

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)13-1161-03

用线性动力学方法表征 L-苯丙氨酸对兔小肠黏膜碱性磷酸酶的抑制作用

陈虹¹ 程真莉¹ 左渝平² 廖飞¹ (重庆医科大学¹药学院重庆市生物化学与分子药理学重点实验室生物信息学与制药生物技术组,²基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016)

Reliability of a linear kinetic method in characterizing the inhibition of L-phenylalanine on rabbit intestinal alkaline phosphatase

CHEN Hong¹, CHENG Zhen-Li¹, ZUO Yu-Ping², LIAO Fei¹

¹Unit of Bioinformatics & Medicinal Biotechnology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, ²Department of Biochemistry & Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

【Abstract】 AIM: To investigate the reliability of a linear kinetic method based on calibrated specific activities of enzyme at two medium substrate concentrations in characterizing the inhibition of L-phenylalanine on rabbit intestinal alkaline phosphatase. METHODS: Phosphatase reaction was monitored by absorbance at 410 nm using p-Nitrophenyl phosphate (PNPP) as substrate. Kinetic parameters (Michaelis-Menten constant, K_m , and maximal reaction rate, V_m) were estimated by this linear kinetic method at two substrate concentrations above K_m . Inhibition type and inhibition constants (K_{ik} for the change of K_m and K_{iv} for the change of V_m , respectively) were determined by responses of kinetic parameters to phenylalanine concentration. RESULTS: By double-reciprocal analysis, about 70% of K_m and V_m decreased simultaneously in response to the increase of L-phenylalanine concentration and K_{iv}/K_{ik} was $(2.4 \pm 0.6, n=9)$. By this linear kinetic method, nearly 80% of kinetic parameters showed similar changes aside from their improved precision. There was no difference in either inhibition constant between this linear kinetic method and double-reciprocal analysis. This linear kinetic method yielded K_{iv}/K_{ik} of $(2.0 \pm 0.8, n=10)$, consistent to that by double-reciprocal analysis. Given variation in $K_{iv}/K_{ik} < 2.5$ were acceptable for uncompetitive inhibition, both methods consistently

suggested that L-phenylalanine was an uncompetitive inhibitor on rabbit intestinal alkaline phosphatase. CONCLUSION: This linear kinetic method is applicable to characterize uncompetitive inhibitors.

【Keywords】 L-phenylalanine; uncompetitive inhibitor; alkaline phosphatase; linear kinetic method; inhibition constant

【摘要】目的: 考察用线性动力学方法表征 L-苯丙氨酸对兔小肠黏膜碱性磷酸酶抑制作用的可靠性。方法: 测定碱性磷酸酶水解对硝基苯酚磷酸酯(PNPP)的产物生成初速度。用两个底物浓度下标定比活性计算米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m), 再据二者对抑制剂浓度的响应确定抑制剂类型和抑制常数。结果: 双倒数分析法重复测定发现 70% 的 K_m 和 V_m 随抑制剂浓度升高而同步下降, 两动力学参数变化对应抑制常数的比值为 $(2.4 \pm 0.6, n=9)$ 。线性动力学方法所得参数精度稍高, K_m 和 V_m 随抑制剂浓度升高同时下降的出现率约 80%。两抑制常数之比为 $(2.0 \pm 0.8, n=10)$, 两参数变化对应的抑制常数及两抑制常数之比都与双倒数分析法一致。如允许两抑制常数之比在 2.5 倍内波动, 则两种方法都表明 L-苯丙氨酸为此碱性磷酸酶的反竞争性抑制剂。结论: 此线性动力学方法可用于表征反竞争性抑制剂。

【关键词】 L-苯丙氨酸; 反竞争性抑制; 碱性磷酸酶; 线性动力学方法; 抑制常数

【中图分类号】 Q555.8 **【文献标识码】** A

0 引言

反竞争性抑制剂用作临床药物有明显优势^[1-2]。寻找反竞争性抑制剂需测定酶动力学参数(K_m 和 V_m)对抑制剂浓度的响应以确定抑制类型及对应的抑制常数 K_{iv} 和 K_{ik} ^[2-3]。用双倒数分析法测定动力学参数寻找反竞争性抑制剂时需用从远低于 K_m 到远高于 K_m 范围内的底物浓度。常规定量方法灵敏度有限, 在很低底物浓度下测定初速度可靠性差, 这限制了用常规定量方法和双倒数分析法筛选反竞争性抑制剂。此前发现线性动力学方法只用高于 K_m 的两个底物浓度也能表征竞争性抑制剂^[4-5]。用较高底物浓度有利于用常规方法定量测定初速度。L-苯丙氨酸对大鼠小肠黏膜碱性磷酸酶为反竞争性抑制作用^[6]。我们以兔小肠黏膜碱性磷酸酶为模型, 考察此

