

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001487

人 PDE4B2 全长与截短突变体的重组表达及表征

张 祥, 何 姝, 胡小蕾, 廖 飞, 杨晓兰

(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

【摘要】目的:比较 6His-SUMO 融合的人全长环核苷酸磷酸二酯酶 4B2 (SF-hPDE4B2) 及 152-528aa 截短突变体 (ST-hPDE4B2) 在大肠杆菌融合表达、亲和纯化及酶学特征, 以明确 ST-hPDE4B2 用于筛选抗炎活性 hPDE4B2 抑制剂的优势。**方法:**分别将 6His-SUMO 融合到人全长 PDE4B2 基因编码区的 N 端和 152-528aa 截短突变体 N 端得到 SF-hPDE4B2 和 ST-hPDE4B2; 大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导表达, Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化, 用偶联碱性磷酸酶的孔雀绿定磷法测定酶活性。**结果:**纯化后 ST-hPDE4B2 比活性接近 SF-hPDE4B2 的 40 倍, 活性收率超过 100 倍; SDS-PAGE 和 6His 标签免疫印迹发现纯化后 2 种融合蛋白都有多种带 6His 标签的降解片段; 测定咯利普兰 [(R)-Rolipram] 和罂粟碱的抑制常数表明, SF-hPDE4B2 对 (R)-Rolipram 主要为高亲和力结合构象, 而 ST-hPDE4B2 主要为低亲和力结合构象。**结论:**与 SF-hPDE4B2 相比, ST-hPDE4B2 用于筛选抗炎活性 hPDE4B2 抑制剂可能更有优势。

【关键词】环核苷酸磷酸二酯酶 4B2; 重组表达; 孔雀绿定磷法; 酶抑制剂

【中图分类号】Q556; R446.61

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-07-22

Recombinant expression and characterization of full-length and truncated mutant of human PDE4B2

Zhang Xiang, He Shu, Hu Xiaolei, Liao Fei, Yang Xiaolan

(College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To compare the expression, affinity purification and enzyme kinetics against representative inhibitors of full-length human phosphodiesterase 4B2 fused with 6His-SUMO on N-terminus (SF-hPDE4B2) and its 152-528aa truncate fused with 6His-SUMO on N-terminus (ST-hPDE4B2), to reveal the superiority of ST-hPDE4B2 over SF-hPDE4B2 as the target for high-throughput screen of hPDE4B2 inhibitors as potential anti-inflammatory agents. **Methods:** The two fusion proteins were expressed in Escherichia coli BL 21 (DE3) and purified through Ni^{2+} -NTA; phosphodiesterase activities were measured via alkaline phosphatase-coupled malachite green assay of phosphate in high-throughput mode. **Results:** After affinity purification, ST-hPDE4B2 exhibited specific activity nearly 40-fold higher and activity yield over 100-fold higher than SF-hPDE4B2; SDS-PAGE and Western blot of 6His tag supported that there were a lot of polypeptides degraded in both of the purified fusion proteins. Inhibition constants of (R)-Rolipram and papaverine indicated that SF-hPDE4B2 mainly existed in the high-affinity state while ST-hPDE4B2 appeared principally in the low-affinity state for (R)-Rolipram. **Conclusion:** ST-hPDE4B2 may have some advantages over SF-hPDE4B2 as the target for the screening of inhibitors as potential anti-inflammatory agents.

【Key words】 cyclic nucleotide phosphodiesterase 4B2; fusion expression; alkaline phosphatase-coupled malachite green assay of phosphate; rolipram

磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 催化细胞内第二信使 cAMP 和 cGMP 水解失活; 在哺乳动物

作者介绍: 张 祥, Email: 1135808473@qq.com,

研究方向: 酶分子工程与突变体筛选。

通信作者: 杨晓兰, Email: xiaolanyang666@yeah.net

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 31570862)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.1119.040.html>

(2018-01-09)

