

胶原酶与不同药物相配伍对其酶活性影响的研究

金星, 杨春生, 章凤兰, 刘, 毛碧峰

(沈阳市骨科医院, 辽宁 沈阳 110044)

【摘要】 目的: 观察注射用胶原酶与不同药物相配伍后酶活性变化的情况, 探讨胶原酶与不同药物配伍对酶活性的影响。方法: 将注射用胶原酶制剂与 12种药物分别配伍后, 将样品管、底物对照管和酶对照管各加入无水乙醇 0.5 ml 终止酶反应, 冷却过滤。取滤液稀释后置于 TU-1800 紫外可见分光光度计, 将样品管的吸收度减去底物对照管和酶对照管的吸收度, 再从标准曲线上查得亮氨酸的 μg 数, 以胶原酶在 37℃、pH7.5 条件下作用于胶原蛋白, 每小时从胶原蛋白中释放的多肽相当于茚三酮显色 1 μmol 亮氨酸量为一个活性单位来计算注射用胶原酶制剂的活性。结果: 12种药物对注射用胶原酶的活性均有不同程度的影响, 轻者导致胶原酶的活性下降, 重者导致胶原酶的活性丧失。结论: 胶原酶的化学本质是蛋白质, 任何能改变蛋白质性质的条件, 都会使酶的活性下降或失活。忽视胶原酶的化学本质而随意配伍的不规范做法, 有悖于酶促反应动力学的基本原理, 在临床工作中不应提倡。

【关键词】 胶原酶类; 配伍; 酶活性; 椎间盘化学松解术

Research on activity effect of collagenase's compatibility with different drugs JIN Xing YANG Chun-sheng, ZHANG Feng-lan, LIU Yang MAO Bi-feng. Shenyang Orthopaedic Hospital, Shenyang 110044 Liaoning, China

ABSTRACT Objective To observe the change of the activity of collagenase's compatibility with different drugs. **Methods** The collagenase was mixed with twelve kinds of drugs. Adding anhydrous alcohol 0.5 ml to the sample tube, the substrate control tube and the enzyme control tube respectively to stop enzyme reaction, cooling and filtering. Putting filtered solution which was diluted into TU-1800PC type ultraviolet photometer, subtracting the absorption ratio of the substrate control tube and the absorption ratio of the enzyme control tube from that of the example tube, checking leucine's μg value from the standard curve. On the condition of 37℃ pH7.5, collagenase effected on collagen. Released peptide from collagen per hour was equivalent to 1 μmol leucine quantity from ninhydrin color reaction as one unit to calculate collagenase solution preparation's activity. **Results** Twelve kinds of drugs had different degree effect on the collagenase's activity. It could cause collagenase's activity to decline in slight condition and loss in severe condition. **Conclusion** Collagenase is protein in chemical nature. Any conditions which change protein's character can lead to enzyme's activity declined or lost. This kind of un-standard way which ignore enzyme's chemical nature and compatibility will violate enzymatic reaction dynamic's basic theory, shouldn't be advocated in clinical practice.

Key words Collagenases; Compatibility; Enzyme activity; Intervertebral disc chemo lysis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(2): 108-109 www.zggsszz.com

近年来, 在应用胶原酶 (Collagenase) 化学松解术治疗腰椎间盘突出症的临床工作中, 屡有将不同药物与注射用胶原酶制剂联合或混合应用的报道^[1-3]。为了研究不同药物与胶原酶配伍后对其酶活性的影响, 使用文献报道^[1-3]中经常与其相配伍的 12种药物在体外与注射用胶原酶制剂配伍后, 依照中华人民共和国卫生部 [WS-240(X-207)-96(1)] 部颁标准对其酶活性进行了测定, 现将有关结果报告如下。

1 材料与与方法

1.1 酶制剂 注射用胶原酶每支 600 U (辽宁味邦生物制药有限公司, 批号: 031102); 注射用胶原酶每支 1 200 U (上海乔源生物制药有限公司, 批号: 20020528)。

