

基于 BODIPY 母核的羧酸酯酶 1 特异性荧光探针底物的设计研发

丁乐乐^{1,2}, 田镇豪¹, 侯洁^{1,3}, 翁仔森³, 崔京南¹, 杨凌², 葛广波^{2*}

(1. 大连理工大学精细化工国家重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 3. 大连医科大学, 辽宁 大连 116011)

摘要: 羧酸酯酶 1 (carboxylesterase 1, CE1) 是哺乳动物体内分布的一种重要的丝氨酸水解酶, 广泛参与多种内外源性酯类化合物 (包括胆固醇酯等内源物, 以及酯类药物及杀虫剂等外源物) 的水解代谢。本研究基于人羧酸酯酶 1 (hCE1) 偏好底物的结构特征, 选取 8-羧酸-BODIPY 为荧光母核, 设计合成了 4 种 BODIPY-8-羧酸酯衍生物, 进而通过单酶筛选和酶抑制实验考察了 hCE1 催化 4 种酯类底物的特异性。研究发现, BODIPY-8-羧酸酯的醇基部分越小, hCE1 对底物的选择性越高, BODIPY-8-羧酸甲酯 (BCM) 和 BODIPY-8-羧酸乙酯 (BCE) 均可以作为 hCE1 的特异性荧光探针底物。在此基础上, 选择了水解速率更快的 BCM 为 hCE1 探针底物, 进一步考察了 BCM 在人肝微粒体 (HLM) 和 hCE1 单酶中的水解动力学, 并借助该底物开展了 hCE1 抑制剂的高效表征研究。研究发现 BCM 在 HLM 和 hCE1 中的酶动力学行为及 K_m 值非常接近, 表明 hCE1 是 HLM 中参与 BCM 水解的主要代谢酶。此外, 抑制剂表征实验表明 BCM 可用于 hCE1 抑制剂的高效筛选与评价, 且可用 HLM 代替 hCE1 单酶进行酶抑制剂的筛选与评价。

关键词: 羧酸酯酶 1; BODIPY 母核; 荧光探针; 特异性; 抑制剂筛选

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0058-08

Design and development of fluorescent probe substrates for carboxylesterase 1 using BODIPY as the basic fluorophore

DING Le-le^{1,2}, TIAN Zhen-hao¹, HOU Jie^{1,3}, WENG Zi-miao³, CUI Jing-nan¹,
YANG Ling², GE Guang-bo^{2*}

(1. State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 3. Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

Abstract: Carboxylesterase 1 (CE1) is an important serine hydrolase in mammals, which involved in the hydrolysis of a variety of compounds (endogenous substrates like cholesterol and xenobiotic compounds like ester-contain drugs and pesticides). This study aimed to design and develop the fluorescent probe substrates for human carboxylesterase 1 (hCE1), on the basis of the structural features of hCE1 preferred substrates. Four carboxylic esters deriving from BODIPY-8-carboxylic acid were designed and synthesized. After then, reaction phenotyping assays and chemical inhibition assays were used to evaluate the selectivity of these four ester derivatives towards hCE1. Our results clearly demonstrated that the substrate specificity of these ester substrates towards hCE1 would be improved with the decrease of the alcohol group on BODIPY-8-carboxylesters, while BODIPY-8-carboxylesters with small alcohol groups including methyl (BCM) and ethyl (BCE) esters could serve as the ideal probe substrates for hCE1. Given that BCM exhibit rapid hydrolytic rate in hCE1, we

收稿日期: 2016-10-17; 修回日期: 2016-12-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302793, 81473181, 21572029); 精细化工国家重点实验室资助项目 (KF1504, KF1408).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-411-84676961, E-mail: geguangbo@dicp.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1004

further investigate the enzymatic kinetics of this fluorescent probe substrate in both human liver microsomes (HLM) and recombinant hCE1, as well as to explore its potential application in high-throughput screening of hCE1 inhibitors by using HLM as enzyme source. The results showed that the kinetic behaviors and the affinity of BCM in HLM is much closed to those in recombinant hCE1, implying that hCE1 played the key roles in BCM hydrolysis in HLM. Furthermore, the inhibition study demonstrated that BCM could be used for rapid screening and characterization of hCE1 inhibitors, by using HLM to replace recombinant hCE1 as enzyme source.

