

毒黄素对黄嘌呤氧化酶作用的影响

任维栋 赵乃昕 苑永华 刘进升 刘殿珍

(潍坊医学院, 潍坊 261042)

提 要

利用从椰毒假单胞菌 (*Pseudomonas cocovenenans*) 中所分离提取的毒黄素 (toxoflavin) 对黄嘌呤氧化酶 (EC. 1.2.3.2) 作用的动力学试验表明, 毒黄素是此酶的非必需激活剂, 而且对以次黄嘌呤为底物的反应的激活作用明显高于以黄嘌呤为底物的反应。此激活作用属于部分混合型。这一结果为探寻毒黄素对人体的致毒机理提供了一条重要线索。

关键词 毒黄素, 黄嘌呤氧化酶, 部分混合型激活作用

Borngrek 中毒最初在印尼的爪哇食用发酵椰子食物的群众中发现^[1]。我国东北、西南农村也时有发生酵米面食物中毒; 近年来又有变质银耳中毒的报道^[2]。多年的研究证明, 这类中毒都由椰毒假单胞菌 (*Pseudomonas cocovenenans*) 引起^[3]。此菌产生两种毒素: (1) 米酵菌酸 (bongkrekic acid), (2) 毒黄素 (toxoflavin)。H. E. Latuasan 等认为, 在酵母菌和许多微生物中, 毒黄素可能是通过细胞色素体系发挥电子载体作用, 结果产生 H_2O_2 , 因而表现出强烈的毒性和抗生素性质。我们通过多年的工作, 证明了我国的酵米面中毒菌与国外的椰毒假单胞菌为同一菌种^[3]。并首先从此菌中分离提取出毒黄素纯品^[4]。为探寻其中毒机理, 我们做了毒黄素对黄嘌呤氧化酶 (EC. 1.2.3.2) 影响的试验。

1 材料与方 法

毒黄素是本实验室制备的纯品^[5]。在马铃薯蛋白胨甘油培养基上, 灭菌、接种, 28℃ 下, 180r/min 振荡培养 48h, 将产生的毒素用 $(NH_4)_2SO_4$ 饱和, 离心、过滤。滤液用氯仿提取 3—4 次, 减压浓缩, 加入两倍量的石油醚并用水提取。水液再用 $(NH_4)_2SO_4$ 饱和, 重复离心和氯仿提取, 将最后的氯仿提取物减压蒸干, 在

正丙醇中于 -5℃ 形成结晶。

黄嘌呤 (sigma 公司); 次黄嘌呤 (上海试剂二厂); 黄嘌呤氧化酶 (EC. 1.2.3.2) (中科院上海生化所东风试剂厂)。其他试剂均为分析纯, 重蒸水。

仪器: 岛津 Shimadzu UV-260 (日本)。

黄嘌呤氧化酶的测定按 L. Greenlee 等法稍加改进^[6]。在 pH 7.63 的 0.03mol/L 磷酸缓冲液中, 加少量 EDTA。预先将酶溶液与反应体系均置于 0℃, 10min, 将酶加入反应体系中, 反应温度 24—25℃, 在 300nm 处测定由黄嘌呤或次黄嘌呤生成尿酸的光吸收变化。

2 结 果

2.1 在三种不同浓度的黄嘌呤为底物的反应系统中, 各加入等量的毒黄素, 并与各自的对照组同时测量 300nm 光密度的变化。结果列于表 1。

2.2 考虑到在人体内黄嘌呤氧化酶还可以氧化次黄嘌呤, 因此又测量了 3 种不同浓度的次黄嘌呤为底物的反应速度。分别加入等量的毒黄素, 并与各自的对照组同时测量 300nm 光吸收的变化, 结果列于表 2。

表 1 毒黄素对以不同浓度的黄嘌呤为底物的反应速度的影响

Table 1 Influence of toxoflavin on the rate of reaction by xanthine oxidase at the different concentration of xanthine as substrate

编号 Number	底物浓度 Concentration of substrate mol/L	XOD ml	无毒黄素时光吸收 变化 Absorbance change without toxoflavin $\Delta A/\text{min}$	有毒黄素时光吸收 变化 Absorbance change with toxoflavin $\Delta A'/\text{min}$	激活作用 Activation $\frac{\Delta A' - \Delta A}{\Delta A} \times 100\%$
1	4.03×10^{-3}	0.02	0.0056	0.0062	10.71
2	5.05×10^{-3}	0.02	0.0074	0.0077	9.92
3	6.06×10^{-3}	0.02	0.0075	0.0082	9.93

XOD: 黄嘌呤氧化酶, 0.42U/ml.

