

生物化学在高水平创新型药学人才培养中的交叉融合应用 ——以去甲基化酶LSD1抑制剂的活性评价为例

宋宜辉^{1,†}, 秦上尚^{1,†}, 吴凯¹, 金成允^{1,*}, 余斌^{2,*}

¹ 郑州大学药学院, 郑州 450001

² 郑州大学化学学院, 平原实验室, 抗病毒性传染病创新药物全国重点实验室, 郑州 450001

摘要: 药学是一门综合性学科, 涉及生物学、化学、医学等多个领域。作为连接生物学和化学的桥梁, 生物化学是药学教育中的一门基础必修课程, 对于培养高水平创新型药学人才具有重要意义。但生物化学各章节相对独立, 理论知识点繁多且零散, 学生理解学习和灵活应用难度较大。如何有效地将生物化学基础理论知识与药学实践交叉应用, 培养出具有创新能力和实践技能的药学人才是当前药学教育教学改革的重要课题。本文以去甲基化酶LSD1抑制剂的活性评价为例, 采用传统理论教学与案例教学相结合的教学模式有机地将生物化学的理论知识与药物研发过程系统联系起来, 激发学生的学习兴趣, 培养学生的科研创新精神。本文旨在探讨闭环式案例教学模式在生物化学与药学教育中的融合应用, 培养学生的分析思维能力和问题解决能力, 引导他们运用生物化学知识分析和解决药物研发中的实际问题, 以期为我国高水平创新型药学人才培养提供参考和借鉴。

关键词: 生物化学; 药学人才培养; 闭环式案例教学; 融合应用; 科研创新

中图分类号: G64; O6

Cross-Integration Application of Biochemistry in the Cultivation of High-Level Innovative Pharmaceutical Talents: A Case Study on the Activity Evaluation of Demethylase LSD1 Inhibitors

Yihui Song^{1,†}, Shangshang Qin^{1,†}, Kai Wu¹, Chengyun Jin^{1,*}, Bin Yu^{2,*}

¹ School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China.

² State Key Laboratory of Antiviral Drugs, Pingyuan Laboratory, College of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China.

Abstract: Pharmacy is a multidisciplinary field that encompasses biology, chemistry, and medicine. Serving as a fundamental bridge connecting biology and chemistry, biochemistry is a core course in pharmaceutical education and plays a crucial role in cultivating high-level innovative pharmaceutical talents. However, it is traditionally taught in independent chapters with extensive and fragmented theoretical content, making it challenging for students to comprehend and apply flexibly. Effectively integrating fundamental biochemistry theory with pharmaceutical practice to cultivate innovative and practically skilled pharmaceutical professionals is a key topic in the ongoing reform of pharmaceutical education. This study uses activity evaluation of demethylase LSD1 inhibitors as an example and adopts a hybrid teaching model that combines traditional theoretical instruction with case-based teaching. By systematically linking biochemical concepts with the drug development process, this approach enhances students'

收稿: 2024-06-11; 录用: 2024-08-14; 网络发表: 2025-03-26

[†]共同第一作者, 对本文工作同等贡献

^{*}通讯作者, Emails: yubin@zzu.edu.cn (余斌); cyjin@zzu.edu.cn (金成允)

基金资助: 郑州大学教育教学改革研究与实践项目(2023ZZUJGXW226); 河南省本科高校校级青年骨干教师培养计划; 河南省本科高校省级青年骨干教师培养计划(2021GGJS016)

engagement, fosters scientific research and innovation, and improves their ability to analyze and solve practical problems in drug discovery. This study explores the application of a closed-loop case-based teaching model in integrating biochemistry and pharmaceutical education, aiming to enhance students' analytical thinking and problem-solving ability. The findings provide valuable insights for the development of high-level innovative pharmaceutical talent.

Key Words: Biochemistry; Pharmaceutical talent training; Closed-loop case-based education; Integrated application; Research innovation

1 引言

药学是一门综合性学科,涉及生物学、化学、医学等多个领域。随着我国药学事业的不断发展,对高水平创新型药学人才的需求日益增加^[1]。生物化学是药学专业中的重要基础课程,对培养具有创新精神和实践能力的药学人才具有重要作用。作为连接生物学和化学的桥梁,生物化学涉及大量的理论知识,是一门理论与实践相结合的学科^[2,3]。在当前药学教育中,如何有效地将生物化学知识与药学实践相结合,培养出具有创新能力和实践技能的药学人才,是教育改革的重要课题^[1,2]。

由于生物化学理论知识每个章节涉及理论知识繁多、原理抽象、案例相对独立缺乏连贯性,学生较难系统理解相关理论知识并灵活运用到药学研究实践中,因而导致学习难度较大,难以有效调动学生学习生物化学的积极性^[4,5]。此外,生物化学是一个快速发展的领域,新的研究成果和技术不断涌现,学生需要不断更新自己的知识库,以跟上科学发展的步伐^[6,7]。闭环式案例教学是指以一个具体的药物研发案例为课程载体,从药学理论知识的学习开始,过渡到药学实践项目的实践拓展,再回到理论学习的闭环教学模式。这种模式紧密结合了教学与科研,体现了药学的核心内容,旨在全面培养学生的思维与实践能力^[8]。笔者将以赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1 (lysine-specific demethylase 1, LSD1)抑制剂的活性评价为典型案例,采用传统理论教学与闭环式案例教学相结合的互动式教学模式,将生物化学的理论知识与药物研发过程系统联系起来,帮助学生理解生物化学的重要性和实用性^[8,9]。通过调整更新教学内容,延伸拓展最新科学前沿,充分利用网络教学资源,激发学生的学习兴趣和探索精神,为高水平创新型药学人才的培养打下坚实的基础。

2 教学方案

本课程以LSD1抑制剂的活性评价为主题,将靶标蛋白的背景介绍、理化性质、分离纯化、抑制剂筛选平台的建立、抑制剂的活性评价等药物研发过程导入生物化学课程中,并与蛋白质结构与功能的关系、蛋白质的重要性质、蛋白质分离纯化和表征、酶的催化机制和酶促动力学章节中的理论知识有机融合(表1)。采用传统理论教学和连续、渗透性更强的闭环式案例教学相结合的教学模式帮助学生理解巩固生物化学的基础理论知识,同时结合课程内容设计相关问题进行小组讨论,激发学生自主学习的积极性,训练学生融会贯通的实验技能。此外,通过设置闭环式实验课程,锻炼学生的实践操作技能,启发学生科研创新能力,为培养高水平创新型药学人才奠定基础。

