

DOI: 10.13208/j.electrochem.140441

Artical ID:1006-3471(2015)01-0045-08

Cite this: *J. Electrochem.* 2015, 21(1): 45-52

Http://electrochem.xmu.edu.cn

# 细胞色素 P450 酶电化学生物传感器的构建及其药物代谢应用

徐璇, 卢菊生, 刘松琴\*

(东南大学化学化工学院, 江苏 南京 211189)

**摘要:** 药物代谢过程是药物在体内产生药效和毒性的主要过程, 发展廉价、方便、快速、高通量的体外药物代谢研究方法对新药的开发和设计、给药的方法和剂量、临床药物的检测等都有重要的指导意义. 细胞色素 P450 酶 (CYP450 酶) 在药物的 I 相反应中起到关键作用, 以电极代替辅酶 NADPH 提供 CYP450 酶催化反应过程中需要的两个电子, 构建 CYP450 酶电化学生物传感器可实现药物的初步筛选. 大量研究表明, CYP450 酶在电极表面合适的固定方法与电极材料可有效提高传感器的检测性能. 本文主要综述近年来 CYP450 酶电化学生物传感器的构建及其在药物代谢研究方面的应用, 并展望其研发前景.

**关键词:** 细胞色素 P450 酶; 药物代谢; 电化学; 生物传感; 组装方法

**中图分类号:** O646

**文献标识码:** A

药物进入人体内后将经历吸收、分布、代谢、排泄和转运的过程. 其中, 药物的代谢系指药物分子被机体吸收后, 在机体作用下发生的化学结构转化. 药物代谢通常经历两个阶段, 分别为 I 相和 II 相反应. I 相反应: 药物在酶的作用下通过氧化、还原、水解反应, 向底物分子中引入极性基团, 提高药物的极性, 为 II 相反应提供靶向底物; II 相反应 (又称结合反应): I 相代谢产物或者原型药物在酶的影响下与内源性小分子结合产生极性更强的失活结合物, 从而排出体外. 肝脏是药物代谢的主要场所, 而其中起关键作用的酶就是位于微粒体的细胞色素 P450 酶 (CYP450 酶). CYP450 酶在药物代谢方面发挥着重要作用, 候选药物的 CYP450 酶代谢、抑制或诱导作用以及代谢产物的生物毒性是候选药物的重要指标<sup>[1]</sup>.

目前, 药物代谢研究主要有体内法和体外法, 与体内代谢实验或动物代谢实验相比, 体外法具有以下诸多优点: 可排除体内干扰因素, 直接观察代谢酶对底物的选择性代谢; 易于对代谢物进行分离、提取, 较快确定药物代谢途径及结构变化; 适于分析体内代谢转化率低、缺乏灵敏检测手段

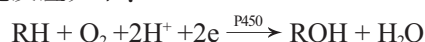
的药物; 不需要实验动物或消耗大量的样品, 降低费用. 常用的体外代谢法有肝微粒体体外温孵、重组 CYP450 酶体外温孵以及肝细胞体外温孵等, 即将一定量的 CYP 底物和制备好的肝微粒体或重组 CYP450 酶或肝细胞在模拟生理环境下温孵, 并在反应过程中定期地从反应体系取样, 检测药物及代谢物的浓度, 鉴定代谢物的结构, 测定代谢酶促反应动力学常数, 研究代谢反应途径. 液-质联用技术一直是最有价值且广泛应用的药物检测方法, 其缺陷在于可平行检测的样品数量有限、检测时间长. 荧光检测方法是实现药物高通量筛选的有力手段, 但往往需要借助荧光探针, 涉及试剂种类繁多, 建立新检测体系消耗大量时间. 此外, CYP450 酶的体外代谢的实验室方法或工业方法, 均需要电子供体辅酶 NADPH 的参与, 而 NADPH 价格昂贵, 不易保存, 这已成为药物体外代谢研究的一大难题<sup>[2]</sup>.

为解决上述难题, 人们尝试将 CYP450 酶固定于电极上, 通过电极替代 NADPH 给予 CYP450 酶活性中心提供催化循环的两个电子, 并利用一定电压下催化电流的强度与酶对药物底物催化性能

关联,实现了药物的初步筛选<sup>[3]</sup>. 自上世纪九十年代中期以来,有关 CYP450 酶直接电化学及其 CYP450 酶电化学生物传感器的研究工作已相继被报道. 起初只是把 CYP450 酶直接吸附到光电极表面,后来发现电极环境对保持 CYP450 酶的生物活性有很大的影响,若采用合适的酶固定方法和生物兼容性电极材料可极大地避免酶的变性,使酶处于有利的电子传递构象,从而有效地提高 CYP450 酶生物传感器的检测性能. 本文主要综述了 CYP450 酶电化学生物传感器的构建以及其在药物代谢研究方面的应用,并重点阐述 CYP450 酶在电极表面的组装.

