

简 报

人精液磷酸二酯酶 I 性质研究

韩刚毅 王 实*

(济南军区军事医学研究所, 济南 250014)

关键词 人精液, 磷酸二酯酶 I, 同工酶

精液中含有多种酶类, 其中一些活性高、性质稳定的酶可以作为现场勘验工作中的精液标志物, 为发现和鉴别物证提供线索, 在现代法医学研究中具有重要意义^[1,2]. 在对磷酸二酯酶 I (简称 PDE I) 研究中, 我们发现该酶在精液中的比活性超过人体其它分泌液, 而且具有一定的稳定性. 为了探索精液磷酸二酯酶 I 在法医学中的应用价值, 我们详细观察了人精液中 PDE I 的有关生化性质, 现将结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 试剂 检测 PDE I 所用底物对-硝基苯酚苯基磷酸酯 (PNPpPh) 和 4-甲基伞形酮苯基磷酸酯均由本实验室合成^[3]. 其它试剂均为市售 (分析纯级).

1.2 样品 收集健康人 (25—40 岁) 精液, 液化后稀释 10—20 倍置 -14℃ 保存. 临用时 37℃ 融化 5min.

1.3 方法 采用本实验建立的“PDE I 活性微量检测法”测定精液中 PDE I 活性. 以所分解产生的对硝基苯酚微克分子数每分钟每毫克蛋白质为酶的活性单位^[4]. 精液中 PDE I 同工酶谱测定参照文献介绍的方法进行^[5].

用 Lowry 方法^[6]测定样品中蛋白质含量, 以牛血清白蛋白作标准.

2 结果与讨论

2.1 人精液 PDE I 的 pH 曲线

采用不同 pH 值的 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液检测精液中 PDE I 活性所得到的 pH 曲线见图 1. 该酶在 37℃ 反应时的最佳 pH 值在 7.6—8.0 之间, 将反应温度升高到 50℃, 其最佳 pH 值改变为 8.1—8.5 范围. 精液 PDE I 的最佳 pH 随催化温度改变的生理意义有待于深入研究.

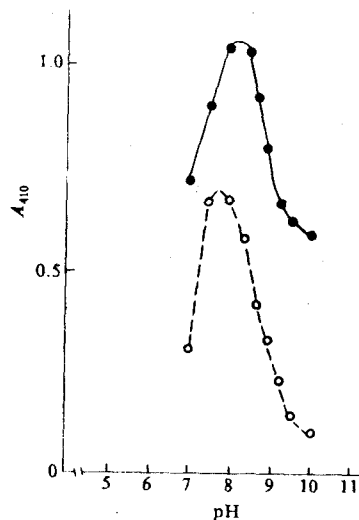


图 1 精液 PDE I 的 pH 曲线

—•— 50℃ -○- 37℃

2.2 精液 PDE I 的反应温度

测量精液 PDE I 在 22—70℃ 之间进行催化反应的活性曲线, 显示精液 PDE I 在 50—55℃ 范围内催化活性较高. 反应 60min 与 120min 的线性情况很相似.

2.3 反应进程和 K_m 值

测定人精液 PDE I 在 50℃ 的反应时间进程, 结果表明在 20—180min 期间催化反应都呈现良好的线性. 用 Lineweaver-Burk 直线作图法测定人精液中 PDE I 的 $K_m = 5.56 \times 10^{-4} \text{mol}$, $V_{\max} = 7.41 \times 10^{-5} \text{mol}$. 结果见图 2.

2.4 几种抑制剂对精液 PDE I 活性的影响

为深入了解精液 PDE I 的生化性质, 我们分别观

*河南省新乡市职业病防治研究所.

