。

3. 统计学方法:使用 Stata 7.0 软件进行统计学分析。计量资料使用 t 检验,双侧 $P < 0.05$ 认为统计学差异有显著性。

结 果

1. 观察 XAR、XAG 两菌株细胞生长情况及 XAG 荧光表达:加入 ARI 组与对照组相比均无显著差异 (图 1)。

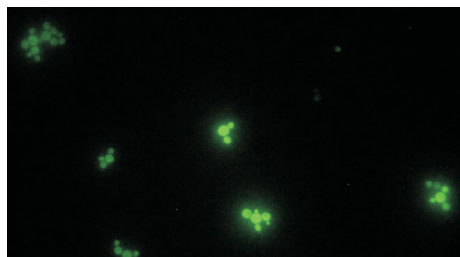


图 1 XAG 中 GFP 表达 ($\times 40$)

2. Western blotting 检测蛋白表达:分别取加入 ARI (Sorbinil 或 Zopolrestat) 3h 及 6h 的细胞行 West-

ern blotting,对照组加同体积 0.1L/mol NaOH,AR 大小为 30kDa,AR::GFP 融合蛋白分子质量约 57kDa,中间条带考虑为 mRNA 剪切所致 (图 2)。XAR、XAG 两菌株加入 ARI 组与对照组相比均无显著差异。

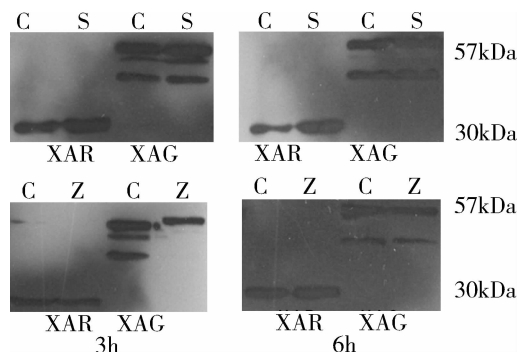


图 2 Western blotting 检测 ARI 对酵母细胞表达 AR 蛋白的影响

C. 对照组;S. 加入 Sorbinil 组;Z. 加入 Zopolrestat 组

3. AR 活性测定:同上收集细胞,提取蛋白并测定 AR 活性,可见加入 Sorbinil 组与对照相比差别均无统计学意义 (图 3),但加入 Zopolrestat 组较对照组活性减弱 ($P < 0.05$)。测定实验重复 3 次。

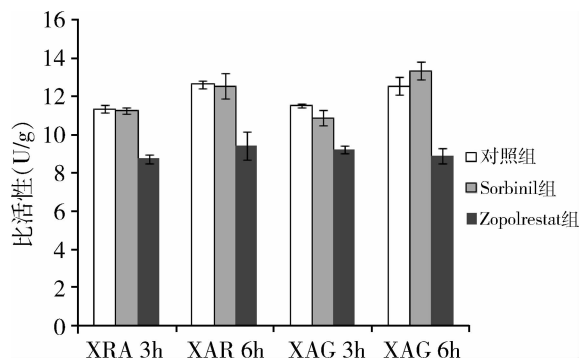


图 3 Sorbinil 对酵母细胞 AR 活性的影响

讨 论

自 20 世纪 60 年代以来,人们开发出了大约百余种 ARI,主要来源有微生物及合成,特别是在合成方面成绩显著。合成的 ARI 分为羧酸类、海因类、苯并吡喃酮类等^[11,12]。本文初步探讨了 ARI 对建立的 AR 酵母细胞表达模型的影响,所用抑制剂为经典的 AR 抑制剂 Sorbinil 与 Zopolrestat,其中 Sorbinil 属海因类,Zopolrestat 属羧酸类。文献报道的 IC_{50} 分别为 150nmol/L 和 3.1nmol/L ^[13,14]。

到目前为止,开发的 ARI 大多属非竞争性抑制类型,晶体结构分析表明其结合于 AR 的活性部位。在酵母生长的培养液中加入抑制剂结果显示,两种

ARI 未对细胞生长产生影响, XAG 菌株的 GFP 荧光信号表达没有受到抑制。提取蛋白后行 Western blotting, 证实了各组 AR 蛋白表达的一致。但活性测定的结果表明, Zopolrestat 抑制了两菌株 AR 的活性, 而 Sorbinil 则没有显示其抑制的效果, 这可能与高浓度的 Sorbinil 影响荧光测定有关。