ΔA 与 $\Delta A'$ 各为反应 20min 后, 平均每 min 光吸收的变化, 表中数据为 3 次数据的平均值.

反应总体积 5.08ml, 温度 24℃.

All assays were performed as described under "Experimental Procedure." The total volume of reaction was 5.08 ml. Temperature was 24℃. The abbreviation used is: XOD, xanthine oxidase; ΔA and $\Delta A'$, average of absorbance change per minute after having been reacting for 20 minutes.

The data was average of three value.

表 2 毒黄素对以不同浓度的次黄嘌呤为底物的反应速度的影响

Table 2 Influence of toxoflavin on the rate of reaction by xanthine oxidase at the different concentration of hypoxanthine as substrate

编号 Number	底物浓度 Concentration of substrate mol/L	XOD ml	无毒黄素时光吸收 变化 Absorbance change without toxoflavin $\Delta A/\text{min}$	有毒黄素时光吸收 变化 Absorbance change with toxoflavin $\Delta A'/\text{min}$	激活作用 Activation $\frac{\Delta A' - \Delta A}{\Delta A} \times 100\%$
1	3.92×10^{-3}	0.02	0.0055	0.0073	32.72
2	4.90×10^{-3}	0.02	0.0052	0.0069	32.69
3	5.88×10^{-3}	0.02	0.0054	0.0072	33.33

条件同表 1 注解.

All notes are similar to table 1.

试验中观察到, 以上两组试验中加毒黄素后, 不仅光密度变化较快, 而且相对应的光密度值也明显高于对照管. 以光密度为纵坐标, 以测定时间为横坐标作图(图 1, 图 2), 各得一条关系曲线.

2.3 为了确定毒黄素对黄嘌呤氧化酶的激活类型, 做了不同浓度的毒黄素对反应速度的影响试验. 以 300nm 光吸收的变化与相应的底物黄嘌呤浓度进行双倒数作图, 结果绘于图 3, 此图表明, 此激活作用属于部分混合型.

在无毒黄素的条件下, 以黄嘌呤为底物, 0.03mol/L 磷酸缓冲液, pH7.63, 用双倒数作图法(图 4), 测知黄嘌呤氧化酶的 $K_m = 1.75 \times 10^{-3} \text{mol/L}$.

3 讨 论

从图 1 及图 2 中可以看出, 反应体系中加入毒黄素后, 与对照组相比, 光密度都增高了, 表明黄嘌呤氧化酶活性增强. 从图中还可以看出, 不仅即时光密度提高, 而且加入毒黄素后速度直线的斜率也高于对照组, 说明加毒黄素后速度提高得也快. 后面这一点从表 1 与表 2 中也得到证实. 从表 1 和表 2 中还可以看出, 在以黄嘌呤为底物的反应中, 对照组 $\Delta A/\text{min}$ 由 0.0056 至 0.0075; 加毒黄素的体系 $\Delta A/\text{min}$ 由 0.0062 至 0.0082; 在以次黄嘌呤为底物的反应系统中, 对照组 $\Delta A/\text{min}$ 由 0.0052 至 0.0054; 而加毒黄素体系 $\Delta A/\text{min}$ 由 0.0069 至 0.0073.