Key words: carboxylesterase 1; boron-dipyromethene; fluorescent probe; specificity; inhibitors screening

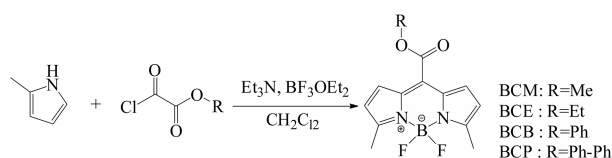
羧酸酯酶 (carboxylesterase, CE, EC 3.1.1.1) 是丝氨酸水解酶超家族的重要成员, 其可有效催化羧酸酯、硫酸酯、氨基甲酸酯和酰胺等多种内源性和外源性化合物的水解^[1, 2]。哺乳动物的 hCEs 依据其氨基酸序列的同源性可分为 5 个家族, 即 hCE1、hCE2、hCE3、hCE5 和 hCE6, 其中在人体主要分布有 hCE1 和 hCE2 两大类羧酸酯酶^[3]。hCE1 和 hCE2 的组织分布和底物特异性存在显著差异。hCE1 主要分布在人体肝脏和脂肪细胞中, 在其他组织 (如肠道中) 的表达量相对较低; 但 hCE2 则主要分布在人肠道中, 同时在肝脏中也有一定的分布^[4-6]。底物偏好性上, hCE1 偏好催化醇基较小和酰基较大底物的水解, 如胆固醇酯和氯吡格雷等; 而 hCE2 则偏好催化醇基较大和酰基较小底物的水解, 如抗肿瘤药物卡培他滨和伊立替康^[7]。

作为人体分布的一种重要的水解代谢酶, hCE1 在维持人体脂质代谢平衡、药物及毒物的代谢清除中发挥不可忽视的作用。hCE1 参与了胆固醇酯和脂肪酸酯等内源性脂类的水解代谢, 是维持脂质代谢平衡的关键代谢酶^[5, 8]。近年来有研究表明, 肥胖和糖尿病患者皮肤细胞中 hCE1 的表达和活性均显著提升, 而 hCE1 强效抑制剂可通过抑制皮肤细胞中 hCE1 的活性减少胆固醇酯的水解, 进而降低血中游离胆固醇和脂肪酸酯的水平并显著改善胰岛素的敏感度^[9, 10]。因此, 研发用于复杂生物体系中 hCE1 抑制剂的高效筛选与评价方法对于以 hCE1 为靶标的新药研发意义重大。另一方面, hCE1 还参与了多种酯类外源物的水解代谢, 如抗血栓药物氯吡格雷、血管紧张素转化酶抑制剂依那普利、血管紧张素受体抑制剂奥美沙坦、3-羟基-3 甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂洛伐他汀、中枢神经系统激活剂哌醋甲酯、麻醉止痛剂哌替啶、抗病毒药物奥司他韦及免疫抑制剂霉酚酸酯等, 以及农用杀虫剂溴氰菊酯等^[2]。临床多药联用以及中西药联合使用等可能通过竞争代谢酶引发潜在的药物-药物相互作用^[11]。因此, 构建 hCE1 相关药-药相互作用的早期评价及预警体系对于指导

酯类药物的临床合理用药具有重要意义。

目前, hCE1 抑制剂的筛选与评价多使用氯吡格雷及奥司他韦等传统探针底物, 其检测灵敏度有限且筛选通量低^[12]。荧光探针底物因其具有检测灵敏度高、操作简单、适于高通量实时检测等优势, 近年来备受生物医药研究领域的关注^[13-16]。因此, 可基于 hCE1 的底物偏好性设计研发 hCE1 的高特异性荧光探针底物, 进而用于复杂生物体系中的 hCE1 活性检测和抑制剂高通量筛选等研究。值得注意的是, 大多数荧光团都具有大羟基的结构, 其成酯后也多为 hCE2 的底物^[14, 16-19]。因此, 近年来国内外多个研究团队都成功研发了 hCE2 的特异性荧光探针底物。但与之相对的是, hCE1 的特异性荧光探针研发极具挑战, 其不仅需要选择含有羧酸基团且体积较大的荧光母体, 还需要考虑羧酸成酯前后荧光属性产生较大的变化, 同时还需要避免人体其他丝氨酸水解酶的参与。

本研究以 8-羧酸-氟硼二吡咯 (boron-dipyromethene, BODIPY) 为荧光母体, 旨在设计研发一种新型的 hCE1 高特异性荧光探针底物, 进而为新药研发及生物医学相关领域提供强有力的工具分子。BODIPY 作为一种常用的荧光母体, 其不仅具有量子产率高、摩尔消光系数高、光稳定性良好和 pH 不敏感等优点^[20-22], 同时其 8-位取代基的吸电子能力强弱能显著影响其紫外吸收和荧光发射波谱。8-羧酸-BODIPY 的 8-位羧基成酯后羧酸酯的吸电子能力增强进而引起荧光发射谱的红移, 而具有强吸电子能力的羧酸酯被酯酶水解后释放出吸电子能力相对较弱的 8-羧酸-BODIPY 后, 产物荧光发射谱会发生蓝移。因此, BODIPY-8-羧酸酯衍生物可作为理想的 hCE1 潜在底物。本研究以 8-羧酸-BODIPY 为荧光母体, 设计合成了 4 种羧酸酯衍生物 (合成路线 1), 借助抑制剂实验和代谢反应表型等实验评估了其特异性, 并从中发现了 2 个 hCE1 的特异性荧光探针底物。在此基础上, 细致开展了其代谢动力学和抑制剂高效筛选等研究。