表1 课程教学方案

| 知识模块 | 教学案例 | 学习目标 |
|------------------|----------------|-------------------------------|
| 模块一: 蛋白质结构与功能的关系 | 靶标蛋白LSD1的背景 | 理解靶标蛋白的结构和生物学功能对于药物研究的意义 |
| 模块二: 蛋白质的重要性质 | LSD1的理化性质 | 掌握蛋白质的理化性质在其分离纯化中的应用 |
| 模块三: 蛋白质分离、纯化和表征 | LSD1的分离和纯化 | 融会贯通不同方法分离纯化目的蛋白,测定其相对分子质量和浓度 |
| 模块四: 酶的作用机制和酶的调节 | LSD1抑制剂筛选体系的建立 | 掌握基于靶标蛋白的调控机制建立药物筛选体系 |
| 模块五: 酶促反应动力学 | LSD1抑制剂的活性评价 | 掌握酶促反应动力学在药物活性评价中的应用 |

3 教学内容设计

3.1 蛋白质结构与功能的关系——靶标蛋白LSD1的背景介绍

在蛋白质的结构与功能的关系章节中，导入靶标蛋白LSD1的背景介绍，围绕靶标蛋白的背景即LSD1的一级、二级和三级结构以及其生物学功能展开系统介绍，结合后期学习的药理学、药学分子生物学等药学相关课程以及实验课程(课程名称：采用AlphaFold预测LSD1的结构)，使学生理解蛋白质不同层级的结构特点及基本概念，深刻理解“结构决定性质、结构决定功能”的逻辑主线。

通过LSD1的一级和二级结构特点，结合图形及动画介绍蛋白质结构域、亚结构域、 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲等基本概念。蛋白质的一级结构指的是蛋白质分子中氨基酸残基的线性序列，是蛋白质结构的基础。LSD1的一级结构由852个氨基酸组成，从左到右依次为N端SWIRM (Swi3p/Rsc8p/Moira)结构域、中心突出的Tower结构域和C端的胺基氧化酶(amine oxidase-like, AOL)结构域，每个结构域是相对独立的紧密球状实体(图1A)。二级结构是指蛋白质多肽链折叠后形成的局部结构，主要由氢键维持。SWIRM结构域的二级结构由六个长的 α -螺旋和两个链状的 β -折叠组成，为LSD1与其他伴侣蛋白间的相互作用提供了结构基础。AOL结构域包含黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)结合和底物结合两个亚结构域，两者共同形成的大空腔构成了LSD1的催化活性中心。FAD结合亚结构域是混合 α - β 结构，底物结合亚结构域的特征包括一个六股混合的 β -片状结构和两侧的六个 α -螺旋状结构。Tower结构域是AOL结构域的延伸，由两个反向平行的 α -螺旋结构组成(图1B)。了解三维结构是理解蛋白质如何行使其功能的基础。以人源LSD1的晶体结构模型为例，围绕LSD1的三维空间结构特征及功能展开讲解，使学生掌握蛋白质结构和功能的关系，理解稳定蛋白质三维结构的作用力。在LSD1中，SWIRM结构域堆积在AOL结构域上以稳定蛋白质，并通过蛋白-蛋白和DNA-蛋白相互作用形成连接各种底物的凹槽。Tower结构域含有伴侣蛋白REST辅助抑制因子(RE1-silencing transcription factor corepressor, CoREST)结合位点，CoREST从C端AOL结构域中伸出，并将AOL分为两部分。AOL中FAD结合和底物结合亚结构域构成的敞开空腔构成了LSD1的催化活性中心，为去甲基化酶反应的发生提供了空间，在LSD1去甲基化和底物识别中发挥重要作用(图1C)。结合目前报道的LSD1结构模型，讲解研究蛋白质构象的方法即X射线衍射法和核磁共振，同时延伸拓展目前被广泛使用的冷冻电子显微镜法和AlphaFold，使学生了解研究蛋白质构象的不同方法、适用范围和最新科学前沿。鼓励学生利用在线视频、模拟软件等资源进行自主学习AlphaFold预测蛋白结构等科学前沿，拓宽学习渠道。

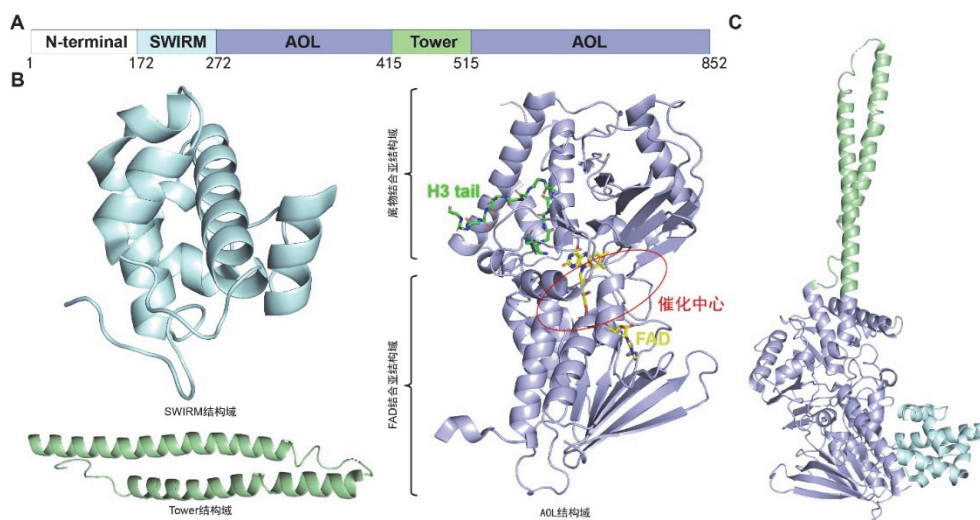


图1 LSD1的结构

A. LSD1的一级结构；B. LSD1的二级结构和结构域；C. LSD1的晶体三维结构

以LSD1的生物学功能为例,讲解药物研究中靶标蛋白的选择和科学意义。LSD1是FAD依赖性单胺氧化酶家族的一员,在表观遗传调控中扮演着关键角色。LSD1可通过甲基化功能依赖的形式转录共激活或抑制组蛋白3赖氨酸4和9 (histone H3 lysine 4/9, H3K4/9)的甲基化,参与调控干细胞分化、细胞运动、上皮间充质转化、自噬和衰老等过程。除了LSD1经典的去甲基化酶催化活性外,LSD1也以非催化功能依赖的形式调控转录因子锌指蛋白217 (zinc finger protein 217, ZNF217)和抑癌因子含F框及WD重复域蛋白7 (F-box and WD repeat domain-containing 7, FBXW7)的稳定性^[9]。LSD1在多种肿瘤细胞如乳腺癌、前列腺癌、小细胞肺癌、神经母细胞瘤和急性淋巴细胞白血病中高表达,与肿瘤的不良预后密切相关,是一个有潜力的表观遗传调控靶标。目前报道的LSD1抑制剂均靶向LSD1经典的去甲基化酶催化功能,结合在AOD中FAD结合或底物结合亚结构域中^[9]。在讲解LSD1的结构和功能过程中将以下问题贯穿其中(表2),引导学生理解蛋白质的三维结构和生物学功能对于药物研究的意义。同时结合后期学期的药理学和药理学分子生物学等课程,使学生理解LSD1介导的信号通路及病理机制在药物研发中的意义,启发学生思考如何基于靶标蛋白的结构和功能进行创新药物研究。

