

用联合有效的药物治疗正在成为一种可能<sup>[14]</sup>。在 SCI 的治疗中, 神经系统功能的恢复是关注的热点。本研究结果表明 Annexin A2 可促进脊髓损伤后的功能恢复, 与其他具有脊髓保护作用的药物相比, 可能在 SCI 后期的康复治疗中, 起到一定的促进作用, 帮助运动功能的恢复。这可能与小鼠脊髓损伤后, 后肢运动功能有部分恢复的病理生理基础有关。该药改善 SCI 小鼠脊髓运动功能的机制尚需进一步探索。

致谢: 感谢浙江大学研究生导师戴海斌及博士生李汶路等对此次研究的实验设计及论文写作等方面的诸多指导。

## REFERENCES

- [1] THURET S, MOON L D, GAGE F H. Therapeutic interventions after spinal cord injury [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(11): 628-643.
- [2] CROZIER K S, CHENG L L, GRAZIANI V, et al. Spinal cord injury: prognosis for ambulation based on quadriceps recovery [J]. *Paraplegia*, 1992, 30(11): 762-767.
- [3] WATERS R L, ADKINS R H, YAKURA J S. Definition of complete spinal cord injury [J]. *Paraplegia*, 1991, 29(9): 573-581.
- [4] DENG F J, YANG Y B, XU J P. Advances in research on pharmacological strategies for spinal cord injury [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2009, 25(2): 147-150.
- [5] LUO M, HAIJAR K A. Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2013, 39(4): 338-346.
- [6] 陆秋涯, 黄立东, 陆佩华. Annexin A2 的结构和功能及其与疾病的关系[J]. *医学分子生物学杂志*, 2008, 5(2): 174-176.
- [7] YIN W H, LEI Y, MA G D, et al. Control study between behavioral and pathological findings of the transected spinal cord model in rats [J]. *Chin J Tiss Eng Res*, 2014, 18(36): 5847-5854.
- [8] KNOP M, AARESKJOLD E, BODE G, et al. Rab3D and Annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells [J]. *EMBO J*, 2004, 23(15): 2982-2992.
- [9] YAN H B, JIN D D, LU K W, et al. Establishment of stable rat models of complete spinal cord transection [J]. *J Clin Rehabil Tiss Eng Res*(中国组织工程研究与临床康复), 2007, 11(6): 1091-1094.
- [10] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weightdrop device versus transection [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(6): 244-256.
- [11] DONOVAN W H. Spinal cord injury-past, present and future [J]. *Spinal Cord Med*, 2007, 30(2): 85-100.
- [12] DUCKER T B, HAMIT H F. Experimental treatments of acute spinal cord injury [J]. *Neurosurg*, 1969, 30(6): 693-697.
- [13] SILVA N A, SOUSE N, REIS R L, et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury [J]. *Prog Neurobiol*, 2014(114): 25-57.
- [14] COX A, VARMA A, BANIK N. Recent advances in the pharmacologic treatment of spinal cord injury [J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(2): 473-482.

收稿日期: 2015-03-12

## 腺苷脱氨酶抑制剂快速筛选模型的建立

董佩杰<sup>1</sup>, 张新国<sup>1\*</sup>, 刘英娟<sup>1</sup>, 唐鹏<sup>1</sup>, 苏媛<sup>2</sup>, 苏岷山<sup>1</sup>, 韩锡萍<sup>1</sup>, 邵男<sup>1</sup>(1.兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃省中藏药筛选与深加工重点实验室, 兰州 730050; 2.青海省西宁市药检所, 西宁 810000)

**摘要:** 目的 建立腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)抑制剂的快速筛选模型。方法 采用 ADA 酶, 以腺苷为底物, 2'-脱氧助间型霉素作为抑制剂验证反应体系, 通过紫外分光光度法检测, 优化反应条件, 并对 248 种中药提取物及其内生菌发酵产物进行筛选。结果 建立了最佳模型方案为: pH 7.5 的 PBS 缓冲液体系, 底物浓度为腺苷 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ADA 酶浓度 55  $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 连续检测腺苷在 265 nm 下 OD 值动态变化情况。此模型可以用于 ADA 酶抑制剂的快速筛选, 且基于此模型共筛选获得 23 个有一定活性的粗提物。结论 本实验建立的体系可以为 ADA 酶抑制剂的筛选提供简单可行、稳定、可靠的研究平台。

