

95-97

15

第22卷 第1期
1998年3月水生生物学报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICAVol.22, No.1
Mar., 1998

研究简报

微囊藻毒素对鱼组织匀浆液蛋白磷酸酶
活性抑制作用的研究

12945-23

陈加平 徐立红[✓] 张甬元

5941.91

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

A STUDY OF INHIBITION OF MICROCYSTINS ON PROTEIN
PHOSPHATASE IN FISH TISSUE HOMOGENATE

Chen Jiaping, Xu Lihong and Zhang Yongyuan

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词 蛋白磷酸酶, 组织匀浆液, 微囊藻毒素, 抑制

Key words Protein phosphatase, Tissue homogenate, Microcystins, Inhibition

蛋白磷酸酶是在调节细胞内蛋白磷酸化水平方面具有重要作用的酶。研究表明,蛋白磷酸化水平与肿瘤的促进作用密切相关,激活蛋白激酶C和抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(Ser/Thr Protein phosphatase,简称PP,根据对抑制剂的敏感性和对二价阳离子的依赖性,分为1,2A,2B,2C四类)的物质都对肿瘤形成起促进作用。近期研究发现,天然有毒物微囊藻毒素对PP1和PP2A活性具有极强的抑制作用^[1]。对PP1和PP2A具有极强抑制作用的这一物质的发现有重要意义,从酶学研究来看,由于这类物质对酶抑制作用专一和灵敏,因而可作为理想的分子探针用于对生物体内各类PP的研究;从生态毒理学考虑,由于PP抑制程度可反映一类具有相同作用机理物质的总量,因而可用来定量检测环境中促肿瘤物的量以及用来评价化学品的潜在促肿瘤作用。当考虑蛋白磷酸酶作为分子生态毒理学指标而用于环境监测时,方法的简化是十分重要的。由于蛋白磷酸酶的纯化步骤较为繁琐,给化学品的活体致毒测定工作带来不便,而组织匀浆液比较容易得到,利于活体致毒测定工作的大量进行,因此,验证用纯化的酶进行实验的条件是否同样适合于匀浆液,研究微囊藻毒素对组织匀浆液中蛋白磷酸酶的抑制作用的特点,并与对纯化的酶的抑制作用模式及其程度进行比较显得非常必要。

1 材料与方方法

- 1.1 蛋白磷酸酶的分离纯化 取草鱼肝脏,按照文献[2]中的方法,得到的PP2A分装后,贮存于-20℃。
- 1.2 组织匀浆液的制备 取草鱼肝脏、肾脏,分别加适量(W/V=1/10)含0.25mol/L蔗糖的缓冲溶液A(50mmol/L Tris, pH7.4,含2mmol/L EDTA, 2mmol/L EGTA, 0.2mmol/L PMSF, 2mmol/L 巯基乙醇和10%甘油),置冰浴中,匀浆,经离心(6000g, 4℃, 30min),所得上清液分装,贮存于-20℃。

国家自然科学基金资助,编号39400024,淡水生态与生物技术国家重点实验室资助。

1997-03-12收到。

1.3 底物制备 参照文献 [2] 进行。

1.4 酶活力测定 参照文献 [2] 进行。

1.5 抑制作用比较 参照文献 [2] 进行。用毒素存在时酶的相对活力与毒素浓度的对数作图。

1.6 试剂 微囊藻毒素 LR、YR、RR, 日本名城大学原田健一教授赠送。

2 结果与讨论

2.1 组织匀浆液反应条件的确定

组织匀浆液相对活力以反应产生的 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 占加入的底物的总 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 计数的百分比来表示。在肝、肾匀浆液稀释倍数分别为 32, 16, 8, 4, 2 时, 测定它们对糖原磷酸化酶 a 脱磷酸化的活力 (图 1)。从图 1 看出, 当稀释倍数为 32, 即肾匀浆液蛋白量 0—2.0 μg , 肝匀浆液蛋白量 0—2.5 μg 时, 酶蛋白量与活力呈线性关系。将肝、肾匀浆液均稀释 32 倍, 分别进行反应时间—活力实验 (图 2)。从图 2 可看出, 在 12min 以内, 相对活力与反应时间呈线性关系, 因此, 10min 的反应时间对肝、肾匀浆液的活性实验来说是合适的。