细胞中有 11 种 PDE 同工酶^[1-3]。人 PDE4 同工酶是选择性水解 cAMP 的关键酶, 并分为 PDE4A、4B、4C、4D 四种亚型, 各自有不同的组织细胞特异性分布。参与炎症反应的单核和中性粒 (白) 细胞内以 PDE4B2 为主^[4]。PDE4 抑制剂可治疗哮喘、慢性阻塞性肺病等炎症相关疾病^[5]。第一代 PDE4 抑制剂代表为咯利普兰 (Rolipram), 但有致呕吐等副作用^[6], 故需副

作用更低的具抗炎活性 PDE4B2 抑制剂。

测定对靶酶活性的抑制是获得新抑制剂及用已知抑制剂为先导化合物获得优化衍生物的关键环节,需测定酶活性的高通量及低成本表达高活性靶酶。现有常规方法中,只有偶联碱性磷酸酶的孔雀绿定磷法适合在所有药物筛选实验室高通量测定 PDE 活性,需活性大于 8 U/g 的 PDE 靶酶^[7-9]。靶酶可来源于真核或原核重组表达。筛选人 PDE4B2 抑制剂理论上需用人全长 PDE4B2。用真核系统重组表达不带标签的人全长 PDE4 靶蛋白成本非常高;用 sjGST 和 6His 为标签分别在 N 端和 C 端融合表达能获得高比活性人全长 PDE4B2,但其依赖真核表达而成本仍然高(Sigmaaldrich, 编号 SRP0264, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/srp0264?lang=zh®ion=CN> 和 BPS Bioscience, Inc, 编号 60042, [http://bpsbioscience.com/catalogsearch/result/?q=60042&x=10&y=8,5ug/\\$430.00](http://bpsbioscience.com/catalogsearch/result/?q=60042&x=10&y=8,5ug/$430.00))。用原核表达系统成本很低,但人全长 PDE4B2 复性难而均一性差^[8-9]。用增溶肽标签在原核融合表达能获得可溶活性人全长 PDE4B2,但其比活性很低^[10-11]。另外,人全长 PDE4B2 存在(R)-Rolipram 高亲和力结合构象和(R)-Rolipram 低亲和力结合构象 2 种状态(抑制常数分别为 5~10 nmol/L 和 140~400 nmol/L)^[12-14];现有研究显示人 PDE4B2 抑制剂致呕吐副作用与其结合(R)-Rolipram 高亲和力构象状态有关^[14-21],其抗炎作用与其结合(R)-Rolipram 低亲和力构象状态有关^[14-15,22-24]。所以,还需低成本原核表达高比活性、处于(R)-Rolipram 低亲和力构象状态的人 PDE4B2 为靶酶筛选潜在抗炎活性抑制剂。

人全长 PDE4B2 的 N 端残基抑制酶活性,且 N 端残基与底物结合域共同作用导致对(R)-Rolipram 高亲和力结合状态^[12-14]。在 N 端用 6His-SUMO 原核融合表达所得的人全长 PDE4B2(6His-SUMO tagged full-length human PDE4B2, SF-hPDE4B2)主要处于(R)-Rolipram 高亲和力结合构象状态^[7-9];相反,仅保留催化结构域 152~528aa 的截短突变体用 N 端 6His-SUMO 原核融合表达所得蛋白(6His-SUMO tagged 152~528aa truncate of human PDE4B2, ST-hPDE4B2)处于(R)-Rolipram 低亲和力结合构象状态且活性提高^[7-9,25]。本文比较 2 种融合靶蛋白的表达纯化和酶学性质,以明确用 ST-hPDE4B2 筛选 PDE4B2 抑制剂的潜在优势。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

蛋白胨、酵母粉等细菌培养试剂购自英国 Oxoid 公司,氨苄青霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)等购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司。Ni²⁺-NTA 亲和层析柱购自 GE Healthcare 公司。6His-tag 鼠抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗购于南京钟鼎生物技术有限公司。SDS-PAGE 电泳试剂和化学发光液购自美国 BIO-RAD 公司。孔雀绿、cAMP、盐酸罂粟碱、牛小肠碱性磷酸酶购于 Sigma-Aldrich, (R)-Rolipram 购自 ICN Biochemicals。携带 SF-hPDE4B2 基因和 ST-hPDE4B2 基因的 pReceiver-B13 质粒(序列见 Genebank accession no. M97515)为此前构建^[7]。Escherichia coli BL21 (DE3)感受态细胞购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 靶蛋白的诱导表达