**关键词:** 腺苷脱氨酶; 抑制剂; 筛选模型

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)11-1301-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.004

基金项目: 国家自然科学基金(31360379); 国家级大学生创新创业训练计划支持(091073117)

作者简介: 董佩杰, 男 Tel: 13619310464 E-mail: 435277150@qq.com \*通信作者: 张新国, 男, 博士, 副教授, 硕士 Tel: (0931)2976703 E-mail: biodrug@163.com

## Rapid Drug Model for Screening Adenosine Deaminase Inhibitor

DONG Peijie<sup>1</sup>, ZHANG Xinguo<sup>1\*</sup>, LIU Yingjuan<sup>1</sup>, TANG Peng<sup>1</sup>, SU Yuan<sup>2</sup>, SU Minshan<sup>1</sup>, HAN Xiping<sup>1</sup>, SHAO Nan<sup>1</sup>(1.School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Key Laboratory of Screening and Deep Processing in New Tibetan Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050, China; 2.Xining Institute for Drug Control, Qinghai 810000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a rapid screening model for adenosine deaminase(ADA) inhibitor. **METHODS** Using the bovine spleen ADA as enzyme, adenosine as substrate, pentostatin as an inhibitor of the reaction system verification, an ultraviolet spectrophotometry method was used to screen for adenosine deaminase inhibitor after optimize its reaction conditions. **RESULTS** The best model scheme for pH was 7.5, phosphate buffer solution(PBS) was buffer system, the concentration of the substrate concentration of adenosine was at 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and the concentration of ADA enzymes was at 55  $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The model could be used for rapid screening of ADA enzyme inhibitors and 23 activities were obtained from 248 kinds of Chinese herb extracts and fermentation products endophytes screening by the present model. **CONCLUSION** The present method is simple, stable and reliable for screening ADA inhibitor.

**KEY WORDS:** adenosine deaminase; inhibitor; screening model

腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)抑制剂不仅可以调节 T-或 B-细胞的恶性肿瘤免疫应答反应, 增强某些化疗剂的抗肿瘤活性, 而且对潜在的腺苷类药物的应用也有非常重要的作用。由美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准的 2'-脱氧助间型霉素(pentostatin, 2'-dCF)为代表的 ADA 抑制剂的研究正在被研究人员所越来越关注<sup>[1-2]</sup>。

搭建 ADA 酶抑制剂筛选平台是顺利筛选出该类抑制剂的先决条件。尽管有较多研究报道了检测 ADA 酶活性的方法, 如改良的 Berthelot 比色法<sup>[3]</sup>, 单一试剂、双试剂和三试剂偶联酶法<sup>[4]</sup>等, 也有 ADA 酶抑制剂研究的筛选报道, 但是关于 ADA 酶抑制剂筛选模型的系统研究, 尚未见文献报道。研究表明, 底物腺苷在 ADA 酶的作用下脱氨生成次黄苷, 而腺苷和次黄苷在紫外可见光下具有不同的特征吸收峰, 利用紫外分光光度法测定腺苷在特征峰 265 nm 处吸收度的下降速度, 可以测算 ADA 的活性<sup>[5]</sup>。因此, 本研究在此原理基础上, 通过各种条件的优化, 搭建了简单、快速的 ADA 抑制剂筛选平台, 以期 ADA 抑制剂筛选提供基础依据。

### 1 仪器与材料

#### 1.1 仪器和试剂

752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); AB104-N 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; 腺苷( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ )含量 $\geq 98\%$ (阿拉丁试剂公司); ADA 标准品(美国 Sigma);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和无水乙醇等试剂均为分析纯; 新鲜牛脾(兰州市屠宰场)。

#### 1.2 溶液的配制

PBS 缓冲溶液: 称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.28 g 溶于 200 mL 双蒸水中, 调节 pH 为 7.5, 即得。腺苷溶液: 称取腺苷 2.0 mg 溶于 10 mL 上述的 PBS 缓冲溶液, 即得; 待测物溶液: 将待测物溶于无水乙醇中, 浓度为 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

### 2 方法

#### 2.1 牛脾中 ADA 提取制备

ADA 粗酶液的提取采用 Pfrogner<sup>[6]</sup>的提取方法。将提取的粗酶液与 ADA 标准品校对后, 即可用于 ADA 抑制剂的筛选。

#### 2.2 底物最佳检测波长的确定

取 1 mg 腺苷溶解于 10 mL PBS 溶液中, 在 200~499.9 nm 波长范围内对样品液进行全波长扫描, 以确定底物腺苷的最大吸收波长<sup>[5]</sup>。