1.2 配伍药物 与注射用胶原酶制剂相配伍的 12种药物由沈阳市食品和药品监督管理局提供。其中, 盐酸曲马多注射

液每支 2 ml/100 mg (德国格兰泰, 批号: 404H); 枸橼酸芬太尼注射液每支 2 ml/0.1 mg (宜昌人福药业, 批号: 040902); 盐酸布比卡因注射液每支 5 ml/37.5 mg (上海禾丰药业, 批号: 4H 03040); 盐酸罗哌卡因注射液每支 10 ml/10 mg (瑞典阿斯利康制药, 批号: 021004); 盐酸利多卡因注射液每支 20 ml/400 mg (上海旭东海普药业, 批号: 031102); 盐酸普鲁卡因注射液每支 2 ml/40 mg (上海旭东海普药业, 批号: 030601); 碳酸利多卡因注射液每支 5 ml/86.5 mg (江苏济川制药, 批号: 030402); 盐酸吗啡注射液每支 1 ml/10 mg (沈阳第一制药厂, 批号: 030608); 地塞米松磷酸钠注射液每支 1 ml/5 mg (河南开封先锋制药厂, 批号: 0306212); 维生素 B₁ 注射液每支 2 ml/100 mg (天津金耀氨基酸, 批号: 0309021); 维生素 B₁₂ 注射液 1 ml/0.5 mg (天津金耀氨基酸, 批号: 0311211);

醋酸曲安奈德注射液每支 5 ml/50 mg(上海通用药业, 批号: 030409)。

1.3 仪器 本研究使用的仪器为 TU-1800pc紫外可见分光光度计(国家药品审评委员会指定产品、北京普析通用仪器有限责任公司生产)。

1.4 注射用胶原酶活性的测试 注射用胶原酶制剂以 0.9% 氯化钠溶液 2 ml 溶解, 将上述 12 种药物在室温下与注射用胶原酶制剂分别混合(共 12 支测试品)静置 0.5 h, 依照部颁标准 [WS-240(X-207)-96(1)] 测定其酶活性。

1.4.1 对照品溶液的制备 精密称取试剂级亮氨酸适量, 用双蒸馏水配制成每毫升中含 50 μg 的溶液(临用前制备)。

1.4.2 测试品溶液的制备 将测试品用曲瑞斯缓冲液(pH 7.5)稀释成每毫升含 1~7 U 的溶液(临用前制备)。

1.4.3 标准曲线的制备 取大小相同的试管 7 支, 按顺序精密加入亮氨酸对照品溶液 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ml 后分别用双蒸馏水稀释至 1 ml, 再于各试管中依次加入枸橼酸缓冲液(pH 5.0) 1 ml 和氰化钾-茛三酮试液 1 ml, 置沸水浴中保温 15 min 后于冷水中冷却 10 min, 然后在各管中加入 60% 乙醇 3 ml 摇匀, 以 0 管为空白, 依照分光光度法(中国药典 1995 年版二部附录 IV) 在 570 nm 波长处分别测定吸收度, 以亮氨酸浓度为横坐标, 吸收度为纵坐标绘制标准曲线。

1.4.4 测定 样品管: 将 12 支测试品管各加入胶原蛋白 20 mg 与曲瑞斯缓冲液(pH 7.5) 1 ml; 底物对照管: 取具塞试管 12 支各加入胶原蛋白 20 mg 与曲瑞斯缓冲液(pH 7.5) 1 ml; 酶对照管: 取具塞试管 12 支各加入曲瑞斯缓冲液(pH 7.5) 1 ml; 样品管、底物对照管和酶对照管均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 5 min, 底物对照管、酶对照管分别加入测试液 0.5 ml 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温并振荡(60 次/min)准确 1 h, 样品管、底物对照管和酶对照管各加入无水乙醇 0.5 ml 终止酶反应, 冷却至室温后分别滤过, 各取滤液 0.5 ml 加双蒸馏水至 2.5 ml 摇匀, 分别取出 1 ml 置于 TU-1800pc 紫外可见分光光度计, 将样品管的吸收度减去底物对照管和酶对照管的吸收度, 再从标准曲线上查得亮氨酸的 μg 数, 按下式计算可得: 注射用胶原酶活性单位(U) = 亮氨酸 μg 数 $\times 4 \times 5 \times$ 稀释倍数 / 131.2。式中“4”为反应终止后过滤液取原液 1/4, “5”为滤液稀释 5 倍, “131.2”为亮氨酸分子量。

1.4.5 注射用胶原酶活性单位的定义 胶原酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5 条件下作用于胶原蛋白, 以每小时从胶原蛋白中释放的多肽相当于茛三酮显色 1 μmol 亮氨酸量为 1 个活性单位。

2 结果

测试结果表明, 12 种药物对胶原酶的活性均有不同程度的影响, 轻者导致酶的活性下降, 重者导致酶完全失活。具体结果如下:

