

# 模型胆汁中磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性测定的新方法

李宏丽, 王张权, 杨 倩, 孙连妹, 朱银燕, 安学勤

(南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏省生物功能材料重点实验室, 江苏 南京 210046)

[关键词] 模型胆汁, 磷脂酶 A<sub>2</sub>, 卵磷脂, 水解, 药物

[中图分类号] O 614.33 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)03-0138-03

胆石病是一种常见病和多发病. 胆石病不仅会引起急性胆绞痛, 还会引起心律失常、肝功能衰竭等并发症, 严重的会导致糖尿病和胆囊癌. 胆固醇、卵磷脂和胆汁酸盐是胆汁中的主要成分. 胆固醇几乎不溶于水, 在胆汁中主要由胆盐与卵磷脂形成的胶体溶解, 在胆汁中胆固醇过饱和而析出是胆固醇结石形成的最主要的原因. 磷脂酶 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 是人的胰液与胆囊胆汁中含有的主要酶<sup>[1]</sup>. 文献报道磷脂酶 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 的活性对胆固醇结石的形成起着关键的作用<sup>[2]</sup>. 在模型胆汁中磷脂酶 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 催化卵磷脂水解为游离脂肪酸和溶血卵磷脂, 其中, 游离脂肪酸在模型胆汁中有成核效应<sup>[3]</sup>, 溶血卵磷脂增溶胆固醇的能力仅为卵磷脂的 50%<sup>[4]</sup>. 故磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性的改变会直接导致卵磷脂浓度发生变化, 从而影响胆结石的形成.

目前在模型胆汁体系中研究药物对 PLA<sub>2</sub> 作用的方法还未见报道, 我们通过考察模型胆汁体系中酚红浓度、缓冲对浓度、酶浓度、反应温度、底物浓度等对脂酶 A<sub>2</sub> 催化卵磷脂水解反应的反应速率的影响, 建立了一种操作简便、实验误差小、重现性好、使用样品少且可以快速研究药物对 PLA<sub>2</sub> 作用的方法, 并用本方法考察了苦参碱、黄连素、抗坏血酸等一系列药物对模型胆汁体系中 PLA<sub>2</sub> 的影响.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

试剂: 猪胰脏磷脂酶 A<sub>2</sub>、牛黄胆酸盐为 sigma 公司产品, 蛋黄卵磷脂为上海华东师大试剂厂产品, 胆固醇为上海国药集团有限公司产品, 苦参碱为陕西林海生物工程有限公司产品, 抗坏血酸为国药集团化学试剂有限公司产品, 黄连素为东北制药总厂产品, 其余试剂均为国产级分析纯.

仪器: Agilent 8453 紫外可见分光光度计, 安捷伦科技有限公司; PHS-2C 数显酸度计, 上海宇隆有限公司.

### 1.2 实验方法

借助于 Sm all 三角相图配制模型胆汁<sup>[5]</sup>. 具体方法是精确称取一定量的胆固醇、胆盐、卵磷脂混合溶于氯仿-甲醇(体积比为 2/1)溶液中, 用旋转蒸发仪使样品溶剂挥发后, 样品呈玻璃态或粘稠状, 抽真空至恒重. 加 pH = 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 0.15 mol/L 的氯化钠溶液), 使总脂浓度达 3%, 再加入定量的酚红溶液, 放入 65℃ 水浴中孵化 1 h 后, 使其自然降温至 37℃, 恒温孵化 12 h 再加入需要考察的药物的溶液, 然后继续孵化 12 h.

磷脂酶 A<sub>2</sub> 催化卵磷脂水解的产物游离脂肪酸可与指示剂酚红作用, 在 560 nm 处产生特征吸收. 用可见一紫外分光光度计在线检测在 560 nm 处吸光度随反应时间的变化. 用油酸作标准曲线, 根据标准曲线将磷脂酶 A<sub>2</sub> 水解反应得到的“吸光度-时间”曲线转化为“产物浓度-时间”曲线. 由此计算该反应的初速率和酶活性.

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(20573056、20673059)、上海基础研究重点项目(08jc1408100)资助项目.

通讯联系人: 安学勤, 教授, 博士生导师, 研究方向: 物理化学. E-mail: anxueqi@njnu.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 酚红浓度的影响

酚红作为指示剂, 是否干扰反应、影响反应速率, 浓度选择多少合适, 是实验方法建立时必须考虑的. 我们在模型胆汁体系中, 研究了在不同浓度的酚红条件下磷脂酶 A<sub>2</sub> 催化卵磷脂水解反应的反应速率, 结果如图 1. 可见酚红浓度对该反应的反应速率在误差范围内没有影响. 但是考虑到酚红浓度太低, 吸光度很小, 检测误差大; 酚红浓度太高, 可能会超出仪器的检测量程. 综合考虑我们选择了酚红浓度为  $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为检测所用浓度.

2.2 缓冲对浓度的影响

缓冲对浓度决定着模型胆汁的酸碱性. 缓冲对浓度过低, 不足以稳定溶液的 pH 值, 影响酶的活性. 缓冲对浓度过高, 一方面会使本实验的灵敏性降低; 另一方面缓冲对会阻碍酶与卵磷脂的结合, 使反应变慢, 酶活性降低. 我们考察了缓冲对浓度为  $5\text{ }25\text{ }50\text{ }75\text{ }100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时酸碱度和灵敏度的变化. 结果显示缓冲对浓度达到  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 足以稳定溶液的 pH 值;  $50\text{ }75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时反应速率达到最大. 综合考虑, 我们选择  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为本反应的缓冲对浓度.

