

注射用胶原酶对磷脂酶 A₂ 活性抑制作用的体外实验研究

金星¹, 张红梅², 杨春生¹, 张景海²

(1. 沈阳市骨科医院, 辽宁 沈阳 110044 2. 沈阳药科大学制药工程学院)

【摘要】 目的: 研究注射用胶原酶对炎性物质磷脂酶 A₂ (PLA₂) 的水解作用和对其活性的抑制作用。方法: 制备不连续 SDS-PAGE 垂直平板凝胶, 将 3 种酶促反应体系的不同酶解时间的反应液样品, 进行电泳、固定、染色、脱色。同时在 PLA₂ 活性测定体系中, 加入定量的胶原酶溶液, 测定各反应体系的 PLA₂ 活性相当值。以不含胶原酶的 PLA₂ 活性测定体系为标准, 求出不同活性单位胶原酶体系的 PLA₂ 相对活性, 并依据实验所获得的数据, 绘制 Lineweaver Burk 图加以识别。通过对注射用胶原酶在 PLA₂ 水解卵磷脂过程中所起的作用, 确定注射用胶原酶对 PLA₂ 活性的抑制机制。结果: 注射用胶原酶对 PLA₂ 无水解作用, 但在体外对 PLA₂ 的活性有明显的抑制作用, 其抑制类型为竞争性抑制, 且抑制作用随胶原酶剂量的增加而增强。结论: 虽然注射用胶原酶在体外对炎性物质 PLA₂ 的活性有明显的抑制作用, 但根据酶促反应动力学的基本理论, “针抵患处、酶达底物”是构成化学溶解术这一微创技术的基本要素和应用该技术时必须遵守的基本原则。

【关键词】 胶原酶类; 磷脂酶 A₂; 酶抑制

Studies on mechanism of collagenase solution for inhibition on activity of phospholipase A₂ in vitro Jin Xing*, ZHANG Hong-mei, YANG Chun-sheng, ZHANG Jing-hai* Shenyang Orthopaedics Hospital, Shenyang 110044 Liaoning, China

ABSTRACT Objective To investigate the hydrolysis of collagenase for injection to inflammatory substance phospholipase A₂ (PLA₂) and the inhibition to activity. **Methods** Uncontinuous SDS-PAGE vertical slab gel were prepared. Reaction solution sample in different enzymolysis time of three kinds of enzymatic reaction system were electrophoresis, fixed, stained and decolorized. At the same time, quantitative collagenase solution were added in PLA₂ active measuring system and PLA₂ active value of each reactive system were measured. As PLA₂ active measuring system without containing collagenase standard to calculate PLA₂ relative activity in different active unit collagenase system and draw Lineweaver Burk diagram according to data from experiment. According to the action of collagenase for injection in the process of PLA₂ hydrolyzing lecithin to ascertain the inhibitive mechanism of collagenase for injection to the activity of PLA₂. **Results** Collagenase for injection had no hydrolysis to PLA₂, but the inhibition was obvious in vitro. The inhibitive type was competitive inhibition and the inhibition increase as the increscence of collagenase dose. **Conclusion** Although collagenase for injection has obvious inhibition to inflammatory substances phospholipase A₂'s activity in vitro. The basic theory of enzymatic reaction dynamics "needle to the site, enzyme to the substrate" constitutes the basic element of chemolysis of one kind of microtraumatic technique and the basic principle having to be obeyed as applying this technique.

Key words Collagenases; Phospholipases A₂; Enzyme repression

注射用胶原酶的化学名为胶原蛋白水解酶 (Collagenase) [EC3.4.24.3], 简称胶原酶, 临床用于治疗腰椎间盘突出症^[1]。由于它在人体生理 pH 值及正常体温下, 可对椎间盘组织成分—胶原蛋白进行特异性溶解, 使突出物体积减小或消失, 进而解除其对神经根的刺激和压迫, 而不损伤其他蛋白质和组织, 达到治疗或治愈的目的。就胶原酶的作用机制而

言, 在选择好适应证和控制好用药剂量的前提下, 注射方法以盘内或突出物内给药为佳。因为从理论来说, “针抵突出处, 溶解达底物”是化学溶解术这一技术构成的基本要素, 盘外给药的疗效理论上应该不理想, 但临床实践表明盘外注射也是一种有效的注射方式^[1]。在穿刺针未达突出处, 溶解酶未达底物的情况下, 是否还有其他因素参与其疗效? 其中一个

