

基于大环分子葫芦素的鸟氨酸脱羧酶实时无标记活性分析方法的改进与应用

王静^{1,2}, 刘翔琛¹, 马红艳^{1,2}, 陈强¹, 刘森^{1,2}

1 湖北工业大学 发酵工程教育部重点实验室/细胞调控与分子药物“111”引智基地, 湖北 武汉 430068

2 三峡大学 医学院 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

王静, 刘翔琛, 马红艳, 等. 基于大环分子葫芦素的鸟氨酸脱羧酶实时无标记活性分析方法的改进与应用. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2903-2914.

Wang J, Liu XC, Ma HY, et al. Optimization of a cucurbit[6]uril-based real-time label-free method for analyzing the activity of ornithine decarboxylase. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2903-2914.

摘要: 鸟氨酸脱羧酶 (Ornithine decarboxylase, ODC) 是多胺生物合成途径中的关键酶, 其主要功能是催化鸟氨酸脱羧生成腐胺。在多种疾病和肿瘤细胞中, ODC 的表达水平和催化活性都高于正常细胞, 因此抑制 ODC 的活性是相关疾病预防和治疗的一个潜在途径。ODC 抑制剂的发现和检验依赖于对其催化反应进程的监测, 常采用的途径包括利用高效液相色谱法检测腐胺产量和利用同位素标记法检测二氧化碳的产量等。这些检测方法的繁琐操作和成本极大地限制了其应用, 尤为突出的问题是这些方法很难实现高通量检测和实时检测。文中研究了基于大环分子葫芦[6]脲 (Cucurbit[6]uril, CB6) 与荧光染料 DSMI (Trans-4-[4-(dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium iodide) 的 ODC 酶活实时无标记检测法, 系统分析了其应用范围和局限性, 并对其进行了优化。最后, 利用优化后的方法实现了对不同机制 ODC 抑制剂的活性评价。

关键词: 鸟氨酸脱羧酶, 抑制剂, 实时, 无标记, 酶活检测

Received: September 8, 2020; **Accepted:** November 3, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31670768, 31971150), Hubei Outstanding Youth Foundation of China (No. 2019CFA069), Wuhan Science and Technology Bureau of China (No. 2018060401011319).

Corresponding author: Sen Liu. Tel: +86-27-59590100; E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

国家自然科学基金 (Nos. 31670768, 31971150), 湖北省杰出青年基金 (No. 2019CFA069), 武汉市基础前沿研究项目 (No. 2018060401011319) 资助。

Optimization of a cucurbit[6]uril-based real-time label-free method for analyzing the activity of ornithine decarboxylase

Jing Wang^{1,2}, Xiangchen Liu¹, Hongyan Ma^{1,2}, Qiang Chen¹, and Sen Liu^{1,2}

1 Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education) & National "111" Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

2 Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Medical School of China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

Abstract: Ornithine decarboxylase (ODC) is a key enzyme in the biosynthetic pathway of polyamines and catalyzes the decarboxylation of ornithine to produce putrescine. Inhibition of ODC activity is a potential approach for the prevention and treatment of many diseases including cancer, as the expression levels and the activities of ODC in many abnormal cells and tumor cells are generally higher than those of normal cells. The discovery and evaluation of ODC inhibitors rely on the monitoring of the reaction processes catalyzed by ODC. There are several commonly used methods for analyzing the activity of ODC, such as measuring the yield of putrescine by high performance liquid chromatography, or quantifying the yield of isotope labelled carbon dioxide. However, the cumbersome operation and cost of these assays, as well as the difficulty to achieve high-throughput and real-time detection, hampered their applications. In this work, we optimized a real-time label-free method for analyzing the activity of ODC based on the macromolecule cucurbit[6]uril (CB6) and a fluorescent dye, DSMI (trans-4-[4-(dimethylamino) styryl]-1-methylpyridinium iodide). Finally, the optimized method was used to determine the activities of different ODC inhibitors with different inhibition mechanisms.

Keywords: ornithine decarboxylase, inhibitor, real-time, label-free, enzyme activity analysis

多胺 (主要指腐胺、精脒和精胺) 是一类在几乎所有细胞中都存在的天然有机小分子, 它们对细胞的正常生长至关重要, 在细胞发育、蛋白质合成与功能、DNA 氧化性损伤、细胞增殖和分化等^[1-4]多种细胞活动中发挥功能。在细胞内, 生物合成、分解代谢和跨膜运输三者协同作用, 维持胞内多胺浓度的稳定, 从而保障细胞的正常功能^[5]。研究发现, 多胺生物合成速率的上升和细胞内多胺浓度的增加在多种肿瘤细胞中都有出现, 因此多胺生物合成途径是肿瘤治疗的潜在靶标^[6-8]。鸟氨酸脱羧酶 (Ornithine decarboxylase, ODC) 是一种磷酸吡哆醛 (Pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 依赖性酶, 它催化鸟氨酸脱羧成腐胺, 后者为精脒和精胺的合成提供原料^[9]。ODC 是多胺生物合成途径的第一个限速酶, 其活性与多种组织中 DNA 合成和细胞增殖的速率呈正相关^[10]。因此, ODC 被认为是治疗多种癌症的潜在靶点, 而

ODC 抑制剂的发现也成为研究热点。 α -二氟甲基鸟氨酸 (α -difluoromethylornithine, DFMO) 是 ODC 的不可逆自杀性抑制剂, 该化合物被催化脱羧并与 ODC 形成不可逆共价结合, 从而抑制 ODC 活性^[11]。磷酸吡哆基-鸟氨酸 (N-(4'-pyridoxyl)-ornithine (BOC)-OMe, POB) 是 ODC 的共价辅酶-底物加合物, 是一种基于过渡态原理发现的 ODC 非共价抑制剂^[12]。多年的研究^[11-12]发现, 虽然 DFMO 和 POB 抑制 ODC 活性的机制不同, 但是两者在体外和细胞水平都能显著抑制 ODC 的活性。遗憾的是, DFMO 和 POB 迄今都还没有在肿瘤的临床治疗上得到应用, 因此新的 ODC 抑制剂的发现将具有重要潜在价值。

为了筛选、比较和评价 ODC 抑制剂, 建立方便、有效的 ODC 酶活检测方法具有重要意义。目前, 较常用于 ODC 酶活检测的方法有同位素标记法^[13]、分光光度检测法^[14]、高效液相色谱法^[15]

等, 其原理都是通过检测产物的生成量来反映 ODC 的活性。然而, 同位素标记法和高效液相色谱法的样品制备烦琐、成本较高, 而分光光度法的灵敏度较低, 这些缺点限制了这些方法的应用范围。更为重要的是, 这些方法都很难实现对反应进程的实时监测, 也很难应用于抑制剂的高通量筛选。近年来, Nilam 等^[16]运用超分子偶联酶法^[17]建立了一种 ODC 酶活性的无标记连续荧光检测法, 该方法利用大环受体葫芦[6]脲 (Cucurbit[6]uril, CB6) 和荧光染料 DSMI (Trans-4-[4-(dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium iodide) 组成的报告对进行实时检测。适量的 DSMI 可与 CB6 结合产生荧光信号。在反应过程中, ODC 酶促反应的产物腐胺与 CB6 有更高的亲和力, 因此其竞争性置换与 CB6 结合的 DSMI, 引起荧光信号降低。这种方法提供了一种简单、廉价、灵敏且无标记的方法来实时监测 ODC 的酶促反应, 可能具有更为广泛的应用前景。

