

## 高效液相色谱测定血小板 cAMP-磷酸二酯酶活力

韩金祥 王美岭 冯进波

(山东省医科院基础所, 济南)

### 提 要

本文报道了离子交换高效液相色谱-紫外检测磷酸二酯酶(PDE)活力的方法。本方法的回收率为 $93.02 \pm 2.09\%$ , 重复性 CV 为 $3.16\%$ ,  $5'$ -AMP 在 $17.0-90.7 \text{ pmol}/10 \mu\text{l}$ , cAMP 在 $138-1104 \text{ pmol}/10 \mu\text{l}$  浓度范围内, 相关系数分别为 $0.9986$ 和 $0.9950$ 。用 $5'$ -AMP 生成率和 cAMP 的转化率表达 PDE 活力, 两者吻合。本方法能灵敏地反映茶碱对 PDE 的抑制作用。

**关键词:** 高效液相色谱, cAMP-磷酸二酯酶, 血小板

磷酸二酯酶(PDE: E. C. 3. 1. 4. 17) 与腺苷酸环化酶配合控制细胞内 cAMP 水平。观察 PDE 活力变化对研究 cAMP 在细胞代谢调控中的作用具有重要意义。目前, PDE 活力测定多采用“Batch”技术或称两步温育法<sup>[1-3]</sup>。该方法虽应用广泛, 但有下列不足点: (1)水溶性体积大<sup>[4]</sup>; (2) cAMP 与腺苷分离不完全<sup>[4]</sup>; (3)空白较高<sup>[4]</sup>; (4)标记化合物不稳定<sup>[4]</sup>; (5)第二步酶反应易干扰实验, 特别在研究药物对 PDE 的作用时, 腺苷酸酶影响实验结果<sup>[5]</sup>; (6)常用的腺苷酸酶——蛇毒中含有少量的 PDF, 给实验造成误差<sup>[4]</sup>。

高效液相色谱(HPLC)具有高速、高效、高灵敏度、高准确度等优点, 为分析 cAMP、AMP 以及腺苷提供了强有力的分析手段<sup>[6]</sup>。本实验试图利用 HPLC 技术建立血小板 PDE 活力测定方法, 为临床和基础研究提供有效的分析方法。

### 材 料 和 方 法

#### 一、主要试剂和仪器

血小板洗液:  $50 \text{ mmol/L}$  Tris-AC, pH 6.0;  $2 \text{ mmol/L}$  EDTA,  $0.9\%$  NaCl, 血小板悬液:  $50 \text{ mmol/L}$  Tris-AC pH7.5,  $20 \text{ mmol/L}$

$\text{MgCl}_2$ ,  $0.1 \text{ mg/ml}$  BSA, 主要试剂: cAMP、 $5'$ -AMP、腺苷、ATP、茶碱均为美国 Sigma 公司产品。

高效液相色谱: 美国 Varian-5060型; 色谱数据处理仪: 美国惠普公司 3390 A 型。

#### 二、酶制剂制备

参考 Wang 等<sup>[7]</sup>方法, 略加改进, 用硅化试管、吸管和针头, 空腹抽血, 按 9:1 的比例加  $3.8\%$  柠檬酸钠抗凝, 室温下离心  $160 \times 7 \text{ min}$ , 取上清 PRP (platelet rich plasma) 计量, 取  $20 \mu\text{l}$  PRP 计数<sup>[8]</sup>, PRP 离心  $2000 \times 10 \text{ min}$ , 倾上清 PPP (platelet poor plasma) 得血小板沉淀, 用血小板洗液洗涤两次, 将血小板悬浮在血小板悬液中, 低温 ( $-70^\circ\text{C}$ ) 快速冻融两次, 离心  $6000 \times 15 \text{ min}$  取上清得 PDE, Bradford 法<sup>[9]</sup>定蛋白。

#### 三、酶活力测定

参考张林华等<sup>[4]</sup>方法, 反应体系为  $50 \text{ mmol/L}$  Tris-AC, pH7.5,  $5 \text{ mmol/L}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $75 \text{ mmol/L}$  巯基乙醇,  $22.7 \mu\text{mol/L}$  cAMP, 加适量 PDE 制剂, 总体积为  $200 \mu\text{l}$ 。 $37^\circ\text{C}$  温育  $15 \text{ min}$ , 沸水浴  $90 \text{ s}$  终止反应, 离心除蛋白, 取上清  $10 \mu\text{l}$  进行色谱分析。酶活力单位:  $\text{pmol}/(\text{mg} \cdot \text{protein} \cdot \text{min})$ 。