## 1 细胞色素 P450 酶的结构及其催化循环

CYP450 酶是一类以与半胱氨酸配位的血红素为辅基的金属酶超级大家族. 在一个轴方向上,铁与邻近肽链上的半胱氨酸配位,在另一轴向上,当没有底物结合时,即与水分子配位,若有底物进入活性位点腔,配位的水分子被底物取代. CYP450 酶催化反应过程涉及多个步骤,有多种作用机制. 典型的反应是通过电子传递系统,将电子从 NADPH 转移至微粒体系统的 NADPH-细胞色素 P450 还原酶,或铁氧还蛋白还原酶,或线粒体、细菌体系中的非血红素铁蛋白,继而将电子传递给 CYP450 酶血红素中心,使氧分子还原活化,随后将其中一个氧原子加至底物. CYP450 酶催化的单氧化反应如下:



CYP450 酶催化反应是一种循环作用机制,如图 1 所示<sup>[4]</sup>. 当底物与 CYP450 酶结合,酶的铁从 NADPH-细胞色素 P450 还原酶等电子供体分子上得到一个电子而被还原,使铁血红素由三价还原成二价. 该铁还原态与分子氧结合,形成亚铁-二氧( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ )复合物. 另一个电子和质子加至铁复合物上形成铁-过氧化( $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ )中间体. 最后 O—O 键断裂, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$  复合物失去一个水分子,可得到很高反应活性的铁-氧中间体( $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ ),该复合物将另一个氧原子传递至底物上,底物释放后 CYP450 酶回到初始状态并开始新一轮的循环.

## 2 电极表面 CYP450 酶的组装

### 2.1 裸电极表面的直接吸附

细菌型 CYP450<sub>cam</sub>(CYP101)在光电极上的电

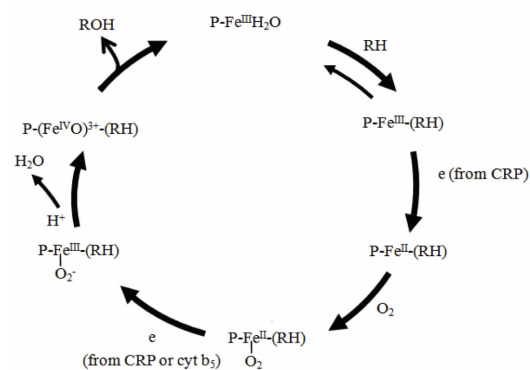


图 1 生物体内 CYP450 酶催化底物代谢过程示意图<sup>[4]</sup>

Fig. 1 The general biocatalytic pathways of CYP450 *in vivo*<sup>[4]</sup>

化学性质研究为构建重要的药物代谢 CYP450 酶电化学生物传感器打下了理论基础. 初始细菌型 CYP450<sub>cam</sub> 并没有直接固定于电极表面与电极发生直接电子传递,而在溶液中加入氧化还原电子媒介体,如五氨合钴络合物<sup>[5]</sup>、假单胞氧还蛋白<sup>[6]</sup>、铁氧还蛋白<sup>[7]</sup>等,借助电子媒介体间接给溶液的 CYP450<sub>cam</sub> 提供催化反应需要的两个电子,从而实现底物的催化.

但是,构建 CYP450 酶电化学生物传感器的最终目标是实现电化学驱动的生物催化过程,即通过电极直接给 CYP450 酶活性中心提供电子. 蛋白质膜伏安法(PFV)的发展为蛋白质的直接电化学和生物催化研究提供了新的思路,与溶液中伏安法相比它有以下优点:1)不需要电子媒介体;2)避免蛋白质分子的扩散以及变性蛋白质造成的电极钝化;3)适用于仅需要少量蛋白质的简单过程. Hill 等<sup>[8]</sup>首次将 P450<sub>cam</sub> 固定于光热解石墨电极表面,检测到 CYP450 酶活性中心与电极之间的直接电子传递. 为讨论表面半胱氨酸对 P450<sub>cam</sub> 直接电化学的影响,Lo 等<sup>[9]</sup>将野生型 CYP101 和突变蛋白分别固定于裸金电极表面,对比发现其氧化还原峰并没有区别,这表明酶表面的半胱氨酸残基不会对酶的电子传递过程产生影响. Fantuzzi 等<sup>[10]</sup>将药物代谢酶 CYP2E1 吸附于裸玻碳(GC)电极表面,首次检测到 CYP2 家族酶在电极上的直接电化学,通过电荷转移数估算酶在电极表面的吸附量  $0.96 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,近似为单层覆盖. 电化学检测实验在严格的无氧条件下(为防止形成  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$  复合物)进行,检测到一对明显的氧化还原峰,式量电位为  $-(90 \pm 5) \text{ mV (vs. NHE)}$ ,异相电子转移速率常数( $k_s$ )为  $5 \text{ s}^{-1}$ ,遗憾的是该酶电极并没有实现对

标记底物(对硝基苯酚)的电催化羟化反应。

## 2.2 离子型聚合物及其纳米复合物的层层吸附

早在上世纪九十年代,Decher 等<sup>[11-12]</sup>通过离子型聚合物及其它带电材料构建多组分薄膜一层层(Layer-by-Layer)吸附,即通过相反电荷之间的静电相互作用,利用带电基底在带相反电荷中交替沉积自组装多层膜聚电解质。如在带有正电荷的基底表面先吸附阴离子聚合物形成第一层阴离子层,继而吸附阳离子聚合物形成第二层为阳离子层,该过程不断重复,每一次交替吸附过程将改变基底表面薄膜的电荷类型。因此,只要离子聚合物带有相反的电荷,就可以将不同的组分通过不同的吸附过程组装至基底表面,以此可以构建同时含有两种或多种酶<sup>[13]</sup>、蛋白质和纳米粒子<sup>[14]</sup>或 DNA 和酶<sup>[15]</sup>的多层膜。

