

## 重组人乙酰胆碱酯酶体外表达制备及其相关小分子活性筛选\*

孙磊, 李照, 吴怀秀, 李晓丹, 高飞, 钱永常, 王向军\*\*

(浙江农林大学, 林业与生物技术学院中药学科, 杭州 311300)

**摘要** **目的:** 建立重组人乙酰胆碱酯酶 (rhAChE) 抑制剂体外筛选模型, 并应用该模型对中药单体进行抑制剂的初步筛选。**方法:** 运用 pCMV-AChE 表达质粒转染 HEK293 细胞, 通过 DEAE-Sepharose FF 柱纯化酶液, 获得更高纯度和活性的纯化酶, 并建立其活性检测方法, 同时结合 SDS-PAGE 及 Western blot 验证模型成功与否; 以 AChE 的可逆性抑制剂多奈哌齐为阳性药, 运用该模型探究小檗碱、血根碱和蛇根碱对 AChE 的影响。**结果:** 纯化液比活力为  $15.93 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 纯化倍数为 9.63, 酶活回收率为 56%; Western blot 结果显示在  $68 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  附近出现明显的 rhAChE 的单一一条带; 测得纯化后 rhAChE 的  $\text{IC}_{50}$  为  $5.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 明显低于纯化前 ( $14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 3 个不同的化合物对 rhAChE 分别表现出不同程度的抑制作用, 其中小檗碱的  $\text{IC}_{50}$  接近多奈哌齐。**结论:** SDS-PAGE、Western blot 以及多奈哌齐的阳性结果显示利用 pCMV-AChE 转染的 HEK293 细胞成功构建 rhAChE 抑制剂体外筛选模型, 并成功运用于中药单体药物的初筛。**关键词:** 重组人乙酰胆碱酯酶 (rhAChE); 阿兹海默症; HEK293 细胞; 抑制剂; 小檗碱; 筛选模型

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2019) 03-0386-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.03.02

## Expression and preparation of recombinant human acetylcholinesterase *in vitro* and screening of micromolecule for anti-AChE activity\*

SUN Lei, LI Zhao, WU Huai-xiu, LI Xiao-dan, GAO Fei,

QIAN Yong-chang, WANG Xiang-jun\*\*

(Institute of Traditional Chinese Medicine, School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

**Abstract Objectives:** To build a cell-based recombinant human acetylcholinesterase (rhAChE) model for screening of micromolecule for anti-AChE activity *in vitro*. **Methods:** HEK293 cells were transfected with the reconstructed plasmid pCMV-AChE. DEAE-Sepharose FF affinity chromatography was used to obtain higher purity and higher activity of rhAChE. Detection method of rhAChE was also developed. Meanwhile, the recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western-blot. The established detection system of rhAChE activity was applied to explore the effects of berberine, sanguinarine and serpentine with the AChE's reversible inhibitor of donepezil as positive drug. **Results:** Purified enzyme liquid specific activity was  $15.93 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , the purification

\* 浙江省自然科学基金 (LY16H280014); 浙江农林大学科研发展基金 (2012FR080)

\*\* 通信作者 Tel: (0571) 63741827; E-mail: xjwang@zafu.edu.cn

第一作者 Tel: 15068170826; E-mail: sunlei19930227@sina.com

ratio was 9.63, the recovery rate was 56%. Western blot analysis showed that rhAChE strip appeared in the vicinity of  $68 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  obviously. The  $\text{IC}_{50}$  of purified rhAChE was  $5.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , which was lower than that of non-purified ( $14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Three kinds of compounds showed diverse degrees for inhibition of rhAChE. The  $\text{IC}_{50}$  of berberine was almost equal to that of Donepezil. **Conclusion:** The rhAChE inhibitor model was verified with SDS-PAGE, Western-Blot and the ability of activation for Donepezil *in vitro*, which was established by HEK293 cell transfected pCMV-AChE. This model can be used to screen and to evaluate rhAChE natural inhibitor.

