

阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制动力学研究*

袁向华** 周艳玲 勾 洵 严 伟
(四川师范大学生命科学学院, 成都 610101)

摘要:为探究以马铃薯淀粉为底物时阿卡波糖对胰 α -淀粉酶(来自猪胰)的抑制动力学,采用 3,5-二硝基水杨酸显色法及双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法),体外模拟人体生理环境,建立胰 α -淀粉酶最佳反应体系。结果显示,阿卡波糖在体外对胰 α -淀粉酶活性具有明显的抑制作用,且作用效果随阿卡波糖浓度升高而增强,其半抑制浓度 $IC_{50} = 5.975 \times 10^{-6}$ mol/L,即 3.854×10^{-3} mg/mL。通过双倒数作图法得知,胰 α -淀粉酶的 $K_m = 12.309$ mmol/L,阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制类型为非竞争性抑制混合型。本研究证实了以马铃薯淀粉为底物测定阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制作用更为灵敏,为其它抑制剂以马铃薯淀粉为底物时抑制胰 α -淀粉酶活性的研究提供了比较依据;且证实了阿卡波糖对胰 α -淀粉酶有较强的抑制作用,可为临床治疗 2 型糖尿病时减少阿卡波糖的副作用提供一定的参考。

关键词:胰 α -淀粉酶;3,5-二硝基水杨酸; α -葡萄糖苷酶抑制剂;阿卡波糖;抑制动力学;副作用
中图分类号:Q556 文献标识码:A doi:10.16507/j.issn.1006-6055.2016.01.026

Researches on Inhibition Kinetics of Pancreatic α -Amylase by Acarbose*

YUAN Xianghua** ZHOU Yanling GOU Xun YAN Wei
(College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101)

Abstract:To explore the inhibitory kinetics of pancreatic α -amylase by acarbose using potato starch as substrate, human physiological environment in vitro was simulated and the optimal reaction system of pancreatic α -amylase was established. Experiments were measured by 3,5-dinitrosalicylic acid method and double-reciprocal plot (Lineweaver-Burk plot). The results showed that the activity of pancreatic α -amylase was inhibited by acarbose obviously, and the inhibition was enhanced with the increasing of acarbose concentration. The half inhibitory concentration (IC_{50}) was 5.975×10^{-6} mol/L (3.854×10^{-3} mg/mL). The double-reciprocal plot indicated that the K_m of pancreatic α -amylase was 12.309 mmol/L and the inhibition type is the hybrid of noncompetitive and competitive inhibition. It was more sensitive to determine the inhibition effect of acarbose on pancreatic α -amylase when using potato starch as substrate, the results may provide the basis and comparisons for the inhibition research of pancreatic α -amylase activity by other inhibitors. Our research also confirmed that acarbose had a strong inhibitory effect on pancreatic α -amylase, which provide a reference for the reduction of side-effects of the use of acarbose in the clinical treatment of type 2 diabetes.

Key words: pancreatic α -amylase; 3,5-dinitrosalicylic acid; α -glucosidase inhibitor; acarbose; inhibition kinetics; side effects

1 引言

糖尿病是严重危害人类健康的慢性疾病,症状为持续高血糖,主要分为 1 型、2 型糖尿病。目前治疗糖尿病的药物按其作用机制和结构主要分为胰岛素促泌剂、胰岛素增敏剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、胰岛素及胰岛素类似物、二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 抑制剂、其他口服降糖药。其中 α -葡萄糖苷酶抑制剂作为一类治疗 2 型糖尿病的典型药物,可抑制 α -葡

萄糖苷酶、蔗糖酶、 α -淀粉酶活性,从而降低糖尿病患者的餐后血糖^[1]。

阿卡波糖(Acarbose)为一种生物合成的假性四糖,能抑制小肠壁细胞的 α -葡萄糖苷酶活性,延缓肠道内寡糖、双糖或多糖的降解,减慢葡萄糖和果糖的降解和吸收,从而显著降低餐后血糖^[2]。作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂,临床上用其治疗 2 型糖尿病时,因抑制肠道中的 α -淀粉酶(即胰 α -淀粉酶)而导致腹胀、腹泄等副作用^[1]。当前对阿卡波糖抑制 α -淀粉酶的研究主要集中在天然抑制剂如苦荞黄酮^[3]、茶多酚^[4]、芦丁和槲皮素^[5]等对 α -淀粉酶的抑制作用,该类研究以不存在于人体肠道的对硝基苯酚- α -D-葡萄糖苷(pNPG)为底物,因此实验结果值得商

