

一种基于细胞测定维生素 K 环氧化物还原酶活性的方法

徐亚奇^a, 王一伊^a, 李飞^a, 邱稳辉^a, 沈滢^{a,b}, 沈国民^{a,b}

(河南科技大学 a.基础医学院; b.河南省血栓与止血国际联合实验室, 河南 洛阳 471023)

摘要: 维生素 K 环氧化物还原酶(VKOR)是开发抗凝药的重要靶点,其活性测定对鉴定靶向 VKOR 新型抑制剂具有重要的应用价值.目前测定 VKOR 活性的常用方法为基于报告基因的方法,是一种间接测定 VKOR 活性的方法,不能用于鉴定靶向 VKOR 新型抑制剂.为建立一种快速、直接测定 VKOR 活性的方法,首先建立了一种基于 HPLC 检测维生素 K(VK)和维生素 K 环氧化物(VKO)的方法,该方法简便快速,准确性高,重复性好,各检测物色谱峰分离良好.在此基础上,利用 GGCX 基因敲除的细胞,建立了直接测定细胞内 VKOR 活性的方法,更加便捷地鉴定靶向 VKOR 抑制剂,为研发靶向 VKOR 新型抗凝药提供帮助.

关键词: 维生素 K 环氧化物还原酶;高效液相色谱;维生素 K;维生素 K 环氧化物;华法林

中图分类号: R446

文献标志码: A

维生素 K 环氧化物还原酶(vitamin K epoxide reductase, VKOR)是位于内质网的整合膜蛋白,是维生素 K 循环中的限速酶,在血液凝集中发挥重要作用^[1-2].在维生素 K 循环中, VKOR 先后把维生素 K 环氧化物(vitamin K epoxide, VKO)转化为维生素 K(vitamin K, VK)以及 VK 转化为二氢维生素 K(vitamin K hydroquinone, VKH₂)^[3].VKH₂ 作为辅因子参与 γ -谷氨酰羧化酶(γ -glutamyl carboxylase, GGCX)对维生素 K 依赖性凝血因子进行 γ 羧基化修饰^[4],这种翻译后修饰是维生素 K 依赖性凝血因子发挥生理功能的必要条件^[5].VKOR 是临床常用抗凝药华法林的特异性靶点^[6].华法林通过抑制 VKOR 的活性,使 VKO 不能转化为 VK 和 VKH₂,从而阻断了维生素 K 循环,进而抑制维生素 K 依赖性凝血因子的 γ 羧基化修饰,发挥抗凝作用.在临床应用中,华法林存在个体用药量差异大和华法林耐受等问题^[7-8],因此,开发克服华法林耐受的新型抗凝药具有重要应用价值和广泛应用前景.

为了鉴定化合物特异靶向抑制 VKOR,需要利用 VKOR 活性实验进行测定.目前, VKOR 活性实验方法有微粒体法^[1-2]和报告基因法^[9],其中微粒体法可以直接测定 VKOR 活性,但步骤较为繁琐.报告基因法虽然方便快捷,由于是间接测定 VKOR 活性,所以只能测定已知靶向 VKOR 化合物的抑制作用,而不能鉴定抑制 VKOR 的新型化合物.因此有必要建立一种方便快捷,且直接测定 VKOR 活性的方法.本研究利用高效液相色谱法建立了一种基于细胞测定 VKOR 活性的方法,该方法方便快捷,可用于鉴定靶向抑制 VKOR 的化合物.

1 材料与方法

1.1 材料

GGCX 基因敲除细胞系 293-GGCX-knockout 为本实验室构建^[10].DMEM 培养基购自 Hyclone 公司,

收稿日期:2021-09-07;修回日期:2022-01-09.

基金项目:国家自然科学基金(82170133;81770140);河南省科技攻关项目(212102310629;212102310877).

作者简介:徐亚奇(1993-),男,河南信阳人,河南科技大学硕士研究生,研究方向为细胞生物学,E-mail:1114265595@qq.com.