**Keywords:** recombinant human acetylcholinesterase (rhAChE); AD; HEK293 cell; inhibitor; berberine; screen model

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 是一种位于胆碱能突触间隙催化水解神经递质乙酰胆碱的关键性酶<sup>[1]</sup>, 可造成乙酰胆碱缺失或活性降低, 导致神经信号传递失败, 从而引起阿兹海默症<sup>[2]</sup> (Alzheimer's disease, AD) 等疾病。随着“胆碱能假说”<sup>[3]</sup>的提出, 利用 AChE 抑制剂阻止突触间隙内乙酰胆碱的降解, 成为近年来设计治疗 AD 用药的主要机理之一<sup>[4]</sup>。因此建立 AChE 抑制剂体外筛选模型, 筛选高效价、低副作用的抑制剂对临床治疗 AD 具有重大意义<sup>[5]</sup>。而如何获得高纯度和高活性的 AChE 对于其抑制剂筛选尤为关键<sup>[6]</sup>。

人们长期利用重组表达的大鼠 AChE 开展抑制剂筛选研究。近年来, 学者们开始运用重组人乙酰胆碱酯酶 (recombinant human acetylcholinesterase, rhAChE) 开展相关研究<sup>[7]</sup>, 以避免一系列不利因素的影响, 更符合临床实际<sup>[8]</sup>, 从而更具研究和应用价值。目前只有少量的天然 AChE 抑制剂被发现, 因此构建高效的 rhAChE 体外筛选模型, 探寻植物源的 AChE 抑制剂也成为治疗 AD 的重要途径。本研究通过优化 rhAChE 制备方案, 建立起 rhAChE 体外筛选模型, 并开展了相关中药化合物的初步筛选, 为探寻具潜在活性的天然药物治疗 AD 提供一种高通量的筛选模型。

## 1 仪器与材料

SW-CJ-2FD HS-840D 超净工作台 (苏州净化公司); AC2-4S1-CN 生物安全柜 (ESCO 公司); MCO-18AC 二氧化碳培养箱 (三洋公司); Multiskan, FC 酶标仪 (Thermo 公司); DMI-3000B 倒置显微镜 (Leica 公司); Trans-Blot 半干转膜仪 (Bio-Rad 公司); PAGE 电泳仪, Mini-PROTEAN Tetra C 电泳槽 (Bio-Rad 公司); 5427R 台式高速冷冻离心机、移液器 (Eppendorf 公司); HHW-420 恒温水浴锅 (常州市仪都仪器有限公司); WTL 掌式离心机 (湖南湘仪

仪器公司); ME204E 精密电子天平 (METTLER 公司); Direct8 Mill-Q 纯水仪 (Millipore 公司); YXQ-LS-S2 灭菌锅 (济南思卓医疗器械厂); 303-3 恒温培养箱 (常州恒隆仪器有限公司); ZWY-2102C 恒温摇床 (上海百典仪器设备有限公司); 馏分收集 CBS-A 程控全自动部分收集器 (上海沪西分析仪器厂)。

HEK293 细胞系 (人胚肾 293 细胞, 浙江大学药学院陈枢青教授赠送); pCMV-AChE 质粒 (浙江大学药学院陈枢青教授赠送); 大肠杆菌菌株 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (本实验室保存); Amp (Amresco 公司); 琼脂糖 (Biowest 公司); 酵母提取物、胰蛋白酶 (OXIOD 公司); DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司); Lipofectamine<sup>TM</sup>2000,  $\beta$ -巯基乙醇 (Invitrogen 公司); 质粒提取试剂盒 (Axygen 公司); 胎牛血清 (PAA 公司); 5 mL 规格细胞培养瓶、100 mm 细胞培养皿 (Corning 公司); 96 孔培养板 (Costar 公司); 碘化硫代乙酰胆碱 (Fluka 公司); DTNB、SDS、TEMED (Sigma 公司); DNA Marker (Fermentas 公司); PVDF 膜 (Sattle 膜材公司); 阴离子交换柱 (DEAE-Sepharose Fast Flow) 亲和层析柱 (Amersham Pharmacia 公司); Anti-AChE antibody、Goat anti rabbit IgG、ECL 发光试剂盒、Tris-HCl 粉剂 (上海生工生物工程有限公司); 多奈哌齐 (批号 30178359, 98%, 上海皓元科技公司); 透析袋 (相对分子质量  $14 \times 10^3$ , 南京森贝伽生物科技有限公司); 蛋白标准品 ( $14.3 \times 10^3 \sim 97.2 \times 10^3$ , 杭州纽龙生物科技有限公司); 小檗碱、血根碱、蛇根碱 (B21379、B21379、B20722, 上海源叶生物科技有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 质粒表达系统构建

制备感受态细胞 E.coli DH5 $\alpha$ , 将 pCMV-AChE

转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 加入 LB 培养基 800  $\mu\text{L}$  摇床培养 1 h, 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液, LB 培养基 50  $\mu\text{L}$  重悬后平铺至 LB 培养板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养倒置培养过夜; 次日挑取单菌落放入 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜, 次日抽提质粒。

**2.2 pCMV-AChE 表达质粒转染及 rhAChE 粗酶液提取**

**2.2.1 HEK293 细胞培养** 培养条件: 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 、饱和湿度、10% 胎牛血清、100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素、DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶, 2~5 d 消化传代。