收稿日期 2006-09-26; 接受日期 2007-03-15

基金项目 国家自然科学基金(30472139)

通讯作者 廖飞。Tel (023) 60607015 Email liaofeish@vip.sina.com

作者简介: 陈虹。本校七年制在读本科生。Tel (023) 89014079

Email zhhong113@tom.com; 程真莉。本校七年制在读本科生。Tel :

(023) 89014348 Email zhengzhenli_1219@163.com。两者共同第一

作者。

线性动力学方法表征 L-苯丙氨酸对兔小肠黏膜碱性磷酸酶抑制作用的可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP, 美国 Fluka 公司); L-苯丙氨酸 (美国 Amresco 公司); 对硝基苯酚磷酸酯 (美国 Sigma 公司); 其余为常规国产试剂。成年大白兔 8 只, 雌雄不拘 (本校实验动物中心)。新茂 UV 7504 分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 碱性磷酸酶制备^[7] 将 8 只大白兔小肠黏膜用 250 mL 生理盐水制成匀浆, 1.0 mol/L NaOH 调到 pH 7.5, 四层纱布过滤, 4℃ 下 1800 g 离心 40 min; 上清用 2.0 mol/L 醋酸钠 (pH 3.8) 调至 pH 5 (出现白色沉淀), 4℃ 静置过夜再 1800 g 离心 40 min; 沉淀用 150 mL 生理盐水溶解, 0.5 mmol/L Na₂CO₃ 调到 pH 7.5。再离心、调到 pH 5 后收集沉淀, 用 100 mL 冷蒸馏水溶解, 冰水浴中缓慢加入 40 mL 正丁醇, 38℃ 水浴 5 min, 离心收集下层无色水液约 100 mL, 搅拌下缓慢加 (NH₄)₂SO₄ 粉末 100 g 过夜, 离心收集水相和有机相间黏稠状不溶物, 用 pH 9.8 的 AMP 溶解, 离心去沉淀后 -10℃ 保存。临用前融化后用 pH 9.8 的 AMP 缓冲液稀释。

1.2.2 碱性磷酸酶反应监测 缓冲液为 100 mmol/L AMP-HCK (pH 9.8), 其它试剂均用此缓冲液配制。用 13.6 (mmol/L)⁻¹ · cm⁻¹ 的消光系数, 据酶完全作用后的产物量标定对硝基苯酚磷酸酯浓度。酶反应体系总体积 2.0 mL, 加底物启动反应 40 s 后, 在 2.0 min 内且底物消耗 < 6% 时段的平均速度为初速度。用 0.12 mmol/L 底物标定酶活性, 换算成酶活性单位数 (nkat)。

1.2.3 抑制类型和抑制常数确定 线性动力学方法所用低浓度底物 (SL) 为 0.070 mmol/L, 高浓度底物 (SH) 为 0.280 mmol/L, 酶量为适当稀释的碱性磷酸酶液 (< 1.33 μkat/L) 30, 40, 50, 60 μL。线性回归得两底物浓度下每 10 μL 酶液的比活性, 用相关系数大于 0.99 的比活性数据计算 K_m 和 V_m^[4-5]。用双倒数分析法时所用底物浓度为 0.018, 0.036, 0.072, 0.108, 0.144 mmol/L, 适当稀释酶液 50 μL。两种方法所用苯丙氨酸都小于 7.0 mmol/L。据 1/V_m 和 1/K_m 对抑制剂浓度响应的有效性、两抑制常数比值确定抑制剂类型和对应的抑制常数。

统计学处理: 以回归分析有统计学显著意义的数用于后续分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SAS 8e 进行统计分析, *t* 检验比较均值, *F* 检验比较变异系数, χ^2