Scheme 1 The synthetic scheme of BODIPY-8-carboxylesters derivatives. BODIPY: Boron-dipyrromethene

材料与方法

实验材料 人肝微粒体 (human liver microsomes, HLM)、羧酸酯酶 1 (carboxylesterase1, CE1) 和羧酸酯酶 2 (carboxylesterase2, CE2) 购自瑞德肝脏疾病研究有限公司 (上海, 中国), 对氧磷酶-1 (paraoxonase-1, PON1) 和对氧磷酶-2 (paraoxonase-2, PON-2) 购自巴傲得 (明尼苏达, 美国)。丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase, BChE) 和乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 购自西格玛 (密苏里, 美国)。双 (对硝基苯基) 磷酸盐 (*bis-p*-nitrophenyl phosphate, BNPP) 和洛哌丁胺 (loperamide, LPA) 购自东京化成工业株式会社 (日本), 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 和加兰他敏 (galanthamine base, GA), 2-甲基吡咯, 三乙胺及草酰氯酯单甲酯购自百灵威 (北京, 中国)。3-*O*- β -羧丙酰基-乌苏酸 [3-*O*- β -carboxypropionyl]-urs-12-en-28-oic acid, CUA] 为实验室自制, 纯度 98% 以上。色谱分析实验中所用试剂均为色谱纯。

仪器 全自动荧光酶标仪 (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader), 美国 BioTek 公司; 400 MHz 核磁共振仪美国 Bruker 公司; SHIMADZU 超快速高效液相色谱仪 (UFLC) 配有 LC-30AD 高压泵、SPD-20A 紫外/可见光检测器及荧光检测器 (FD), CBM-20A 系统控制器、DGU-20A 真空在线脱气机、SIL-30AC 自动进样器、CTO-30A 柱温箱及 LabSolutions 5.81 数据处理系统, 日本 Shimadzu 公司; 高分辨质谱仪 LTQ Orbitrap XL, 美国 Thermo 公司; Milli-Q 超纯水制备系统, 美国 MILLIPORE 公司。

BODIPY 衍生物的合成 4 种 BODIPY 衍生物的制备工艺参照 Kim 等^[23]报道, 合成工艺如合成路线 1 所示。本研究以 2-甲基吡咯和草酰氯酯单甲酯为起始原料制备 BODIPY-8-羧酸甲酯 (BCM), 同时依照该合成方法制备了 BODIPY-8-羧酸乙酯 (BCE)、BODIPY-8-羧酸苯酯 (BCB) 及 BODIPY-8-羧酸联苯酯 (BCP)。所得产物的纯度经液相色谱-紫外检测仪分析均达到 98% 以上, 其结构经高分辨质谱及核磁鉴定。

单酶特异性筛选 在 100 mmol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中分别加入不同的 BODIPY 酯类衍生物 (底物终浓度为 10 μ mol·L⁻¹), 在 37 °C 下孵育 3 min 后分别加入不同的水解酶 (hCE1、hCE2、AChE、BChE、PON1 和 PON2) 起始反应, hCE1、hCE2、AChE、BChE、PON1 和 PON2 的终浓度分别为 5 μ g·mL⁻¹、5 μ g·mL⁻¹、5 μ g·mL⁻¹、20 U·L⁻¹、0.5 μ g·mL⁻¹ 和 0.5 μ g·mL⁻¹。酶反应体系的总体积为 200 μ L 且 DMSO 的含量为 1%。在 37 °C 下孵育 60 min 后加入冰乙腈 200 μ L 终止反应, 随后取出反应液 150 μ L 在全自动荧光酶标仪上进行产物 8-羧酸 BODIPY 的荧光信号检测, 产物检测条件如下: 激发波长为 505 nm, 发射波长为 560 nm。阴性对照组为未加入任何水解酶的 PBS 体系。

化学抑制实验 以 HLM 为酶源, 分别加入 BNPP (羧酸酯酶的抑制剂)、LPA (CE2 抑制剂)、GA (AChE 和 BChE 抑制剂)、EDTA (PON1 和 PON2 抑制剂) 和 CUA^[24] (hCE1 特异性抑制剂) 测定抑制剂加入组和空白对照组 (PBS) 中 8-羧酸 BODIPY 的荧光信号进而计算出残余酶活。实验步骤如下: 将适量的 HLM 加入到 100 mmol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, 然后加入上述任意一种抑制剂的 DMSO 溶液使抑制剂的终浓度达到 100 μ mol·L⁻¹, 在 37 °C 下混匀后于金属孵育器上预孵 15 min, 最后加入 BODIPY 酯类衍生物起始反应, 反应体系的总体积为 200 μ L 且 DMSO 的含量不超过 1%。在 37 °C 下孵育 30 min 后加入冰乙腈 200 μ L 终止反应, 随后取出反应液 150 μ L 直接在全自动荧光酶标仪上进行目标产物的荧光信号检测, 产物检测条件如下: 激发波长为 505 nm, 发射波长为 560 nm。

hCE1 定量标准曲线绘制 在生理条件下 (pH 7.4、37 °C) 测定了 BCM 和 BCE 两种荧光底物于不同 hCE1 质量浓度梯度 (0、0.5、1、2、4 和 6 μ g·mL⁻¹) 下孵育后产物 8-羧酸 BODIPY 荧光信号的响应。实验操作及目标产物的检测流程可参照单酶特异性筛选部分, 酶反应体系的总体积为 200 μ L 且 DMSO 的含量为 1%。

