

# 微量 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型及抑制类型的判断方法

朱娟娟, 尹忠平, 陈继光, 上官新晨, 彭大勇, 蒋艳

(江西农业大学食品科学与工程学院, 天然产物与功能食品重点实验室, 江西南昌 330045)

**摘要:**  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂能抑制碳水化合物水解, 是高血糖人群降低餐后血糖的常用物质。本文基于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG体外反应体系, 建立了微量、快速的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型, 该模型的主要参数如下: 酶浓度为0.05 U/mL; 底物浓度范围为0.05~1 mM; 反应温度为37 °C; 反应时间为6 min。以该模型检测了阿卡波糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并采用Lineweaver-Burk Plots、Eadie-Hofstee Plots、Hanes-Wolff Plots、Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots、Non-linear Regression Analysis五种方法对该酶促反应的动力学数据进行了详细的分析。通过对数据处理的过程和结果比较发现, 该五种方法各有特点, 各法所获得的 $V_{\max}$ 、 $K_m$ 和 $K_i$ 存在一定的差异, Non-linear-Regression Analysis法更加简便、合理及可靠, 是酶动力学数据处理的首选方法。采用Non-linear-Regression Analysis法计算, 该模型中酶促反应的 $V_{\max}$ 为 $3.91 \times 10^{-6}$  mmol/min,  $K_m$ 为0.12 mM, 阿卡波糖的 $K_i$ 为90  $\mu$ M。

**关键词:**  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂; 模型; 动力学

文章编号: 1673-9078(2016)12-164-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.026

## A Model for Screening Trace Amounts of $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors and Methods for Judging Inhibition Type

ZHU Juan-juan, YIN Zhong-ping, CHEN Ji-guang, SHANG GUAN Xin-chen, PENG Da-yong, JIANG Yan  
(Jiangxi Key Laboratory of Natural Product and Functional Food, College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045, China)

**Abstract:** Alpha-glucosidase inhibitors can inhibit carbohydrate hydrolysis and are commonly used to decrease postprandial blood glucose in individuals with hyperglycemia. A model for the rapid screening of trace amounts of alpha-glucosidase inhibitors was established based on the alpha-glucosidase-pNPG *in vitro* reaction system. The optimized parameters of this model were as follows: the enzyme concentration, substrate concentration, reaction temperature, and reaction time were 0.05 U/mL, 0.05~1 mM, 37 °C, and 6 min, respectively. The inhibitory effect of acarbose was determined using this model, and the enzymatic reaction kinetics data were analyzed using five methods (Lineweaver-Burk plots, Eadie-Hofstee plots, Hanes-Wolff plots, Eisenthal-Cornish-Bowden direct plots, and Non-linear regression analysis). Data processing and comparison of results showed that these five methods had distinct characteristics as the  $K_i$ ,  $K_m$ , and  $V_{\max}$  calculated by these five methods differed slightly. Non-linear Regression Analysis was more convenient, reasonable, and reliable, and therefore was the first choice for processing the data of enzyme kinetics. By this model, the  $V_{\max}$  ( $\times 10^{-6}$  mmol/min) and  $K_m$  (mM) of enzymatic reaction were calculated to be 3.91 and 0.12, respectively and the  $K_i$  ( $\mu$ M) of acarbose was 90.

**Key words:** alpha-glucosidase inhibitor; model; kinetics

据国际糖尿病联盟 (IDF) 统计, 2013 年全世界糖尿病患者约 3.82 亿<sup>[1]</sup>。我国约有 5000 万糖尿病患者,

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31460436, 31260368); 江西省自然科学基金项目 (20132BAB204004)

作者简介: 朱娟娟 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物与功能性食品

通讯作者: 尹忠平 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物与功能性食品

居世界第二位<sup>[2]</sup>。研究表明, 高血糖是糖尿病的主要特征, 也是导致糖尿病并发症的重要原因<sup>[2]</sup>。糖耐量受损 (IGT) 主要表现为餐后血糖升高, 因此控制患者餐后血糖水平非常重要。根据 IDF 《II 型糖尿病全球指南》和《中国 II 型糖尿病防治指南》, 服用  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂是 II 型糖尿病治疗的首选方法之一<sup>[3,4]</sup>。膳食中碳水化合物的消化吸收是影响餐后血糖的关键因素, 为了防止餐后高血糖, 患者必须控制日常饮食中碳水化合物的摄入量, 严重影响了患者的生活质量。

为了控制好餐后血糖但又不太影响一日三餐,以碳水化合物为主要食物成分、餐后血糖受损的人群通常需要服用 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂。因此,筛选新型、高活性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂成为了研究的热点。准确及快速筛选的前提是建立稳定高效的筛选模型,因而建立微量及快速的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型具有重要的意义。