非常重要的事实是:在突出及疼痛椎间盘中,致炎物质磷脂酶 A₂ (Phospholipase A₂, PLA₂) [EC 3.1.1.4]的含量异常增高^[2,3], PLA₂具有强致炎性,并导致椎间盘突出症引起的疼痛加重^[4,6]。因此,本研究旨在探讨注射用胶原酶在体外与 PLA₂的关系。

1 材料与方 法

1.1 试剂 注射用胶原酶(批号 20030301上海乔源生物制药有限公司), PLA₂和胶原蛋白 I、II、III (Sigma), Tris (BB1), 丙烯酰胺 (BBI), 甲叉双丙烯酰胺 (Fika), 四甲基乙二胺 (Sigma), 月桂醇硫酸钠(上海生工), 卵磷脂 (Sigma), 其余均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器 MD100-1型电子天平(上海天平仪器厂), PHSJ-3F型酸度计(上海雷磁分析仪器厂), 电热恒温水浴箱(江苏金坛仪器厂), UV-9100紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), DYY型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂), DYY-II型 28A型垂直板电泳槽(北京六一仪器厂), 微量酸碱滴定管。

1.3 方 法

1.3.1 注射用胶原酶对 PLA₂的水解作用^[6,7](以下简称实验 1) PLA₂冻干蛋白粉用反应缓冲液(0.05 mol/L Tris, 0.01 mol/L CaCl₂, 0.2 mol/L NaCl, pH 7.5)配制成 1 mg/ml 溶液,用前配制。注射用胶原酶(1 200 U)用同样反应缓冲液配制成不同比活的溶液,用前配制。

100 μl (1 mg/ml) PLA₂溶液置 37℃水浴中预热 5 min, 分别加入相同体积不同浓度的胶原酶溶液,使反应体系胶原酶终浓度分别为 0.6、60、2 000 U/ml 混匀后置 37℃水浴保温。胶原酶终浓度为 0.6、600 U/ml 的反应体系,每间隔 10 min 取出反应液 20 μl 终止酶促反应于含有乙二胺四乙酸盐(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)和二硫苏糖醇的聚丙烯酰胺凝胶(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)上样缓冲液中,煮沸 5 min 后备用。两种酶促反应进行 60 min, 胶原酶终浓度为 2 000 U/ml 的反应体系,分别在 40、60、80、100 min 时,取出反应液 20 μl 终止酶促反应于含有 EDTA 和二硫苏糖醇的 SDS-PAGE 上样缓冲液中,煮沸 5 min 后备用。

参照文献方法^[8]制备不连续 SDS-PAGE 垂直平板凝胶,分离胶(10 cm × 10 cm): T = 15% 或 20%, C = 2.6%; 堆积胶(0.6 cm × 10 cm): T = 3.0%, C = 2.6% (T: Total content 总含量, C: Cross 混合物, T% 和 C% 是通常用来表示凝胶中丙烯酰胺组成的指标, T% 是指丙烯酰胺总的含量 W/V, C% 是指交联的丙烯酰胺,即双丙烯酰胺与丙烯酰胺单体的比值 W/W) 上述 3 种酶促反应体系的不同酶解时间的反应液样品,沸水浴 5 min 后,分别定量加至各自的不连续 SDS-PAGE 的样品孔,按文献方法^[9,10]进行电泳、固定、染色、脱色。SDS-PAGE 分离上述 3 种酶促反应体系样品的结果见图 1-3。

1.3.2 注射用胶原酶对 PLA₂活性的影响(以下简称实验 2) 按文献[9]配制 PLA₂酶促反应缓冲液,即 1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L CaCl₂, 0.01 mol/L 去氧胆酸钠各 10 ml 混匀,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 8.0 后,定容至 100 ml。

注射用胶原酶用 PLA₂酶促反应缓冲液制成不同比活的

溶液,用前配制。

卵磷脂 500 mg 加少许蒸馏水在 50℃水浴中保温 20 min, 超声处理使其呈悬浊液后,冷却至室温^[11]。加 1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L CaCl₂, 0.01 mol/L 去氧胆酸钠各 10 ml 混匀,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 8.0 后,定容至 100 ml 混匀即为 PLA₂底物溶液,当天配制。