Rusling 课题组<sup>[16]</sup>首次将层层吸附法应用于 CYP450 酶电化学生物传感器的构建。首先,用巯基丙烷磺酸处理金电极表面使其表面带负电,然后通过阳离子聚电解质聚二烯基丙二甲基氯化铵(PDDA)和 CYP101 之间的静电相互作用将 CYP101 组装至多层膜中。石英晶体微天平(QCM)检测结果表明,该多层膜有很好的稳定性和重复性,(CYP101/PDDA)<sub>2</sub> 双层膜的厚度为 15 nm,酶固定量为 0.1 nmol·cm<sup>-2</sup>。电化学方法检测出酶血红素中心与金电极之间的直接电子传递,当 pH=7 时其式量电位为 -0.25 V (vs. SCE)。在有氧条件下该酶电极实现了对底物苯乙烯的电催化氧化,GC-MS 检测表明底物的电催化速率为 9.3 h<sup>-1</sup>,而

在溶液中的自然催化速率仅为 0.35 h<sup>-1</sup>。Munge 等<sup>[17]</sup>则借助另一种阳离子聚电解质聚聚酰亚胺(PEI)在热解石墨(PG)电极构建(cyt P450<sub>cam</sub>/PEI)<sub>n</sub> 多层膜,首次研究了离子型聚合物、膜厚度以及 pH 值对酶的电化学性质和催化活性的影响。

上述体系大都可以检测出药物的代谢产物。进一步研究发现,O<sub>2</sub> 在负电位可能被还原为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 CYP450 酶结合生成的活性中间体也可实现对底物的催化,这种 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 驱动的催化过程与实际体内的催化途径并不一致,在一定程度上影响着电催化效率。Sultana 等<sup>[18]</sup>首次将带负电荷的微粒体与阳离子聚合物相互作用构建多层膜,微粒体中同时含有磷脂、CYP450 酶和 CYP450 还原酶(CPR),在良好的生物微环境中,电化学驱动的 CYP450 酶催化途径趋向与实际体内相一致。最近,Krishnan 等<sup>[19]</sup>将纯化的 CYP450 酶和 CPR 微粒体在 PG 电极表面构建膜 30 nm 厚的 PDDA/PSS/(cyt P450 1A2/CPR+b<sub>5</sub>)<sub>6</sub> 多层膜,首次真实模拟了 CYP450 酶的自然催化途径。氧化还原电位、电子转移速率、CO-结合物、底物转化速率表明电极将电子传递给 CPR 继而传递给 CYP450 酶血红素中心,这与实际体内的电子传递途径一致,同时通过膜的伏安图和理论模拟图(图 2)检测到 CPR 与 CYP450 酶的相互作用。

作者课题组引入纳米材料石墨烯、金胶纳米粒子,构建了 CYP450 酶电化学生物传感器(图 3)。先合成稳定分散的 PDDA 功能化石墨烯(PDDA/G),并以 PDDA/G 基底层层吸附将带负电的金胶纳米粒子和 CYP3A4 微粒体交替组装于电极表面,该

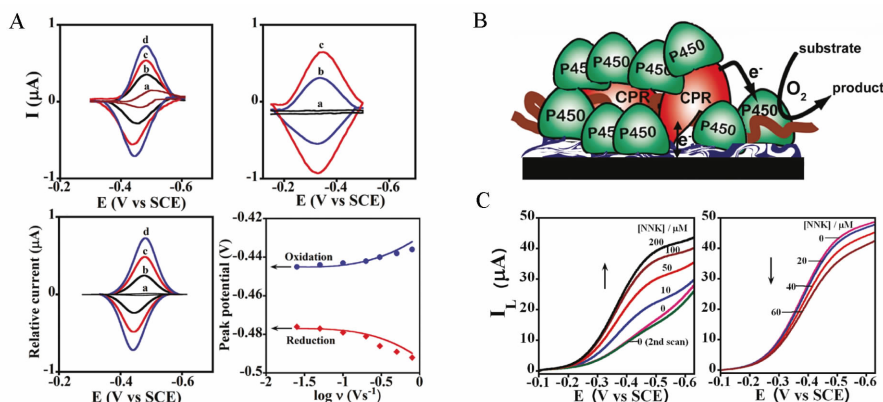


图 2 A. 实验和模拟伏安图;B. 电极表面电子传递过程示意图;C. CYP450 酶/CPR 修饰电极对药物的电催化响应<sup>[19]</sup>

Fig. 2 A. Experimental and simulated voltammograms; B. Schematic representation of cyt P450/CPR bioelectronics films on pyrolytic graphite electrodes; C. Cyt P450/CPR films in electrochemical biocatalysis<sup>[19]</sup>



多层膜为固定酶提供了理想的生物微环境,金胶纳米粒子则起着增强电子传递的作用. CYP3A4/PDDA/Au/PDDA/G/GCE 对底物硝苯地平有良好的电催化响应,其表观米氏常数( $K_m^{\text{app}}$ )为  $1.30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 检测结果证明,在该催化体系中生成的代谢产物与体内代谢产物一致,并研究了抑制剂酮康唑对 CYP3A4 药物代谢过程的抑制作用<sup>[20]</sup>.