**2.2.2 pCMV-AChE 质粒转染细胞** 细胞接种: 取对数期生长的 HEK293 细胞  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种至 100 mm 培养皿中, 每个培养皿加入完全培养基 10 mL, 待细胞生长至 70%~80%, 即可转染。

细胞转染: 取 pCMV-AChE 质粒 5  $\mu\text{g}$  加入无血清培养基 500  $\mu\text{L}$  中, 并加入 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染试剂 20  $\mu\text{L}$ , 混匀后静置 15~20 min, 配制成转染液; 取出 HEK293 细胞弃去培养基, 加入无血清培养基 5 mL、转染液 1 mL, 摇匀, 培养 5 h 后取出, 弃去培养液, 加完全培养基 10 mL, 培养箱继续培养。

**2.2.3 粗酶液获取** HEK293 细胞转染后培养 24 h, 弃去培养液, 加入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 2 mL 冲洗, 弃去, 加入无血清培养基 10 mL, 培养 24 h, 收集培养基, 即为粗酶液。

**2.2.4 rhAChE 活性测定** 采用改进的 Ellman 方法<sup>[8]</sup> 检测。使用 96 孔培养板, 反应体系中加入 pH 为 7.4

的 PBS 80  $\mu\text{L}$ 、粗酶液 20  $\mu\text{L}$ 、0.1% 的 DTNB 50  $\mu\text{L}$ , 混匀, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 8 min, 取出, 加入 0.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  底物碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh) 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 18 min, 3% SDS 50  $\mu\text{L}$  终止反应, 412 nm 处测定其吸收度。阴性对照, 加入 pH 为 7.4 的 PBS 30  $\mu\text{L}$ 、收集的粗酶液 20  $\mu\text{L}$ 、0.1% DTNB 50  $\mu\text{L}$ 、3% SDS 50  $\mu\text{L}$ , 孵育 8 min, 加入底物 ATCh ( $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 50  $\mu\text{L}$ , 孵育 18 min, 加入 pH 为 7.4 的 PBS 50  $\mu\text{L}$ , 412 nm 下测定吸收度。

**2.3 rhAChE 的分离纯化**

**2.3.1 透析** 使用分子截止量大小为  $14 \times 10^3$  的透析袋对 rhAChE 粗酶液进行透析。纯水煮沸 60 min, 去除杂质。透析袋内加入待纯化粗酶液 40 mL, 扎紧。放入 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 溶液 400 mL 中, 磁力搅拌 4  $^{\circ}\text{C}$  透析过夜, 期间更换 3 次 Tris-HCl 溶液。透析后放入聚乙二醇中吸水浓缩, 调节 pH 至 7.4, 即为上样液, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**2.3.2 DEAE-Sephrose FF 柱纯化** 装柱: 取 50 mL 柱子, 装凝胶液 30 mL, 20% 乙醇清洗, 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 溶液 10 mL 平衡, 最终柱床体积约 20 mL。

上样: 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液平衡 100 mL, 酶液上样 40 mL。

洗脱: 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.4 Tris-HCl 溶液梯度洗脱, 氯化钠溶液浓度从 0~0.4  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 洗脱液共 400 mL。

收集: 馏分收集器每管收集 4 mL, 即得纯化液。

**2.3.3 rhAChE 活性检测** 步骤同“2.2.4”, 比较粗酶液和纯化酶液活性。结果见表 1。

表 1 纯化前后蛋白酶活性对比

Tab. 1 Enzymatic activity contrast before and after purification

纯化步骤 (procedure of step)	蛋白含量 (total protein)/mg	比活力 (specific activity)/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	酶活性 (enzyme activity)/ U	纯化倍数 (purification fold)	回收率 (recovery)/%
初酶液 (crude enzyme solution)	56.00	0.68	38.00	1	100
DEAE-Sephrose FF 层析 (DEAE-Sephrose FF chromatography)	3.25	6.55	21.28	9.63	56.00

**2.3.4 rhAChE 浓度的测定** 按照 BCA 试剂盒说明书操作 (试管法)。将 BSA 标准品 ( $2 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 试剂盒自带) 分别配制成质量浓度为 1、0.5、0.25、0.125、0.006 25  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  等溶液。将试剂 A 和试剂 B 按 50:1 配制成 BCA 工作液, 混匀。取标准品溶液和待

测纯化液样品分别加入 96 孔板中, 每孔 20  $\mu\text{L}$  (3 组重复), 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  BCA 工作液, 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 25 min。570 nm 处测定吸收度 A, 建立标准曲线, 测定蛋白浓度。

