

牛磺熊去氧胆酸对谷丙转氨酶活性的影响

刘 煜 郭向敏¹ 李继衍

(中国药科大学生物化学教研室,南京 210009)

摘要 通过测定谷丙转氨酶(GPT)活力的方法,观察了牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)对GPT的作用。发现TUDCA对GPT呈抑制作用。且随其浓度的增加,抑制作用增强,当TUDCA浓度为0.833 mg/ml时,对GPT的抑制率达到81%。动力学实验还表明,增加底物浓度,并不能消除TUDCA对GPT活力的抑制作用, K_m 值不变, V_m 值作减小, K_m/V_m 值增大,呈现出非竞争性抑制作用。同时用CCl₄小鼠肝损伤模型,观察了口服TUDCA与UDCA对血清GPT活性的影响,提示TUDCA对肝脏无损害,较UDCA为优。

关键词 牛磺熊去氧胆酸(TUDCA); 谷丙转氨酶(GPT); 活性; 抑制

牛磺熊去氧胆酸(Tauroursodeoxycholic acid,简称TUDCA)是一种结合型天然胆汁酸,广泛存在于人及动物胆汁中,熊科动物胆汁含量最高,是胆汁中镇静及抗惊厥作用的主要有效成分^[1]。为研究TUDCA的生理、药理效应,本实验观察了人工合成的TUDCA对血清谷丙转氨酶(GPT)活性的影响,并测定了TUDCA对谷丙转氨酶动力学性质的影响。同时,用CCl₄造成小鼠肝损伤模型,观察了TUDCA与熊去氧胆酸(UDCA)对小鼠血清谷丙转氨酶活性的影响,以便为研制药用TUDCA提供有关理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TUDCA由本室合成;GPT底物溶液(α -酮戊二酸0.292 mg/ml,dl-丙氨酸0.0178 g/ml);pH 7.4,0.1 mol/L磷酸缓冲液;2,4-二硝基苯肼溶液(0.198 mg/ml);0.4 mol/L NaOH溶液;丙酮酸标准溶液(0.22 mg/ml);(以上五种溶液均按文献[2]配制)。GPT标准酶液由健康小鼠肝脏匀浆液上清稀释至320 u/ml即得;恒温水浴;721分光光度计。

1.2 标准谷丙转氨酶的制备和稳定性试验

称取健康小鼠新鲜肝脏0.5 g,加生理盐水10 ml用Teflon玻璃匀浆器匀浆,后经3000 r/min离心10 min,取上清液用生理盐水稀释20倍即得。该酶液置冰箱4℃保存,每隔1 d测其活力一次,测定方法见文献[2]。一周测定结果,该酶液酶活平均值为320±10 u/ml,表明该酶于4℃放置一周活力不减失,稳定性良好。

GPT活力单位定义:1 ml小鼠肝匀浆液上清稀释液于37℃与底物作用30 min,每产生2.5 μg丙酮酸为一个GPT活力单位。

1.3 谷丙转氨酶标准曲线的绘制

取干燥洁净试管6只编号,分别加入丙酮酸标准溶液0,0.05,0.10,0.15,0.20,0.25 ml;加入相应GPT溶液1.00,0.95,0.85,0.75 ml。各管再加入0.1 mol/L pH 7.4磷酸缓冲液0.20 ml后测各管GPT活力,方法同1.2,以各管光密度与空白管光密度差值为纵坐标,以GPT活力单位为横坐标作标准曲线,得回归方程。

$$A_{520}=5.09 \times 10^{-3}u + 0.0237 \quad r=0.9963 \quad (n=5)$$

1.4 TUDCA浓度对谷丙转氨酶的作用

收稿日期 1994-10-18 本校1994届毕业实习生

取浓度为 10 mg/ml 的 TUDCA 溶液等倍稀释成 6 种不同浓度的溶液。取干燥洁净试管 6 支, 分别加入相应浓度的 TUDCA 溶液 0.1 ml, 另取 1 支试管以磷酸缓冲液 0.1 ml 替代 TUDCA 溶液, 各管均加入标准酶液 0.1 ml 及 GPT 底物溶液 0.5 ml 后混匀, 按文献 [2] 测 GPT 活力, 两次结果取平均值; 另取 7 支试管作空白。以 TUDCA 浓度为横座标, 以 GPT 活力为纵座标作图, 结果见图 1。

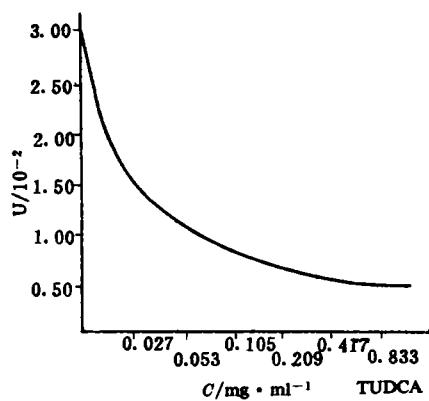


Fig. 1. The effect of TUDCA on the activities of GPT.

