

醛酮还原酶AKR1Cs的表达纯化及其
催化还原福美司坦的作用研究*孔 熙¹⁾ 陶思雯²⁾ Frank Heinrich WIELAND¹⁾ 杨佑喆¹⁾
Alexander Tobias TEICHMANN¹⁾ 马 根³⁾ 陈木兰⁴⁾ 解河崧⁴⁾
王 海⁴⁾ 汪贵林¹⁾ 万闰兰^{1)**}⁽¹⁾ 西南医科大学附属医院四川省妇科及乳腺疾病治疗中心, 泸州 646000; ⁽²⁾ 泸州市妇幼保健院 (泸州市第二人民医院), 泸州 646000;
⁽³⁾ 成都百奥森斯科技有限公司, 成都 610200; ⁽⁴⁾ 西南医科大学临床医学院, 泸州 646000

摘要 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 芳香化酶抑制剂 (AIs) 是辅助治疗乳腺癌的重要手段. 福美司坦 (4-OHA) 作为固醇类 AIs, 不可逆地抑制芳香化酶的活性, 可有效治疗乳腺癌. 多项研究表明, 醛酮还原酶 (AKR1Cs) 参与许多固醇类及其衍生物的代谢而间接治疗多种激素依赖性疾病, 从而成为治疗靶点. 我们推测 AKR1Cs 可能参与 4-OHA 的特异性代谢而影响其疗效. 本文通过体外原核表达纯化成功得到 4 种具有酶活性的 AKR1Cs 蛋白亚型, 采用荧光法检测 AKR1Cs 对 4-OHA 的催化效率, 并检测 AKR1Cs 酶抑制剂对其催化还原 4-OHA 的影响. 结果发现 4 种 AKR1Cs 蛋白亚型均能催化还原 4-OHA, 其中 AKR1C4 能快速还原 4-OHA, 转化率几乎为 100%, 其次是 AKR1C3 和 AKR1C1, 转化效率为 30% 左右, AKR1C2 对 4-OHA 的还原性最低, 转化效率只有 20% 左右. 同时抑制剂对 AKR1Cs 表现出明显的剂量-效应关系, 非线性回归分析得到抑制剂对 AKR1C3 和 AKR1C4 的亲合性较强, IC_{50} 值分别为 47.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 54.68 $\mu\text{mol/L}$, 而对 AKR1C1 和 AKR1C2 的抑制能力相对较弱, IC_{50} 值分别为 77.37 $\mu\text{mol/L}$ 和 82.24 $\mu\text{mol/L}$. 以上结果表明, 4-OHA 能被肝脏中特异性表达的 AKR1C4 快速代谢, 从代谢角度揭示了 4-OHA 口服用药效果不理想的原因. 因此, 本研究阐明了 4-OHA 肠胃外或经皮给药的优势并奠定了理论基础, 也为今后利用纳米药物载体和开展该药物衍生物的深入研究提供了新思路.

关键词 AKR1Cs, 福美司坦, 转化效率, IC_{50} **中图分类号** Q554+.2**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0204

乳腺癌是一种严重影响女性身心健康甚至危及生命的最常见恶性肿瘤之一^[1-3], 发病率随着年龄增长而增高, 绝经后乳腺癌患者占绝大多数, 且约 50%~60% 的乳腺癌患者属于雌激素依赖型 (ER+). 芳香化酶抑制剂 (新) 辅助治疗是当前治疗乳腺癌特别是治疗绝经后 ER+ 乳腺癌的有效方法. 福美司坦 (4-hydroxyandrostenedione, 4-OHA) 作为第二代不可逆的甾体类芳香化酶抑制剂, 广泛用于治疗绝经后 ER+ 乳腺癌^[4], 具有很好的系统耐受性、药效性, 副作用非常小. 4-OHA 开发的肌肉注射制剂 (商品名: 兰他隆) 能有效治疗绝经后晚期 ER+ 乳腺癌, 但存在局部 (注射位点) 耐受性问题, 而口服制剂则代谢速度较快, 基本无疗效, 这些都限制了 4-OHA 在临床上的应用. 因此需要明确 4-OHA 的代谢途径, 以期研发 4-OHA 新剂型新

用药方式.

根据 4-OHA 的结构特点, 4-OHA 在人体中可能存在几种主要代谢方式^[5] (图 1), 包括 4 位羟基的直接糖醛酸化或磺基化的二相代谢以及 17 位还原、3 位还原、4-5 位还原等一相代谢. 人的 4 种醛酮还原酶 (AKR1Cs) 属于醛酮还原酶家族 (Aldo-keto reductases, AKRs) 的亚家族之一^[6], 包括 AKR1C1 (20 α (3 α)-HSD)、AKR1C2 (type33 α

* 西南医科大学附属医院启动基金 (16169、16248), 泸州市人才引进专项项目 (02-00040055、02-00040108), 西南医科大学校级重点项目 (2018-ZRZD-004) 和四川省大学生创新训练项目 (S201910723092) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 15196645714, E-mail: wrl.cdibcas@aliyun.com

收稿日期: 2019-08-31, 接受日期: 2019-10-31

(17 β)-HSD)、AKR1C3 (type2 3 α -HSD)、AKR1C4 (type1 3 α -HSD) 4种亚型. 这些酶都具有NADPH依赖型的3-、17-和20-酮基还原酶活性, 也具有3 α -、17 β -和20 α -的羟基化类固醇氧化酶活性^[7], 以还原反应为主^[8]. 多项研究^[9-10]表明AKR1Cs参与许多固醇类及其衍生物的代谢而间接治疗多种激素依赖性疾病, 由此推测AKR1Cs对4-OHA的代谢起重要作用.