PLA₂活性测定参照文献方法^[9]进行。5 ml PLA₂底物溶液及 300 μl 酶促反应缓冲液,37℃预热 5 min 后,加 100 μl PLA₂(用酶促反应缓冲液配制),混匀后置 37℃水浴中反应 15 min,加 20 μl EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)终止反应。加入 5 滴甲酚红-百里酚蓝(甲酚红 25 mg 百里酚蓝 150 mg 溶于 100 ml 蒸馏水)作为指示剂,用 0.01 mol/L KOH 标准溶液进行滴定。空白对照除在加 PLA₂溶液前先加 20 μl EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)以灭活 PLA₂外,其他同上操作。样品活性测定体系所消耗 KOH 标准溶液量减去空白对照的即为该样品 PLA₂活性相当值。

在上述 PLA₂活性测定体系中,加入 300 μl 胶原酶溶液,以使每个体系中分别含胶原酶活性单位为 2.4、7.2、21.6、64.8、194.4 同上测定各体系的 PLA₂活性相当值。以不含胶原酶的 PLA₂活性测定体系为标准,求出不同活性单位胶原酶体系的 PLA₂相对活性,分别为:50%、34.2%、13.2%、7.9%、2.6%。

1.3.3 注射用胶原酶对 PLA₂活性抑制的类型(以下简称实验 3) PLA₂底物溶液的量逐渐增加,并用 PLA₂酶促反应缓冲液使得总体积为 5 ml 从而建立由低到高 5 种卵磷脂浓度的酶促反应体系,以考察底物浓度对 PLA₂活性的影响。上述 5 种底物浓度的反应体系在 37℃预热 5 min 后,分别加入 10 μl (52.6 U) PLA₂溶液,混匀后 37℃水浴反应 15 min,加 20 μl EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)终止反应。加入 5 滴甲酚红-百里酚蓝(甲酚红 25 mg 百里酚蓝 150 mg 溶于 100 ml 蒸馏水)作为指示剂,用 0.01 mol/L KOH 标准溶液进行滴定。空白对照组除在加 PLA₂溶液前先加 20 μl EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)以灭活 PLA₂外,其他同上操作。样品反应体系所消耗 KOH 标准溶液量减去空白对照的即为该样品 PLA₂活性相当值。即:底物浓度(mg/ml) / 消耗标准 KOH 容积(ml) 的对应值分别为 0/0、0.20/0.13、0.50/0.27、1.00/0.35、1.50/0.45、2.00/0.50。

在上述 5 种卵磷脂浓度的酶促反应体系中,每个反应体系先加入 10 μl (52.6 U) 胶原酶溶液,再加入 PLA₂溶液测定其活性相当值。当底物浓度(mg/ml)为 0、0.20、0.50、1.00、1.50、2.00 时,其消耗标准 KOH 容积(ml)分别为 0、0.04、0.10、0.16、0.20、0.29。

依据实验 2 和实验 3 所获得的数据,用 Lineweaver-Burk 双倒数法 $\{1/v = (K_m/V_{max}) (1/[S]) + (1/V_{max}); y = ax + b\}$ 分别作图(见图 4)。

2 结 果

由实验 1 的电泳图 1-3 结果可见,不论胶原酶的比活是 0.6、600 U/ml 还是 2 000 U/ml 与不同酶促反应时间的样品间相比, PLA₂的质量均未发生变化,而且当胶原酶的比活达到 2 000 U/ml 时,对 PLA₂作用的结果也与 600 U/ml 的一样,因此,在本实验的条件下,注射用胶原酶对 PLA₂无水解作用。