为了揭示酶抑制反应动力学机制,研究者建立了Lineweaver-Burk Plots(双倒数作图法)、Eadie-Hofstee Plots、Hanes-Wolff Plots、Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots和Non-linear Regression Analysis等多种数据分析方法,其中最为常用的是双倒数作图法。徐俊等<sup>[5]</sup>的研究表明,利用双倒数作图法判断酶反应抑制类型时须使反应处于非零级状态。当底物浓度过高时,酶促反应为零级反应,反应速度将不随底物浓度改变而改变,此时不适用于双倒数作图分析。本实验室研究发现,当底物浓度相对较低时,反应为非零级,但反应速度会在较短的时间内显著降低。因此,双倒数作图法具有一定的局限性。本文基于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG体外反应体系,建立了微量及快速的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型,以此模型检测了阿卡波糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用,并采用上述五种数据处理方法,对该酶抑制试验数据进行了详细地分析,比较了各方法的优缺点,可为酶抑制反应动力学数据分析和抑制类型判断提供参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

$\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase, EC 3.2.1.20)、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, PNPG, 026K1516),购自美国Sigma公司;阿卡波糖,购自广州市亿邦医药科技公司;对硝基苯酚(PNP)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、 $\beta$ -巯基乙醇和甘油均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

酶标仪, SpectraMax M2, Molecular Devices。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 主要反应试剂的制备

PB(磷酸缓冲液):称取 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.559 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  7.646 g,以去离子水定容稀释至500 mL,调节pH至6.8,再以0.22  $\mu\text{m}$ 水系滤膜过滤,121  $^\circ\text{C}$ 灭菌20 min,4  $^\circ\text{C}$ 贮存备用。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶:将 $\alpha$ -葡萄糖苷酶冻干粉溶于含50%甘油的PB(0.1 mM, pH 6.8),配制成100 U/mL的酶溶液,分装,-20  $^\circ\text{C}$ 冻存备用。

PNPG、PNP、阿卡波糖和 $\beta$ -巯基乙醇均以0.1 mM pH 6.8的PB配制。

#### 1.3.2 PNP测定标准曲线的绘制

以0.1 mM、pH 6.8 PB配制PNP标准溶液,取不同体积加入96孔板中,同时每孔加入1.4 M的 $\beta$ -巯基乙醇1.5  $\mu\text{L}$ ,再以pH 6.8 PB补足至200  $\mu\text{L}$ ,得0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1、0.2、0.4、0.8、1、2、4、8、16、32和64( $\times 10^{-6}$  mmol/L)系列标准浓度,每一浓度设置3个平行,于 $\lambda=405$  nm下测定吸光度值。以PNP物质的量 $n$ ( $\times 10^{-6}$  mmol)为纵坐标,OD值A为横坐标,绘制测定标准曲线。测定回归方程为:

$$Y=37.209X(R^2=0.9998)$$

式中: X为吸光度值, Y为PNP的物质的量。

#### 1.3.3 微量 $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外反应模型的建立

参考Luo等<sup>[6]</sup>、Gao等<sup>[7]</sup>和Ye等<sup>[8]</sup>的方法,加以改进,建立基于96微孔板的微量、快速反应模型( $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG反应体系)。具体操作如下:往各反应孔中加入 $\beta$ -巯基乙醇(1.4 M)1.5  $\mu\text{L}$ 、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(1 U/mL)10  $\mu\text{L}$ ,以0.1 mM、pH 6.8 PB补足至180  $\mu\text{L}$ ,混匀后置于37  $^\circ\text{C}$ 水浴中孵育20 min,加入PNPG(1 mM)20  $\mu\text{L}$ ,37  $^\circ\text{C}$ 水浴加热6 min,在405 nm波长下测定吸光度值,每个浓度重复3次。

#### 1.3.4 微量 $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外反应模型主要参数的优化

##### 1.3.4.1 酶和底物浓度的优化

反应体系如1.3.3所述。在确定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的浓度为0.05 U/mL的基础上,选取0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8和2 mM 12个浓度进行试验,反应6 min后于405 nm下测定吸光度值,以吸光度值(A)对底物浓度(S)作图,以确定适合的底物浓度范围。

##### 1.3.4.2 反应时间的优化

反应体系如1.3.3所述。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的浓度为0.05 U/mL,底物浓度为0.05、0.075、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8和1 mM,每隔1 min测定一次吸光度值,连续测定60 min。分别以吸光度值(A)、PNP生成量(n)、反应速度(V)和单位时间内反应速度增加值( $\Delta V$ )对时间(T)作图,以确定最佳反应时间。

#### 1.3.5 阿卡波糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

反应体系如1.3.3所述。底物浓度设为0.05、0.075、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2和1.4 mM,反应时

间为 6 min, 测定酶反应速度和  $IC_{50}$ 。

$$\text{酶活抑制率 (\%)} = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}] \times 100$$