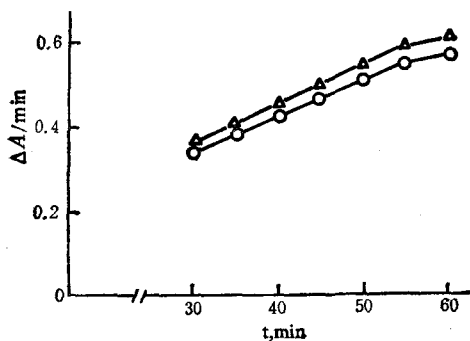


图 1 毒黄素对黄嘌呤氧化酶氧化黄嘌呤速度的影响

Fig. 1 Effect of toxoflavin on the rate of oxidation of xanthine by xanthine oxidase

○-○ 无毒黄素 △-△ 毒黄素 (1.75×10^{-3} mol/L)
底物黄嘌呤浓度均为 8×10^{-3} mol/L

The reaction mixture contained 0.03 mol/L sodium phosphate, pH 7.63, 6×10^{-3} mol/L EDTA, and 8×10^{-3} mol/L xanthine (○-○); and the active system contained, in addition, 1.75×10^{-3} mol/L toxoflavin (△-△)

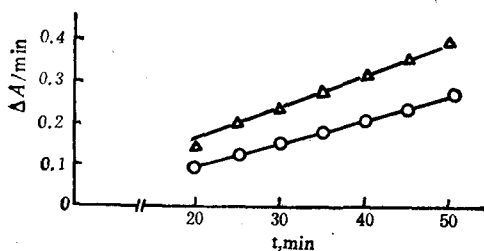


图 2 毒黄素对黄嘌呤氧化酶氧化次黄嘌呤速度的影响

Fig. 2 Effect of toxoflavin on the rate of oxidation of hypoxanthine by xanthine oxidase

○-○ 无毒黄素 △-△ 毒黄素 (1.75×10^{-3} mol/L)
底物次黄嘌呤浓度均为 4.89×10^{-3} mol/L

The reaction mixture contained 0.03 mol/L sodium phosphate, pH 7.63, 6×10^{-3} mol/L EDTA, 4.89×10^{-3} mol/L hypoxanthine (○-○); and the active system contained, in addition, 1.75×10^{-3} mol/L toxoflavin (△-△)

总之,加毒黄素后,不论从光密度的绝对数值,还是变化情况来,都明显高于对照组。说明毒黄素可以激活黄嘌呤氧化酶。而且,这一激活作用在由次黄嘌呤氧化为黄嘌呤阶段较由黄嘌呤氧化成尿酸这一阶段大得多。

由图 3 可以进一步看出,毒黄素对黄嘌呤氧化酶的激活作用属于部分混合类型。这种类型一般用下式描述:

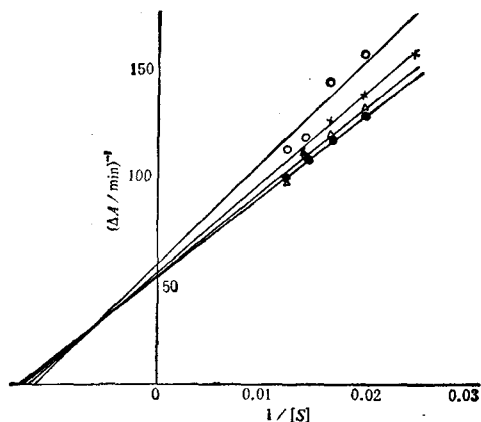


图 3 在几种毒黄素浓度下黄嘌呤氧化酶氧化黄嘌呤的速度的双倒数图

Fig. 3 A double reciprocal plots of the rate of oxidation of xanthine by xanthine oxidase against concentration of xanthine at several fixed concentration of activator

在 0.03 mol/L 磷酸缓冲液 pH 7.63, 6×10^{-3} mol/L EDTA 反应系统中

Reaction rates were measured by following the change in absorbance at 300 nm 25°C. Sodium phosphate buffer, 0.03 mol/L, pH 7.63, containing 6×10^{-3} mol/L EDTA was present in all incubation.

