

# 芳香化酶抑制剂的辅助设计及筛选模型建立

周雪亮 周 渊 胡雯雯 张荣丽

徐州医科大学, 中国·江苏 徐州 221000

**【摘要】** 本文利用 $^3\text{H}_2\text{O}$ 放射性标记法,以胎盘的微粒体为芳香化酶的酶源,反应底物选用 $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ 雄烯二酮,先测得产物 $^3\text{H}$ ,进而检测芳香化酶的活性。同时对该方法进行反应动力学研究,得出该方法可以作为芳香化酶抑制剂的筛选模型

**【关键词】**  $^3\text{H}_2\text{O}$ ; 芳香化酶; 芳香化酶抑制剂; 筛选模型

江苏省大学生创新创业训练计划(201410313005Z)、国家级大学生创新创业训练计划(201410313005)、基础医学国家级实验教学示范中心(徐州医科大学)资助项目

近年来,由于人们生活环境和方式的改变,乳腺癌的发病率也持续增加。乳腺癌给患者的身体健康带来很大病痛的同时,也给患者带来了很大的心理压力。大约60%–70%的乳腺癌患者都是荷尔蒙依赖性,患者体内癌细胞的增长依赖雌激素。而芳香化酶能将患者体内的雄激素转化为雌激素,因此芳香化酶抑制剂对临床上荷尔蒙依赖性乳腺癌有很好的治疗作用,因此芳香化酶抑制剂成为预防和治疗激素依赖性乳腺癌的一个重要靶点。然而,目前临床使用的抗乳腺癌药物大部分的毒性较高,药物的选择性较低,而且患者使用这些药物后会出现很严重的耐药性。因此,研究低毒性、高选择性的药物迫在眉睫,以芳香化酶为靶点的抗乳腺癌药物,成为近年来研究治疗乳腺癌药物的热点。

筛选芳香化酶抑制剂的主要方法有以下几种:细胞株培养法、酶联免疫吸附法、荧光法、毛细管电泳、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 放射性标记法等。 $^3\text{H}_2\text{O}$ 放射性标记法利用放射性同位素标记测量,检测的灵敏度较高,而且测量方法相对简便。因此,本实验利用 $^3\text{H}_2\text{O}$ 放射性标记法检测芳香化酶的活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

材料:人体胎盘, $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ 雄烯二酮( $958.3\text{TBq}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),雄烯二酮,葡聚糖 T70, NADPH, exemestane, 其他试剂均为国产分析纯。

仪器:超速离心机,低温离心机,  $-86^\circ\text{C}$ 超低温冰箱,放射性同位素检测仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 制备微粒体

本实验在温度为 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 条件下进行。先把新鲜的胎盘放在冰上,除去大血管、绒毛膜之后,用 $0.01\text{mol/L}$ 磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗,之后剪碎,匀浆。利用离心机以 $900\text{xg}$ 离心70分钟。去掉沉淀物之后将上层清液再以 $10000\text{xg}$ 离心70分钟,得到线粒体之后,上层清液再以 $125000\text{xg}$ 离心70分钟,得到微粒体部分。沉淀用 $0.01\text{mol/L}$ 的PBS(含有 $0.5\mu\text{mol/L}$ 雄烯二酮和 $0.1\text{mmol/L}$ EDTA)重悬浮,沉淀再用 $0.01\text{mol/L}$  PBS重悬浮,对于悬浮的蛋白,利用以 $0.01\text{mol/L}$  PBS为溶剂的 $0.1\%$  NP-40溶解,直至蛋白终浓度为 $2\text{--}3\text{g/L}$ 。采用Bradford法对蛋白浓度进行测定。

#### 1.2.2 建立酶反应体系

将保存在无水乙醇中的 $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ 雄烯二酮取出稀释。加入缓冲液, $0.01\text{ml}$ 之前制备的微粒体, $50\text{pmol}[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ 雄烯二酮, $0.02\text{mg}$  NADPH,制备成 $0.4\text{ml}$ 的反应体系。实验温度条件 $37^\circ\text{C}$ ,分四组进行实验,分别反应2分钟、5分钟、10分钟、15分钟。在体系中加入 $1\text{ml}$ 氯仿,振荡15分钟,以 $3200\text{xg}$ 离心15分钟,取

$0.8\text{ml}$ 上层清液,加入 $0.8\text{mol}\%$ 葡聚糖包被活性炭,在 $37^\circ\text{C}$ 温浴条件,振荡35分钟,之后离心。测定上层清液中 $^3\text{H}$ ,利用无微粒体的反应体系作对比。

#### 1.2.3 测定 $K_m$ 和 $V_{\text{max}}$

$0.4\text{ml}$ 反应体系中, $[S]$ 的浓度分别取 $20, 25, 33.3, 50, 100\text{nmol/L}$ ,反应时间为 $5\text{min}$ ,反应体系的步骤同1.2.2。

