

葎草酮抑制人胃癌细胞 SGC-7901 N-乙酰基转移酶 1 活性的酶动力学研究

高世勇^{1,2}, 郎 朗^{1,2}, 邹 翔^{1,2}, 汲晨锋^{1,2}, 季宇彬^{1,2}, 马 强^{1,2}, 岳 磊^{1,2}, 曲中原^{1,2}, 尚 明^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研流动站, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要:目的 探讨葎草酮对人胃癌 SGC-7901 细胞 N-乙酰基转移酶 1 (NAT1) 酶动力学常数的影响。方法 采用 HPLC 法, 以 NAT1 酶特异性底物对氨基苯甲酸 (PABA) 为底物, 以 SGC-7901 完整细胞及细胞质内 PABA 被 NAT1 乙酰化为 Ac-PABA 的速度为 NAT1 酶的反应速率, 采用双倒数作图法, 以底物 PABA 浓度的倒数对 NAT1 反应速率的倒数进行直线回归, 得出回归方程, 计算米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max})。结果 酶动力学研究表明, 以 PABA 为底物, 对于 SGC-7901 完整细胞, 阴性对照组的 K_m 和 V_{max} 分别为 $(3.910 \pm 0.087) \mu\text{mol/L}$ 、 $(0.306 0 \pm 0.006 7) \text{ pmol} (1 \times 10^6 \text{ 个细胞})$, 葎草酮组的 K_m 和 V_{max} 分别为 $(3.830 \pm 0.123) \mu\text{mol/L}$ 、 $(0.275 0 \pm 0.005 8) \text{ pmol} (1 \times 10^6 \text{ 个细胞})$, 对于 SGC-7901 细胞质, 阴性对照组的 K_m 和 V_{max} 分别为 $(760.2 \pm 210.2) \mu\text{mol/L}$ 、 $(0.191 0 \pm 0.043 7) \text{ pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 葎草酮组的 K_m 和 V_{max} 分别为 $(449.0 \pm 72.9) \mu\text{mol/L}$ 和 $(0.094 0 \pm 0.010 4) \text{ pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 数据经统计学处理表明对 SGC-7901 完整细胞或细胞质中的 NAT1 酶, 阴性对照组和葎草酮组的 K_m 没有统计学差异, 而 V_{max} 有显著差异。结论 葎草酮是 SGC-7901 人胃癌细胞 NAT1 酶 PABA 底物的非竞争性抑制剂。

关键词: 葎草酮; 人胃癌细胞 SGC-7901; N-乙酰基转移酶 1 (NAT1); 米氏常数 K_m ; 最大反应速率 V_{max}

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)04-0931-04

Effects of humulon on kinetic constants of NAT1 in SGC-7901 cells

GAO Shi-yong^{1,2}, LANG Lang^{1,2}, ZOU Xiang^{1,2}, JI Chen-feng^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2},

MA Qiang^{1,2}, YUE Lei^{1,2}, QU Zhong-yuan^{1,2}, SHANG Ming^{1,2}

(1. Post-doctoral Research Station, Institute of Materia Medica, Center of Research and Development on Life Sciences and Environment Sciences of Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. MOE Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract : Objective To explore the effects of humulon on kinetic parameters of N-acetyltransferase-1 (NAT1) of human gastric cancer SGC-7901. **Methods** Employing HPLC, using para-aminobenzoic acid (PABA) as substrate, in intact SGC-7901 cells and their cytoplasm, taking the speed of PABA being acetylated to Ac-PABA by NAT1 as the rate of NAT1, using double reciprocal plot, taking the reciprocal of concentration of PABA and reaction rate of NAT1 as coordinates, regression equation was obtained and the Michaelis constant (K_m) and maximum reaction velocity (V_{max}) were calculated. **Results** Study on enzyme kinetics demonstrated, as for intact SGC-7901 cells, K_m and V_{max} of control group were $(3.910 \pm 0.087) \mu\text{mol/L}$ and $(0.306 0 \pm 0.006 7) \text{ pmol/L} (1 \times 10^6 \text{ cells})$, respectively, K_m and V_{max} of the humulon group were $(3.830 \pm 0.123) \mu\text{mol/L}$ and $(0.275 0 \pm 0.005 8) \text{ pmol} (1 \times 10^6 \text{ cells})$, respectively. As for the cytoplasm of SGC-7901 cells, K_m and V_{max} of control group were $(760.2 \pm 210.2) \mu\text{mol/L}$ and $(0.191 0 \pm 0.043 7) \text{ pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, K_m and V_{max} of the humulon group were $(449.0 \pm 72.9) \mu\text{mol/L}$ and $(0.094 0 \pm 0.010 4) \text{ pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$. Statistically, as for intact SGC-7901 cells or their cytoplasm, there was no difference of the K_m between control group and humulon group, but there was remarkable difference of V_{max} between control group and humulon group, $P < 0.01$ for intact cell and $P < 0.05$ for cytoplasm. **Conclusion** Humulon is a noncompetitive inhibitor of NAT1 in SGC-7901 cells.

