维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0020-03

离子交换高效液相色谱法分析兔肝环核苷酸磷酸二酯酶反应体系

廖 飞[1]，张晓萍[2]，周岐新[3]，杨俊清[3]，曾昭淳[1]，陈文缘[1]，汤先觉[4]

（1.重庆医科大学基础医学院生物化学教研室；2.重庆医科大学中心实验室；3.重庆医科大学基础医学院药理学教研室；4. 重庆医科大学基础医学院化学教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：用阴离子交换HPLC分析环核苷酸磷酸二酯酶反应体系。方法：用Shim-Pak WAX-1柱，30 mmol/L 的pH 4.0磷酸钾为流动相，洗脱速度0.5 ml/min，254 nm 检测，峰面积定量。结果：上述离子交换HPLC体系可分离并定量测定cAMP和AMP。在硫酸铵分级粗制兔肝PDE反应混合物中，cAMP 和AMP同杂质完全基线分离；随反应进行，cAMP逐步下降，AMP上升到平台后再下降。用米氏酶的积分速度方程作图分析cAMP下降的进程曲线，发现硫酸铵分级粗制的兔肝PDE的米氏常数为负数。结论：此离子交换HPLC方法可以分析无杂酶干扰时PDE对cAMP的水解。

【关键词】环核苷酸磷酸二酯酶；离子交换高效液相色谱；3,5-cAMP；5-AMP

【中国图书分类法分类号】Q503 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-04-10

Lon-exchange high-performance liquid chromatography analysis of rabbit liver cyclic nucleotide phosphodiesterase reaction mixture

LIAO Fei, et al

(Department of Biochemistry, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, 400016)

【Abstract】 *Objective*: Ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC) was investigated for the analysis of cAMP hydrolysis catalyzed by rabbit liver cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE). *Methods*: The HPLC column was Shim-Pak WAX-1, mobile phase was 30 mmol/L potassium phosphate at pH 4.0 eluted at 0.5 ml/min, detection was absorbance at 254 nm, and quantification was performed with peak area. *Results*: cAMP and AMP were well-resolved and quantified by peak area under this HPLC condition. Rabbit liver PDE was partially purified by ammonium sulfate fractionation. In this PDE reaction mixture, residual contaminants after extraction were all baseline-resolved from both cAMP and AMP. The time course of rabbit PDE reaction showed that cAMP continuously dropped but AMP increased to a plateau before dropping. Analysis of cAMP dropping by the integrated Michaels-Menten rate equation of mono-substrate irreversible reaction lead to negative Michaelis constant. *Conclusion*: This ion-exchange HPLC method was desirable for the analysis of cAMP hydrolysis by PDE without phosphatase interference.

【Key words】 Cyclic nucleotide phosphodiesterase; Ion-exchange high-performance liquid chromatography; 3,5-cAMP; AMP

环核苷酸磷酸二酯酶 (EC 3.1.4.17, cyclic nucleotide phosphodiesterase, PDE) 水解 cAMP 和 cGMP成相应5'-单核苷酸，是环核苷酸的唯一灭活代谢途径。PDE有多种同工酶，呈组织特异性分布，不同的同工酶对cAMP或cGMP的选择性不同。近年来，发现PDE同工酶选择性抑制剂有特殊药理作用，使PDE和其同工酶选择性抑制剂成为一个研究热点[1,2]。

PDE活性测定常用放射性底物，用核苷酸酶将产物脱磷酸转变成核苷，经常规柱层析分离核苷后再液闪定量[3]。此方法花费大，耗时，放射性危害大。高效液相色谱（high-performance liquid chromatography，HPLC）可快速地同步分离和定量测定核苷酸[4-6]。本文用离子交换HPLC法研究兔肝PDE对cAMP的水解，为用此方法研究PDE 抑制剂奠定基础。

作者介绍：廖 飞（1969- ），男，讲师、硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

3',5'-cAMP，5'-AMP，3',5'-cGMP和5-GMP均购自Sigma（纯度99%），其余试剂为分析纯。岛津Shim-Pak WAX-1柱（Φ 4.0×50mm，粒径3μm）；水重蒸并过Waters Milli Q柱。

1.2 HPLC系统

预装的Shim-Pak WAX-1柱连接到Waters HPLC系统，包括Waters510泵，Waters484可调吸收检测器，Rheodyne7725i 50μl进样器，及NEC APICTM微机，由Waters Baseline 810色谱工作站软件控制，自动收集和处理数据。流动相为 30 mmol/L磷酸钾（pH 4.0）[6]，流速0.5ml/min，254nm吸收检测，AUFS设在0.002。

1.3 兔肝PDE的制备[7]

兔肝用无离子水制成匀浆，13000×g 离心90min，上清用25%到55%硫酸铵分级。Sephadex G_{25} 柱(1×15cm)脱盐，4mmol/L 巯基乙醇洗脱(A_{280}检测)。4℃贮存，五日内用。

