

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00640

· 论 著 ·

人白细胞弹性蛋白酶抑制剂体外筛选模型的建立及优化

宋 歌^{1,2△}, 胡显腾^{1,2△}, 孔令超^{1,2}, 刘军华¹, 刘小宇^{1*}

1. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学研究生管理大队, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨人白细胞弹性蛋白酶(HLE)与其底物反应的最适条件, 建立一种高通量的 HLE 抑制剂体外筛选模型。**方法** 通过测定反应产物——对硝基苯胺(*p*-NA)的光密度值, 研究电解质浓度、反应温度、反应体系 pH 值、酶和底物作用浓度、反应时间及检测波长等对酶促反应的影响程度, 确定酶与底物反应的最佳条件。**结果** 确定的最优反应条件为: HLE (0.2 U/ml) 30 μ l, 底物(50 mmol/L)100 μ l, 含 1.0 mol/L NaCl 的 Tris 缓冲液(pH 7.5), 反应温度 37 $^{\circ}$ C, 反应时间 24 h, 检测波长为 545 nm。**结论** 建立了一种稳定的 HLE 抑制剂体外筛选模型, 该模型灵敏度高、准确性和重复性强, 可用作筛选 HLE 抑制剂的平台。

[关键词] 白细胞弹性蛋白酶; 抑制剂; 筛选模型; 条件优化**[中图分类号]** R 345.63 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0640-05

Optimization research on *in vitro* screening model for human leukocyte elastase inhibitor

SONG Ge^{1,2△}, HU Xian-teng^{1,2△}, KONG Ling-chao^{1,2}, LIU Jun-hua¹, LIU Xiao-yu^{1*}

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Postgraduate School, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the most suitable reaction condition for human leukocyte elastase (HLE) and its substrates, so as to establish a high-throughput *in vitro* screening model for HLE inhibitor. **Methods** By measuring the UV absorbance of the product *p*-NA, we studied the electrolyte concentration, temperature, pH, enzyme/substrate concentration, the influence of reaction time, and detection wavelength on the reaction, so as to determine the optimal condition for the reaction between HLE and its substrates. **Results** The suitable reaction condition was determined as follows: HLE (0.2 U/ml) 30 μ l, substrate (50 mmol/L) 100 μ l, Tris buffer(1.0 mol/L NaCl, pH 7.5), temperature 37 $^{\circ}$ C, reaction time 24 h, and detection wavelength 545 nm. **Conclusion** We have successfully established a stable *in vitro* HLE inhibitor screening model with high sensitivity, accuracy, and repeatability, which provides a better platform for HLE inhibitor screening.

[Key words] leukocyte elastase; inhibitor; screening model; reaction conditions optimization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6): 640-644]

人体内弹性蛋白是细胞外基质中十分重要的结构性蛋白, 主要由弹性纤维构成。人体多种组织如肺、肝脏、肾脏、皮肤、韧带和动脉壁等都富含弹性蛋白, 从而保持一定的弹性和张力。人白细胞弹性蛋白酶(human leukocyte elastase, HLE)是多形核白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMNL)受炎症刺激而释放出的一种破坏性丝氨酸蛋白酶。它可水解如弹性蛋白、粘蛋白和某些胶原蛋白等组织连

接蛋白, 因而可直接作用于肺、肝脏、肾脏等结缔组织中的多种胞外基质。体内弹性蛋白酶表达过多或活性过高均可导致严重的组织损伤, 成为如肺气肿、囊性纤维化、慢性支气管炎、急性呼吸窘迫综合征、脓血症、肾炎、类风湿关节炎和某些皮肤病等多种疾病的诱因之一^[1-3]。因此, 在治疗炎症相关疾病的同时, 抑制 HLE 也成为抗炎治疗的靶点之一。另外, 过多的 HLE 还会破坏胶原纤维及组织基底膜层, 在

[收稿日期] 2011-02-26 **[接受日期]** 2011-03-17**[作者简介]** 宋 歌, 第二军医大学临床医学专业本科 2007 级学员。E-mail: sganthem@163.com; 胡显腾, 第二军医大学临床医学专业本科 2007 级学员。E-mail: thefallingsnow@126.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870970-8004, E-mail: liuxiaoyu8888@msn.com