通信作者:沈国民(1979-),男,河南商丘人,河南科技大学副教授,硕士生导师,研究方向为维生素 K 代谢与出凝血疾病,E-mail:shenba433@163.com.

胎牛血清购自 ABW 公司,青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶溶液、TritonX-100 购自北京索莱宝科技有限公司,色谱纯乙腈、正己烷和异丙醇购自天津科密欧化学试剂有限公司,维生素 E 醋酸酯(vitamin E acetate, VE) 购自 BBI 公司,华法林、维生素 K₁(VK)、维生素 K₁-2,3-环氧化物(VKO)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 HPLC 检测 VK 和 VKO 的条件

用高效液相色谱分析仪分析从细胞中萃取的维生素 K,色谱柱为 Eclipse XDB-C18(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm),流动相为乙腈-异丙醇(体积比为 92.5:7.5),流速 1.2 mL/min,检测波长 248 nm,柱温 40℃,进样量 30 μL,进样后洗脱时间为 25 min。

1.2.2 标准曲线样品、测试样品和内标样品的配制

首先配制 500 μmol/L 的 VK 溶液和 50 μmol/L 的 VKO 溶液。按倍比稀释法,用乙腈分别配制 VK 和 VKO 的标准工作液。VK 标准工作液的浓度分别为 500.00, 250.00, 125.00, 62.50, 31.20, 15.60, 7.80, 3.90, 1.96, 0.98 μmol/L。VKO 标准工作液的浓度分别为 50.000, 25.000, 12.500, 6.250, 3.120, 1.560, 0.780, 0.390, 0.196, 0.098 μmol/L。空白对照为乙腈溶液,用乙腈配制不同浓度的测试样品。维生素 E 醋酸酯为制备细胞样品的内标物,在萃取 VK 和 VKO 的过程中,用正己烷配制含维生素 E 醋酸酯的萃取试剂。

1.2.3 细胞培养以及测定细胞内 VKOR 活性的预处理

293-GGCX-knockout 细胞在体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中培养。为了测定 293-GGCX-knockout 细胞的 VKOR 活性,把细胞铺至 10 cm 皿中,待细胞长至 90% 覆盖率时,加 VKO 至终浓度为 10 μmol/L,继续培养 4~6 h 后收集细胞,萃取细胞内 VK 和 VKO。对于华法林处理组,在加入 VKO 的同时,加入华法林,终浓度为 10 μmol/L。

1.2.4 VK 和 VKO 的萃取与重悬

细胞处理后,弃培养液上清,收集细胞,用 PBS 洗 3 次,后收集细胞沉淀;加入 1 mL 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCL pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 体积分数 1% TritonX-100),涡旋使细胞充分裂解,置于冰上 20 min(期间再涡旋 1 次);向离心管中加入 500 μL 异丙醇,涡旋混匀 30 s,再加入 500 μL 含维生素 E 醋酸酯(浓度为 1 mmol/L)的正己烷,涡旋混匀 30 s,封口膜封闭离心管,室温放置 30 min(每隔 10 min 涡旋 1 次);2 000 r/min 水平离心 10 min,轻轻取出离心管(切勿震荡)置于管架上,此时溶液分为上层有机相和下层水相;吸取 450 μL 上层有机相于 2 mL 的棕色进样瓶中,将瓶开口避光室温放置使有机相自然挥发晾干(或氮气快速吹干)。加入 100 μL 乙腈,使瓶壁及底部残留的脂溶性物质充分溶解,并转移到新的 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min,4℃离心 10 min,取上清进行 HPLC 分析。

2 结果

2.1 方法的专属性

分别用乙腈配制不同浓度的含 VK, VKO, VE 和同时含有 VK, VKO 和维生素 E 醋酸酯的样品溶液,进行色谱分析检测,依据文献选取 248 nm 为检测波长^[11]。VK, VKO 和维生素 E 醋酸酯的保留时间分别约为 17.1, 11.7 和 14.3 min(图 1)。三者峰形较好,在液相中分离良好,互不干扰。