将 2 种质粒分别转化 Escherichia coli BL21 感受态细胞,在含 0.1 g/L 氨苄青霉素 LB 培养基平板上 37 ℃ 过夜。挑取单克隆接种于含 0.1 g/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 条件下 180 r/min 振荡 1~2 h 至细胞悬液在 600 nm 处吸光度约 0.6,以终浓度 0.6 mmol/L IPTG 诱导表达 SF-hPDEB2,以终浓度 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达 ST-hPDEB2;加诱导剂后细胞以 200 r/min 于 16 ℃ 再培养 20 h。

1.3 重组蛋白纯化

将诱导培养后细胞以 4 000 r/min 离心 15 min 收集,用预冷到 4 ℃ 的结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 0.4 mol/L NaCl)重悬,在冰水浴下超声破碎细菌(超声 4 s, 间隔 6 s, 振幅 26 %, 破碎 10 min);4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 30 min 取上清,用结合缓冲液平衡 Ni²⁺-NTA 柱(柱体积 5.0 mL, 结合 6His 标签蛋白最大容量约 50 mg;上样蛋白总量约 40 mg);用含 20 mmol/L 咪唑结合缓冲液洗脱杂蛋白得层析穿透液,再用含 500 mmol/L 咪唑结合缓冲液洗脱目的蛋白。脱盐脱咪唑浓缩后,目的蛋白样品冻存于-80 ℃ 备用。

1.4 重组蛋白表征

1.4.1 蛋白分析 用 Bradford 法测定蛋白浓度^[26],用牛血清白蛋白作为参考。用含变性剂十二烷基硫酸钠的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析多肽链组成和鉴定纯度。

1.4.2 免疫印迹检测含 6His 标签的多肽 将样品经 12% SDS-PAGE 分离,转印到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF);5% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 2 h,加入 1:1 000 稀释的鼠抗 6His 抗体在 4 ℃ 结合过夜,用洗涤缓冲液(0.02 mol/L Tris, 0.14 mol/L NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)洗膜 4 次,再加入用 5% BSA 封闭液,用 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗室温孵育 1 h。用洗涤缓冲液洗膜,最后用 Western ECL 发光底物鉴定目的蛋白表达。

1.4.3 PDE 活性测定 用偶联碱性磷酸酶的孔雀绿定磷测

定磷酸二酯酶 PDE 的活性^[7]。PDE 活性单位定义为每分钟水解一微摩尔底物 cAMP 所对应的酶量。反应混合物共 1.35 mL, 其中含有 1 033 μ L 反应缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L MgCl₂)、30 μ L 恰当稀释 PDE 溶液、162 μ L cAMP 溶液终浓度 60 μ mol/L、125 μ L 适当稀释碱性磷酸酶溶液 (含甘油 28%, 终浓度 35 kU/L 以上), 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 反应 20 min; 加入 250 μ L 40%高氯酸终止反应, 12 000 r/min 离心 10 min 去沉淀。取 700 μ L 离心上清加入 130 μ L 孔雀绿试剂 (1.0 mmol/L 孔雀绿溶于含 0.16 % PVA 和 6 mmol/L 硫酸溶液中)混匀, 2.0 min 之内加入 70 μ L 钼酸铵 (50 mmol/L, 含 3.4 mol/L 硫酸), 混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 在 630 nm 测定吸收。设置试剂空白校正包括抑制剂在内的干扰。

1.4.4 抑制常数的测定 测定酶活性抑制率对抑制剂浓度对数的响应, 用 MS Excel 6.0 内嵌函数拟合线性部分确定半抑制浓度 (IC₅₀), 按照 SF-hPDE4B2 米氏常数 (K_m) 为 (8.5 $\pm$ 0.1) μ mol/L, ST-hPDE4B2 的 K_m 为 (54.0 $\pm$ 4.0) μ mol/L, 换算竞争性抑制剂的抑制常数^[7-9]。