1.5 TUDCA 对谷丙转氨酶动力学的影响

1.5.1 谷丙转氨酶反应动力学曲线 于 7 支干燥洁净试管中分别加入 GPT 底物溶液 0, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40, 0.50 ml, 各管分别用 pH 7.4, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液补充至总体积为 0.7 ml, 然后各管加入 GPT 标准酶液 0.5 ml, 按文献[2]方法测 GPT 活力。两次结果取平均值, 另取 7 支试管做空白。以吸光度倒数 $1/A_{520}$ 为纵座标, 以底物浓度倒数 C^{-1} 为横座标作图, 结果见图 2(a)。

1.5.2 TUDCA 存在时谷丙转氨酶反应动力学曲线 取 7 支干燥洁净试管, 各加 GPT 底物溶液 0, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40, 0.50 ml, 用磷酸缓冲液补充至各管体积为 0.5 ml, 各管再加 0.625 mg/ml 的 TUDCA 溶液 0.2 ml 和 GPT 标准酶液 0.5 ml, 按文献[2]测 GPT 活力, 结果见图 2(b)。

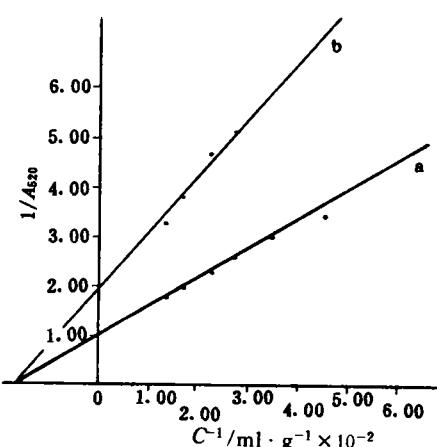


Fig. 2. The Lineweaver-Burk curve on reactive rate.

- a. normal curve of reaction
- b. TUDCA-bearing reactive curve

1.6 TUDCA 对 CCl_4 引起的小鼠急性肝损伤的作用^[3]

取小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 分别 po 生理盐水(两组), TUDCA 100 mg/kg, UDCA 100 mg/kg, 连续 7 d, 于 d 6 按 10 ml/kg 灌以 1 : 700 的四氯化碳油溶液, 制备急性肝损伤模型, 其中一组以生理盐水替代 CCl_4 作为正常对照组, 20 h 后摘眼球取血, 测血清 GPT 活力(高单位血清以生理盐水稀释 5 倍), 方法见文献[2], 结果见表 1。

Tab. 1. Effects of TUDCA on hepatitis induced by CCl_4 in mouse. n=10

Group	Dose, mg/kg	GPT, u
saline control		42.98±12.17**
CCl_4 control		375.87±40.48
TUDCA	100	377.59±97.05*
UDCA	100	408.32±12.83*

*P<0.05, **P>0.05, ***P>0.01 (vs CCl_4 control)

2 讨论

1) 国内外关于 TUDCA 对谷丙转氨酶作用的研究未见报道, 本研究发现 TUDCA 对体外谷丙转氨酶呈抑制作用, 且随其浓度升

高作用增强,当 TUDCA 浓度为 0.833 mg/ml 时,对 GPT 活力的抑制率达 81%。至于该性质与熊科动物生理活动的相关性,有待进一步研究。

2) 动力学实验表明,即使增加底物浓度,也不能消除 TUDCA 对谷丙转氨酶的抑制作用。此外,在 TUDCA 存在下,反应速度与底物浓度在 Lineweaver-Burk 曲线与正常酶促反应的 Lineweaver-Burk 曲线相比, K_m 值不变, V_m 值减小, K_m/V_m 值增大,呈现出非竞争性抑制作用。

3) 对小鼠的整体试验表明,TUDCA 组与

生理盐水组无显著性差异,而 UDCA 组 GPT 活力较生理盐水组明显升高。表明 TUDCA 对肝脏无损害,较 UDCA 为优,至于 TUDCA 对小鼠肝细胞作用机理及 UDCA 对小鼠肝细胞是否有破坏作用,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 李继珩,许东,牟晓虹等.牛磺熊去氧胆酸对胰蛋白酶活性的影响.中国药科大学学报,1993,24(5):302
- 2 徐秀兰主编.生物化学实验与指导.北京:中国医药科技出版社,1994.93
- 3 中华人民共和国卫生部药政管理局.新药临床前研究指导原则汇编.1993.92

Effects of Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on Activities of Glutamic Pyruvic Transaminase(GPT)

Liu Yu, Guo Xiangming, Li Jiheng

Department of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009

Abstract This paper deals mainly with the effects of TUDCA on activities of GPT. The studies show that TUDCA is a kind of compounds which inhibits activities of GPT. The rate of inhibition is 81% at 0.833 mg/ml concentration of TUDCA. In the kinetics studies, we found it impossible to relieve the inhibition depending on increasing the concentration of substrate. The value of K_m/V_m in TUDCA-bearing reacion is higher than that in normal. Further more, we studied the activites of TUDCA in mice. The results show that TUDCA is harmless to liver.

Key word Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA); Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT); Activity; Inhibition