

PARP-1 体外活性测定方法的建立及其应用

陈 蕴, 杨雪丽, 周海燕, 黄 超, 王文龙, 龚笑海, 冯柏年, 金 坚*

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 建立 PARP-1 的体外活性测定方法并对 84 个具有潜在 PARP 抑制活性的化合物进行筛选。从 Sf9 昆虫细胞中提取酶液, 以 NAD^+ 为底物, DNA 为激活剂, 建立 PARP-1 的活性测定方法; 以高通量技术参数评价此方法, 用已知 PARP 抑制剂进行验证, 并以此方法进行 PARP 抑制剂的筛选。结果显示, 确定的酶促反应体系为: $12.5 \text{ nmol/L NAD}^+$, $15 \text{ }\mu\text{g/mL DNA}$, $6.25 \times 10^{-4} \text{ U PARP-1}$ 。评价 Z' 因子为 0.76, S/B 值为 3.58。基于此模型筛出 47 个化合物在浓度 $7.4 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 时对 PARP-1 的抑制率达到 60% 以上。表明所建立的 PARP-1 活性测定方法, 适用于 PARP-1 抑制剂的高通量筛选。

关键词: 多聚二磷酸腺苷核糖基聚合酶-1; 活性测定; 抑制剂; 高通量筛选

中图分类号: Q 556.2; R 965.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)03—0324—06

Establishment and Application of Enzymatic Assay for Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1

CHEN Yun, YANG Xueli, ZHOU Haiyan, HUANG Chao,
WANG Wenlong, GONG Xiaohai, FENG Bainian, JIN Jian*

(School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To establish an enzymatic assay for poly (ADP-ribose) polymerase-1 and screen PARP inhibitors from 84 potential compounds. Crude PARP-1 was extracted from Sf9 insect cells. With nicked DNA as activator, PARP-1 was used to catalyze the hydrolysis of the substrate NAD^+ , the RFU value measured from the remaining NAD^+ was used to evaluate the activity of PARP-1 or efficiency of PARP inhibitors. A 96-microwell screening method was set up by optimizing the reaction system. The screening method was assessed with high throughput index, such as Z' factor, signal to back ground (S/B) and validated by well-known PARP inhibitors such as PHE, DPQ and AZD2281. 84 compounds were assayed for PARP inhibition through the established method. The enzymatic reaction system was optimized as: $12.5 \text{ nmol/L NAD}^+$, $15 \text{ }\mu\text{g/mL DNA}$, $6.25 \times 10^{-4} \text{ U PARP-1}$. The Z' factor is 0.76, S/B is 3.58 and the IC_{50} of PHE, DPQ and AZD2281 is 562.4 nmol/L , 369.6 nmol/L and 6.8 nmol/L . There are 47 compounds showed 60% or more PARP-1 inhibition efficiency at the concentration of $7.4 \text{ }\mu\text{mol/L}$. An enzymatic assay of PARP-1 was successfully established. It can be effectively applied to high-throughput screening for PARP inhibitors.

Keywords: poly(ADP-ribose) polymerase-1, enzymatic assay, inhibitors, high-throughput screening

收稿日期: 2014-04-14

作者简介: 陈 蕴(1972—), 女, 上海崇明人, 工学硕士, 讲师, 主要从事药理学研究。Email: chenyun72@126.com

* 通信作者: 金 坚(1960—), 男, 浙江东阳人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物设计与分子药理学研究。E-mail: jinjian31@126.com

PARP(Poly (ADP-ribose) polymerase,聚 ADP核糖基聚合酶)是一种参与翻译后修饰的核蛋白质,能催化 β -NAD⁺脱去烟酰胺生成 PAR (poly (ADP-ribose)),与多种接受体蛋白质形成酯键连接,进而影响多种细胞过程。至今已发现 18 种 PARPs,其功能各异也有交叉,参与 DNA 修复、转录控制、基因稳定和细胞死亡和转化等过程^[1-2]。

