

研究简报 ·

## 尼古丁是脂肪酶的反竞争抑止剂的实验研究

林琳<sup>a</sup> 陈锡侨<sup>b</sup> 赵福群<sup>a</sup> 唐应武<sup>a</sup> 张复实<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> 清华大学化学系 有机光电子与分子工程教育部重点实验室 北京 100084)

(<sup>b</sup> 澳门大学科技学院 澳门 邮政信箱 3001 号)

**摘要** 希望明确尼古丁对脂肪酶活性是否有抑止作用,用于解释医学已有统计数据:吸烟的人体重普遍较轻,而戒烟后体重会有回升.用三油酸甘油酯为底物,在加入尼古丁前后,检测脂肪酶活性变化.结果表明:脂肪酶在人体外仍有活性,而且尼古丁是脂肪酶反竞争性抑止剂.在脂肪酶浓度为 7 mg/mL 时,抑止程度达 50%.

**关键词** 脂肪酶,尼古丁,三油酸甘油酯,油酸

## Study of Nicotine Acting as an Uncompetitive Inhibitor of Lipase

LIN, Lin<sup>a</sup> CHAN, Shek-Kiu<sup>b</sup> ZHAO, Fu-Qun<sup>a</sup> TANG, Ying-Wu<sup>a</sup> ZHANG, Fu-Shi<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> Key Lab of Organic Optoelectronic & Molecular Engineering, Ministry of Education

Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

(<sup>b</sup> Department of Science and Technology, University of Macau, Macau)

**Abstract** The aim of the study is to determine the role of nicotine as a lipase inhibitor in fat and fatty acid metabolism and to explain the clinic phenomenon: smokers weigh less than age-matched nonsmokers, and most of smokers gain weight after smoking cessation. Lipase activity was measured in the presence or absence of nicotine using olein as substrate. Lipase is active *in vitro*. Nicotine is demonstrated to be an uncompetitive inhibitor of lipase at biologically reachable concentration. It is shown that the activity of lipase was reduced to 50% at lipase concentration of 7 mg/mL.

**Key words** lipase, nicotine, olein, oleic acid

吸烟有害健康,但临床统计数据发现一个有趣的规律,吸烟者的体重普遍低于同龄的非吸烟者,戒烟后,大部分人的体重在一段时间内会有所增加<sup>[1,2]</sup>.对这一现象的解释有很多,有医生发现,戒烟后体重增加是因为食欲不能得到抑止,饮食量增加所致<sup>[3]</sup>;也有研究指出,这种体重的增加是由于戒烟患者的内分泌发生变化,导致新陈代谢减慢,消耗能量减少<sup>[4]</sup>.本文拟研究人体吸收烟雾后,体内发生的生物化学反应,明确戒烟后体重增加的本质原因.

烟雾中含有 4000 余种化学物质<sup>[5]</sup>,其中 200 多种对人体有害,40 多种有致癌性.而其中浓度最高、对人体危害最大的化学物质是尼古丁.根据人体脂类代谢规律,我们研究了人体最重要的脂代谢过程与尼古丁的关系,即脂肪和脂肪酸的吸收与尼古丁的关系.在小肠中,人体对脂肪的吸收是

由脂肪酶催化的生物化学反应.酶活性的高低直接导致人体吸收脂肪的快慢.在尼古丁存在和不存在的条件下,分别检测这种生物酶活性的高低,可直接了解尼古丁是否对人脂肪代谢和体重增减有关.

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器和材料

仪器: HP8452 型分光光度计(美国惠普).

材料:猪胰脂肪酶,胆盐(均为美国 Sigma 公司产品),尼古丁(为德国 Merck 公司产品),三油酸甘油酯和油酸,橄榄油,聚乙烯醇等试剂均为国产分析纯.

\* E-mail: zhangfs@tsinghua.edu.cn

Received August 25, 2003; revised December 15, 2003; accepted March 15, 2004.

