

# 抗菌类药物对锯缘青蟹 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

颜雅雯<sup>1</sup>, 张继平<sup>1, 2</sup>, 王 勤<sup>1</sup>, 谢进金<sup>3</sup>, 陈清西<sup>1</sup>

(1 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005 2 广东佛山科学技术学院生命科学学院, 广东 佛山 528231, 3 泉州师范学院生物系, 福建 泉州 362000)

摘要: 研究了几种抗菌类药物对锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶 (简称 NAGase, EC 3.2.1.52) 活力的影响。其结果表明: 链霉素、卡那霉素、青霉素钾、庆大霉素和磺胺嘧啶对该酶活力均没有明显的影响。头孢拉定对该酶有显著的激活作用, 当其浓度为  $4.5 \text{ mg/cm}^3$  时, 可使酶活力提高 200%。而氟哌酸和恩诺沙星对该酶均有抑制作用, 其中恩诺沙星对该酶的抑制作用较强, 随着抑制剂浓度增大, 酶活力呈指数下降, 导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.44 \text{ mg/cm}^3$ 。恩诺沙星对该酶的抑制作用类型表现为非竞争性可逆过程, 抑制常数  $K_1$  为  $0.35 \text{ mg/cm}^3$ 。该研究对锯缘青蟹的人工养殖具有一定的参考价值。

关键词: 锯缘青蟹; N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶; 抗菌类药物; 酶活力; 抑制作用

中图分类号: Q356.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2007)02-0231-05

N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶 (简称 NAGase, EC 3.2.1.52) 是几丁质酶水解系统的一个组成成分, 它协同内切几丁质酶和外切几丁质酶将几丁质彻底降解为单糖<sup>[1]</sup>。几丁质酶的研究与应用已涉及到工业、农业、医药、生物技术等领域<sup>[2]</sup>, 特别引人关注的是发现几丁质酶在生物体自溶、形态发生和营养代谢中具有一系列重要作用<sup>[3]</sup>。在海洋甲壳动物中, 包括 NAGase 在内的几丁质酶系直接参与生长发育中的周期性蜕皮<sup>[4]</sup>, 而甲壳动物的很多疾病都与其蜕皮生理状态发生的病理性改变有关。在养殖水体中, 一定量的药物, 必定会影响动物的生活与代谢及酶的活力。

锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 是我国沿海重要的海洋经济蟹类之一, 其养殖面积逐年增加, 养殖方法由粗放型向集约化方向发展。但由于病原体的侵蚀扰乱将引起锯缘青蟹个体的生理生化变化, 影响其正常生理活动与物质代谢, 导致锯缘青蟹的健康程度下降, 疾病的发生日益增多<sup>[5]</sup>。这严重制约了我国养蟹业的发展。因此, 多种抗菌类药物陆续应用于养殖过程中锯缘青蟹疾病的防治。但由于人们在使用这些药物之前缺乏科学的认识, 药物滥用的情况时有发生。这将对锯缘青蟹的养殖造成危害, 也将在动物体内遗留对人体有害的药物。本文在分离纯化锯缘青蟹 NAGase 并研究酶的部分性质的基础上<sup>[6-8]</sup>, 进一步研究了几种抗菌药物对该酶活力的影响。这对于人工养殖锯缘青蟹过程中药物的选择与使用具有一定的科学指导意义。

收稿日期: 2006-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40576066); 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室资助项目 (2005101)

作者简介: 颜雅雯 (1982~), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 陈清西, 男, 教授 (博导); E-mail: chenqx@xmu.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

NAGase是由本实验室从锯缘青蟹内脏中制备而获得的电泳纯酶制剂<sup>[6]</sup>,纯酶的比活力为7990U/mg。对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(pNP-NAG)为上海医药工业公司产品;对硝基苯酚(pNP)为England产品;庆大霉素为天津药业集团产品,青霉素钾、链霉素、卡那霉素、恩诺沙星及头孢拉定为河北远征药业有限公司产品,其余试剂均为国产分析纯试剂,所用溶液均以玻璃重蒸水配制。