2015-06-18 收稿,2015-07-29 接受,2016-02-25 网络发表

* 四川省高校重点实验室开发项目(SCYZ201408)资助

** 通讯作者, E-mail: lemonlyty@sohu.com

榷。已有的研究表明^[1,2],阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为竞争型,而对胰 α -淀粉酶的抑制类型的研究鲜有报道。

本研究以马铃薯淀粉为底物^[6],来自猪胰的胰 α -淀粉酶作为实验材料,旨在体外模拟人体生理环境,试图构建更为灵敏的胰 α -淀粉酶抑制动力学模型,为其它抑制剂以马铃薯淀粉为底物时对胰 α -淀粉酶抑制作用的研究提供比较依据。同时本文拟通过研究胰 α -淀粉酶的活性及阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制效果、抑制类型,为临床上减小阿卡波糖抑制胰 α -淀粉酶导致的副作用提供一定的参考。

2 材料与方法

2.1 材料

马铃薯淀粉:选用新鲜、优质的马铃薯,去除芽眼、皮,于实验室自制马铃薯淀粉,常温保存,使用时配置成1%马铃薯淀粉溶液作为底物。

酶:胰酶(cas: B049-47-6)来源于猪胰腺,为阿拉丁公司产品,胰 α -淀粉酶含量210 U/mg。

阿卡波糖:拜唐苹(批号BJ18063),为拜耳医药保健公司产品,每片含阿卡波糖50 mg。

2.2 试剂

所用试剂均为国产分析纯。

10 mg/mL 葡萄糖标准溶液;1.2% NaCl 溶液;磷酸盐缓冲液(pH = 6.8);1 mol/L HCL 溶液;4.8 $\times 10^{-5}$ g/mL(10.1 U/mL)胰 α -淀粉酶溶液;

3,5-二硝基水杨酸(DNS)显色液:称取6.5 g DNS溶于少量水中,加入2 mol/L 氢氧化钠溶液325 mL,再加入45 g 丙三醇,摇匀,冷却后定容至1000 mL。避光密封保存4~7天后使用。

2.3 仪器

KQ-400KDB型高功率数控超声波清洗器;DKB-501A型超级恒温水槽;UNICO WFZ-UV2000型紫外可见分光光度计;JJ-2组织捣碎匀浆机。

2.4 实验方法

马铃薯淀粉在胰 α -淀粉酶的作用下分解为葡萄糖,使其与DNS试剂反应,加热反应后溶液呈橘红色,测定溶液540 nm处的吸光值,在一定浓度范围内吸光值与胰 α -淀粉酶活性成正比,可进行定量分析^[7]。实验中使用1 mol/L HCL终止酶促反应。

2.4.1 制作葡萄糖标准曲线

采用4 mL反应体系,0~6号试管分别加入10 mg/mL的葡萄糖标准溶液(0、0.05、0.1、0.2、

0.3、0.4、0.5 mL),2 mL DNS试剂,蒸馏水补齐至4 mL。摇匀,沸水浴5 min,冷却至室温,蒸馏水定容至25 mL。以0号管调零,540 nm下分别读取1~6号管的吸光值(Abs),求得葡萄糖标准曲线方程。

2.4.2 确定酶的最适反应条件

胰 α -淀粉酶的最适温度为40 $^{\circ}$ C,最适pH = 6.8,最佳反应时间为10 min^[8],以此建立胰 α -淀粉酶最佳反应体系。

1) 确定最适酶量

采用4 mL反应体系,设置0~8号管,分别加入底物2.5 mL,1.2% NaCl溶液0.1 mL,磷酸盐缓冲液(pH = 6.8)0.5 mL,再依次加入蒸馏水0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mL,摇匀,40 $^{\circ}$ C水浴10 min后立即依次加入40 $^{\circ}$ C温浴的酶液0、100、200、300、400、500、600、700、800 μ L。40 $^{\circ}$ C水浴中酶解10 min,取出并终止反应。最后向每支试管加入2 mL DNS试剂,沸水浴5 min,冷却至室温,蒸馏水定容至25 mL。以0号管调零,在540 nm下分别读取1~8号管的吸光值(Abs)。以加入酶量(μ L)为横坐标,吸光值(Abs)为纵坐标,绘制曲线。