2.3 酶浓度的影响

酶浓度的大小决定反应速率, 在整个反应体系中有着举足轻重的作用. 我们研究了在不同酶浓度时磷脂酶 A<sub>2</sub> 催化卵磷脂水解反应的反应速率, 结果如图 2 所示. 考虑到反应太快, 不利于考察促进酶活性物质的作用; 反应太慢, 因反应所需时间太长、溶剂的挥发、温度控制等方面的影响, 使实验误差增加, 也不利于考察抑制酶活性物质的作用. 综合考虑后本研究最终选择磷脂酶 A<sub>2</sub> 的浓度为  $10.2\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  作为检测浓度.

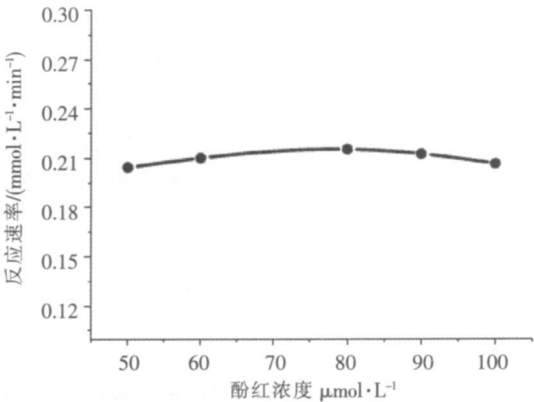


图 1 反应速率与酚红浓度的关系

Fig.1 Relationship of reaction rate with concentrations of phenol red

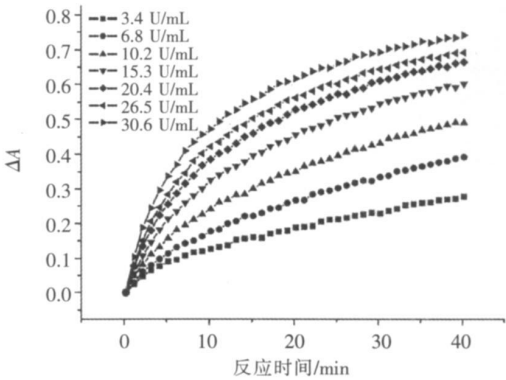


图 2 吸光度与反应时间的关系

Fig.2 Relationship of absorbance with reaction time

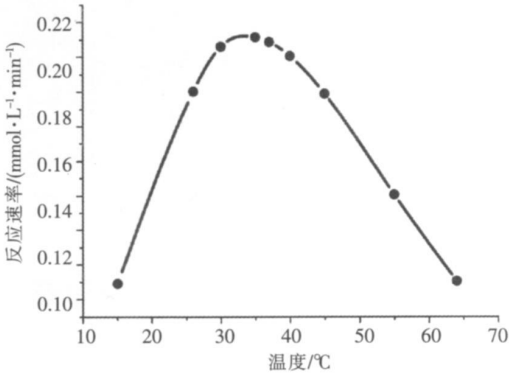


图 3 温度对反应速率的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on the reaction rate

2.4 温度的影响

温度对酶活性的影响具有双重作用, 升高温度, 一方面使反应体系活化能增加, 进而使催化反应速率增加; 另一方面可能使酶失活, 降低反应速率. 图 3 显示了温度对模型胆汁中磷脂酶 A<sub>2</sub> 催化卵磷脂水解反应的反应速率的影响, 由图 3 可见,  $30\sim 40^{\circ}\text{C}$  是磷脂酶 A<sub>2</sub> 作用的适宜温度, 结合实验体系是人体模型胆汁, 选择接近人体生理温度的  $37^{\circ}\text{C}$  为反应温度.

2.5 实验方法的应用

用该方法考察了苦参碱、抗坏血酸、黄连素 3 种药物对模型胆汁中磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性的影响. 结果表明, 苦参碱对模型胆汁中磷脂酶 A<sub>2</sub> 的活性有很大抑制作用, 随着其浓度从  $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  增加到  $16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,

反应速率从  $0.2050\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  降低到  $0.145\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , 并呈良好的线性关系; 黄连素对模型胆汁中磷脂酶  $A_2$  的活性也有抑制作用, 但影响不大; 抗坏血酸对模型胆汁中磷脂酶  $A_2$  的活性基本上没有影响.

### 3 结论

研究结果表明, 我们建立的酚红在线分光光度法适用于模型胆汁中磷脂酶水解卵磷脂反应, 可应用于考察一些治疗胆结石的药物. 该方法具有操作简便、实验误差小、重现性好、使用样品少等优点. 我们应用该方法考察了苦参碱、黄连素等多种药物, 发现其中不少药物可抑制磷脂酶  $A_2$  活性, 可为临床治疗胆结石病提供重要信息.

#### [参考文献]

[ 1 ] Akano T, Yanagisawa J. Phospholipase activity in human bile[ J]. Hepatology 1988, 8( 6): 1560-1564.  
[ 2 ] Sunan iY, et al. Is a role of phospholipase  $A_2$  in cholesterol gallstone formation phospholipid species-dependent[ J]. Biochemical et Biophysica Acta 2001, 1532( 1/2): 51-59.  
[ 3 ] Hapem Z, Goldman G, Pekel Y, et al. Free fatty acids have nucleating effects in model bile[ J]. Liver 1992, 12( 3): 107-111.  
[ 4 ] A tindra K. The role of phospholipase  $A$  in gallstone fomation[ J]. Journal of Surgical Research 1974, 16( 2): 162-163.  
[ 5 ] Carey M C, Sm all D M. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile[ J]. Journal of Clinical Investigation 1978, 61( 4): 998-1026.

[责任编辑: 顾晓天]