

·质量分析研究·

参环毛蚓体内核苷磷酸化酶的活性测定及动力学分析

李 菁, 龚 玲, 李 薇, 卢瑞珊, 陈立红, 迟玉广(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立参环毛蚓体内嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)的检测方法, 以肌苷为底物, 评价该酶的活性。 **方法** 采用 HPLC 法, 色谱条件: Ecosil C₁₈-AQ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 10 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢铵缓冲液(pH4.5)和甲醇, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为室温, 检测波长 254 nm, 用底物肌苷与组织粗蛋白提取液在室温孵育 30 min, 沸水煮 5 min 终止反应, 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清过滤后进行 HPLC 分析, 以 OriginPro 8.5 软件作图, 计算酶动力学参数。 **结果** 酶反应中产物次黄嘌呤在 0.5~40 μmol·L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系($r=0.9996$); 精密度小于 3.5%, 回收率大于 80%。 PNP 酶动力学参数: $V_{\max}$ 为 0.015 nmol·min⁻¹·mg⁻¹, K_m 为 19.8 μmol·L⁻¹。 **结论** 成功构建了参环毛蚓体内次黄嘌呤代谢酶活性测定相关的实验体系, 该法所得数据稳定可靠, 可准确反映关键酶活性的动态变化。

关键词: 参环毛蚓; 次黄嘌呤; 肌苷; 嘌呤核苷磷酸化酶; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0721-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.018

Assay of Purine Nucleoside Phosphorylase Activity in *Pheretima Asperfillum* (E·Perrier) and Analysis of Its Enzyme Kinetics

LI Jing, GONG Ling, LI Wei, LU Ruishan, CHEN Lihong, CHI Yuguang(College of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish a method for evaluating the purine nucleoside phosphorylase (PNP) activity in *Pheretima asperfillum*(E. Perrier) by high-performance liquid chromatography(HPLC) -UV detection, and to analyse the enzyme kinetics of PNP. **Methods** Ecosil C₁₈-AQ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column, a mobile phase of 10 mmol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate buffer(pH4.5) -methyl alcohol, and gradient elution were used. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and detection wavelength was 254 nm. The samples were incubated with inosine respectively for 30 min at room temperature, and the reactions were terminated by immersion of the test-tubes in boiling water for 5 min. The reactive liquid was centrifuged at 12000 r·min⁻¹ for 10 min. Finally, the supernatant was analyzed by HPLC, and the kinetic parameters were calculated with OriginPro 8.5 software. **Results** The linear range of the reactive product of hypoxanthine was 0.5~40 μmol·L⁻¹ ($r=0.9996$) and the detection limit was 0.05 μmol·L⁻¹. The relative standard deviations were less than 3.5 %, and the method recovery was more than 80 %. The results of enzyme kinetic analysis of PNP showed that that $V_{\max}$ was 0.015 nmol·min⁻¹·mg⁻¹, and K_m was 19.8 μmol·L⁻¹. **Conclusion** The experimental system for determining enzyme activity in purine metabolism of *Pheretima asperfillum* has been established successfully. The established method is steady, accurate and suitable for assaying the dynamic changes of PNP activity, which will lay an experimental basis for the further study of purine metabolism and its exact mechanism in the future.

Keywords: *Pheretima Asperfillum*(E. Perrier); Hypoxanthine; Inosine; PNP; HPLC

收稿日期: 2014-04-14

作者简介: 李菁, 女, 硕士研究生, 研究方向: 新技术在中药品质研究中的应用。Email: 399937707@qq.com。通讯作者: 李薇, 教授, 博士。研究方向: 中药品种鉴定与品质评价。Email: liwei-li@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81374035)。