2) 确定最适底物量

采用4 mL的反应体系,设置0~6号管,分别加入1.2% NaCl溶液0.1 mL,磷酸盐缓冲液(pH = 6.8)0.5 mL,按0~6的顺序分别加入底物0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,用蒸馏水补至3.3 mL,40 $^{\circ}$ C水浴10 min;迅速加入40 $^{\circ}$ C温浴的酶液700 μ L(7.05U),40 $^{\circ}$ C酶解10 min,取出并终止反应。最后向每支试管加入2 mL DNS试剂,沸水浴5 min,冷却至室温后定容至25 mL。以0号管调零,540 nm下分别读取1~6号管的吸光值(Abs)。以加入底物量(mL)为横坐标,吸光值(Abs)为纵坐标,绘制曲线。

2.4.3 测定阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制作用

采用4 mL的反应体系,共25个浓度梯度,重复实验3次,均以煮沸的酶液为空白对照。每支试管分别加入2.5 mL底物,0.1 mL 1.2% NaCl溶液,0.5 mL磷酸盐缓冲液(pH = 6.8),以及对应浓度梯度的阿卡波糖溶液,再用蒸馏水将溶液补至3.3 mL。震荡均匀后40 $^{\circ}$ C水浴10 min,迅速加入对应的40 $^{\circ}$ C温浴的酶液700 μ L。40 $^{\circ}$ C酶解10 min,取出并终止反应。分别加入2 mL DNS试剂,沸水浴5 min,冷却至室温,蒸馏水定容至25 mL。以煮沸的酶液为空白对照,测定实验组540 nm处的吸光值。抑制活性

计算公式为

$$\text{抑制率} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\%$$

式中, A_1 为不加抑制剂时 540nm 处的吸光值, A_2 为加入阿卡波糖后 540 nm 处的吸光值。

以阿卡波糖浓度为横坐标, 抑制率 (%) 为纵坐标, 绘制抑制曲线, 计算阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的半数抑制浓度 IC_{50} 。

2.4.4 测定及计算胰 α -淀粉酶的米氏常数 K_m

采用 4 mL 的反应体系, 设置 0~5 号管, 分别加入 1.2% NaCl 溶液 0.1 mL, 磷酸盐缓冲液 (pH = 6.8) 0.5 mL, 再依次加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 底物, 蒸馏水定容至 3.3 mL。40℃ 水浴 10 min, 迅速加入 40℃ 温浴的酶液 700 μ L (7.05U), 40℃ 酶解 10 min, 取出并终止反应。加入 2 mL DNS 试剂, 沸水浴 5 min, 冷却至室温, 蒸馏水定容至 25 mL。以 0 号管为空白对照, 测定实验组 540 nm 处的吸光值 (Abs)。以底物浓度倒数 $1/[S]$ 为横坐标, 反应速度倒数 $1/v$ 为纵坐标, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。

2.4.5 测定及计算加入低浓度和高浓度阿卡波糖溶液后胰 α -淀粉酶的米氏常数 K_m' 、 K_m''

在反应温度、时间、pH 一定的条件下, 改变底物量, 添加不同浓度阿卡波糖的条件下, 使阿卡波糖终浓度分别为 2.5×10^{-6} mol/L (低浓度)、 2×10^{-5} mol/L (高浓度) [6], 测定胰淀粉酶的米氏常数 K_m' 、 K_m'' 。

加入低浓度 (2.5×10^{-6} mol/L) 阿卡波糖后胰 α -淀粉酶米氏常数 K_m' 的测定: 采用 4mL 的反应体系, 设置 0~5 号管, 加入 1.2% NaCl 溶液 0.1 mL, 磷酸盐缓冲液 (pH = 6.8) 0.5 mL, 再依次加入底物 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 加入阿卡波糖溶液使其显色反应前的浓度为 2.5×10^{-6} mol/L (低浓度), 最后加入蒸馏水定容至 3.3 mL。40℃ 水浴 10 min, 迅速加入 40℃ 温浴的酶液 700 μ L (7.05U)。40℃ 酶解 10 min, 取出并终止反应。分别加入 2 mL DNS 试剂, 沸水浴 5 min, 冷却至室温, 用蒸馏水定容至 25 mL。以 0 号管为空白对照, 测定实验组 540 nm 处的吸光值 (Abs)。