式中:  $A_{\text{空白}}$  为未加抑制剂 (阿卡波糖) 的吸光值;  $A_{\text{样品}}$  为加入抑制剂时的吸光值。

### 1.3.6 酶抑制反应动力学数据处理方法

**Lineweaver-Burk Plots:** 采用 Excel 软件, 以  $1/V$  对  $1/S$  作图。

**Eadie-Hofstee Plots:** 采用 Excel 软件, 以  $V$  对  $V/S$  作图。

**Hanes-Wolff Plots:** 采用 Excel 软件, 以  $S/V$  对  $S$  作图。

**Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots:** 采用 Excel 软件, 以  $-S, V$  数据对作图。

**Non-linear Regression Analysis:** 采用 Origin 8.0 软件, 以  $S$  为自变量、 $V$  为因变量进行非线性拟合。

主要参数 ( $K_m, V_{\max}, K_i$ ) 计算方法如下:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$V' = \frac{V'_{\max}[S]}{K'm + [S]}$$

$$K'm = (1 + \frac{[I]}{K_i}) K_m$$

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K'm}{K_m} - 1}$$

### 1.3.7 数据分析

利用 Excel (2003) 和 DPS (v6.55) 软件作图和进行数据统计分析, 以 Spss 13.0 软件拟合数据计算  $IC_{50}$ 。数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外抑制剂筛选模型的建立及主要参数的优化

本文参考 Luo 等<sup>[6]</sup>、Gao 等<sup>[7]</sup>和 Ye 等<sup>[8]</sup>的方法, 建立了基于 96 微孔板的微量、快速  $\alpha$ -葡萄糖苷酶-PNPG 体外反应体系。反应在 0.1 mM、pH 6.8 PB 中进行, 温度为 37 °C, 总体积为 200  $\mu$ L。为了使模型能更好地适用于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选及酶抑制动力学研究, 本文对酶浓度、底物浓度和反应时间进行了优化。

#### 2.1.1 酶和底物浓度的优化

在酶反应体系中, 酶和底物浓度是重要的参数, 决定了反应速度的高低, 但二者的比值更为重要。我

们发现在一定范围内同比例增加或降低酶和底物浓度, 速度-底物浓度图的形状和趋势基本不变, 只是反应速度的数值相应的增加或减少。本文基于试验效率和反应后吸光度检测的需要, 首先通过试验确定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的浓度为 0.05 U/mL。在此基础上, 设置了 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2 mM 等 12 个底物 (PNPG) 浓度进行优化试验。试验结果 (如图 1 所示) 表明, 随着底物浓度的增加, 反应速度先是快速上升, 之后上升趋势逐步变缓, 当浓度达到 0.6 mM 以后, 速度基本保持不变, 说明此时反应体系中的酶已被底物饱和。从图 1 的数据来看, 在底物浓度为 0.05~1 mM 范围内, 速度曲线呈双曲线形, 速度和底物浓度之间的相关关系基本上符合米氏方程。因此, 反应模型的酶浓度确定为 0.05 U/mL, 底物浓度范围确定为 0.05~1 mM。

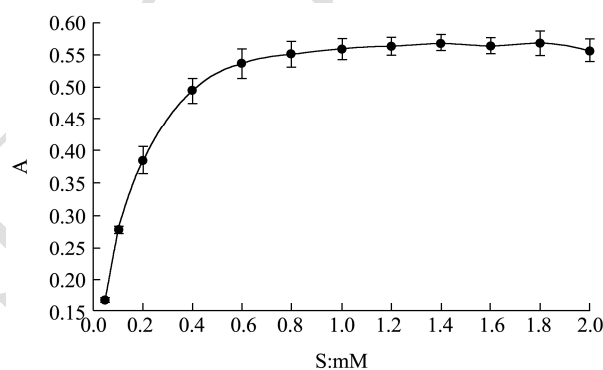


图 1 不同底物浓度下的反应速度

Fig.1 Reaction rates under different substrate concentrations

#### 2.1.2 反应时间的优化

研究已经证实, 在酶促反应开始后的较短的一段时间内, 反应速度基本保持不变, 之后随着底物浓度的降低、产物浓度增加及部分酶分子失活, 反应速度会逐步降低<sup>[9]</sup>。因此, 测定酶促反应速度应选在这个近似恒速反应阶段进行。本文在酶浓度 0.05 U/mL 的条件下, 设置 0.05、0.075、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8 和 1 mM 等 10 个底物浓度进行试验, 连续测定了反应开始后 60 min 的吸光度值, 结果如图 2 所示。由图 2a 可知, 反应 10 分钟后, 低底物浓度下的反应速度开始显现降低的趋势, 随着时间的推移, 高底物浓度下的反应速度也相继出现下降趋势。底物浓度越高, 出现下降趋势的时间点越往后推移。图 2c、b 和 d 数据分析表明, 反应的前 10 min, 各底物浓度下各时间点的即时反应速度和平均反应速度随着时间的推移稍微有所下降, 但降幅很小, 据此可判定前 10 min 反应基本处于恒速阶段。为了确保低底物浓度下的反应在测定反应速度时仍处于初期的恒速阶段, 本文将模型的反应时间确定为 6 min。