#### 四、色谱条件

色谱柱: Micropak AX-5 30 cm × 4mm;  
 检测器: UV-100,  $\lambda = 259$  nm; 流动相: 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3; 双蒸水; 流速: 1ml/min; 柱温: 25°C。

#### 五、分析方法

定性分析以 cAMP、5'-AMP、腺苷等标准样品在相同条件下的保留时间 (RT), 并增加标准样品检验峰是否升高。定量分析以峰高数记录, 用已知浓度标准样品作曲线, 按标准曲线计算待测样品的含量。

### 结果与讨论

#### 一、最佳色谱条件

标准样品紫外吸收光谱扫描, 各样品的最大吸收光谱分别为腺苷: 259.4nm, AMP: 258.8 nm, ATP: 259.0 nm, cAMP: 268.0nm, 我们选用 259nm 波长的检测器。

Micropak AX-5 为离子交换色谱柱, 流动相的 pH 值和离子强度是影响分离度的两个主要因素。流动相为 20mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  时, 不同 pH 下色谱保留时间见表 1。

表 1 pH 对保留时间 (min) 的影响

pH	腺苷	cAMP	5'-AMP	ATP
5	3.88	13.36	18.65	31.92
3	2.09	6.23	9.18	14.00

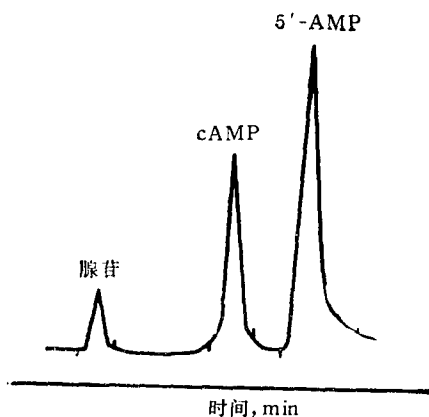


图 1 腺苷、cAMP、5'-AMP 色谱分离图

在 pH3 不变情况下,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为 10

mmol/L 时, 5'-AMP 的保留时间为 11.3 min,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为 20 mmol/L 时, 5'-AMP 的保留时间为 9.18min。由此可见, 在本实验条件下, 腺苷酸的保留时间随流动相 pH 的降低和离子强度的升高而变小, 我们选用的流动相为 pH3, 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 在此条件下几种腺苷酸的分离度  $R_s > 1$  (图 1), 分离效果良好。

本实验所用数据处理仪为积分仪, 由于峰面积受杂质峰的影响较大, 我们以峰高数定量, 峰高数与输入信号的关系为: 1 高度数 =  $1.25 \times 10^{-4}$  mV。

#### 二、5'-AMP、cAMP 测定的线性范围

在选定的色谱条件下, 不同浓度的各样品重复进样三次, 取平均值, 并以峰高数对样品浓度作曲线。5'-AMP 在 17.0—90.7 pmol/10  $\mu\text{l}$  的范围内, 相关系数为  $r = 0.9986$  (图 2); cAMP 在 138—1104 pmol/10  $\mu\text{l}$  的范围内,

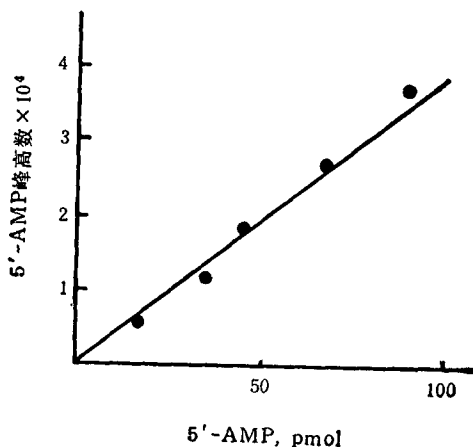


图 2 5'-AMP 测定的线性关系

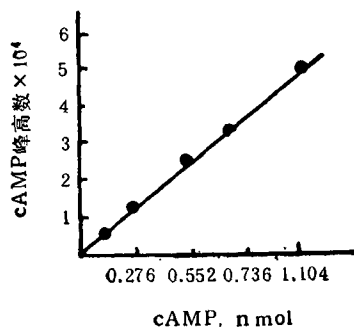


图 3 cAMP 测定的线性关系

$r = 0.9950$  (图 3), 5'-AMP、cAMP 在一定浓度范围内, 线性关系良好。

### 三、色谱仪重复性实验

同一 5'-AMP 样品, 重复进样 8 次 ( $n = 8$ ), 保留时间的变异系数  $CV = 0.037\%$ , 峰高数的变异系数  $CV = 2.19\%$ , 色谱仪重复性良好。