PARP-1 参与细胞内 90%以上的聚 ADP-ribose 作用,在糖尿病并发症、动脉粥样硬化、感染性休克、关节炎等疾病过程中发挥重要作用^[3-4]。此外,PARP-1 因与其产物 PAR 参与 DNA 碱基切除修复过程,PARP 抑制剂在肿瘤治疗中成为联合用药及放射增敏的有效选择^[5]。虽然 Pfizer 开发的 PARP 抑制剂 AG014699 在 2003 年首先联合 Temozolomide 用药进入癌症治疗的临床研究^[6],但至今仍未有正式上市的 PARP 抑制剂,这些都为 PARP 抑制剂的相关研究和研制,提供了有效的参考价值^[7]和可能的广阔市场前景。

中国药科大学^[8]和北京协和医学院药物研究所曾在多种中药及天然药物中筛选 PARP-1 抑制剂,但 PARP-1 的制备和体外筛选方法的建立仍制约着新型 PARP 抑制剂在我国的研究和发展。作者所在实验室前期已成功利用杆状病毒/昆虫细胞进行 hPARP-1 的高表达^[9],解决了 PARP-1 的制备问题。如何利用获得的 PARP-1 建立灵活稳定的 PARP 抑制剂高通量筛选方法,即是本课题研究中拟解决的关键问题。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

表达 PARP-1 的 Sf9 昆虫细胞由作者所在实验室保存,筛选样品由江南大学药学院冯柏年教授提供。Deoxyribonucleic acid from calf thymus Type XV, Activated, 购于 Sigma 公司;NAD⁺氧化型辅酶 I, Roche 公司产品;96 孔白板,Corning Costar 公司产品;AZD2281 (Ku-0059436,Olaparib),购于 Selleck 公司;其他化学试剂均为国药集团分析纯。

所用荧光化学发光微孔板读数仪型号为 Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL。

1.2 方法

1.2.1 PARP-1 制备 1 000 g 离心 5 min 收集细胞,弃上清液,用裂解液(25 mmol/L Tris-HCl,

10 mmol/L EDTA,50 mmol/L 葡萄糖,1 mol/L NaCl,质量分数 0.02% Tween-20,0.5 mmol/L PMSF,pH 8.0)重悬细胞。冰浴超声破碎,15 000 g、4 ℃离心 40 min,收集上清液,低温透析将裂解液置换为存储液(25 mmol/L Tris-HCl,200 mmol/L NaCl,1.5 mmol/L BSA,质量分数 1% TritonX-100,体积分数 50%甘油,pH 8.0),活性测定后分装保存于-80 ℃冰箱。

1.2.2 NAD⁺的转化反应原理 NAD⁺在碱性条件下与苯乙酮反应后,与过量的甲酸经加热反应转化为高荧光活性物质,通过测定生成物的荧光值来检测反应物 NAD⁺的量^[10]。利用反应缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L MgCl₂,pH 8.0)将 NAD⁺稀释成不同浓度,以每孔 30 μ L 加入 96 孔板,每个浓度 4 个复孔,于室温条件下轻微振荡 15 min;加入 10 μ L 2 mmol/L KOH 和 10 μ L 体积比 1/5 的苯乙酮-乙醇,4 ℃/25 ℃反应 5~15 min;加入 50 μ L 体积分数 88%甲酸(终体积分数为 44%),110 ℃反应 5 min;室温平衡 10~40 min,荧光化学发光分析仪检测,激发波长 355 nm,发射波长 460 nm。RFU:Relative Fluorescence Units,相对荧光单位。

1.2.3 PARP-1 活性测定原理 PARP-1 被 DNA 激活后以 NAD⁺为底物进行催化反应,通过测定剩余 NAD⁺的量,可检测出 PARP-1 消耗的 NAD⁺的量,从而反映出 PARP-1 的相对活性。将 PARP-1 与 DNA 以不同浓度混合至 20 μ L,加入 40 μ L NAD⁺(终浓度为 12.5 nmol/L),每个浓度 4 个复孔,只含有 DNA 的为空白对照,不含 PARP-1 的为阴性对照,含 PARP-1 的为试验组,室温轻微振荡 15 min;加入 20 μ L 2 mmol/L KOH 和 20 μ L 体积比 1/5 的苯乙酮-乙醇,4 ℃反应 10 min;加入 100 μ L 体积分数 88%甲酸,110 ℃反应 5 min;室温平衡 30 min,荧光化学发光分析仪检测。相对酶活力

$$X_{\text{rea}} = \frac{\text{RFU}_{\text{negative}} - \text{RFU}_{\text{test}}}{\text{RFU}_{\text{negative}} - \text{RFU}_{\text{blank}}} \quad (1)$$