## 1.2 方法

1.2.1 酶活力测定 采用终止法和跟踪法两种方法测定酶的活力<sup>[9]</sup>。终止法是以pNP-NAG为底物,在2.0cm<sup>3</sup>的反应体系中,含0.1mol/dm<sup>3</sup>NaAc-HAc缓冲液(pH 5.8),0.4mmol/dm<sup>3</sup>pNP-NAG,10mm<sup>3</sup>酶液,混匀,在37℃恒温下准确反应10min后加入2.0cm<sup>3</sup>0.5mol/dm<sup>3</sup>的NaOH终止反应,用Beckman UV-650型分光光度计测定波长为405nm的光密度值(OD<sub>405nm</sub>),加NaOH终止的产物(pNP)的摩尔消光系数按 $1.73 \times 10^4 \text{ dm}^3 / (\text{mol} \cdot \text{cm})$ 计算<sup>[10]</sup>。跟踪法的测活条件与终止法类似,但不加NaOH终止反应,而直接在分光光度计上测定OD<sub>405nm</sub>随反应时间的增长值。在pH值为5.8的产物(pNP)的摩尔消光系数为 $1.77 \times 10^3 \text{ dm}^3 / (\text{mol} \cdot \text{cm})$ <sup>[11]</sup>。

1.2.2 抗菌类药物对酶活力的影响 在测活体系中加入不同浓度的抗菌类药物,研究其对酶活力的影响,以不加抗菌类药物为对照,测定酶的相对活力。由于头孢拉定能与NaOH反应产生有色化合物,影响测定酶活力,不能采用NaOH终止反应。因此,研究头孢拉定对酶活力的影响是采用跟踪法检测酶的剩余活力,一种药物均设计三组平行实验。

1.2.3 抗菌类药物对酶抑制机理的测定 参考文献[8]方法在含不同浓度抗菌类药物的测活体系中,改变加入的酶量,测定酶活力与酶量的关系,进行抑制机理的判断。

1.2.4 抗菌类药物对酶抑制类型的测定 参考文献[9],通过Lineweaver-Burk双倒数作图,比较酶催化的动力学参数,包括表观米氏常数( $K_m$ )和最大反应速度( $v_m$ )的变化来判断。

# 2 结果

## 2.1 抗生素类与磺胺类药物对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响

分别以链霉素、庆大霉素、卡那霉素、青霉素钾、头孢拉定和磺胺嘧啶等为效应物,在正常的测活体系中加入不同浓度的效应物,研究它们对锯缘青蟹 NAGase 活力影响,结果(图1)表明,链霉素在0.1~1.0mg/cm<sup>3</sup>的浓度范围内对该酶活力没有任何影响;庆大霉素在1.0~10.0mg/cm<sup>3</sup>的浓度范围内对该酶有轻微的激活作用,可以使酶活力提高10%左右;50~400μg/cm<sup>3</sup>的磺胺嘧啶对该酶活力没有影响。而青霉素钾和卡那霉素在测定的浓度范围内对该酶均没有明显的影响。而一定浓度的头孢拉定对该酶具有极为显著的激活作用(图1c),当其浓度为4.5mg/cm<sup>3</sup>时,激活作用达到最大,可以使酶的活力提高200%。但随着浓度的增加,激活作用减弱,当其浓度增加到30.0mg/cm<sup>3</sup>时,仅使酶活力提高25%。

## 2.2 喹诺酮类药物对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响

氟哌酸和恩诺沙星是属于喹诺酮类药物,常用于预防养殖锯缘青蟹免受微生物的侵袭。在本文,我们探讨了这两种药物对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响,在正常的测活体系中,加入不