### 四、酶浓度对 PDE 活力的影响

以灭活的 PDE 制剂作空白对照, 在相同的酶反应条件下, 分别记录 5'-AMP 的生成率和 cAMP 的转化率, 结果表明(图 4、图 5), 酶量在 4—10  $\mu\text{g}$  范围内呈线性关系, 其曲线类型相似皆呈“S”型, 说明 cAMP 的转化率与 5'-

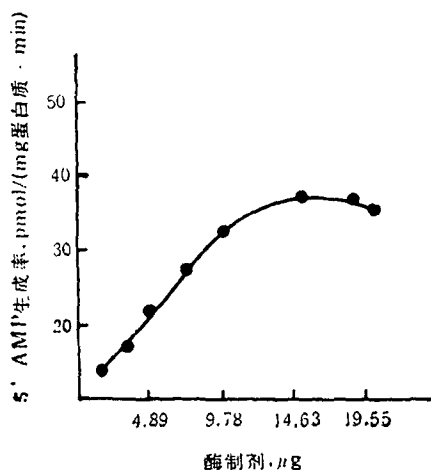


图 4 酶浓度对 5'-AMP 生成率的影响  
底物 cAMP 浓度为  $22.7 \mu\text{mol/L}$

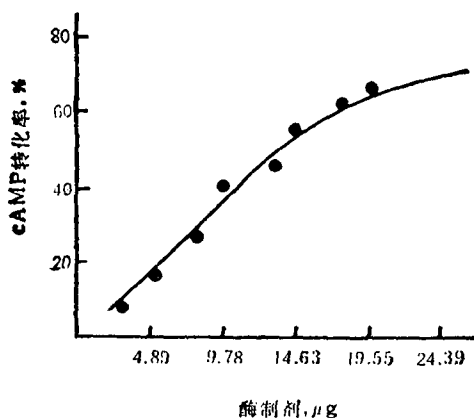


图 5 酶浓度对 cAMP 转化率的影响  
底物 cAMP 浓度为  $22.7 \mu\text{mol/L}$

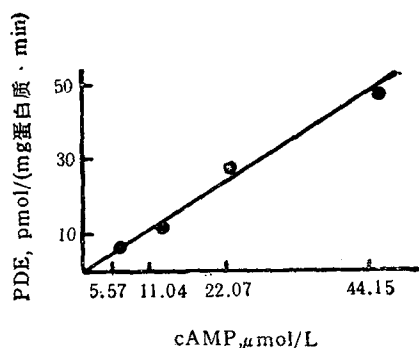


图 6 cAMP 对 PDE 活力影响  
酶量:  $9.7 \mu\text{g}$

AMP 的生成率相吻合。

### 五、底物 cAMP 对 PDE 活力的影响

在合适的酶浓度下, 改变 cAMP 浓度, 测定 PDE 活力变化, 在一定浓度范围内, PDE 活力与 cAMP 浓度线性相关(图 6)。

### 六、茶碱对 PDE 的抑制作用

茶碱是 cAMP-PDE 的抑制剂<sup>[10]</sup>。在本实验条件下观察茶碱对 PDE 活力的影响, 结果显示: HPLC 法测定 PDE 活力能灵敏地反映茶碱对 PDE 的抑制作用。当茶碱浓度达到一定水平时, 抑制达到饱和(图 7)。

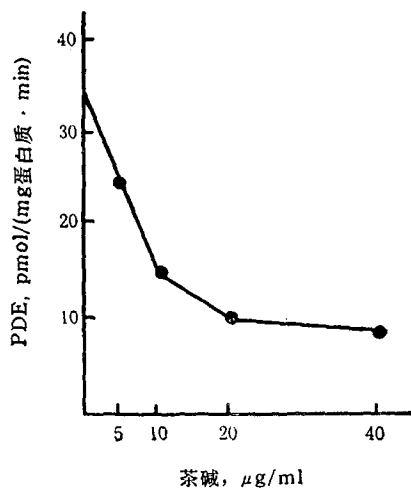


图 7 茶碱对 PDE 活力的影响

### 七、PDE活力测定的重复性和回收率实验

同一样品, 平行管测定 PDE 活力, 重复性为  $CV = 3.16\%$  ( $n = 8$ ); 回收率为  $93.02 \pm 2.09\%$  ( $n = 6$ )。说明本方法有效好的重复性