### 2.3 聚合物及其纳米复合物的包埋

包埋是指将酶包埋于凝胶或聚合物的格子结构或微囊结构中,底物可渗入格子内与酶接触,不但减少酶蛋白的流失,而且可以很好地保持酶的生物活性. 常见的载体有多糖类载体 (甲基纤维素、壳聚糖等) 和聚合物载体 (藻酸盐、聚乙烯醇、聚氯乙烯、聚丙烯酰胺、树脂等).

Sugihara 等<sup>[21]</sup>借助导电聚合物聚吡咯将 CYP450<sub>cam</sub> 固定于氧化铟锡 (ITO) 电极上,首次应用包埋技术构建了 CYP450 酶生物传感器. 最近,Alonso-Lomillo 等<sup>[22]</sup>在微型化三电极芯片上构建了 CYP450 酶电化学生物传感器,同样也选择聚吡咯将 CYP2B4 固定于金工作电极表面,当外加电位为  $-0.45 \text{ V (vs. Ag/AgCl)}$  时,其还原电流与底物苯巴比妥浓度呈线性关系. Dai 等<sup>[23]</sup>通过环氧导电膜将 CYP3A4 固定于玻碳 (GC) 电极表面,该环氧膜的主要成分为导电聚合物环氧聚合物和聚乙炔.

作者课题组将具有良好成膜性和生物兼容性的壳聚糖应用于 CYP450 酶电化学生物传感器的构建. 该生物膜中掺杂有良好导电性和生物兼容性的纳米材料 (如金胶纳米粒子或 ITO 纳米粒

子), 不仅可为生物分子提供合适的生物微环境,更有利于保持生物分子构象,且缩短了生物分子活性中心与电极的距离,使电子快速有效传递至酶活性中心. 首先,合成了金胶-壳聚糖纳米复合物,通过包埋法将 CYP2B6 包裹于该复合物中并固定于 GC 电极,实现了酶直接电化学并观察到酶对氧及抗癌药物环磷酰胺、利多卡因等药物的催化作用. 利用高效液相色谱及电喷雾质谱对代谢产物进行全面分析,证明该药物的代谢途径与生物体内途径完全一致<sup>[24]</sup>. 随后又采用包埋法将 CYP2C9/CPR 微粒体、ITO 纳米粒子和壳聚糖 (CS) 混合均匀,配制了优异酶活性的纳米复合物,将其滴加于 GC 电极表面,实现了 CYP2C9/CPR 微粒体与电极之间快速的电子传递,  $k_s$  为  $12.252 \text{ s}^{-1}$ . CYP2C9/CPR 微粒体 /CS/GCE 对底物甲苯磺丁脲具有良好的电催化响应,  $K_m^{\text{app}}$  为  $202.84 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 通过该电化学系统研究了 CYP2C9 的特异性抑制剂磺胺苯吡唑对甲苯磺丁脲 4-羟基化反应的抑制效应,测得  $\text{IC}_{50}$  值为  $1.592 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,在文献<sup>[25]</sup>报道的数值范围之内.

### 2.4 自组装单分子层的共价键合

利用巯基与金电极之间的强吸附性以及烷烃链之间良好的范德华力,可以将长链或短链的正硫醇在金电极表面形成一个有序自组装单分子层 (SAM), SAM 末端往往含有不同的官能团如羧基、氨基或马来酰亚胺,可与 CYP450 酶表面的半胱氨酸残基共价键合,从而将 CYP450 酶有序组装至金电极表面 (图 4)<sup>[26-27]</sup>.

虽然表面活性剂及各种聚合物为 CYP450 酶

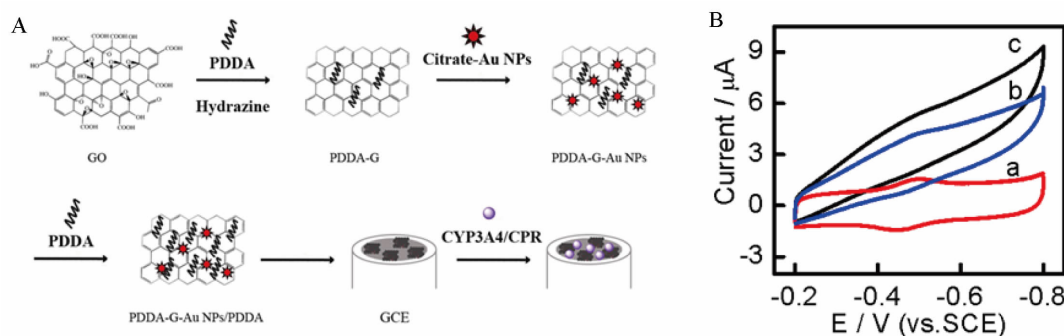


图 3 A. CYP3A4 传感器的构建; B. CYP3A4/CPR-microsomes/PDDA/Au/PDDA/G/GCE 在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.4 PBS 溶液, 扫速  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  的循环伏安图 (a. 无氧条件; b. 饱和空气; c. 含有饱和空气的  $46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硝苯地平缓冲溶液)<sup>[20]</sup>