表2 蛋白质结构和功能在药物研发应用中问题设计

| 序号 | 问题 | 知识点 |
|----|---------------------------|--------------|
| 1 | 如何采用AlphaFold预测蛋白质的结构 | 蛋白质的三维结构测定方法 |
| 2 | 研究蛋白质构象不同方法的优缺点 | 蛋白质的三维结构测定方法 |
| 3 | 靶标蛋白的结构和功能与创新药物研究的关联性 | 蛋白质结构与功能的应用 |
| 4 | 如何基于靶标蛋白的结构和功能进行创新药物研究 | 蛋白质结构与功能的关系 |
| 5 | 靶标蛋白的催化功能和非催化功能对创新药物研究的意义 | 蛋白质的功能应用 |

3.2 蛋白质的重要性质——LSD1的理化性质

在蛋白质的重要性质章节,围绕LSD1的物理化学性质和胶体性质展开讲述,结合无机化学知识和实验课程(课程名称:LSD1的变性和沉淀),延伸拓展蛋白质的理化性质在分离和纯化中的意义和应用。

鉴于N端无规则卷曲对LSD1蛋白稳定性的影响,在LSD1抑制剂的活性评价中以不含N端无序结构的LSD1截断体蛋白(123-852aa)作为靶标蛋白。首先采用Expasy的ProtParam模块估算LSD1截断体蛋白的氨基酸数目、理论等电点PI和相对分子质量等信息,以此为例讲述蛋白质的酸碱性质和测定相对分子质量的原理及方法。LSD1截断体蛋白(下文均称为LSD1)含有730个氨基酸,相对分子质量为81.18553 KDa。蛋白质的等电点和它所含的酸性氨基酸和碱性氨基酸的数目比例有关。LSD1的PI值为5.87,包含正负电荷的残基数目分别为90和79,即在PH = 5.87时,LSD1所带的正电荷和负电荷恰好相等。测定相对分子质量的方法包含化学组合法、渗透压法、沉降分析法、凝胶过滤法和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),重点介绍应用较为广泛的凝胶过滤法和SDS-PAGE。凝胶过滤法中,蛋白质分子通过凝胶柱的速度即洗脱体积的大小与其斯托克半径有关,以几种已知蛋白质标准物的相对分子质量对洗脱体积做标准曲线,测定待测蛋白样品的洗脱体积即可计算其相对分子质量。SDS-PAGE中,阴离子变性剂SDS与蛋白质形成的复合物几乎具有相同的荷质比和构象,因而以几种已知蛋白质标准物相对分子质量的对数值对其在聚丙烯酰胺凝胶电泳上的相对迁移率作图,根据待测蛋白的相对迁移率带入公式计算其相对分子质量。通过对比讲解测定蛋白质相对分子质量不同方法的原理和局限性,使学生理解如何根据不同的情况选择不同的相对分子质量测定方案。

由于具有水化层与双电层两方面的稳定因素,蛋白质溶液作为胶体系统相对稳定。但当质点大小、电荷和水化作用受到破坏而影响蛋白质的稳定性,蛋白质将相互凝集而沉淀。通过讲述沉淀蛋白质的方法、原理及异同点,即盐析法、有机溶剂沉淀法、重金属沉淀法、生物碱和酸类试剂沉淀

法、加热变性沉淀法，介绍盐析法在蛋白纯化中的应用。通过向学生提出问题(表3)，引导学生思考蛋白质的胶体性质在蛋白质分离纯化中的应用，并基于蛋白质的胶体性质回顾反思SDS-PAGE测定蛋白质相对分子质量的局限性，将蛋白质的重要性质融会贯通应用到药物研究实践中。

表3 蛋白质胶体性质问题设计

| 序号 | 问题 | 知识点 |
|----|---------------------------------|-------------|
| 1 | 蛋白纯化中为什么要保持低温 | 蛋白质的胶体性质 |
| 2 | 蛋白纯化中为什么避免接触酸碱有机试剂、重金属、生物碱和酸类试剂 | 蛋白质的胶体性质 |
| 3 | 盐析法为什么可以用来纯化蛋白质 | 蛋白质的胶体性质 |
| 4 | SDS-PAGE是否可测定多聚体蛋白质的相对分子质量 | 蛋白质相对分子质量测定 |

3.3 蛋白质分离、纯化和表征——LSD1的分离和纯化

在蛋白质的分离、纯化和表征章节，以LSD1的分离纯化方法为例，讲述蛋白质分离纯化的一般原则、分离纯化方法和蛋白质含量测定和纯度鉴定方法，结合无机化学和实验课程(LSD1蛋白的表达和纯化；Bradford法测定LSD1蛋白浓度)使学生掌握如何基于目的蛋白的理化性质融会贯通不同方法分离纯化靶标蛋白以用于药物筛选。