为了探讨 Nilam 等^[16]的方法 (本文简称为 ODC-CB6 法) 在 ODC 抑制剂发现与评价中的应用价值, 我们在本研究中对该检测方法进行了系统分析, 发现该方法虽然能够检测 DFMO 的抑制能力, 但并不能检测 POB 的抑制效果。因此, 我们对 ODC-CB6 法进行了条件优化, 建立了具有更广泛适用范围的改进方法 (简称为 ODC-CB6-opt 法)。最后, 利用 ODC-CB6-opt 法定量分析了我们近期发现的一种新型 ODC 多功能抑制剂的抑制效果。本研究建立的 ODC-CB6-opt 法将对 ODC 抑制剂的筛选和评价具有重要价值。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、甘氨酸 (广州赛国生物科技有限公司); DSMI、CB6、腐胺、二硫苏糖醇

(DTT) (美国 Sigma 公司); L-鸟氨酸、磷酸吡哆醛 (PLP)、Bradford 法蛋白质定量检测试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司); 乙二胺四乙酸 (EDTA)、吐温-80、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl (中国国药集团化学试剂有限公司); DFMO (美国 MCE 公司); POB (德国 MERCK 公司); 黑色 96 孔板 (德国 Greiner Bio-One 公司); 透明 96 孔板 (3599) (美国 Corning 公司); Ni-NTA 琼脂糖树脂 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司); 咪唑 (中国上海阿拉丁生化科技股份有限公司); SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (中国上海雅酶生物科技有限公司); 5×SDS-PAGE 上样缓冲液 (中国上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

PHS-2C 精密 pH 计 (中国上海司乐仪器有限公司); 电热恒温培养箱 (DH3600B II 型) (天津市泰斯特仪器有限公司); Synergy H1 多功能荧光酶标仪 (美国 BioTek 公司); 电子天平 (XB 220A) (瑞士 Precisa 公司); 高压均质细胞破碎仪 (AH-1500) (中国苏州安拓思纳米技术有限公司); Sephacryl S-200 HR 层析柱 (美国 GE 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制

配制 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 的缓冲溶液; 用 10 mmol/L Tris-HCl 配制 260 $\mu\text{mol/L}$ DSMI、130 $\mu\text{mol/L}$ CB6、1 mmol/L PLP; 临用前用 10 mmol/L Tris-HCl 配制含 1 mmol/L EDTA、25 mmol/L DTT、1 mmol/L PLP、1%吐温-80 的 ODC-PLP 储备液以及含 1 mmol/L EDTA、25 mmol/L DTT、1%吐温-80 的 ODC 储备液; 用 10 mmol/L Tris-HCl 配制不同浓度的 L-鸟氨酸和腐胺标准品。

1.3.2 光谱检测

使用多功能荧光酶标仪和透明 96 孔板在 460 nm 处检测 DSMI (10 $\mu\text{mol/L}$) 中加入 CB6 (0–6 $\mu\text{mol/L}$) 的吸光度值; 使用多功能荧光酶

标仪和黑色 96 孔板进行 CB6 与 DSMI 的结合荧光测定和之后的酶促反应连续监测, 检测荧光强度时, 使用的滤光片组为激发 485/20 nm、发射 528/20 nm。

1.3.3 结合测定

DSMI (3 $\mu\text{mol/L}$) 中加入 CB6 (0–1 $\mu\text{mol/L}$) 检测其荧光强度; L-鸟氨酸 (0–10 mmol/L) 或腐胺 (0–1 $\mu\text{mol/L}$) 加入到含 CB6 (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 和 DSMI (3 $\mu\text{mol/L}$) 的体系中检测其竞争性荧光强度; 检测体系为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 的缓冲溶液, 检测 ($\lambda_{\text{exc}}=460 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$) 时的荧光强度。

1.3.4 ODC 蛋白的表达与纯化

将人野生型 ODC 序列克隆到 pET28a 载体中, 获得 pET28a-hODC 的质粒, 然后将质粒转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 中。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 用 0.5 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白过表达 6 h 后收集得到菌泥, 并将菌泥用含有 20 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Na_2HPO_4 和 500 mmol/L NaCl (pH 7.6) 的缓冲液重悬后经高压均质细胞破碎机破碎得到粗提取物, 高速离心得蛋白裂解液上清。将蛋白裂解液上清上样至含有 Ni-NTA 琼脂糖树脂填料的重力柱, 使用含有 20 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Na_2HPO_4 和 500 mmol/L NaCl (pH 7.6) 的缓冲液冲洗重力柱以除去杂蛋白。然后用含有不同浓度咪唑 (50、100、150、250、350、500 mmol/L)、20 mmol/L Na_2HPO_4 和 500 mmol/L NaCl (pH 7.6) 的缓冲液进行梯度洗脱, 于 50 mmol/L 和 100 mmol/L 咪唑浓度时得到目的蛋白。接着将所得目的蛋白使用含有 0.1 mmol/L EDTA、20 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L HEPES (pH 7.5) 的缓冲液在 Sephacryl S-200 HR 层析柱中进行进一步纯化, 得到高纯度的目的蛋白。最后用 Bradford 方法测定目的蛋白浓度, 用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析目的蛋白纯度。

1.3.5 酶促反应连续监测

ODC-CB6 法: 将 234 μL 含有 3 $\mu\text{mol/L}$ DSMI、0.5 $\mu\text{mol/L}$ CB6、10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 的溶液加入黑色 96 孔板的孔中并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下平衡 10 min, 然后加入 24 μL 含有 EDTA、DTT、PLP、ODC 和 1% 吐温-80 的 ODC-PLP 储备液, 得到含 0.1 mmol/L EDTA、2.5 mmol/L DTT、0.1 mmol/L PLP、0.1% 吐温-80 和 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (约 19 nmol/L) ODC 的溶液; 最后通过加入 2 μL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 溶液配制的鸟氨酸引发反应, 反应初始体系中鸟氨酸浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。对于含抑制剂的体系, 需将抑制剂与 ODC、PLP 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 40 min 后再进行反应, 并且每个孔终体积为 260 μL 。在开始反应后, 将黑色 96 孔板立即放入酶标仪中, 并以特定的时间间隔记录每个孔的荧光强度 ($\lambda_{\text{exc}}=460 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$)。

ODC-CB6-opt 法: 将 232 μL 含有 6 $\mu\text{mol/L}$ DSMI、2 $\mu\text{mol/L}$ CB6、10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 的溶液加入黑色 96 孔板的孔中并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 10 min, 然后加入 26 μL 不含 PLP 的 ODC 储备液, 得到不含 PLP、其他物质浓度与 ODC-CB6 法相同、ODC 浓度为 4 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (约 77 nmol/L) 的溶液; 最后通过加入 2 μL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 溶液配制的鸟氨酸和 PLP 混合液引发反应, PLP 终浓度为 75 nmol/L , 鸟氨酸最终浓度 2 $\mu\text{mol/L}$ 。对于含抑制剂的体系, 需将抑制剂与 ODC 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 40 min 再进行反应, 每个孔终体积为 260 μL 。在开始反应后, 操作同 ODC-CB6 法。

