

死亡^[10]。LC3 和 Bcl-1 是自噬正向调控相关蛋白,一些研究已经使用它们来检测自噬^[11]。本研究的结果表明,脊髓神经元在 H₂O₂ 处理后,LC3 和 Bcl-1 的表达上调。与此同时,流式凋亡和 CCK-8 的增殖结果表明凋亡增加,细胞增殖减慢。而干扰 NIX 的表达后,LC3 和 Bcl-1 的表达被抑制,凋亡减少,细胞增殖加快,这意味着干扰 NIX 可以通过抑制自噬减缓 H₂O₂ 诱导神经元损伤。

综上所述, H₂O₂ 通过促进 NIX 的表达介导自噬诱导大鼠神经元损伤,而干扰 NIX 抑制自噬促进神经元的存活。因此, NIX 有望成为恢复神经元功能一个靶点。

参考文献

- [1] 殷德振, 陈聪, 王鹏, 等. LncRNA CYTOR 对大鼠背脊髓神经元细胞损伤及炎症因子的影响 [J]. 河北医药, 2023, 45 (8): 1152-1156.
- [2] 丁铁群, 李喜功, 潘文明, 等. 脊髓损伤中线粒体自噬的作用及进展 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27 (35): 5727-5733.
- [3] NIE P, WANG H, YU D, et al. NIX Mediates Mitophagy in Spinal Cord Injury in Rats by Interacting with LC3 [J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42 (6): 1983-1994.
- [4] ANJUM A, YAZID M D, FAUZI D M, et al. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions and Underlying Recovery Mechanisms [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21 (20): 7533.
- [5] HU X, XU W, REN Y, et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2023, 8 (1): 245.
- [6] FIELD J T, GORDON J W. BNIP3 and Nix: Atypical regulators of cell fate [J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular cell research, 2022, 1869 (10): 119325.
- [7] NGUYEN-DIEN G T, KOZUL K L, CUI Y, et al. FBXL4 suppresses mitophagy by restricting the accumulation of NIX and BNIP3 mitophagy receptors [J]. The EMBO Jou, 2023, 42 (13): e112767.
- [8] YU D, LI M, NI B, et al. Bcl-2/E1B-19KD-Interacting Protein 3/Light Chain 3 Interaction Induces Mitophagy in Spinal Cord Injury in Rats Both In Vivo and In Vitro [J]. Journal of neurotrauma, 2018, 35 (18): 2183-2194.
- [9] FILOMENI G, DE ZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs [J]. Cell death and differentiation, 2015, 22 (3): 377-388.
- [10] SHI B, MA M, ZHENG Y, et al. mTOR and Beclin1: Two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. The Journal of Cellular Physiology, 2019, 234 (8): 12562-12568.
- [11] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery [J]. Cell, 2019, 177 (7): 1682-1699.

• 基础研究 •

基于体外微量反应评价某些甾醇类化合物对 5 α 还原酶的抑制作用

林 滨 蔡沓粟 何小蓉 何 宇 江 举

【摘 要】 目的 基于体外微量反应, 体外筛选有效的 5 α 还原酶抑制物。**方法** 从 SD 大鼠肝脏中获得 5 α 还原酶的粗酶, 建立体外微量反应体系, 通过反应前后睾酮量的变化来评价受试甾醇类化合物对 5 α 还原酶的抑制作用。**结果** 在反应体系中加入二甲基亚砜 (DMSO), 解决非那雄胺及受试甾醇类化合物在水相中溶解度低等的问题, 确保微量反应有效进行, 从而得到可靠的筛选结果。**结论** 羊毛甾醇在体外具有较好的 5 α 还原酶抑制效果, 或许可以成为新型的 5 α 还原酶抑制物。

【关键词】 5 α 还原酶; 非那雄胺; 体外; 脱发

【中图分类号】 R914 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)04-0091-04

基金项目: 福州市科学技术局医疗卫生项目 (2022-S-070); 福州市“十四五”临床专科培育建设项目整形外科 (20220303)