澳门大学研究基金(RG013/02-03W/CSK/FST)资助项目.

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 脂肪酶活性测定

反应时间较短(3~15 min)时,可以认为反应酯解反应是每分子甘油三酯生成一分子脂肪酸和一分子甘油二酯.以橄榄油为底物,水解所放出的脂肪酸,可以用标准的碱溶液滴定,在底物完全过量情况下,用滴定值表示酶活力.(1)精确称取0.1000 g 酶粉,加少量水调匀成糊状,再加水定容至10 mL,制成稀释100倍的酶液.(2)取100 mL 锥形瓶两个,每瓶加5 mL 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液和4 mL 聚乙烯醇橄榄油乳化液,置37 °C 水浴中预热10 min,然后加入酶液1 mL,从开始加入酶液精确计时,保温15 min,立即加入无水乙醇15 mL,终止酶反应.加酚酞指示剂三滴,用0.05 mol/L 氢氧化钠标准溶液滴至微红色,并同时做空白对照,对样品中的乙醇在酶液前加入,不需保温.

### 1.2.2 显色法测量酯解产物油酸的浓度和吸光度的关系

配制浓度范围0~2.88 mmol/L 的油酸-苯标准溶液,用显色法测量吸光度,绘制成标准曲线.显色法:取0.2 mL 待测液(已知浓度的油酸-苯标准溶液),加入盛有4.8 mL 苯和1.0 mL 醋酸铜-吡啶溶液(5%醋酸铜溶液用吡啶调pH至6.1)的比色管中,电磁搅拌显色10 min,离心使混合液分层.取上层有机相,用分光光度计测710 nm 波长处的吸光度,以同样方法制备空白溶液作为参比.

### 1.2.3 尼古丁对酶促动力学影响

取15 mL 缓冲液(pH=8.9)和0.100 g 脂肪酶,胆盐0.100 g,置于25 mL 圆底烧瓶中,在37 °C 水浴中预热10 min.加入三油酸甘油酯,电磁搅拌,并从加入三油酸甘油酯时起精确计时,保温反应3 min.取0.2 mL 反应液,加入显色剂中,在可见光区710 nm 处测量吸收值.对比实验中,尼古丁的水溶液与酶同时加入.最后反应系统中脂肪酶溶液的浓度为7 mg/mL;尼古丁溶液浓度为 $1.04 \times 10^{-2}$  mol/L(人体内致死浓度为大于 $10^{-2}$  mol/L).

### 1.2.4 尼古丁浓度改变对酶活性的影响

取15 mL 三油酸甘油酯浓度为0.18 mol/L 的缓冲液(pH=8.9),加入不同浓度的尼古丁,置于25 mL 圆底烧瓶中,在37 °C 水浴中预热10 min.加入0.100 g 脂肪酶和0.100 g 胆盐,电磁搅拌,并从加入脂肪酶和胆盐时起精确计时,保温反应3 min.取0.2 mL 反应液,加入显色剂中,在可见光区710 nm 处测量吸收值.

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂肪酶活性测定

空白液滴定用0.05 mol/L 氢氧化钠标准溶液2.97 mL;待测液滴定用0.05 mol/L 氢氧化钠标准溶液5.37 mL,与空白液差值2.40 mL.这一数据满足此法测脂肪酶活力的原则:测定酶溶液样品和对照样品耗碱量相差2~5 mL.