蛋白质纯化的目的是增加制品的纯度和比活，以增加单位蛋白质重量中目的蛋白质的含量和生物活性。蛋白质分离纯化的一般程序可分为前处理、粗分级分离和细分级分离。根据蛋白质在溶液中的性质如分子大小、溶解度、电荷、吸附性质和对配体分子的生物亲和力等分离纯化目的蛋白。LSD1蛋白的分离纯化过程包含超声破碎、差速离心、Ni亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤，采用快速蛋白质液相层析系统(FPLC)和SDS-PAGE电泳法可分离检测蛋白质的含量和纯度。以LSD1纯化的前处理和细分级分离过程为例，讲解各种纯化方法的原理、步骤以及SDS-PAGE电泳法测定蛋白纯度原理。LSD1纯化的前处理过程包含超声破碎和差速离心。获得LSD1重组蛋白的菌体后，首先加入裂解液并采用超声破碎仪破碎菌体，释放DNA和蛋白等细胞组分。然后采用差速离心方法分离裂解后的菌体，通过逐步增加离心力每次沉降裂解细胞的不同组分，获得含有重组目的蛋白的上清液以进行进一步的细分级分离(图2A)。LSD1的细分级分离过程包含Ni亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤。Ni亲和层析的原理是基于带有6xHis标签的LSD1重组蛋白对Ni₂SO₄基质特异的生物亲和力，将粗分级分离获得的上清液与Ni₂SO₄基质孵育，通过不同浓度的咪唑洗脱分离LSD1重组蛋白和杂蛋白。Ni亲和层析和SDS-PAGE结果显示：目的蛋白纯度约为60%，杂蛋白含量仍较高(图2A)，因而进一步采用离子交换层析法分离杂蛋白，提高LSD1目的蛋白的纯度。离子交换层析是根据电荷不同分离蛋白质混合物，蛋白质对离子交换剂的结合力取决于彼此间相反电荷基团的静电吸引，溶液的PH决定离子交换剂和蛋白质的电离程度。离子交换层析中电导值代表盐溶液(如氯化钠)的电导率，电导值的高低与盐溶液的浓度成正比。离子交换剂包含两类即阳离子交换剂和阴离子交换剂，通过讲解两类离子交换剂的区别以及每个分类中不同类型的应用，使学生理解如何根据具体情况选择不同的离子交换剂。由于LSD1的等电点(PI = 5.87)小于缓冲液的pH值(pH = 7.5)，带负电荷的目的蛋白可通过与阴离子交换剂的可电离基团交换而被洗脱，因而采用Q阴离子交换层析法进一步分离亲和层析获得的蛋白溶液，结合FPLC和SDS-PAGE检测蛋白含量和纯度。离子交换层析结果显示：目的蛋白在电导26.20 ms·cm⁻¹处紫外吸收值最高，除了目的蛋白条带外，在26 KDa附近仍有较高比例的杂蛋白条带。鉴于目的蛋白与杂蛋白分子量的差异，因而继续采用凝胶过滤层析进一步提高目的蛋白纯度(图2A, B)。凝胶过滤层析是基于蛋白质分子大小不同进行纯化，分子量较大的目的蛋白LSD1不能进入柱内网状结构而先被洗脱，而分子量较小的杂蛋白进入凝胶柱中而后被洗脱，进而可将LSD1与26 KDa附近的杂蛋白分离。凝胶过滤层析结果显示：LSD1蛋白在Sephacryl™ S-200 HR层析柱上66.44 mL处紫外吸收值达到峰尖位置，纯度大于95%(图2A和C)。在讲解过程中将以下问题贯穿

其中(表4), 引导学生思考如何综合运用不同方法分离纯化靶标蛋白, 回顾如何鉴定多聚体靶标蛋白的相对分子质量, 使学生理解蛋白质的分离纯化对于药物研发的意义。

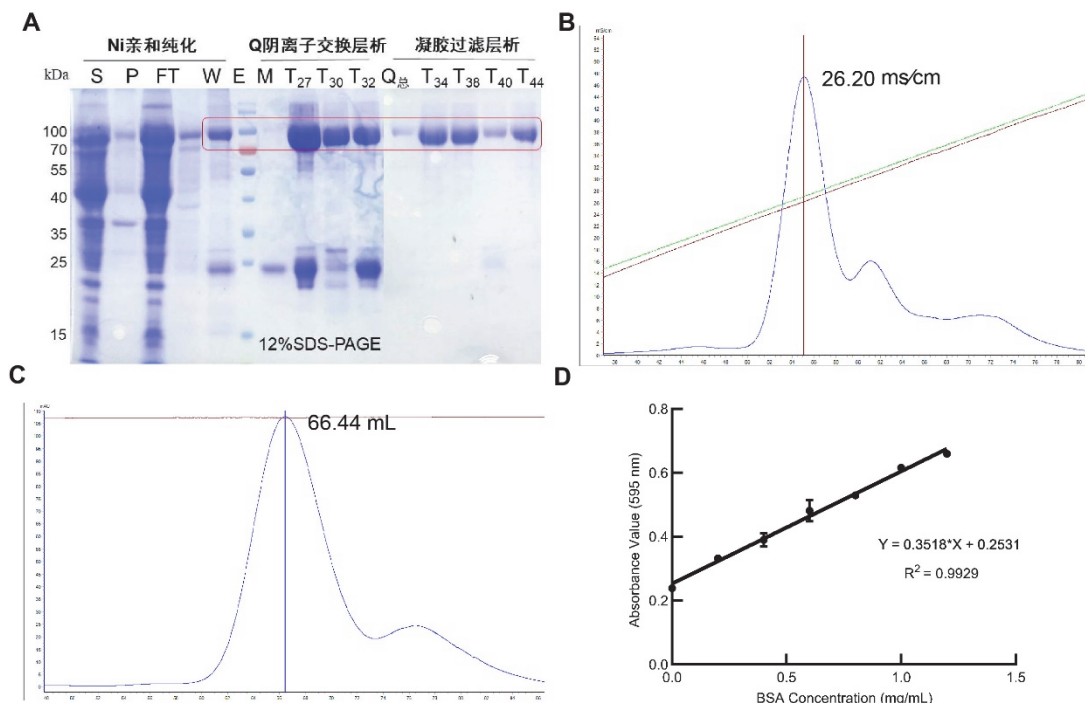


图2 LSD1的纯化和表征

A. SDS-PAGE表征LSD1蛋白纯度(S: 上清; P: 沉淀; FT: 流穿液; W: 清洗液洗脱杂蛋白; E: 洗脱液洗脱目的蛋白);
B. Q阴离子交换层析FPLC检测图; C. SephacrylTM S-200 HR凝胶过滤层析FPLC检测图; D. LSD1蛋白浓度测定标准曲线

表4 蛋白质分离纯化过程中的问题设计

| 序号 | 问题 | 知识点 |
|----|------------------------------------|-------------|
| 1 | LSD1细分级分离纯化中三种方法是否可以调整顺序 | 蛋白质分离纯化应用 |
| 2 | 亲和层析是否可通过FPLC监测蛋白含量 | 亲和层析实践操作 |
| 3 | 离子交换层析上样前为何要将蛋白浓度进行稀释 | 离子交换层析实践操作 |
| 4 | 目的蛋白的出峰电导值对稀释倍数有何启示 | 离子交换层析实践操作 |
| 5 | FPLC和SDS-PAGE上目的蛋白的位置是否对应其真实相对分子质量 | 蛋白质相对分子质量测定 |
| 6 | 如何结合FPLC和SDS-PAGE测定目的蛋白的相对分子质量 | 蛋白质相对分子质量测定 |
| 7 | 如何根据FPLC评估目的蛋白的聚集状态 | FPLC应用 |