肿瘤的形成和转移方面也起关键作用^[4-5]。

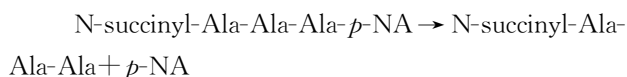
目前 HLE 抑制剂的体外筛选模型大多采用酶与化学标记的底物反应,测定生成的产物在 405 nm 处的光密度值^[6-7]。但在实际操作中,由于许多天然产物都具有 405 nm 处的吸收,测定时的误差较大,所以,对于待筛选样品的颜色有较大的限制。同时,现有的反应条件如缓冲体系、反应时间等都存在着个样化、不统一、过程烦琐、操作复杂等问题,这给真正大规模筛选 HLE 抑制剂带来困难。因此,建立一个灵敏度高、重现性好、适用面广、方便简单的 HLE 抑制剂体外筛选模型意义重大。

本研究拟采用化学标记的多肽底物 N-琥珀酰-丙氨酰-丙氨酰-丙氨酰-对硝基苯胺(N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-NA, STANA)与 HLE 作用,通过重氮化作用间接测定水解释放的硝基苯胺(*p*-NA)的浓度来检测反应的进行程度,以建立一种高通量的 HLE 抑制剂体外筛选模型。同时,通过对酶促反应的底物浓度、酶浓度、缓冲液组分、pH 值及作用时间等反应条件进行优化,并以 HLE 特异性抑制剂西维来司钠(sivelestat sodium)验证该模型的实用性。

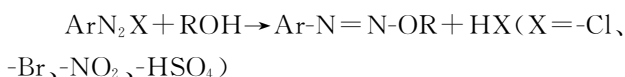
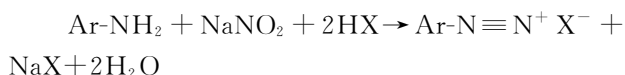
1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 HLE、STANA 和西维来司钠(sivelestat sodium)购自 Sigma 公司,762 型分光光度计(上海精密仪器有限公司),Tris 碱、NaNO₂、氨基磺酸铵、N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐[N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, NEDDC]购自上海医药集团。

1.2 HLE 活性测定原理 HLE 在合适的条件下催化底物 STANA 水解,产生 *p*-NA^[8]。反应方程式如下:



采用测定 *p*-NA 光密度的方法来检验酶促反应的进行程度。为了提高检测的灵敏度,本实验采用重氮化-偶联的方法对反应生成的 *p*-NA 进行衍生。其原理是:在低温条件下,底物 STANA 经 HLE 水解释放的 *p*-NA 与亚硝酸进行重氮化反应,生成芳香重氮盐,该芳香重氮盐再与酚类进行偶合反应,偶合产物在 545 nm 处有特定吸收,通过测定 545 nm 处光密度值可间接测定 HLE 活性。反应方程式如下:



1.3 *p*-NA 标准曲线的建立 分别取 1 mmol/L

p-NA 标准液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 ml 于 25 ml 棕色容量瓶中,加 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液至标线,取该标准溶液 1.4 ml,在冰浴中依次添加 0.1% 亚硝酸钠溶液、0.5% 氨基磺酸铵溶液、0.1% NEDDC 溶液,各 200 μl,混匀后继续冰浴 15 min 进行重氮化-偶联反应,反应结束后在 545 nm 处读取光密度(*D*)值,重复实验 3 次,取平均光密度(*D*)值。以 *p*-NA 的浓度为横坐标,545 nm 处的平均(*D*)值为纵坐标,绘制标准曲线。

1.4 方法考察

1.4.1 缓冲液离子组成对酶促反应的影响 参照文献[9],用分别含 0.5 mol/L CaCl₂、0.5 mol/L MgCl₂、1.0 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)作为缓冲体系,加入 0.2 U/ml 的酶 50 μl 和 50 mmol/L 的底物 STANA 100 μl,37℃ 反应,分别于反应的 1 h 和 8 h 处终止反应,采用 1.3 项下的方法进行重氮化衍生,并测定其在 545 nm 处光密度(*D*)值,重复实验 3 次,取平均光密度(*D*)值,比较不同金属离子对酶促反应的影响。