参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 属钜蚓科动物, 药材习称“广地龙”, 是《中华人民共和国药典》收载的 4 种来源动物中品质最优者。在广地龙入药的四千多年历史中, 其平喘作用为临床常用^[1]。由于次黄嘌呤及黄嘌呤是目前已知地龙平喘作用的重要物质基础^[2-3], 因此, 次黄嘌呤的存在与否及含量高低自然成为评价广地龙平喘药效的重要指标性成分^[4]。迄今为止, 参环毛蚓体内次黄嘌呤的合成代谢途径研究尚属空白, 无法了解次黄嘌呤如何生成及影响和控制其产量与代谢方式的因素。众所周知, 酶是细胞内生物化学反应的催化剂, 其存在与否及活性的高低直接影响产物的形成和产量^[5]。据此, 本研究借鉴国外相关研究^[6-8]成果, 以次黄嘌呤代谢过程中产生重要作用的嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)为主要研究对象, 构建能快速准确检测参环毛蚓体内 PNP 酶活性的方法, 考察该酶活性效应及其作用规律, 为进一步确认及探究参环毛蚓体内嘌呤合成代谢途径, 解析其调控机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 P680A LPG 高效液相色谱系统、ASI-100 自动进样器、UVD170U 紫外检测器, 美国戴安公司; TL-18M 台式高速冷冻离心机, 上海市离心机械研究所有限公司; TG16-W 微量高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; SG8200HE 超声波清洗机, 郑州南北仪器设备有限公司; BP211D 十万分之一精密电子天平, 德国赛多利斯公司。

标准品肌苷(批号: J-031-130611)、次黄嘌呤(批号: C-069-130511), 成都瑞芬思生物科技有限公司; 磷酸二氢铵、甲醇, 色谱纯, 广州市文睿科学仪器有限公司; 小牛血清蛋白(BSA, 批号: MPBIO 0218054991)、Bradford Reagent(批号: SK3031-1), 上海生工生物工程有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物 样本采自广东省广州市番禺区, 经广州中医药大学李薇教授鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)。选择体型健硕、活力较强、性成熟、体表具有明显生殖环带、平均湿质量约 14.1 g 的健康成蚓, 经无菌超纯水清洗后, 放入铺有湿润灭菌滤纸的塑料箱中, 在室温(22 ± 2)℃下, 避光培养 48 h 以备用。

1.3 标准溶液配制与样品处理

1.3.1 标准溶液配制 精密称取肌苷标品 3.88 mg, 次

黄嘌呤标品 2.51 mg, 分别置于 2 mL 量杯中, 用 PBS 缓冲液溶解并定容至 10 mL 的容量瓶, 均稀释为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为母液, 置于 4℃ 冰箱中备用。

1.3.2 参环毛蚓粗蛋白的制备 解剖活体参环毛蚓, 去除肠道后剪取体壁组织用 PBS 缓冲液浸泡润洗 3 次, 转移至培养皿剪碎后用匀浆器研磨, 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.4 的 PBS 缓冲液为溶剂, 将组织液转移至离心管, 4℃ $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 将提取液分装, -20℃ 保存备用。以小牛血清蛋白(BSA)为标准品, 采用 Bradford 法测定粗蛋白含量。

1.3.3 酶孵育体系 参照文献^[6-7], 1.75 mL 酶反应体系包括 $15.013 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 广地龙粗蛋白, 底物肌苷 ($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 用于启动反应, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液(pH7.4)作为溶剂, 使用时将各母液用 PBS 稀释至所需浓度, 其中粗蛋白为 0.5 mL, 底物为 1 mL, BSA 为 0.25 mL。室温孵育 30 min 后, 沸水煮 5 min 终止反应, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 取滤液 10 μL 进行 HPLC 分析。以产物次黄嘌呤的变化量进行统计学分析。

1.4 色谱条件 采用 Ecosil C₁₈-AQ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为室温, 检测波长为 254 nm。流动相 A 为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢铵缓冲液, 用磷酸调 pH 至 4.5, B 为 10% 甲醇。采用梯度洗脱: 0~10 min A-B (50:50), 10~15 min A-B (20:80), 15~25 min A-B (0:100), 25~35 min A-B (0:100)。