检验比较 K_m 和 V_m 各种变化特征的出现率, *P* < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 双倒数分析法表征 L-苯丙氨酸的抑制作用 无抑制剂时双倒数分析得兔小肠黏膜碱性磷酸酶 K_m 为 (73 ± 7) μmol/L (n = 13); 所用苯丙氨酸浓度下 V_m 变异系数小于 10%, 优于测定 K_m 的精度。用双倒数法 13 次重复测定抑制作用, 发现近 70% 的 K_m 随抑制剂浓度升高而显著降低, 其余 K_m 对抑制剂无有效响应, 仅 1 次所得 V_m 对抑制剂无显著响应, 其余 V_m 随抑制剂浓度升高而显著降低; K_m 和 V_m 随抑制剂浓度升高而同步降低者接近 70%, K_{iv}/K_{ik} 为 (2.4 ± 0.6, n = 9), 大于 1.0 (*t* 检验, *P* < 0.001)。两参数都下降时所得 K_{iv}/K_{ik} 都大于 1.1 但小于 3.5, 其中小于 2.0 者约 30%, 小于 2.5 者约 80%。

2.2 线性动力学法表征 L-苯丙氨酸的抑制作用 相同抑制剂浓度下线性动力学法所得 K_m 与双倒数分析法一致, 测定 V_m 的精度也优于测定 K_m (表 1)。此法重复测定 13 批次, 仅 1 次所得 V_m 对抑制剂浓度无显著响应, 其余 V_m 随抑制剂浓度升高而显著降低, 所得 K_m 中 80% 随抑制剂浓度升高而显著降低, 其余 K_m 对抑制剂浓度无显著响应; 两参数随抑制剂浓度升高同时下降出现率约 80%, 所得 K_{ik} 和 K_{iv} 与双倒数分析法对应结果一致 (表 2)。此法测定 K_m 精度略优于双倒数分析法, 其 K_{iv}/K_{ik} 为 (2.0 ± 0.8) (n = 10), 也大于 1.0 (*P* < 0.01) 且与双倒数分析法一致 (*P* > 0.19); 所得 K_{iv}/K_{ik} 都大于 1.1 而小于 3.9, 其中小于 2.0 者占 70%, 小于 2.5 者占 80%。此法所得 K_m 和 V_m 中任一个随抑制剂浓度升高而显著下降、二者随抑制剂浓度升高同时显著下降这三种情况的出现率都与双倒数分析法无显著差异 (χ^2 检验, *P* > 0.658)。

表 1 两种方法测定兔小肠黏膜碱性磷酸酶 V_m 和 K_m ($\bar{x} \pm s$)

L-Phe (mmol /L)	线性动力学方法		双倒数分析法	
	K _m (μmol/L)	V _m [(μmol/ L)/min]	K _m (μmol/L)	V _m [(μmol/ L)/min]
0	70 ± 7	2.7 ± 0.2	73 ± 7	9.7 ± 0.5
2.0	47 ± 6	2.1 ± 0.1	43 ± 9	7.4 ± 0.7
4.0	37 ± 4*	1.7 ± 0.1*	34 ± 14	6.4 ± 1.1
6.0	29 ± 3*	1.5 ± 0.1	28 ± 14	5.5 ± 1.0

线性动力学方法测定 10 次, 双倒数分析法测定 9 次。**P* < 0.05 vs 双倒数分析法。

表2 两种方法所得 K_{iv} , K_{ik} 及 K_{iv}/K_{ik} 的比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

项目	双倒数分析法	线性动力学方法	均值检验概率(双尾 t 检验)	标准差检验概率(F 检验)
K_{iv}	8.0 ± 2.9	7.9 ± 0.9	>0.920	<0.01
K_{ik}	3.7 ± 2.2	4.5 ± 1.5	>0.390	>0.07
K_{iv}/K_{ik}	2.4 ± 0.6	2.0 ± 0.8	>0.190	>0.10