1.4 PDE 反应体系

终体积200μl，含5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)，1 mmol/L $MgCl_2$，4 mmol/L 巯基乙醇，10μmol/L cAMP及适量的酶，反应温度25℃。100℃ 加热 1min 终止反应。混合物用等体积二氯甲烷抽提，2 500×g 离心 8 min，置冰水浴中，40 min 内上HPLC 柱。在反应进程曲线测定时，将反应终体积按比例扩大到4.0 ml，在指定反应时间取两份200μl反应混合物，加热终止并抽提后测定水相核苷酸。

1.5 蛋白质测定

用牛血清白蛋白为标准，Folin酚试剂法测定。

2 结 果

在所述HPLC条件下，cAMP 和AMP完全基线分离(图1)。

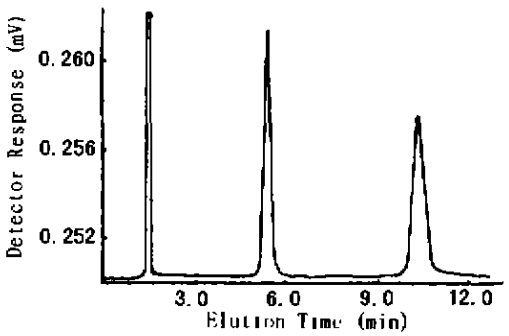


图1 cAMP 和 AMP的离子交换HPLC色谱图

cAMP 峰在 5.44 min，AMP 峰在 10.22 min

cAMP和AMP的峰面积和上柱量呈正比（图2，相关系数均大于0.993）。cGMP和GMP 也可完全基线分离并用峰面积定量（数据未给出）。cAMP定量下限为10 pmol，且不受反应体系中Mg^{2+} 浓度的影响。在1 mmol/L Mg^{2+}溶液中AMP定量下限为20 pmol，但在40mmol/L Mg^{2+}溶液中，定量下限为90 pmol；GMP的定量下限也受Mg^{2+} 体浓度的影响（数据未给出）。测定重复性均在5%。

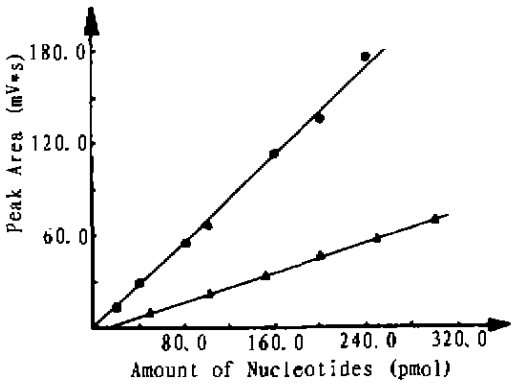


图2 cAMP 和 AMP的峰面积定量标准曲线。

●—● 代表 cAMP的标准曲线，▲—▲ 代表AMP的标准曲线。核苷酸均溶解于5mmol/L Tris-HCL，1mmol/L Mg^{2+} 中，各点三次重复测定的变化小于 5%

抽提后的PDE反应混合物中，残余杂质在4.2 min前洗脱，不干扰对cAMP和AMP的测定(图3)。

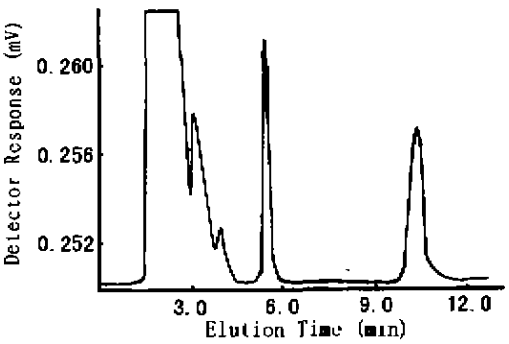


图3 兔子肝脏 PDE反应混合物的离子交换HPLC色谱图

底物浓度为 20 μmol/L，25℃反应15 min，蛋白质终浓度 10 mg/L。反应混合物抽提后取20 μl上层水相进样分析核苷酸。

用此HPLC体系分析兔肝PDE催化cAMP水解的进程曲线，发现cAMP持续下降，AMP在前10 min内基本线性增加，维持在平台很久后再下降（图4）。在反应混合物中，cAMP和AMP的浓度之和随反应延续而下降。10μmol/L AMP在同样的反应体系中30 min后，只剩余5.8±0.8 μmol/L(n=2)。在初始cAMP为10.6 μmol/L时，用单底物不可逆反应米氏酶的积分速度方程作图，分析兔肝PDE反应的前40 min 内cAMP 下降的进程曲线，发现所得的K_m 无物理意义（K_m =-14.7±1.7 μmol/L，n=3，相关系