1.5 PNP 酶反应动力学研究

1.5.1 蛋白浓度选择 取浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 肌苷标准液, 分别加入至蛋白浓度为 0, 0.75, 1.50, 3.00, 4.50, 7.50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酶反应体系。按 1.3.3 项下方法操作并测定($n=6$)。

1.5.2 孵育时间选择 取浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 肌苷标准液加入至蛋白浓度为 7.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酶反应体系, 分别在 0, 15, 30, 45, 60 min 后沸水煮 5 min 终止反应, 按 1.3.3 项下方法操作并测定($n=6$)。

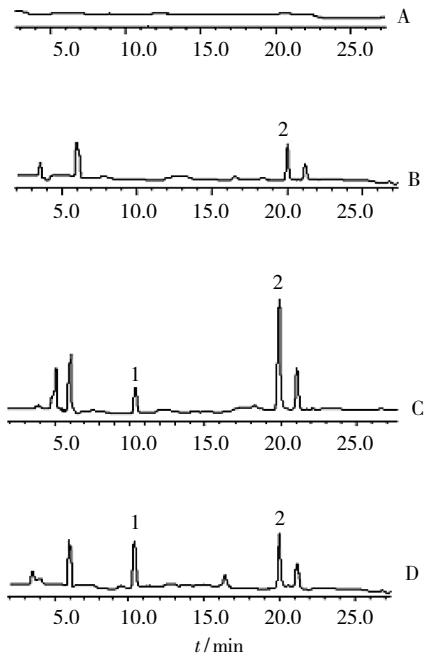
1.5.3 酶动力学实验 分别取浓度为 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肌苷标准液加入酶反应体系中, 按 1.3.3 项下方法操作并测定($n=6$)。

1.6 统计学处理方法 数据采用 SPSS19.0 进行统计学处理, 计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。酶动力学参数则使用 OriginPro 8.5 软件作图并计算。

2 结果

2.1 方法学考察结果

2.1.1 方法专属性 在优化的色谱条件下，肌苷峰型良好，与代谢产物分离良好。且酶反应体系中无其他内源性物质干扰，见图 1。



A. 流动相 (mobile phase); B. 失活组织粗蛋白 (inactivation of protein); C. 肌苷、次黄嘌呤对照品加失活组织粗蛋白 (inactivated protein with inosine and hypoxanthine); D. 肌苷与正常组织粗蛋白孵育 (inosine incubated with normal protein)

1. 次黄嘌呤(hypoxanthine); 2. 肌苷(inosine)

图 1 底物肌苷和代谢产物次黄嘌呤的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of inosine and hypoxanthine

2.1.2 标准曲线的绘制与检测限 取次黄嘌呤标准液，用 PBS 缓冲液稀释成 0.5, 2, 4, 5, 10, 15, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准液，取 10 μL 按色谱条件进行 HPLC 分析，测定次黄嘌呤含量($n=5$)。以次黄嘌呤峰面积 Y 为纵坐标，次黄嘌呤浓度(X , $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标，绘制标准曲线。结果表明次黄嘌呤在 0.5~40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好，回归方程为： $Y=0.0653X-0.0394$, $r=0.9996$ 。次黄嘌呤检测限为 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N\geq 3$)。

2.1.3 精密度、稳定性与加样回收率 取浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的次黄嘌呤标准液，平行测定 6 次，以次黄嘌呤峰面积计算 RSD，考察仪器的精密度。试验结果表明 RSD 为 2.2 %，表明仪器精密度良好。取浓度为 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的粗蛋白样品，加入 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的底物肌苷，按 1.3.3 项下方法操作，取 10 μL 于 0, 12 h 后分别进行 HPLC 分析 ($n=5$)，以次黄嘌呤峰面积计