作者单位: 福州市皮肤病防治院, 福州 350025

通信作者: 江 举, Email: 846069532@qq.com

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.04.027

Evaluation of the inhibitory effects of certain sterol compounds on 5 α -reductase based on in vitro micro reactions

LIN Bin, CAI Dali, HE Xiaorong, HE Yu, JIANG Ju

Dermatology Hospital of FuZhou, Fuzhou, Fujian 350025, China

Corresponding author: JIANG Ju, Email: 846069532@qq.com

【Abstract】 Objective To screen effective inhibitors of 5 α -reductase in vitro, based on in vitro micro reactions. **Methods**

The crude enzyme of 5 α -reductase was obtained from the liver of SD rats, and then established a micro reaction system in vitro. The inhibitory effect of the tested sterol compounds on 5 α -reductase was evaluated by the changes in testosterone levels before and after the reaction. **Results** The addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) to the reaction system solved the problem of low solubility of finasteride and tested sterol compounds in the aqueous phase, ensuring effective trace reactions and obtaining reliable screening results. **Conclusion** Lanosterol has a good inhibitory effect on 5 α -reductase in vitro, and may become a new type of 5 α -reductase inhibitor.

【Key words】 5 α -reductase; finasteride; in vitro; hair loss

人体毛发部位的 5 α 还原酶将睾酮转化为具有生物活性的二氢睾酮 (DHT), 二氢睾酮是导致雄激素性脱发的主要因素。目前推荐的临床用于治疗雄激素性脱发的口服药物为非那雄胺, 该药物通过竞争性结合 5 α 还原酶从而抑制酶活性, 减少头皮部二氢睾酮生成, 达到治疗脱发的目的。5 α 还原酶具有 3 种同工酶, 其中 I 型酶和 II 型酶的主要功能是将睾酮转化为二氢睾酮。非那雄胺是人工合成的 4-氮杂甾体化合物, 是目前治疗雄激素性脱发的有效药物。有研究发现, 许多植物中分离出来的黄酮、三萜类化合物具有抑制 5 α 还原酶的作用^[1]。本文选择茶油中分离出来的某些甾醇类化合物作为筛选目标, 通过建立体外微量反应体系, 以非那雄胺为阳性对照药物, 以筛选有效的 5 α 还原酶抑制剂。

1 材料与方法

1.1 材料 色谱柱; 蔗糖 (麦克林); DTT (生工生物工程); EDTA (麦克林); Tris-HCl pH8.0 (上海源叶生物); SD 大鼠 (杭州医学院实验动物中心); 98% 睾酮 (上海吉至生化); 还原型辅酶 II (NADPH, 瑞士罗氏制药); 100% 甲醇 (默克); 非那雄胺 (麦克林); DMSO (Sigma); 羊毛甾醇 (上海阿拉丁); 环阿屯醇 (麦克林); 100% 乙醇 (国药集团); eppendorf 2 mL 离心管; 恒温箱; Merck Millipore 0.22 μ m 滤膜; 50 mL 玻璃匀浆器 (四川蜀牛); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (赛默飞) 等。