2.2 微囊藻毒素对组织匀浆液蛋白磷酸酶活性的抑制

酶抑制实验中用不加抑制剂时的酶活力作为 100%, 测定不同抑制剂浓度时的酶的相对活力。用促肿瘤剂微囊藻毒素 LR、YR、RR 分别对肝、肾匀浆液进行抑制实验, 从图 3 可以看出, 微囊藻毒素对肝、肾匀浆液中蛋白磷酸酶活性抑制作用的模式与对纯化的 PP2A 的一样, 反应曲线呈典型的 S 形。就对酶活

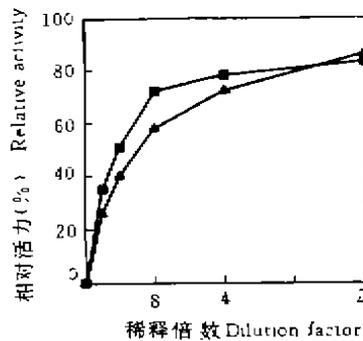


图 1 相对活力与蛋白浓度的关系

Fig.1 Relationship between relative activity and protein concentration

■ 肾匀浆液 Kidney homogenate

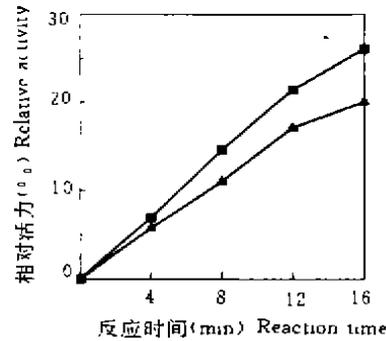


图 2 相对活力与反应时间的关系

Fig.2 Relationship between relative activity and reaction time

▲ 肝匀浆液 Liver homogenate

性的影响而言, LR 最大、YR 次之、RR 最小, 这与毒性实验的结果是一致的^[3]。

2.3 抑制作用的比较

比较 LR、YR、RR 对肝匀浆液与肝 PP2A 抑制的结果 (图 4), 可以看到, 尽管匀浆液成分复杂, 但三种

表 1 LR、YR、RR 对三种酶和制剂的半抑制浓度 (nmol / L)

Tab.1 IC_{50} of LR, YR, RR to protein phosphatase

	LR	YR	RR
肾匀浆液 Kidney homogenate	0.32	0.38	0.81
肝匀浆液 Liver homogenate	0.30	0.32	0.70
肝 PP2A Liver PP2A	0.25	0.39	0.62

毒素对其蛋白磷酸酶活性抑制作用的模式和程度与对纯化的 PP2A 的作用是完全一致的。对三组曲线的数据用灰色系统理论进行关联度检验, 在 P 为 0.5 时, LR、YR、RR 对两种酶制备物的抑制作用曲线的关联度分别为 0.65、0.69、0.70, 结果表明曲线间的相似程度是可信的^[4]。由此可以证明, 微囊藻毒素对蛋