1.3.6 数据分析

每组实验重复测定 3 次, 结果表示为平均值 \pm 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$), 其中结合常数 K_a 根据 $Y=B_{\text{max}} * X / (1/K_a + X)$ 进行拟合, 米氏常数根据 Michaelis-Menten 方程拟合分析, 而抑制剂的抑制常数 K_i 则根据希尔方程拟合, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 ODC-CB6 法的验证

2.1.1 CB6/DSMI 报告对的表征

葫芦[n]脲 (CB[n], 简称 CB) 及其衍生物由于其特殊的性能被广泛关注, 其中 CB6 对某些生物胺具有较高结合力, 尤其是多胺中的腐胺^[18]。与此同时, CB6 还可与具有紫外吸收的荧光染料

如 DSMI 进行结合^[19]。DSMI 是一种阳离子半菁染料, 与 CB6 结合后在激发光照射下可产生强烈的荧光信号^[20]。结果显示, CB6 的加入不会显著影响 DSMI 在 460 nm 处的吸光度 (图 1A), 但是会使体系产生明显的荧光发射信号 ($\lambda_{\text{exc}}=460$ nm, $\lambda_{\text{em}}=590$ nm), 并且信号强度具有显著的剂量依赖性 (图 1B)。通过 $\lambda_{\text{em}}=590$ nm 处的荧光数值和对

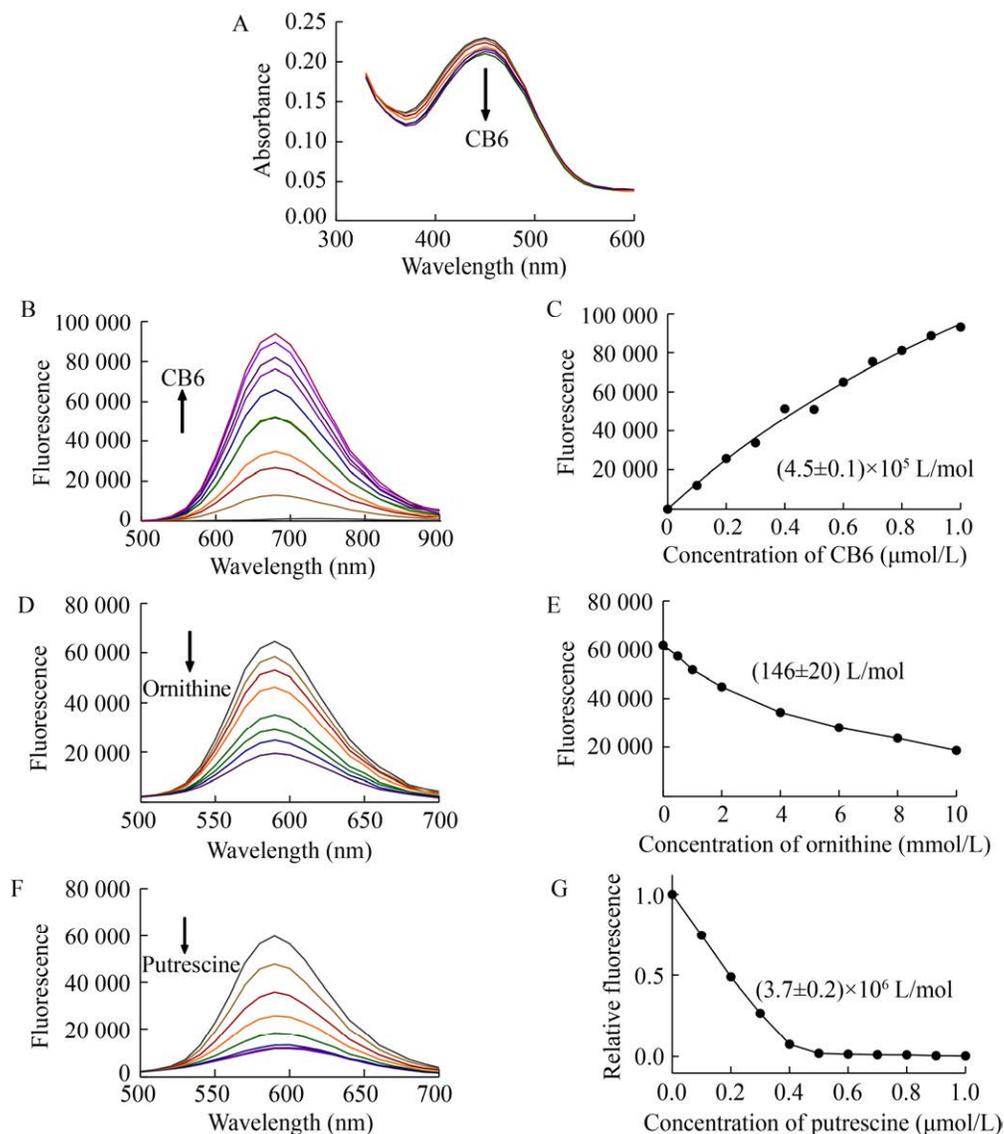


图 1 CB6/DSMI 报告对的表征

Fig. 1 Characterization of CB6/DSMI report pairs. (A) Absorption spectral changes upon addition of CB6 (0–6 μmol/L) to 10 μmol/L DSMI. (B) Fluorescence changes upon addition of CB6 (0–1 μmol/L) to 3 μmol/L DSMI. (C) Binding constant of CB6 and DSMI. (D) Competitive fluorescence intensity of L-ornithine for CB6/DSMI reporter pair. (E) Binding constant of CB6 and L-ornithine. (F) Competitive fluorescence intensity of L-ornithine for CB6/DSMI reporter pair. (G) Binding constant of CB6 and putrescine.

应的 CB6 浓度拟合得到 CB6 与 DSMI 的结合常数 K_a 为 $(4.5 \pm 0.1) \times 10^5$ L/mol (图 1C)。L-鸟氨酸的加入使 CB6/DSMI 荧光强度略有降低, 但浓度依赖趋势不变 (图 1D), 拟合得到 CB6 与 L-鸟氨酸的结合常数 K_a 为 (146 ± 20) L/mol (图 1E)。图 1F 是加入腐胺后 CB6/DSMI 的荧光变化图, 拟合得到 CB6 与腐胺的结合常数 K_a 为 $(3.7 \pm 0.2) \times 10^6$ L/mol (图 1G)。以上结合常数的数据与文献[16]数据相当。这些数据表明, ODC 酶促反应中底物鸟氨酸与 CB6 的结合能力远低于 DSMI 或腐胺与 CB6 的结合能力, 因此对 CB6/DSMI 报告对的影响很微弱。同时, 腐胺与 CB6 的亲合力显著高于 DSMI 与 CB6 的亲合力, 能够竞争性取代与 CB6 结合的 DSMI, 而且腐胺存在时的荧光强度与腐胺的浓度呈线性关系 (在 $0-0.5 \mu\text{mol/L}$ 范围内 $R^2 > 0.99$), 可见 CB6 与腐胺的结合是定