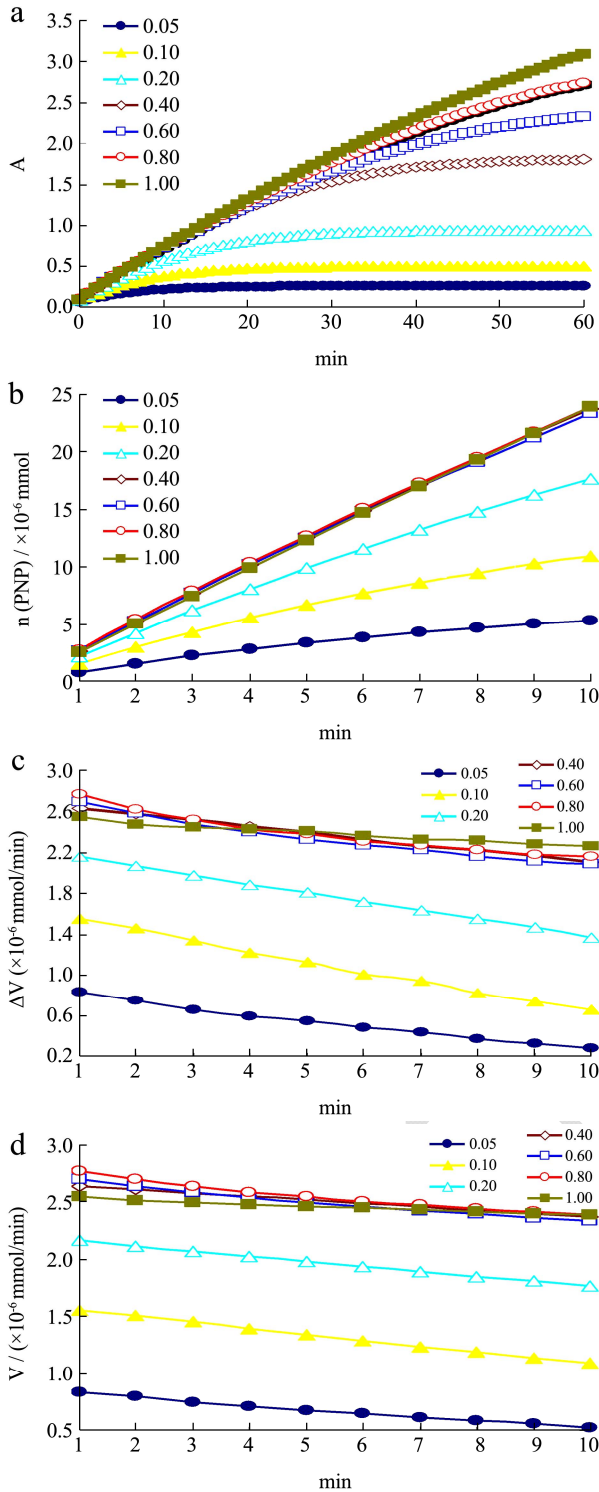


图2 反应速度随时间变化情况分析图

Fig.2 Profile of changes in reaction rate within 60 min

注: a, 前 60 min 的反应速度变化情况图; b, 前 10 min PNP 的生成量; c, 前 10 min 内各时间点的即时反应速度; d, 前 10 min 内各时间点的平均速度。

## 2.2 阿卡波糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

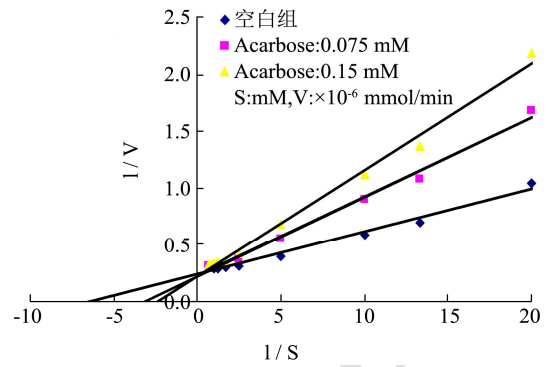


图3 Lineweaver-Burk Plots 法对阿卡波糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据处理结果

Fig.3 The inhibitory effect of acarbose on  $\alpha$ -glucosidase by Lineweaver-Burk plots

表 1 双曲线作图法计算的阿卡波糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的特征参数

	$V_{max}/\times 10^{-6}$ mmol/min	$K_m/mM$	$K_i/mM$	$IC_{50}/mM$
空白组	4.16±0.38 <sup>a</sup>	0.15±0.03 <sup>c</sup>		
A1	4.52±0.33 <sup>a</sup>	0.32±0.05 <sup>b</sup>	0.08±0.02	0.13±0.02
A2	4.66±0.57 <sup>a</sup>	0.44±0.04 <sup>a</sup>		

注: 表中数据后所标注的小写字母表示各处理组间数据在统计学上的差异显著性 ( $p < 0.05$ ), A1 组 (阿卡波糖浓度为 0.075 mM 的处理组)、A2 组 (阿卡波糖浓度为 0.15 mM 的处理组)。