**2.3.5 Western blot 鉴定** 5% 浓缩胶和 10% 分离胶

SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,观察蛋白纯化效果;Western blot 验证蛋白,通过半干转膜法将目的蛋白转至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭,抗体孵育,采用 ECL 发光法鉴定。

#### 2.4 rhAChE 活性测定条件优化

采用改进的 Ellman 法测定 rhAChE 酶的活性,步骤同“2.2.4”项,分别测定不同底物浓度、反应时间及酶浓度的酶活性变化。

**2.4.1 底物浓度对 rhAChE 酶活性的影响** 酶浓度为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 碘化硫代乙酰胆碱配制成  $0$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $400$ 、 $800$ 、 $1\ 600$ 、 $3\ 200$ 、 $6\ 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度,测定酶活性。

**2.4.2 反应时间及不同 AChE 浓度对酶活性的影响** 碘化硫代乙酰胆碱浓度为  $6\ 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , AChE 稀释为  $15.625$ 、 $31.25$ 、 $62.5$ 、 $125$ 、 $250$ 、 $500$ 、 $1\ 000$ 、 $2\ 000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 测定酶活性;反应时间设置为  $10$ 、 $15$ 、 $20$ 、 $25$ 、 $30$ 、 $60$ 、 $120 \text{ min}$ , 测定酶活性。

#### 2.5 rhAChE 筛选模型建立及中药筛选

96 孔板中加入纯化液  $4 \mu\text{L}$ 、酶抑制剂  $20 \mu\text{L}$ 、DTNB ( $0.1\%$ )  $50 \mu\text{L}$ , pH 7.4 PBS 补足至  $150 \mu\text{L}$ , 摇床混匀,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育  $6 \text{ min}$ , 加入  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATCh  $50 \mu\text{L}$ , 继续孵育  $16 \text{ min}$ , 最后加入  $3\%$  SDS 终止反应 ( $n=3$ )。  $412 \text{ nm}$  下检测吸收度  $A$ , 计算化合物的酶抑制率, 以摩尔浓度的负对数和酶抑制率进行线性回归, 求出  $\text{IC}_{50}$  值, 作为天然产物活性成分的抑制活性指标。

酶抑制率 =  $(A_0 - A_1) / A_0$ ,  $A_0$  为未加抑制剂时的  $A_{412}$  值,  $A_1$  为抑制剂浓度为  $I$  时的  $A_{412}$  值。

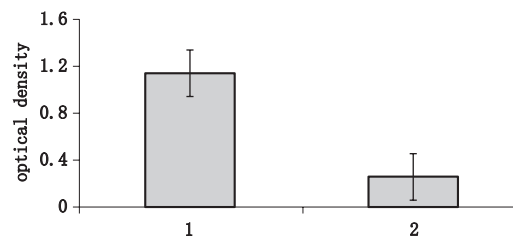
多奈哌齐是 AChE 的可逆性抑制剂, 作为阳性对照, 设置 7 个反应浓度:  $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $40$ 、 $80$ 、 $160 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 测定多奈哌齐的  $\text{IC}_{50}$  值。

据文献报道和临床用药经验, 选择小檗碱、血根碱和蛇根碱<sup>[9-10]</sup> 3 个化合物, 纯度达到  $98\%$ 。依据预试结果确定 7 个不同浓度来测定化合物的  $\text{IC}_{50}$  值, 考察化合物的 AChE 抑制活性。

### 3 结果

#### 3.1 rhAChE 的表达系统建立

检测 pCMV-AChE 质粒转染 HEK293 细胞和未转染 HEK293 细胞的酶活性 (图 1), 结果显示转染 pCMV-AChE 质粒组有较高的酶活性。实验结果表明 pCMV-AChE 转染 HEK293 细胞可实现对 rhAChE 的分泌表达。



1. 转染后 (after being transfected) 2. 未转染 (without being transfected)

图 1 转染 pCMV-AChE 的 HEK293 细胞上清液的酶活

Fig. 1 Enzymatic activity of supernatant of HEK293 with pCMV-AChE

#### 3.2 重组人乙酰胆碱酯酶的纯化

体外表达的 rhAChE 粗酶液经 DEAE-Sephacryl FF 阴离子交换柱纯化后, 检测酶活性和蛋白浓度, 结果如图 2 所示。

检测每管馏分酶活, 根据酶活力测定结果绘制折线图。图 2 表明, 氯化钠溶液浓度的增加, rhAChE 的活性在第 35 管起出现; 第 60 管酶活达到最高; 随后酶活性逐渐下降, 第 97 管活性下降至背景 A;  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液冲洗, 收集检测酶活性, 未检测到乙酰胆碱酯酶活性。