算 RSD，考察其在 12 h 内的稳定性。试验结果显示 RSD 为 3.3 %，表明样品在 12 h 内稳定性良好。取 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的次黄嘌呤标准液加入蛋白浓度为 7.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及底物肌苷浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的酶反应体系中，按 1.3.3 项下方法操作并测定，计算加样回收率。试验结果显示，平均加样回收率大于 80 %，RSD 小于 5 %，表明测定方法稳定可靠。见表 1。

表 1 加样回收率试验($n=6$)

Table 1 Result of recovery test

试样量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	加入量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
2.82	3	5.50	83.9	82.4 $\pm$ 3.27	3.27
2.53	3	4.89	78.5		
2.68	3	5.27	86.4		
3.28	3	5.67	79.8		
3.15	3	5.57	80.5		
2.85	3	5.42	85.5		

2.2 肌苷在参环毛蚓组织粗蛋白中的酶反应动力学

2.2.1 蛋白浓度考察 为了考察参环毛蚓体壁组织酶反应体系中合适的蛋白浓度，以不同蛋白浓度(X)与产物次黄嘌呤的浓度增加量绘制曲线，见图 2。结果表明样品的蛋白浓度在 0~7.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内，与产物浓度变化量呈线性关系，因此在该浓度范围内的广地龙粗蛋白提取物可用于酶活性分析。

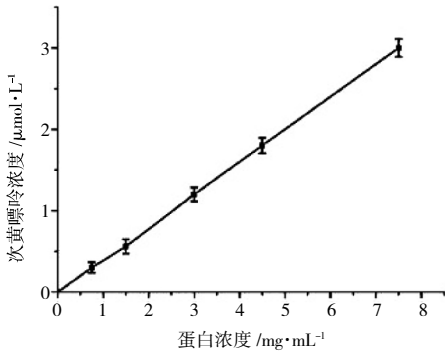


图 2 蛋白浓度与次黄嘌呤浓度的标准曲线

Figure 2 Plot of protein concentration vs hypoxanthine concentration

2.2.2 孵育时间考察 为了考察适当的孵育时间，以产物浓度与孵育时间绘制曲线，结果见图 3。在 0~30 min 的反应时间内，酶促反应呈线性上升，而 30 min 后，酶活力基本稳定，说明酶促反应已完成，处于稳定状态，故选用孵育时间 30 min 作为酶活力测定的时间。

2.2.3 PNP 酶活性动力学分析 分别取不同浓度的肌

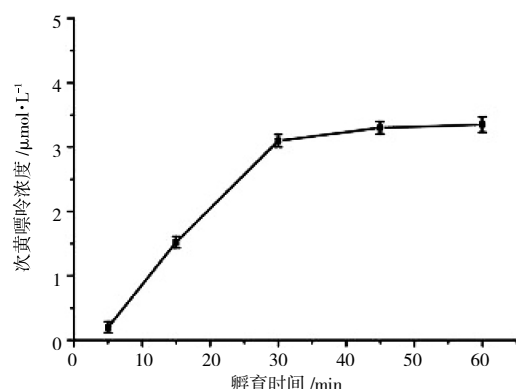


图3 孵育时间与次黄嘌呤浓度曲线

Figure 3 Plot of reaction time vs hypoxanthine concentration

昔标准液加入酶反应体系中,按色谱条件测定产物次黄嘌呤浓度。以底物肌昔浓度与产物次黄嘌呤的生成速率绘制曲线,见图4。采用双倒数作图法,可得PNP酶反应的 $V_{\max}$ 为 $0.015 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, K_m 为 $19.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