Fig. 3 A. Illustration for the design of the CYP3A4/CPRmicrosomes biosensor; B. CV curves obtained for CYP3A4/CPR-microsomes/PDDA/Au/PDDA/G modified GCE at a scan rate of  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  in  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.4 PBS (a. without oxygen; b. with saturated oxygen; c. with addition of  $46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  nifedipine)<sup>[20]</sup>

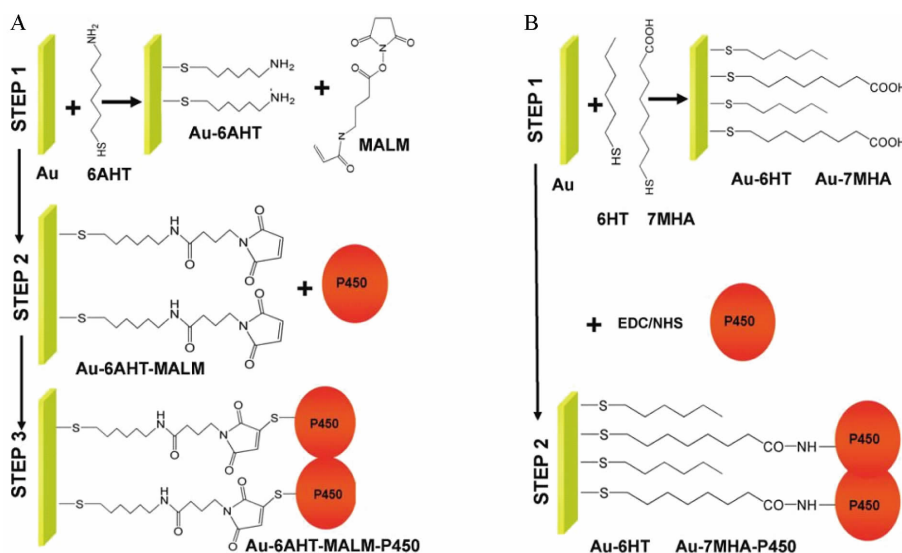


图 4 A. 金电极表面三步修饰 CYP2D6:1)6-氨基己硫醇(6AHT);2)与 3-马来酰亚胺基丙酸羧基琥珀酰亚胺酯(MALM)反应引入马来酰亚胺;3)马来酰亚胺与 CYP450 酶表面的氨基直接反应;B. 在金电极表面两步修饰 CYP2C9:1)6-己硫醇和 7-巯基庚酸(1:1)的 SAM 层;2)通过 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸化物(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作用下羧基与 CYP450 酶表面的氨基交联<sup>[28]</sup>

Fig. 4 A. Three-step immobilization of CYP2D6 (P450) to gold (Au) electrodes after the sequential deposition of 6-aminohexanethiol (6AHT) and Nsuccinimidyl-3-maleimido propionic acid (MALM) as spacers; B. Two-step immobilization of CYP2C9FLD (P450) to Au electrode after the deposition of 6-hexanethiol (6HT) and 7-mercaptoheptanoic acid (7MHA) mixture. The carboxy group of 7MHA was activated by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) prior to binding the cytochrome P450 enzyme (P450)<sup>[28]</sup>.

在电极表面的固定提供了相对简便的方法,但 SAM 的共价键合已经被证明可改善电子转移速率常数和催化效率. Fantuzzi 等<sup>[28]</sup>通过 CYP2E1 表面的半胱氨酸残基 Cys261、Cys268 与 SAM 末端马来酰亚胺的直接键合将 CYP2E1 固定于金电极表面,单层蛋白质覆盖量为  $1.1 \times 10^{13} \text{ molecules} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $k_s$  为  $10 \text{ s}^{-1}$ ,而相同浓度的 CYP2E1 在 GC 表面的  $k_s$  仅为  $5 \text{ s}^{-1}$ . 后来, Fantuzzi 等<sup>[29]</sup>又在金电极上构建了同时修饰 6-己硫醇和 7-巯基庚酸(1:1)的 SAM,借助 EDC/NHS 将 SAM 末端羧基与 CYP450 酶半胱氨酸残基上的氨基交联将 CYP3A4 固定到金工作电极上,以丝网印刷碳电极对电极和 Ag/AgCl 参比电极构造微流控电池. 通过滴定研究了 CYP3A4 对四种药物奎尼丁、硝苯地平、阿洛斯拉和昂丹司琼的代谢性能,求得  $K_m^{\text{app}}$  值的大小次序与文献报道的结果相一致. 他们还借助 10-巯基奎酸和 8-羟基辛硫醇 (1:1) SAM 层将三种重要的药物代谢相关性酶 (CYP3A4、CYP2D6 和 CYP2C9) 组装于八阵列电极上(图 5),检测了 30 多种常见药物的  $K_m^{\text{app}}$  值 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),由该

传感器测得的  $K_m^{\text{app}}$  值误差很小,在文献报道和传统温孵实验得到的  $K_m^{\text{app}}$  值范围之内<sup>[30]</sup>.