收稿日期: 1992-07-28 修回日期: 1992-11-14

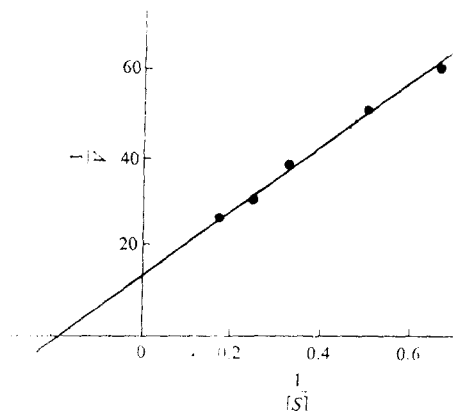


图2 Lineweaver-Burk 作图法测定人精液 PDE I 的 K_m 和 V_{max}

察了 CuSO_4 , EDTA, DL-半胱氨酸 (DL-Cyst) 和苯基膦酸 ($\text{PhPO}(\text{OH})_2$) 等试剂对精液中 PDE I 催化活性的影响。实验结果显示 CuSO_4 , EDTA, DL-Cyst, $\text{PhPO}(\text{OH})_2$, Na_2HPO_4 和胸苷对精液 PDE I 都有一定的抑制作用 (见图 3, 4)。其中 $\text{PhPO}(\text{OH})_2$ 和 EDTA 的抑制作用较强, 而 EDTA 的抑制作用达到一定程度后即不再增加, 加入醋酸锌, 可以抵消 EDTA 的抑制作用。这反映 Zn^{2+} 可能参与形成酶分子的活性构型, 对维持酶的催化活性具有重要意义。

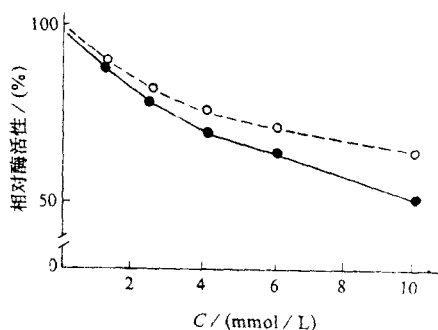


图3 人精液 PDE I 活性受 $\text{PhPO}(\text{OH})_2$ 和胸苷的抑制情况

—•— $\text{PhPO}(\text{OH})_2$, - - - - - 胸苷

2.5 人精液酶活性及同工酶谱

收集 172 份精液, 测定 PDE I 活性为 761.4 ± 208.6 ($\bar{X} \pm s$)。经 7% 聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 有 142 份精液中出现 3 条同工酶区带 (自原点起分别定为 I, II, III 带; $Rf_1=0.14$, $Rf_2=0.28$, $Rf_3=0.46$)。有 4 份精液中缺少 I 带, 有 21 份精液中缺少 II 带。所有的精

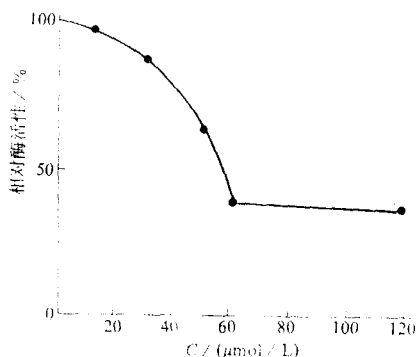


图4 EDTA 对精液 PDE I 抑制情况

液中都含有移动较快的 III 带。与临床常规检查项目结合分析显示精液中 PDE I 活性及其酶谱与精液中所含精子数量、活度及液化程度无显著相关性。

2.6 精液 PDE I 的稳定性

将新鲜精液用生理盐水稀释 20 倍后离心 3500r/min 30min。取上清液部分分装成数份, 分别放置在室温 $10-28^\circ\text{C}$, $4-6^\circ\text{C}$, -10°C 条件保存, 定期抽样测定样品中 PDE I 活性变化情况, 结果见表 1。实验结果说明: 人精液中 PDE I 活性非常稳定, 在室温条件下自然放置 40d 后的精液已严重腐败, 其中的蛋白质含量已减少 50%, 而 PDE I 总活性反较新鲜精液高, 以每毫克蛋白质计算的 PDE I 比活性也增加约 2.4 倍。这说明 PDE I 对精液自然腐败过程有一定的耐受性, 其总活性增加也许是由于腐败过程中蛋白质分子肽键断裂或变构而暴露出更多的酶催化中心所造成的。