量的。

2.1.2 酶动力学的测定

首先, 我们获得了高纯度的 ODC 蛋白 (51.7 kDa), 接下来, 我们利用 ODC-CB6 法进行了 ODC 酶催化活性的实时监测 (图 2)。如图 2B 所示, 随着 ODC 浓度的增加, 根据荧光强度变化计算得到的 DSMI 被替换速率也更快, 反映出随着酶浓度的增加, 酶初始反应速率也随之增加 (图 2C)。在固定的 ODC 浓度下, 底物鸟氨酸浓度的增加也使 DSMI 的被替换速率加快 (图 2D), 反映出酶初始反应速度对底物浓度具有依赖性。经 Michaelis-Menten 方程拟合分析 (图 2E) 得出 ODC 对鸟氨酸的 K_m 为 $(16 \pm 2) \mu\text{mol/L}$, k_{cat} 为 $(0.36 \pm 0.10) \text{ s}^{-1}$ 。该数据与文献报道数据相当 ($K_m = (24 \pm 1) \mu\text{mol/L}$, $k_{\text{cat}} = (0.12 \pm 0.01) \text{ s}^{-1}$ [16]; $K_m = 80 \mu\text{mol/L}$, $k_{\text{cat}} = 3.3 \text{ s}^{-1}$ [21]), 验证了 ODC-CB6 法的可靠性。

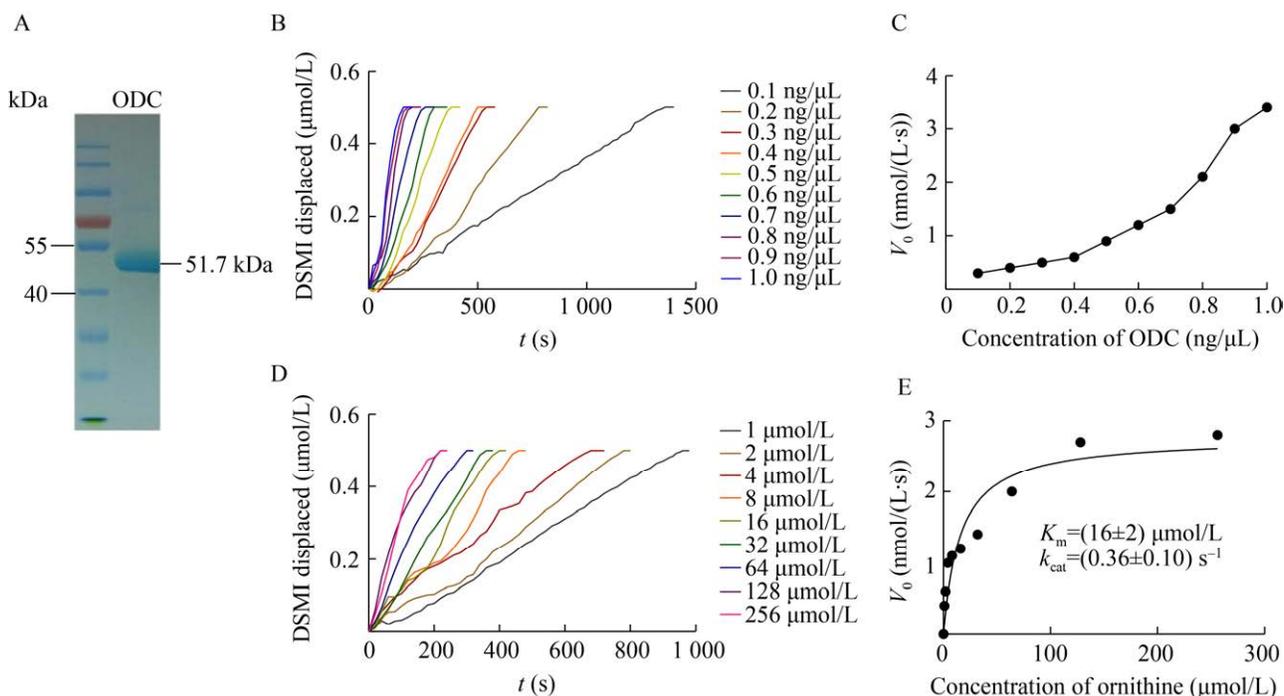


图 2 酶动力学测定

Fig. 2 Determination of enzyme kinetics. (A) Purified ODC. (B) Kinetics of enzymatic reactions with different ODC concentrations (0.1–1.0 ng/μL). (C) Dependence of the initial reaction rate on enzyme concentration (with 200 μmol/L L-ornithine). (D) Kinetics of enzymatic reactions with different ornithine concentrations (1–256 μmol/L). (E) Dependence of the initial reaction rate on substrate concentration (with 1.0 ng/μL ODC).

2.1.3 抑制常数的测定

DFMO 是目前研究最广泛的 ODC 自杀性抑制剂,它在脱羧后与 ODC 活性位点中的半胱氨酸残基形成共价键,从而不可逆地抑制 ODC 活性^[22]。根据上述 ODC-CB6 方法,我们实时检测了在不同浓度 DFMO 存在下 ODC 的酶促反应过程(图 3A),通过拟合荧光曲线获得酶初始反应速度,进一步得到不同浓度 DFMO 的抑制率,拟合得到 DFMO 对 ODC 的 K_i 等于 $(0.45 \pm 0.10) \mu\text{mol/L}$ (图 3B)。该数据与文献[16]中的 K_i 值 $(4.4 \pm 0.2) \mu\text{mol/L}$ 较为接近。因此,ODC-CB6 方法可有效定量评价 DFMO 对 ODC 的抑制能力。

2.2 ODC-CB6 法的应用局限性

2.2.1 鸟氨酸脱羧酶抑制剂 POB 对 ODC 的作用

磷酸吡啶氧基-鸟氨酸(POB)是基于 ODC

的辅酶 PLP 与底物鸟氨酸在反应过程中形成的过渡态复合物而设计的过渡态类似物^[12]。我们使用 ODC-CB6 法检测了 POB (0.25% DMSO) 对 ODC 的抑制作用,但是该方法未能准确反映出 POB 对 ODC 酶活的抑制作用(图 4)。

2.2.2 溶剂 DMSO 对检测体系的影响

在上述实验中我们注意到,DFMO 溶解于水中,而 POB 溶解于 DMSO 中,同时考虑到多数有机分子也常利用 DMSO 进行溶解,因此我们分析了 DMSO 对 ODC-CB6 法的影响。如图 5A 和 5B 所示,随着 DMSO 浓度的增加,体系的荧光强度逐渐减弱。为了分析 DMSO 是否影响对 ODC 抑制剂的评价,我们在 1% DMSO (V/V) 存在下检测了不同浓度 DFMO 对 ODC 的抑制作用。结果显示,虽然 DMSO 会导致体系荧光强度降低且