基于上述优化后的体外反应模型, 本文测定了阿卡波糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性, 并采用双倒数作图法处理了测定数据, 结果如图 3 和表 1 所示。由图 3 可知, 采用双倒数作图, C 组 (无抑制剂的空白对照组)、A1 组 (阿卡波糖浓度为 0.075 mM 的处理组)、A2 组 (阿卡波糖浓度为 0.15 mM 的处理组) 三组的  $1/V$  和  $1/S$  均呈现出较好的线性相关性, 线性回归后的  $R^2$  分别达到了 0.9830、0.9927 和 0.9931。三组数据线性回归后的直线近似交于 Y 轴上的一点, 表明反应体系中加入阿卡波糖基本上没有改变其  $V_{max}$  (最大反应速度)。表 3 所列各组酶反应特征参数的计算值也验证了这一点, 虽然加入阿卡波糖后  $V_{max}$  稍有增大, 但方差分析显示三者间无显著差异。从图 3 和表 1 可以看出, 加入阿卡波糖后, 反应的表现  $K_m$  显著增大, 且呈现出明显的量效关系, 表明阿卡波糖与酶结合后, 降低了酶与底物的亲和性。通过进一步的数据计算, 得出了阿卡波糖的  $K_i$  和  $IC_{50}$ , 分别为 80  $\mu M$  和 130  $\mu M$ , 表明其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有较好的抑制作用。综上所述, 阿卡波糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的最大反应速度没有明显影响, 但通过降低酶与底物的亲和力抑制了

该酶的活性，具有竞争型抑制剂的典型的特征，因此属于竞争型抑制剂。本文的研究结果与<sup>[10]</sup>的报导一致，这也从另一角度证明，我们所建立的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型准确、有效，可用于实际筛选。

### 2.3 五种酶抑制动力学数据处理方法比较

目前研究人员已经建立了多种酶抑制反应动力学数据处理和分析方法，Lineweaver-Burk Plots、Eadie-Hofstee Plots、Hanes-Wolff Plots、Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots 和 Non-linear Regression Analysis 是其中较为常用的五种。本文采用上述五种方法，对阿卡波糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的试验数据进行了详细的分析和比较，旨在为酶抑制反应动力学数据分析提供参考。

#### 2.3.1 Eadie-Hofstee Plots 处理结果

该法对米氏方程：

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

进行形式变换，推导出：

$$V = V_{\max} - K_m \left( \frac{V}{[S]} \right) \quad (1)$$

这一形式的动力学方程，该方程中变量  $V$  与变量  $V/[S]$  呈线性相关关系，所表示的直线的斜率为  $-K_m$ ，在  $y$  轴上的截距为  $V_{\max}$ 。本文采用方程 (1) 对阿卡波糖抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据进行拟合，C 组(无抑制剂的空白对照组)、A1 组(阿卡波糖浓度为 0.075 mM 的处理组)、A2 组(阿卡波糖浓度为 0.15 mM 的处理组) 数据所拟合出来的方程分别为：

$$y_c = -0.1323x_c + 3.9184 \quad (R^2 = 0.9311)、$$

$$y_{A1} = -0.2669x_{A1} + 4.1644 \quad (R^2 = 0.9571)$$

$$\text{和 } y_{A2} = -0.3597x_{A2} + 4.1598 \quad (R^2 = 0.9501)。$$

(如图 4a)，利用拟合直线斜率和截距计算出的

$V_{\max}$ 、 $K_m$  和  $K_i$  如表 2 所示。

#### 2.3.2 Hanes-Wolff Plots 处理结果

该法由米氏方程：

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

推导出：

$$\frac{[S]}{V} = [S] \left( \frac{1}{V_{\max}} \right) + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (2)$$

其表示的直线斜率为  $1/V_{\max}$ ，在  $x$  轴上的截距为  $-K_m$ 。本文利用方程 (2) 对阿卡波糖抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据进行拟合(如图 4b)，C 组、A1 组(阿卡波糖浓度为 0.075 mM 的处理组)、A2 组(阿卡波糖浓度为 0.15 mM 的处理组) 数据的拟合直线分别为