酶动力学实验 分别以 HLM 和 hCE1 为酶源, 在生理条件下 (pH 7.4、37 °C) 测定 BCM 在不同浓度 (0、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15 和 20 μ mol·L⁻¹) 下水解产物的生成。酶动力学实验的孵育时间控制在 30 min, 以确保底物的转化率低于 10% 且产物的生成速率处于线性范围内。实验操作及目标产物的检测流程可参照单酶特异性筛选部分, 酶反应体系的总

体积为 200 μL 且 DMSO 的含量为 1%。根据反应前后产物荧光值的变化, 通过产物 8-羧酸 BODIPY 的标准曲线 ($Y=17854X+2365$, $R^2=0.995$, $P<0.0001$) 计算出产物的生成速率。以底物浓度 S 为 x 轴, 产物生成速率 v 为 y 轴, 借助 Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, USA) 软件利用如下公式 1 通过非线性回归绘制酶动力学曲线 (包括米氏动力学曲线和 Eadie-Hofstee 图) 并拟合相应的动力学参数 K_m 和 V_{\max} 。

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

抑制剂的高效表征 以 BCM 为探针底物开展 hCE1 抑制剂的高效评价示范研究, 分别选用羧酸酯酶的广谱抑制剂 BNPP 和 hCE1 的高效抑制剂 CUA, 并以 HLM 和 hCE1 为酶源测定了不同抑制剂浓度下 hCE1 的残余酶活力进而计算出相应的半数抑制剂量 (IC_{50} 值)。反应体系的总体积为 200 μL , DMSO 的含量为 1%。具体实验步骤如下: 首先, 将适量的 HLM 或 hCE1 加入到 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, 然后加入不同浓度的抑制剂, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下预孵育 15 min 后加入底物 BCM 起始反应, 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min 后加入冰乙腈 200 μL 终止反应, 随后取出反应液 150 μL 直接在全自动荧光酶标仪上进行目标产物的荧光信号检测, 产物检测条件如下: 激发波长为 505 nm, 发射波长为 560 nm。通过对抑制剂浓度进行对数转换, 以抑制剂浓度的对数值 $\text{Log}C$ 为 x 轴, hCE1 的残余活力为 y 轴, 使用 Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, USA) 通过非线性回归绘制抑制动力学曲线并拟合 IC_{50} 值。

结果

1 生理条件下底物的稳定性

结果显示, 4 种 BODIPY-8-羧酸酯类衍生物在生理条件下 (pH 7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 2 h 后均未见明显降解, 且无任何水解产物生成。但加入 HLM 及 hCE1 后, 4 种 BODIPY-8-羧酸酯类衍生物均可在生理条件下 (pH 7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$) 水解并释放出荧光产物 8-羧酸 BODIPY, 且该水解过程可被有机溶剂 (如乙腈) 终止。以上研究提示 4 种 BODIPY-8-羧酸酯类衍生物在生理条件下不会发生化学水解, 但其可被 hCE1 及含有 hCE1 的 HLM 水解。

2 生理条件下底物的酶催化选择性

为考察 4 种 BODIPY-8-羧酸酯类衍生物的特异性, 首先利用人体分布的丝氨酸水解酶进行了代谢

表型研究。如图 1 及图 2 所示, 4 种 BODIPY-8-羧酸酯类衍生物均可被 hCE1 水解, 但随着 BODIPY-羧酸衍生物醇基部分的逐渐增大, hCE2 开始参与酯类化合物的水解, BCB 和 BCP 的 hCE1 特异性显著降低。其次, 以 HLM 为酶源, 借助 5 种酯酶特异性抑制剂 (BNPP、LPA、GA、EDTA 和 CUA) 对 4 种 BODIPY-8-羧酸酯衍生物在 HLM 中的特异性进行了评价。结果表明, BCM 和 BCE 在 HLM 中的水解过程仅被羧酸酯酶的特异性抑制剂 BNPP 和 hCE1 的特异性抑制剂 CUA 抑制, 而 hCE2 的特异性抑制剂 LPA 并不抑制 BCM 和 BCE 在 HLM 中的水解 (图 2)。而 BCB 和 BCP 在 HLM 中的水解过程可被 hCE2 的特异性抑制剂 LPA 强烈抑制, 提示 hCE2 参与 BCB 和 BCP 的水解。结果显示, BCM 和 BCE 可作为 hCE1 的特异性