加入高浓度 (2×10^{-5} mol/L) 阿卡波糖后抑制胰 α -淀粉酶米氏常数 K_m'' 的测定方法同上。

以底物浓度倒数 $1/[S]$ 为横坐标, 反应速度倒数 $1/v$ 为纵坐标, 绘制不同浓度阿卡波糖抑制胰 α -淀粉酶的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。

3 结果与分析

3.1 绘制葡萄糖标准曲线

按照 2.4.1 的方法, 测定不同浓度葡萄糖所对应的光吸收值, 绘制出葡萄糖标准曲线 (见图 1), 可知葡萄糖标准曲线方程为 $y = 0.282x + 0.0110$, $R^2 = 0.9977$, 线性关系良好。

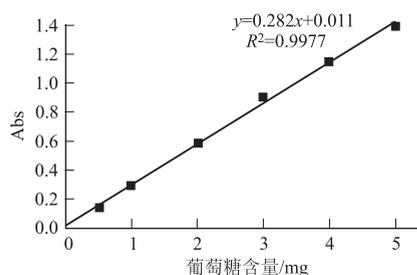


图1 葡萄糖标准曲线

3.2 确定酶最适反应条件

3.2.1 确定最适酶量

按照 2.4.2 的方法, 测定不同体积的酶液对胰 α -淀粉酶的水解作用, 绘制酶液加入量-Abs 曲线, 如图 2 所示。

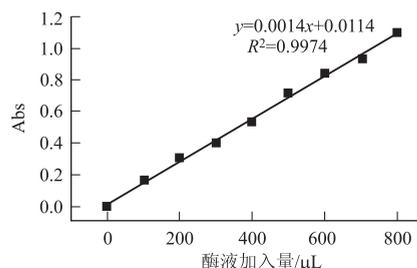


图2 酶液加入量与反应速度的关系曲线

建立酶促动力学方程的关键在于在底物过量的情况下发生零级反应, 即确定酶加入量使酶的反应初速度最大, 加入酶过多或过少都无法准确建立酶促动力学方程。在不同光吸收值范围内读数会使测定产生不同程度的误差 [9], 根据朗伯比尔定律, 当光吸收值 (Abs) 在 0.15~1.0 时, 测量误差在 2.2% 以内 [7]。在本研究中, 根据葡萄糖标准曲线 (图 1), 反应产生的葡萄糖在 0~5 mg 时与光吸收值具有良好的线性关系; 由图 2 可知光吸收值与酶液加入量呈线性关系。为保证有充足的酶液催化底物, 同时不使葡萄糖产量在 5 mg 之外, 且光吸收值在 0.15~1.0 的范围内, 综合考虑, 在本实验中取 700 μ L 酶液较为适合。

3.2.2 确定加入底物量

按照 2.4.2 的方法, 测定不同体积的底物与葡

葡萄糖产生量的关系,葡萄糖产生量用光吸收值计算。根据实验结果绘制底物加入量与光吸收值(Abs)的关系图(图3),以此反映加入不同体积的底物与反应速度的关系。由图可见,随着底物加入量的增加,光吸收值(Abs)呈升高趋势,后期趋于稳定,可知随着底物加入量的增加,底物趋于饱和。酶促反应初速度的测定必须在底物饱和的情况下才能准确测得,在本研究中,为了使反应有足够的底物,选择加入2.5 mL底物。

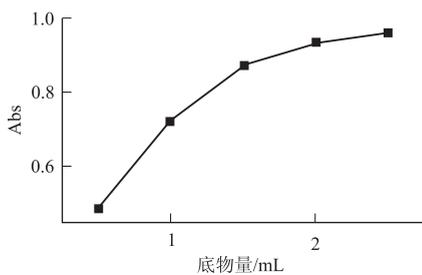


图3 加入底物量与反应速度的关系

3.2.3 确定酶最适反应体系

综上,本研究胰α-淀粉酶反应体系确定如下:在4 mL体系、pH = 6.8的条件下,加入底物量为2.5 mL,酶700 μL,反应时间10 min。

3.3 测定阿卡波糖对胰α-淀粉酶的抑制作用

按照2.4.3的方法,测定不同浓度的阿卡波糖对胰α-淀粉酶的抑制作用,并计算阿卡波糖对胰α-淀粉酶的半抑制浓度IC₅₀。共设24个浓度梯度,绘制阿卡波糖对胰α-淀粉酶的抑制曲线(图4)。由图可见,随着阿卡波糖浓度的增加,其对胰α-淀粉酶的抑制作用增大,胰α-淀粉酶的活性降低,说明阿卡波糖对胰α-淀粉酶有明显的抑制作用。经计算阿卡波糖对胰α-淀粉酶的半数抑制浓度IC₅₀ = 5.975 × 10⁻⁶ mol/L,即3.854 × 10⁻³ mg/mL。