1.4.2 缓冲液成分、反应温度、反应时间及离子强度对酶促反应的影响 为了进一步考察离子强度、缓冲液组分、反应时间及反应温度对酶促反应的影响,本研究设计如下实验(表 1):首先分别配制 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液(pH 7.5)和 Hepes 缓冲液(pH 7.5),其中分别含 0.5 mol/L 和 1.0 mol/L NaCl,将 50 μl 酶(0.2 U/ml)和 100 μl 底物(50 mmol/L)置于其中(具体数值参照表 1),混合均匀后,分别放置于 25℃ 和 37℃ 条件下反应,分别于 3、8、24 h 时终止反应,重氮化衍生后测定 545 nm 处光密度(*D*)值,重复实验 3 次,取平均光密度(*D*)值。

1.4.3 底物浓度对酶促反应的影响 分别取 50 mmol/L 的底物 STANA 25、50、75、100、150、200、250 μl, HLE(0.2 U/ml) 50 μl,置于含 1.0 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中,37℃ 水浴反应 24 h 后,采用上法进行重氮化衍生,反应结束后在 545 nm 处测定光密度(*D*)值,重复实验 3 次,取平均光密度(*D*)值。

1.4.4 酶量对酶促反应的影响 取 50 mmol/L 的 STANA 100 μl,分别加入 0.2 U/ml HLE 5、10、20、30、40、50 μl,置于含 1.0 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中,37℃ 水浴反应 24 h,采用上法进行重氮化衍生,反应结束后在 545 nm 波长处测定光密度(*D*)值,重复实验 3 次,取平均光密度(*D*)值。

1.4.5 西维来司钠抑制实验 取 50 mmol/L STANA 100 μl,0.2 U/ml 酶 30 μl,分别加入 5 mg/ml 的西维来司钠 5、10、25、50、100、150、200 μl 于反

应体系中, 37℃水浴反应 24 h, 取出部分等体积反应溶液在 405 nm 波长处测光密度值, 将其余的反应体系进行重氮化衍生, 在 545 nm 波长处测定光密度(D)值, 重复该实验 3 次, 取平均光密度(D)值。

表 1 缓冲液成分、温度、时间及离子强度对酶促反应的影响

Tab 1 Effects of different buffer composition, temperature, reaction time, and ionic strength on enzymatic reaction

No.	Enzyme V/ μ l	Buffer	NaCl c_B /(mol·L ⁻¹)	Temperature θ /℃
1	50	Tris	1.0	37
2	50	Tris	0.5	37
3	50	Hepes	1.0	37
4	50	Hepes	0.5	37
5	-	Tris	-	37
6	-	Hepes	-	37
7	50	Tris	1.0	25
8	50	Tris	0.5	25
9	50	Hepes	1.0	25
10	50	Hepes	0.5	25
11	-	Tris	-	25
12	-	Hepes	-	25
13	-	Tris	1.0	37
14	-	Tris	0.5	37
15	-	Tris	1.0	25
16	-	Tris	0.5	25
17	-	Hepes	1.0	37
18	-	Hepes	0.5	37
19	-	Hepes	1.0	25
20	-	Hepes	0.5	25

1.5 统计学处理 组间比较采用 *t* 检验, 检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 *p*-NA 标准曲线的建立 从图 1 中可以看出, 随着 *p*-NA 浓度的升高, 光密度值也相应增加, 线性方程为 $y=5.1186x+0.245$, 相关系数为 0.9911, 线性程度较高, 说明重氮化衍生的方法完全可以用于检测反应生成 *p*-NA 的量, 本实验线性良好, 故在本实验中取最低实验浓度为检测限。

2.2 缓冲液离子组分对酶促反应的影响 结果见图 2, 离子种类的不同对反应的进行程度有很大影响, 在离子强度相当的情况下, NaCl 的促进能力最强。同时通过这个实验也看出, 随着反应时间的延长, 反应体系光密度值也逐渐增高, 说明酶促反应更加彻底。