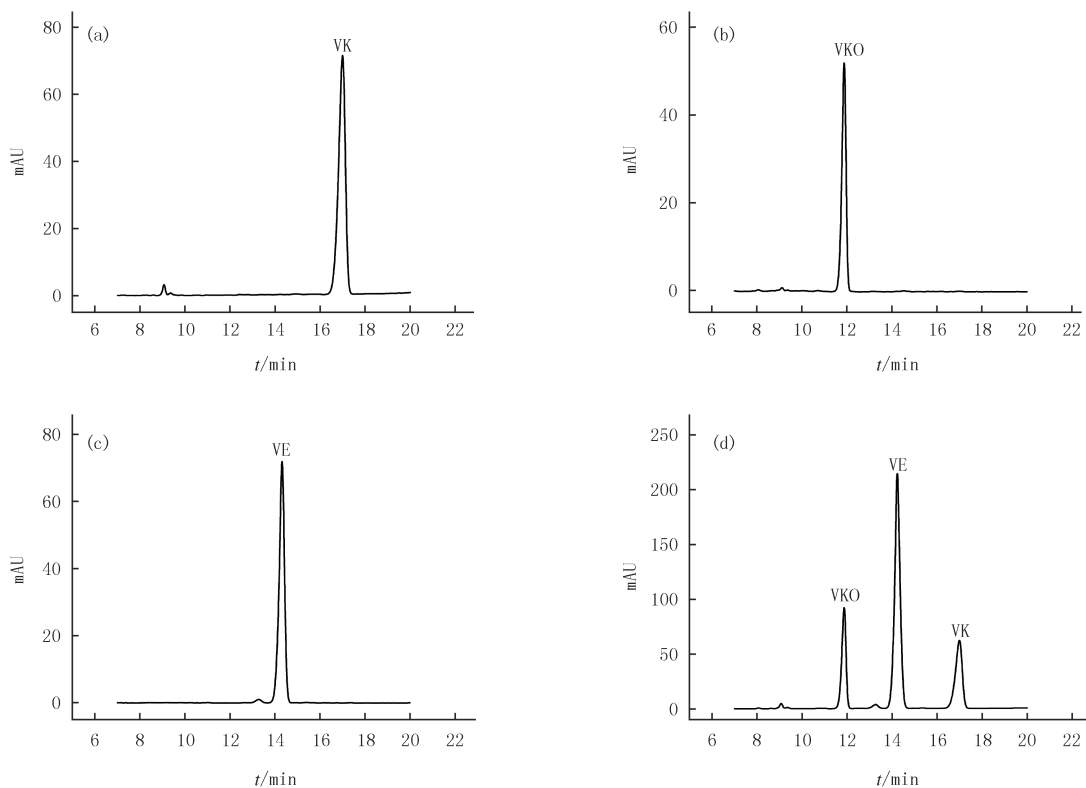
2.2 标准曲线和定量限

用 HPLC 分别分析 VK 和 VKO 的标准品,以标准品浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标进行线性回归分析,得直线回归方程,即为标准曲线(图 2)。结果表明, VK 在 0.97~500.00 μmol/L 的浓度范围内,其浓度与峰面积线性关系良好,回归方程为: $Y=24.804X+19.54$ (图 2(a), $R^2=0.9999$)。VKO 在 0.097~50.000 μmol/L 的浓度范围内,浓度与峰面积具有良好线性关系,回归方程为: $Y=54.9X+6.05$ (图 2(b), $R^2=0.9998$)。因此,本研究中 VK 的定量限为 0.97~500.00 μmol/L, VKO 的定量限为 0.097~50.000 μmol/L。