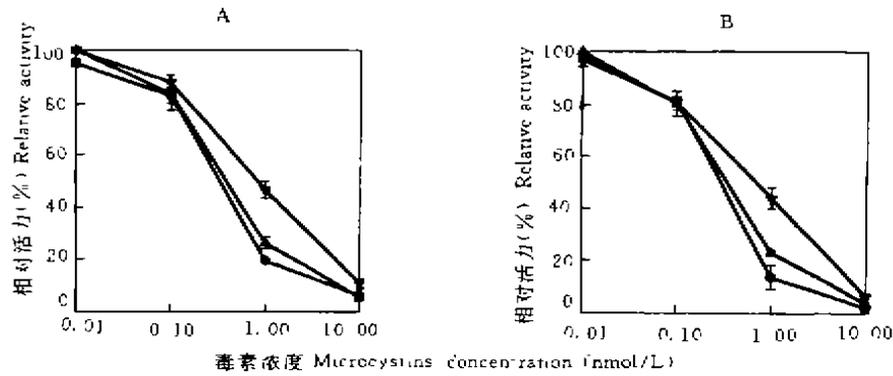


图3 微囊藻毒素对几种酶制备物的抑制作用。

Fig.3 Inhibition of microcystins on enzyme preparations.

(A: 肾匀浆液 Kidney homogenate, B 肝匀浆液 Liver homogenate)

● LR ▲ YR ▼ RR

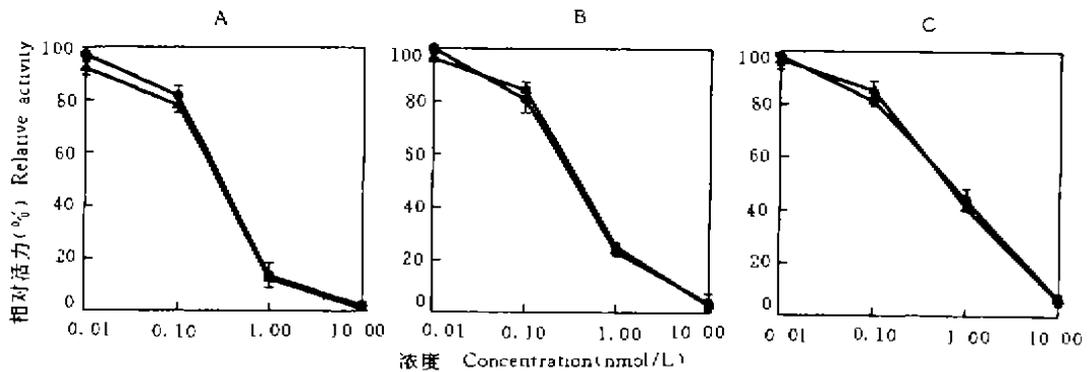


图4 微囊藻毒素对肝匀浆液和肝 PP2A 抑制作用的比较。(A: LR, B: YR, C: RR)

Fig.4 Comparison between inhibition of microcystins on liver homogenate and PP2A

● 肝匀浆液 Liver homogenate ▲ 肝 PP2A Liver PP2A

白磷酸酶 1 和 2A 的作用是专一性的, 不受系统中存在的其它磷酸酶和蛋白的影响。

由图 3、图 4 计算出 LR、YR、RR 对肾、肝匀浆液和肝 PP2A 的半抑制浓度 IC_{50} 如表 1。毒素对几种酶的 IC_{50} 十分接近, 与文献 [2, 5] 报道的结果是一致的。

本研究结果为用组织匀浆液代替纯化的酶进行抑制实验及化学品的活体致毒测定提供了依据, 而且, 在用放射性同位素标记法进行促肿瘤作用研究时, 用组织匀浆液作为酶制备物将更为方便。

参 考 文 献

- [1] 徐立红, 张雨元. 微囊藻毒素分子致毒机理研究近况. 水生生物学报, 1993, 17(4): 365—374
- [2] 徐立红等. 鱼肝中蛋白磷酸酶的分离纯化. 水生生物学报, 1995, 19(4): 379—381
- [3] Harada, K-I. Chemistry and detection of microcystins. In Toxic microcystins, Ed. M. F. Watanabe, 1996, p103—148. CRC press
- [4] 邓聚龙. 灰色预测与决策. 华中理工大学出版社, 1986
- [5] Alistair T R, et al. Protein Phosphatase activity in cyanobacterial: consequences for microcystin toxicity analysis. *Toxicol*, 1993, 31(9): 1179—1186