

# 毛细管电泳法测定团羽铁线蕨的 $5\alpha$ -还原酶活性部位

杜培刚\*, 肖 溶

首钢水钢总医院六盘水临床药学重点实验室, 六盘水 553000

**摘要:** 建立毛细管电泳法测定  $5\alpha$ -还原酶活性的方法, 考查鼠肝脏  $5\alpha$ -还原酶催化睾酮反应活性。采用大体积进样及胶束推扫法, 以 20 mmol/L 硼砂 60 mmol/L SDS pH 9.20 为运行缓冲液, 电压 20 kV, 检测波长 242 nm, 对提取的鼠肝脏  $5\alpha$ -还原酶活性进行监测。通过对电泳条件的优化, 10 min 内实现  $5\alpha$ -还原酶活性测定。毛细管电泳法用于  $5\alpha$ -还原酶活性测定, 为中药有效成分的活性评价提供了评估方法。

**关键词:**  $5\alpha$ -还原酶; 毛细管电泳; 胶束扫集; 团羽铁线蕨

中图分类号: R446.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.031

## Determination of $5\alpha$ -Reductase Activity of *Adiantum capillus-junonis* by Capillary Electrophoresis

DU Pei-gang\*, XIAO Rong

Clinic Pharmacy Laboratory of General Hospital of Shougang Shuicheng

Iron&Steel (group) co., ltd. in Liupanshui, Guizhou Liupanshui 553000, China

**Abstract:** To establish a capillary electrophoresis method for the determination of  $5\alpha$ -reductase activity, rat liver testosterone  $5\alpha$ -reductase catalytic activity was determined. Large volume injection and sweeping micellar push method to 20 mmol/L borax 60 mmol/L SDS pH 9.20 running buffer, voltage 20 kV, detection wavelength 242 nm, the extracted rat liver  $5\alpha$ -reductase activity was monitored. Through the optimization of electrophoresis conditions within 10 min achieved  $5\alpha$ -reductase activity was measured. As a conclusion, a capillary electrophoresis method was successfully developed for the determination of  $5\alpha$ -reductase activity.

**Key words:**  $5\alpha$ -reductase; capillary electrophoresis; micellar sweeping; *Adiantum capillus-junonis*

$5\alpha$ -还原酶是存在于微粒体和细胞核内质网上的一种膜蛋白酶, 有两种类型 I 和 II, 以还原型辅酶 NADPH 作为供氢体, 催化睾酮 (Testosterone, T) 转化为二氢睾酮 (Dihydrotestosterone, DHT)。DHT 与雄激素受体结合后对细胞的生长和分化起重要作用<sup>[1,2]</sup>, 研究表明, 前列腺增生 (BPH) 患者和前列腺癌患者体内的 DHT 含量高于正常人, DHT 与雄激素受体结合后抑制了前列腺细胞的凋亡, 由此, 形成了前列腺增生的 DHT 学说, 即通过抑制  $5\alpha$ -还原酶活性, 减少 DHT 生成, 可能成为 BPH 非手术治疗的主要途径<sup>[3]</sup>, 另有报道脱发、痤疮及癌症等疾病与体内 DHT 浓度升高有关, 因此, 寻找安全有效的  $5\alpha$ -还原酶抑制药成为 BPH 治疗药物的研究重点。

目前用于测定  $5\alpha$ -还原酶的活性方法有高相液相色谱法、气相色谱法、放射免疫法、酶标法、紫外分光光度法等, 毛细管电泳法测定  $5\alpha$ -还原酶活性未见报导。较之其它分析方法, 毛细管电泳具有抗污染能力强、分析成本低等优点, 反应结束后直接上机测定, 减少样品处理步骤, 样品及试剂用量少, 运行成本低。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

毛细管电泳仪 (CE-10 大连江申分离科学有限公司)、紫外可见分光光度计 (Cary 300 美国 Varian)、电子天平 (BS224S 北京赛多利斯仪器有限公司)、台式高速冷冻离心机 (TGL20M 长沙湘仪贝克仪器仪表有限公司)、pH 计 (PHS-828 贵阳学通仪器仪表有限公司)、旋转蒸发器 (RE52AA 上海亚荣生化仪器厂)、快速涡旋混合器 (JY-B 江苏姜堰康健医疗器械厂)、电热恒温水浴锅 (HHS 上海医疗器械

收稿日期: 2015-06-17 接受日期: 2015-10-22

基金项目: 贵州省中医药管理局资助项目 (QZYY2012-66); 六盘水市科技局中药现代化计划项目 (52020-2013-01-07-04); 六盘水市临床药学重点实验室资助项目 (52020-2013-1-05-01)

\* 通讯作者 E-mail: gzdupeigang@sohu.com

厂)、匀浆机(FSH-2A 常州朗越仪器)。

## 1.2 实验动物与材料

SD 大鼠清洁级[SCXK(黔)2012-001]贵阳医学院动物中心提供。睾酮、二氢睾酮(Sigma), NADPH(Roche), 其他试剂均为分析纯。团羽铁线蕨购于六盘水药材市场, 经贵阳中医学院药学院孙庆文教授鉴定为团羽铁线蕨 *Adiantum capillus-junonis* Rupr.