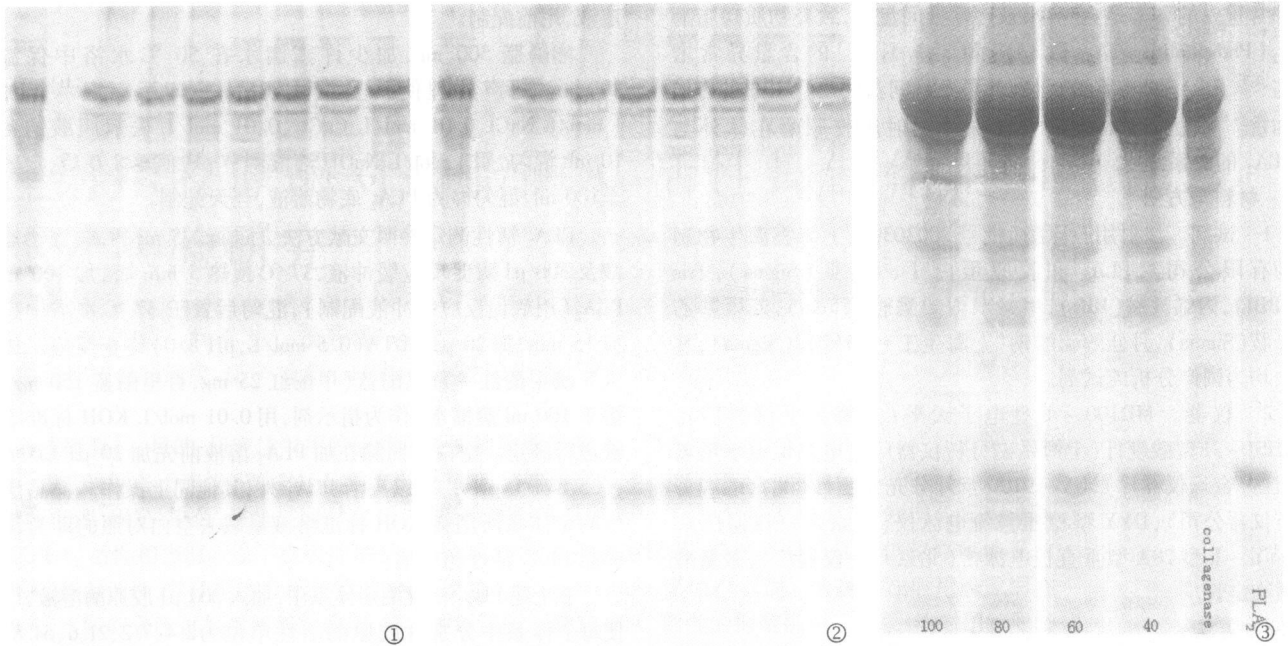


图 1 0.6 U/ml 胶原酶水解 PLA₂ 在 20% SDS-PAGE 上的电泳分离结果 A: 胶原酶电泳带; B: PLA₂ 电泳带; C: 反应 10 min 时产物电泳带; D: 反应 20 min 时产物电泳带; E: 反应 30 min 时产物电泳带; F: 反应 40 min 时产物电泳带; G: 反应 50 min 时产物电泳带; H: 反应 60 min 时产物电泳带; I: 反应 70 min 时产物电泳带 **图 2** 600 U/ml 胶原酶水解 PLA₂ 在 20% SDS-PAGE 上的电泳分离结果 A: 胶原酶电泳带; B: PLA₂ 电泳带; C: 反应 0 min 时产物电泳带; D: 反应 10 min 时产物电泳带; E: 反应 20 min 时产物电泳带; F: 反应 30 min 时产物电泳带; G: 反应 40 min 时产物电泳带; H: 反应 50 min 时产物电泳带; I: 反应 60 min 时产物电泳带 **图 3** 2 000 U/ml 胶原酶水解 PLA₂ 在 20% SDS-PAGE 上的电泳分离结果 A: 反应 100 min 时产物电泳带; B: 反应 80 min 时产物电泳带; C: 反应 60 min 时产物电泳带; D: 反应 40 min 时产物电泳带; E: 胶原酶电泳带; F: PLA₂ 电泳带

Fig 1 Result of 0.6 U/ml collagenase hydrolysis phospholipase A₂, which were separated on 20% SDS-PAGE (T 20%; C 2.6%) Lane A: The sample of collagenase; Lane B: The sample of PLA₂; Lane C: The product of 10 min; Lane D: The product of 20 min; Lane E: The product of 30 min; Lane F: The product of 40 min; Lane G: The product of 50 min; Lane H: The product of 60 min; Lane I: The product of 70 min **Fig 2** Result of 600 U/ml collagenase hydrolysis phospholipase A₂, which were separated on 20% SDS-PAGE (T 20%; C 2.6%) Lane A: The sample of collagenase; Lane B: The sample of PLA₂; Lane C: The product of 0 min; Lane D: The product of 10 min; Lane E: The product of 20 min; Lane F: The product of 30 min; Lane G: The product of 40 min; Lane H: The product of 50 min; Lane I: The product of 60 min **Fig 3** Result of 2 000 U/ml collagenase hydrolysis phospholipase A₂, which were separated on 20% SDS-PAGE (T 20%; C 2.6%) Lane A: The product of 100 min; Lane B: The product of 80 min; Lane C: The product of 60 min; Lane D: The product of 40 min; Lane E: The sample of collagenase; Lane F: The sample of PLA₂