2.3 精密度和稳定性

为了检测方法的精密度和回收率,分别配制低、中、高(62.5, 125.0, 375.0 μmol/L)3 种浓度的 VK 质控样品和低、中、高(6.25, 12.5, 37.5 μmol/L)3 种浓度的 VKO 质控样品。将上述质控样品置于-20℃冰箱中

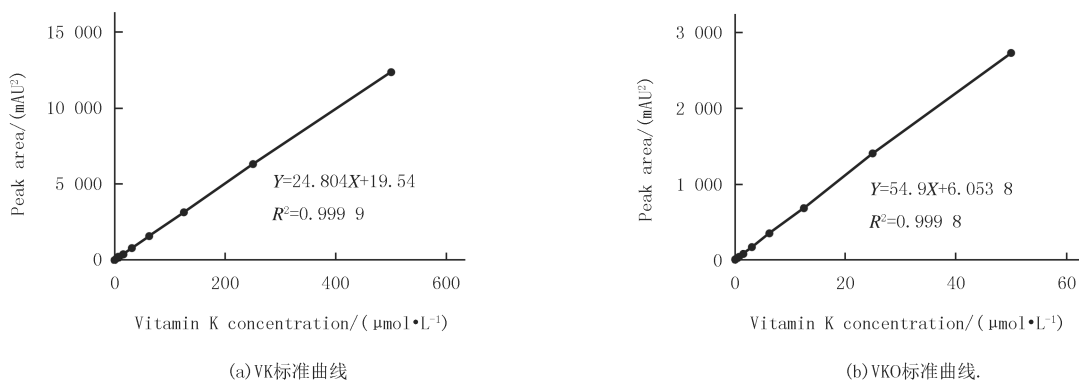
保存,分别在第 1、2、3 d 进行色谱分析,每个质控样品每天测定 5 次,依据上述标准曲线,分析日内精密度、日间精密度和回收率(表 1).结果显示各浓度 VK 的日内精密度为 0.1%~1.2%,日间精密度为 0.2%~1.6%,回收率为 94.0%~98.9%;各浓度 VKO 的日内精密度为 0.30%~1.70%,日间精密度为 0.9%~3.2%,回收率为 94.3%~103.2%,均符合要求(表 1).



(a) 维生素K的色谱图; (b) 维生素K环氧化物的色谱图; (c) 维生素E醋酸酯的色谱图; (d) A、B和C混合物的色谱图.

图1 各检测物的色谱图

Fig.1 Chromatograms of the detected substances.



(a) VK标准曲线

(b) VKO标准曲线.

图2 标准曲线

Fig.2 Standard curves

2.4 GGCX 基因敲除细胞中测定 VKOR 活性

收集不同处理组的 GGCX 基因敲除细胞,按 1.2.4 方法萃取 VK 和 VKO,在萃取过程中加入维生素 E 醋酸酯为内标,用于分析不同样品在萃取过程中的误差.结果表明,在未处理组,可以检测到特异的维生素 E 醋酸酯的峰,且峰值与 VKO 处理组相似,但没有检测到 VK 和 VKO 的特异峰(图 3(a)),说明细胞内源的 VK 和 VKO 极少,检测不到,因此用该细胞测定 VKOR 活性时,内源的 VK 和 VKO 对测定 VKOR 活性的

影响可以忽略.在 VKO 处理组,可以检测到 VK 和 VKO 的峰,说明细胞吸收 VKO 后,在 VKOR 的催化下部分 VKO 被还原为 K(图 3(b));依据峰面积和标准曲线分别计算出 VK 和 VKO 的浓度, VKO 的转化率为 $C_{VK}/(C_{VK}+C_{VKO})$,可计算出 VKO 的转化率约为 35.5%.在 VKO 与华法林共处理组(图 3(c)),由于华法林特异抑制 VKOR 活性,导致 VKO 不能被 VKOR 还原为 K,所以在色谱图上只检测到 VKO,而没有检测到 VK(图 3(c)),因此 VKO 的转化率为 0.