2.3 缓冲液成分、缓冲液 pH、反应温度、反应时间及离子强度对酶促反应的影响 由于 HLE 体内反应环境为 pH 7.5, 且相关文献均支持此为最佳 pH 条件^[10], 本实验模拟体内反应环境认为缓冲液 pH

7.5 为最佳反应条件, 故此处省略对缓冲液 pH 条件的讨论。缓冲液成分、反应温度、时间及离子强度的影响见图 3。实验结果表明: 反应时间越长, 反应越充分, 光密度值越高, 其中以 24 h 处光密度值最高(图 3A); 采用 Tris 缓冲液效果比 Hepes 缓冲液好(图 3B); 当 NaCl 溶液的浓度为 1.0 mol/L 时酶促反应进行程度最高(图 3C); 采用 37℃水浴的条件比 25℃水浴反应效果好(图 3D)。因此, 在后续实验中, 我们确立反应的缓冲液为 Tris 缓冲液, 其中含 1.0 mol/L NaCl 溶液, 反应条件为 37℃水浴反应 24 h。

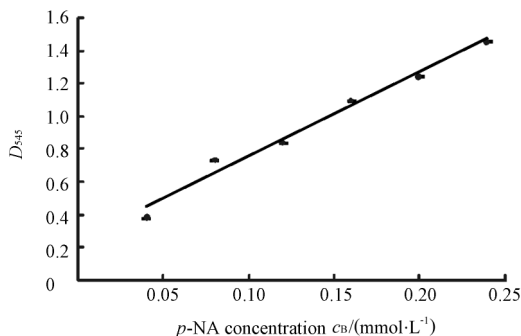


图 1 *p*-NA 标准曲线

Fig 1 *p*-NA standard curve

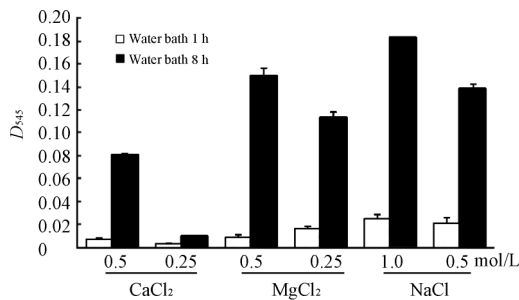


图 2 离子种类对酶促反应的影响

Fig 2 Effects of different buffer ions on enzymatic reaction

$n=3, \bar{x} \pm s$

2.4 底物浓度对酶促反应的影响 不同底物浓度的反应结果见图 4。从图中可以看出光密度值与底物浓度呈良好线性关系, 线性方程为 $y=0.051x+0.187$, 相关系数为 0.9529。底物浓度为 6 mmol/L 时, 既有明显的光密度值, 又不至于浪费试剂。因此, 在后续的抑制剂筛选实验中, 均采用 6 mmol/L 的底物浓度。

2.5 酶量对酶促反应的影响 酶量对酶促反应的影响结果见图 5, 酶加入量在 30 μ l (0.2 U/ml) 左右出现拐点, 说明此时酶浓度已达到饱和, 因此, 在后续的筛选实验中, 加入 30 μ l 酶量 (0.2 U/ml)。