酶活性单位:12.5 nmol/L NAD⁺与酶在 15 μ g/mL DNA 激活作用下于室温反应 15 min,1 min 内转化 1 μ mol/L NAD⁺所需的酶用量定义为 1 U。

1.2.4 PARP-1 抑制剂高通量筛选方法评价 Z' 因子是用来评估高通量筛选模型的一种重要技术参数,当 Z' > 0.5 时才认为该模型是可行的,Z' 因子越接近 1.0,表明该模型的可靠性和可行性越高^[11]。可

根据公式(2)计算:

$$Z' = 1 - \frac{3(SD_{sig} + SD_{back})}{|M_{sig} - M_{back}|} \quad (2)$$

式(2)中:SD 为标准差;M 为平均值;“sig”体系:不加 PARP-1, 只含 12.5 nmol/L NAD⁺和 15 μg/mL DNA;“back”体系:12.5 nmol/L NAD⁺, 15 μg/mL DNA, 6.25×10⁻⁴ U PARP-1。按照上述反应条件取多个孔的数据进行计算分析。信号本底比(S/B)反映的是筛选模型获得的数据与本底数据之间的距离。一般情况下,信号本底比的数值应大于 3^[12],其计算公式为

$$S/B = M_{sig} / M_{back} \quad (3)$$

1.2.5 化合物的 PARP-1 抑制活性测定 所有测定样品由 DMSO 溶解并配制成 10 mmol/L。化合物适当稀释后以每孔 4 μL 加入 96 孔板,PARP-1 和 DNA 混合后以反应缓冲液补足至 16 μL, 加入 40 μL NAD⁺(终浓度:12.5 nmol/L NAD⁺, 15 μg/mL DNA, 6.25×10⁻⁴ U PARP-1), 3 个复孔, 室温轻微振荡 15 min;后续步骤同 1.2.3。只含 NAD⁺和 DNA 的为阴性对照组,只含 NAD⁺、DNA 和 PARP-1 的为阳性对照组,含化合物的为试验组。抑制率

$$R = \frac{RFU_{test} - RFU_{positive}}{RFU_{negative} - RFU_{positive}} \quad (4)$$

以 GraphPad Prism 5.0 计算 IC₅₀。

1.2.6 数据分析 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析,其中 * 表示 $p < 0.05$; ** 表示 $p < 0.01$; *** 表示 $p < 0.001$ 。

2 结果与讨论

2.1 NAD⁺反应条件的确定

NAD⁺与苯乙酮在 4 ℃作用 10 min, 时间较短, 温度难以控制, 为了解该步骤对最终结果的影响, 对该反应条件的温度和时间分别进行探索。图 1(a) 是 NAD⁺浓度在 0~100 nmol/L 时, 与苯乙酮在 4 ℃或 25 ℃条件下反应 10 min 的结果, 测得 RFU 值并无差异, 表明此反应中温度对结果并无影响, 为减少苯乙酮的挥发, 后续实验选择 4 ℃作为反应温度。图 1(b) 是 0~100 nmol/L NAD⁺与苯乙酮在 4 ℃条件下作用不同时间的结果, NAD⁺浓度较高时, 反应 5 min 与反应 10 min 的 RFU 值显示出一定的差异, 而 10 min 与 15 min 时的无差异, 由此表明该浓度范围内的 NAD⁺与苯乙酮在 10 min 内即可反应完

全, 后续实验确定 10 min 为反应时间。NAD⁺与苯乙酮反应后, 需要加入终体积分数 44% 的甲酸, 于 110 ℃反应 5 min, 然后室温平衡后测定。为得到稳定的结果, 实验探索了平衡时间对 RFU 值的影响, 结果如图 1(c) 所示, NAD⁺浓度为 12.5 nmol/L 时, 反应平衡 30 min 后 RFU 逐渐趋于稳定, 后续实验以 30 min 作为平衡时间。