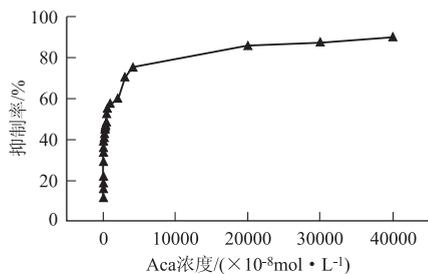


图4 不同浓度阿卡波糖对胰α-淀粉酶的抑制曲线

王斯慧^[4]、李波^[10]和伍城颖等^[11]以pNPG为底物,得出阿卡波糖对α-淀粉酶的IC₅₀分别为0.095 mg/mL、623.73 μg/mL(即0.624 mg/mL)、0.02 mg/mL。本研究以马铃薯淀粉为底物,所得到

的阿卡波糖对胰α-淀粉酶的半数抑制浓度IC₅₀明显小于利用pNPG作为底物得到的阿卡波糖对胰α-淀粉酶半数抑制浓度IC₅₀,说明以马铃薯淀粉为底物,在筛选抑制剂时更为灵敏,结果更具有可信度。

3.4 测定及计算胰α-淀粉酶的米氏常数K_m

按照2.4.4的方法,对胰α-淀粉酶的米氏常数进行测定及计算。采用双倒数作图法作图,以1/[S]为横坐标,1/v为纵坐标作图,如图5。可知该图拟合曲线方程为y = 18.806x + 1527.76, R² = 0.9951,线性关系良好,计算得出K_m = 12.309 mmol/L。

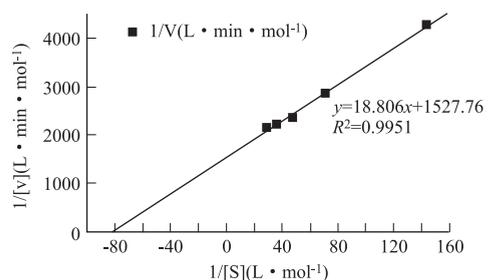


图5 胰α-淀粉酶的抑制曲线

3.5 测定及计算加入低浓度、高浓度阿卡波糖溶液后胰α-淀粉酶的米氏常数K_m'、K_m''

根据2.4.5的方法,在其他条件一定,改变底物量,添加不同浓度阿卡波糖的条件下,对分别加入低浓度、高浓度阿卡波糖抑制后胰α-淀粉酶的米氏常数K_m'、K_m''进行测定。对实验数据采用双倒数作图法作图,结果如图6所示。

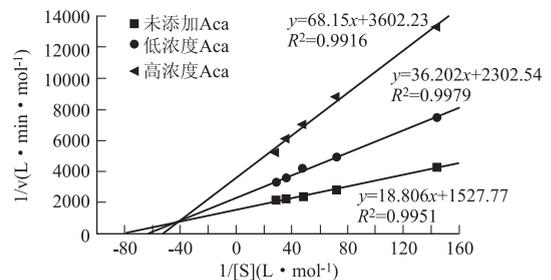


图6 阿卡波糖对胰α-淀粉酶的抑制双倒数图

在未加入阿卡波糖的反应中测得胰α-淀粉酶的米氏常数K_m = 12.309 mmol/L,加入低浓度阿卡波糖(2.5 × 10⁻⁶ mol/L)后,胰α-淀粉酶的米氏常数K_m' = 15.72 mmol/L,加入高浓度阿卡波糖(2 × 10⁻⁵ mol/L)后,胰α-淀粉酶的米氏常数K_m'' = 18.92 mmol/L。观察图6可知,未加阿卡波糖和加入不同浓度的阿卡波糖的酶促动力学曲线相交于第二象限,可知阿卡波糖对胰α-淀粉酶的抑制作用类