测定蛋白质含量的常用方法有紫外吸收法、染料结合法(Bradford法)、双缩脲法等。以Bradford法测定LSD1蛋白浓度为例, 重点讲解应用较广的染料结合法的原理和操作方法。考马斯亮蓝染料和LSD1蛋白结合产生的蛋白质染料结合物在595 nm下有最大光吸收。通过不同浓度标准样品BSA (X 轴)对蛋白质染料结合物在595 nm下的光吸收值(Y 轴)制定标准曲线($Y = 0.3518X + 0.2531$, $R^2 = 0.9929$), 并将待测LSD1蛋白的光吸收值带入方程计算其浓度, 结果显示LSD1蛋白的最终浓度是 $0.436 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图2D, 表5)。在此过程中向学生提出以下问题(表6), 使学生了解蛋白质含量测定不同方法的原理和优缺点, 掌握Bradford法测定蛋白浓度的原理和注意事项。

表5 Bradford法测定LSD1蛋白浓度

| O.D.值 | BSA浓度(mg·mL ⁻¹) | | | | | | | LSD1浓度(mg·mL ⁻¹) | |
|----------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|------------------------------|-------|
| | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 0.436 | |
| <i>A</i> ₅₉₅ | 0.235 | 0.333 | 0.376 | 0.505 | 0.537 | 0.611 | 0.667 | 0.52 | 0.518 |
| <i>A</i> ₅₉₅ | 0.243 | 0.332 | 0.405 | 0.458 | 0.522 | 0.622 | 0.653 | 0.519 | 0.522 |
| <i>A</i> ₅₉₅ 平均 | 0.239 | 0.3325 | 0.3905 | 0.4815 | 0.5295 | 0.6165 | 0.66 | 0.5195 | 0.52 |

表6 蛋白浓度测定中的问题设计

| 序号 | 疑问 | 知识点 |
|----|------------------------|-----------|
| 1 | 不同蛋白浓度测定方法的原理和优缺点是什么 | 蛋白质含量测定方法 |
| 2 | 待测蛋白的浓度是否可以超越标准蛋白的浓度范围 | 蛋白质含量测定操作 |
| 3 | Bradford法测定波长是否可以更改 | 蛋白质含量测定操作 |

3.4 酶的作用机制和酶的调节——LSD1抑制剂筛选体系的建立

在酶的作用机制和酶的调节章节, 导入LSD1抑制剂筛选平台的建立, 结合有机化学知识和实验课程(课程名称: Amplex Red偶联法测定LSD1的去甲基化酶活性)讲述去甲基化酶LSD1的催化机制和调节模式, 使学生掌握酶的作用和调节机制在药物筛选中的实际应用。

以LSD1的活性位点和去甲基化催化机制为实例, 讲述酶活性位点的特点及催化机制的含义。酶的活性部位是位于酶分子表面的一个裂缝。LSD1中AOD结构域的FAD和底物结合亚结构域中间的空隙构成了LSD1的催化活性中心。酶的活性部位具有柔性或可运动性, 在酶和底物结合的过程中, 底物分子或酶分子发生构象诱导契合, 使催化基团的位置正好在所催化底物键的断裂和即将生成键的适当位置。LSD1是一种FAD依赖的组蛋白去甲基化酶, 通过胺氧化反应特异性地使H3K4me1/2去甲基化。使其失去一个电子并形成碳自由基中间体, 并产生副产物过氧化氢(H₂O₂)和甲醛(HCHO), 同时辅助因子FAD被还原为FADH₂, 然后氧气再氧化产生H₂O₂。辅助因子FAD或组蛋白等与LSD1结合也可诱导LSD1催化活性中心发生构象变化。在LSD1的去甲基化催化过程中, 甲基化的赖氨酸残基首先被氧化为一个亚胺中间体, 这个中间体进一步水解产生HCHO、胺和去甲基化的赖氨酸残基, 使H3K4me1/2失去一个电子并形成碳自由基中间体。同时, 辅助因子FAD接受一个质子并转移至甲基化的赖氨酸残基, FAD被还原为FADH₂, 氧气再氧化产生H₂O₂^[10] (图3)。

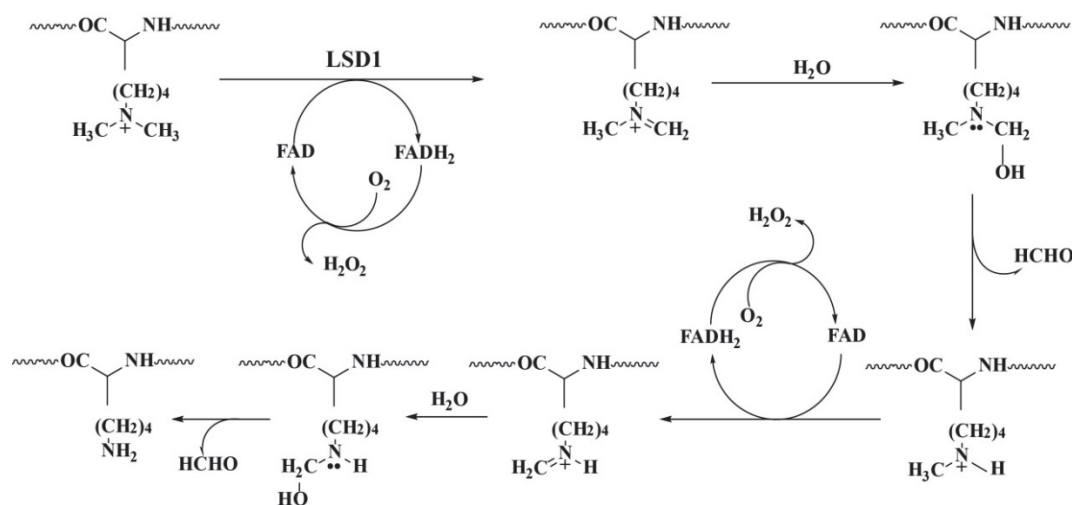


图3 LSD1的去甲基化催化机制

以Amplex Red偶联法建立LSD1抑制剂筛选平台讲述LSD1的去甲基化酶活性调节。Amplex Red是一种对H₂O₂高度敏感的荧光探针，在辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)存在的情况下，Amplex Red能与H₂O₂进行1:1反应，产生强烈的红色荧光物质试卤灵，通过酶标仪检测激发光535 nm和发射光590 nm条件下的荧光强度即可判断化合物对LSD1去甲基化酶活性的影响(图4)。基于Amplex Red偶联原理检测去甲基化酶活可表征化合物对LSD1的抑制活性。