## 2 实验方法

### 2.1 酶提缓冲液的配制

精密称取 Tris 670 mg、EDTA-Na<sub>2</sub> 9 mg、MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 610 mg、NaCl 1.46 g、蔗糖 22.5 g, 加入 20  $\mu$ L 二巯基乙醇溶解并用蒸馏水定容至 500 mL, 盐酸调 pH 至 7.13, 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

### 2.2 5 $\alpha$ -还原酶制备

取三只雄性 SD 大鼠(体重约 200 g)取肝脏, 生理盐水冲洗至无血色。剪碎, 加 5 倍体积酶提取液。置冰台匀浆杯中匀浆, 组织完全悬浮, 静置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中过夜。取出摇匀, 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min, 10000 g, 取上清液 23120 g 离心 60 min。得上清液分装即得。

### 2.3 蛋白含量测定

分别配制剂 1、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/mL 系列浓度的牛血清白蛋白溶液。分别于紫外分光光度计下 280 nm 处测定其吸光度。并绘制标准曲线。Y = 0.5859x + 0.0709, r<sup>2</sup> = 0.9992。按 5 $\alpha$ -还原酶制备项得的酶液稀释 50 倍于紫外分光光度计下测定得酶含量为 0.3268 mg/mL。

### 2.4 毛细管电泳法对酶活性的测定

毛细管电泳采用大体积堆积推扫法测定酶的活性, 以 20 mmol/L 硼砂、60 mmol/L SDS、20% 甲醇(V/V)、pH 9.20 为运行缓冲液, 重力进样高度 20 cm 进样时间为 100 s, 运行电 20 kV, 检测波长为 242 nm。毛细管长 57 cm, 有效长度 50 cm, 内径 75  $\mu$ m。

### 2.5 酶活性测定法

反应总体积为 1 mL, 在 1.5 mL 的 EP 管内配制反应液。加液顺序为: 水、睾酮、酶液、NADPH、样品溶液, 旋涡混匀于 37  $^{\circ}$ C 水浴温浮 30 min。取出加入内标, 摇匀上机测定。

### 2.6 团羽铁线蕨供试品的制备

称取净制团羽铁线蕨 100 g 粉碎, 加入 95% 乙醇超声 30 min 提取两次, 合并乙醇, 置旋转蒸发器中回收乙醇至无醇味, 留取部分总提物旋干, 浸膏加

水分散, 分别用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取。回收溶剂得六个部分。另分别称取 10 g 粉末, 用正己烷超声 30 min 提取两次和水煎煮 1 h, 回收溶剂, 干燥。取上述八个样品称取 6 mg 无水乙醇 1 mL 超声溶解, 10000 rpm 离心 10 min 取上清液作供试液。另取非那雄胺胶囊两粒取粉末称重, 计算相当于 6 mg 重, 加乙醇至 1 mL 超声溶解, 离心, 即得对照品。

## 3 结果与讨论

### 3.1 酶的活性测定条件优化

#### 3.1.1 对反应时间的优化

分别考查了 5 至 90 min 的温浮时间, 结果如下图 1, 随时间增加 T 快速下降, 30 min 后达到平衡。因此, 选择温浮时间为 30 min。

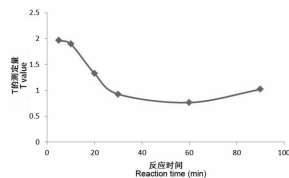


图 1 反应时间对酶活性的影响

Fig. 1 Effect of reaction time on enzyme activity

#### 3.1.2 睾酮用量的优化

固定其它条件, 100  $\mu$ mol/L NADPH、100  $\mu$ L 酶液, 分别考查了 10、20、30、40、50、60  $\mu$ mol/LT 的浓度对反应的贡献, 结果如下图 Figure 2, 于 30  $\mu$ mol/LT 出现了拐点, 综合考虑用 40  $\mu$ mol/L。

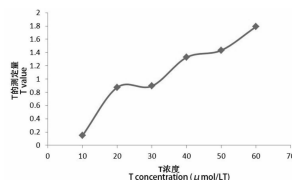


图 2 睾酮用量对酶活性的影响

Fig. 2 Effect of T concentration on enzyme activity

#### 3.1.3 酶用量的优化

固定 T 和 NADPH 的用量, 随着酶液的用量的增加 T 先下降后略上升, 当增加到 200  $\mu$ L 时不再下降, 因此, 选择 200  $\mu$ L 用量。

### 3.2 团羽铁线蕨提取物的初步考查

对团羽铁线蕨的提取, 采用 95% 乙醇进行提取, 回收乙醇后浸膏分散水中, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 得到 5 个部分, 查阅资料有报道<sup>[4,5]</sup>, 多设定考查了水提物部分和己烷提

