

γ -氨基丁酸转氨酶抑制剂筛选方法的建立及其在天麻成分筛选中的应用

李碧¹, 方雄¹, 龚晏¹, 张晨泽¹, 闫文强¹, 毕思玲², 姚秋丽³, 张宇忠², 王鹏龙^{1*}, 雷海民^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学护理学院, 北京 100102

摘要: 目的 建立以 γ -氨基丁酸转氨酶 (GABA-T) 抑制剂类抗癫痫神经系统药物筛选模型, 并运用此模型对天麻有效成分及其类似物进行体外活性筛选和构效关系分析。方法 优化酶催化反应温度、反应时间、底物 NAD^+ 浓度、底物 α -酮戊二酸浓度、底物 γ -氨基丁酸 (GABA) 浓度等因素建立 GABA-T 酶系活性筛选模型, 采用对羟基苯甲醛 (HBA) 及其 11 种结构类似物验证模型可靠性。结果 成功构建 GABA-T 酶系抗癫痫活性筛选模型, HBA 及 11 个结构类似物测定结果与文献报道抗癫痫作用相一致, 且构效分析发现 -OH 及苯环对位上的 -CHO 为必需药效团。结论 建立的模型可应用于 GABA-T 酶抑制剂的高通量筛选, 为 GABA-T 酶抑制剂类抗癫痫活性成分的筛选及其作用机制研究提供参考。

关键词: γ -氨基丁酸转氨酶抑制剂; 构效关系; 抗癫痫; 天麻; 对羟基苯甲醛; 高通量筛选

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)03-0454-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.017

Establishment of screening method for γ -aminobutyric acid transaminase inhibitor and its application in screening constituents in *Gastrodiae Rhizoma*

LI Bi¹, FANG Xiong¹, GONG Yan¹, ZHANG Chen-ze¹, YAN Wen-qiang¹, BI Si-ling², YAO Qiu-li³, ZHANG Yu-zhong², WANG Peng-long¹, LEI Hai-min¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. School of Nursing, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To establish a screening model *in vitro* with γ -aminobutyric acid transaminase (GABA-T) as a target for screening the inhibitors of anti-epilepsy drugs for the treatment of nervous diseases and finish the structure-activity relationship analysis of *p*-hydroxybenzaldehyde as effective components in *Gastrodiae Rhizoma* and its analogs. **Methods** Catalyst performed temperature, reaction time, the concentration of NAD^+ , α -ketoglutarate, and GABA were investigated to optimize the model. The test of *p*-hydroxybenzaldehyde (HBA) and its 11 analogs were selected as verification of this model. **Results** The screening model *in vitro* based on GABA-T was established. The testing result of *p*-HBA and its 11 analogs was consistent with the practical activity recorded in the literature. Hydroxyl groups of -OH and -CHO in *p*-aldehyde on the benzene ring were pharmacophores. **Conclusion** The model established in this paper can be used for high throughput screening the inhibitors of anti-epilepsy drugs, which provides the reference for the study on the inhibitors of anti-epilepsy drugs for nervous diseases and their mechanism.

Key words: inhibitor of GABA-T; structure-activity relationship; anti-epilepsy; *Gastrodiae Rhizoma*; *p*-hydroxybenzaldehyde; high throughput screening

天麻 *Gastrodia elata* Blume 味甘、性平, 入肝经, 具有平肝息风、镇静安眠之功效, 主要用于治疗癫痫、惊风、头痛、眩晕等疾病^[1-2], 其抗癫痫作用在临床上具有广泛应用, 如抗痫散、镇惊止痫丸等^[3-4]。

收稿日期: 2015-05-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173519); 北京中医药大学中青年教师自主科研课题面上项目 (2015-JYB-JSMS023); 北京中医药大学科研创新团队项目 (中药先导化合物发现与开发, 2011-CXTD-15)

作者简介: 李碧, 女, 研究生, 研究方向为中药功效成分拼合及活性筛选。Tel: 13263279230 E-mail: libimegan@163.com

*通信作者 王鹏龙, 男, 讲师, 研究方向为中药功效成分修饰及活性筛选。Tel: (010)84738641 E-mail: wpl581@126.com

雷海民, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药先导化合物发现与开发。Tel: (010)84738641 E-mail: hm_lei@126.com