4种AKR1Cs亚型, 其基因均位于10号染色体的p15-p14上, CDS序列均为978 bp, 其蛋白质平均分子量约为34~42 ku^[7]. 它们的氨基酸序列具有高度一致性, 相似度至少为84%, 均在细胞质中

表达^[11]. AKR1C1、AKR1C2、AKR1C3在各组织中均有表达, 表达量的高低有所差异, 其中AKR1C3在乳腺组织和前列腺组织中表达量非常高, AKR1C4在肝组织中特异表达^[7]. 因此本研究构建载体、原核表达、纯化得到4种AKR1C1~AKR1C4重组蛋白质, 利用荧光法鉴定酶活性、测定4种酶对4-OHA的催化还原作用, 另加入酶抑制剂检测抑制效应, 旨在证明AKR1Cs是否催化4-OHA的还原反应, 不同酶亚型催化效应是否存在差异, 从而阐释4-OHA不同用药方式存在代谢差异的原因, 也为开发4-OHA新药提供理论依据.

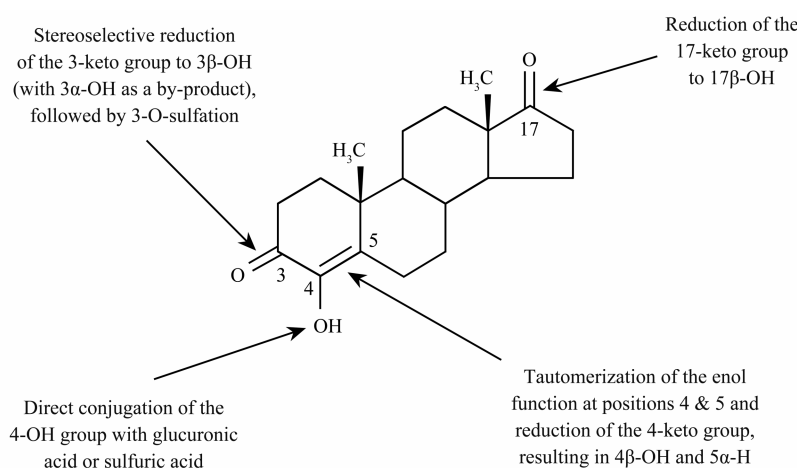


Fig. 1 The main mode of 4-OHA biotransformation *in vivo*^[5]

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; pET28a载体为成都百奥森斯科技有限公司保存; 在上海生工生物工程有限公司合成AKR1C1~AKR1C4 CDS序列, 并构建到了pcDNA3.1载体上, 保存于本实验室; T4连接酶和限制性内切酶购自Thermo公司; 质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自OMEGA公司; 蛋白质分子量标记和DNA分子量标记购自北京全式金生物技术有限公司; 4-OHA、氟灭酸 (flufenamic acid) 购自艾览化工科技有限公司; 酚酞 (phenolphthalein)、双氢睾酮 (DHT) 购买自上海

源叶科技有限公司; 96孔黑色酶标板、Ni-NTA琼脂糖树脂、IPTG、卡那霉素、氯霉素购自上海生工生物工程有限公司; NADPH-Na4和NADP-Na购自德国Bio-Froxx公司; 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体的构建

根据目的基因序列设计引物 (表1), 以含有AKR1C1~AKR1C4目的片段的pcDNA3.1载体作为模板进行PCR扩增, 得到目的片段.

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence	Restriction enzyme
AKR1C1-F	attgcgagatctatggttcgaaatc	<i>Bgl</i> II
AKR1C2-F	attgcgagatctatggttcgaaatc	<i>Bgl</i> II
AKR1C3-F	attgcgggattccatggttcgaaacac	<i>Bam</i> HI
AKR1C4-F	attgcgagatctatggttcgaaatc	<i>Bgl</i> II
Universal primer-R	tagaaggcacatcgagg	<i>Xho</i> I

PCR产物在1.5%琼脂糖电泳, 切胶回收目的条带并与pET28a载体同时进行双酶切与酶切产物回收, 用T4连接酶与pET28a载体进行连接, 反应条件为16℃过夜. 将连接产物转入DH5α大肠杆菌感受态, 经卡那霉素培养筛选后挑取3个阳性克隆, 扩大培养提取质粒后进行双酶切验证, 将双酶切验证的阳性克隆送至成都擎科生物科技有限公司进行测序验证. 把鉴定正确的质粒分别命名为pET28a-AKR1C1、pET28a-AKR1C2、pET28a-AKR1C3、pET28a-AKR1C4.

