

人白三烯 A₄ 水解酶的提取和纯化

富继义 吴大勇

(白求恩医科大学, 长春)

李振甲 杨梅芳 刘景汉

(解放军总医院, 北京)

Olof Radmark

(瑞典卡罗琳斯卡医学院)

提 要

人白细胞匀浆中的 LTA₄H 经硫酸铵分段盐析, DEAE-纤维素柱层析, Sephadex 柱层析和 HPLCmono-Q 阳离子交换柱层析, 再经羟基磷灰石柱纯化, 得到其纯度可达 90—95% 的产物。酶活性为 212 LTB₄ nmol · mg⁻¹ · min⁻¹。较纯化前活性提高 350 倍。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示酶的分子量为 68000—70000 的单体蛋白质。与以前报道人红细胞 LTA₄H 不同。

白三烯 A₄ 水解酶 (Leukotriene A₄ Hydrolase 简称 LTA₄H) 存在于多种哺乳类动物组织胞浆中^[1]。其生物活性是催化 5-(s)-反-5,6-环氧-7,9-反-11,14-顺-廿碳四烯酸(白三烯 A₄, LTA₄) 生成 5(s), 12(R)-三羟-6,14-顺-8,10-反廿碳四烯酸(白三烯 B₄, LTB₄)。1984 年 Radmark 等首先从人白细胞中提取此酶获得成功^[2]。随后有些作者分别从大鼠白细胞和人的红细胞中提取了此酶。由于 LTB₄ 具有强大的白细胞趋化作用, 促进白细胞集聚和附着, 促进白细胞溶酶体内酶的释放和白细胞过氧化物的生成。目前认为 LTB₄ 和炎症、过敏等关系密切。因此研究 LTA₄H 的活性在生物医学研究中越来越受到人们的关注。本文报告我们改进了 Radmark 的方法, 从人白细胞中提取 LTA₄H 获得成功, 并对该酶的理化特性进行了初步研究。

材 料

一、LTA₄ 甲酯为 Upjohn 公司产品。在氩气下加入四氢呋喃 (1mg/mL) 和 1mol/L 氢氧化锂 (90 μL/mg LTA₄), 在 40℃ 振荡 48h, 使

LTA₄ 甲酯转化为游离酸型。活性的 LTA₄ 在紫外吸收光谱 270、280、290nm 有三个峰。保存 -20℃ 可使用 1—2 周。

二、LTB₄ 为 Merck Frosst 公司产品。

三、人白细胞由献血员血液中分离获得。

四、标准系列分子量蛋白质为 Sigma 公司产品

五、DEAE 纤维素 DE32 为 Whatman 产品, Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品。

方法和结果

一、人外周白细胞分离 取正常供血者静脉血 200ml × 40, ACD-APO₄ 抗凝 (50ml/200ml 全血)。离心 1000 × g 4℃ 20min, 收集各管白膜层, 再离心 1000 × g 4℃ 25min, 弃上清液, 得到人白细胞粗提物。向白细胞粗提物中加 10 倍体积的红细胞溶解液 (0.14mol/L NH₄Cl + 50mmol/L Tris-HCl pH7.4), 混匀后置 37℃ 温育 5min, 离心 1000 × g 4℃ 20min, 留取沉淀物。如此再经红细胞溶解液处理 2—3 次后, 取出做白细胞计数和染色检查, 其中多核白细胞为 80% 以上, 然后稀释总数为 1—2 × 10⁶ /

mL。

二、LTA₄H 的提取 以下操作需在 4℃ 冷室或冰浴中进行。

1. 将白细胞 $1-2 \times 10^{10}$ 于 100mL PBS 中, 用超声波破碎, 离心 $10000 \times g$ 4℃ 15min。LTA₄H 溶于上清液中, 将沉渣弃去。向上清液中加链霉素至 0.5%, 搅拌 30min, 离心 $10000 \times g$ 4℃ 15min, 保留上清液, 弃去沉渣。

2. 每 100mL 上清液中加入硫酸铵 20.3g, 使硫酸铵浓度达 40% 饱和。继续搅拌 30min, 离心 $10000 \times g$ 4℃ 15min, 弃去沉渣, 继续向上清液中加入硫酸铵(每 100mL 加入 28.5g), 使浓度达到 80% 饱和, 搅拌 30min 后离心 $10000 \times g$ 4℃ 15min。酶存在于沉淀物中, 弃去上清液。将沉淀物溶于 20mL 10mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液中, 然后用相同缓冲液透析 24h, 中间更换缓冲液三次。