$$y_c = 0.2748x_c + 0.0261 \quad (R^2 = 0.9938)、$$

$$y_{A1} = 0.2556x_{A1} + 0.0583 \quad (R^2 = 0.9932)$$

$$\text{和 } y_{A2} = 0.2558x_{A2} + 0.0806 \quad (R^2 = 0.9903)。$$

计算出来的  $V_{\max}$ 、 $K_m$  和  $K_i$  如表 2 所示。

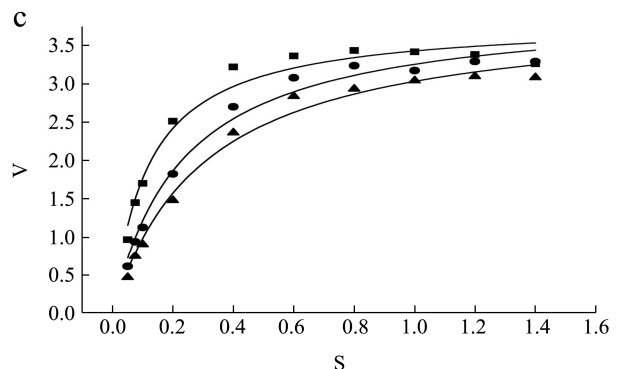
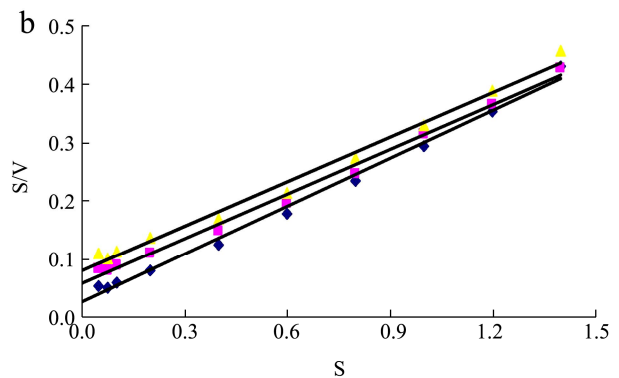
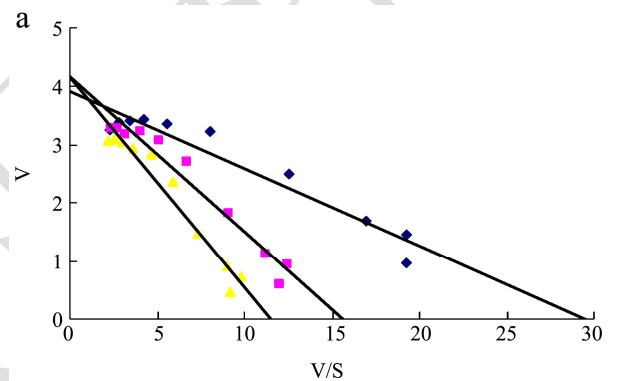
#### 2.3.3 Non-linear-Regression Analysis 处理结果

米氏方程：

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

方程中  $V$  和  $[S]$  两个变量之间为双曲线相关关系，该法利用这一相关关系进行非线性拟合，可直接得出  $V_{\max}$  和  $K_m$  两个参数，然后通过计算可得  $K_i$ 。本文采用 Origin (8.0) 软件对阿卡波糖抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据进行了非线性双曲线拟合，拟合结果如图 4c 所示，计算出来的  $V_{\max}$ 、 $K_m$  和  $K_i$  如表 2 所示。

#### 2.3.4 Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots 处理结果



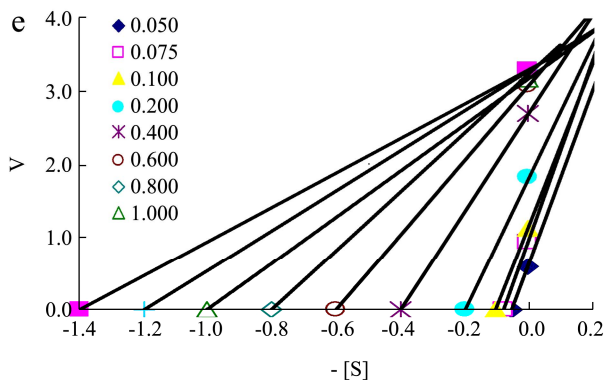
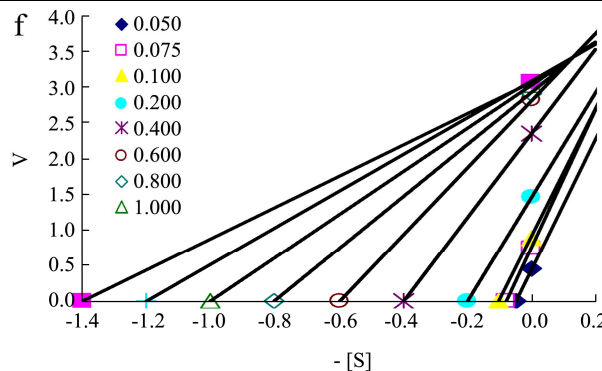
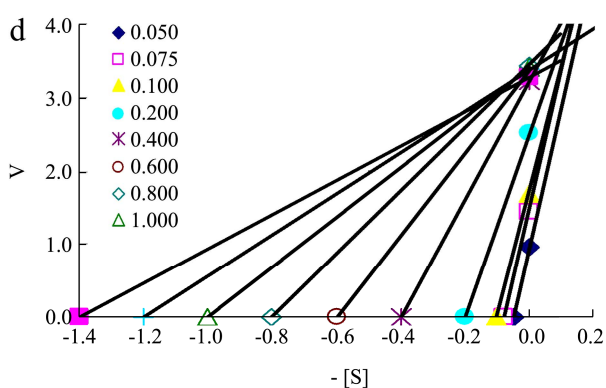