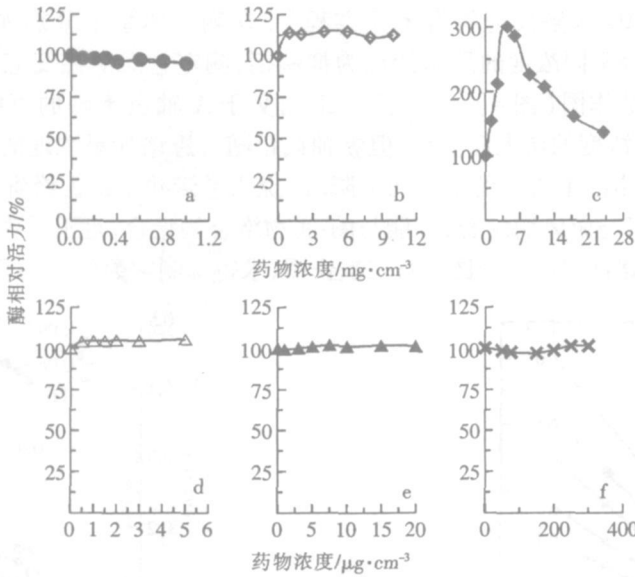


图1 抗生素类药物和磺胺类药物对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响

Fig.1 Effect of antibiotic and sulfadiazine on the activity of NAGase from mud crab (*Scylla serrata*)

a.链霉素, b.庆大霉素, c.头孢拉定, d.青霉素钾, e.卡那霉素, f.磺胺嘧啶

同浓度的氟哌酸或恩诺沙星, 测定它们对酶活力的影响, 以酶的相对活力对效应物浓度作图, 见图 2 结果表明, 氟哌酸和恩诺沙星对锯缘青蟹 NAGase 均有抑制作用, 随着抑制剂浓度的增大, 酶活力逐渐下降. 恩诺沙星对该酶的抑制作用明显强于氟哌酸, 当浓度为  $2.0 \text{ mg/cm}^3$  时, 它们分别可以使酶活力下降 72.5% 和 25.2%. 测定导致酶活力丧失一半的恩诺沙星浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.44 \text{ mg/cm}^3$ .

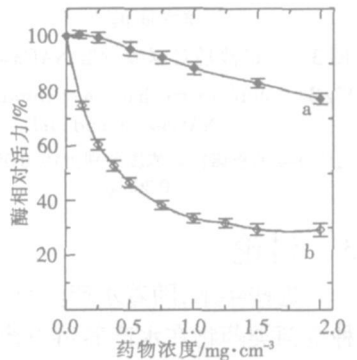


图2 氟哌酸(a)和恩诺沙星(b)对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响

Fig.2 Effect of norfloxacin(a) and enrofloxacin(b) on the NAGase activity of mud crab

### 2.3 锯缘青蟹 NAGase 在恩诺沙星溶液中的抑制作用

在固定底物 ( $pNP-NAG$ ) 浓度为  $0.4 \text{ nmol/dm}^3$ , 恩诺沙星浓度分别为:  $0, 0.05, 0.1, 0.2$  和  $0.3 \text{ mg/cm}^3$  的测活体系中, 加入不同量的锯缘青蟹 NAGase, 测定酶催化反应的初速度. 以反应当初速度对加入的酶量作图, 见图 3 结果表明, 酶经恩诺沙星作用后, 反应当初速度与加入的酶量间的关系图为一组通过原点的直线, 随着恩诺沙星浓度的增大, 直线的斜率降低. 这说明恩诺沙星对酶的抑制作用是可逆反应, 恩诺沙星是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低, 而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降, 因为后者将会产生一组横轴截距随抑制剂浓度增大而增大的平行线.

2.4 恩诺沙星对锯缘青蟹 NAGase 的抑制类型

考虑到恩诺沙星对该酶具有较强的抑制作用, 我们进一步探讨其抑制作用类型, 测定恩诺沙星对该酶促反应动力学参数的影响. 在含不同浓度底物 ( $pNP-NAG$ ) 的测活体系中, 固定加入的酶量 ( $0.3 \mu\text{g/cm}^3$ ), 测定酶促反应的初速度, 酶促反应初速度与底物浓度呈双曲线关系,

### 2.4 恩诺沙星对锯缘青蟹 NAGase 的抑制类型

考虑到恩诺沙星对该酶具有较强的抑制作用, 我们进一步探讨其抑制作用类型, 测定恩诺沙星对该酶促反应动力学参数的影响. 在含不同浓度底物 ( $pNP-NAG$ ) 的测活体系中, 固定加入的酶量 ( $0.3 \mu\text{g/cm}^3$ ), 测定酶促反应的初速度, 酶促反应初速度与底物浓度呈双曲线关系,