## 2.5 光驱动的 CYP450 酶电化学生物传感器

将光电化学过程与传统的电化学生物传感器相结合发展出了一种新型的生物传感器,即光电化学(PEC)生物传感器. 无机半导体纳米材料量子点(QDs)因其良好的光电化学活性已在光电化学生物传感器中得到广泛应用<sup>[31-32]</sup>. 当无机半导体材料吸收能量大于其禁带宽度的光子能量时,价带电子就会跃迁到导带,产生电子-空穴对,可能是发生电子-空穴对的复合,或导带上的电子转移到外电路或溶液中的电子受体,从而产生光电流. 若导带上的电子转移到电极上,价带的空穴被溶液中的电子供体所猝灭,则产生阳极光电流,反之则产生阴极光电流<sup>[33]</sup>. 目标分析物可作为半导体的电子供体/受体或能与溶液中的电子供体/受体发生反应,均会引起阳极或阴极光电流的改变,据此就可以实现对目标分析物的直接或间接测定.

最近,研究发现酶的血色素中心有可能与激发 QDs 发生直接电子传递过程, Onoda 等将 CdTe

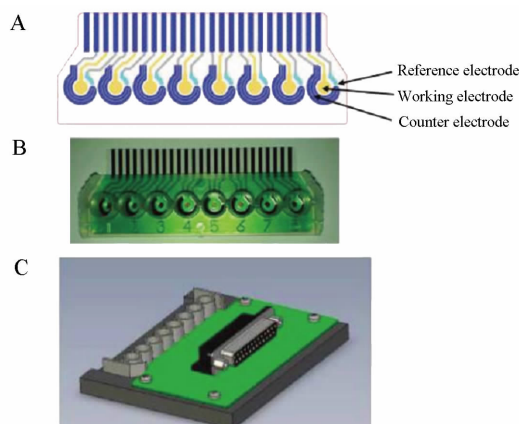


图 5 A. 在对苯二甲酸乙二醇酯(PET)上电极阵列的示意图,阵列的构建材料用颜色标记:黄色金工作电极;蓝色碳墨对电极;青色 Ag/AgCl 参比电极;灰色银油墨;B. 阵列电极的俯视图;C. 阵列电极的侧视图<sup>[29]</sup>

Fig. 5 A. Scheme for the design of the electrode array on the PET layer. The materials used for the construction of the array are color coded: yellow for the gold of the working electrode and the track; blue for the carbon ink of the counter electrode and of the contacts pads; cyan for the Ag/AgCl ink of the reference electrode; gray for the silver ink used for the connecting tracks; B. Photograph of the array from the top. It is possible to observe the polypropylene housing and the green layer of insulation ink sandwiched between the housing and the polyethylene terephthalate (PET)/contacts layer. The comb structure of the contacts is also noticeable; C. Side view of the array housed in the holder for measurement<sup>[29]</sup>

QDs 共价组装至肌红蛋白(Mb)上,其激发态 CdTe QDs 可以给酶活性中心提供电子,实现对血红素中心的光诱导还原<sup>[34]</sup>. Stoll 等报道 CdSe/ZnS QDs 与氧化态细胞色素 C(cyt c)之间也存在光诱导电子传递过程(PET)过程,引起 QDs 修饰电极上阴极光电流的增加<sup>[35]</sup>,cyt c 的氧化还原状态还可以调控光电流的大小和方向<sup>[36]</sup>.

据 CdTe QDs 与血红素酶之间 PET 过程的启发,作者课题组<sup>[37]</sup>构建了基于 CYP2C9 功能化量子点的光驱动 CYP450 酶药物代谢系统.以 CdTe QDs 作为电子供体,由激发态 QDs 的导带电子提供 CYP450 酶催化循环过程中所需要的电子,同时给电极施加合适偏压,中和 QDs 的价带空穴,此时就可以直接检测电极光诱导的药物代谢过程的催化信号(图 6). CYP2C9/QDs 纳米复合物的荧光强度

随着 CYP2C9 相对于 QDs 摩尔比的增加逐渐降低.将 CYP2C9/QDs 纳米复合物共价组装至 ITO 电极表面(CYP2C9/QDs/ITO),CYP2C9/QDs/ITO 的阴极光电流较 QDs/ITO 的明显增加.上述现象证明激发态 CdTe QDs 也能够为 CYP2C9 活性中心提供电子.随着体系中底物甲苯磺丁脲浓度的增加,CYP2C9/QDs/ITO 的阴极光电流逐渐上升,其趋势与米氏关系模型相符,这表明发生了光驱动的药物代谢行为, $K_m^{app}$  为  $(76.28 \pm 3.59) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,同时测得特异性抑制剂磺胺苯吡唑对甲苯磺丁脲 4-羟基化反应的抑制常数  $IC_{50}$  值为  $1.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,在文献报道的数值范围之内.目前,作者课题组关于其它半导体材料在 CYP450 酶电化学生物传感器中的构建工作仍在开展中,旨在简化体系、提高催化效率并缩短检测时间.