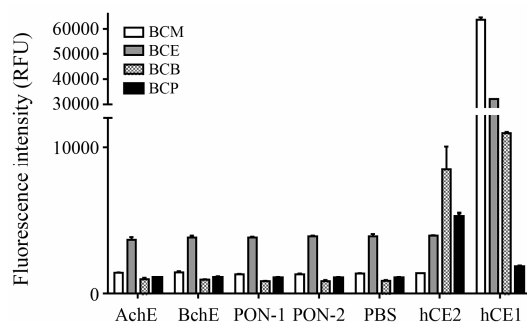


Figure 1 Reaction phenotyping assays of four BODIPY-base fluorescent substrates (BCM: BODIPY-8-carboxylic acid methyl ester; BCE: BODIPY-8-carboxylic acid ethyl ester; BCB: BODIPY-8-carboxylic acid phenyl ester; BCP: BODIPY-8-carboxylic acid biphenyl ester) were incubated with different human serine hydrolase (AChE, BChE, PON1, PON2, hCE1, hCE2) for 60 min. AChE: Acetyl cholinesterase; BChE: Butyryl cholinesterase; PON1: Paraoxonase-1; PON2: Paraoxonase-2; hCE1: Human carboxylesterase 1; hCE2: Human carboxylesterase 2

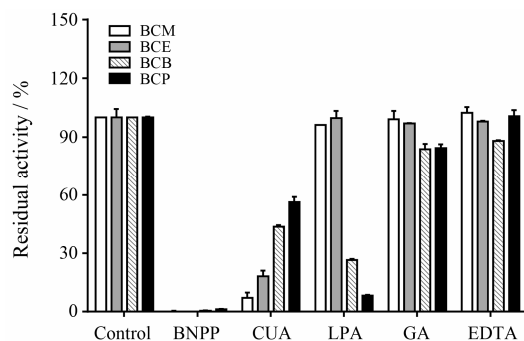


Figure 2 Chemical inhibition assays of four BODIPY-base fluorescent substrates. Five selective inhibitors of various esterases (BNPP, LPA, GA, CUA and EDTA) were used. BNPP: bis-*p*-Nitrophenyl phosphate; CUA: 3- β -*O*-(β -Carboxypropionyl)-urs-12-en-28-oic acid; LPA: Loperamide; GA: Galanthamine base; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

荧光探针底物。

3 hCE1 的定量标准曲线

如图 3 所示, BCM 和 BCE 在水解前后荧光发射光谱会产生显著变化。在生理条件下加入 hCE1 后, BCM 和 BCE 可被 hCE1 快速水解并释放出产物 8-羧酸-BODIPY, 后者在 560 nm 附近产生强烈的荧光信号。因此, BCM 和 BCE 可作为 hCE1 的 OFF-ON 型探针用于该酶的活性检测。分别以 BCM 和 BCE 为 hCE1 的特异性荧光探针底物, 在生理条件下 (pH 7.4, 37 °C) 测定了上述两种荧光底物对不同浓度 hCE1 的线性响应曲线。图 3C 及 3D 显示, BCM 和 BCE 分别与不同浓度 hCE1 孵育 30 min 后 560 nm 处的荧光信号变化, 从中可以看出 BCM 和 BCE 对 hCE1 均具有量好的线性响应 ($R^2 > 0.99$)。BCM 和 BCE 检测 hCE1 的定量下限分别为 0.18 和 0.37 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。上述研究为 hCE1 的活性检测提供了定量基础。

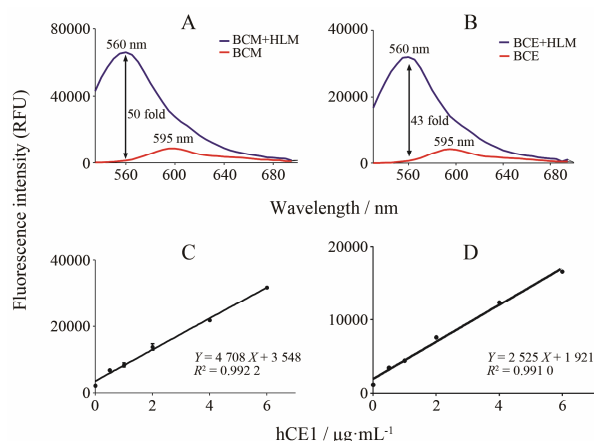


Figure 3 The changes in emission spectrum of BCM (A) and BCE (B) following incubation in human liver microsomes (HLM) for 30 min, and the calibration curves for hCE1 determination by BCM-based assay (C) and BCE-based assay (D)

4 BCM 的酶动力学行为

探针底物的酶动力学行为对于以酶活定量为基础的目标酶活性检测是十分重要的^[25–28]。本研究细致考察了 BCM 在重组 hCE1 和 HLM 中的水解动力学行为。如图 4 所示, BCM 在重组 hCE1 和 HLM 的水解动力学均遵循经典的米氏动力学行为 (Eadie-Hofstee 图呈线性)。BCM 在上述两种酶源中的酶动力学参数如表 1 所示, 从中可以看出, BCM 对 hCE1 具有较高的亲和力 (K_m 值小于 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且 BCM 在重组 hCE1 中的 K_m 值与其在 HLM 中的 K_m 值非常接近, 提示 hCE1 是 HLM 中介导 BCM 水解的主要代谢酶。