1.5 数据处理

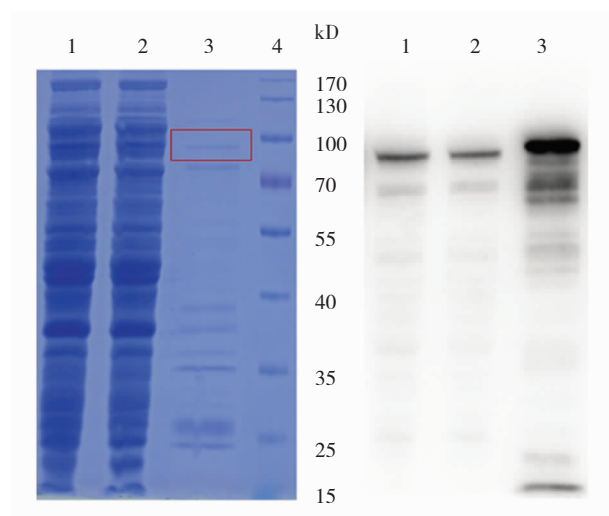
SPSS 19.0 软件作统计分析, t 检验比较均值。实验结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组蛋白的诱导表达和纯化

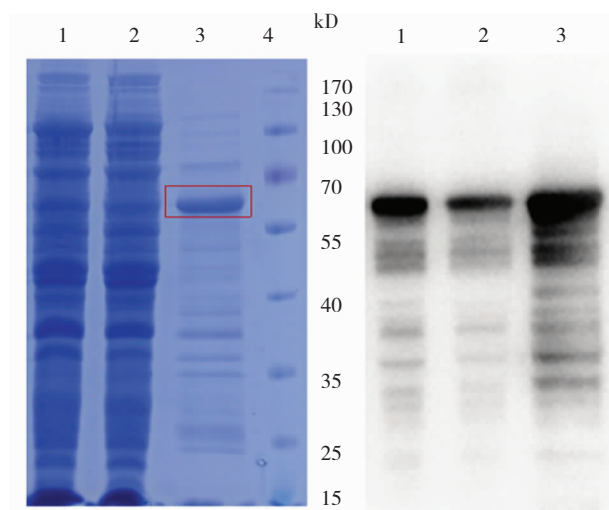
针对 SF-hPDE4B2, 由 SDS-PAGE 和 6His 标签的免疫印迹结果 (图 1) 可见, 诱导表达后细胞裂解液中存在预期分子量和带 6His 标签的 SF-hPDE4B2, 但其丰度很低。用 Ni²⁺-NTA 柱纯化时总蛋白上样量低于其最大容量, Ni²⁺-NTA 柱基本不会过载, 但单次 Ni²⁺-NTA 柱纯化的 SDS-PAGE 结果显示, 细胞裂解上清与层析穿透液的分子量组成和目的蛋白丰度均相当, 表明 SF-hPDE4B2 与亲和介质结合能力较差, 而且用 500 mmol/L 咪唑洗脱成分的 SDS-PAGE 显示 SF-hPDE4B2 也并非主成分, 从图中染色相对强度估计目的蛋白丰度不超过 10%。6His 标签免疫印迹显示, 细胞裂解液上清与层析穿透液中的 6His 标签蛋白成分和含量也相当且目的蛋白丰度很低, 500 mmol/L 咪唑洗脱成分也可见多种含 6His 标签的多肽片段, 但目的蛋白是其中的主要成分。

针对 ST-hPDE4B2, SDS-PAGE 和免疫印迹获得类似结果 (图 2)。细胞裂解液上清预期分子量目的蛋白丰度也很低, 在穿透液中蛋白条带与裂解液上清中相当。但与 SF-hPDE4B2 纯化产物显著不同的是, 单次 Ni²⁺-NTA 柱纯化后 SDS-PAGE 显示主成分为 ST-hPDE4B2, 其丰度接近 40%。6His 标签免疫印迹显示纯化产物仍有多条带 6His 标签的降解多肽片段, 显然目的蛋白为主要成分。



左图为 SDS-PAGE; 右图为免疫印迹检测; 1. 300 mL 含细胞的培养基加 100 mL 裂解缓冲液 0 $^{\circ}$ C 超声裂解 16 min 再 12 000 r/min 离心 30 min 后, 取上清 30 μ L 上样; 2. 层析穿透液取 30 μ L 上样; 3. 目的蛋白洗脱成分, 上样蛋白量 5 μ g; 4. Marker