本研究对利用基因工程的方法得到的酵母细胞模型在药物筛选方面的作用进行了初步探索, Zopolrestat 对酵母工程菌中表达的 AR 呈现出良好的抑制效应, 可考虑作为该模型进行 ARI 筛选时的对照药物。本方法用于药物初步筛选, 较传统的糖尿病动物模型及动物组织提取 AR 蛋白筛选方法, 靶点明确、易重复、费用经济。在 AR 酶活性测定中存在不足之处, 由于内源性酶对 NADPH 的氧化作用, ARI 抑制作用后的比活性的差值并不显著。并且, 荧光法测定酶活性虽然灵敏度高, 但影响因素较多, 不易控制。我们将改进工作, 寻求更适合本模型 AR 蛋白活性测定的方法。

参考文献

- 1 Varma SD, Mizuno A, Kinoshita JH. Diabetic cataracts and flavonoids[J]. Science, 1977, 195: 205 - 206
- 2 Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, *et al.* Aldose reductase in diabetic complications of the eye[J]. Metabolism, 1979, 28: 462 - 469
- 3 Schemmel KE, Padiyara RS, D'Souza JJ. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review[J]. J Diabetes Complications, 2010, 24(5): 354 - 360
- 4 Lo AC, Cheung AK, Hung VK, *et al.* Deletion of aldose reductase leads to protection against cerebral ischemic injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(8): 1496 - 1509
- 5 Alexiou P, Pegklidou K, Chatzopoulou M, *et al.* Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st Century[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16: 734 - 752
- 6 Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase: A novel therapeutic target for inflammatory pathologies[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010, 42: 17 - 20
- 7 陈思斌, 萧熙佩. 酵母生物化学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1990: 106 - 260
- 8 刘静, 叶玲, 刘建伟. 糖尿病并发症相关基因醛糖还原酶酵母细胞模型的建立[J]. 中国老年学杂志, 2005, 11(25): 1367 - 1369
- 9 Burke D, Dawson D, Stearns T. Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory course manual (2000 Edition) [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002: 115 - 116
- 10 Bradgord MM. A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Analytical biochemistry, 1976, 72: 248 - 254
- 11 Lowry OH, Robert NR, Kapphahn JI. The flurometric measurement of pyridine nucleotides[J]. J Biol Chem, 1957, 224(2): 1047 - 1064
- 12 Luca C, Giulio R, Paola V, *et al.* Diabetes complication and their potential prevention and other approaches[J]. Med Res Rev, 1999, 19(1): 3 - 23

(收稿: 2011 - 10 - 14)

(修回: 2011 - 10 - 20)

DEHP 诱导的氧化应激致小鼠学习记忆能力的下降和维生素 E 的保护作用

程静菲 尚 帅 何贵波 刘晓帆 唐佳琦 熊国梅 廖晓梅 杨 旭

摘 要 目的 研究邻苯二甲酸二乙基己酯(Di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP)对小鼠学习记忆能力的影响与其在脑组织造成氧化损伤的关系。**方法** 36 只雄性昆明小鼠随机分成 4 组, 每组 9 只, 分别为空白对照组(生理盐水)、DEHP 染毒组(50mg/kg DEHP)、维生素 E(vitamin E)保护组(50mg/kg DEHP + 50mg/kg 维生素 E)、维生素 E 对照组(50mg/kg 维生素 E)。每天清晨灌胃 1 次, 连续 10 天。期间进行 Morris 水迷宫测试, 检验小鼠的学习记忆能力变化, 10 天后将小鼠处死, 取出脑组织, 检验 ROS 及 MDA 含量。**结果** Morris 水迷宫结果显示, DEHP 染毒组小鼠学习记忆能力与对照组相比显著下降($P < 0.05$), 而维生素 E 作为抗氧化剂在一定程度上可减少其下降幅度; DEHP 染毒组小鼠脑组织中的 ROS 水平和 MDA 含量显著上升($P < 0.05$), 而维生素 E 可减少这种增加, 并与对照组没有显著差异。**结论** 维生素 E 作为抗氧化剂可对 DEHP 致小鼠学习记忆能力损伤有保护作用, DEHP 致小鼠学习记忆能力损伤可能与其在脑组织造成的氧化损伤有关。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(51076079); 华中师范大学 2011 年大学生科研立项资助项目

作者单位: 430079 武汉, 华中师范大学生命科学院

通讯作者: 杨旭, 电子信箱: yangxu@mail.ccnu.edu.cn