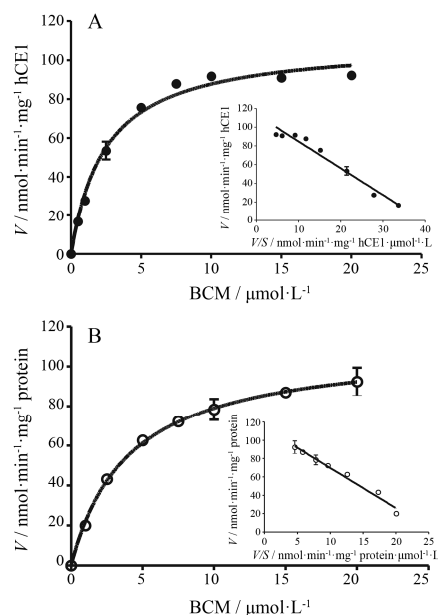


Figure 4 Enzymatic kinetic plots of BCM in both recombinant hCE1 (A) and HLM (B). The corresponding Eadie-Hofstee plot was shown as an insert

Table 1 The kinetic parameters of BCM hydrolysis in both recombinant hCE1 and HLM

Enzyme source	$V_{\max}/\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$CL_{\text{int}}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
hCE1	109.3	2.46	44.43
HLM	110.9	4.04	27.45

5 hCE1 抑制剂的高效表征

结果表明, BCM 在 hCE1 和人肝组织制备物中均有良好的特异性及检测灵敏度, 同时 BCM 水解前后的信号增益倍数可达 50 倍左右。因此, BCM 可作为理想的 hCE1 特异性荧光探针底物, 且有望以 HLM 为酶源开展 hCE1 抑制剂的高效筛选及表征。为此, 本研究以 BCM 为探针底物, 在不同酶源孵育体系中表征了两种 hCE1 强效抑制剂 (BNPP 和 CUA) 对 BCM 水解反应的抑制能力。如图 5 所示, BNPP 和 CUA 可强效抑制对 HLM 及重组 hCE1 中的 BCM 水解, 其抑制行为均呈现剂量依赖型, 且 BNPP 和 CUA 在 HLM 中对 BCM 水解反应的抑制趋势与其在单酶中的趋势完全一致。BNPP 和 CUA 在两种酶源中的半数抑制剂量 IC_{50} 如表 2 所示, 从中可以看出, BNPP 和 CUA 均可强效抑制 hCE1 介导的 BCM 的水解, 其 IC_{50} 值介于 $74\sim 189 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 且 BNPP 和 CUA 在 HLM 中的 IC_{50} 值与其在重组单酶中的 IC_{50} 值高度吻合。以上研究提示可借助 BCM 这一特异性荧光探针底物在组织微粒体层面开展 hCE1 抑制剂的高效筛选及表征。

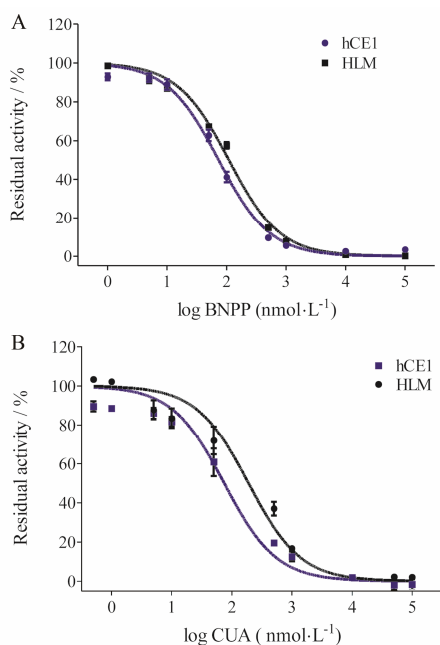


Figure 5 Rapid screening of hCE1 inhibitors in both HLM and recombinant hCE1 using BCM as the probe substrate; ① Dose-inhibition curves of BNPP on BCM hydrolysis in HLM and hCE1; ② Dose-inhibition curves of CUA on BCM hydrolysis in HLM and hCE1

Table 2 The IC_{50} values of BNPP and CUA against BCM hydrolysis in different enzyme sources

Inhibitor	Enzyme source	$IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$
BNPP	HLM	109 ± 3
	hCE1	74 ± 3
CUA	HLM	189 ± 8
	hCE1	75 ± 7