#### 2.3 反应体系中最适酶浓度的确定

为获得较高标准的直线校正系数  $R^2$ , 达到最优实验反应体系, 本实验分别设计了 4 组不同梯度 ADA 浓度, 取 PBS 缓冲溶液 1 000  $\mu\text{L}$  于试管中, 再依次加入 300  $\mu\text{L}$  200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的腺苷溶液, 100  $\mu\text{L}$  的无水乙醇, 混合均匀, 最后加入 100  $\mu\text{L}$  酶活分别为 18.2, 36.4, 56.4, 112.8  $\text{IU}$  的 ADA 溶液后, 迅速摇匀。用紫外分光光度计在 265 nm 处测量吸光值的变化。

#### 2.4 底物最适浓度的确定

采用 ADA 酶浓度 100  $\mu\text{L}$ (55  $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )不变, 设计 9 组不同梯度腺苷浓度, 用紫外分光光度计在 265 nm 处测量吸光值的变化, 每 10 s 测定一次数据, 共测定 180 s。

## 2.5 温度对反应体系的影响

将 PBS 缓冲溶液、腺苷溶液、乙醇和 ADA 酶溶液于 4, 15, 25, 35, 45, 55, 65 °C 不同水浴中恒温至相应温度后, 取上述 PBS 缓冲溶液 900  $\mu\text{L}$ , 加入 400  $\mu\text{L}$  腺苷溶液, 加入 100  $\mu\text{L}$  的上述乙醇稀释溶液, 混合均匀, 加入 100  $\mu\text{L}$  ADA 溶液后, 用紫外分光光度计在 265 nm 处测量吸光值的变化, 每 10 s 测定一次数据, 共测定 180 s, 评价不同温度对反应体系的影响。

## 2.6 不同有机溶剂对反应体系的影响

采用“2.5”项下体系, 用甲醇、丙酮、氯仿、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇无水乙醇溶解待测试样品, 用紫外分光光度计在 265 nm 处测量吸光值的变化, 评价不同温度有机溶剂对反应体系的影响。

## 2.7 2'-dCF 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)的测定

采用“2.5”项下体系, 将 2'-dCF 用 PBS 稀释, 不同浓度添加, 其他用量固定, 用紫外分光光度计在 265 nm 处测量吸光值的变化, 将 3 次测得的结果以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标拟定直线, 根据直线斜率的变化计算化合物的抑制活性, 抑制率计算公式<sup>[7]</sup>如下: 抑制率/%=(标准酶活力-样品酶活力)/标准酶活力 $\times$ 100%。以抑制剂浓度为横坐标, 以酶抑制活性为纵坐标绘制平面坐标系, 即可求出抑制剂 IC<sub>50</sub> 值。

## 2.8 ADA 抑制剂的筛选

采用上述建立的方法对 248 种中药单体及微生物发酵的干燥提取物, 进行活性筛选。

## 3 结果

### 3.1 底物最佳检测波长的确定

腺苷的全波长扫描图可知, 在 264.4 nm 处, 腺苷达到最大吸收峰值, 具有较高吸收度和精确性, 可以作为 ADA 活性检测的最适波长, 结果见图 1。

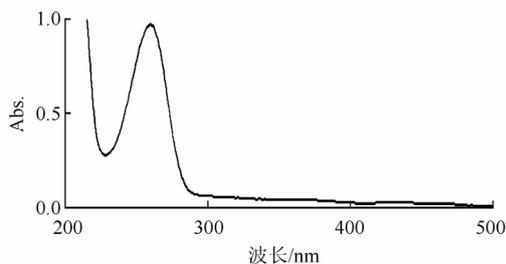


图 1 腺苷的全波长扫描图

Fig. 1 The result of the full wavelength scans for Adenosine

### 3.2 反应体系中最适酶浓度的确定

不同 ADA 酶浓度活力对该酶反应体系影响显著, ADA 酶反应初速率随着 ADA 酶浓度的增大呈先升高后下降的趋势。在酶活性为 36.4 IU 时酶反应初速率达到最高值, 显著高于其他各组, 但是校正系数  $R^2$  较低, 酶活力 54.6 IU 组酶反应初速率显著高于 18.2 IU 组和 112.8 IU 组, 略低于 36.4 IU 组, 且校正系数  $R^2$  达到 0.995 1, 呈现非常高的相关性, 因此, 以酶粗提液稀释 56.4 IU 作为最适的酶浓度用于后期的筛选。结果见表 1。