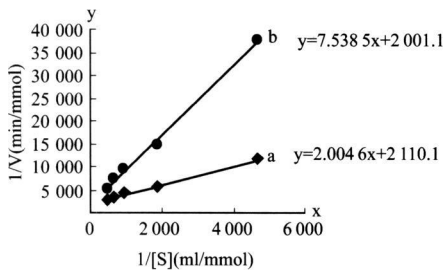


图 4 胶原酶对 PLA₂ 活性抑制作用曲线图
● 存在胶原酶 ◆ 不存在胶原酶

Fig 4 The inhibitory curve of collagenase solution to PLA₂
● With collagenase ◆ Without collagenase

由实验 2 结果可见, 注射用胶原酶对 PLA₂ 无水解作用, 但对 PLA₂ 的活性具有抑制作用。在胶原酶活性单位为 2.4 U 的反应体系中, PLA₂ 的相对活性为 50%, 而在胶原酶活性单位为 194.4 U 的反应体系中, PLA₂ 的相对活性仅为 2.6%, 说明注射用胶原酶对 PLA₂ 抑制程度是随注射用胶原

酶剂量的增加而增强的。

由图 4a 的回归方程计算得知: 在本实验条件下, 卵磷脂作为 PLA₂ 底物的 K_m 为 0.95 mmol/m。由图 4b 的回归方程计算得知: 在本实验条件下, 卵磷脂作为 PLA₂ 的底物, 当反应体系存在 PLA₂ 抑制剂—注射用胶原酶时, 其反应体系的表观 K_m 为 3.76 mmol/m。由于 PLA₂ 反应体系存在抑制剂与否的 V_{max} 基本未改变, 而 K_m 变大, 符合酶竞争性抑制作用特性。因此, 在本实验条件下, 注射用胶原酶对 PLA₂ 表现出竞争性抑制作用。

3 讨论

在突出的椎间盘组织中, PLA₂ 呈异常性升高可能是腰椎间盘突出症疼痛的重要病因, 而且椎间盘突出症患者标本中的 PLA₂ 具有致炎的特性^[4]。临床使用胶原酶注射治疗腰椎间盘突出症的给药方式之一有盘外注射法, 这种给药方式也是将酶制剂注射到突出物的周围或突出物的表面, 依靠酶液的扩散和渗透并通过注射后控制患者体位, 以使胶原酶溶液能够充分被引流到椎间盘突出部分而发挥作用。但在组

织间的这种引流,尤其是穿刺途径和注射方法不规范等,势必影响胶原酶与椎间盘突出部位胶原的接触,从而影响其对胶原的水解。此外,临床使用胶原酶后,尽管椎间盘突出物未有明显改善或缩小,但仍表现出较好的疗效,尤其是对腰痛和坐骨神经痛^[12]。因此,一定会有其他因素参与其疗效,否则无法解释盘外注射所取得的疗效。其中一个非常重要的事实是腰椎间盘突出症及其病情发展与 PLA₂ 活性及其升高密切相关。因此,有必要了解注射用胶原酶与 PLA₂ 活性的关系。最初认为注射用胶原酶可能水解 PLA₂ 使其失活,但实验结果表明,剂量从 0.6 U/ml 到 2 000 U/ml 的范围内,均未发现注射用胶原酶对 PLA₂ 具有水解作用。进一步研究表明,注射用胶原酶在体外对 PLA₂ 的活性具有明显的抑制作用,且抑制程度随胶原酶剂量的增加而增强,表现为竞争性抑制作用。本研究首次探讨注射用胶原酶对 PLA₂ 活性的这种影响,从一个侧面解释为什么在突出物周围或突出物表面注射胶原酶,在突出物体积未见有明显减小或消失情况下,也能表现出较好疗效的原因。

胶原酶化学溶解术治疗腰椎间盘突出症,是利用酶对底物的特异性和专一性水解作用,来达到其治疗的目的。根据酶促反应动力学的基本理论,只有当酶和底物形成酶-底物络合物,且底物浓度足以使酶饱和、同时在反应体系中没有抑制剂等干扰因素存在时,酶促反应才能发生并且得以进行。所以,“针抵患处、酶达底物”是构成化学溶解术这一微创技术的基本要素。虽然使用盘外注射法在突出物周围和突出物表面注射有较好的疗效,但盘外注射法的临床疗效与影像学所表现的突出物缩小率不成正比^[12]。所以,在使用该技术时应严格掌握适应证,在影像设备的监视下选择安全规范的穿刺途径和注射方法,正确合理地使用酶制剂,是使用该技术时应该遵守的基本原则。