1.2 方法

1.2.1 匀浆液配制 配置 100 mL 匀浆液, 称取蔗糖 10.95 g、DTT 1.54 mg、EDTA 29.2 mg, 使

用 20 mmol/L Tris-HCl 100 mL pH8.0 的缓冲液溶解后放冰盘上备用。蔗糖为饱和溶液, 室温下容量瓶底部有少量蔗糖固体未溶解。

1.2.2 粗酶提取 取 SD 大鼠 1 只, 脱髓处死后迅速取出肝脏组织, 剥离可见脂肪组织 (可减少 BCA 蛋白定量的影响), 用上述匀浆液清洗组织后置于陶瓷研磨器中加入约 40 mL 匀浆液, 剪碎组织并转移至 50 mL 玻璃匀浆器中, 进一步研磨至肝脏组织全部呈浆状即可, 分装入两管 50 mL 离心管, 用剩余的匀浆液配平后离心。离心机须提前预冷至 4 $^{\circ}$ C, 6 000 g, 15 min 离心 1 次。取出离心管置于冰盘上, 清理掉最上层漂浮的白色脂肪。中间层即为粗酶, 最下层为离心沉淀下来的固状组织物, 将两管中间层取出, 置于一支新的 50 mL 离心管中混合均匀, 分装入 eppendorf 2 mL 离心管, 每管 1~1.5 mL。分装后迅速置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。上述提取方法参照崔心禹等^[2]的研究方法, 并进行部分调整。

1.2.3 BCA 蛋白浓度测定 标准曲线浓度设定 7 个浓度梯度: 0 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、1.75 mg/mL、2 mg/mL。粗酶原液稀释 16 倍为待测蛋白, 标准蛋白和待测蛋白均设置 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 10 min 后, 将 96 孔板置于酶标仪中进样检测, 波长 562 nm。线性关系回归方程 $Y=0.583\ 656X+0.097\ 755\ 6$, $R^2=0.999$, 提取的粗酶浓度为 24.672 mg/mL。

1.2.4 反应体系组成 20 mmol/L pH8.0 Tris-HCl 90 μ L; DMSO 210 μ L; 1.52 mg/mL 粗酶 500 μ L; 1 mmol/L 睾酮 50 μ L; 2 mmol/L NADPH

100 μL ; 75%乙醇(空白组)/非那雄胺(阳性对照组)/受试药物(实验组) 50 μL , 阳性对照组和实验组设 0.02、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32 $\mu\text{mol/L}$ 6 个浓度梯度。反应体系体积 1 mL, 分 0 min 和 30 min 两管。反应在 0 min 时间吸取 500 μL 液体加入 1 mL 甲醇淬灭反应, 剩余 500 μL 液体放 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 30 min 后加入 1 mL 甲醇淬灭反应。0 min 和 30 min 两组均有明显蛋白沉淀后, 置于离心机中 5 000 g, 室温下离心 6 min。用 5 mL 注射器吸取离心管上清液过 0.22 μm 滤膜, 注入液相进样小瓶中(不用内衬管), 密封待检测。

1.2.5 色谱条件 色谱柱 C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 不锈钢柱; 流动相: 甲醇/水 = 70/30; 柱温: 室温; 检测波长 242 nm; 流速为 1.0 mL/min; 进样体积 20 μL 。

1.2.6 5α 还原酶抑制率 为尽可能减小不同批次提取粗酶活性不同等因素对酶促反应的影响, 抑制效率计算采取如下方法进行校正。抑制率 = (阳性对照组或实验组反应前睾酮峰面积 - 阳性对照组或实验组反应后睾酮峰面积) / (空白组反应前睾酮峰面积 - 空白组反应后睾酮峰面积)

2 结果

2.1 非那雄胺抑制作用 非那雄胺组重复多次实验并排除实验假阳性数据后, 发现非那雄胺随着药物浓度提升呈现出明显抑制的趋势曲线, 抑制作用在 0.24 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最强, 之后继续提升浓度则无抑制作用。见图 1。

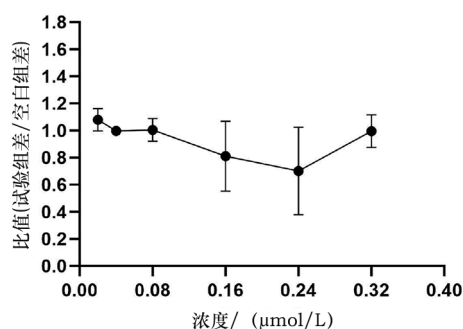


图 1 非那雄胺抑制作用曲线图

2.2 羊毛甾醇抑制作用 利用非那雄胺建立的 5α 还原酶抑制作用曲线, 绘制受试药物羊毛甾醇的抑制曲线与阳性对照组非那雄胺进行比较。受试药物羊毛甾醇虽然整体抑制效率低于非那雄胺, 但是呈现与非那雄胺类似的抑制曲线, 提示其具有较稳定的 5α 还原酶抑制作用。见图 2。