表 1 不同酶浓度对反应体系的影响

Tab. 1 Effects of different enzyme concentrations on the initial velocity of enzyme reaction

PBS/ $\mu\text{L}$	腺苷/ $\mu\text{L}$	乙醇/ $\mu\text{L}$	ADA 酶 活力/IU	酶促反应的初 速率/ $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$	$R^2$
1 000	300	100	18.2/100 $\mu\text{L}$	0.050 4	0.793 8
1 000	300	100	36.4/100 $\mu\text{L}$	0.064 2	0.964 6
1 000	300	100	54.6/100 $\mu\text{L}$	0.055 8	0.995 1
1 000	300	100	112.8/100 $\mu\text{L}$	0.027 4	0.999 8

### 3.3 底物最适浓度的确定

不同底物浓度对腺苷-ADA 酶催化反应体系影响显著, ADA 酶反应初速率随着底物腺苷浓度的增大呈先升高后下降的趋势。其中, 腺苷加入量为 400  $\mu\text{L}$  时, ADA 酶活力最高, 与腺苷加入量 250  $\mu\text{L}$  以及 300  $\mu\text{L}$  之间不存在显著性差异, 但是判定系数  $R^2$  最高, 达到 0.999 6, 相关性最高, 因此, 以腺苷加入量 400  $\mu\text{L}$  作为最优选择, 腺苷加入量 250~400  $\mu\text{L}$  较为适宜。结果见表 2。

表 2 不同腺苷浓度对腺苷-ADA 催化反应体系的影响

Tab. 2 Effects of different adenosine concentrations on the initial velocity of enzyme reaction

PBS/ $\mu\text{L}$	腺苷/ $\mu\text{L}$	乙醇/ $\mu\text{L}$	ADA 酶 活力/IU	酶促反应的初 速率/ $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$	$R^2$
1 250	50	100	100	0.007 8	0.875 6
1 200	100	100	100	0.023 8	0.959 8
1 150	150	100	100	0.033 0	0.959 0
1 100	200	100	100	0.042 5	0.981 3
1 050	250	100	100	0.049 0	0.985 6
1 000	300	100	100	0.051 4	0.995 7
900	400	100	100	0.052 1	0.999 6
800	500	100	100	0.040 9	0.998 9
700	600	100	100	0.024 4	0.994 2

### 3.4 温度对反应体系的影响

不同温度对腺苷-ADA 酶催化反应具有一定

的影响,表现在 ADA 酶反应初速率随着温度升高呈现先升高后下降的趋势。低温对酶活性有一定的抑制作用,表现出了降低的反应初速率;在温度升高大于 45 °C 时,对酶活性的影响明显,反应初速率下降,且相关性降低;在温度范围为 15~35 °C 时,ADA 酶活力接近,判定系数  $R^2$  介于 0.99~0.98 之间,提示本研究建立的反应体系在室温范围内检测时,差异不明显,其中,在温度为 25 °C 时,ADA 酶活力最好,判定系数  $R^2$  最高,达到 0.999 6,相关性最高;因此,在检测温度为 25 °C 时为适宜。结果见表 3。

表 3 不同反应温度对腺苷-ADA 催化反应体系的影响  
Tab. 3 Effects of different temperature on the initial velocity of enzyme reaction

温度/°C	酶促反应的初速率/mmol·min <sup>-1</sup>	$R^2$
4	0.148 5	0.995 7
15	0.161 4	0.991 8
25	0.163 1	0.995 6
35	0.156 9	0.989 2
45	0.132 6	0.953 7
55	0.128 8	0.955 1
65	0.112 3	0.943 6

### 3.5 不同有机溶剂对反应体系的影响

不同有机溶剂对腺苷-ADA 酶催化反应具有一定的影响。其中甲醇和乙酸乙酯对 ADA 酶活性的影响较小,石油醚、氯仿次之,正丁醇和丙酮对酶活的影响最显著,反应初速率下降明显,相关性降低,结果见表 4。该结果也说明,正丁醇和丙酮不适宜作为样品溶解的溶媒,此外,为尽可能减小有机溶剂对反应体系的影响,实验中要设立该溶剂的空白对照,以求结果的准确,防止样品筛选的漏筛、误筛。