酶活力定义为:脂肪酶在以上反应条件下,水解甘油三

酯每分钟产生1 μmol 脂肪酸的酶量为一个单位.

$$\begin{aligned} \text{酶活力} &= \frac{\text{每分钟产生脂肪酸量}}{\text{酶量}} \\ &= \frac{2.40 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0.05 \text{ mol/L}}{\left(\frac{1}{10} \times 0.1003 \text{ g}\right) \times 15 \text{ min}} \times 10^6 \mu\text{mol/mol} \\ &= 797.6 \text{ U/g} \end{aligned}$$

误差分析:根据误差的传递,计算间接测量结果-脂肪酶活力的误差.根据碱式滴定管标准差0.2 mL,电子天平测量标准差0.10 mg,测量时间偏差1 s,则有:

$$\begin{aligned} \frac{S_R}{\text{酶活力}} &= \sqrt{\left[\frac{S(V)}{V}\right]^2 + \left[\frac{S(m)}{m}\right]^2 + \left[\frac{S(t)}{t}\right]^2} \\ &= \sqrt{\left[\frac{0.2}{2.4}\right]^2 + \left[\frac{0.01}{100.3}\right]^2 + \left[\frac{1}{15 \times 60}\right]^2} \\ &= 0.083 \\ S_R &= \frac{S_R}{\text{酶活力}} \times \text{酶活力} = 0.083 \times 797.6 = 66 \\ \text{酶活力} &= (798 \pm 66) \text{ U/g} \end{aligned}$$

### 2.2 油酸的浓度和吸光度的关系

将吸光度值对油酸浓度做图,可得到图1.经过拟合,图1的直线方程为:

$$A = -0.015 + 0.411 X$$

其中,  $X$  为油酸浓度.直线的  $R = 0.994$ .

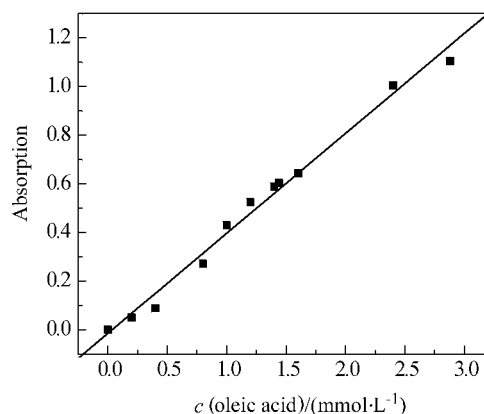


图1 油酸浓度和吸光度的关系.直线方程为:  $A = -0.015 + 0.411 X$ .其中,  $X$  为油酸浓度.  $R = 0.994$

Figure 1 The standard line of the concentration of oleic oil and absorption. The line equation is  $A = -0.015 + 0.411 X$ ,  $X$  means the concentration of oleic oil.  $R = 0.994$

### 2.3 尼古丁对酶促动力学影响

底物为三油酸甘油酯,经脂肪酶促水解后,生成油酸和二油酸甘油酯.通过油酸浓度与吸光度的关系曲线,根据反

应体系吸光度变化,测定反应的实际速度.在加入尼古丁后,同样方法测量反应速度.用底物浓度对反应速度做图得到图2.

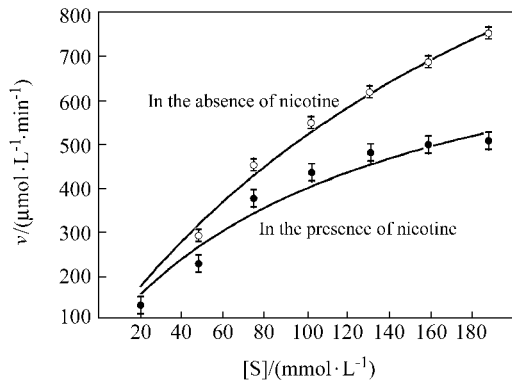


图2 反应速度与底物浓度的M-M方程拟合曲线.其中空心点为未加入尼古丁时数据点,实心点为加入尼古丁后数据点  
Figure 2 The Michaelis-Menten line in the absence or presence of nicotine. Hollow dots present the data in the absence of nicotine and solid dots present the data in the presence of nicotine

用数学软件(Origin 5.0)拟合M-M酶促曲线得到两个脂肪酶的动力学方程,其中 $v$ 为反应速度, $[S]$ 为底物浓度:  
在没有尼古丁加入的情况下:

$$v = \frac{1739[S]}{[S] + 9.1 \times 10^{-3}}, \text{相关度 } R^2 = 0.99.$$

在尼古丁浓度  $1.04 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  的情况下:

$$v = \frac{877[S]}{[S] + 4.7 \times 10^{-3}}, \text{相关度 } R^2 = 0.98.$$

可以将M-M曲线做双倒数图,用底物浓度的倒数对反应速度的倒数做图,得到相应的Lineweaver-Burk双倒数图,如图3所示.