3. DEAE-纤维素柱层析, 将活化的 DEAE-纤维素 DE32 装入 10×4 cm 柱。经平衡后, 将酶液加至柱中, 以 200mL 10mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液和 200mL 10mmol/L Tris-HCl (含 0.5mol/L KCl) 混合所组成的离子强度梯度系统淋洗, 在紫外 280nm 监测, 流速为 1mL/min, 按 5mL/管收集。淋洗曲线如图 1 中方框为 LTA₄H 活性组分。约 35—40mL, 超滤浓缩至 7.5mL, 蛋白浓度为 15—20mg/mL。

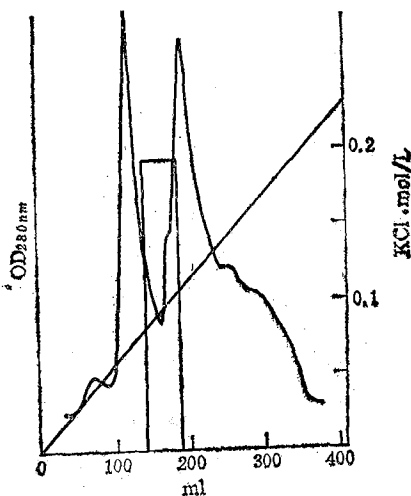


图 1 DEAE-纤维素柱层析淋洗曲线

4. Sephadex 柱层析 将 Sephadex G-10⁰ 装入 100×4 cm 柱, 用 20mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液平衡, 将酶液 7.5mL 加至柱中。用相同缓冲液淋洗, 流速为 0.7mL/min, 紫外 280nm 监测, 并分段收集淋洗液, 图 2 中方框内为 LTA₄H 活性组分, 体积约 20—25mL, 蛋白质浓度约 1—1.5mg/mL。

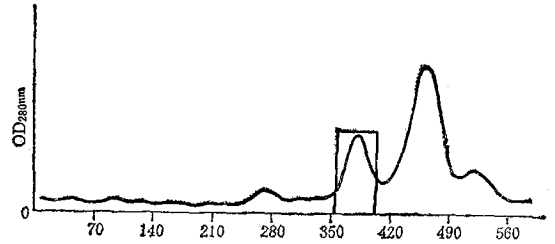


图 2 Sephadex G-100 柱层析淋洗曲线

5. 高效液相离子交换柱层析, 使用瑞典 Pharmacia 公司高速蛋白液相层析仪(HPLC), mono Q 层析柱 (50×5 cm)。以 50mmol/L pH7.7 Tris-HCl 缓冲液和 50mmol/L pH7.7 Tris-HCl + 0.5mol/L KCl 缓冲液组成的离子强度梯度淋洗液系统淋洗。使用 10mL Super-loop 进样, 每次加样蛋白质量小于 10mg, 加样速度为 0.5mL/min。以流速 1mL/min 进行梯度淋洗, 在紫外 280nm 监测下收集流出液。图 3 中方框内为 LTA₄H 活性组分。获得酶液 3—5mL, 蛋白质量 1—2mg。

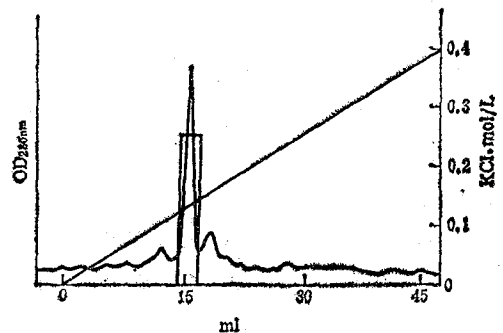


图 3 FPLC-mono Q 柱层析淋洗曲线

6. FPLC 羟基磷灰石柱层析 Bio-Rad 羟基磷灰石柱为 100×7.8 mm。缓冲液 I 为 10mmol/L 磷酸氢钾, 25mmol/L 氯化钙, pH7.6—7.3。缓冲液 II 为 500mmol/L 磷酸氢钾, 5μmol/L

L 氯化钙, pH7.0~7.3。用缓冲液 I 以 0.5mL/min 的流速平衡柱床 1h。注入样品 3—5ml。用缓冲液 I + 缓冲液 II 进行梯度淋洗。在 280nm 紫外监测下出现如图 4 中的蛋白峰时, 收集流出液。至此, LTA₄H 提纯完成。