1.2.2 蛋白质诱导表达及纯化

将构建好的表达载体转入*E. coli* BL21 (DE3) 中, 挑取单克隆接种至含50 mg/L卡那霉素的LB培养基中, 37℃、220 r/min培养过夜. 次日, 以1:100接种到100 ml TB培养基中扩大培养, 37℃培养至 $A_{600}=0.4\sim0.6$, 加入0.1 mmol/L的IPTG, 25℃诱导表达12 h, 离心收集菌体. 将收集的菌体重悬于破碎液(500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L PBS, pH 7.4), 进行超声波裂解, 取上清和沉淀进行SDS-PAGE分析, 判断目的蛋白质的表达形式. 确定目标蛋白质以可溶上清形式进行表达后, 使用Ni-NTA琼脂糖树脂进行纯化, 梯度洗脱, 12% SDS-PAGE电泳检测纯化效果以及BCA法进行蛋白质浓度测定.

1.2.3 荧光法^[12-14]测定AKR1Cs与4-OHA、DHT的反应效率

200 μl 反应体系: 100 mmol/L PBS缓冲液(pH 7.4), 5 mmol/L硫酸铵, 0.2 mmol/L NADPH, 24 μg AKR1C1~AKR1C4蛋白酶, 固定底物浓度为50 μmol/L. 在冰上避光配制好后, 立即放入37℃水

浴0、5、10、15、20、25、30、60、90、120 min. 反应完成后, 加入600 μl 0.5 mol/L HCl, 60℃水浴15 min, 终止反应. 冰浴冷却后加入2 ml 6 mol/L NaOH (含10 mmol/L 咪唑), 37℃水浴30 min, 激发NADP产生荧光. 每个样品分别取150 μl于96孔板中, 通过荧光检测器, 检测Ex360 nm/Em460 nm荧光强度. 以去离子水代替NADPH做空白对照, 以DHT代替4-OHA做阳性对照.

反应条件同上, 用去离子水代替蛋白酶, NADP (0~200 μmol/L) 代替NADPH, 以NADP浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程, 由方程求得NADP生成量, 计算反应效率.

1.2.4 抑制剂对AKR1Cs催化还原4-OHA、DHT的影响

选择氟灭酸为AKR1C1~AKR1C3的抑制剂^[11], 以酚酞为AKR1C4的抑制剂^[11], 基本反应体系同1.2.3, 控制抑制剂浓度为0、0.5、1、5、10、20、40、80、100、160 μmol/L. 反应条件、检测及计算方法同1.2.3.

2 结果与分析

2.1 AKR1Cs表达载体的构建

AKR1Cs基因的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见1 000~2 000 bp之间有特异条带(图2a), 大小与预期相符. 目的基因经双酶切后连接转化, 挑选阳性克隆经双酶切验证(图2b). 从图中可以看出, 经双酶切后, 分别得到与载体和目的基因大小一致的2条带, 初步验证正确, 随后送公司测序, 序列及阅读框正确.

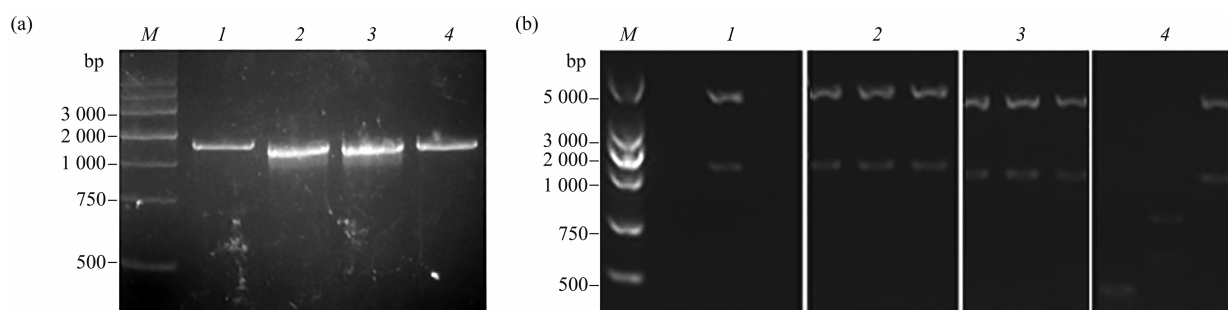


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of AKR1Cs fragment and double enzyme digestion verification of recombinant vector

(a) M: DNA marker; 1: AKR1C1 fragment; 2: AKR1C2 fragment; 3: AKR1C3 fragment; 4: AKR1C4 fragment. (b) M: DNA marker; 1: pET28a-AKR1C1 after *Bgl*III/*Xho*I digestion; 2: pET28a-AKR1C2 after *Bgl*III/*Xho*I digestion; 3: pET28a-AKR1C3 after *Bam*HI/*Xho*I digestion; 4: pET28a-AKR1C4 after *Bgl*III/*Xho*I digestion.