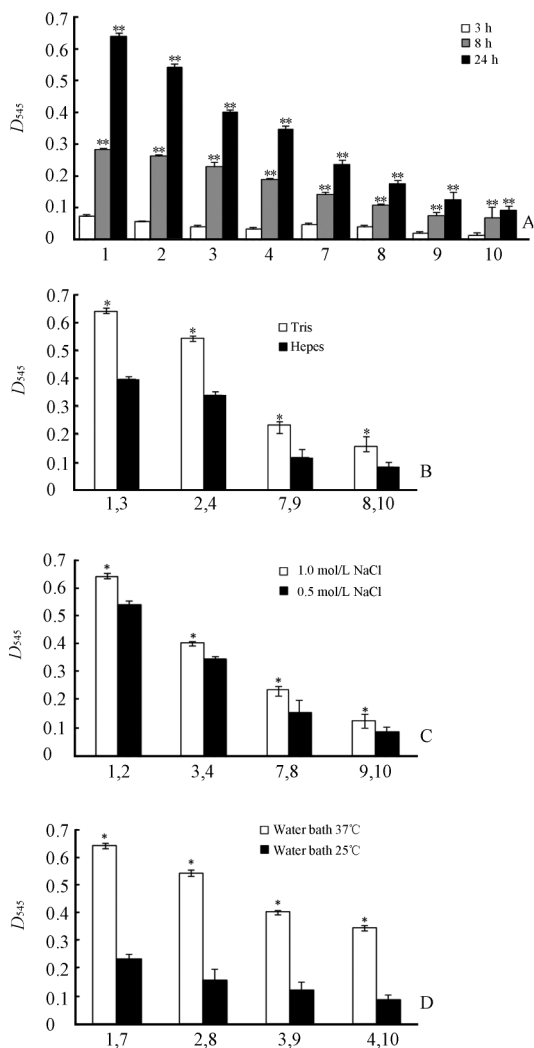


图 3 反应时间及离子强度(A)、缓冲液成分(B)、NaCl 离子浓度(C)、反应温度(D)对酶促反应的影响
Fig 3 Effects of reaction time and ionic strength(A), buffer compositions(B), ionic concentrations(C), and temperatures(D) on enzymatic reaction

1-4, 7-10 was the No. in table 1. A: $** P < 0.01$ vs 3 h group; B: $* P < 0.05$ vs HEPES group; C: $* P < 0.05$ vs 0.5 mol/L NaCl group; D: $* P < 0.05$ vs water bath 25°C group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

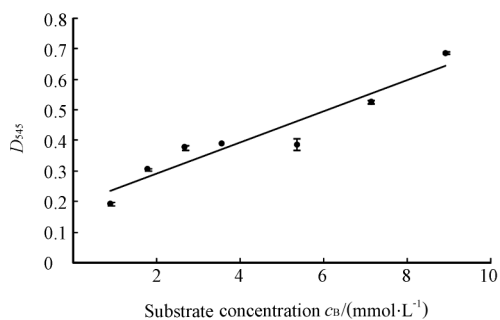


图 4 底物浓度对酶促反应的影响
Fig 4 Effects of substrate concentration on enzymatic reaction

$n = 3, \bar{x} \pm s$

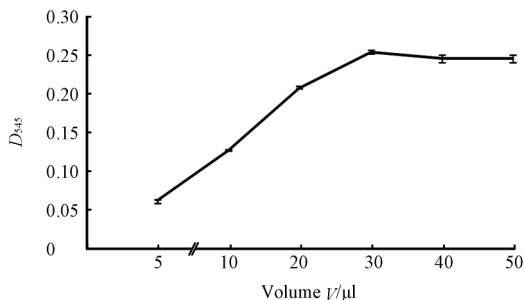


图 5 酶量对酶促反应的影响
Fig 5 Effects of different enzyme volumes(0.2 U/ml) on enzymatic reaction
 $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.6 西维来司钠抑制实验 西维来司钠抑制实验的结果如图 6 所示,从图 6A 中可以看出,进行重氮化后,光密度值比非重氮化组高。从图 6B 中可以看出,随着抑制剂西维来司钠浓度的增加,反应体系的抑制率升高, IC_{50} 为 0.093 4 mg/ml,结果说明该模型的实际应用效果良好。

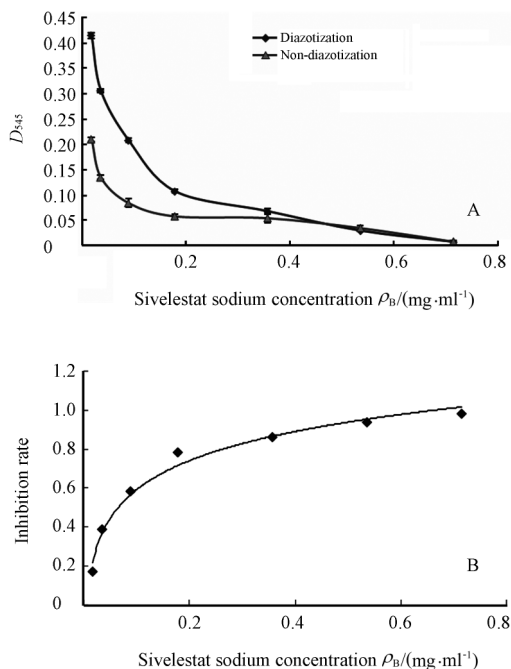


图 6 重氮化组和非重氮化组光密度值的比较(A)以及西维来司钠抑制率与浓度的关系(B)
Fig 6 Comparison of absorbance values between diazotization and non-diazotization groups(A) and relationship of sivelestat sodium concentration with inhibition rate(B)