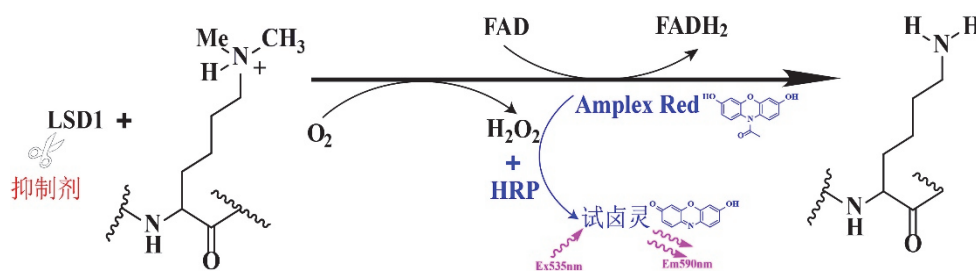


图4 Amplex Red偶联法测定LSD1抑制剂的去甲基化酶活

影响酶催化效率的因素包含底物和酶的邻近效应、底物的形变和诱导契合、酸碱催化、共价催化和金属离子催化等。筛选体系中的成分即缓冲液条件、蛋白和底物浓度等均会对LSD1的去甲基化催化活性即体系的信号窗口(方程1)产生影响，因而针对筛选体系中的成分如缓冲液种类及PH (Hepes pH = 7.5或PBS pH = 7.4)、盐浓度(0–40 mmol·L⁻¹ NaCl)、去垢剂种类(0.05% BSA或0.01% Tween-20、Amplex Red (1.28–50 μmol·L⁻¹)和HRP浓度(0.1–6.4 U·mL⁻¹)，以及LSD1与底物H3K4me2的最佳孵育时间(15、30、45、60和90 min)进行交叉滴定，并结合实验信号窗口确定筛选体系的最优条件(表7和图5A–D)。此外，鉴于DMSO含量过高会影响蛋白的活性，通过体系中LSD1蛋白对DMSO的耐受性确定体系中最终的DMSO浓度范围(0–5%，图5E)。以阳性化合物ORY-1001在不同浓度点(浓度范围0.048–50.0 nmol·L⁻¹)的抑制率(方程2)为纵坐标，化合物浓度为横坐标，通过非线性拟合方程(方程3)计算ORY-1001的半数抑制浓度IC₅₀，并通过与文献数据对比验证筛选体系可靠性(图5F)。最终确定LSD1抑制剂筛选体系组成为：Hepes pH = 7.5、20 mmol·L⁻¹ NaCl、0.05% BSA、0.1 U·mL⁻¹ HRP和5 μmol·L⁻¹ Amplex Red，孵育时间为30 min。在此过程中向学生提出问题(表8)，引导学生理解如何根据靶标蛋白的独特调节机制优化建立筛选体系并筛选获得抑制剂。

$$\text{Assay window} = \text{Positive control signal} / \text{Negative control signal} \quad (1)$$

$$\text{Inhibition rate}(\%) = (\text{Maximum} - X) / (\text{Maximum} - \text{Minimum}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Percent effect}(\%) = \text{Minimum} + (\text{Maximum} - \text{Minimum}) / (1 + 10^{(\text{Log}IC_{50} - X) \times \text{Hillslope}}) \quad (3)$$

注：阳性对照(Positive control)是指不含抑制剂的样品信号，阴性对照(Negative control)是指仅含蛋白和激活多肽的样品信号。Inhibition rate是待测化合物对于LSD1去甲基化酶活性的抑制效率，X是待测化合物体系的荧光强度，Maximum是不含抑制剂的样品信号，Minimum是仅含蛋白和激活多肽的样品信号。IC₅₀是半数抑制效应，即介于Maximum和Minimum中间时的化合物浓度，hillslope是量效关系曲线的倾斜度。

3.5 酶促反应动力学——LSD1抑制剂的活性评价

在酶促反应动力学章节中，以LSD1抑制剂的活性评价为例，结合米氏方程并设置实验课程(课程名称：LSD1抑制剂的酶促动力学参数测定)讲述底物浓度对酶反应速率的影响和酶的抑制作用，使学生了解酶促反应动力学在药物活性评价中的应用。

米氏方程(方程4)是描述酶促反应速率的数学模型，广泛应用于酶促动力学的研究。在低底物浓度下，反应速率与底物浓度成正比；而在高底物浓度下，反应速率接近最大速率 V_{max} ，此时底物浓度的增加对反应速率的影响较小。抑制剂可使酶必需基团化学性质的改变，但酶未变性而酶的活力降

低或丧失。 K_m 值是酶的特征常数之一，其大小与酶的性质有关，而与酶浓度无关。按照抑制剂与酶的作用方式及抑制作用，可将抑制作用分为不可逆抑制和可逆抑制。通过超滤、透析、凝胶过滤或动力学等方法可区分可逆抑制作用和不可逆抑制作用。以本课题自主合成的LSD1抑制剂**1**为例，分析透析前后化合物对LSD1去甲基化酶活性的影响，讲解采用透析法分析化合物抑制类型的原理和方法。如图6所示，化合物**1**与对照组可逆抑制剂CC-90011类似，透析后LSD1的酶活性恢复，但不可逆抑制剂2-PCPA的酶活性不变，因而化合物**1**是LSD1的可逆抑制剂。

$$V = V_{\max}[S]/(K_m + [S]) \quad (4)$$

V_{\max} 是指最大酶促反应速率， $[S]$ 是指底物浓度， K_m 是指米氏常数。

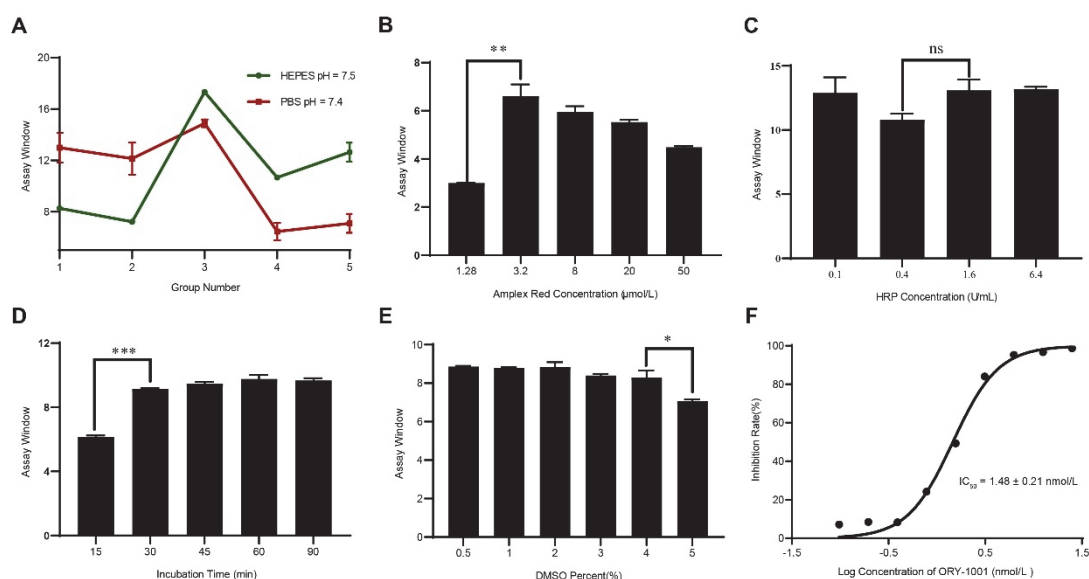


图5 LSD1抑制剂筛选体系优化

- A. 缓冲液成分优化；B. Amplex Red浓度优化；C. HRP浓度优化；D. LSD1与底物H3K4me2的孵育时间优化；
E. DMSO耐受性优化；F. 阳性化合物ORY-1001验证筛选体系可靠性