说明该酶催化 pNP-NAG 水解反应符合米氏方程<sup>[6]</sup>。在测活体系中分别加入 0.05、0.10、0.20 和 0.30 mg/cm<sup>3</sup> 等不同浓度的恩诺沙星为抑制剂,测定它对酶促反应初速度的影响,以 Lineweaver-Bulk 双倒数作图(图 4),结果为一组相交于 X 轴负半轴的直线,说明米氏常数(K<sub>m</sub>)不随着恩诺沙星浓度的增大而变化,但纵轴截距随着恩诺沙星浓度的增大而增大,最大反应速度(v<sub>m</sub>)随着恩诺沙星浓度的增大而下降。这说明恩诺沙星是锯缘青蟹 NAGase 的非竞争性抑制剂。它既可以与游离酶结合,也能与酶-底物络合物结合,且不受底物的影响。以得到的直线纵轴截距对恩诺沙星浓度作图进行二次作图,求得抑制常数(K<sub>i</sub>)为 0.35 mg/cm<sup>3</sup>。

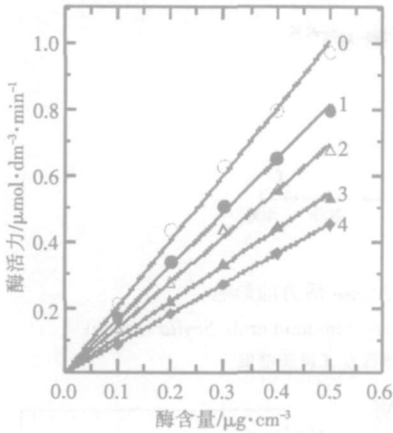


图3 恩诺沙星对锯缘青蟹 NAGase 抑制作用  
Fig.3 Inhibitory mechanism of enrofloxacin on the NAGase of mud crab

曲线 0-4 的恩诺沙星浓度分别为:0、0.05、0.10、0.20、0.30mg/cm<sup>3</sup>

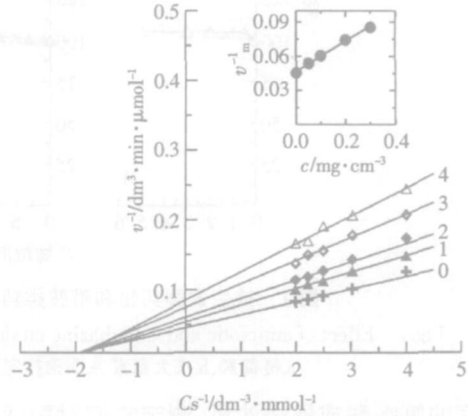


图4 恩诺沙星对锯缘青蟹 NAGase 抑制类型  
Fig.4 Inhibitory types of enrofloxacin on the NAGase of mud crab

曲线 0-4 的恩诺沙星浓度分别为:0、0.05、0.10、0.20、0.30mg/cm<sup>3</sup>

### 3 讨论

近些年来,随着水产养殖业的高度发展,各种水产动物疾病的发生率也越来越高,因此,多种抗菌类药物在水产养殖中普遍使用。在锯缘青蟹的养殖过程中也相应加入了一些抗菌类药物对各种疾病进行预防。因此,探讨这些抗菌类药物对锯缘青蟹 NAGase 酶活力的影响,对青蟹的养殖有一定的指导作用。本文参照水产药物的用法用量<sup>[12]</sup>,并在常用的药物浓度基础上增加了 3~10 倍,在离体条件下研究了部分常用抗菌类药物对锯缘青蟹 NAGase 的影响。研究表明,大多抗菌药物对该酶活力没有明显影响,头孢拉定对酶有明显的激活作用,而氟哌酸和恩诺沙星对该酶都有不同程度的抑制作用。文献[13]报道,喹诺酮类的母核为 4 喹诺酮,在其 1、3、6、7 等位引入不同基团即形成各种药物,可以抑制细菌 DNA 合成酶之一的旋转酶的活性,结果使细菌 DNA 的合成受干扰,使细胞不能进行分裂,从而达到杀菌作用。NAGase 酶活力可受氟哌酸和恩诺沙星的影响,2.0 mg/cm<sup>3</sup> 的恩诺沙星可以使酶活力被抑制 72.5%。由于 NAGase 与锯缘青蟹的周期性蜕皮有密切的关系<sup>[4]</sup>,因此,这类药物在生产中使用,会导致 NAGase 的活力受抑制,锯缘青蟹蜕皮受阻。低浓度的头孢拉定对锯缘青蟹 NAGase 有显著的激活作用(图 1c),在锯缘青蟹幼体的养殖中,对锯缘青蟹饲料加入少量头孢拉定,即可得到抑菌作用,也能提供 NAGase 活性,有利于几丁质类物质的消化和吸收。