型属于竞争性抑制与非竞争性抑制混合型^[12]。

4 结论

本研究以马铃薯淀粉作为底物,采用3,5-二硝基水杨酸显色法研究胰 α -淀粉酶的酶促反应动力学。建立的胰 α -淀粉酶反应体系表明,在4mL的反应体系中(底物2.5 mL,酶液700 μ L, pH = 6.8, 温度40 $^{\circ}$ C, 反应时间10 min),反应体系具有良好的线性关系,胰 α -淀粉酶的 $K_m = 12.309$ mmol/L。

进一步研究可知,阿卡波糖对胰 α -淀粉酶有强抑制作用,且阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的半抑制浓度 $IC_{50} = 5.975 \times 10^{-6}$ mol/L, 即 3.854×10^{-3} mg/mL, 明显灵敏于以pNPG为底物的其它物质对胰 α -淀粉酶的抑制作用,为其它抑制剂抑制胰 α -淀粉酶活性的研究提供了比较依据。以马铃薯淀粉为底物时,阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制类型为非竞争性抑制与竞争性抑制混合型。这与已报道的阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶为竞争性抑制^[13]不同,可能因酶不同,其结构上的差异造成抑制效果和类型不同,具体原因有待进一步研究。该结果可为其它抑制剂抑制胰 α -淀粉酶的研究提供参考与比较依据,同时为减小阿卡波糖抑制胰 α -淀粉酶产生的副作用提供一定的理论基础。

使用 α -葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖治疗2型糖尿病时,会引起腹胀、腹泻等副作用^[11,13],可能是抑制剂抑制 α -淀粉酶导致结肠部位未被吸收的碳水化合物经细菌发酵产生的^[14,15]。本研究证实阿卡波糖对胰 α -淀粉酶有强抑制作用,是导致副作用的主要因素之一。故在使用阿卡波糖治疗糖尿病时其用量需适中,使其降低餐后血糖的同时减少副作用,即应在抑制 α -葡萄糖苷酶的同时对 α 淀粉酶有较为温和的抑制作用。

参考文献

- [1] 艾娜,王瑞好. 治疗2型糖尿病的新药物米格列醇的研究进展[J]. 广东化工,2011,38(6):113-115.
- [2] 杨晓晖,邓媛媛,董慧,等. 阿卡波糖不良反应国外最新研究进展[J]. 中国药物警戒,2009,6(1):36-40.
- [3] 王斯慧,白银花,黄婉凌,等. 苦荞黄酮对 α -淀粉酶的抑制作用研究[J]. 食品工业,2012,(3):109-111.
- [4] 王斯慧,黄婉玲,陈庆松,等. 芦丁、槲皮素对 α -淀粉酶抑制活性研究[J]. 食品与发酵科技,2012,48(3):34-37.
- [5] 张永军,黄惠华. 茶多酚对胰 α -淀粉酶的抑制动力学研究[J]. 食品工业,2010,(1):7-9.
- [6] 刘春滢,黎霞. 阿卡波糖抑制III型 α -葡萄糖苷酶动力学研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版),2015,38(2):286-291.
- [7] 齐香君,苟金霞,韩成珺,等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究[J]. 纤维素科学与技术,2004,12(3):17-19,30.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:626.
- [9] 宋占午,王莱,刘艳玲. 3,5-二硝基水杨酸测定还原糖含量的条件探讨[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),1997,33(2):52-54.
- [10] 李波,包怡红,高锋,等. 红松球球鳞片多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品工业科技,2015,36(1):63-69.
- [11] 伍城颖,吴启南,王红,等. 茨种皮多酚提取物体外一直 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性研究[J]. 食品工业科技,2015,36(16):91-94,99.
- [12] 姜涌明. 分子酶学导论[M]. 北京:中国农业大学出版社,2000:56-66.
- [13] 薛亚平,郑裕国. α -糖苷酶抑制剂的研究[C]//中国生物化学学会. 2002年第十届全国学术年会论文集. 桂林:[出版者不详],2002:391-394.
- [14] PUGSLEY M K, KALRA V. Protamine is a low molecular weight polycationic amine that produces actions on cardiac muscle[J]. Life Sciences,2002,72(3):293-305.
- [15] LUO F, RONG G. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology,2008,148(3):250-257.