○-○ 5.9×10^{-3} mol/L 毒黄素 (toxoflavin)
X-X 5.9×10^{-3} mol/L 毒黄素 (toxoflavin)
△-△ 1.47×10^{-3} mol/L 毒黄素 (toxoflavin)
●-● 1.76×10^{-3} mol/L 毒黄素 (toxoflavin)

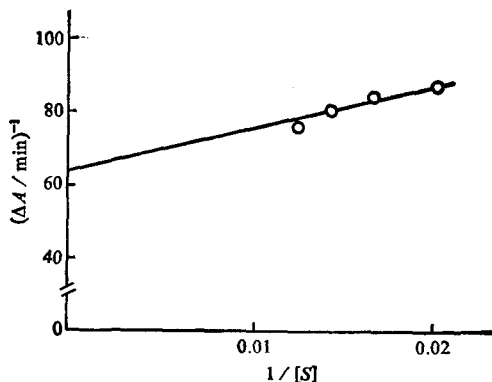
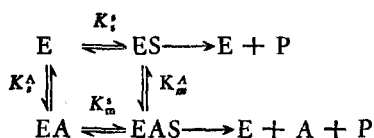


图 4 黄嘌呤氧化酶氧化黄嘌呤的速度与底物浓度的双倒数图

Fig. 4 A double reciprocal plot of the rate of oxidation of xanthine by xanthine oxidase against substrate concentration

在 0.03 mol/L 磷酸缓冲液 pH 7.63 6×10^{-3} mol/L EDTA 的反应系统中

Reaction rates were measured by following the change in absorbance at 300 nm, 24°C. The reaction mixture contained 0.03 mol/L sodium phosphate, pH 7.63, 6×10^{-3} mol/L EDTA



也就是说,毒黄素不仅与酶结合,也与酶与底物的复合物结合。三分子复合物(EAS)较两分子复合物(ES)分解产物速度快($K_2' > K_2$),反应速度提高。关于诸多常数: K, K', K_1', K_1'', K_2' 与 K_2 等,有待下一步试验工作。至于以次黄嘌呤为底物的反应机制就更复杂了。

黄嘌呤氧化酶属于需氧脱氢酶,在人体内分布广泛,它是嘌呤分解代谢的重要酶。它催化了次黄嘌呤转化成黄嘌呤,最终氧化成尿酸随尿排出体外。在这两步氧化过程中都产生 H_2O_2 。毒黄素以部分混合型方式激活了此酶,且改变了平衡常数^[7],产生高于正常代谢的 H_2O_2 ,造成对人体的毒害。

此外,黄嘌呤氧化酶在氧化次黄嘌呤和黄嘌呤过程中,可以产生超氧基团 $O_2^{\cdot-}$ ^[8,9]。超氧基团 $O_2^{\cdot-}$ 对人体有明显的毒害作用。毒黄素对黄嘌呤氧化酶的激活,造成 $O_2^{\cdot-}$ 基团生成过多,这也可能是毒黄素致使人体中毒的另一重要方式,有待今后进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Van Veen A G *et al.* *Rec Trav Chim*, 1934; **53**: 253
- 2 刘秀梅等. 卫生研究, 1985; **14**(4): 25
- 3 赵乃昕等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1988; **8**(3) 151
- 4 Latuasan H E *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1961; **52**: 502
- 5 赵乃昕等. 中国公共卫生, 1987; **6**(2): 65
- 6 Greenlee L *et al.* *J. Biol Chem*, 1964; **239**: 1090
- 7 Dixon M *et al.* *Enzymes*. Third edition, London: Longman Group Ltd, 1979: 389—398
- 8 Olson J S *et al.* *J. Biol Chem*, 1974; **249**: 4350
- 9 Charles Beauchamp *et al.* *Anal Biochem*, 1971; **44**: 276

EFFECT OF TOXOFLAVIN ON THE ACTION OF XANTHINE OXIDASE

Ren Weidong, Zhao Naixin, Yun Yunghua, Liu Jinsheng, Liu Dianzhen
(Weifang Medical College)

ABSTRACT

The kinetic studies of effect of toxoflavine on the action of xanthine oxidase (EC1, 2,3,2) which was extracted from *Pseudomonas cocovenenans* showed that toxoflavin was nonessential activator for the enzyme, and the activation in condition of hypoxanthine as substrate was more marked than xanthine. The activation obeyed the partial activation type. These results provide us a clue for searching toxic mechanism of toxoflavin for human.

Key words toxoflavin, xanthine oxidase, partial activation