表 1 VK 和 VKO 的精密度和回收率结果

Tab. 1 Results of precision and recovery of VK and VKO

标准品及浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	日内精密度/%			日间精 密度/%	回收 率/%	标准品及浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	日内精密度/%			日间精 密度/%	回收 率/%		
	1 d	2 d	3 d				1 d	2 d	3 d				
VK	62.5	0.4	0.4	0.1	0.2	94.5	VKO	6.25	1.7	0.7	0.3	3.2	103.2
	125	0.5	0.6	0.4	1.2	94.0		12.5	0.5	0.7	0.5	0.9	94.3
	375	1.2	0.8	0.1	1.6	98.9		375	0.5	0.5	0.4	1.4	100.3

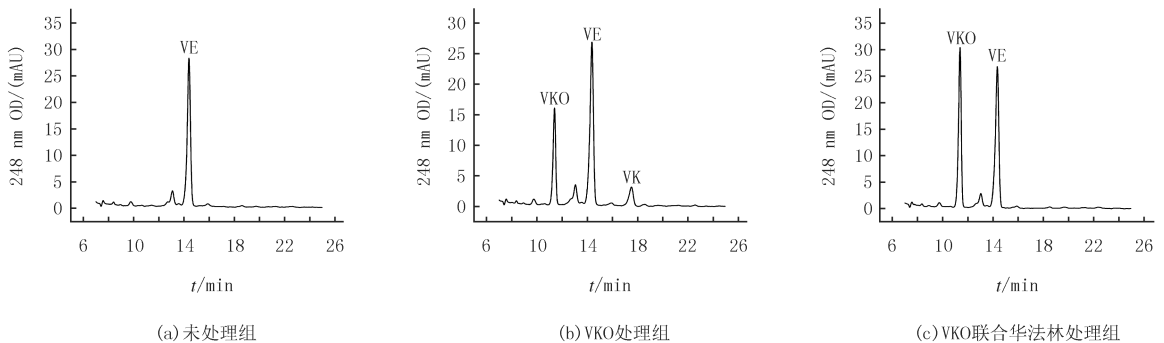


图3 GGCX基因敲除细胞不同处理组萃取物的色谱图.

Fig. 3 Chromatograms of extraction from *GGCX* gene knockout cells with different treatment

3 讨 论

VKOR 作为开发抗凝药的重要靶点,其活性测定对鉴定新型 VKOR 抑制剂具有重要的应用价值^[12],但由于该蛋白是一种整合膜蛋白,其活性测定方法较为有限.目前,测定 VKOR 活性的常用方法为基于报告基因的方法,是一种间接测定 VKOR 活性的方法,不能用于鉴定靶向抑制 VKOR 的新型抑制剂,因为该方法还可以分析维生素 K 循环中 GGCX 的活性^[12].本研究建立了一种基于 HPLC 检测 VK 和 VKO 的方法,该方法简便快速,准确性高,重复性好,且各检测物色谱峰分离良好.在流动相优化过程中,乙腈和异丙醇的比例对峰形和出峰时间很重要,减少异丙醇比例,各检测物的出峰时间将延长,且峰形可能为非对称单峰.为了兼顾各检测物的分离效果和缩短每个样品的检测时间,流动相乙腈和异丙醇的体积比例为 92.5 : 7.5.另一方面,由于维生素 K 以 3 种形式在细胞内循环,在测定 VKOR 活性中,为使 VKOR 还原的 VK 不被 GGCX 转化为 KO,本研究选择在 GGCX 基因敲除的细胞中测定 VKOR 活性,可以排除细胞中 GGCX 活性对 VKOR 活性测定的干扰.在从细胞中萃取 VK 和 VKO 的过程中,为了分析萃取操作过程对结果的影响,实验选择维生素 E 醋酸酯为内标,可分析操作过程对结果的影响^[12].综上,本研究通过建立检测 VK 和 VKO 的方法,利用 GGCX 基因敲除的细胞直接测定 VKOR 活性,将为靶向 VKOR 抑制剂的鉴定和新型抗凝药的研发提供技术支持.