表 4 不同有机溶剂对腺苷-ADA 催化反应体系的影响  
Tab. 4 Effects of different organic solvents on the initial velocity of enzyme reaction

有机溶剂	酶促反应的初速率/mmol·min <sup>-1</sup>	$R^2$
乙醇	0.163 1	0.995 6
甲醇	0.147 2	0.987 6
乙酸乙酯	0.141 1	0.992 3
石油醚	0.135 6	0.929 3
氯仿	0.111 9	0.918 8
正丁醇	0.033 2	0.976 4
丙酮	0	-

### 3.6 腺苷脱氨酶抑制剂筛选平台验证结果

2'-dCF<sup>[8]</sup>的  $IC_{50}$  为 0.48  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 见图 2。说明用 2'-dCF  $IC_{50}$  值作为阳性对照,能够保证实验的稳定与有效。

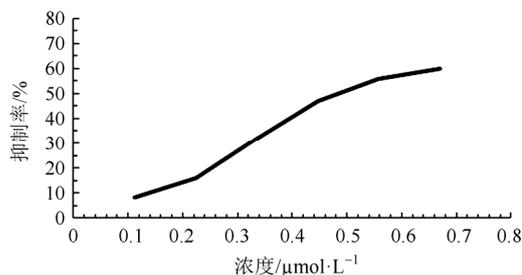


图 2 2'-脱氧助间型霉素的抑制率

Fig. 2 The result of adenosine deaminase inhibition rate for pentostatin

### 3.7 化合物的筛选

对 248 个中药提取物及内生菌发酵样品进行了 ADA 酶抑制活性的初筛,根据对照的检测值及化合物、阳性对照的浓度,得到了 23 个有抑制活性的粗提物,其中源自于中药独活的内生菌发酵提取物,其抑制  $IC_{50}$  达到了 34.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。通过筛选并跟踪分离,从中药木贼中分离得到的 6 个单体化合物显示了较好的抑制活性,其中化合物 2 的抑制活性最好,其抑制  $IC_{50}$  活性达到了 26.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,为进一步进行 ADA 酶抑制剂的研究奠定了基础。

## 4 讨论

目前,以酶为靶点的酶抑制剂类药物占到了上市药物的 32.4%,已经正在变成新药开发的重要来源<sup>[9]</sup>。酶抑制剂类药物的筛选,实质是抑制剂通过可逆或者不可逆等不同的方式与酶发生作用,抑制或降低酶促反应的发生;对酶而言,酶的活性是指酶催化化学反应的能力,其衡量标准是酶促反应速度的大小<sup>[10]</sup>。因此新药筛选所要寻找的酶抑制剂其活力的大小,可通过添加该化合物后酶促反应速率的变化来评价。但是,许多因素可以影响酶促反应速度。如过多的产物抑制,环境 pH 的改变等。为了避免上述因素对酶促反应动力学研究的影响,通常是采用测定反应的初速度  $v_0$ (initial velocity)来评价。 $v_0$  是指反应刚刚开始时,上述因素尚未发挥作用时,时间进程曲线为直线部分时的反应速度,一般在约 >10% 的底物被转化成产物之前对  $v_0$  进行测定,以便将这类复杂因素的影响降至最低限度<sup>[11]</sup>。因此,本实验尝试建立

在短时间内(10 min, 甚至可以在 5 min 内)完成的酶促反应的最佳底物和酶反应浓度和条件。

本研究表明, 在预设的时间内, 酶浓度较高或者底物腺苷浓度小时, 腺苷就会迅速与 ADA 反应脱氨生成次黄苷, 表现出酶的反应初速度在该时间内会发生变化, 间接的反映在初速度的直线斜率的相关性较低; 酶活性较低或者腺苷浓度较大, ADA 酶活力较低, 虽然反应初期线性关系较好, 但是反应速度慢(如表 2), 不利于抑制剂的筛选。只有当反应体系浓度适宜时, 酶促反应才逐渐趋向一个平稳状态。因此, 最终确定优化方案: PBS 缓冲液(pH=7.5)900  $\mu\text{L}$ , 腺苷(200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 400  $\mu\text{L}$ , ADA100  $\mu\text{L}$ , 空白/待筛物 100  $\mu\text{L}$ , 总体系 1 500  $\mu\text{L}$ 。