图 1 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 SF-hPDE4B2 的纯化结果
Fig.1 SDS-PAGE and Western blot for SF-hPDE4B2



左图为 SDS-PAGE, 右图为免疫印迹检测; 1. 300 mL 含细胞的培养基加 100 mL 裂解缓冲液 0 $^{\circ}$ C 超声裂解 16 min 再 12 000 r/min 离心 30 min 后, 取上清 30 μ L 上样; 2. 层析穿透液取 30 μ L 上样; 3. 目标蛋白洗脱成分, 上样蛋白量 10 μ g; 4. Marker

图 2 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 ST-hPDE4B2 的纯化
Fig.2 SDS-PAGE and Western blot for ST-hPDE4B2

定量比较可见 2 种靶酶表达纯化效果存在明显差异 (表 1)。纯化后 SF-hPDE4B2 蛋白总收率只有 ST-hPDE4B2 蛋白总收率的 1/3; 纯化后 SF-hPDE4B2 比活性却仅约 ST-hPDE4B2 的 1/40, 因此其活性收率不到 ST-hPDE4B2 的 1/100。

2.2 动力学特征的初步比较

测定 PDE4 经典选择性抑制剂 (R)-Rolipram 和非选择性

抑制剂罂粟碱对 2 种靶蛋白的 IC₅₀ 并换算成对应竞争性抑制常数 K_i(表 2)。可见,在所测浓度范围内,SF-hPDE4B2 主要呈现为(R)-Rolipram 高亲和力结合状态而 ST-hPDE4B2 基本都为对(R)-Rolipram 低亲和力结合状态。相反,2 种融合靶蛋白对非选择性抑制剂罂粟碱都处于低亲和力状态。

表 1 2 种融合重组靶蛋白的纯化效果比较($n=3$)

Tab.1 Comparison for the purification of SF-hPDE4B2 and ST-hPDE4B2($n=3$)

靶酶	蛋白量 (mg/L 培养基)	纯化后的表现 比活(U/mg)	酶活收率 (U/L 培养基)
SF-hPDE4B2	5.12 ± 0.12	0.03 ± 0.01	0.15 ± 0.02
ST-hPDE4B2	15.11 ± 0.18	1.31 ± 0.03	19.79 ± 0.24
<i>t</i> 值	79.980	70.110	141.200
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

表 2 (R)- 咯利普兰和罂粟碱对两种融合重组靶蛋白的抑制作用比较($\mu\text{mol/L}$, $n=3$)

Tab.2 Inhibition of (R)-Rolipram and papaverine for two fusion targets($\mu\text{mol/L}$, $n=3$)

靶酶	(R)- 咯利普兰		罂粟碱	
	IC ₅₀	K _i	IC ₅₀	K _i
SF-hPDE4B	0.09 ± 0.01	0.01 ± 0.01	43.21 ± 1.22	5.32 ± 0.51
ST-hPDE4B2	0.69 ± 0.07	0.33 ± 0.02	7.22 ± 1.10	3.41 ± 0.31
<i>t</i> 值	3.150	24.790	37.950	5.540
<i>P</i> 值	0.035	0.000	0.000	0.005

3 讨 论

高通量筛选酶抑制剂要求测定酶活性的方法操作简便、分析容量大且成本低,使用微孔板系统是基本要求。从成本和操作效率、设备依赖性等考虑,本实验室此前建立的偶联碱性磷酸酶的孔雀绿定磷法测定 PDE4 活性是适合普通实验室常规高通量筛选 PDE4 抑制剂的唯一方法,但要求靶蛋白比活性高于 8 U/g^[7],且靶蛋白活性收率越高越好。本研究结果表明,PDE4B2 全长和截短突变体在大肠杆菌中与 6His-SUMO 融合表达效率都较低,且都可能降解。SF-hPDE4B2 在大肠杆菌中表达更易团聚、降解^[11],导致裂解上清中丰度较低,这可能是使得 SF-hPDE4B2 表观比活性很低的根本原因。另外,可能 2 种融合靶蛋白对所用亲和层析介质 Ni²⁺-NTA 的亲和力差异显著,所得目标蛋白的纯度和收率都有显著差异。这两方面的累积效应使 ST-hPDE4B2