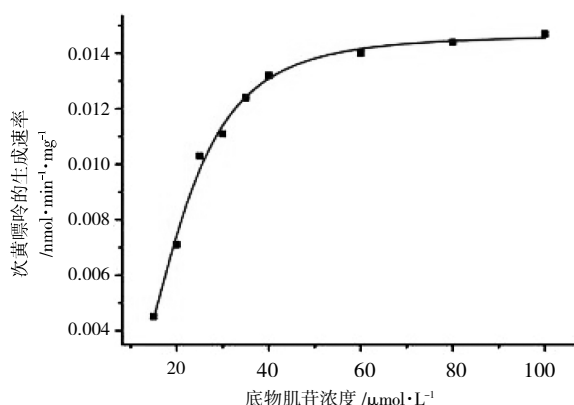


图4 底物肌昔浓度与反应速率曲线

Figure 4 Plot of inosine concentration vs rate of reaction

3 讨论

在酶活性的检测方法中,高效液相色谱法因其灵敏度高、选择性好而应用广泛,尤其是对目标成分的检测能做到快速、准确、实时的特点,更受国内外学者的欢迎。本研究参考了文献^[7-9]有关HPLC方法,并以此为基础对流动相的比例、梯度洗脱条件进行了改进及优化,实现了底物与产物之间的良好分离。

对酶活性的测定是通过检测单位时间、单位体积中底物的减少量或产物的增加量来实现的,即测定酶反应的速度。而酶反应速率受蛋白浓度和反应时间影响,只有当反应速率与蛋白浓度及孵育时间均显线性关系时,才是酶活性的真实表现^[10]。因此,本研究考察了酶反应体系所需的最佳蛋白浓度和孵育时间。首次建立了参环毛蚓体内次黄嘌呤代谢酶活性测定相关

的实验体系,为进一步研究平喘有效物质的代谢途径及其调控机制提供了良好的实验平台。

采用的酶反应动力学方程式是由Michaelis和Menten于1913年推导出来的,简称为米氏方程。在酶浓度不变时,不同的底物浓度与反应速度的关系为一矩形双曲线,这一矩形双曲线的数学表达式为: $V = V_{\max}[S]/(K_m + [S])$ 。其中, $V_{\max}$ 为最大反应速度, K_m 为米氏常数。 K_m 等于酶促反应速度达最大值一半时的底物浓度,可用于判断酶的专一性和天然底物。

鉴于国外有研究学者^[6]已从寄生虫和哺乳类动物体内发现PNP是主导次黄嘌呤生成的关键酶。因此,本研究选取了PNP作为研究对象。此外,与嘌呤合成代谢途径相关的酶还有腺苷脱氧酶(ADA)和黄嘌呤氧化酶(XO)。本实验除了PNP外,还利用上述实验体系对ADA和XO也进行了酶活性分析,获得相应的动力学参数。此研究结果与国外已报道的人红细胞、寄生虫等嘌呤合成代谢途径关键酶活性的结果颇为一致^[7-8]。由此,提示参环毛蚓体内有可能也存在类似嘌呤合成代谢途径。

参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 2353-2358.
- [2] 利红宇, 李钟, 黄艳玲, 等. 不同炮制的广地龙平喘化痰止咳药效比较[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1464-1465.
- [3] 何欢, 李文平. 地龙的主要成分及其作用的研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(3): 28-30.
- [4] 吴文如, 李薇, 赖小平. HPLC法测定不同产地地龙中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(7): 914-917.
- [5] Gao XF, Zhao H, Zhang GH, et al. Genome shuffling of *Clostridium acetobutylicum* CICC 8012 for improved production of acetone butanol ethanol (ABE)[J]. Curr Microbiol, 2012, 65(2): 128-132.
- [6] Craig PS, Eakin AE. Purine salvage enzymes of parasites as targets for structure-based inhibitor design[J]. Parasitol Today, 1997, 13(6): 238-241.
- [7] Suchail S, Sarciron ME, Petavy AF. Purine metabolism in *Echinococcus multilocularis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1998, 120(4): 633-637.
- [8] Anne P. Halfpenny, Phyllis R. Optimized assay for purine nucleoside phosphorylase by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1980, 199: 275-282.
- [9] Jamshed Iqbal, Christa E, Müllera. High-sensitivity capillary electrophoresis method for monitoring purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase reactions by a reversed electrode polarity switching mode[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(29): 4764-4771.
- [10] 何华. 生物药物分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 226-228.

(编辑: 邓响潮)