#### 1.2.4 exemestane 抑制类型的检测

$0.4\text{ml}$ 反应体系中,作为酶源的蛋白量分别加 $0.012, 0.02, 0.036, 0.048, 0.060, 0.072\text{mg}$ , exemestane浓度为 $100\text{nmol/L}$ ,反应时间为 $5\text{min}$ ,反应体系的步骤同1.2.2。

#### 1.2.5 exemestane 的 $IC_{50}$ 的检测

$0.4\text{ml}$ 反应体系, exemestane浓度为 $0.001, 0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$ ,反应时间为 $5\text{min}$ ,反应体系的步骤同1.2.2。

## 2 结果

利用梯度离心得到胎盘微粒体,从提取的缓冲液中测得 $0.5\mu\text{mol/L}$ 雄烯二酮,雄烯二酮对于芳香化酶的稳定有积极影响。

### 2.1 进程曲线及抑制时间曲线

建立反应体系,选用 $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ 雄烯二酮为底物,以微粒体为酶源。通过图1的时间曲线可看出,反应过程中的前 $5\text{min}$ 基本呈线性关系。利用 $5\text{min}$ 的点计算胎盘中芳香化酶的活性,为 $30\text{nmol}\cdot(\text{min}\cdot\text{g protein})^{-1}$ 。再将芳香化酶抑制剂 exemestane 加入到反应中,发现 exemestane 对于芳香化反应起到明显的抑制作用,其抑制效率始终保持在 $68\%$ 左右,且不随时间而改变,由此得出,采用本实验方法,以胎盘微粒体作为芳香化酶酶源,用来检测芳香化酶的活性是可行的。

### 2.2 测定底物的 $K_m$ 和 $V_{\text{max}}$

对 $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ 雄烯二酮的浓度进行调整,并将产物量始终控制在小于底物量的 $5\%$ 范围,根据图2,计算出 $K_m=113\text{nmol/L}$ ,  $V_{\text{max}}=33.3\text{nmol}\cdot(\text{min}\cdot\text{g protein})^{-1}$ 。

### 2.3 exemestane 的抑制类型和抑制活性的测定

对 exemestane 的浓度做改变,其他条件不变,可以得出图。由图3可得, exemestane 的浓度与其抑制活性有关,  $IC_{50}=70\text{nmol/L}$ 。

## 3 讨论

$^3\text{H}_2\text{O}$ 法主要依据底物雄烯二酮 $1\beta$ 位上的H转移到产物水中的机制,利用反应后的 $^3\text{H}_2\text{O}$ 来进行检测,测量方法相对简单,操作便捷,灵敏度较高。由此可得 $^3\text{H}_2\text{O}$ 法可作为芳香化酶抑制剂的筛选方法。

为检测本方法是否可用于药物筛选,本文采用 exemestane 作为对比。通过图线可以看出, exemestane 对于酶的抑制类型属于不可逆抑制,而且抑制效率较高,  $IC_{50}=70\text{nmol/L}$ , 与其介于 $20\text{--}$

100nmol/L之间的标准相符。说明本文建立的测量模型是成功的。

**参考文献:**

[1]全海天,楼丽广.芳香化酶抑制剂筛选模型的建立[J].中国药理学通报, 2004:1189-1192.

[2]闫敏.芳香化酶抑制剂治疗乳腺癌研究进展[J].国外医学:肿瘤学分册, 2003:125-128.

附图:

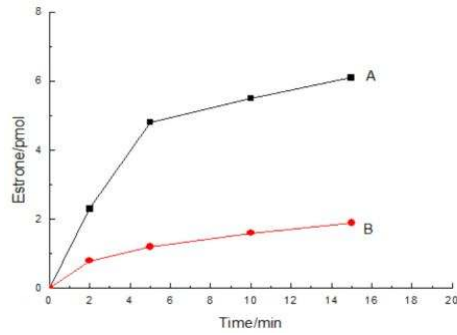


图1 A不存在exemestane时雌性激素随反应时间变化量, B存在exemestane时雌性激素随反应时间变化量

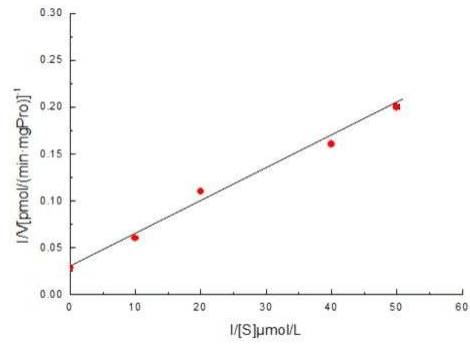


图2 芳香化酶抑制剂动力学分析

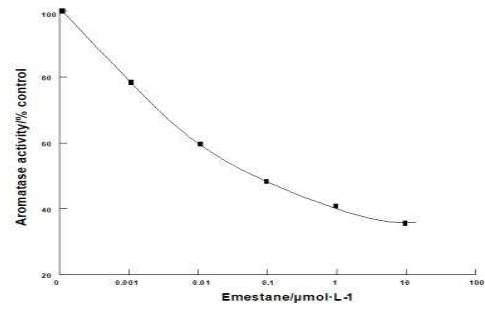


图3 exemestane含量与芳香化酶活性的关系