活性收率显著高于 SF-hPDE4B2。考虑 2 种融合表达靶蛋白纯化后样品中丰度的差异,可能 SF-hPDE4B2 和 ST-hPDE4B2 比活性差异并不大。鉴于测定 PDE4 活性筛选抑制剂对靶蛋白活性的要求,用 ST-hPDE4B2 为靶蛋白在成本上将有明显优势。

(R)-Rolipram 是公认 PDE4 探针,用于表征人 PDE4 的高亲和力和低亲和力构象^[12-15]。全长 hPDE4 多个亚型含 N 端 UCR2 结构域(在 hPDE4B2 中即是 81-151aa),与活性中心相互作用抑制其水解 cAMP 催化活性,还导致其(R)-Rolipram 高亲和力结合构象^[14],且全长 hPDE4 中对(R)-Rolipram 高/低亲和力结合构象的比例还可因组织来源、表达因子、寡聚状态、折叠状态和翻译后磷酸化修饰及表达纯化过程而改变。脑组织提取所得 hPDE4 以(R)-Rolipram 高亲和力结合构象为主,而巨噬细胞、人单核细胞、RBL 细胞提取所得 hPDE4 以(R)-Rolipram 低亲和力结合构象为主^[14-15]。抑制剂引起的恶心、呕吐、胃酸分泌等副作用与其对(R)-Rolipram 高亲和力构象的结合正相关^[14-21],而抗炎作用与其对(R)-Rolipram 低亲和力构象的结合(即对活性位点的结合)正相关^[14-15,22-24]。hPDE4B2 截短突变体(152-528aa)只含催化活性位点,与(R)-Rolipram 结合表现为低亲和力构象^[7,13-14,25]。所以,用截短突变体筛选潜在抗炎作用的抑制剂更有吸引力,用全长 hPDE4B2 筛选的高亲和力抑制剂存在潜在的副作用。

虽然 SF-hPDE4B2 比 ST-hPDE4B2 对底物 cAMP 亲和力高,但 SF-hPDE4B2 对(R)-Rolipram 亲和力也更高,这对筛选副作用低的抗炎药用抑制剂不利。可能 SUMO 代替 N 端与活性中心的相互作用造成对带负电荷底物 cAMP 的亲和力差异,但对催化活性的影响并不大。特殊的是,ST-hPDE4B2 对(R)-Rolipram 在 0.50~20 mol/L 近 40 倍浓度范围内表现为低亲和力状态,这对筛选副作用低的抗炎药用抑制剂有显著优势。(R)-Rolipram 在测定条件下处于中性。目前报道的 PDE4 选择性抑制剂主要是中性的。因此,ST-hPDE4B2 可能适合在普通实验室常规高通量筛选 PDE4 抑制剂,且有利于低成本发现副作用更低的抗炎抑制剂类药物。