检测每管馏分蛋白浓度, 根据蛋白浓度结果绘制折线图。图 2 表明, 氯化钠溶液浓度的增加, 蛋白逐渐被洗脱下来, 第 15 管馏分出现第 1 个蛋白峰; 第 30 管处出现第 2 个蛋白峰; 第 60 管处出现第 3 个蛋白峰, 并达到浓度最大。图 2 显示, 第 3 个蛋白峰的出峰位置和乙酰胆碱酯酶活性出峰位置重合, 且酶活性最高处与蛋白浓度最高处一致。由于洗脱液中蛋白浓度较低, 故冻干浓缩后再测定。

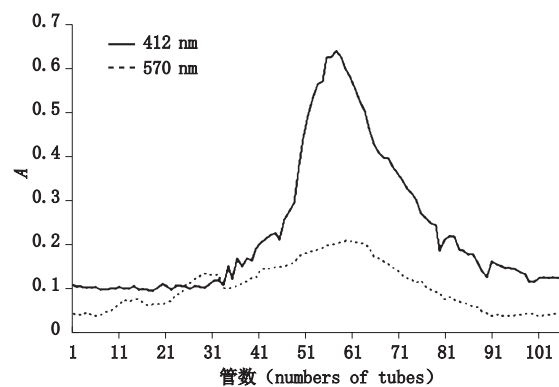


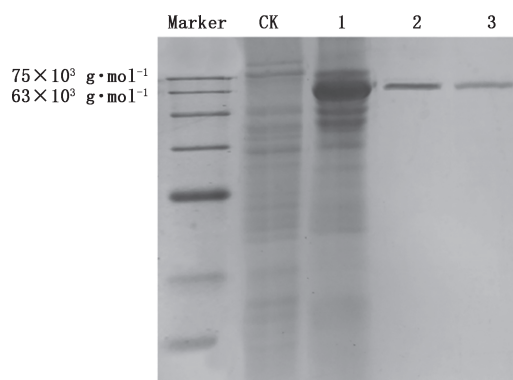
图 2 粗酶液经 DEAE-Sephacryl FF 阴离子交换柱洗脱后的酶活性 ( $412 \text{ nm}$ ) 和蛋白浓度 ( $570 \text{ nm}$ )

Fig. 2 rhAChE protease activity ( $412 \text{ nm}$ ) and protein concentration ( $570 \text{ nm}$ ) after the crude enzyme solution was eluted through DEAE-Sephacryl FF affinity chromatography column



### 3.3 Western blot 结果

**3.3.1 SDS-PAGE** 上样组分别为空白组(无质粒转染组)、转染组、蛋白标品及纯化后蛋白。SDS-PAGE 结果(见图 3)表明,标准品、纯化后蛋白与转染组大量表达蛋白大小一致,分子量约为  $68 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。实验结果可证明,转染组大量表达蛋白、纯化蛋白和标准品的蛋白分子量一致,即该蛋白为乙酰胆碱酯酶。

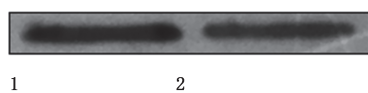


1. 转染组 (transfection group) 2. 蛋白标准品 (protein standard) 3. 纯化后蛋白 (purified protein)

图 3 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE Gel electrophoresis

**3.3.2 Western blot** 将标准品及纯化蛋白 2 个样品,重新跑胶和进行 Western blot 实验,上样量为  $10 \mu\text{g}$ ,实验结果见图 4。研究同样证实了纯化后的蛋白即为乙酰胆碱酯酶。



1. 蛋白标准品 (protein standard) 2. 纯化后目的蛋白 (purified protein)

图 4 Western blot 结果

Fig. 4 The result of Western blot

### 3.4 rhAChE 活性测定条件优化

**3.4.1 不同底物浓度对 rhAChE 活性的影响** 分别以 0、50、100、200、400、800、1 600、3 200、6 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  不同浓度的 ATCh 为底物,检测 rhAChE 在不同底物浓度下的酶活性,结果见图 5。实验结果表明,反应条件一致情况下,随着底物浓度的增加,酶解反应速率也相应上升,且当底物浓度为  $6 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时依旧呈上升趋势。可推测在一定范围内,底物浓度与 rhAChE 酶活性呈正比例关系。结果见表 2。

**3.4.2 不同浓度、不同反应时间对 rhAChE 活性影响** 分别测定 15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000、2 000  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  rhAChE, 反应 10、15、20、