Key words: humulon; human gastric cancer SGC-7901 cells; N-acetyltransferase-1 (NAT1); Michaelis constant (K_m); maximum reaction velocity (V_{max})

收稿日期: 2010-01-18

基金项目: 黑龙江省教育厅重点项目 (11511102)

作者简介: 高世勇 (1975—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 哈尔滨商业大学药物研究所所长, 研究方向为肿瘤药理学。

E-mail: sygao2002@163.com

葎草酮为大麻科植物啤酒花中的一种主要化学成分,在桑科植物葎草的球果中量也较高。啤酒花是一种重要的传统中药,也是酿造啤酒的重要原料,其中 α -酸及 β -酸是啤酒花苦味的主要来源,因其独特的药用价值而成为近年研究的热点^[1]。葎草酮作为啤酒花 α -酸的主要成分之一,有研究表明其对化学方法诱导的小鼠皮肤癌有较好疗效^[2],与影响环氧化酶 2 (COX-2) 活性及基因表达有关^[3],Tobe 等^[4]报道葎草酮能够诱导 HL-60 细胞凋亡。另有研究^[5]发现葎草酮抑制肿瘤新生血管的生成从而达到抗肿瘤的作用。

本课题组前期研究表明葎草酮对人胃癌细胞 SGC-7901 有较好的抑制作用,作用机制与抑制肿瘤细胞内 *N*-乙酰基转移酶 1 (NAT1) 的活性和基因表达有关^[6],即葎草酮是一种 NAT1 酶抑制剂。酶的抑制剂一般分为 3 类:竞争性抑制剂,非竞争性抑制剂和反竞争性抑制剂。不同类型的抑制剂影响酶活性的机制是截然不同的,因此,为了深入探讨葎草酮抑制 NAT1 酶活性的进一步机制,首先研究葎草酮属于哪种 NAT1 酶抑制剂类型是非常必要的。因此本实验主要研究葎草酮对人胃癌细胞 SGC-7901 NAT1 酶动力学相关常数的影响,揭示葎草酮作为酶抑制剂的类型,为进一步探讨葎草酮是如何抑制 NAT1 酶活性而发挥抗肿瘤作用提供依据。

1 材料

1.1 细胞株:人胃癌 SGC-7901 细胞株,购自美国 ATCC (American Type Culture Collection),由黑龙江省肿瘤医院肿瘤研究所保种提供。

1.2 药品与试剂:葎草酮(质量分数 95%)购自北京豪盛酒花制品厂。对氨基苯甲酸(PABA)、Tris、AcCoA、BSA、乙酰肉毒碱、肉毒碱乙酰转移酶购于美国 Sigma 公司;Ac-PABA 购于美国 FLUKA 公司;RPMI 1640 细胞培养液、胰酶购于美国 Gibco 公司;PMSF、亮抑酶肽购于上海华舜生物工程有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DTT 购于国药集团化学试剂有限公司;EDTA 购于天津市福晨化学试剂厂。

1.3 仪器:CO-150 型 CO₂ 培养箱(美国 NBS 公司);SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州净化设备厂);Olympus IX70 型倒置显微镜(Olympus 公司);Waters 2695 型高效液相色谱仪、Symmetry-Shield C₁₈ 逆向色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),美国 WATERS 公司;LD5-2 型离心机(北京医用离心机厂);6R 型台式冷冻离心机(美国 BECK-

MAN-COULTER 公司);AS-2060B 型超声波提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养:SGC-7901 细胞以适量浓度接种于细胞培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置于 37 °C 恒温、5% CO₂ 及饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,细胞贴壁生长,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞备用。

2.2 葎草酮对 SGC-7901 完整细胞 NAT1 酶动力学常数的影响

2.2.1 分组及给药:取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,0.25% 胰酶消化后,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液调整细胞浓度为 5×10^5 / mL,铺入 24 孔板中,每孔 1 mL,24 h 后分别加入相应的试剂。实验分为 5 个不同底物浓度的阴性对照组和 5 个不同底物浓度的葎草酮组,阴性对照组及葎草酮组分别给予不同浓度的底物 PABA (终浓度分别为 5.625、11.25、22.5、45、67.5 μmol/L)。阴性对照组不加葎草酮,而给予相同体积的 RPMI 1640 细胞培养液。葎草酮组加入终浓度 28 μmol/L 的葎草酮^[6]。置于 37 °C 恒温、5% CO₂ 及饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养 24 h 后 HPLC 法测定 Ac-PABA 的生成量。

2.2.2 活性测定:24 h 后吸取各组的细胞培养上清液,3 500 × *g* 离心 10 min,加 0.2 mL 10% 三氯乙酸沉淀蛋白,静置 6 h,12 000 × *g* 高速离心 5 min,取 20 μL 上清液 HPLC 自动进样进行检测。色谱条件:流动相 50 mmol/L 醋酸-乙腈(86:14),体积流量 0.8 mL/min,2487 紫外检测器(UV),检测波长 266 nm,柱温(25 ± 5) °C,Ac-PABA 保留时间约为 13.5 min。经由 HPLC 分析 Ac-PABA 的量来反映 NAT1 活性的变化。活性用 1×10^6 细胞生成的 Ac-PABA 的量(nmol)表示。采用双倒数作图法计算最大反应速率($V_{\max}$)和米氏常数(K_m)。

2.3 葎草酮对 SGC-7901 细胞质中 NAT1 酶动力学常数的影响

2.3.1 细胞质的提取:取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞 1×10^7 个,胰酶消化后,PBS 洗两遍,沉淀的细胞悬浮在 2 mL 裂解液[20 mmol/L Tris-HCl(4 °C,pH 7.5),1 mmol/L DTT,1 mmol/L EDTA,50 μmol/L PMSF,10 μmol/L 亮抑酶肽]中。4 °C 下超声波破碎 20 min 后,先以 9 000 × *g* 离心 1 min,取上清液,再以 10 000 × *g* 离心 60