图4 四种酶动力学数据处理方法对阿卡波糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据处理结果

Fig. 4 Results obtained after processing the inhibitory effects of acarbose on alpha glucosidase by four methods of enzyme kinetics data processing

注: a, Eadie-Hofstee Plots 法处理结果; b, Hanes-Wolff Plots 法处理结果; c, Non-linear-Regression Analysis 法处理结果; d, Eienthal-Cornish-Bowden Direct Plots 法处理 C (对照组) 数据结果; e, Eienthal-Cornish-Bowden Direct Plots 法处理 A1 组 (0.075 mM) 数据结果; f, Eienthal-Cornish-Bowden Direct Plots 法处理 A2 组 (0.15 mM) 结果

表2 五种数据处理方法所获得的  $V_{max}/\times 10^{-6}$  mmol/min、 $K_m/mM$  及  $K_i/mM$  ( $\bar{x} \pm SD$ )

	空白组		A1		A2		$K_i$
	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	
E-H	3.94±0.29 <sup>a</sup>	0.13±0.02 <sup>c</sup>	4.16±0.33 <sup>a</sup>	0.27±0.03 <sup>b</sup>	4.12±0.36 <sup>a</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>ab</sup>
H-W	3.64±0.15 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>c</sup>	3.96±0.38 <sup>a</sup>	0.23±0.04 <sup>b</sup>	3.94±0.38 <sup>a</sup>	0.32±0.03 <sup>a</sup>	0.06±0.02 <sup>b</sup>
N-L	3.91±0.21 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>c</sup>	4.01±0.26 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>b</sup>	4.04±0.27 <sup>a</sup>	0.31±0.02 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>a</sup>
L-B	4.16±0.38 <sup>a</sup>	0.15±0.03 <sup>c</sup>	4.52±0.33 <sup>a</sup>	0.32±0.05 <sup>b</sup>	4.66±0.57 <sup>a</sup>	0.44±0.04 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>ab</sup>
E-C	3.93±0.3 <sup>b</sup>	0.14±0.02 <sup>c</sup>	4.11±0.33 <sup>ab</sup>	0.28±0.01 <sup>b</sup>	4.21±0.38 <sup>a</sup>	0.37±0.02 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>ab</sup>

注: E-H, Eadie-Hofstee Plots、H-W, Hanes-Wolff Plots、N-L, Non-linear-Regression Analysis、L-B, Lineweaver-Burk Plots、E-C, Eienthal-Cornish-Bowden Direct Plots; 不同小写字母表示存在显著差异 ( $p < 0.05$ ),  $V_{max}$  与  $K_m$  组的字母标记是指同种方法不同组别间的比较,  $K_i$  组的字母标记则表示不同方法间的比较, 且  $K_i$  值为 A1 与 A2 两组处理所得的均值; A1 组 (阿卡波糖浓度为 0.075 mM 的处理组)、A2 组 (阿卡波糖浓度为 0.15 mM 的处理组)。

Eisenthal 和 Cornish-Bowden 于 1974 报道该法<sup>[11]</sup>, 方法如下: 以  $V$  和  $[S]$  为数据对, 在  $y$  轴上标出数值为  $V$  的点, 在  $x$  轴上标出数值为  $-[S]$  的点, 两点相连成一条直线, 各直线相交于一点, 该点的横坐标和纵坐标分别是  $K_m$  和  $V_{max}$  值。本文以该法处理阿卡波糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据, 结果如图 4d、4e 和 4f 所示, 计算出来的  $V_{max}$ 、 $K_m$  和  $K_i$  如表 2 所示。

### 2.3.5 五种数据处理方法比较

本文采用 Lineweaver-Burk Plots、Eadie-Hofstee Plots、Hanes-Wolff Plots、Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots 和 Non-linear Regression Analysis 五种酶动力学数据处理方法对阿卡波糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性

试验数据进行了较为详细的处理和对比分析, 发现五种方法各有特点, 各法所获得的  $V_{max}$ 、 $K_m$  和  $K_i$  存在一定的差异 (见表 2)。因此, 在酶动力学试验中应注意针对实际情况合理选择数据处理方法。

(1) Lineweaver-Burk Plots 法: 操作简便, 高质量的试验数据可获得较高的拟合度, 但低底物浓度点的误差会被大幅放大。从本文以该法处理阿卡波糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据来看, C 组、A1 组和 A2 组三个处理组的  $V$  和  $[S]$  数据经倒数变换后回归出来的直线, 难以交于一点。特别值得注意的是, 阿卡波糖是竞争型抑制剂<sup>[10]</sup>, 理论上三条直线应交于  $y$  轴上的一个点, 但我们进行了很多次试验, 可近似交于