维普资讯 http://www.cqvip.com

数均大于0.996)。

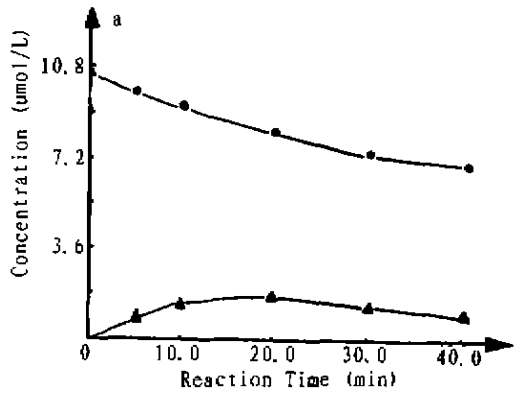


图4　PDE反应的进程曲线

初始底物浓度（用A_{254}确定）为10.6 μmol/L，终止反应并抽提后取40μl水相进样。各数据点两次独立重复的变化小于5%。●—● 代表cAMP变化，▲—▲ 代表AMP变化。

3 讨　论

用磷酸盐为流动相能有效分离测定环核苷酸和其对应的PDE水解产物。PDE反应体系通常使用高浓度的Mg^{2+}，Mg^{2+}降低AMP和GMP测定下限的机制不清，为方便测定PDE反应进程曲线，选择了低浓度Mg^{2+}。已报道的HPLC方法分析PDE反应体系均测定产物5'-单核苷酸，但都未提及反应体系中有无其它酶干扰对产物的直接测定[5,6]。Watterson等曾用离子交换HPLC测定粗制的脑组织膜PDE水解2mmol/L cAMP和cGMP生成AMP及GMP的活性，发现5min内产物生成量同酶量成正比[5]。本文的结果表明，粗制兔肝PDE中存在磷酸酶（可能包括5'-核苷酸酶），对测定水解生成的AMP有明显干扰。因此这种方法不便于测定存在磷酸酶干扰的PDE粗制剂产物生成初速度。

在组织中cAMP和cGMP灭活代谢只有先水解成5'-单核苷酸，水解反应不可逆，产物无抑制作用[8]。由于HPLC定量的精确度只有5%，不能用离子交换HPLC测定反应体系中cAMP消耗的初速度。PDE同工酶水解cAMP的单底物米氏动力学方程，可以积分并转换成线性形式，据此对cAMP下降的进程曲线回归分析可得表观米氏常数[9]。用硫酸铵分级粗制的肝脏可溶PDE以PDE2为主。在pH7.4时，大鼠肝PDE2对cAMP的水解呈底物负协同效应；在40mmol/LMg^{2+}和pH8.0时别构效应减弱，基本为常规米氏酶[7]。PDE2对cAMP的米氏常数较高。在1mmol/LMg^{2+}和pH8.0时，对兔肝PDE粗酶制剂催化cAMP水解进程曲线，用单底物米氏酶不可逆反应的积分速度方程线性形式回归分析，所得的Km无意义。这种现象可能是由于所用底物浓度太低[9]，或者是Mg^{2+}浓度过低，使粗制的兔肝PDE2不遵从米氏动力学；或者由于酶纯度低和离子交换HPLC定量精度低等因素造成。

综上所述，离子交换HPLC可分析PDE催化的cAMP水解的过程，但只有当粗酶制剂中无磷酸酶等干扰时，此方法才能测定产物生成初速度。对于肯定为米氏动力学的PDE同工酶，如骨骼肌PDE4，在所需要的底物浓度下用离子交换HPLC测定cAMP下降的进程曲线，再用米氏方程的积分形式分析cAMP下降的进程曲线，仍可得到酶的表观米氏常数；利用竞争性抑制剂对米氏常数的改变，可间接评价竞争性抑制剂。这方面的工作正在进行中。

参 考 文 献

[1] BeavoJ A. Cyclic nucleotide phosphodiesterase: functional implication of multiple forms[J]. Physiol Rev, 1995;75(4):725-748.

[2] Teixeira M M, Gristwood R W, Cooper N, et al. Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? [J]. Trends in Pharmacol Sci 1997;18(2):164-171.

[3] Lin M C. An automated chromatographic assay for adenylyl cyclase and cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase[J]. Methods Enzymol, 1974;38:125-135.

[4] Walseth T F, Graff G, Moors M C, et al. Separation of 5'-ribonucleoside mono-phosphates by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1980;107(2):240-245.

[5] Watterson D M, Iverson D B, van Eldik L J. Rapid separation and quantification of 3',5'-cyclic nucleotides and 5'-nucleotides in phosphodiesterase reaction mixtures using High-performance liquid chromatography[J]. J Biochem Biophys Methods, 1980:2(2): 139-146.

[6] Watterson D M, Lukas T J. Analysis of phosphodiesrease reaction mixture by High-Performance liquid chromatography[J]. Methods Enzymol, 1988;159:471-477.

[7] Beavo J A, Hardman J G, Sutherland E W. Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5'-monophosphate[J]. J Biol Chem, 1971;246(12):3841-3846.

[8] Cheung W Y, Lin Y M. Purification and characterization of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase from bovine brain[J]. Methods Enzymol, 1974;38:223 - 239.

[9] Orsi B A, Tipton KF. Kinetic analysis of progress curve[J]. Methods Enzymol, 1979;63:159-183.