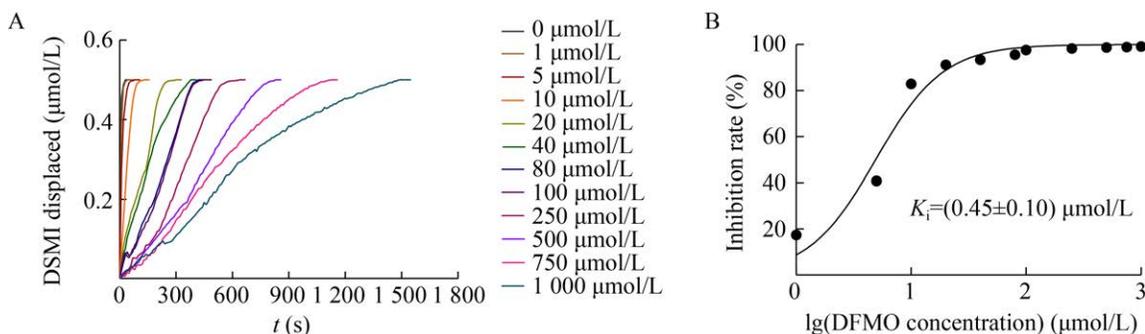


图 3 DFMO 抑制常数的测定

Fig. 3 Determination of the DFMO inhibition constant. (A) Kinetics of enzymatic reaction of ODC in the presence of different concentrations of DFMO (0–1 000 $\mu\text{mol/L}$). (B) Inhibition constant of DFMO.

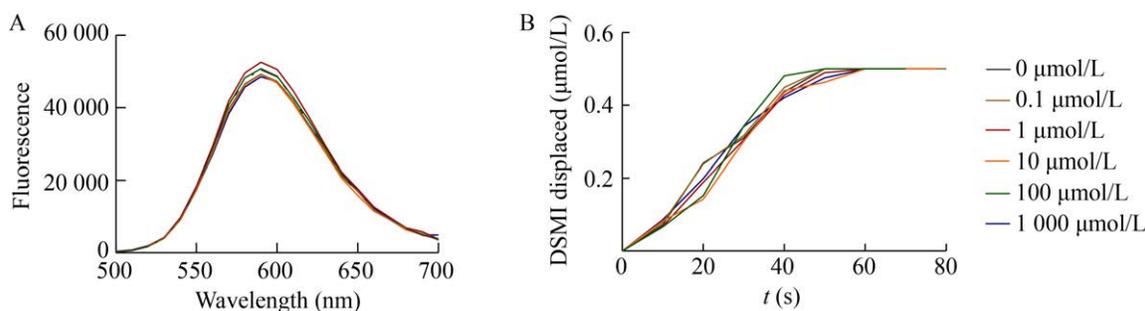


图 4 鸟氨酸脱羧酶抑制剂 POB 对 ODC 的影响

Fig. 4 Effects of ornithine decarboxylase inhibitor POB on ODC. (A) Fluorescence changes upon addition of POB (0–1 000 $\mu\text{mol/L}$) to the CB6/DSMI reporter pair (DSMI: 3 $\mu\text{mol/L}$; CB6: 0.5 $\mu\text{mol/L}$). (B) Kinetics of enzymatic reaction of ODC in the presence of different concentrations of POB (0–1 000 $\mu\text{mol/L}$).

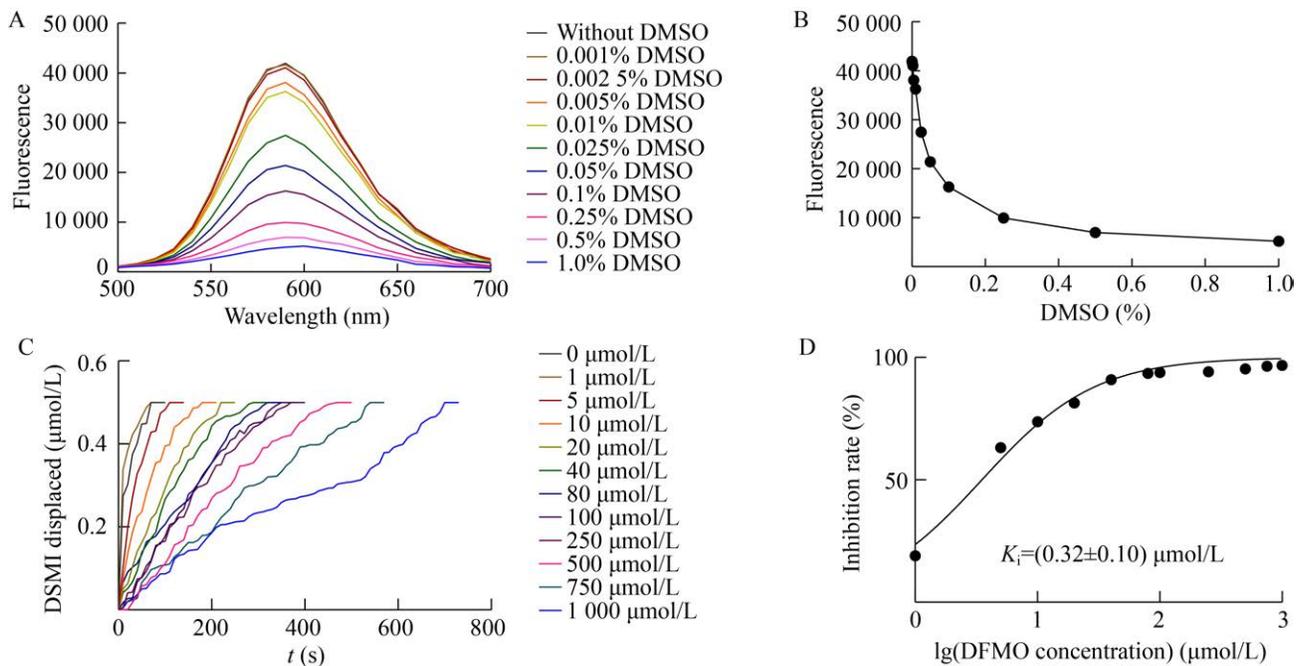


图 5 溶剂 DMSO 对检测系统的影响

Fig. 5 Effect of solvent DMSO on detection system. (A) Fluorescence changes upon addition of DMSO (0–1%) to the CB6/DSMI reporter pair (DSMI: 3 $\mu\text{mol/L}$; CB6: 0.5 $\mu\text{mol/L}$). (B) Fluorescence intensity at $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$ in the presence of different concentrations of DMSO (0–1%). (C) Effects of DFMO at different concentrations (0–1 000 $\mu\text{mol/L}$) on ODC in the presence of 1% DMSO. (D) Inhibition constant of DFMO.