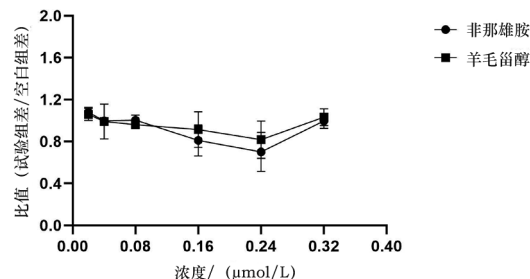


图 2 非那雄胺和羊毛甾醇抑制曲线图

2.3 环阿屯醇抑制作用 受试药物环阿屯醇对 5α 还原酶的抑制作用在各个浓度下大致呈现齐同水平, 在 0.02~0.24 $\mu\text{mol/L}$ 区间内没有呈现明显的抑制作用趋势, 提示其对 5α 还原酶无抑制作用。见图 3。

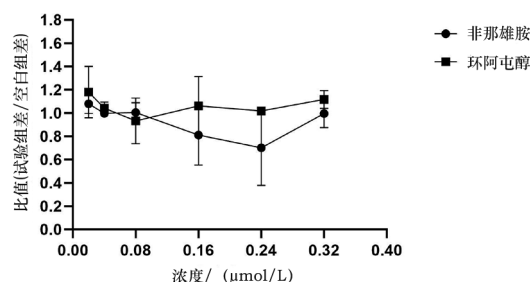


图 3 非那雄胺和环阿屯醇抑制曲线图

3 讨论

反应体系中 NADPH 作为微量反应的辅酶, 起到向睾酮“递氢”的作用, 从而实现睾酮向二氢睾酮的转化过程。NADPH 自身在酸性溶液中不稳定, 容易被氧化成 NADP^+ , 本研究在 pH8.0 的碱性环境中建立微量反应体系, 避免辅酶的不稳定对酶促反应造成负面影响, 旨在通过非那雄胺在反应体系中的抑制作用来评价其他受试药物。有研究报道^[3], 实验通过 pH5.5 和 pH7.5 来调控 5α 还原酶中 I 型酶和 II 型酶的活性来区分两种酶的活性作用, 由于 II 型 5α 还原酶采用 pH5.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 出现了睾酮抑制率为负数的情况, 即睾酮的量反应后比反应前多, 本研究利用液相色谱检测的样品中也发生过类似的情况考虑可能的原因是辅酶被氧化后, 微量反应出现了逆向反应, 但是目前较少相关报道, 有待进一步的研究证实。

由于 SD 大鼠肝脏较附睾等组织大, 提取的酶液量较多, 可以减少实验动物。匀浆液提取的粗酶蛋白浓度在 24 mg/mL 以上, 使用反应蛋白浓度太高, 在上述非那雄胺浓度下其抑制作用无法体现出

来。经过反复试验,在兼顾 DMSO 环境下使用 1.52 mg/mL 的抑制作用较为有效。另外,要避免 2 次离心造成酶活性下降,尤其在 DMSO 环境中 2 次离心后酶活性影响更甚。

反应体系中粗酶蛋白属于水溶性物质,而非那雄胺以及其他受试药物则易溶于有机相,难溶于水相。体系中的酶和酶的抑制物的溶解性质是相背离的,因此,本研究在反应系统中创新性的加入 DMSO 来弥合,两者“背离”的问题。经过反复实验,在 DMSO 环境下同时兼顾粗酶活性,最后 DMSO 添加量为总反应体积的 21%,这是一个比较好的平衡点。根据 LOFTSSDN 等^[4]提供的文献资料,非那雄胺在纯水水中的溶解度按照雅尔考斯基方程计算的结果是 10 $\mu\text{mol/L}$ 。结合本文,非那雄胺在 0.32 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时没有抑制作用,可能是非那雄胺在反应体系中处于过饱和溶液的状态,0.32 $\mu\text{mol/L}$ 则进入了过饱和溶液的“不稳定区”,药物被迅速析出晶体,造成溶解量大幅减少。