25、30、60、120 min 时的活性,其他反应条件一致,结果见图 6。图 6 显示,当 rhAChE 质量浓度小于  $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,酶活性随着反应时间和酶浓度的增加而增加;但当 rhAChE 质量浓度大于  $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,酶活性达到饱和,即使反应时间和酶浓度变化而酶活不变,且有下降趋势。

由图 6 可知,酶活性达到饱和之前,其线性范围随着反应时间的增加而上升;但在反应时间为 15~20 min 期间, rhAChE 浓度与 412 nm 下的 A 线性关系最好,故选择 15~20 min 作为酶活检测反应时间,可保证酶活性浓度在  $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  内与 A 有良好的线性关系。

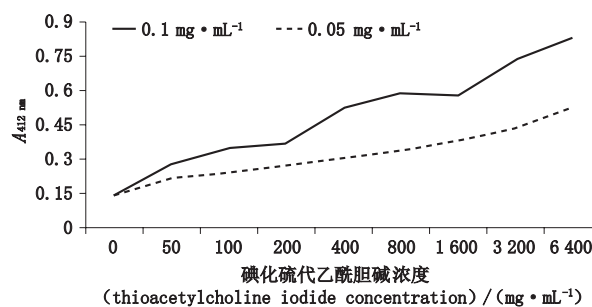


图 5 底物浓度对纯化液 rhAChE 活性的影响

Fig. 5 Effect of ATCh concentration on activity of purified rhAChE

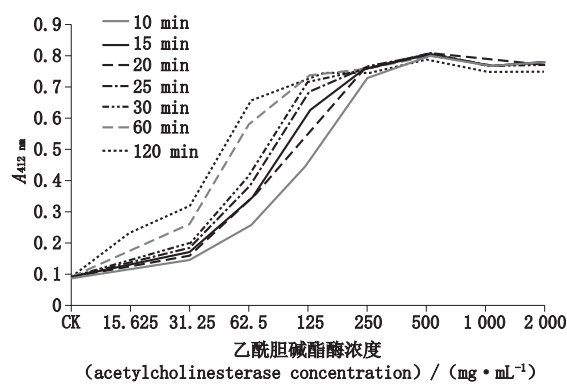


图 6 乙酰胆碱酯酶浓度、时间对纯化 rhAChE 活性的影响

Fig. 6 Effect of concentration time on activity of purified rhAChE

### 3.5 rhAChE 抑制剂筛选模型的建立及其抑制剂的筛选

多奈哌齐作为乙酰胆碱酯酶的可逆性抑制剂,可作阳性药。粗酶液中多奈哌齐的  $\text{IC}_{50}$  值为  $14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;多奈哌齐对 rhAChE 纯化液抑制率的  $\text{IC}_{50}$  值见表 3。

据预实验的结果,选择小檗碱、血根碱和蛇根碱测定其对纯化后的 rhAChE 抑制率,计算出 3 种中药单体对纯化液 rhAChE 的  $\text{IC}_{50}$  值,结果同见表 3。

表 2 rhAChE 时间浓度折线图线性关系

Tab. 2 The linear relationship of the line graph of rhAChE time – concentration relationship

反应时间 (reaction time)/min	线性回归方程 (equation of linear regression)	$r^2$	线性范围 (linearity range) mg/ml
10	$Y=391.2X-178.5$	0.967 0	15–250
15	$Y=407.3X-107.2$	0.997 7	15–250
20	$Y=409.0X-70.50$	0.982 6	15–250
25	$Y=404.1X-2.83$	0.957 4	15–250
30	$Y=396.7X+57.50$	0.933 8	15–250
60	$Y=329.0X+344.0$	0.855 1	15–250
120	$Y=270.6X+549.2$	0.775 7	15–250

表 3 3 个化合物对纯化液 rhAChE 的  $IC_{50}$  值Tab. 3  $IC_{50}$  values of three compounds for rhAChE of purified liquid

化合物 (compound)	分子式 (molecular formula)	$IC_{50}$ for rhAChE/ ( $nmol \cdot L^{-1}$ )
多奈哌齐 (donepezil)	$C_{24}H_{29}NO_3$	$5.0 \pm 0.8$
小檗碱 (berberine)	$C_{20}H_{18}NO_4$	$78.0 \pm 4.0$
血根碱 (sanguinarine)	$C_{20}H_{14}NO_4$	$160.0 \pm 7.0$
蛇根碱 (serpentine)	$C_{21}H_{20}N_2O_3$	$382.0 \pm 15.0$

