

# 牛磺熊去氧胆酸对谷丙转氨酶活性的影响

刘煜 郭向敏<sup>1</sup> 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  $CCl_4$  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(Tauroursodexychoic 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<sup>[1]</sup>。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  $CCl_4$  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( $\alpha$ -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  $320 \pm 10$  u/ml, 表明该酶于 4℃ 放置一周活力不减退, 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  $\mu$ g 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。

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

### 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。

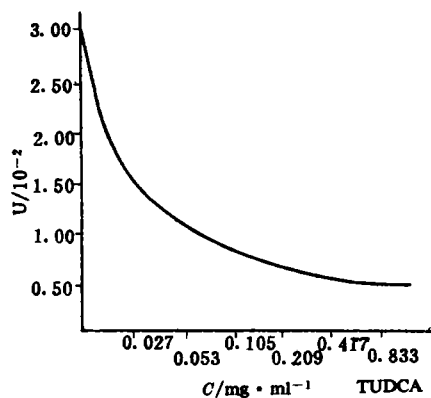


Fig 1. The effect of TUDCA on the activities of GPT.

### 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)。

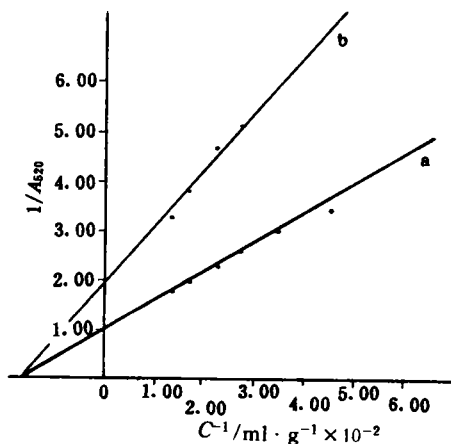


Fig 2. The Lineweaver-Burk curve on reactive rate.

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

### 1.6 TUDCA 对 CCl<sub>4</sub> 引起的小鼠急性肝损伤的作用<sup>[3]</sup>

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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> in mouse. n=10

Group	Dose, mg/kg	GPT, u
saline control		42.98±12.17***
CCl <sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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 reaction is higher than that in normal. Further more, we studied the activities of TUDCA in mice. The results show that TUDCA is harmless to liver.

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