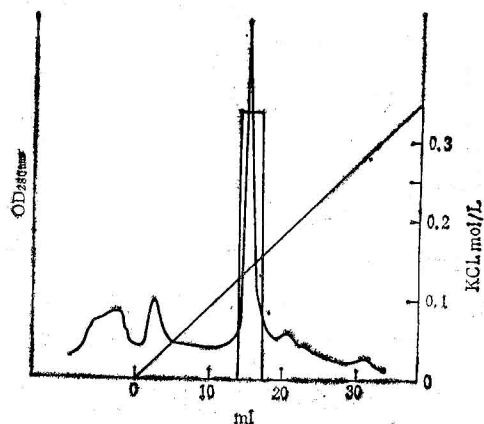


图 4 FPLC 羟基磷灰石柱层析淋洗曲线

三、LTA₄H 活性检测 取纯化或半纯化的 LTA₄H 液 100 μ l, 放 37 $^{\circ}$ C 预热 10min, 加入 LTA₄ 甲醇液 1 μ l, 使 LTA₄ 在温育反应液中的浓度为 10mmol/L。37 $^{\circ}$ C 温育 1min, 即刻加含有 PGB₂ 0.5 μ g 的甲醇液 200ml, 终止反应。离心去除蛋白质沉淀, 用乙醚萃取上清液中的脂类化合物。将萃取液负压蒸干后溶于 15 ml 甲醇中。取半量于反相 高效液相色谱 (RP-HPLC) 检测。使用 Nucleosil C₁₈, 250 $\times$ 4.6mm 柱, 流动相为 甲醇:水:乙酸 = 70:30:0.01 (V/V/V)。流速为 1ml/min。紫外 270nm 监测流出液。LTA₄H 活性检测见图 5a。峰 1 和峰 2 为 LTA₄ 非酶水解产物。峰 3 为 LTA₄H 催化 LTA₄ 生成的 LTB₄。LTB₄ 的生成量以 LTB₄ 的峰面积与内标 PGB₂ 峰面积比值, 参照 PGB₂ 用量 (0.5 μ g) 计算。用按 Bredford 法测定酶蛋白量。以 mg 酶蛋白每分钟催化生成的 LTB₄ nmol 数表示酶活性。取 LTB₄ 标准品与收集的 LTB₄ 淋洗峰同时经紫外光谱扫描, 鉴定酶催化生成的 LTB₄ [2,3,4]。将酶液加热 90 $^{\circ}$ C 10min, 再与 LTA₄ 液温育, 峰 3 消失, 见图 5b, 证明酶失活。

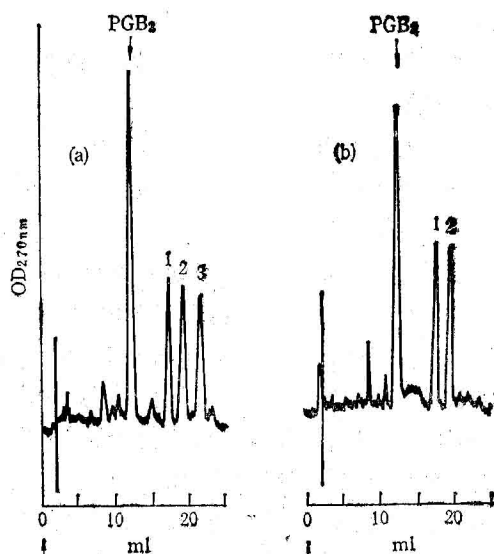


图 5 LTA₄H 活性检测 (RP-HPLC)

四、LTA₄H 纯度鉴定

将各步骤所提取的酶液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。首先制备厚 1.5mm, 长 15cm 10% 聚丙烯酰胺平板。样品中加入 1:20 的 2-巯基乙醇, 电泳图谱见图 6。经可见光光谱扫

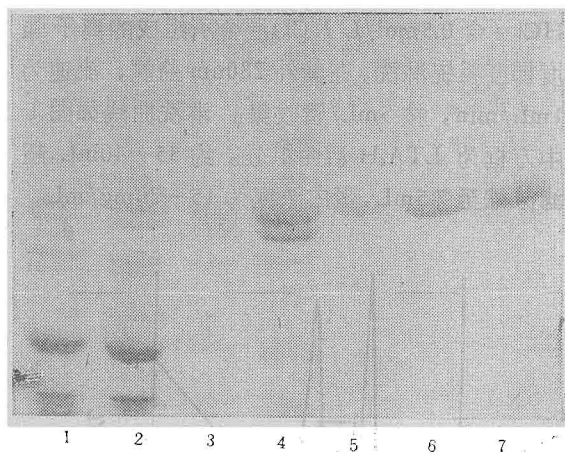


图 6 各阶段所提取的 LTA₄H SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

1. 白细胞匀浆 10000 $\times$ g 上清液; 2. 40—80% 硫酸铵沉淀的样品; 3. DEAE 纤维素离子交换层析活性组分; 4. 葡聚糖 G-100 凝胶过滤层析的活性组分; 5. HPLC-mono Q 柱层析的活性组分; 6. HPLC-羟基磷灰石柱层析的活性组分; 7. 牛血清白蛋白, 分子量 68000