前期文献研究^[5-6]表明对羟基苯甲醛 (HBA) 和香草醛等酚醛类成分为天麻抗癫痫的主要有效成分; 而结构类似的对羟基苯甲醇和对羟基苯乙醇等酚醇类成分无明显抗癫痫活性, 其作用差异可能与结构中取代基类型有关, 但具体的构效关系尚未明确。

HBA 的抗癫痫作用机制较为明确, 通过调节 γ -氨基丁酸 (GABA) 酶系, 抑制 GABA 转氨酶 (GABA-T) 活性, 导致神经递质 γ -GABA 的水平升高从而产生抗癫痫作用。相关研究表明, 利用化合物对 GABA-T 抑制作用来评价其抗癫痫活性具有一定的可行性^[6]。但此种评价方法未见系统的条件优化, 以适用于更多抗癫痫药物的体外活性筛选, 从而进一步开发 GABA-T 抑制剂类抗癫痫药物。

本课题组一直致力于神经系统类中药有效成分结构修饰、构效关系分析及体外活性筛选研究^[7-9]。在前期工作的基础上, 本研究以 HBA 为阳性药^[6,10], 优化影响 GABA-T 酶系稳定性的各项参数, 建立一个高效的 GABA-T 抑制剂类抗癫痫药物筛选模型, 并运用此模型测定 12 个 HBA 结构类似物的 GABA-T 抑制活性, 同时分析 HBA 及其结构类似物抗癫痫活性的构效关系。本研究为 GABA-T 抑制剂类抗癫痫药物的研发提供一种新的筛选方法。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 5 只, 体质量 200~250 g, 北京市维通利华实验动物技术中心提供, 动物生产许可证 SCXK (京) 2006-0009。

1.2 药品及主要试剂

HBA 及其类似物均购自于北京伊诺凯科技有限公司, 质量分数均达 98% 以上, 结构见图 1、表 1。GABA, 阿拉丁试剂; β -巯基乙醇, 天津市福晨化学试剂厂; α -酮戊二酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (氧化型辅酶 I, NAD⁺), Sigma 公司; 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na)、二甲基亚砜 (DMSO), Amresco 公司。

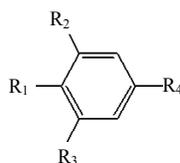


图 1 HBA 及其类似物母核结构

Fig 1. Structures of HBA and its analogs

表 1 HBA 及其类似物结构

Table 1 Structures of HBA and its analogs

编号	原料名称	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	HBA	-OH	H	H	-CHO
2	茴香醛	-OCH ₃	H	H	-CHO
3	苯甲醛	H	H	H	-CHO
4	对羟基苯甲醇	-OH	H	H	-CH ₂ OH
5	对羟基苯乙醇	-OH	H	H	-CH ₂ CH ₂ OH
6	对羟基苯甲酸	-OH	H	H	-COOH
7	香草醛	-OH	-OCH ₃	H	-CHO
8	香草醇	-OH	-OCH ₃	H	-CH ₂ OH
9	香草酸	-OH	-OCH ₃	H	-COOH
10	原儿茶醛	-OH	-OH	H	-CHO
11	原儿茶酸	-OH	-OH	H	-COOH
12	没食子酸	-OH	-OH	-O	-COOH

1.3 仪器

TU-1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); pH 计 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 组织研磨器 (匀浆器, 涿州市长虹玻璃仪器厂); 移液枪、离心机、DK-600 电热恒温水浴箱 (上海精宏实验设备有限公司); Spectra Max190 酶标仪 (美国 Molecular Devices); 96 孔板 (美国 Costar 公司)。

2 方法

2.1 GABA-T 酶系液的制备

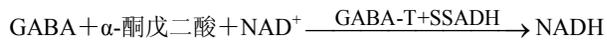
2.1.1 缓冲液的配制 缓冲液 1: 0.01 mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄、0.1 mmol/L EDTA-2Na、1 mmol/L β -巯基乙醇和 1 mmol/L α -酮戊二酸, pH 值为 7.4, 4 °C 保存; 缓冲液 2: 0.01 mmol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄、0.1 mmol/L EDTA-2Na、1 mmol/L β -巯基乙醇和 20% 甘油, pH 值为 7.4, 4 °C 保存; 检测缓冲液: 0.1 mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 值为 8.5。