靠近 y 轴的一个点, 但很难准确地交于 y 轴上的一个点。因此, 我们建议对该法获得的  $V_{\max}$  和  $K_m$  进行单因素方差分析, 用统计学的方法来判断加入抑制剂前后的  $V_{\max}$  和  $K_m$  有无显著差异, 据以来准确判断抑制剂的类型。其它四种方法也不同程度的存在这个问题, 均可采用此法来处理 and 判断。此外, 数据经倒数处理可能带来较大的误差, 特别是低底物浓度的点, 会放大误差, 造成结果上的不准确<sup>[9]</sup>。

(2) Eadie-Hofstee Plots 法: 处理简便, 但拟合度较低。以该法处理阿卡波糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据, 拟合的  $R^2$  值均低于 0.96, 空白组的  $R^2$  仅为 0.9311。

(3) Hanes-Wolff Plots 法: 操作简便, 但低底物浓度点的离散性较大, 影响了结果的准确性。

(4) Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots 法: 数据处理量大, 且所得数据离散性较大, 难以获得准确结果。该法以数据对作图时会产生非常多的直线, 除非试验数据非常准确, 否则这些直线很难以交于一点。因此, 本文将所有两两相交的交点坐标加和后进行平均, 据此计算  $V_{\max}$  和  $K_m$ 。

(5) Non-linear-Regression Analysis 法: 操作简便, 不需要对数据进行形式变换, 直接以  $V$  和  $[S]$  进行双曲线拟合, 因此没有其它几种方法因数据变换带来的误差。该法另外一个显著的优点是, 可适用于较大的底物浓度范围, 0.25~5.0  $K_m$  的范围均可<sup>[9]</sup>。虽然这种方法简便易行, 且结果准确可靠, 但需要专业计算软件。随着计算机技术的快速发展和各种计算软件的普及, 这种非线性拟合方法将会得到迅速推广。从本文以该法处理阿卡波糖抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性试验数据来看, 所得参数  $V_{\max}$ 、 $K_m$  和  $K_i$  的标准偏差相对于其它四种方法来说比较小。从表 2 数据可知, 阿卡波糖未改变反应的  $V_{\max}$ , 其主要是通过降低酶与底物的亲和力来抑制酶活, 据此可判断其为竞争型  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂; 此法计算所得的  $K_i$  均值为 90  $\mu\text{M}$ , 与相关文献报道一致<sup>[10]</sup>。

基于以上分析, 我们认为 Non-linear-Regression Analysis 法更加简便、合理和可靠, 是酶动力学数据处理的首选方法。

### 3 结论

本文建立了微量、快速的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型, 该模型的主要参数如下: 酶浓度为 0.05 U/mL; 底物浓度范围为 0.05~1 mM; 反应温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ ; 反应时间为 6 min。以该模型检测了阿卡波糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并采用 Lineweaver-Burk

Plots、Eadie-Hofstee Plots、Hanes-Wolff Plots、Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots 和 Non-linear Regression Analysis 五种方法对该酶反应动力学数据进行了详细的对比和分析, 结果表明, 各法所获得的  $V_{\max}$ 、 $K_m$  和  $K_i$  存在一定的差异, Non-linear-Regression Analysis 法更加简便、合理及可靠, 是酶动力学数据处理的首选方法。

### 参考文献

- [1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas [M]. 2013
- [2] 杨明会, 柯新桥, 巴元明. 糖尿病 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010  
YANG Ming-hui, KE Xin-qiao, BA Yuan-ming. Diabetes [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010
- [3] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2011  
Chinese Medical Association Diabetes Branch. Guidelines for prevention and treatment of type 2 diabetes in China [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2011
- [4] International Diabetes Federation. Global guideline for type 2 diabetes [M]. 2012
- [5] 徐俊, 鲍娇琳, 沈伟哉, 等. 穿心莲内酯衍生物炎琥宁对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性及机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1637-1640  
XU Jun, BAO Jiao-lin, SHEN Wei-zai, et al. Inhibitor effect and mechanism of potassium sodium dehydroandrographolide succinate (PSDS) as an  $\alpha$ -glucosidase [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(7): 1637-1640
- [6] ZHANG Zhong, LUO Ai-min, ZHONG Kai et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity by the flower buds of *Lonicera japonica* thunb [J]. Journal of Function Foods, 2013, 5(3): 1253-1259
- [7] HONG Gao, JUN Kawabata.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2, 3, 4-trihydroxybenzoyl -containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13(5): 1661-1671
- [8] YE Xiao-ping, SONG Chun-qing, YUAN Ping et al. Alpha-glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of common constituents from traditional Chinese medicine used for diabetes mellitus [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, 8(5): 349-352

- [9] Robert A. Copeland. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis [M]. New York: Wiley-VCH, Inc. 2000
- [10] Van de Laar F A, Lucassen P L B J, Akkermans R P et al. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus: a systematic review [J]. Chinese Journal of Evidence Based Medicine, 2006, 6(5): 335-351
- [11] R Eisenthal A, Cornish-Bowden. The direct linear plot: A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters [J]. Biochemical Journal, 1974, 139(3): 715-720

现代食品科技