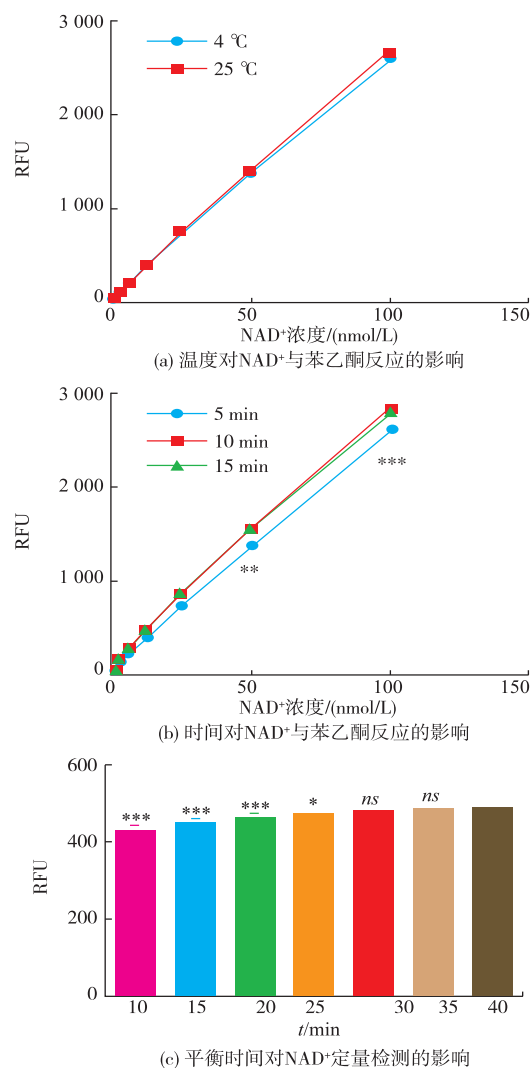


图 1 NAD⁺的化学定量反应条件

Fig. 1 Reaction conditions of NAD⁺ conversion

2.2 底物 NAD⁺浓度的确定

为减少后续实验误差, 将酶反应体系扩大至 60 μL, 测定 NAD⁺浓度的标准曲线以选择底物用量。结果见图 2, NAD⁺浓度在 0.1~100 nmol/L 时与 RFU 值呈良好的线性关系, 实验中测得不含 NAD⁺的空白组 RFU 值为 5.0±0.2, 选取 RFU 值 500±20 为后续实验的阴性值, 此时信噪比为 100, 可有效减

少背景值对实验结果的影响,相对应的 NAD^+ 浓度即 12.5 nmol/L 作为底物工作浓度。

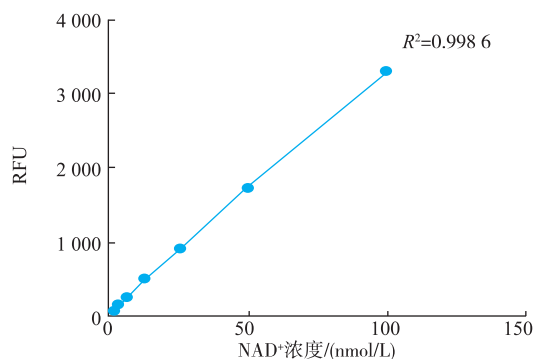


图 2 底物 NAD^+ 与 RFU 值的线性关系

Fig. 2 NAD^+ concentration is in a linear relationship with fluorescence intensity

2.3 激活剂 DNA 浓度的确定

以 12.5 nmol/L NAD^+ 作为底物,通过优化 DNA 浓度以提高 PARP-1 对 NAD^+ 的催化作用,结果见图 3,选取 3 个不同的 PARP-1 用量,随着 DNA 浓度的增加,PARP-1 的活性不断增加,但在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 达到最高值,继续增加 DNA 浓度 PARP-1 活性并无提高,为确保反应中 PARP-1 的最高活性,选取 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 DNA 的工作质量浓度。