2.1.2 GABA-T 酶系液的制备 雄性 SD 大鼠, 乙醚深度麻醉后, 断头处死, 迅速取出完整鼠脑 (操作均在冰块上进行), 于 4 °C 生理盐水中洗净, 置匀浆器中, 每个鼠脑加入 4~5 mL 缓冲液 1, 冰水浴匀浆处理。向匀浆液中慢慢滴加 1 mmol/L 乙酸, 调节 pH 值为 5.5, 于 50 °C 加热 5 min 后, 在冰箱中冷却至 4 °C。10 000 r/min, 离心 10 min, 收集上清液, 缓慢加入 (NH₄)₂SO₄, 达 70% 饱和度时产生沉淀。10 000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清液, 收集沉淀, 用缓冲液 2 溶解, 得质量分数为 25% 的 GABA-T 酶系粗提液, -20 °C 暂存。本优化处理是在常规酶原配制方法^[11-12]的基础上进行改进, 制备的 GABA-T

酶系含有琥珀酸半醛脱氢酶 (SSADH), 活性检测时无需另外加入。

2.2 GABA-T 活性检测模型的建立

2.2.1 酶活力单位与吸光度 (A) 值相关性评价 应用紫外分光光度计检测烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 在 340 nm 处 A 值, 检测 NADH 的生成量、生成速率, 反映 GABA-T 的活性大小。NADH 生成表达式如下:



分别以反应时间, 底物 NAD^+ 、 α -酮戊二酸、GABA 的浓度, GABA-T 酶系液的加入量为横坐标, 以 A 值为纵坐标, 绘制相关性曲线。

2.2.2 反应温度和时间对 GABA-T 活性的影响 向检测缓冲液中依次加入底物 NAD^+ 、GABA、 α -酮戊二酸, 使终浓度分别为 0.025、5、0.2 mmol/L, 摇匀后加入 80 μL GABA-T 酶系液, 总体积 4 mL。温孵温度为 30、37、45 $^{\circ}\text{C}$, 每隔 10 min 测定 1 次 340 nm 处 A 值。

2.2.3 NAD^+ 浓度对 GABA-T 活性的影响 向检测缓冲液中, 分别加入 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.6、0.8、1.6 mmol/L 浓度的 NAD^+ , 再依次加入 5 mmol/L GABA 和 0.2 mmol/L α -酮戊二酸, 摇匀后加入 80 μL GABA-T, 总体积 4 mL。分别于温孵之前及 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温孵 30 min 后测 340 nm 处 A 值, 记录 ΔA 。

2.2.4 α -酮戊二酸浓度对 GABA-T 活性的影响 向检测缓冲液中, 加入 0.2 mmol/L NAD^+ 和 5 mmol/L GABA, α -酮戊二酸的浓度分别为 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、4.8、6.4 mmol/L, 摇匀后加入 80 μL GABA-T 酶系液, 总体积 4 mL。 ΔA 值检测方法同“2.2.3”项。

2.2.5 GABA 浓度对 GABA-T 活性的影响 向检测缓冲液中, 加入 0.2 mmol/L NAD^+ 和 0.8 mmol/L α -酮戊二酸, GABA 的浓度分别为 0、2、4、6、8、10、12、16 mmol/L, 摇匀后加入 80 μL GABA-T 酶系液, 总体积 4 mL。 ΔA 值检测方法同“2.2.3”项。

2.3 HBA 及其结构类似物的筛选及构效分析

设置空白组、对照组、药物空白组、药物测定组。以 GABA-T 酶系液、DMSO、检测缓冲液组成空白组; 以 GABA-T 酶系液、检测缓冲液、0.2 mmol/L NAD^+ 、6 mmol/L GABA、0.8 mmol/L α -酮戊二酸组成对照组; 以检测缓冲液、药物、DMSO 组成药物空白组, 用以扣除药物的吸收; 以 GABA-T 酶系液、药物、缓冲液、0.2 mmol/L NAD^+ 、6 mmol/L

GABA、0.8 mmol/L α -酮戊二酸组成药物测定组。各药物测定组中, HBA 及其结构类似物以 DMSO 配制成质量浓度分别为 0、2、4、6、8、10、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。每组设 3 个复孔, 测 340 nm 处 A 值。以 A 值为纵坐标, 以药物质量浓度为横坐标, 绘制药物对 GABA-T 活性的抑制曲线。