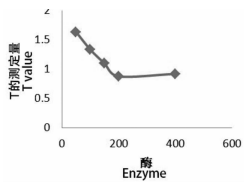


图3 酶用量的影响

Fig. 3 Effect of enzyme amount

取物部分。结果如下图4,石油醚部位和乙酸乙酯部均强于对照药。因此,有进一步研究的必要。

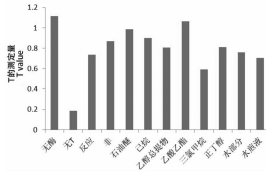


图4 团羽铁线蕨不同提取物的活性

Fig. 4 Determination of active site of *A. capillus-junonis*

### 3.3 毛细管电泳条件的优化

考查了区带电泳,灵敏度太低,不利于测定,换成胶束毛细管电泳,采用胶束推富集和大体积进样提高了灵敏度。胶束推扫富集(sweeping-MECC)为样品区过长且不含胶束相,运行缓冲液为胶束,样品向随电泳淌度向负极运动,胶束相则由负极向正极运动,实现了推扫富集,待分离物质在水相和胶束相中被多次分配而实现了分离。通过对电泳缓冲液、pH、SDS、甲醇、检测波长、运行电压、大体积进样进行了优化,电泳缓冲液我们考查了硼砂、磷酸盐、醋酸盐和 Tris 等体系,硼砂体系最好。pH 考查了 7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 结果 9.0 至 9.5 效果最好,最后选择了 9.2。SDS 考查了 20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$ ,随用量增加分离度加大,峰高增高。有机改性剂考查了甲醇、乙腈、异丙醇、正丁醇。甲醇的效果最好,检测波长考虑用 200、205、210 nm 时睾酮和二氢睾酮的末端吸收实现同时测定,结果在二氢睾酮的位置出现干扰,所以选择了睾酮的最大吸收峰 242 nm,二氢睾酮没有吸收,不能在一张图中反映出来。运行电压的选择,随电压的升高分离时间缩短,易产生焦耳热,易断流。稳定性考虑选择了 20 KV。进样时间考查 50、80、100、120 s 结果随进样时间的增加,峰面积和峰高均增加,100 s 时满足条件,设备运行稳定,120 s 运行易断流。最终确定了电泳条件,电泳图谱如下图 Figure 6。保留时间 6.249 为内标 IS 对羟基苯甲酸丙酯,9.226 为睾酮 T,8.164 和 8.622 为还原辅酶 NADPH,由于 NADPH 不纯,这两个峰不能确定是 NADPH 还  $\text{NADP}^+$ 。通

过条件的优化实现了  $5\alpha$ -还原酶活性测定,并应用于团羽铁线蕨提取物的活性筛选。

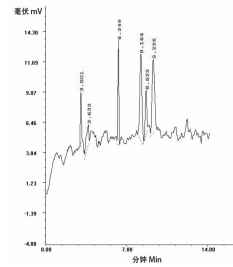


图5 毛细管电泳条件的优化

Fig. 5 Optimization of capillary electrophoresis conditions

## 4 结论

本实验建立了毛细管电泳法测定  $5\alpha$ -还原酶活性的方法,考查鼠肝脏  $5\alpha$ -还原酶催化睾酮反应活性通过对电泳条件的优化,10 min 内实现  $5\alpha$ -还原酶活性测定。毛细管电泳法用于  $5\alpha$ -还原酶活性测定,为药材有效成分的活性评价提供了评估方法。

### 参考文献

- Ranjan M, Diffley P, Stephen G, *et al.* Comparative study of human steroid  $5\alpha$ -reductase isoforms in prostate and female breast skin tissues: sensitivity to inhibition by finasteride and epristeride. *Life Sci*, 2002, 71: 115-126.
- Han BM (韩邦旻). Study of the androgen receptor isoforms in human prostate-the mechanism of formation, molecular structure and the significance in prostate. Shanghai: Fudan University, PhD, 2006.
- Jia Y (贾悦), Wang XD (王晓东), Cui YG (崔毓桂), *et al.* Roles of  $5\alpha$ -reductase in male reproduction. *J Reproduct Med* (生殖医学杂志), 2003, 12: 115-118.
- Song SS (宋姗姗), Yuan QY (袁倩颖), Xiong CM (熊朝梅), *et al.* Screening of effective fractions of *Adiantum capillus-junonis* Rupr. on experimentally induced benign prostatic hyperplasia in mice. *China Pharm* (中国药师), 2011, 7: 946-948.
- Nakane T, Arai Y, Masuda K, *et al.* Fern constituents: six new triterpenoids alcohols from *Adiantum capillus-veneris*. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47: 543-547.
- Wang CC, Cheng SF, Cheng HL, *et al.* Analysis of anabolic androgenic steroids in urine by full-capillary sample injection combined with a sweeping CE sacking method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405: 1969-1976.
- Shen HJ, Lin CH, *et al.* Comparison of the use of anionic and cationic surfactants for the separation of steroids based on MEKC and sweeping-MEKC modes. *Electrophoresis-An International Journal*, 2006, 27: 1255-1262.