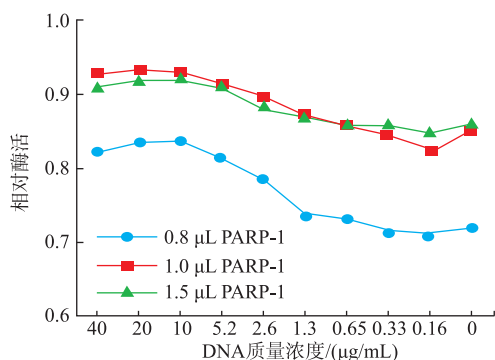
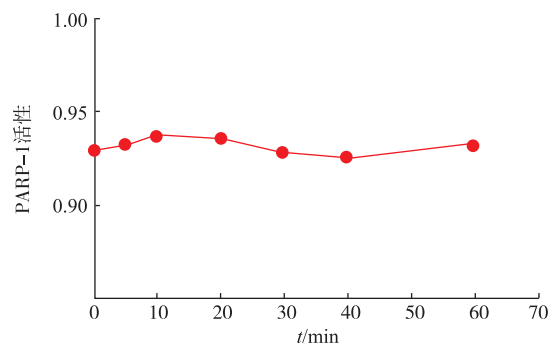


图 3 DNA 质量浓度对 PARP-1 活性的影响

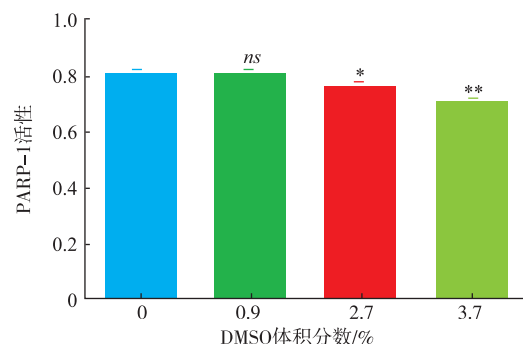
Fig. 3 Effects of DNA concentration on PARP-1 activity

2.4 PARP-1 酶的稳定性验证及 DMSO 体积分数对 PARP-1 活性的影响

将 PARP-1 在室温条件下放置 0~60 min 后分别进行测定,结果发现 PARP-1 活性基本无变化,如图 4(a)所示。后续化合物筛选过程中以 DMSO 作母液,为排除 DMSO 对结果的影响,测定了不同 DMSO 体积分数对 PARP-1 活性的影响,结果如图 4(b)所示,反应体系 DMSO 体积分数高于 2.7% 时对 PARP-1 的活性有显著抑制作用。



(a) PARP-1 在 0~60 min 内活性的变化



(b) DMSO 对 PARP-1 活性的影响

图 4 PARP-1 的稳定性

Fig. 4 Activity changes of PARP-1

2.5 PARP-1 酶的用量的确定

从 1 L 昆虫细胞 ($2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) 中共获得 30 mL PARP-1 粗酶液。15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA 激活作用下,不同浓度 PARP-1 对 12.5 nmol/L NAD^+ 的作用结果如图 5 所示,随着酶用量增加,反应剩余底物不断减少。设置 S/B 值为 4,将反应 15 min 后 NAD^+ (12.5 nmol/L) 消耗至 $(25 \pm 2)\%$ ($(3.125 \pm 0.25) \text{ nmol/L}$) 时的酶活力单位数 ($6.25 \times 10^{-4} \text{ U}$) 作为 PARP-1 的用量,结果表明该批次粗酶液约 0.6 μL 即可达到该筛选体系所需要的 PARP-1 用量。

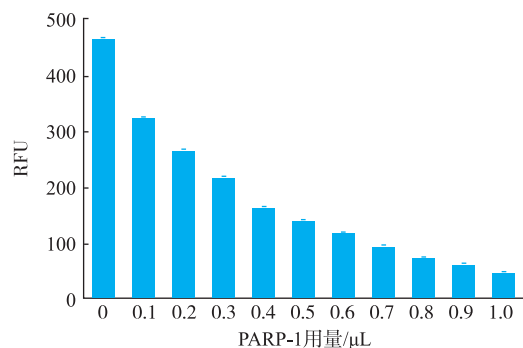


图 5 PARP-1 活性测定

Fig. 5 PARP-1 activity assays

2.6 高通量技术参数评价

为了验证该方法的稳定性和可靠性,以高通量技术参数进行评价,得到“sig”值为 478 ± 8 , “back”值为 133 ± 20 , 计算 Z' 为 0.76, $S/B=3.58$ 。因此可认为该反应体系适用于 PARP-1 抑制剂的高通量筛选。

2.7 已知 PARP 抑制剂的验证实验

选取 3 个已知 PARP-1 抑制剂对上述筛选方法进行验证,结果见图 6,测得 PHE、DPQ、AZD2281 的 IC_{50} 分别为 562.4、369.6、6.8 nmol/L, 因此可认为本模型是一种高效灵敏的 PARP 抑制剂的活性测定方法。