拟合曲线波动增大(图 5C), 但是并不显著影响对 DFMO 抑制作用的定量评价 ($K_i=(0.32 \pm 0.10) \mu\text{mol/L}$) (图 5D)。因此, ODC-CB6 法未能准确反映出 POB 对 ODC 酶活的抑制作用并不是 DMSO 所导致的。

2.3 ODC-CB6 法的优化与应用

2.3.1 DSMI 与 CB6 量的优化

以上实验表明 DMSO 对 DSMI/CB6 检测体系的荧光强度有淬灭作用, 所以为了提高荧光强度, 以增强数据分辨率和稳定性, 我们对体系中 DSMI 和 CB6 的终浓度进行了优化。DSMI 与 CB6 以 1 : 1 的比例进行结合^[20], 因此为使 CB6 饱和, DSMI 的浓度要高于 CB6。为便于小分子抑制剂的评价和筛选, 我们在体系中添加 1% (V/V) 的 DMSO。如图 6 所示, 随着 DSMI 和 CB6 的浓度的升高, 体系的荧光强度随之增强。基于该结果, 同时结合后期 ODC 催化反应的浓度设置区间情况, 我们将 DSMI 的终浓度设定为 6 $\mu\text{mol/L}$,

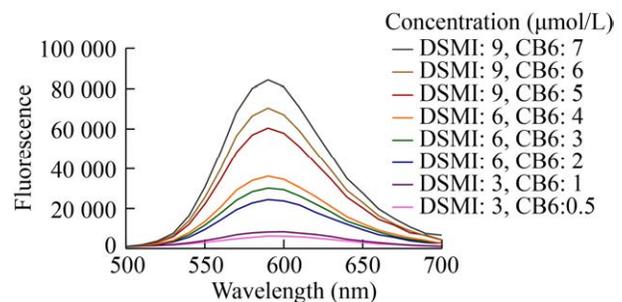


图 6 在 1% DMSO 存在下 CB6/DSMI 的荧光强度

Fig. 6 Fluorescence intensity of CB6/DSMI in the presence of 1% DMSO.

CB6 的终浓度设定为 2 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3.2 ODC、鸟氨酸和 PLP 的量的优化

磷酸吡哆醛 (PLP) 是 ODC 的重要辅因子, 而鸟氨酸是 ODC 的底物^[23]。Nilam 等^[16]提到 PLP 在 DSMI 的激发波长下有一定的光吸收 (在 0.1 mmol/L PLP 时约 0.4), 因此, 在上述优化 DSMI 和 CB6 浓度的基础上, 我们参考分光光度检测法^[14]和高

效液相色谱法^[15],将体系中 PLP 的终浓度调整为 75 nmol/L。同时,按照 ODC:PLP=1:1 的比例将 ODC 的终浓度调整为 4.0 ng/ μ L (约 77 nmol/L)。我们利用优化后的条件实时检测了酶反应对底物浓度的依赖性,并拟合得到鸟氨酸对 ODC 的 K_m 为 (20 ± 3) μ mol/L, k_{cat} 为 (0.14 ± 0.01) s^{-1} (图 7)。该结果与原方法得到的结果 (图 2) 相当。为了在检测过程中可以使 CB6 被腐胺完全饱和,实现荧光值的最大变化量,我们将抑制剂评价时体系中鸟氨酸浓度确定为 2 μ mol/L。为便于区分,将优化后的体系命名为 ODC-CB6-opt 法。

2.3.3 ODC-CB6-opt 法检测 DFMO 和 POB 对 ODC 的抑制作用

为了验证 ODC-CB6-opt 法的可靠性,我们分析了 DFMO 和 POB 对 ODC 的抑制作用。图 8A 为在 1% DMSO 存在时 DFMO 对 ODC 抑制作用的实时检测曲线,结果经拟合得到 K_i 为 (4.94 ± 0.98) μ mol/L (图 8B),该数据与前述 ODC-CB6 法的检测结果相当 (图 3)。由于共价抑制剂的抑制作用具有时间依赖性,因此我们检测了 DFMO 对 ODC 抑制作用的时间依赖 (图 8C)。结果表明,随着孵育时间的延长,DFMO 的抑制效果越好,符合其共价抑制剂的特性。进一步,我们利用 ODC-CB6-opt 法检测了 POB 对 ODC 的抑制作用 (图 8D),并拟合得到其 IC_{50} 为 (15.52 ± 0.49) μ mol/L,

K_i 为 (13.80 ± 0.44) μ mol/L (图 8E),虽没有文献报道 POB 在体外对 ODC 的抑制效果,但 Wu 等^[12]发现 POB 在 LN229 细胞中的 IC_{50} 约 50 μ mol/L。由于 POB 为非共价抑制剂,且其机制与 DFMO 不同,其实时检测曲线不如 DFMO 显著,但该结果明显体现出 ODC-CB6-opt 法比 ODC-CB6 法具有更好的适用范围。

2.3.4 ODC-CB6-opt 法检测 ODC-MPI-1 对 ODC 的抑制作用

近期我们发现了一类新型 ODC 多功能抑制剂,其中最具有代表性的是 ODC-MPI-1^[24]。我们利用 ODC-CB6 法和 ODC-CB6-opt 法对 ODC-MPI-1 的 ODC 酶活抑制能力进行了检测。首先,ODC-MPI-1 不影响 CB6/DSMI 检测体系的荧光信号,表明其不干预 CB6 与 DSMI 的结合 (图 9A)。其次,利用 ODC-CB6 法无法显著检测到 ODC-MPI-1 对 ODC 的抑制作用 (图 9B)。但是,利用 ODC-CB6-opt 法能够明显检测出 ODC-MPI-1 对 ODC 的抑制作用 (图 9C-D)。

3 讨论

多胺的生物合成速率和细胞内多胺浓度与肿瘤的发生密切相关,而 ODC 作为多胺生物合成途径中的重要限速酶,被认为是肿瘤治疗的潜在靶标。DFMO 和 POB 为具有代表性的两种 ODC 抑

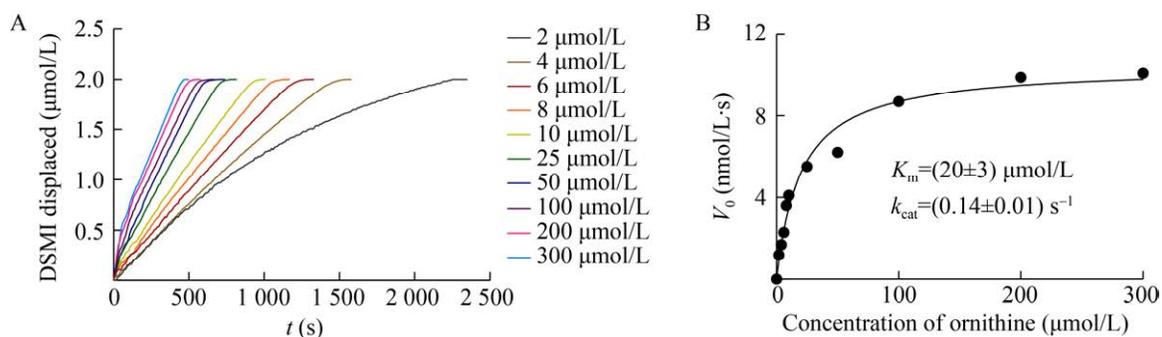


图 7 ODC 的米氏常数

Fig. 7 K_m of ODC. (A) Kinetics of enzymatic reactions with different ornithine concentrations (2–300 μ mol/L). (B) Dependence of the initial reaction rate on substrate concentration (with 4.0 ng/ μ L ODC).