### 3 结论与展望

合成新的有光学、电学、磁学性质且能保持生物分子生物活性的纳米材料是本研究领域的关键.研究 CYP450 酶与纳米材料的相互作用,探讨生物分子与自组装单分子层、纳米材料的可控组装,构建多维度纳米功能界面,观察膜的组成、空间取向对 CYP450 酶的活性及其反应性能的影响,仍是今后本研究领域的重要课题.随着纳米传感技术和检测技术研发,CYP450 酶电化学生物传感器将朝着如下方向发展:1)操作简单、便捷化;2)微型化、商品化;3)高通量、阵列化;4)多种自动化仪器联

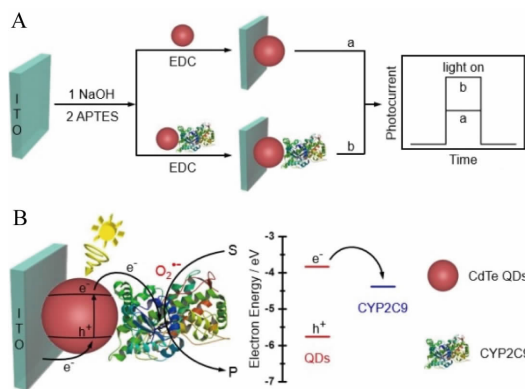


图 6 A. 光催化剂修饰电极的构造过程;B. 在光照条件下, CYP2C9/QDs/ITO 电极的电子传递途径示意图<sup>[37]</sup>

Fig. 6 A. Fabrication processes of the photo catalyst-modified electrodes; B. Illustration of the electron transfer steps of the CYP2C9/QD/ITO electrode under illumination<sup>[37]</sup>



用,智能型、自动化.同时,因生物体内的生物分子有一定的组装模式并可发挥协同作用,例如 CYP450 酶系代谢系统,由几种 CYP450 酶以膜蛋白作为成核位点通过特异性相互作用而形成的多酶复合组装体,模拟生物体内生物分子的组装,研究 CYP450 酶多酶复合组装体的组装方法以及相互作用,揭示生物体代谢通道的形成规律、干预代谢过程、指导代谢产物的高产率合成以及药物研发仍需开展大量工作.此外,随体外药物代谢研发技术趋于成熟和完善,体外代谢关键研究已逐渐从数据获取转向数据解释.虽然体外代谢业已证明在定性预测药物相互作用有重要价值,然而在定量解释方面仍无法作为单一手段预测药物的相互作用,故深入研究体外检测获得的 CYP450 酶抑制性数据与体内药物相互作用的关联,充分合理地应用体外检测数据,降低药物研发筛选过程的成本与风险,将为临床合理用药提供有价值的信息.

## 参考文献 (References):

- [1] Guengerich F P. Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products[J]. *Nature reviews-Drug discovery*, 2002, 1(5): 359-366.
- [2] Schneider E, Clark D S. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 39(1): 1-13.
- [3] Bistolas N, Wollenberger U, Jung C, et al. Cytochrome P450 biosensors—a review [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, 20(12): 2408-2423.
- [4] Krishnan S, Schenkman J B, Rusling J F. Bioelectronic delivery of electrons to cytochrome P450 enzymes[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115(26): 8371-8380.
- [5] Estabrook R W, Faulkner K M, Seth M S, et al. Application of electrochemistry for P450-catalyzed reactions [J]. *Method in Enzymology*, 1996, 272: 44-51.
- [6] Reipa V, Mayhew M P, Vilker V L. A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(25): 13554-13558.
- [7] Wirtz M, Klucik J, Rivera M. Ferredoxin-mediated electrocatalytic dehalogenation of haloalkanes by Cytochrome P450<sub>cam</sub>[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(6): 1047-1056.
- [8] Kazlauskaitė J, Westlake A C G, Wong L, et al. Direct electrochemistry of cytochrome P450<sub>cam</sub>[J]. *Chemical Communications*, 1996, 18: 2189-2190.
- [9] Lo K K, Wong L, Hill H A O. Surface-modified mutants of cytochrome CYP101 enzymatic properties and electrochemistry[J]. *FEBS Letters*, 1999, 451: 342-346.
- [10] Fantuzzi A, Fairhead M, Gilardi G. Direct electrochemistry of immobilized human cytochrome P450 2E1 [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(16): 5040-5041.
- [11] Decher G, Hong J D, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces[J]. *Thin Solid Films*, 1992, 210(2): 831-835.
- [12] Lvov Y, Decher G, Moehwald H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine)[J]. *Langmuir*, 1993, 9(2): 481-486.
- [13] Ariga K, Kunitake T. Sequential catalysis in organized multienzyme films[M]//Ed. Lvov Y, Möhwald H. *Protein architecture: Interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000: 169-192.
- [14] Lvov Y M. Thin film nanofabrication by alternate adsorption of polyions, nanoparticles, and proteins[M]//. Nalwa R W, Ed. *Handbook of surfaces and interfaces of materials (Vol. 3). Nanostructured materials, micelles and colloids*. San Diego, CA: Academic Press, 2001: 169-188.
- [15] Zhou L P, Yang J, Estavillo C, et al. Toxicity screening by electrochemical detection of DNA damage by metabolites generated *in situ* in ultrathin DNA-enzyme films[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(5): 1431-1436.
- [16] Lvov Y M, Lu Z Q, Schenkman J B, et al. Direct electrochemistry of myoglobin and cytochrome P450<sub>cam</sub> in alternate layer-by-layer films with DNA and other polyions [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(17): 4073-4080.
- [17] Munge B, Estavillo C, Schenkman J B, et al. Optimization of electrochemical and peroxide-driven oxidation of styrene with ultrathin polyion films containing cytochrome P450<sub>cam</sub> and myoglobin[J]. *ChemBioChem: A European Journal of Chemical Biology*, 2003, 4 (1): 82-89.
- [18] Sultana N, Schenkman J B, Rusling J F. Protein film electrochemistry of microsomes genetically enriched in human cytochrome P450 monooxygenases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(29): 13460-13461.
- [19] Krishnan S, Wasalathanthri D, Zhao L L, et al. Efficient bioelectronic actuation of the natural catalytic pathway of human metabolic cytochrome P450s [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(5): 1459-1465.
- [20] Huang M H, Xu X, Yang H, et al. Electrochemically-driven and dynamic enhancement of drug metabolism via cytochrome P450 microsomes on colloidal gold/graph-