2.8 化合物筛选

对 84 个具有潜在 PARP 抑制活性的化合物进行初步筛选,结果如图 7 所示,相同浓度的不同化

合物表现出对 PARP-1 活性的不同抑制作用,其中抑制率高于 0.6 的有 47 个。

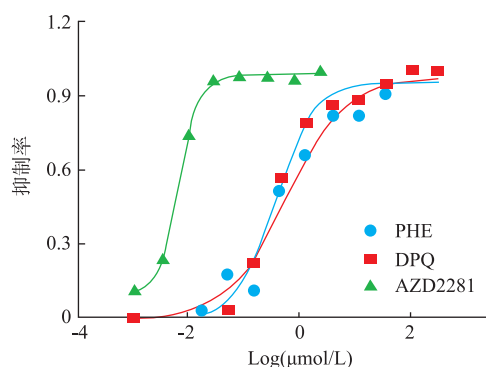


图 6 PARP 抑制剂的 IC_{50} 测定

Fig. 6 Concentration-inhibition curve of PARP inhibitors on PARP-1

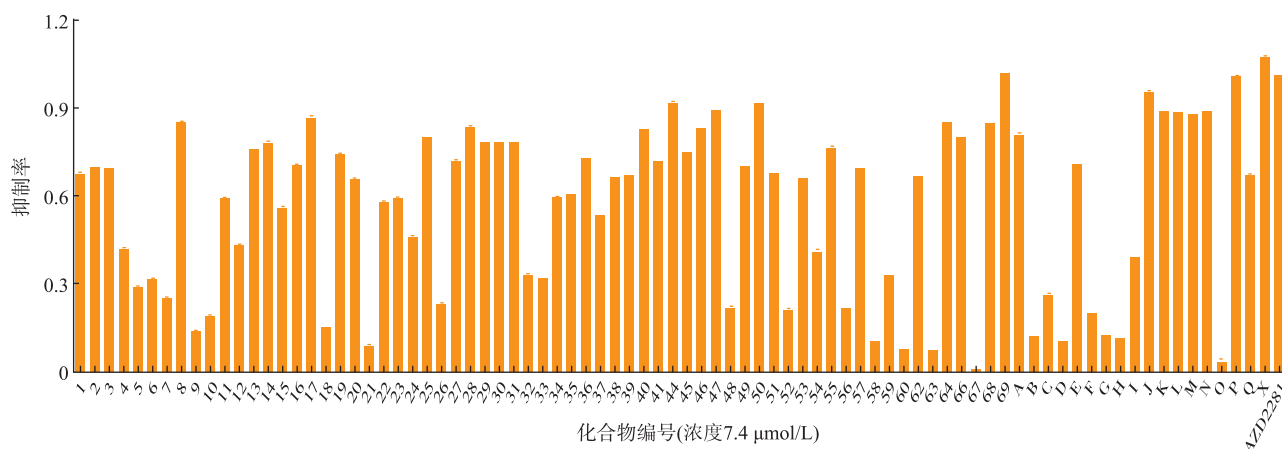


图 7 化合物的 PARP-1 抑制活性筛选

Fig. 7 Screening for PARP-1 inhibitors in 96 well plates

3 结 语

PARP 抑制剂的筛选模型以 PARP 酶的活性为基础,而 PARP 活性测定的标准方法常需要放射性/生物素标记的 NAD⁺或 PAR 抗体,成本高,操作较繁琐^[13-16]。

本课题研究中借鉴 Karson S. Putt 的 NAD⁺化学定量法,首先进行 NAD⁺反应条件的评估,有效地控制了操作过程中的稳定性和结果的重复性。此外,研究所用的 PARP-1 来自作者所在实验室已成功表达的昆虫细胞,经一步超声破碎即可获取,经济且高效。同时,为克服酶的活性差异带来的影响,作者首先优化底物 NAD⁺的浓度,选择合适的 PARP-1 活力单位数,通过调节酶液的用量以达到所需的酶