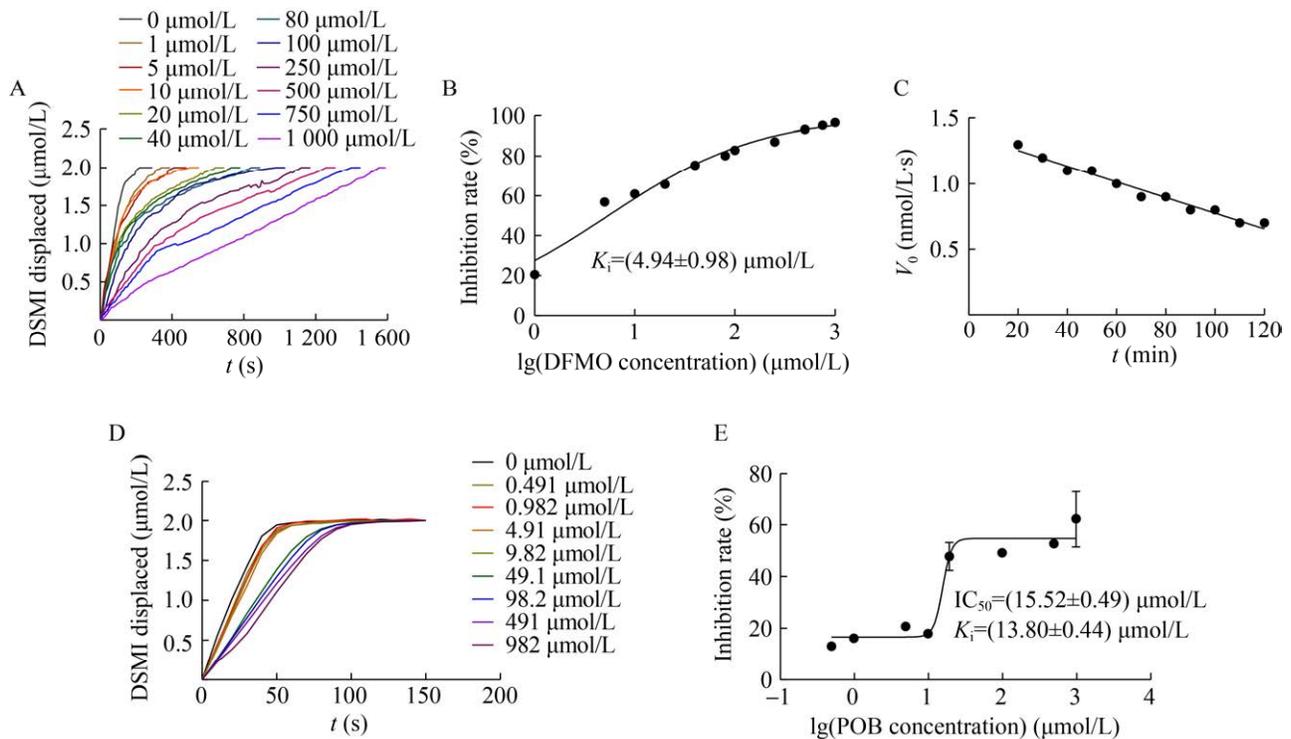


图 8 ODC-CB6-opt 法检测 DFMO 和 POB 对 ODC 的抑制作用

Fig. 8 Using ODC-CB6-opt method to analyze the inhibitory effect of DFMO and POB on ODC. (A) Kinetics of enzymatic reaction of ODC in the presence of different concentrations of DFMO (0–1 000 μmol/L). (B) Inhibition constant of DFMO. (C) Time-dependent decrease of ODC activity with increasing incubation times with DFMO (4.0 ng/μL ODC, 100 μmol/L DFMO). (D) Kinetics of enzymatic reaction of ODC in the presence of different concentrations of POB (0–982 μmol/L). (E) Inhibition constant of POB.

制剂, 其中 DFMO 为底物类似物, POB 为底物与辅酶的过渡态类似物。虽然 ODC 抑制剂暂时还没有在肿瘤的临床治疗中获得应用, 但 DFMO 已被用于多种肿瘤治疗的临床试验中。DFMO 的主要缺点是其有效浓度非常高, 并有不同程度的副作用 (如暂时性失聪)^[25]。因此, 发现新的 ODC 抑制剂具有重要的价值。

高通量筛选是药物发现的一个重要且有效的途径, 但是目前常采用的几种 ODC 活性检测方法具有较大的局限性, 不能有效应用于 ODC 抑制剂的高通量筛选。Nilam 等^[16]提出的 ODC-CB6 法利用超分子偶联酶法建立了一种 ODC 酶活的无标记连续荧光检测法, 其操作流程简单, 实验成本低廉, 也可以高通量进行。但是我们研究发现

ODC-CB6 法的适用范围具有一定的局限性。因此我们在原 ODC-CB6 法的基础上对其进行了优化, 首先调整了 DSMI 和 CB6 的配比组成, 使其可以在 DMSO 的存在下进行灵敏、稳定的检测。其次, 我们调整了 ODC、鸟氨酸和 PLP 的终浓度, 并建立了 ODC-CB6-opt 法。我们的研究表明, ODC-CB6-opt 法可以适应不同机制 ODC 抑制剂 (DFMO 和 POB) 的评价。最后, 我们利用 ODC-CB6-opt 法对本实验室近期发现的一种新型 ODC 多功能抑制剂 ODC-MPI-1 进行了验证。

在使用 ODC-CB6-opt 法检测 POB 和 ODC-MPI-1 的抑制作用时, 荧光曲线比 DFMO 体系的波动大。我们认为可能是由于 DFMO 的作用机制与 POB 和 ODC-MPI-1 不同导致。例如,