2.2 AKR1Cs蛋白的原核表达及纯化

用IPTG诱导表达重组工程菌,经Ni-NTA琼脂糖树脂亲和层析分离纯化后,取少量样品进行SDS-PAGE电泳及考马斯亮蓝染色(图3),35~45 ku之间有明显条带,与AKR1Cs的分子质量相

当,为目的蛋白质,其纯度达90%以上,使用20 mmol/L PBS, pH 7.4, 500 mmol/L NaCl进行透析换液去除咪唑,之后使用BCA方法测定蛋白质浓度用于后续酶活测定.

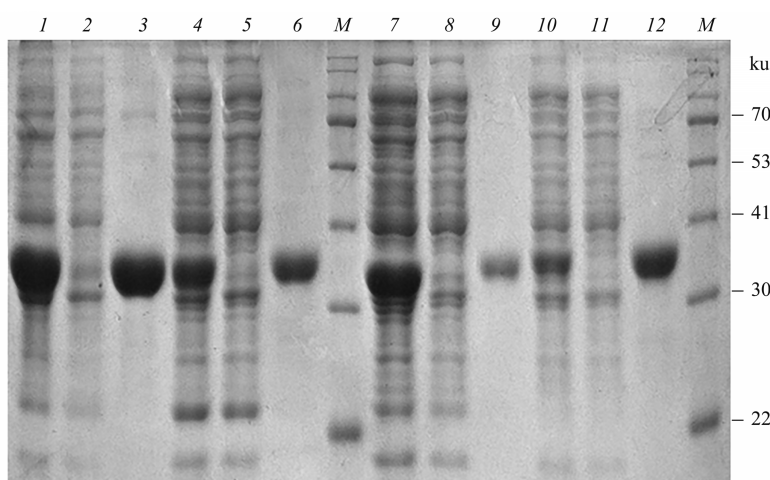


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant AKR1Cs

M: Protein marker; 1-3: Lysate/ flow-through/ eluted-fraction of AKR1C1; 4-6: Lysate/ flow-through/ eluted-fraction of AKR1C2; 7-9: Lysate/ flow-through/ eluted-fraction of AKR1C3; 10-12: Lysate/ flow-through/ eluted-fraction of AKR1C4.

2.3 AKR1Cs对4-OHA转化效率的研究

根据文献报道^[15],4种AKR1Cs蛋白质亚型均能催化DHT还原,体现 $3\alpha/\beta$ -HSD活性,形成 3α -雄甾烷二醇(3α -diol)和 3β -雄甾烷二醇(3β -diol)产物;其中AKR1C2和AKR1C4体现较高的 3α -HSD活性,AKR1C4还体现较高的 3β -HSD活性,二者催化效率较高,以AKR1C4为最甚;而AKR1C1和AKR1C3的 3α -HSD活性较弱,AKR1C1的 3β -HSD活性高于 3α -HSD活性.本实验结果发现AKR1C4与DHT反应速率最快,其次是AKR1C2和AKR1C1,但它们的转化效率都在60%~70%.而AKR1C3的反应速率和转化效率最低,对DHT的转化效率只有30%左右(图4e-h).以上结果与文献报道^[15]结果一致,说明我们原核表达纯化的4个酶均具有还原酶活性.

同样,在相同反应条件下,它们对4-OHA的转化效率差异显著(图4a~d).随着时间的推移,AKR1C4快速还原4-OHA,转化率最高,几乎为

100%,其次是AKR1C3和AKR1C1,转化效率为30%左右,AKR1C2对4-OHA的还原性最低,转化效率只有20%左右.在反应30 min时,AKR1C1和AKR1C2对DHT的转化率都明显高于4-OHA,说明这2个酶对DHT的亲和力更强;而AKR1C3对2个底物的催化效率相差不大,由此推测AKR1C3对4-OHA的还原能力与对DHT一样,体现 $3\alpha/\beta$ HSD活性;AKR1C4还原DHT的速率很快,几分钟就达到平衡状态,而AKR1C4还原4-OHA则具有时间效应,因此推测AKR1C4在还原DHT和4-OHA时所表现出的 $3\alpha/3\beta$ 活性比率不同.4种AKR1Cs蛋白质亚型对4-OHA的催化效率高低为AKR1C4>AKR1C1=AKR1C3>AKR1C2,而催化DHT还原的效率则为AKR1C4>AKR1C2>AKR1C1>AKR1C3.这样说明在催化不同底物时,尽管是还原相同的化学键,但由于相邻基团的差异,AKR1Cs同样的活性位点功能可能发生改变.