讨论

虽然目前国内外已有许多 hCE1 特异性底物被报道, 如氯吡格雷、依那普利、奥美沙坦、洛伐他汀、利多卡因和胆固醇酯等, 但上述底物及其水解产物的检测往往需要借助液相色谱-质谱联用技术。与传统的液质联用技术相比, 荧光检测具有检测灵敏度高, 操作简单, 适用于高通量检测等优势, 因而备受国内外研究者的关注。然而, hCE1 特异性荧光探针的设计研发才刚刚起步, 前期仅有作者研究组报道了一种苯并噻唑母核的 hCE1 荧光探针, 但其发射波长低于 500 nm, 易受生物基质的干扰^[27, 29]。因此, 有必要研发属性优良的 hCE1 荧光探针用于复杂生物样本中目标酶活性的高效检测。

本研究结合 hCE1 偏好底物的结构特征 (偏好催化醇基较小和酰基较大底物发生水解反应), 以 BODIPY-8 羧酸为母核, 设计合成了 4 种羧酸酯衍生

物。由于这些酯类衍生物都具有 BODIPY-8 羧酸这样的大酰基, 因此均可作为 hCE1 的潜在底物。而本研究也证实了上述 4 种酯类衍生物均可被 hCE1 催化发生水解反应。更为重要的是, 本研究相关结果表明 hCE1 可催化 BODIPY 羧酸酯发生水解反应, 且在 BODIPY 羧酸酯水解的前后荧光信号发生了显著变化, 可通过测量反应前后的荧光信号变化对 hCE1 进行定量。此外, 代谢型实验和化学抑制实验证实了 BCM 和 BCE 对 hCE1 显示出良好的特异性, 但随着 BODIPY-羧酸酯衍生物醇基部分体积的逐渐增大, hCE2 开始参与酯类化合物的水解。因此, BCB 和 BCP 对 hCE1 的特异性显著降低, 尤其是连接联苯基的羧酸酯衍生物 BCP, 其主要代谢酶是 hCE2。上述结果与相关文献报道的羧酸酯酶的底物谱规律一致^[7]。虽然 BCB 和 BCP 对 hCE1 的特异性都很好, 但由于 BCM 的酯基较小因而其更易被 hCE1 水解, 导致其反应速率要高于 BCE 的水解速率。从反应速率来看, BCM 在 hCE1 和 HLM 中的水解速率均高于 BCE 的水解速率 (高 2 倍左右), 提示在羧基团相同的条件下分子量较小的 BODIPY-8-羧酸甲酯更易于被 hCE1 水解。上述结果表明 BCM 在 hCE1 活性的定量检测中显示出更高的灵敏度。

动力学实验证实 BCM 与 hCE1 具有很高亲和力, 且 BCM 在 HLM 中的动力学行为及参数与其在重组 hCE1 中的动力学行为及参数极其接近。结合图 2 显示的酯酶特异性抑制剂的抑制实验结果, 可以看出 BCM 在 HLM 中的水解完全是 hCE1 催化的。上述结果提示可以 BCM 作为特异性探针底物, 在肝组织微粒体层面筛选 hCE1 的抑制剂。因此, 进一步在 HLM 层面开展了 hCE1 抑制剂的高效表征研究。研究发现两种酯酶抑制剂 (BNPP 和 CUA) 在 HLM 中对 BCM 水解的抑制趋势与其在单酶中的趋势完全一致, 且半数抑制剂量 IC_{50} 值也非常接近。该结果提示, 未来可选用组织或细胞制备物开展 hCE1 抑制剂的高效筛选与评价。考虑到 hCE1 抑制剂可降低血中游离胆固醇和脂肪酸酯的水平并显著改善胰岛素的敏感度, 研发高效安全的 hCE1 抑制剂有望给肥胖和糖尿病患者带来福音。此外, 食品和中药中可能也存在 hCE1 抑制剂, 其与氯吡格雷、依那普利和奥美沙坦等 hCE1 代谢的临床药物共服时, 有可能通过抑制 hCE1 的活性改变上述药物的药代动力学行为进而影响其治疗效果。因此, 未来可借助 hCE1 特异性荧光探针底物开展 hCE1 相关的药-药相互作用快速评价及预警研究。

综上所述, 本研究基于 hCE1 偏好催化醇基较小

和酰基较大底物发生水解反应这一特征, 以 BODIPY-8 羧酸为母核, 设计合成了 4 种羧酸酯衍生物。借助体外人源单酶筛选及化学抑制实验发现了两种 hCE1 特异性荧光探针底物 BCM 和 BCE, 但 hCE1 对 BCM 具有更高的水解速率。进一步研究发现 BCM 具有良好的检测灵敏度和酶动力学行为, 可用于复杂组织微粒体样本中 hCE1 的活性检测, 以及 hCE1 抑制剂的高通量筛选与评价。此外, 本研究所发现的 hCE1 荧光探针底物 BCM 及其匹配的高通量检测方法还可用于 hCE1 相关的生物分析、药物发现、临床药理学及毒理学等研究。