$n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

HLE 抑制剂作为治疗炎症相关疾病药物和抗

癌药物,目前已经成为药物研发的新热点,尤其近几年来由于流感不能得到有效治疗和艾滋病患者晚期因免疫能力降低而导致严重肺部感染等原因,肺部感染已经成为继心脑血管疾病和癌症之后的另一大致死原因,所以迫切需要低毒、高效的 HLE 抑制剂类药物。目前国内外一些公司已开展了此类药物的研发,抑制剂筛选的模型也有多种^[11]。

目前文献均是利用分光光度法的原理,采用化学标记的底物与 HLE 反应,以 405 nm 处的光密度值直接检测 *p*-NA 的生成量,但在实际应用中,该波长检测灵敏度不够理想,同时由于许多天然产物本身可能具有 405 nm 特征吸收,因而直接测定法易受到待测样品自身颜色的影响而降低测定结果的准确性。

为了解决上述问题,本研究根据 *p*-NA 的化学结构,选择采用重氮化-偶联反应对产物 *p*-NA 进行衍生,即采用含 1.0 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5),其中加入 0.2 U/ml 的 HLE 30 μ l,50 mmol/L 的底物 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 24 h 后进行衍生,使衍生产物的最大吸收波长位于 545 nm。本研究发现,重氮化衍生方法与传统直接测定 *p*-NA 方法的检测下限分别为 0.05 mmol/L、0.16 mmol/L,说明重氮化衍生方法较直接测定 *p*-NA 的方法灵敏度明显提高。同时重氮化衍生方法由于采用 545 nm 波长检测,可以降低待测样品本身颜色对实验结果的影响,从而提高检测的准确性和可信度。因此我们认为重氮化衍生方法较传统直接测定法灵敏度高,准确性、重复性强,是一种稳定的体外高通量筛选 HLE 抑制剂的方法。

[参考文献]

[1] Tremblay G M, Janelle M F, Bourbonnais Y. Anti-inflammatory

activity of neutrophil elastase inhibitors [J]. *Curr Opin Invest Drugs*, 2003, 4:556-565.

- [2] Chen R, Jiang X, Sun D, Han G, Wang F, Ye M, et al. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8:651-661.
- [3] Jayashankar L, Syama Sundar B, Arun Kumar R. Human leukocyte elastase inhibitors: analog based studies to design novel lead compounds for treatment of COPD[J]. *J Biomed Sci Res*, 2010, 2:60-72.
- [4] Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression [J]. *Lancet Oncol*, 2004, 5:182-190.
- [5] Donà M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Della Barbera M, et al. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64:6225-6232.
- [6] Okumura Y, Matsui T, Ogawa K, Uchiya K, Nikai T. Biochemical properties and primary structure of elastase inhibitor AFU-EI from *Aspergillus fumigatus* [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57:803-808.
- [7] Alasbahi R, Melzig M. The *in vitro* inhibition of human neutrophil elastase activity by some yemeni medicinal plants [J]. *Sci Pharm*, 2008, 76:417-483.
- [8] Lestienne P, Bieth J G. Activation of human leukocyte elastase activity by excess substrate, hydrophobic solvents and ionic strength [J]. *J Biol Chem*, 1980, 255:9289-9294.
- [9] Blow A M. Action of human lysosomal elastase on the oxidized B chain of insulin [J]. *Biochem J*, 1977, 161:13-16.
- [10] Quinn D M, Shirai K, Jackson R L, Harmony J A. Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble *p*-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II [J]. *Biochemistry*, 1982, 21:6872-6879.
- [11] 任晓, 郑智慧, 路新华, 董悦生, 林洁, 马瑛, 等. 微生物来源的人白细胞弹性蛋白酶抑制剂 F01-221A 的研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31:458-461.

[本文编辑] 尹茶