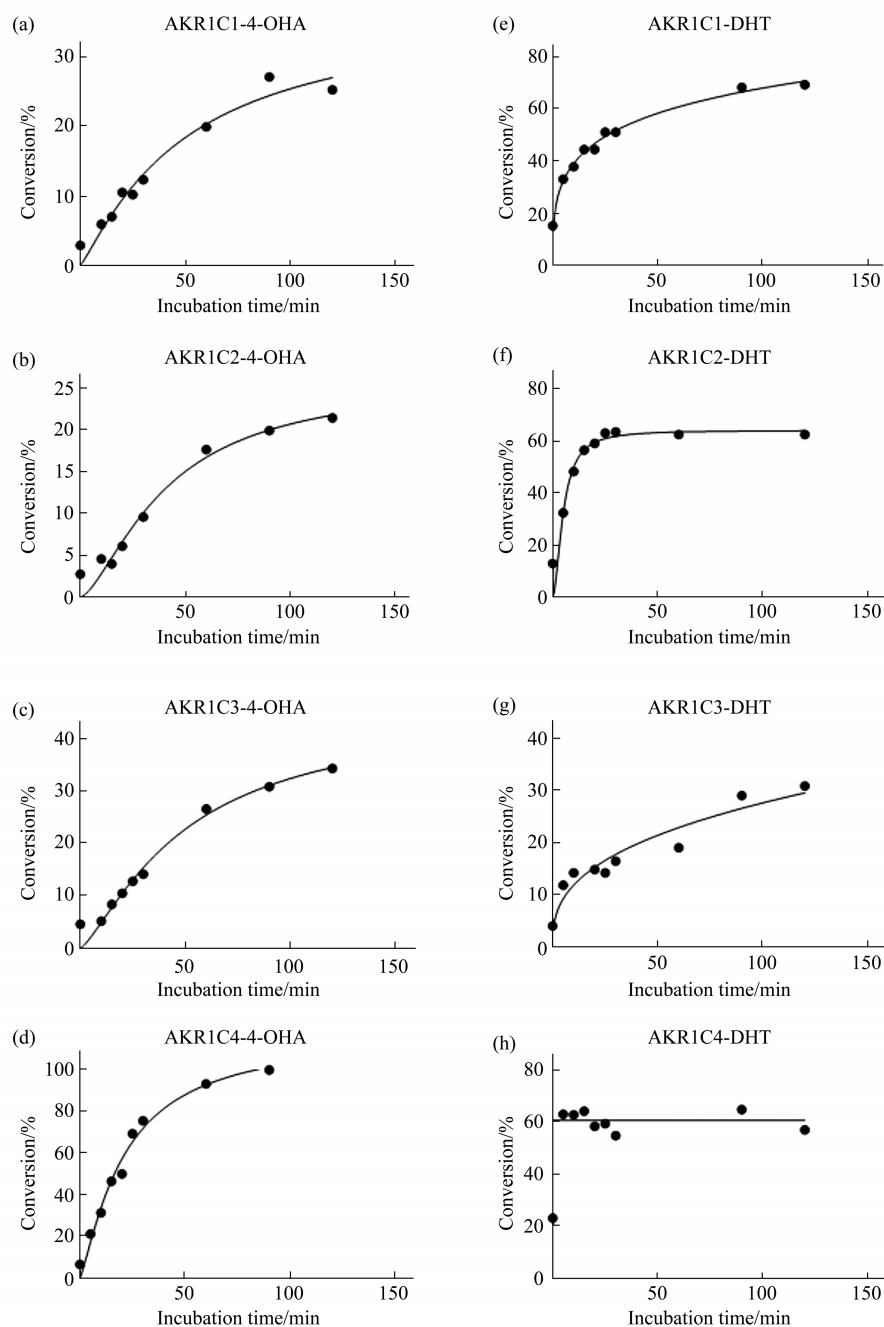


Fig. 4 Effect of reaction time on conversion efficiency of AKR1Cs

(a)–(d): Conversion efficiency of AKR1C1–AKR1C4 for 4-OHA at different time; (e)–(h): Conversion efficiency of AKR1C1–AKR1C4 for DHT at different time.

2.4 抑制剂对AKR1Cs催化4-OHA的影响

根据文献报道^[11, 15], 酚酞能够对4种AKR1Cs都有抑制作用, 其中与AKR1C4的亲合力最强, 因为酚酞能够特异性抑制AKR1C4的3 α -HSD活性, 氟灭酸对AKR1C1~AKR1C3是强有效抑制剂, 但其对AKR1C4亲合力较弱, 对AKR1Cs 3 α -/3 β -

HSD活性具有相同抑制效果. 因此我们选择氟灭酸为AKR1C1~AKR1C3的抑制剂, 以酚酞为AKR1C4的抑制剂. 以DHT为对照, 通过比较 IC_{50} 可知氟灭酸均抑制AKR1C1~AKR1C3对DHT的还原反应, 其中对AKR1C3和AKR1C1的抑制效果相似, 以AKR1C3抑制作用最强, 对AKR1C2的

抑制效果最差 (图5), 与文献结果^[15]一致. 同样, 氟灭酸也能抑制 AKR1C1~AKR1C3 对 4-OHA 的还原反应, 存在明显的剂量-效应关系, 且不同酶抑制效果差异与 DHT 相似, 也为 AKR1C3>AKR1C1>AKR1C2, 但总体 IC_{50} 值偏高, 由此推测 AKR1C1~AKR1C3 对 4-OHA 的还原反应与对 DHT 一样, 体现 $3\alpha/\beta$ HSD 活性, 但低于对 DHT 的还原能力.