和回收率。

任何一种 PDE 活力测定方法都应尽量使 PDE 的作用产物全部回收,在 Batch 技术中,这些产物包括腺苷、肌苷、次黄嘌呤、嘌呤等<sup>[11,12]</sup>,众多的产物影响实验的回收率。最初用 Batch 技术测定 PDE 活力时,回收率仅为 60%<sup>[11]</sup>,改进后的回收率为 68.9%<sup>[4]</sup>,本方法的回收率为 93.02%,优于其他方法。

由于商品阴离子交换树脂对腺苷的特异性不够高<sup>[13,14]</sup>,普通色谱不能使腺苷和 cAMP 分离完全<sup>[5]</sup>。HPLC 的高效、准确等特点克服了分离不完全的缺点,使几种核苷酸的  $R_f > 1$ 。HPLC 法不涉及同位素,一方面消除了由于同位素不稳定,易脱落造成的误差<sup>[1]</sup>,另一方面减少了实验室的同位素污染。本方法的缺点是由于一般粗酶样品中同时存在多种 5'-核苷酸酶,使 5'-AMP 分解而可能引起误差<sup>[4]</sup>,但在两步保温法中,常用的核苷酸酶——蛇毒常常含有 PDE<sup>[1]</sup>,同样会给实验带来误差。HPLC 法避免了第二步酶反应可能引起的误差。特别在研究药物对 PDE 的影响时,本方法避免了第二种酶的干扰<sup>[5]</sup>,提高了结果的准确度。为了考察本方法的可靠性,我们观察了茶碱对 PDE 的抑制作用,结果表明本方法能灵敏地反映茶碱对 PDE 的抑制作用;另外, HPLC 法可同时测定 cAMP 的转化率和 5'-AMP 的生成率,且两者吻合,说明了本方法的可靠性。

PDE 以多种形式存在,动力学行为较为复杂<sup>[15]</sup>,它们的分布、动力学性质及底物特异性不同,其作用机理及生理功能尚未阐明。在我们的实验中,观察到在一定底物浓度时,随酶量的增加, PDE 活力增加呈类似 S 型曲线,此结果与张林华等<sup>[2]</sup>的结果相似。

综上所述,结合我们的实验结果,充分说明 HPLC-UV 测定 PDE 活力具有高效、快速、简便、重复性好、回收率高、非放射性等优点,可应用于临床和基础研究。

### 参 考 文 献

- 1 Nakai C *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1975; 391: 222
- 2 Van Loomerem Compagne M M *et al.* *Anal Biochem*, 1983; 135: 146
- 3 Aria A *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 165: 128
- 4 张林华等. 生物化学与生物物理进展, 1986; (3): 58
- 5 Thompson W J *et al.* *Biochem*, 1971; 10: 311
- 6 Liu L *et al.* *J Chromator*, 1985; 341: 43
- 7 Wang Z *et al.* *Thromb Haemostas*, 1982, 48: 301
- 8 Dilip S *et al.* *Am J Clin Path*, 1976; 72: 248
- 9 Bradford M *et al.* *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- 10 凌柱三, 国外医学(输血及血液学分册), 1986; 9(2): 65
- 11 Boudreau R T *et al.* *Anal Biochem*, 1975; 63: 388
- 12 Ritten W J *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1973; 315: 378
- 13 Lynch T J *et al.* *Anal Biochem*, 1975; 67: 130
- 14 Ouy K K *et al.* *Anal Biochem*, 1976; 76: 53
- 15 Greengard P *et al.* *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1977; 8: 119

[本文于 1989 年 7 月 14 日收到]

## 北京市星火技术研究所转让最新研制的生物节律监测仪技术

本生物节律监测仪采用了最新成果,能预测最佳受孕期、追溯受孕日节律、预测个人生物节律、预测集体生物节律,其准确率在 80% 以上,将广泛应用于各类生产、建设性单位、车队和医院。使用本机还可从事专业监测经营,预计需求量在 100 万台以上。

本监测仪由主机、打印机及软件组成,主机系进出口原装件。生产成本每套 2000 元(含主机、打印机),零售价 4500 元,适于各类电子企业、商店、俱乐部生产和经营。

技术转让费 8000 元,单购样机 4500 元(包括样机一部,负责技术培训与调试)。

[北京市星火技术研究所,北京 867 信箱 20816 组,邮政编码: 100024, 李群]