线性动力学方法共测定 10 次, 双倒数分析法共测定 9 次。

3 讨论

反竞争性抑制剂同时降低米氏酶的 K_m 和 V_m , 且改变 K_m 和 V_m 的效力应相当, 即 K_{iv} 与 K_{ik} 比值应接近 $1.0^{[8]}$ 。双倒数分析法所得 K_m 和 V_m 同时降低者达到 70%, 但如要求 $1/K_m$ 和 $1/V_m$ 对反竞争性抑制剂浓度变化响应的两个抑制常数比值小于 1.10, 则双倒数法的结果表明苯丙氨酸对此酶只能属于混合型抑制剂, 不可能为反竞争性抑制剂。不同方法测定 K_m 精度都比测定 V_m 精度低, 实践中所用抑制剂浓度范围也有限, 这些都会降低据 K_m 和 V_m 变化所得两个对应抑制常数的可靠性, 使得二者的比值存在较大波动。模拟分析发现即使双倒数分析法的随机误差很小, 如只允许两个抑制常数的比值在 1.1 倍内波动, 则反竞争性抑制剂被误定为其它抑制剂的比例可达 80% 以上, 当允许其比值在 2.0 倍范围内波动时, 确定反竞争性抑制剂的准确度可提高到 75% 左右 (数据待发表)。因此, 考虑到实验误差的影响, 设定反竞争性抑制剂对应 K_{iv}/K_{ik} 的临界值为 2.0, 则线性动力学法表明苯丙氨酸最可能是兔子小肠黏膜碱性磷酸酶的反竞争性抑制剂, 而双倒数分析法表明苯丙氨酸可能是此碱性磷酸酶的混合型或反竞争性抑制剂。设定此临界值为 2.5 则两种方法一致表明苯丙氨酸为此碱性磷酸酶的反竞争性抑制剂。可见, 考虑到实验误差的影响允许两个动力学参数变化对应抑制常数比值在较大范围内波动, 则两种方法都表明苯丙氨酸可能是兔小肠黏膜碱性磷酸酶的反竞争性抑制剂, 且此线性动力学法对应的两个抑制常数比值波动范围更窄, 结果可靠性可能更高。

竞争性抑制剂会升高 K_m , 此线性动力学法表征竞争性抑制剂时需较高的底物浓度才能在有抑制剂

时使预设 SL 仍在 K_m 的 0.8 倍以上, 但底物浓度过高会降低测定竞争性抑制剂的灵敏度。反竞争性抑制剂会降低 K_m , 将 SL 定为无抑制剂时 K_m 的 0.8 倍以上而 SH 为 SL 的 4 倍时可保障满足此线性动力学法的要求, 且用较高底物浓度可提高测定反竞争性抑制剂的敏感性。另外, 此线性动力学法仅用较高底物浓度有利于用常规方法定量测定初速度, 但设定所需的两个底物浓度后, 此线性动力学法所允许的酶 K_m 变化范围仍然有限^[4-5], 测定竞争性或反竞争性抑制剂时还需优化所用抑制剂浓度。非竞争性抑制剂不改变酶 K_m , 使得此线性动力学用于筛选非竞争性抑制剂的可靠性更有保障。综上所述, 在靶酶 K_m 过低或定量方法灵敏度有限时, 此线性动力学方法有利于用常规定量方法快速筛选米氏酶的常见类型抑制剂, 且用于发现反竞争性抑制剂可能还有一定优势。

【参考文献】

- [1] Cornish-Bowden A. Why is uncompetitive inhibition so rare? : A possible explanation, with implications for the design of drugs and pesticides [J]. FEBS Lett, 1986, 203(1) 3-6.
- [2] Westley AM, Westley J. Enzyme inhibition in open systems: Superiority of uncompetitive agents [J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5347-5352.
- [3] Kakkar T, Pak Y, Mayersohn M. Evaluation of a minimal experimental design for determination of enzyme kinetic parameters and inhibition mechanism [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(5): 861-869.
- [4] Liao F, Yang X, Zhou QX, et al. Fast estimation of Michaelis-Menten constant of arylesterase with a pair of medium concentration of substrate [J]. J Med Coll PLA, 2003, 18(5): 312-316.
- [5] 赵利娜, 廖飞, 赵运胜. 用线性动力学方法考察黄嘌呤对尿酸酶的抑制作用 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(15): 1363-1365.
- [6] Ghosh NK, Fishman WH. On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. Kinetic studies. [J]. J Biol Chem, 1966, 204(11): 2516-2522.
- [7] Heppel L A. Intestinal phosphomonoesterase [J]. Methods Enzymol, 1955, 2: 530-533.
- [8] 邹国林, 朱汝瑾. 酶学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1997: 94-115.

编辑 王 睿