参 考 文 献

- [1] Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodi es-

- terases; relating structure and function[J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, 65: 1–52.
- [2] Ahmad M, Flatt PR, Furman BL, et al. The role of the cyclic GMP inhibited cyclic AMP specific phosphodiesterase (PDE3) in regulating clonal BRIN BD11 insulin secreting cell survival[J]. *Cell Signal*, 2000, 12(8): 541–548.
- [3] Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(2): 174–179.
- [4] Wang P, Wu P, Ohleth KM, et al. Phosphodiesterase 4B2 is the predominant phosphodiesterase species and undergoes differential regulation of gene expression in human monocytes and neutrophils[J]. *Mol Pharmacol*, 1999, 56(1): 170–174.
- [5] Lipworth BJ. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Lancet*, 2005, 36(1): 167–175.
- [6] Rahmen N, Schlupp CD, Mitsunaga H, et al. A particular silent codon exchange in a recombinant gene greatly influences host cell metabolic activity[J]. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1): 156–162.
- [7] Chen C, Liu M, Wu J, et al. Microplate-based method to screen inhibitors of isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase fused to SUMO[J]. *J Enzyme Inhibit Med Chem*, 2014, 29(6): 836–839.
- [8] Feng J, Chen Y, Pu J, et al. An improved malachite green assay of phosphate; mechanism and application[J]. *Anal Biochem*, 2011, 409(1): 144–149.
- [9] Zhu S, Gan Z, Li Z, et al. The measurement of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 activities via the quantification of inorganic phosphate with malachite green[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 636(1): 105–110.
- [10] Zhu S, Yang G, Yang X, et al. Soluble expression in *Escherichia coli* of active human cyclic nucleotide phosphodiesterase isoform 4B2 in fusion with maltose-binding protein[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(4): 968–970.
- [11] Salanova M, Jin SC, Conti M. Heterologous expression and purification of recombinant rolipram-sensitive cyclic AMP-specific phosphodiesterases[J]. *Methods*, 1998, 14(1): 55–64.
- [12] Rocque WJ, Tian G, Wiseman JS, et al. Human recombinant phosphodiesterase 4B2B binds (R)-rolipram at a single site with two affinities[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(46): 14250–14261.
- [13] Rocque WJ, Holmes WD, Patel IR, et al. Detailed characterization of a purified type 4 phosphodiesterase, HSPDE4B2B; differentiation of high- and low-affinity (R)-rolipram binding[J]. *Protein Expr Purif*, 1997, 9(1): 191–202.
- [14] Gurney ME, Burgin AB, Magnusson OT, et al. Small molecule allosteric modulators of phosphodiesterase 4[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 204(1): 167–192.
- [15] Souness JE, Rao S. Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases[J]. *Cell Signal*, 1997, 9(3–4): 227–236.
- [16] Hirose R, Manabe H, Nonaka H, et al. Correlation between emetic effect of phosphodiesterase 4 inhibitors and their occupation of the high-affinity rolipram binding site in *Suncus murinus* brain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 573(1–3): 93–99.
- [17] Robichaud A, Savoie C, Stamatiou PB, et al. Assessing the emetic potential of PDE4 inhibitors in rats[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 135(1): 113–118.
- [18] Robichaud A, Savoie C, Stamatiou PB, et al. PDE4 inhibitors induce emesis in ferrets via a noradrenergic pathway[J]. *Neuropharmacology*, 2001, 40(2): 262–269.
- [19] Duplantier AJ, Biggers MS, Chambers RJ, et al. Biarylcarboxylic acids and -amides; inhibition of phosphodiesterase type IV versus [3H] rolipram binding activity and their relationship to emetic behavior in the ferret[J]. *J Med Chem*, 1996, 39(1): 120–125.
- [20] Souness JE, Scott LC. Stereospecificity of rolipram actions on eosinophil cyclic AMP-specific phosphodiesterase[J]. *Biochem J*, 1993, 291(2): 389–395.
- [21] Souness JE, Maslen C, Scott LC. Effects of solubilization and vanadate/glutathione complex on inhibitor potencies against eosinophil cyclic AMP-specific phosphodiesterase[J]. *FEBS Lett*, 1992, 302(2): 181–184.
- [22] Barnette MS, Christensen SB, Essayan DM, et al. SB 207499 (Ariflo), a potent and selective second-generation phosphodiesterase 4 inhibitor in vitro anti-inflammatory actions[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 284(1): 420–426.
- [23] Souness JE, Houghton C, Sardar N, et al. Evidence that cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors suppress interleukin-2 release from murine splenocytes by interacting with a ‘low-affinity’ phosphodiesterase 4 conformer[J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 121(4): 743–750.
- [24] Souness JE, Griffin M, Maslen C, et al. Evidence that cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors suppress TNF α generation from human monocytes by interacting with a ‘low-affinity’ phosphodiesterase 4 conformer[J]. *Br J Pharmacol*, 1996, 118(3): 649–658.
- [25] Zhang Y, Yang X, Hu X, et al. Resonant-Mie-scattering of aggregates of phosphomolybdate and papaverine for measuring activities and screening inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 804: 215–220.
- [26] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.

(责任编辑: 方 济)