如图 5d、5h 所示, 酚酞对 AKR1C4 还原 4-OHA 的抑制效应与 DHT 相近, 其 IC_{50} 略低于 DHT, 且当酚酞浓度达到 $100 \mu\text{mol/L}$ 时, 几乎完全抑制 AKR1C4 对 4-OHA 的还原反应, 抑制效果略高于对 DHT. 由此说明 AKR1C4 对 4-OHA 的还原也体现 $3\alpha/\beta$ HSD 活性, 且对 4-OHA 可能更倾向于一种 3α 或是 3β HSD 活性, 易被酚酞所抑制.

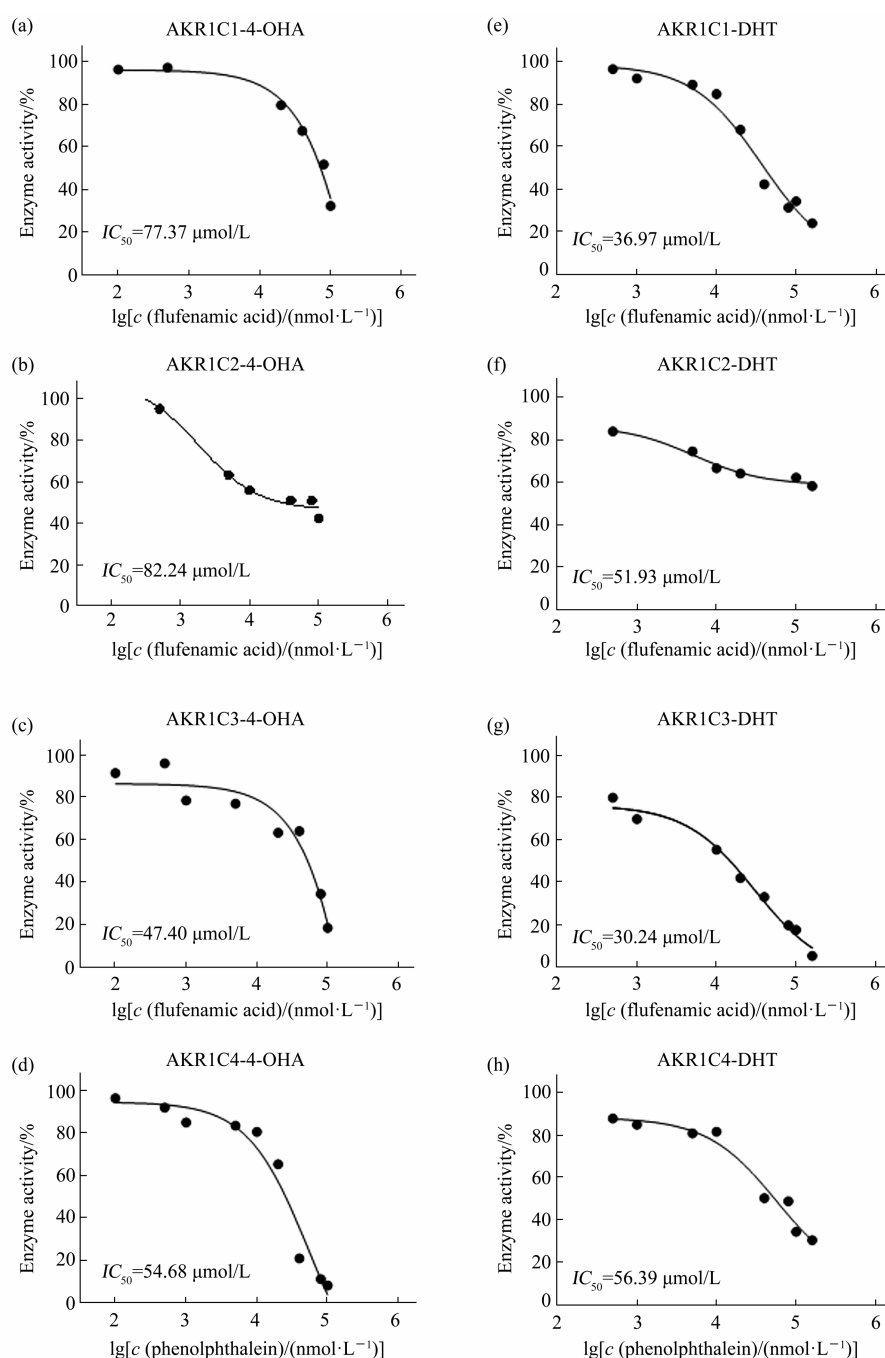


Fig. 5 Effect of inhibitor concentration on AKR1Cs enzyme activity

(a)–(d): Inhibitory effect of different concentration inhibitors on 4-OHA catalyzed by AKR1C1–AKR1C4; (e)–(h): Inhibitory effect of different concentration inhibitors on DHT catalyzed by AKR1C1–AKR1C4.