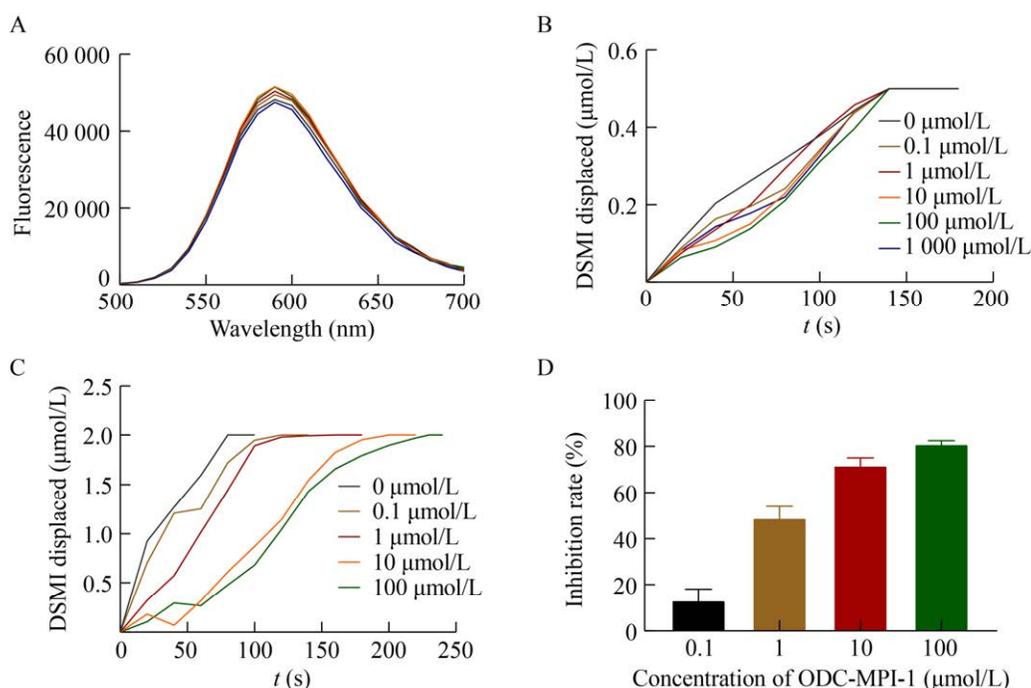


图9 ODC-CB6-opt 法检测 ODC-MPI-1 对 ODC 的抑制作用

Fig. 9 Using ODC-CB6-opt method to analyze the inhibitory effect of ODC-MPI-1 on ODC. (A) Fluorescence changes upon addition of ODC-MPI-1 (0–1 000 $\mu\text{mol/L}$) to the CB6/DSMI reporter pair (DSMI: 3 $\mu\text{mol/L}$; CB6: 0.5 $\mu\text{mol/L}$). (B) ODC-CB6 method to detect the effect of ODC-MPI-1 (0–1 000 $\mu\text{mol/L}$) on ODC. (C) OPT-CB6 method to detect the effect of ODC-MPI-1 (0–100 $\mu\text{mol/L}$) on ODC. (D) Inhibition of ODC by ODC-MPI-1.

DFMO 是共价抑制剂, 其并不影响 ODC 活性二聚体的稳定性, 而 ODC-MPI-1 能够在抑制 ODC 的同时推动 ODC 形成无活性二聚体^[24]。但是, 这种荧光信号的波动并不显著影响对抑制剂效果的评价。同时, 这也暗示该方法有可能可以进一步应用于 ODC 抑制剂作用机制的分析研究。

综上所述, 本研究改进和建立了一种经济、便捷、无标记的 ODC 活性实时检测方法 ODC-CB6-opt 法, 并利用其实现了对多种 ODC 抑制剂的定量评价。该方法未来将有助于新型 ODC 抑制剂的发现和评价。

REFERENCES

- [1] Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 2009, 61(9): 880-894.
- [2] Tanaka H, Takeda K, Imai A. Polyamines alleviate the inhibitory effect of the DNA cross-linking agent mitomycin C on root growth. *Plant Signal Behav*, 2019, 14(11): 1659687.
- [3] Liao CZ, Wang YL, Tan X, et al. Discovery of novel inhibitors of human S-adenosylmethionine decarboxylase based on *in silico* high-throughput screening and a non-radioactive enzymatic assay. *Sci Rep*, 2015, 5: 10754.
- [4] Li JK, Zhang LY, Xiong JW, et al. Polyamines disrupt the KaiABC oscillator by inducing protein denaturation. *Molecules*, 2019, 24(18): 3351.
- [5] Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*, 2003, 376(Pt 1): 1-14.
- [6] Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(10): 781-792.
- [7] Ai YB, Yu LL, Tan X, et al. Discovery of covalent ligands via noncovalent docking by dissecting covalent docking based on a "Steric-Clashes Alleviating Receptor (SCAR)" strategy. *J Chem Inf*

- Model, 2016, 56(8): 1563-1575.
- [8] Zhang Y, Zheng Q, Zhou Y, et al. Repurposing clinical drugs as AdoMetDC inhibitors using the SCAR strategy. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 248.
- [9] Qiu SQ, Liu J, Xing FY. Antizyme inhibitor 1: a potential carcinogenic molecule. *Cancer Sci*, 2017, 108(2): 163-169.
- [10] Murray-Stewart T, Casero RA. Regulation of polyamine metabolism by curcumin for cancer prevention and therapy. *Med Sci (Basel)*, 2017, 5(4): 38.
- [11] Logiudice NL, Le L, Abuan I, et al. Alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of polyamine biosynthesis, as a therapeutic strategy against hyperproliferative and infectious diseases. *Med Sci (Basel)*, 2018, 6(1): 12.
- [12] Wu F, Grossenbacher D, Gehring H. New transition state-based inhibitor for human ornithine decarboxylase inhibits growth of tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(6): 1831-1839.
- [13] Jaenisch S, Squire M, Butler R, et al. *In vitro* development and validation of a non-invasive ¹³C-stable isotope assay for ornithine decarboxylase. *J Breath Res*, 2016, 10(2): 026009.
- [14] Ngo TT, Brillhart KL, Davis RH, et al. Spectrophotometric assay for ornithine decarboxylase. *Anal Biochem*, 1987, 160(2): 290-293.
- [15] Gaboriau F, Havouis R, Groussard K, et al. Measurement of ornithine decarboxylase activity in cell extracts using mass spectrometry detection of dansylated putrescine. *Anal Biochem*, 2005, 341(2): 385-387.
- [16] Nilam M, Gribbon P, Reinshagen J, et al. A label-free continuous fluorescence-based assay for monitoring ornithine decarboxylase activity with a synthetic putrescine receptor. *SLAS Discov*, 2017, 22(7): 906-914.
- [17] Dsouza RN, Hennig A, Nau WM. Supramolecular tandem enzyme assays. *Chemistry*, 2012, 18(12): 3444-3459.
- [18] Rekharsky MV, Ko YH, Selvapalam N, et al. Complexation thermodynamics of cucurbit[6]uril with aliphatic alcohols, amines, and diamines. *Supramol Chem*, 2007, 19(1/2): 39-46.
- [19] Dsouza RN, Pischel U, Nau WM. fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution. *Chem Rev*, 2011, 111(12): 7941-7980.
- [20] Li ZY, Sun SG, Liu FY, et al. Large fluorescence enhancement of a hemicyanine by supramolecular interaction with cucurbit[6]uril and its application as resettable logic gates. *Dyes Pigments*, 2012, 93(1/3): 1401-1407.
- [21] Dufe VT, Ingner D, Heby O, et al. A structural insight into the inhibition of human and *Leishmania donovani* ornithine decarboxylases by 1-amino-oxy-3-aminopropane. *Biochem J*, 2007, 405(2): 261-268.
- [22] Qu N, Ignatenko NA, Yamauchi P, et al. Inhibition of human ornithine decarboxylase activity by enantiomers of difluoromethylornithine. *Biochem J*, 2003, 375(Pt 2): 465-470.
- [23] Kern AD, Oliveira MA, Coffino P, et al. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*, 1999, 7(5): 567-581.
- [24] Chai XY, Zhan JQ, Pan J, et al. The rational discovery of multipurpose inhibitors of the ornithine decarboxylase. *FASEB J*, 2020, 34(9): 10907-12921.
- [25] Lao CD, Backoff P, Shotland LI, et al. Irreversible ototoxicity associated with difluoromethylornithine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(7): 1250-1252.

(本文责编 郝丽芳)