为了观察精斑中 PDE I 的活性情况, 我们还将精液分别涂在市售的白色化纤衣料和白色的棉衣料上, 在空气中自然干燥后, 放置在室温 (温度波动为 $10-28^\circ\text{C}$) 保存 160d。实验时在精斑部位剪取 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 的小片, 加入 2ml 生理盐水, 在室温放置 48h 后离心 10min (5000r/min), 使衣料片和纤维粉末沉降, 收集上清液, 分别测定其中蛋白质含量和 PDE I 活性。同时剪取相同大小的无精斑衣料作为对照按上述过程进行平行处理测定。实验结果显示精液 PDE I 在精斑状态也很稳定, 已在自然环境中保存 8 年的精斑中仍能测定出 PDE I 活性。

本文结果说明, 人精液 PDE I 不仅具有很高的活性, 而且性质稳定, 受精液的自然腐败影响小, 是一个高活性的精液标志物, 在法医学进行现场勘验工作中有一定的应用前景。但其同工酶谱的多态性能否成为个体识别的司法鉴定项目仍有待于进一步的研究。

表1 不同保存条件对精液(斑)中PDE I活性的影响

保存方式	温度范围(℃)	保存时间	酶活性/(U/mg)	相对酶活性/%
新鲜精液	20	4h	59.1	100
冰冻保存	-10	40d	75.1	127.1
低温保存	4-6	40d	93.3	157.9
低温保存	4-6	450d	117.7	199.1
自然室温	10-28	40d	141.2	238.9
自然室温	10-28	450d	42.7	72.2
精斑(棉布)	10-28	160d	125.3	212.0
精斑(化纤)	10-28	160d	257.3	435.4

参 考 文 献

- 1 韩刚毅. 酶与司法鉴定. 解放军医学情报, 1990; 4: 183
- 2 贾静涛. 法医血型血清学. 沈阳: 辽宁科技出版社, 1988; 258
- 3 韩刚毅. 三种苯基膦酯化合物的合成. 化学试剂, 1990; 12(1): 42
- 4 韩刚毅, 王实. 人尿中PDE I的研究. 中国临床医学理论与实践, 1992; (1): 357
- 5 韩刚毅, 唐德复, 唐超等. 血清5'-NPD同工酶荧光酶谱测定法及其临床应用. 中华医学检验杂志, 1988; (1): 8
- 6 Lowry O H, Rowebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265

aFGF对神经元中蛋白质合成及cAMP含量的影响

邵宁生 王会信 周廷冲 柳 川 魏 文

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

关键词 aFGF, 蛋白质, 合成, cAMP, 神经元

酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)是近年来发现的一种新的神经营养因子,它在体外能促进多种神经元的存活及突起生长^[1,2],体内也能促进受损伤神经元的修复与再生^[3].最近我们的研究也表明,aFGF能促进体外培养的海马神经元形态上分化成熟^[4].目前,有关aFGF神经营养作用的研究多为形态学上的观察,对aFGF神经营养作用的机制了解的还不多,本文就aFGF对体外培养的海马神经元蛋白质合成及cAMP含量的影响做了进一步探讨.

1 材料与方法

1.1 材料 人aFGF,本室基因工程表达产品,电泳纯;牛胰岛素、牛转铁蛋白、牛血清白蛋白、多聚赖

氨酸(Mr: 20 000-30 000)及胰蛋白酶均为Sigma公司产品;马血清,本院二所产品;³H-Lue (1mCi/ml)、cAMP分析试剂盒:中国科学院原子能研究所产品;闪烁液,PPO(Sigma)2g,POPOP(上海试剂一厂)0.05g,溶于500ml二甲苯中;新生大鼠,本院动物中心提供.

1.2 神经元原代培养 无菌取新生大鼠海马组织,剥去脑膜和血管,用0.25%胰酶消化及机械吹打法制成单细胞悬液.调整细胞计数为 1×10^6 细胞/ml左右,接种于细胞培养板内(多聚赖氨酸处理过),用含10%马血清的DMEM培养液,在37℃,5%CO₂条件下培养20h,然后更换无血清培养液1L DMEM培养液内加15mol HEPES,33.3mmol葡萄糖,5mg胰岛素,5mg