注：ns不显著，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

表7 缓冲液成分优化

| 组别 | 缓冲液成分 |
|----|---|
| 1 | 50 mmol·L ⁻¹ Hepes pH = 7.5/PBS pH = 7.4 |
| 2 | 50 mmol·L ⁻¹ Hepes pH = 7.5/PBS pH = 7.4 + 40 mmol·L ⁻¹ NaCl |
| 3 | 50 mmol·L ⁻¹ Hepes pH = 7.5/PBS pH = 7.4 + 40 mmol·L ⁻¹ NaCl + 0.05% BSA |
| 4 | 50 mmol·L ⁻¹ Hepes pH = 7.5/PBS pH = 7.4 + 40 mmol·L ⁻¹ NaCl + 0.05% BSA |
| 5 | 50 mmol·L ⁻¹ Hepes pH = 7.5/PBS pH = 7.4 + 40 mmol·L ⁻¹ NaCl + 0.01% Tween-20 |

表8 酶的调控机制在化合物筛选体系建立中的问题设计

| 序号 | 问题 | 知识点 |
|----|--|-----------|
| 1 | Amplex Red偶联法筛选LSD1抑制剂的原理和优缺点是什么 | 酶的催化机制原理 |
| 2 | 如何优化体系成分建立LSD1抑制剂筛选平台 | 酶催化效率影响因素 |
| 3 | 如何判定筛选体系的可靠性 | 酶催化效率影响因素 |
| 4 | 筛选化合物时为什么先测试抑制率再测定半数抑制浓度IC ₅₀ | 酶的催化机制应用 |

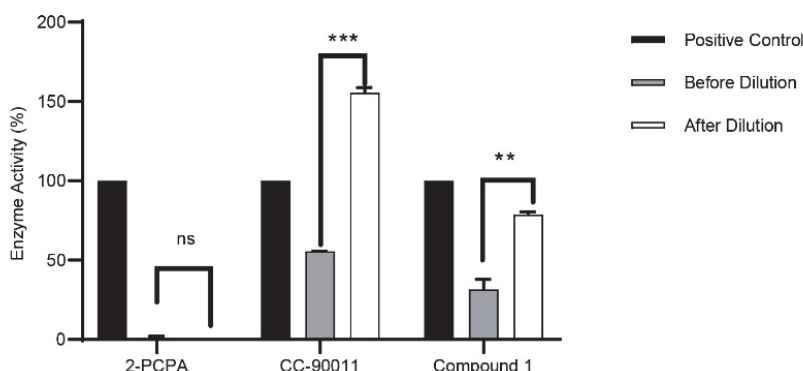


图6 稀释实验验证化合物1的可逆性

ns不显著, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

根据可逆抑制剂与底物的关系,可逆抑制作用分为竞争性抑制(方程5)、非竞争性抑制(方程6)和反竞争性抑制(方程7),不同的结合模式对于酶促动力学参数 K_m 和 V_{max} 的影响不同(表9)。竞争性抑制是指抑制剂(I)与酶底物(S)具有相似的化学结构,能够与底物竞争酶(E)的活性中心并与其结合,因而降低酶促反应速率。首先以LSD1可逆抑制剂1为例讲解竞争性抑制的酶促动力学,使学生理解如何采用Lineweaver-Burk双倒数曲线测定酶促动力学参数。通过交叉滴定底物H3K4me2和抑制剂,对酶促反应速率 V 与底物H3K4me2浓度进行拟合,分析酶底物复合物(ES)的解离常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 值的变化趋势,判断化合物的可逆抑制类型。通过计算化合物每个浓度点的酶促反应速率,以 $1/V$ 为纵坐标、 $1/H3K4me2$ 为横坐标进行Lineweaver-Burk双倒数曲线作图。根据双倒数曲线方程的交点判断化合物的抑制类型,计算抑制常数 K_i 值,评估化合物对靶标蛋白LSD1的抑制潜力。结果显示:随着化合物1浓度的升高, V_{max} 不变, K_m 值逐渐增加,Lineweaver-Burk双倒数曲线相交于Y轴。表明化合物1与LSD1底物H3K4me2具有相似的化学结构,能够与底物竞争结合LSD1的活性中心,降低酶促反应速率,因此化合物1是LSD1的底物竞争性抑制剂, K_i 值为 $42.97 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图7和表10)。此外,通过对比分析讲解非竞争性抑制和反竞争性抑制的动力学特点。非竞争性抑制是指抑制剂结合在酶活性中心以外的部位,对于游离酶和酶-底物复合物均有一定的亲和力,但酶-底物-抑制剂复合物不能释放出产物,因而酶促反应速率降低。非竞争性抑制动力学变化满足方程6, V_{max} 随抑制剂浓度的升高而减小, K_m 值不变,Lineweaver-Burk双倒数曲线相交于第二象限X轴或X轴上下方。反竞争性抑制是指抑制剂不能与游离的酶结合,仅对酶-底物复合物有亲和力,但酶-底物-抑制剂复合物不能释放出产物,酶促反应速率也降低。反竞争性抑制动力学变化满足方程7, V_{max} 和 K_m 值随抑制剂浓度的升高而减小,Lineweaver-Burk双倒数曲线呈反向平行。在讲解过程通过问题设计(表11),使学生理解预测不同抑制类型的特点和酶促动力学表征,掌握酶促动力学在药物研发中化合物抑制类型鉴定中的具体应用。

4 教学评价与反馈

在生物化学课程结束后,教学团队对LSD1抑制剂的活性评价为主题的闭环式案例教学模式的教学效果进行了调查分析。多数学生认为,闭环式案例教学模式加深了他们对于相对枯燥的生物化学理论知识的理解和掌握,并且理解了学习生物化学知识的必要性及其在药物研发中的实际应用,也激发了他们对生物化学课程学习的主动性和积极性。教学团队也根据最新的科学前沿灵活更新教学内容,鼓励学生拓展学习渠道,拓展了学生的知识面。此外,根据学生提议,教学团队也以LSD1抑制剂的活性评价为主题,在暑期小学期课程中开设系统的闭环式实验课程,以锻炼提升学生的实验技能,进一步加深其对理论知识的理解。教学团队也将根据闭环式实验课程中遇到的实际问题,重新调整教学内容,完善教学体系。