参 考 文 献

- [1] LI T, CHANG C Y, JIN D Y, et al. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase[J]. Nature, 2004, 427(6974): 541-544.
- [2] ROST S, FREGIN A, IVASKEVICIUS V, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2[J]. Nature, 2004, 427(6974): 537-541.

- [3] TIE J K, STAFFORD D W. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2016, 14(2): 236-247.
- [4] DE VILDER E Y G, DEBACKER J, VANAKKER O M. *GGCX*-associated phenotypes: an overview in search of genotype-phenotype correlations[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 240.
- [5] BRENNER B, KUPERMAN A A, WATZKA M, et al. Vitamin K-dependent coagulation factors deficiency[J]. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2009, 35(4): 439-446.
- [6] SHEN G, CUI W, ZHANG H, et al. Warfarin traps human vitamin K epoxide reductase in an intermediate state during electron transfer [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(1): 69-76.
- [7] SHEN G, LI S, CUI W, et al. Stabilization of warfarin-binding pocket of VKORC1 and VKORL1 by a peripheral region determines their different sensitivity to warfarin inhibition[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2018, 16(6): 1164-1175.
- [8] TIE J K, JIN D Y, TIE K, et al. Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nucleases-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013, 11(8): 1556-1564.
- [9] TIE J K, JIN D Y, STRAIGHT D L, et al. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells[J]. *Blood*, 2011, 117(10): 2967-2974.
- [10] 高稳稳, 刘红丽, 苏改改, 等. 先天性维生素 K 依赖性凝血因子缺乏症 1 细胞诊断体系的构建[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(8): 811-814.
- GAO W W, LIU H L, SU G G, et al. Development of a cell-based diagnostic system for vitamin K-dependent coagulation factor deficiency 1 [J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2020, 37(8): 811-814.
- [11] HAO Z Y, JIN D Y, CHEN X J, et al. γ -Glutamyl carboxylase mutations differentially affect the biological function of vitamin K-dependent proteins[J]. *Blood*, 2021, 137(4): 533-543.
- [12] CHEN X J, LI C H, JIN D Y, et al. A cell-based high-throughput screen identifies drugs that cause bleeding disorders by off-targeting the vitamin K cycle[J]. *Blood*, 2020, 136(7): 898-908.

A cell-based method for detecting the activity of vitamin K epoxide reductase

Xu Yaqi^a, Wang Yiyi^a, Li Fei^a, Qiu Wenhui^a, Shen Yan^{a,b}, Shen Guomin^{a,b}

(a. School of Basic Medical Science; b. Henan International Joint Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: Vitamin K epoxide reductase (VKOR) is an important target for the development of anticoagulant. It is applied with important value to measure the VKOR activity for the identification of new inhibitors targeting VKOR. However, a reporter-gene assay has been widely used to determine VKOR activity indirectly, it could not be used to identify new inhibitors targeting VKOR. In order to establish a method for determination of VKOR activity rapidly and directly, which can be used to identify inhibitors targeting VKOR, here we develop a method for the determination of vitamin K and vitamin K epoxide based on HPLC firstly. The method is simple, rapid, accurate, reproducible to determine vitamin K and vitamin K epoxide, which can be separated well. On the basis of determination of vitamin K and vitamin K epoxide, we use a *GGCX* gene knockout cells to determine its intracellular VKOR activity directly, which can be used to identify specific VKOR inhibitors easily and quickly. This method will provide technical support for the development of new anticoagulants targeting VKOR.

Keywords: vitamin K epoxide reductase; high performance liquid chromatography; vitamin K; vitamin K epoxide; warfarin

[责任编辑 刘洋 杨浦]