## 参考文献:

- [1] 王君, 黄小红, 陈清西. 金属离子对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2005, 44 (6): 843~846
- [2] 韩宝芹, 余长纆, 刘万顺, 等. 几丁质酶研究现状及展望 [J]. 中国海洋药物, 2001, (5): 41~43
- [3] 杨承勇, 周世宁. 几丁质酶的研究及应用前景 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12 (1): 64~69
- [4] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia* [J]. *Comp Biochem Physiol* 1989, 94B (4): 691~695
- [5] 徐海圣, 舒妙安, 邵庆均, 等. 锯缘青蟹常见病害及其防治技术 [J]. 水产科学, 2000, 19 (5): 24~26
- [6] Zhang J P, Cheng Q X, Wang Q, *et al*. Purification and some properties of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*) [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2006 71 (Sup 1): 55~59
- [7] 林建成, 谢进金, 张继平, 等. 氨基酸对锯缘青蟹 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的效应 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2006 45 (2): 264~267
- [8] 杨学敏, 张继平, 谢进金, 等. 产物及其类似物对锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响 [J]. 台湾海峡, 2006 25 (2): 229~233
- [9] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, *et al*. Purification and some properties of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Mar Biol* 2004, 146: 143~148
- [10] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, *et al*. Kinetics of inhibition of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) by N-Bromosuccinimide [J]. *J Protein Chem*, 1996 15 (4): 345~350
- [11] 张继平, 陈清西. 锯缘青蟹 NAGase 在 DM SO 溶液中的失活动力学 [J]. 台湾海峡, 2006 25 (1): 19~24
- [12] 黄志斌, 胡红. 新编水产药物应用表解 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2004 3~26
- [13] 唐雪莲, 佟恒敏. 喹诺酮类药物研究进展及在兽医临床的应用问题 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001, (3): 24~26

## Effects of antibacterial medicaments on the activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase from mud crab (*Scylla serrata*)

YAN Ya-wen<sup>1</sup>, ZHANG Ji-ping<sup>1,2</sup>, WANG Q in<sup>1</sup>, XIE Jin-jin<sup>3</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering School of Life Sciences Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Foshan Science and Technology College, Foshan 528231, China;

3. Department of Biology, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

**Abstract** The effects of antibacterial medicaments on the activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) from mud crab (*Scylla serrata*) were studied. The results showed that streptomycin, kanamycin, benzylpenicillin, gentamicin and sulfadiazine affected lightly on the enzyme activity while cefradine activated the enzyme obviously and enhanced the enzyme activity by 200% in concentration of 4.5 mg/cm<sup>3</sup>. Norfloxacin and enrofloxacin inhibited the enzyme activity. Enrofloxacin particularly was a potential potent inhibitor and the inhibitor's concentration leading to 50% of enzyme activity lost (IC<sub>50</sub>) was estimated to be 0.44 mg/cm<sup>3</sup>. The inhibitory kinetics and mechanism of enrofloxacin on the enzyme were studied. It showed that enrofloxacin was a reversible non-competitive inhibitor of the enzyme with an inhibitory constant (K<sub>i</sub>) of 0.35 mg/cm<sup>3</sup>.

**Key words** *Scylla serrata*; N-acetyl-β-D-glucosaminidase; antibacterial medicaments; enzyme activity; inhibition

(责任编辑: 郭水伙)