3 讨 论

我们的研究发现, 4种AKR1Cs蛋白亚型对4-OHA的催化效率不尽相同, 这可能与各个酶的主要活性偏好性不同相关, 对于不同的底物, 体现出不同的酶活偏好性. 如文献^[15]报道针对4种DHT酶体现出不同程度的3 α /3 β HSD活性, 其中3 α -HSD活性大小比较为AKR1C4(+++++) > AKR1C2(+++++) > AKR1C1 > AKR1C3, 3 β -HSD活性大小比较则为AKR1C4(+++) > AKR1C1(++) > AKR1C3 > AKR1C2; 而对治疗骨质疏松症的 Δ 5(10)-3-酮基类固醇替勃龙(Tibolone)的还原特性则不同, 仅AKR1C4和AKR1C3具有3 α -HSD活性, 且AKR1C4(+++++) > AKR1C3(+); 4个酶均具有3 β -HSD活性, 活性大小为AKR1C2(+++++) > AKR1C1(+++) > AKR1C4(++) > AKR1C3(+)^[16]. 除此之外, AKR1Cs不同亚型还体现其他特殊酶活性, 如AKR1C1具有20 α 还原功能, 将孕酮转化为失活的20 α -双氢孕酮^[17], AKR1C3具有17 β -HSD, 将雄烯二酮(AD)、5 α -雄甾烷二酮、雄酮分别还原为睾酮(T)、DHT、3 α -diol^[18]. 因此不同亚型的AKR1Cs对4-OHA的催化还原效率差异, 除与酶本身活性特点有关外, 也与4-OHA本身的结构特点有关, 可能将产生不止3 α -羟基产物或3 β -羟基产物, 也可能产生17 β -羟基产物, 具体还有待进一步研究.

本研究通过比较AKR1Cs对4-OHA和DHT的催化效率, 以及抑制剂的抑制效应, 初步确定4种AKR1Cs酶亚型对4-OHA具有3 α /3 β -HSD活性, 这与对结构相近的AD催化还原结果不同. 4种AKR1Cs蛋白亚型均不能还原AD的3位羰基^[7], 这是由于3位羰基与4, 5位双键形成了稳定的共轭结构, 不易直接被还原, 只有AKR1C3在17位把AD催化还原为T之后, 当SRD5A1/2将4, 5位双键还原, AKR1C1/2/4才能对3位产生还原作用^[19]. 与AD相比, 4-OHA在4位上多了一个羟基, 能与4, 5位的双键形成烯醇式结构, 相较于共轭结构不稳定, 这为AKR1Cs在3位发生还原作用提供了可能性. 由此说明4-OHA中4位羟基的存在, 将有助于AKR1Cs行使功能, 催化还原产生丰富的代谢产物.

另外, 4种AKR1Cs酶对4-OHA的催化效率不同, 而4种酶在不同器官组织中的表达分布也有差异. 因而从代谢角度来看, 4-OHA的不同施用方式

将产生不同的吸收利用效果, 产生不同的疗效. 如在肝脏中4种酶均有表达, 且催化效率较高的AKR1C4仅在肝脏中特异性表达, 这从一定程度上解释了为什么4-OHA口服代谢速率远高于肌肉注射, 故而不能口服用药. 4-OHA能被皮肤直接吸收, 局部涂抹或许将成为替代肌肉注射的新用药方式, 后续将进一步研究论证, 以期改进4-OHA给药途径, 开发新药. 该研究也为利用纳米药物载体和开展该药物衍生物的深入研究提供新思路.

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 2009, **59**(4): 225-249
- [2] Fan L, P E Goss, K Strasser-Weippl. Current status and future projections of breast cancer in asia. *Breast Care (Basel)*, 2015, **10**(6): 372-378
- [3] Chaturvedi M, K Vaitheeswaran, K Satishkumar, *et al.* Time trends in breast cancer among indian women population: an analysis of population based cancer registry data. *Indian J Surg Oncol*, 2015, **6**(4): 427-434
- [4] Goa L R, Wiseman K L. Formestane: a review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of postmenopausal breast cancer. *Drug Evaluation*, 1996, **9**(4): 292-306
- [5] P E Lønning, Geisler J, D C Johannessen, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of formestane in breast cancer patients. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2001, **77**(1): 39-47
- [6] Mindnich R D, T M Penning. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Human Genomics*, 2009, **3**(4): 362-370
- [7] T M PENNING, M E BURCZYNSKI, Joseph M JEZ, *et al.* Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem. J.* (Printed in Great Britain), 2000, **351**(Pt 1): 67-77
- [8] Cooper W C, Y Jin, T M Penning. Elucidation of a complete kinetic mechanism for a mammalian hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) and identification of all enzyme forms on the reaction coordinate: the example of rat liver 3 α -HSD (AKR1C9). *J Biol Chem*, 2007, **282**(46): 33484-33493
- [9] Penning T M, Jin Y, Steckelbroeck S, *et al.* Structure-function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, **215**(1-2): 63-72
- [10] Blouin K., Veilleux A, Luu-The V, *et al.* Androgen metabolism in adipose tissue: recent advances. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, **301**(1-2): 97-103
- [11] Steckelbroeck S, Oyesanmi B, Jin Y, *et al.* Tibolone metabolism in human liver is catalyzed by 3 α /3 β -hydroxysteroid