小檗碱、血根碱和蛇根碱是依据 AD 疾病的治疗经验来选择,它们的分子结构式与多奈哌齐非常相似。实验结果表明,小檗碱、血根碱和蛇根碱对 rhAChE 均表现为一定的抑制效果。其中,小檗碱的  $IC_{50}$  值最为接近多奈哌齐。同时,多奈哌齐对 rhAChE 纯化液的  $IC_{50}$  值为  $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 低于多奈哌齐对粗酶液的  $IC_{50}$  值 ( $14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。由此可见,纯化后 rhAChE 相较于粗酶液具更高纯度及活性,并较为成功地构建了 rhAChE 抑制剂体外筛选模型。

#### 4 讨论

HEK293 细胞表达系统作为 rhAChE 获得及其结构、功能等研究最常用的表达系统,可以快捷、高效、简便的获得和人体相似的 rhAChE,并能翻译后加工和表达具有生物活性的外源蛋白<sup>[11]</sup>。真核细胞所表

达的 rhAChE 的生物活性与人 AChE 性质接近,也是体外 rhAChE 的获得及其抑制剂筛选研究的重大突破,对 AD 药物的研究有积极的影响<sup>[12]</sup>。

随着“胆碱能学说”的提出,人们不断在探寻新的 AChE 抑制剂以治疗 AD<sup>[13-14]</sup>。最近研究表明,在天然产物中寻求副作用小、作用面广、适宜长期服用等特点的 AChE 抑制剂已经成为相关领域研究的热点之一<sup>[15]</sup>。植物来源广泛,药效丰富,可利用价值高,值得更深入地考察有抑制 AChE 活性的植物单体或新型结构衍生物,发掘更高效、更低毒、作用更强的抗 AD 药物<sup>[16]</sup>。本研究基于现有资源,考察了 3 种天然产物小檗碱、血根碱和蛇根碱的 AChE 酶活性抑制作用。小檗碱是黄连生物碱的有效成分之一,已有研究证明其可以抑制许多组织中 AchE 的活性,也有学者采用生物信息模拟技术结合生物学效应,研究小檗碱与 AchE 受体的相互作用<sup>[17]</sup>;血根碱是一种苯菲啶异喹啉类生物碱,主要存在于罂粟科、芸香科等植物中,具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等作用,同时也可抑制 AchE 的活性<sup>[18]</sup>;前期课题组研究发现蛇根碱作为长春花主要有效成分之一,也可抑制 AchE 活性,因此本实验选择了这 3 种小分子活性物质作为研究对象。

虽然体外重组蛋白质获取具有广阔的发展前景,但外源蛋白质在大肠杆菌中高效表达时常形成不可溶、无生物活性的蛋白质聚集物。主要是由于使用高剂量的基因和强启动子而导致高表达造成的,使表达蛋白不具有重组蛋白天然的空间结构从而失去了生物活性,故需要采用适宜的复性方法使重组蛋白进行正确的重折叠,重新获得生物活性。目前的蛋白复性的方法主要有稀释<sup>[19]</sup>、透析<sup>[20]</sup>、超滤、液相色谱<sup>[21]</sup>、反胶束等。因为实验后期还将继续优化 rhAChE 的纯化方法,怎样可以将 AChE 的纯化效率达到最高,不可避免的在 AChE 的粗提液中还混有各种不同来源的干扰性蛋白,因此纯化蛋白的复性研究将在后续开展。

综上所述,本研究运用转染 pCMV-AChE 的 HEK293 细胞表达系统成功获得 rhAChE,并通过 DEAE-Sepharose FF 层析法获取纯度较高、活性较强的 rhAChE。通过优化 rhAChE 活性的检测体系,成功建立了 rhAChE 体外抑制剂筛选模型,并利用该模型对天然化合物开展初筛。为 rhAChE 抑制剂的筛选和研究提供了一种更加便捷、有效的研究工具。