活力单位数,同时优化酶激活剂 DNA 的浓度,从而建立了灵活便捷的 PARP-1 抑制剂筛选方法。最后,以高通量技术参数评价该方法,并以已知的 PARP 抑制剂对该活性评价体系进行验证,建立了有效的高通量筛选模型,并以此模型对 84 个具有潜在 PARP 抑制活性的化合物进行了评价。

同时,该活性测定方法也适用于 PARP 家族其他蛋白质活性的检测,但由于 NAD⁺转化条件的限制,反应载体需选用耐高温材料;含有烷基吡啶类结构的化合物会产生较高的本底值。而在研究前期为降低酶的用量,反应体系中底物浓度设置较低,在操作过程中易影响结果的重复性,后期可适当提高 NAD⁺浓度,按照本研究方法以酶的活性为基础,建立新的反应体系和高通量筛选模型。

参考文献:

- [1] Woodhouse B C, Dianov G L. Poly ADP-ribose polymerase-1: An international molecule of mystery [J]. **DNA Repair (Amst)**, 2008, 7(7): 1077-1086.
- [2] Jagtap P, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors[J]. **Nat Rev Drug Discov**, 2005, 4(5): 421-440.
- [3] Abd Elmageed Z Y, Naura A S, Errami Y, et al. The poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs): New roles in intracellular transport[J]. **Cell Signal**, 2012, 24(1): 1-8.
- [4] Peralta-Leal A, Rodriguez-Vargas J M, Aguilar-Quesada R, et al. PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases[J]. **Free Radic Biol Med**, 2009, 47(1): 13-26.
- [5] Lee J M, Ledermann J A, Kohn E C. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies [J]. **Ann Oncol**, 2014, 25(1): 32-40.
- [6] Plummer R, Jones C, Middleton M, et al. Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors[J]. **Clin Cancer Res**, 2008, 14(23): 7917-7923.
- [7] Ferraris D V. Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors: From concept to clinic[J]. **J Med Chem**, 2010, 53(12): 4561-4584.
- [8] 柳军, 张陆勇. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 抑制剂高通量筛选模型[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(1): 124-127.
LIU Jun, ZHANG Luyong. HTS model for Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor [J]. **Chin Pharmacol Bull**, 2007, 23(1): 124-127. (in Chinese)
- [9] 周海燕, 马军, 杨雪丽, 等. hPARP1 酶在杆状病毒/昆虫细胞中的高表达及快速纯化[J]. 生物工程学报, 2013, 29(7): 998-1005.
ZHOU Haiyan, MA Jun, YANG Xueli, et al. Expression and purification of hPARP1 by baculovirus system [J]. **Chin J Biotech**, 2013, 29(7): 998-1005. (in Chinese)
- [10] Putt K S, Hergenrother P J. An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD (+): Application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors [J]. **Anal Biochem**, 2004, 326(1): 78-86.
- [11] 王守宝, 竺晓鸣, 高峰, 等. 仓鼠糜酶 2 抑制剂高通量筛选模型的建立及其应用[J]. 药学报, 2012, 47(2): 168-173.
WANG Shoubao, ZHU Xiaoming, GAO Feng, et al. High-throughput screening for hamster chymase 2 inhibitors [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2012, 47(2): 168-173. (in Chinese)
- [12] 王斯文, 陈向东, 汪辉, 等. β -内酰胺酶抑制剂高通量筛选模型的建立[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(2): 102-105.
WANG Siwen, CHEN Xiangdong, WANG Hui, et al. Establishment of high-throughput screening model for β -lactamase inhibitor [J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2013, 38(2): 102-105. (in Chinese)
- [13] Geraets L, Moonen H J, Wouters E F, et al. Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase-1 at physiological concentrations[J]. **Biochem Pharmacol**, 2006, 72(7): 902-910.
- [14] Decker P, Miranda E A, de Murcia G, et al. An improved nonisotopic test to screen a large series of new inhibitor molecules of poly(ADP-ribose) polymerase activity for therapeutic applications[J]. **Clin Cancer Res**, 1999, 5(5): 1169-1172.
- [15] Brown J A, Marala R B. Development of a high-throughput screening-amenable assay for human poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors[J]. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 2002, 47(2): 137-141.
- [16] Dillon K J, Smith G C, Martin N M. A flashplate assay for the identification of parp-1 inhibitors [J]. **J Biomol Screen**, 2003, 8(3): 347-352.