通过 3 组数据估算筛选体系中非那雄胺对粗酶的半抑制浓度 (IC_{50})。实验重复 3 次,利用空白组、非那雄胺组反应前后睾酮峰面积差值,通过 SPSS 软件拟合曲线的方式来估算半抑制浓度,最终 2 次曲线模型拟合效果好,并通过曲线估算筛选体系中非那雄胺的半抑制浓度为 0.304 $\mu\text{mol/L}$ 。有报道^[5],通过体外筛选实验获得非那雄胺的半抑制为 212 nmol/L,考虑因实验方法的不同导致的

偏差。另外,本研究中的羊毛甾醇和环阿屯醇则拟合计算失败,可能是抑制效能不够的原因。

本研究筛选的羊毛甾醇和环阿屯醇 2 个甾醇类化合物,从抑制曲线得出羊毛甾醇的抑制作用与非那雄胺相似度较高,虽然整体效能不如人工合成的非那雄胺,考虑羊毛甾醇为天然存在的甾醇类化合物,不管在水相还是有机相中的溶解度均不如非那雄胺。

综上,羊毛甾醇在体外具有较好的 5 α 还原酶抑制效果,羊毛甾醇或许可以成为新型的 5 α 还原酶抑制物。

参考文献

- [1] 郑瑞蓉, 欧阳倩兮, 刘子瑶. 天然 5 α -还原酶抑制剂用于改善良性前列腺增生的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (4): 858-867.
- [2] 崔心禹, 崔心禹, 夏琛, 等. 油茶叶提取物的 5 α -还原酶抑制活性及化学成分分析 [J]. 食品工业科技, 2021, 42 (19): 97-105.
- [3] 李慕春, 张显文, 王苗. 12 种植物的提取物对 5 α -还原酶的抑制活性研究 [J]. 中南药学, 2017, 15 (11): 1536-1540.
- [4] LOFTSSON T, HREINSDOTTIR D. Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: a technical note [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2006, 7 (1): 29-32.
- [5] ZHANG R W, ZHANG X Q. Inhibitory activities of some traditional Chinese herbs against testosterone 5 α -reductase and effects of cacumen platycladi on hair re-growth in testosterone-treated mice [J]. J Ethnopharmacol, 2016 (177): 1-9.

• 基础研究 •

miR-149-3p 通过调控 NIS 促进甲状腺乳头状癌增殖和迁移

谢文竣 李华水 林 强

【摘要】 目的 探讨 miR-149 通过调控钠/碘共同转运体 (Sodium/Iodide Symporter, NIS) 调控甲状腺乳头状癌 (Papillary Thyroid Carcinoma, PTC) 细胞增殖和迁移能力。**方法** 对选取的 GSE113629 转录组数据进行数据处理, 筛选其中表达差异较为明显且在 PTC 组织中表达明显增高的 MicroRNA (miRNA) 作为研究分子。通过在线数据库预测目标 miRNA 的下游靶基因, 随后检测调控目标 miRNA 表达后靶基因变化情况并观察靶基因水平改变对甲状腺癌细胞生物学行为的影响。**结果** 在 GSE112629 数据集中, 研究发现 miR-149-3p 在 PTC 组织中高表达。通过对 miR-149-3p 预测靶基因进行维恩分析, 我们发现 NIS 是 miR-149-3p 的重要靶基因。通过分析 GEPIA 和 UALCAN 数据库, 我们发现 NIS 在 PTC 样本中

基金项目: 福建省卫生健康委青年科研基金 (2020QNA007)

作者单位: 福建省立医院甲状腺瘤外科, 福州 350001

通信作者: 李华水, Email: wuxingli83@163.com

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.04.028