表9 不同类型可逆抑制作用的米氏方程和常数

| 类型 | 方程 | 方程序号 | V_{\max} | K_m |
|---------|---|------|------------|-------|
| 竞争性抑制剂 | $V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$ | (5) | 不变 | 增加 |
| 非竞争性抑制剂 | $V = \frac{V_{\max} [S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$ | (6) | 减少 | 不变 |
| 反竞争性抑制剂 | $V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) [S]}$ | (7) | 减少 | 减少 |

V_{\max} 是最大酶促反应速率, $[S]$ 是底物浓度, $[I]$ 是抑制剂浓度,
 K_m 是米氏常数, K_i 是抑制常数

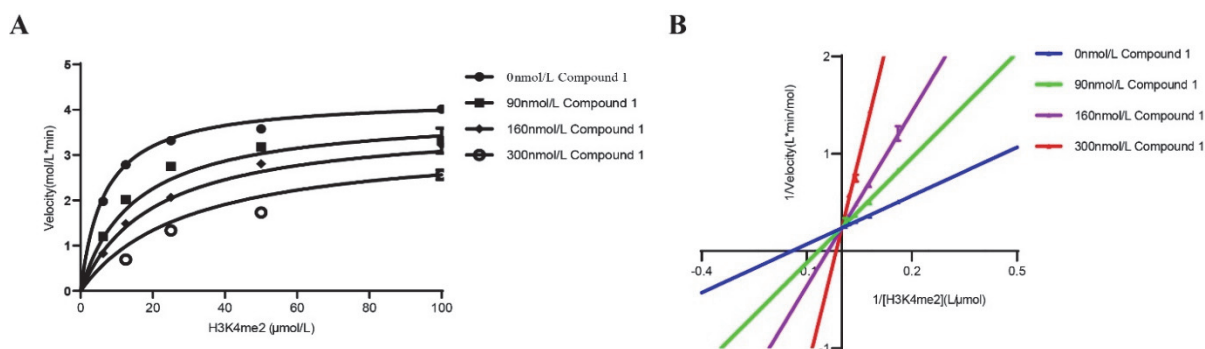


图7 Lineweaver-Burk双倒数曲线分析化合物1的结合动力学特征

表10 化合物1的酶促动力学参数

| 酶动力学参数 | 化合物1浓度(nmol·L ⁻¹) | | | |
|--|-------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| | 0 | 90 | 160 | 300 |
| V_{\max} (mol·L ⁻¹ ·min ⁻¹) | 4.20 ± 0.06 | 3.83 ± 0.16 | 3.96 ± 0.07 | 3.93 ± 0.36 |
| K_M (μmol·L ⁻¹) | 6.81 ± 0.42 | 11.54 ± 1.67 | 21.95 ± 1.03 | 55.64 ± 10.31 |
| K_i (μmol·L ⁻¹) | 42.97 ± 6.275 | | | |

表11 酶促动力学分析中的问题设计

| 序号 | 问题 | 知识点 |
|----|-------------------------|-----------|
| 1 | 不同抑制类型的表征和特点是什么 | 酶促反应动力学表征 |
| 2 | 如何根据酶促动力学分析判定抑制剂的抑制类型 | 酶促反应动力学表征 |
| 3 | K_M 和 K_i 值分别代表什么含义 | 酶促反应动力学参数 |
| 4 | 酶促动力学分析中化合物和底物浓度范围如何设置 | 酶促反应动力学测定 |

5 结语

生物化学课程内容广泛, 涉及多个学科领域。学生需要将所学知识整合, 形成跨学科的素养和创新思维。在当前创新型药学人才培养的大背景下, 生物化学的教学改革及其在药学创新性人才培养中的融合应用显得尤为重要。笔者以LSD1抑制剂的活性评价为典型案例, 连贯性地将生物化学课

程中蛋白质结构与功能的关系、蛋白质的重要性质、蛋白质分离纯化和表征、酶的催化机制和酶促动力学章节中的具体知识点与靶标蛋白的背景介绍、理化性质、分离和纯化、抑制剂筛选平台的建立、抑制剂的活性筛选和评价等药物研发过程巧妙融合，加强学科与实践应用的联系。闭环式案例教学模式具有普适性，不仅可以应用于生物化学中的其他章节中，也可应用与药学其他课程中。如在物质代谢章节中，以物质代谢中的关键药物靶标为例，结合蛋白质结构与功能的关系、蛋白质的重要性质、蛋白质分离纯化和表征等章节，采用闭环式案例教学模式将理论知识与实践学习相结合。此外，Li等人以“ β -内酰胺酶抑制剂的设计、合成与生物学评价”为具体案例介绍了如何将闭环式案例教学模式应用到药物化学和药学综合实验课程中^[8]。基于一个具体案例将相关知识点连贯讲解的闭环式案例教学模式不仅加深学生对重要知识点的掌握，也有助于帮助学生理解生物化学中的具体内容在药物研发过程的实践应用，培养学生发现问题、分析问题和解决问题的能力，以及批判性思维和创新的能力，有望为生物化学课程在高水平创新性药物人才培养中的交叉融合应用提供借鉴和参考。

参 考 文 献

- [1] 朱丹, 苏邵, 晁洁. 大学化学, **2024**, *39* (12), 11.
- [2] 欧田苗, 吴琳娜, 毕惠嫦, 金晶, 李民. 当代医学, **2016**, *22* (14), 162.
- [3] 周卫红, 苗志伟. 大学化学, **2021**, *36* (3), 2011025.
- [4] 卢超, 陈景鲜, 李春阁, 王国霞, 陈刚. 生命的化学, **2019**, *39* (6), 1275.
- [5] 宋美. 畜牧与饲料科学, **2015**, *36* (1), 26.
- [6] 刘宏群, 徐凌志, 滕亚然, 纪爽, 闫志锋, 王丽菲. 医学教育管理, **2023**, *9* (1), 28.
- [7] 高琨. 大学化学, **2020**, *35* (12), 247.
- [8] Liang, G.-Q.; Deng, J.; Wu, C.-X.; Li, W.-J.; Hu, Y.-F.; Song, Y.-Q.; Yin, X.-C.; He, Q.; Xiao, Y.-C.; Li, G.-B. *J. Chem. Edu.* **2022**, *100* (2), 803.
- [9] 史宇婷, 杨欣语, 余斌, 宋宜辉. 药学学报, **2022**, *57* (10), 2949.
- [10] Song, Y. H.; Wang, S.; Yu, B. *J. Med. Chem.* **2022**, *66* (1), 71.