- hene nanocomposites[J]. RSC Advances, 2012, 2(33): 12844-12850.
- [21] Sugihara N. Immobilization of cytochrome P450 and electrochemical control of its activity[J]. Polymers for Advanced Technologies, 1998, 9(5): 307-313.
- [22] Alonso-Lomilloa M A, Gonzalo-Ruizb J, Domínguez-Renedo O, et al. CYP450 biosensors based on gold chips for antiepileptic drugs determination [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2008, 23(11): 1733-1737.
- [23] Dai C, Ding Y, Li M, et al. Direct electrochemistry of cytochrome P450 in a biocompatible film composed of an epoxy polymer and acetylene black[J]. Microchimica Acta, 2012, 176(3/4): 397-404.
- [24] Liu S Q, Peng L, Yang X D, et al. Electrochemistry of cytochrome P450 enzyme on nanoparticle-containing membrane-coated electrode and its applications for drug sensing[J]. Analytical Biochemistry, 2008, 375(2): 209-216.
- [25] Xu X, Wei W, Huang M H, et al. Electrochemically driven drug metabolism via cytochrome P450 2C9 reductase and indium tin oxide nanoparticle composite[J]. Chemical Communications, 2012, 48(63): 7802-7804.
- [26] Sadeghi S J, Fantuzzi A, Gilardi G. Breakthrough in P450 bioelectrochemistry and future perspectives[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1814(1): 237-24.
- [27] Panicco P, Dodhia V R, Fantuzzi A, et al. Enzyme-based amperometric platform to determine the polymorphic response in drug metabolism by cytochromes P450 [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(6): 2179-2186.
- [28] Fantuzzi A, Fairhead M, Gilardi G. Direct electrochemistry of immobilized human cytochrome P450 2E1[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(16): 5040-5041.
- [29] Fantuzzi A, Capria E, Mak L H, et al. An electrochemical microfluidic platform for human P450 drug metabolism profiling[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(24): 10222-10227.
- [30] Fantuzzi A, Mak L H, Capria E, et al. A New standardized electrochemical array for drug metabolic profiling with human Cytochromes P450[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(10): 3831-3839.
- [31] Tanne J, Schafer D, Khalid W, et al. Light-controlled bioelectrochemical sensor based on CdSe/ZnS quantum dots [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(20): 7778-7785.
- [32] Zhao W W, Ma Z Y, Yu P P, et al. Highly sensitive photoelectrochemical immunoassay with enhanced amplification using horseradish peroxidase induced biocatalytic precipitation on a CdS quantum dots multilayer electrode [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(2): 917-923.
- [33] Gill R, Zayats M, Willner I. Semiconductor quantum dots for bioanalysis[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2008, 47(40): 7602-7625.
- [34] Onoda A, Himiyama T, Ohkubo K, et al. Photochemical properties of a myoglobin-CdTe quantum dot conjugate [J]. Chemical Communications, 2012, 48(65): 8054-8056.
- [35] Stoll C, Kudera S, Parak W J, et al. Quantum dots on gold: Electrodes for photoswitchable cytochrome c electrochemistry[J]. Small, 2006, 2(6): 741-7431.
- [36] Katz E, Zayats M, Willner I, et al. Controlling the direction of photocurrents by means of CdS nanoparticles and cytochrome-mediated biocatalytic cascades[J]. Chemical Communications, 2006, 13: 1395-1397.
- [37] Xu X, Qian J, Yu J C, et al. Cytochrome P450 enzyme functionalized-quantum dot as photocatalysts for drug metabolism[J]. Chemical Communications, 2014, 50(57): 7607-7610.

## Fabrication and Application of Cytochrome P450 Electrochemical Biosensor in Drug Metabolism

XU Xuan, LU Ju-sheng, LIU Song-qin\*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 211189, China)

**Abstract:** The process of drug metabolism plays an important role in drug efficacy and toxicity in vivo. Thus, the development of cheap, continent, rapid and high-throughput method for drug metabolism studies has great guiding significance for the design of new drugs, the determination of drug dosage and the detection of clinical drugs. Since the key role played by Cytochrome P450 (CYP450) in phase-I drug reaction, the constructed CYP450 enzyme biosensor can be used for the initial screening of drugs. It is found that the replacement of coenzyme NADPH with an electrode is to provide two electrons demanded in the catalytic reaction. Furthermore, the assembly methods and electrode materials have a close relationship with the detection performance of the constructed CYP450 biosensors. In this review, the construction methods of CYP450 electrochemical biosensor and their applications in drug metabolism are summarized. Particularly, future study and prospect of development are envisioned.

**Key words:** cytochrome p450; drug metabolism; electrochemistry; biosensors; assembly methods