- dehydrogenase activities of the four isoforms of the aldo-keto reductase (AKR)1C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, **316**(3): 1300-1309
- [12] Beranič N, Stefane B, Brus B, *et al*. New enzymatic assay for the AKR1C enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 2013, **202**(1-3): 204-209
- [13] Lowry O H, Carter J G. Stabilizing the alkali-generated fluorescent derivatives of NAD and NADP. *Anal Biochem*, 1974, **59**(2): 639-642
- [14] 陈修平, 石京山. HPLC-荧光法测定醛糖还原酶的活性. *中国药理学通报*, 2012, **28**(10): 1472-1475
- Chen X P, Shi J S. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, **28**(10): 1472-1475
- [15] Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, *et al*. Human cytosolic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. *J Biol Chem*, 2004, **279**(11): 10784-10795
- [16] Steckelbroeck S, Jin Y, Oyesanmi B, *et al*. Tibolone is metabolized by the 3 α /3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four human isozymes of the aldo-keto reductase 1C subfamily: inversion of stereospecificity with a $\Delta^5(10)$ -3-ketosteroid. *Mol Pharmacol*, 2004, **66**(6): 1702-1711
- [17] Rizner T L, Smuc T, Ruprecht R, *et al*. AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, **248**(1-2): 126-135
- [18] Adeniji A O, M Chen, T M Penning. AKR1C3 as a target in castrate resistant prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, **137**: 136-149
- [19] Penning T M, M Chen, Y Jin. Promiscuity and diversity in 3-ketosteroid reductases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, **151**: 93-101

Expression and Purification of AKR1Cs and Its Catalytic Reduction Effects on Formestane*

KONG Xi¹⁾, TAO Si-Wen²⁾, Frank Heinrich WIELAND¹⁾, YANG You-Zhe¹⁾,
Alexander Tobias TEICHMANN¹⁾, MA Gen³⁾, CHEN Mu-Lan⁴⁾, XIE He-Song⁴⁾,
WANG Hai⁴⁾, WANG Gui-Lin¹⁾, WAN Run-Lan^{1)**}

¹⁾Sichuan Provincial Center for Gynaecology and Breast Diseases, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

²⁾Luzhou Maternal & Child Health Hospital (Luzhou Second People's Hospital), Luzhou 646000, China;

³⁾Chengdu Bio-Science Technology Co.Ltd, Chengdu 610200, China;

⁴⁾School of Clinical Medical Science, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract Breast cancer is one of the most common malignant tumors in women, aromatase inhibitors (AIs) are an important adjuvant therapy of breast cancer. Formestane (4-OHA), one of steroidal AIs, is used to treat advanced breast cancer and inhibits irreversibly aromatase activity. Several previous studies have found that aldo-keto reductases AKR1Cs are involved in the metabolism of many steroids and their derivatives. In the future they may be targets of therapy of hormonal diseases. We presumed that AKR1Cs may participate in site-specific metabolism of 4-OHA, affecting its therapeutic effect. In this paper, four active AKR1C isoforms were obtained by prokaryotic expression *in vitro*. The catalytic efficiency of AKR1Cs was detected by spectroscopic methods, and the effect of inhibitors on the catalytic reduction of 4-OHA by AKR1Cs was verified. It was found that four AKR1C isoforms can reduce keto-groups and double bonds of 4-OHA. AKR1C4 can rapidly catalyze the structural changes in 4-OHA with a conversion rate of almost 100%, followed by AKR1C3 and AKR1C1 with a conversion efficiency of about 30%. AKR1C2 has the lowest activity towards of 4-OHA, and the conversion efficiency is only about 20%. At the same time, the inhibitor showed a significant dose-effect relationship with AKR1Cs. Non-linear regression analysis showed that the inhibitors had a strong affinity for AKR1C3 and AKR1C4 with IC_{50} values of 47.4 $\mu\text{mol/L}$ and 54.68 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The inhibition of AKR1C1 and AKR1C2 is relatively weak, and the IC_{50} values are 77.37 $\mu\text{mol/L}$ and 82.24 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The above results indicate that 4-OHA can be rapidly metabolized by AKR1C4 which is expressed in the liver only which may contribute to the fact that 4-OHA and its many conjugated metabolites is not very effective after oral administration. Our data support the advantage of parenteral administration of the drug as a depot-formulation or as a preparation for transdermal delivery and also provides a new idea for further research on nano-drug carriers and derivatives of the drug in the future.

Key words AKR1Cs, formestane, conversion efficiency, IC_{50}

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0204

* This work was supported by grants from the Affiliated Hospital of Southwestern Medical University Start-up Founding (16169, 16248), Luzhou Talent Introduction Grants (02-00040055, 02-00040108), Southwestern Medical University Grant (2018-ZRZD-004) and Sichuan Provincial Innovative Training Program for College Students (S201910723092).

** Corresponding author.

Tel: 15196645714, E-mail: wrd.cdibcas@aliyun.com

Received: August 31, 2019 Accepted: October 31, 2019