由注射用胶原酶 3 种浓度的 SDS-PAGE 图谱可见,对

PLA₂ 的活性产生抑制作用的基团,其主要成分除胶原酶外,还有其他一些未确定成份。因此,注射用胶原酶对 PLA₂ 产生竞争性抑制作用的活性基团尚有待进一步研究。

参考文献

- 1 胡有谷. 腰椎间盘突出症. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 505-512
- 2 王芳, 黄淦堂, 沈姗安, 等. 腰椎组织胶原酶活性测定及临床意义. 临床骨科杂志, 1998, 10(2): 92-93.
- 3 彭金途, 贾连顺. 腰椎间盘突出与磷脂酶 A₂. 中国脊柱脊髓杂志, 1999, 9(1): 47-48
- 4 贺石生, 侯铁胜. 磷脂酶 A₂ 在腰椎间盘突出相关坐骨神经痛发病中的作用. 现代康复, 2000, 4(6): 860-861.
- 5 杨维琦, 李世和. 磷脂酶 A₂ 活性异常升高可能是腰椎间盘突出疼痛重要病因. 颈腰痛杂志, 2000, 21(3): 192-194
- 6 Philips AL, Means W J, Kalchayanand N, et al. Bovine placental protease specificity toward muscle connective tissue proteins. J Anim Sci 2000, 78(7): 1861-1866.
- 7 Fields GB, Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. Sequence specificity of human skin fibroblast collagenase. J Biol Chem, 1987, 262(13): 6221
- 8 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning. 北京: 科学出版社, 1995. 325-327.
- 9 佟晓旭, 赵京山, 刘静芳, 等. 蛇毒磷脂酶 A₂ 的两种测定方法比较. 河北医科大学学报, 1999, 20(6): 372
- 10 Marki E, Franson R. Endogenous suppression of neutral active and calcium-dependent phospholipase A₂ in human polymorphonuclear leukocytes. Biochim Biophys Acta 1986, 879(2): 149-156
- 11 李伟国, 卢振伟, 赵大庆. 稀土及其配合物对蛇毒磷脂酶 A₂ 活性的影响. 化学研究, 2002, 3(1): 1-4.
- 12 许国增, 崔伟锋, 乔忆莲, 等. 胶原酶化学溶解术两种注射方法的临床对比研究. 颈腰痛杂志, 2004, 25(2): 94-96

(收稿日期: 2006-01-12 本文编辑: 王宏)

第二届国际创伤骨科高峰论坛通知

由中华创伤骨科杂志社、中华医学会骨科学分会创伤骨科学组、香港骨科医学会和中华骨科交流学会(台湾)联合主办, 南方医科大学南方医院承办的“第二届国际创伤骨科高峰论坛”定于 2007年 3月 23~26日在广州白云国际会议中心召开。

本届论坛的主题为: 中青年骨科医生论坛, 旨在为骨科中青年医生提供一个独立展示其学术水平、青春才俊的学术舞台和良好机会。论坛由国内外知名专家组成专家评讲团, 对每个主题进行精彩点评, 其权威性、导向性及其独特的组织形式为本届论坛的一大亮点。本届论坛将特别强调学术互动、注重讨论的重要性, 届时讲、讨比例为 1: 1, 以提高学术交流的效果。出席本届论坛的将有来自美国、法国、德国、东南亚各国及国内著名的骨科专家与学者。多国学者的共同参与、不同观点的学术碰撞, 将使论坛具有浓厚的国际氛围。

征文内容: ①创伤骨科基础研究, ②计算机辅助骨科技术, ③微创骨科技术, ④创伤骨科新技术, ⑤关节外科新技术, ⑥运动创伤新技术, ⑦脊柱、脊髓损伤治疗新技术。

投稿及注册报名

电子邮件投稿: chinj@ yahoo.com.cn 信函投稿(附软盘): 广州市广州大道北 1838号 南方医科大学南方医院《中华创伤骨科杂志》编辑部 聂兰英 邮编: 510515 网络投稿: 登录 www.isfort.org 投稿, 同时可详细了解论坛的相关信息, 并可进行参会注册等。投稿截止日期: 2006年 12月 31日 联系电话: 020-61641748 61360066(Fax)