GABA-T 活性 = (药物组 A 值 - 药物空白组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值)

2.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Origin 软件进行统计分析。

3 结果

3.1 催化反应温度和时间对 GABA-T 活性的影响

反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, NADH 的生成速率快且平稳上升, 表明 GABA-T 催化效率高。反应时间为 30 min 时, NADH 的生成浓度接近最大, 趋近平衡, 之后 GABA-T 开始失活, 结果见图 2。故模型选择温孵条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 30 min。

3.2 NAD^+ 浓度对 GABA-T 活性的影响

NAD^+ 浓度为 0.2 mmol/L 时, NADH 的生成量接近最大, 趋于平衡, 说明 GABA-T 的催化能力达到饱和, 不再随 NAD^+ 浓度的增加而升高, 结果见图 3。故模型选择 NAD^+ 浓度为 0.2 mmol/L。

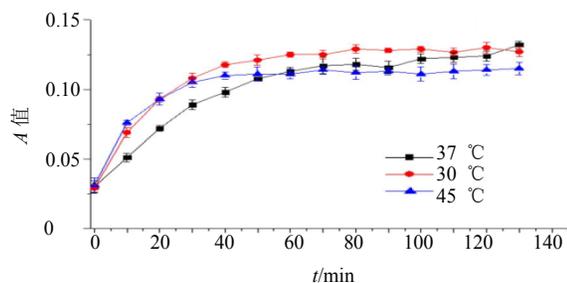


图 2 催化反应温度与时间考察曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Absorbance of reaction temperature and catalytic time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

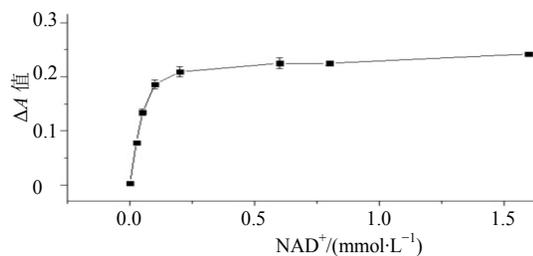


图 3 底物 NAD^+ 浓度考察曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Absorbance of different concentration of NAD^+ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 α -酮戊二酸浓度对 GABA-T 活性的影响

α -酮戊二酸浓度为 0.8 mmol/L 时, NADH 的生成量接近最大, 趋于平衡, GABA-T 的催化能力达到饱和, ΔA 值随 α -酮戊二酸浓度进一步增加而降低, 说明 α -酮戊二酸的浓度过高对 GABA-T 有抑制作用, 结果见图 4。故模型选择 α -酮戊二酸浓度为 0.8 mmol/L。

3.4 GABA 浓度对 GABA-T 活性的影响

GABA 浓度为 6 mmol/L 时, NADH 的生成量接近最大, 趋于平衡, GABA-T 的催化能力达到饱和, 但随 GABA 的浓度继续增大而略有升高趋势, 说明酶的活性与 GABA 的浓度呈量效关系, 结果如图 5。故模型选择 GABA 浓度为 6 mmol/L。

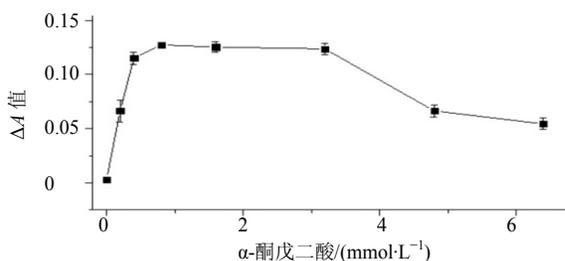


图 4 底物 α -酮戊二酸的浓度考察曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Absorbance of different concentration of α -ketoglutarate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

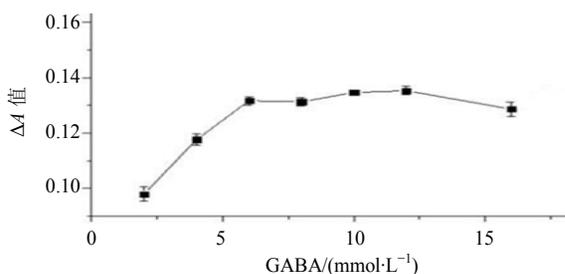


图 5 底物 GABA 的浓度考察曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Absorbance of different concentration of GABA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 GABA-T 活性检测模型最优条件的确定