胶原酶 1(每支 600 U, 辽宁味邦生物制药, 批号: 031102 标示值 600 U, 实测值 690 U, 以下同) + 盐酸罗哌卡因, 配伍后酶效价 606 U, 效价下降率 12.20%; 胶原酶 1 + 盐酸曲马多, 配伍后酶效价 570 U, 效价下降率 17.40%; 胶原酶 1 + 枸橼酸芬太尼, 配伍后酶效价 566 U, 效价下降率 18.00%; 胶原

酶 1 + 盐酸布比卡因, 配伍后酶效价 526 U, 效价下降率 23.80%; 胶原酶 1 + 盐酸普鲁卡因, 配伍后酶效价 299 U, 效价下降率 56.70%; 胶原酶 1 + 盐酸利多卡因, 配伍后酶效价 0 效价下降率 100%。

胶原酶 2(每支 1 200 U, 上海乔源生物制药, 批号: 20020528 标示值 1 200 U 实测值 1 175 U, 以下同) + 碳酸利多卡因, 配伍后酶效价 825 U, 效价下降率 29.80%; 胶原酶 2 + 盐酸吗啡, 配伍后酶效价 745 U, 效价下降率 36.60%; 胶原酶 2 + 醋酸曲安奈德, 配伍后酶效价 686 U, 效价下降率 41.60%; 胶原酶 2 + 维生素 B₁₂, 配伍后酶效价 595 U, 效价下降率 49.40%; 胶原酶 2 + 地塞米松磷酸钠, 配伍后酶效价 295 U, 效价下降率 58.00%; 胶原酶 2 + 维生素 B₁, 配伍后酶效价 0 效价下降率 100%。

3 讨论

近年来, 胶原酶化学溶解术治疗腰椎间盘突出症技术普及, 但是由于受专业思维和自身技术条件所限, 在穿刺注射胶原酶时多采用硬膜外途径。由于针不抵患处、酶未达底物, 导致相当一部分经硬膜外途径单纯注射胶原酶的病例疗效不佳^[4], 故联(混)合用药的做法应运而生, 目的是弥补穿刺的不到位、以及利用激素类和麻醉类药物的作用以期取得一定的临床疗效。但是, 这种联(混)合用药的做法首先是忽视了不同药物的 pH 值对酶活性的影响。

每种酶都有其最适 pH 值。经测定, 国产注射用胶原酶制剂的最适 pH 值为 6.8~7.5, 在此范围内酶的活性最高。如维生素 B₁ 针剂, 该药的 pH 值为 2.5~4.0 注射用胶原酶与其配伍后, 酶活性完全丧失。再者, 蛋白质(酶)的活性取决于其构象是否完整。因此, 在其分子表面必须有一单层必需水来维持它的活性构象。目前临床上经常使用的混悬型糖类皮质激素中(如醋酸曲安奈德、醋酸曲安缩松等), 都含有做为赋形剂而加入的有机溶剂聚乙二醇。胶原酶与混悬型糖类皮质激素相配伍后酶活性的降低, 是因为聚乙二醇等与水混溶的有机溶剂夺取了胶原酶分子表面的必需水, 从而导致酶活性下降。盐溶作用对酶活性的影响也不容忽视。SO₄²⁻、Cl⁻、Br⁻、NO₃⁻、ClO₄⁻、SCN⁻ 等能结合于蛋白质的带电基团或结合于肽键的偶极子, 其结果是降低了蛋白质周围的水簇数目, 从而破坏了蛋白质构象的稳定性, 这种作用将直接导致酶蛋白发生盐溶。如盐酸利多卡因, 胶原酶与其相配伍后, 酶活性丧失殆尽。

参考文献

- 史达, 蒋宜伟, 李振宇. 腰椎间盘突出症胶原酶溶解术治疗综合报告. 颈腰痛杂志, 2003, 24(2): 113-114
- 关长林, 颜端国, 张新明, 等. 利用数字减影机行骶管硬膜外胶原酶注射的观察. 颈腰痛杂志, 2003, 24(1): 24-25
- 涂立刚, 吴成富, 李灵芝. 经骰裂孔硬膜囊前间隙置管注射胶原酶治疗腰椎间盘突出症 300 例临床观察. 中华医学杂志, 2003, 27(4): 201.
- 金星, 孟宪忠. 腰椎间盘突出症化学溶解术应用中的一些问题. 中国脊柱脊髓杂志, 2000, 10(6): 360-361

(收稿日期: 2006-03-14 本文编辑: 连智华)