References

- [1] Teruko I, Masakiyo H. Prodrug approach using carboxylesterases activity: catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue [J]. *J Pestic Sci*, 2010, 35: 229–239.
- [2] laizure SC, herring V, witbrodt K, et al. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance [J]. *Pharmacotherapy*, 2013, 33: 210–222.
- [3] Homes RS, Wright MW, Laulede SJF, et al. Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins [J]. *Mamm Genome*, 2010, 21: 427–441.
- [4] Imai T, Taketani M, Shii M, et al. Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 1734–1741.
- [5] Ross MK, Crow JA. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2007, 21: 187–196.
- [6] Zhang W, Xu G, McLeod HL. Comprehensive evaluation of carboxylesterase-2 expression in normal human tissues using tissue array analysis [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002, 10: 374–380.
- [7] Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs [J]. *Molecules*, 2008, 13: 412–431.
- [8] Wang DD, Jin Q, Zou LW, et al. A bioluminescent sensor for highly selective and sensitive detection of human carboxylesterase 1 in complex biological samples [J]. *Chem Commun*, 2016, 52: 3183–3186.
- [9] Dominguez E, Galmozzi A, Chang JW, et al. Integrated phenotypic and activity-based profiling links Ces3 to obesity and diabetes [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 113–121.
- [10] Marrades MP, González-Muniesa P, Martínez JA, et al. A dysregulation in CES1, APOE and other lipid metabolism-related genes is associated to cardiovascular risk factors linked to obesity [J]. *Obes Facts*, 2010, 3: 312–318.
- [11] Satoh T, Hosokawa M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998, 38: 257–288.
- [12] Zhu HJ, Wang XW, Gawronski BE, et al. Carboxylesterase 1 as a determinant of clopidogrel metabolism and activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 334: 665–673.
- [13] Qian XK, Wang P, Xia YL, et al. A highly selective fluorescent probe for sensing activities of catechol-*O*-methyltransferase in complex biological samples [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2016, 231: 615–623.
- [14] Jing Q, Feng L, Wang DD, et al. A two-photon ratiometric fluorescent probe for imaging carboxylesterase 2 in living cells and tissues [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 28474–28481.
- [15] Dai ZR, Ge GB, Feng L, et al. A highly selective ratiometric two-photon fluorescent probe for human cytochrome P450 1A [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 14488–14495.
- [16] Lv X, Ge GB, Feng L, et al. An optimized ratiometric fluorescent probe for sensing human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and its biological applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 72: 261–267.
- [17] Liu ZM, Feng L, Hou J, et al. A ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of human carboxylesterase 2 and its application in living cells [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2014, 205: 151–157.
- [18] Jin Q, Feng L, Wang DD, et al. A highly selective near-infrared fluorescent probe for carboxylesterase 2 and its bioimaging applications in living cells and animals [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 83: 193–199.
- [19] Feng L, Liu ZM, Xu L, et al. A highly selective long-wavelength fluorescent probe for the detection of human carboxylesterase 2 and its biomedical applications [J]. *Chem Commun*, 2014, 50: 14519–14522.
- [20] Loudet A, Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties [J]. *ChemRev*, 2007, 107: 4891–4932.
- [21] Jiao LJ, Wu YY, Ding Y, et al. Conformationally restricted Aza-Dipyromethene Boron Difluorides (Aza-BODIPYs) with high fluorescent quantum yields [J]. *Chem-Asian J*, 2014, 9: 805–810.
- [22] Yang XD, Zhang XF, Lu XL et al. Red fluorescent monobenzo-BODIPY dyes: solvent effects on spectra and efficient fluorescence quenching by quinones and phenols [J]. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2015, 297: 39–44.

- [23] Kim SW, Kim HJ, Choi YD, et al. A new strategy for fluorogenic esterase probes displaying low levels of non-specific hydrolysis [J]. *Chem-Eur J*, 2015, 21: 9645–9649.
- [24] Yang L, Ge GB, Zou LW, et al. the inhibitory effect of ursolic acid inhibitors in neutral cholesterol ester hydrolase and its application: CN, 201610866559.1 [P]. 2016-9-30.
- [25] Aleksandra J, Lauren EJ, Kamilla M, et al. SERS-based monitoring of the intracellular pH in endothelial cells: the influence of the extracellular environment and tumour necrosis factor- α [J]. *Analyst*, 2014, 140: 2321–2329.
- [26] Feng L, Liu ZM, Hou J, et al. A highly selective fluorescent ES IPT probe for the detection of human carboxylesterase 2 and its biological applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 65: 9–15.
- [27] Liu ZM, Feng L, Ge GB, et al. A highly selective ratiometric fluorescent probe for *in vitro* monitoring and cellular imaging of human carboxylesterase 1 [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 57: 30–35.
- [28] Ge GB, Ning J, Hu LH, et al. A highly selective probe for human cytochrome P450 3A4: isoform selectivity, kinetic characterization and its applications [J]. *Chem Commun*, 2013, 49: 9779–9781.
- [29] Wang DD, Jin Q, Hou J, et al. Highly sensitive and selective detection of human carboxylesterase 1 activity by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1008: 212–218.