根据以上参数考察实验, 确定 GABA-T 活性检测体系为检测缓冲液中加入底物 0.2 mmol/L NAD^+ 、6 mmol/L GABA、0.8 mmol/L α -酮戊二酸; 总体积 4 mL; 37 °C 条件下, 温孵 30 min, 340 nm 处测 A 值。

3.6 HBA 及其结构类似物的筛选及构效分析

HBA 对 GABA-T 酶系液有明显抑制作用 (IC_{50} 为 4.8 $\mu\text{g/mL}$), 且呈剂量依赖性, 与文献报道的一致^[14]。结果见图 6。说明此筛选模型可靠, 可进行

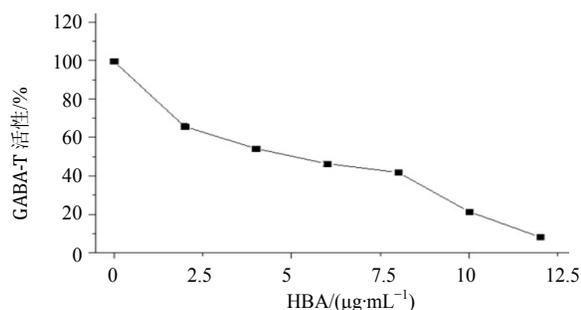


图 6 HBA 对 GABA-T 的抑制曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Inhibition of GABA-T by HBA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

GABA-T 抑制剂类药物筛选。

在 10 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, HBA、香草醛和原儿茶酸组的 GABA-T 活性明显受到抑制, GABA-T 活性分别为 26.16%、45.58%和 53.47%, 对应的抑制率分别为 73.84%、54.42%和 46.53%, 而其他化合物的抑制率较低, 与前期文献报道基本相符^[6,13]。结果见图 7。

构效关系分析表明, 12 种 HBA 结构类似物为以下 4 种情况时, 其对 GABA-T 的抑制活性均消失: ①HBA 的 -OH 替换为 -OCH₃, 即化合物 2 (茴香醛) 结构; ②HBA 的 -OH 被去掉, 即化合物 3 (苯甲醛) 结构; ③HBA 的 -CHO 被还原为 -CH₂OH 即化合物 4 (对羟基苯甲醇) 结构和化合物 8 (香草醇) 结构; ④HBA 的 -CHO 被氧化成 -COOH 即化合物 6 (对羟基苯甲酸) 结构和化合物 9 (香草酸) 结构。得出结论, HBA 及香草醛的 -OH 及苯环对位上的 -CHO 确定为必须药效团。HBA 与底物之一 α -酮戊二酸均具有羰基基团和酸性基团 (-OH 或 -COOH), 故 HBA 可以与底物竞争 GABA-T 的活性位点, 产生较强的抑制作用。

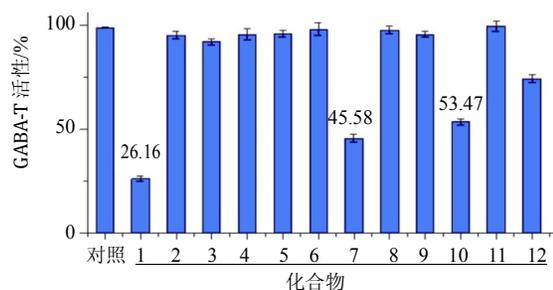


图 7 化合物终质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ GABA-T 体外测试活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 *In vitro* tests on activity of GABA-T at final concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

癫痫等神经系统类疾病均与脑内 GABA 浓度有关, GABA-T 抑制剂类化合物可增加脑内 GABA 浓度, 选择性地对相关神经系统类疾病达到治疗作用, 如 HBA 等 GABA-T 类化合物已被证实通过此途径发挥抗癫痫活性^[15]。因此, GABA-T 抑制活性高通量筛选方法可为发现癫痫等神经系统疾病治疗方法提供依举, 对发现及研究中药有效成分中 GABA-T 抑制剂类抗癫痫成分提供有效参考。