## 参考文献

- [1] 张千,王取南. 乙酰胆碱酯酶生物功能的研究进展及其应用[J]. 国外医学(卫生学分册), 2008, 35(3): 143  
ZHANG Q, WANG QN. Research progress and application of acetylcholinesterase biological function[J]. Foreign Med Sci (Sect of Hyg), 2008, 35(3): 143
- [2] DODART JC, MART RA. Gene delivery of human apolipoprotein E alter brain A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2005, 102(4): 1211
- [3] SCHORDERET M. Alzheimer's disease: fundamental and therapeutic aspects[J]. Experientia, 1995, 51(2): 99
- [4] 张赧彬,宋庆,胡刘岩. 天然产物中乙酰胆碱酯酶抑制剂的研究现状[J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2011, 11(1): 1  
ZHANG YB, SONG Q, HU LY. Research status of acetylcholinesterase inhibitors in natural products[J]. J Shanghai Inst Technol (Nat Sci), 2011, 11(1): 1
- [5] MANIKANDAN K, GEERLOF A, SCHULDT L. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the small subunit of isopropylmalate isomerase (Rv2987c) from mycobacterium tuberculosis[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2009, 65: 136
- [6] JAHNKE U. Therapeutic approaches for Alzheimer's disease[J]. Drugs, 2008, 11(1): 4
- [7] STRITTMATTER WJ. Old drug, new hope for Alzheimer's disease[J]. Science, 2012, 335(6075): 1447
- [8] 王向军,吴怀秀,叶珊珊,等. 重组人乙酰胆碱酯酶的表达及其抑制剂的筛选[J]. 药学学报, 2014, 49(1): 50  
WANG XJ, WU HX, YE SS, et al. Expression of recombinant human acetylcholinesterase and screening of its inhibitors[J]. Acta Pharm Sin, 2014, 49(1): 50
- [9] BERND I, EKKEHARD H. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease[J]. Curr Pharm Design, 2004, 10(3): 231
- [10] 李进东. 银杏叶提取物对老年痴呆症大鼠学习空间学习记忆能力的影响[J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(9): 26  
LI JD. Effect of *Ginkgo biloba* extract on learning and memory ability in Alzheimer's disease rats[J]. Hubei J Tradit Chin Med, 2013, 35(9): 26
- [11] WANG XJ, WU HX, YE SS, et al. Expression of recombinant human acetylcholinesterase and its application in screening its inhibitors[J]. Acta Pharm Sin, 2014, 49(1): 50
- [12] 叶珊珊. 孕烷 X 受体配体筛选模型与乙酰胆碱酯酶抑制剂筛选模型的构建[D]. 杭州: 浙江大学药学院, 2008  
YE SS. Screening Model of Mregnane X Receptor Ligand and Construction of Screening Model for Acetylcholinesterase Inhibitor [D]. Hangzhou: College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, 2008
- [13] SZYMAŃSKI P, OLSZEWSKA P, MIKICIUKOLASIK E, et al. Novel tetrahydroacridine and cyclopentaquinoline derivatives with fluorobenzoic acid moiety induce cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells by activation of DNA damage signaling[J]. Tumour Biol J Intern Socr Oncodevel Biol Med, 2017, 39(3): 1
- [14] NIU B, ZHANG M, DU P, et al. Small molecular floribundiquinone B derived from medicinal plants inhibits acetylcholinesterase activity[J]. Oncotarget, 2017, 8(34): 57149
- [15] 张磊,杨苏蓓. 老年痴呆症发病机制下的治疗药物研究[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(10): 238  
ZHANG L, YANG SB. Study on therapeutic drugs under the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2010, 4(10): 238
- [16] CASTILLO-ORDÓÑEZ WO, TAMAROZZI ER, DA SILVA GM, et al. Exploration of the acetylcholinesterase inhibitory activity of some alkaloids from Amaryllidaceae family by molecular docking in Silico[J]. Neurochem Res, 2017, 42(10): 2826
- [17] 王晨,谭政,邹欣,等. 生物信息模拟及生物学效应结合研究盐酸小檗碱对乙酰胆碱酯酶的抑制作用[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2014, 43(5): 561  
WANG C, TAN Z, ZOU X, et al. Biological information simulation and biological effects combined to study the inhibitory effect of berberine hydrochloride on acetylcholinesterase[J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2014, 43(5): 561
- [18] 李春梅,郁建平. 血根碱对菜青虫几种代谢酶活性的影响[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(3): 463  
LI CM, YU JP. Effects of radix on the activities of several metabolic enzymes of *Pieris rapae*[J]. Chin J Biol Control, 2013, 29(3): 463
- [19] 王莘,井健. 重组人膜联蛋白的尿激酶原融合蛋白衍生物的复性及制备[J]. 北京师范大学学报:自然科学版, 2012, 48(6): 626  
WANG P, JING J. Refolding and preparation of prokaryotic fusion protein derivatives of recombinant human annexin[J]. J Beijing Normal Univ (Nat Sci), 2012, 48(6): 626
- [20] 黄鹏煌,王泽,田海山,等. 重组人成纤维细胞生长因子 8b 原核表达载体的构建和纯化研究[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(1): 14  
HUANG PH, WANG Z, TIAN HS, et al. Construction and purification of recombinant human fibroblast growth factor 8b prokaryotic expression vector[J]. J Chin Biotechnol, 2013, 33(1): 14
- [21] GENG X, WANG L. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs[J]. Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2008, 866(1/2): 133

(本文于 2019 年 1 月 17 日修改回)