描分析, 经羟基磷灰石柱层析酶纯度达 95% 以上。经 mono Q 柱层析酶纯度可达 85—90%。以标准分子量系列蛋白和 BSA 为参照, LTA₄H

的分子量为 69000 ± 1000 。经不加 SDS 和 2-巯基乙醇的聚丙烯酰胺凝胶电泳,所提取的 LTA₄H 为单一蛋白质。本文各步骤所提取产物的比活性和总活性检测结果见附表。

附表 人白细胞 LTA₄H 纯度

	总蛋白 (mg)	比活性 (LTB ₄ nmol mg ⁻¹ min ⁻¹)	总活性 (LTB ₄ nmol min ⁻¹)	产率 (%)	纯化 倍数
10000×g 上清液	1320	0.6	792	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	684	0.9	616	78	1.5
DEAE 柱层析	117	4.6	528	68	7.7
Sephadex 柱层析	62	7.8	481	61	13.0
mono Q 柱层析	2.3	141.0	317	40	235.0
羟基磷灰 石柱层析	0.9	212.0	190	24	353

讨 论

LTA₄H 是存在于多种组织胞浆中的水溶性蛋白质^[1-4]。它催化 LTA₄ 生成 LTB₄, 对底物具有较高的特异性, 对 11, 12-环氧-LTA₄ 和 14, 15-环氧-LTA₄ 几乎没有催化作用^[3,5]。LTA₄ 和 LTA₅ 可竞争性的抑制 LTA₄H 对 LTA₄ 的催化作用, 而只生成少量 LTB₃ 和 LTB₅^[5,6]。至今尚未发现此酶的特异性抑制剂。最近我们发现脂氧化酶和环氧化酶的抑制剂愈创木酸 (no-rdihydroguaiaretic acid) 也显著抑制 LTA₄H 的活性。N-乙基马来亚胺和对-羟基汞苯磺酸钠可抑制此酶活性, 而吡啶乙胺没有抑制作用。对肝脏胞浆环氧化物水解酶有明显抑制作用的 α 和 β -萘黄酮对 LTA₄H 也无抑制作用。

我们提纯的 LTA₄H 分子量为 68000—70000 的单体蛋白质, 其催化 LTA₄ 生成 LTB₄ 的活性为 212nmol LTB₄/(mg·min), 与 Radmark 报告结果一致^[2], 而与 McGee 报告从人红细胞中所提纯的 LTA₄H 不同^[7], 后者分子量为 54000 ± 1000 , 活性为 83nmol LTB₄/(mg·

min)。我们发现所提纯的酶贮存于 40℃ 极易分解, 产物在 SDS 凝胶电泳中出现分子量 55000—60000 的色带。是否由于产物中含有某种微量蛋白水解酶或蛋白自身水解所致, 尚不清楚。但这种水解不影响酶的活性。在 4℃ 下贮存, 酶活性至少在 20 天内无明显降低。在 -20℃—70℃ 下贮存, 则明显降低酶的活性。

本方法所提纯的酶纯度达 95% 以上, 与 Radmark 报告的方法相比作了重大改进, 将 Sephadex 柱层析改在 FPLC 之前, 这样可减少一次透析, 由于 Sephadex 柱层析使总蛋白量减少一半以上。HPLC mono Q 柱层析也由原作者 10—15 次减少至 4—6 次。另外, 使用羟基磷灰石柱代替等点聚焦层析柱, 克服了 pH 降至蛋白质等电点对酶活性的影响, 同时省去了使用进口产品 Polybuffer 和从洗出液中除去 Polybuffer 的繁琐手续。从而使提取方法省时、方便。且产物的活性和产量超过以往的报告^[8]。我们已将所提纯的酶用于酶抑制剂的研究和作为放射免疫分析的标准品, 获得了满意效果。

王青梅、韩玉凤、宋伟、方永鑫、韩冰、马秀丽及 L. Eliasson 参加部分工作, 特此感谢

参 考 文 献

- [1] Izumi, T. et al.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **135**, 139.
- [2] Radmark, O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 12339.
- [3] Samuelsson, B.: *Science*, 1983, **220**, 568.
- [4] Shimizu, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 689.
- [5] Evans, J. et al.: *J. Bio. Chem.*, 1985, **260**, 10966.
- [6] Nathaniel, D. Evans, J. et al.: *Biochem. Bio'lys. Res. Commun.*, 1985, **131**, 827.
- [7] McGee, J. et al.: *J. Bio. Chem.*, 1985, **260**, 12832.
- [8] FU, J., radmark, O. et al.: *Abstract Book of 6th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds*, 1986, 365.

[本文于 1988 年 4 月 14 日收到]