目前, 评价抗癫痫中药药效成分活性的模型主要以动物模型为主^[16], 通过电击或药物刺激等手段对实验动物造模, 待测药物干预后, 将模型动物进行取材, 分析 GABA-T 等癫痫指标, 进而评价抗癫痫药物活性。发掘以靶点进行体外活性高通量筛选是当前药物筛选研究的热点^[17], 本研究成功建立了基于 GABA-T 酶系的体外抗癫痫筛选模型。研究结果表明, 在中药天麻抗癫痫有效成分中, HBA、香草醛和原儿茶醛为 GABA-T 抑制剂类活性成分, 在本模型中测定的其他酪醇未表现出明显活性, 与其不是 GABA-T 抑制剂的事实相符^[18]。该模型可用于抗癫痫中药复方活性成分筛选和作用机制研究, 也可为中药抗癫痫先导化合物的结构修饰、构效关系研究提供依据, 在新型 GABA-T 抑制剂类抗癫痫药物发现方面具有一定价值。

参考文献

- [1] 洪全, 陈森, 李雪萍. 天麻药理研究进展 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(11): 249-250.
- [2] 陈颖, 常琪, 刘新民. 天麻对中枢神经系统作用的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 附 4-附 6.
- [3] 朱欧鸽, 陈志茹, 程为平. 单纯中药治疗癫痫病的研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(3): 272-275.
- [4] 王丛礼. 镇惊止痫丸治疗痫证 (风痰闭窍型) 的临床研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2013.
- [5] 王莉, 肖红斌. 天麻质量控制及活性成分研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 71-72.
- [6] Tao Y H, Yuan Z, Tang X Q, *et al.* Inhibition of GABA shunt enzymes' activity by 4-hydroxybenzaldehyde derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(3): 592-595.
- [7] Xu B, Gong Y, Xu X, *et al.* Synthesis and protective

effect of new ligustrazine derivatives against CoCl₂-induced neurotoxicity in differentiated PC12 cells. Part 2 [J]. *Med Chem Commun*, 2015, 6(5): 806-809.

- [8] Li G L, Xu X, Xu K, *et al.* Ligustrazinyl amides: a novel class of ligustrazine-phenolic acid derivatives with neuroprotective effects [J]. *Chem Cent J*, 2015, doi: 10.1186/s13065-015-0084-5.
- [9] Wang P L, Zhang H G, Chu F H, *et al.* Synthesis and protective effect of new ligustrazine-benzoic acid derivatives against CoCl₂-induced neurotoxicity in differentiated PC12 cells [J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 13027-13042.
- [10] Ha J H, Lee D U, Lee J T. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 73(1/2): 329-333.
- [11] Churchich J E, Moses U. 4-Aminobutyrate aminotransferase. The presence of nonequivalent binding sites [J]. *J Biol Chem*, 1981, 256(3): 1101-1104.
- [12] Koo Y K, Nandi D, Silverman R B. The Multiple active enzyme species of γ -aminobutyric acid aminotransferase are not isozymes [J]. *Rch Biochem Biophys*, 2000, 374(2): 248-254.
- [13] Ha J H, Shin S M, Lee S K, *et al.* *In vitro* effects of hydroxybenzaldehydes from *Gastrodia elata* and their analogues on GABAergic neurotransmission, and a structure-activity correlation [J]. *Planta med*, 2001, 67(9): 877-880.
- [14] 张勇, 席刚明, 周少华. 天麻及其成分对神经系统的作用 [J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(5): 268-271.
- [15] Kushner S A, Dewey S L, Kornetsky C. The irreversible C-aminobutyric acid (GABA) transaminase inhibitor C-vinyl-GABA blocks cocaine self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 290(2): 797-802.
- [16] 于美娟, 刘学伍. 动物模型在抗癫痫药物筛选中的应用 [J]. 国外医学: 神经病学·神经外科学分册, 2003, 30(2): 141-144.
- [17] 庄嘉琅, 曾行, 钟国平, 等. 基于报告基因检测的 PXR, FXR 和 LXR α -激动剂高通量筛选模型的建立 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 289-293.
- [18] 王加强, 韩东娜, 关碧琰, 等. 天麻素辅助治疗慢性顽固性癫痫的疗效观察 [J]. 中国全科医学, 2005, 8(14): 1181-1182.