腺苷脱氨酶活性测定的方法有多种, 其中紫外分光光度法操作简单, 成本较低且稳定性高, 能够连续动态的检测腺苷脱氨酶活力的变化。尽管本研究建立的反应体系中, 腺苷的代谢产物次黄苷的  $\lambda_{\text{max}}$  为 250 nm, 与腺苷( $\lambda_{\text{max}}=265$  nm)部分重叠, 可能会存在干扰。但是在本研究体系中, 底物腺苷是过量的, 且如前所述, 一般在约>10%的底物被转化成产物之前对  $v_0$  进行测定<sup>[11]</sup>, 此时形成的产物次黄苷相对于底物腺苷都比较小, 因此其对底物检测影响较小。在对检测体系的评价中, 较好的相关性也印证了这一结论。现有文献关于新药筛选方面的研究, 尤其是高通量筛选方面的研究, 较多的采用了 96 孔板为材质, 利用酶标仪进行快速检测, 当然这些检测对于底物或产物在可见区的反应较为适宜, 但是, 对于底物或产物在紫外区的酶促反应而言, 往往不仅需要石英材质的 96 孔板, 而且对酶标仪也有更高的要求, 这些条件普通的实验室是很难实现的, 因此本实验尝试建立一种快速、简单的用于紫外区的酶促反应的酶抑制剂药物筛选的方法。如果实验条件具备, 进行等比例调整, 则建立一种高通量的筛选方法是完全可行的。

2'-dCF 是从链霉菌抗菌药物的发酵液中提取

出来, 对小牛肠 ADA 具有很强的抑制活性。经过多年努力, 于 2002 年由 FDA 正式批准为药物, 主要是用于毛细胞性白血病的治疗<sup>[1-2]</sup>。本实验以此作为阳性药物对照, 进一步表明该反应体系稳定性高、灵敏度强, 操作简单易行, 可以为 ADA 抑制剂的筛选提供便捷、稳定、可靠的筛选平台。

## REFERENCES

- [1] BAZL R, GANJALI M R, SABOURY A A, et al. A new strategy based on pharmacophore-based virtual screening in adenosine deaminase inhibitors detection and *in vitro* study [J]. Daru, 2012, 20(1): 64. Doi: 10.1186/2008-2231-20-64.
- [2] YU B C, TANG Y F, TANG L, et al. Advances in study on pharmacological effect of cordycepin [J]. Mod Med Clin(现代药物与临床), 2011, 26(5): 349-352.
- [3] HE Z S, DENG J, XU J S, et al. Determination of adenosine deaminase activity in body fluids by catalytic spectrophotometry [J]. Chin J Health Lab Tech(中国卫生检验杂志), 2005, 15(5): 546-547.
- [4] ZHOU M X, GUAN C Y, CHENG X Y. Automated enzyme-coupled assay for determination of adenosine desaminase [J]. Chin J Clin Lab Sci(临床检验杂志), 2004, 22(5): 338-340.
- [5] SHOWALTER H H, PUTT S R, BORONDY P E, et al. Adenosine deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of (+)-3, 6, 7, 8-tetrahydro-3-[(2-hydroxyethoxy)methyl]imidazo[4, 5-d][1, 3] diazepin-8-ol and some selected C-5 homologs of pentostatin. [J]. J Med Chem, 1983, 26(10): 1478-1482.
- [6] PFROGNER N. Adenosine deaminase from calf spleen: I. Purification [J]. Arch Biochem Biophys, 1967(119): 141-146.
- [7] LEE G, LEE S S, KAY K Y, et al. Isolation and characterization of a novel adenosine deaminase inhibitor, IADA-7, from *Bacillus sp.* J-89 [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2009, 24(1): 59-64.
- [8] PADUA R A, GEIGER J D, DELANEY S M, et al. Rat brain adenosine deaminase after 2'-deoxycoformycin administration: biochemical properties and evidence for reduced enzyme levels detected by 2'-[3H]deoxycoformycin ligand binding [J]. J Neurochem, 1992, 58(2):421-429.
- [9] TANG Z Y, TANG C. Research progression of enzyme inhibitor screening [J]. Shanghai Med Pharm J(上海医药), 2007, 28(3): 117-119.
- [10] HUANG Y T, LU T. Progress in the research of structural design in multi-targeted histone deacetylase inhibitors[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30 (9): 1037-1043.
- [11] Hames B D, Hooper N M, 王镜岩等译. 生物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 96-97.

收稿日期: 2015-06-11