用数学软件(Origin 5.0)拟合Lineweaver-Burk双倒数图,得到加入尼古丁前后的直线方程:

在没有尼古丁加入的情况下:

$$\frac{1}{v} = 5.92 \times 10^{-4} + 0.13 \frac{1}{[S]}, \text{线性相关度 } R = 0.999.$$

在尼古丁浓度  $1.04 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  的情况下:

$$\frac{1}{v} = 12 \times 10^{-4} + 0.13 \frac{1}{[S]}, \text{线性相关度 } R = 0.998.$$

从以上线性关系可以知道脂肪酶的 $v_{\max}$ 和 $K_m$ 的变化如表1.加入尼古丁前后,脂肪酶 $v_{\max}$ 值变小, $K_m$ 值也变小,而

$v_{\max}/K_m$ 值不变.

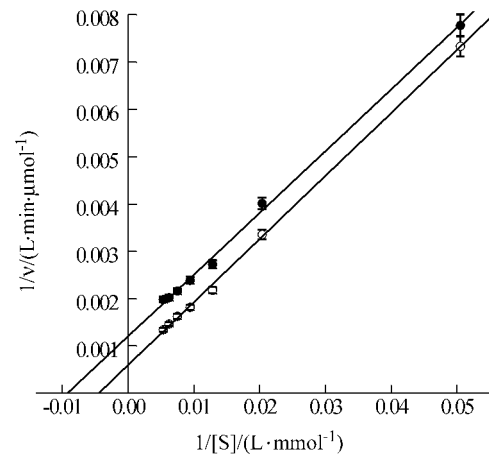


图3 反应速度与底物浓度的Lineweaver-Burk双倒数拟合曲线.其中空心点为未加入尼古丁时数据点,实心点为加入尼古丁后数据点

Figure 3 The Lineweaver-Burk curve of reaction rate and the concentration of substrate. The lines are in the absence or presence of nicotine. Hollow dots present the data in the absence of nicotine and solid dots present the data in the presence of nicotine

表1 加入尼古丁前后脂肪酶的 $v_{\max}$ 和 $K_m$

Table 1 The value of  $v_{\max}$  and  $K_m$  in the absence or presence of nicotine

	$v_{\max}/(\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1})$	$K_m/(\mu\text{mol L}^{-1})$
In the absence of nicotine	1739	$9.1 \times 10^{-3}$
In the presence of nicotine	877	$4.7 \times 10^{-3}$

## 2.4 尼古丁浓度改变对酶活性的影响

在尼古丁浓度改变时,此酶促反应的初始速度发生改变(图4).结果表明:不同浓度的尼古丁对脂肪酶均有不同程度的抑制作用.

## 3 讨论

实验中验证酶活力的主要目的就是考察在人体外,脂肪酶是否还有应有的活性.实验证明,脂肪酶活性保持良好.在测定酶促反应速度时,我们又加入了胆盐.胆盐的作用类似于表面活性剂<sup>[6]</sup>,它可以增大脂溶性的脂肪酶和水溶液的接触面积,更好的和乳糜状态存在的脂肪小颗粒接触并发生酯解反应.

在加入尼古丁后,脂肪酶活性被抑止,在尼古丁浓度较大时,当酶浓度为  $7 \text{ mg/mL}$  时,抑止程度达  $50\%$ .脂肪酶动力学曲线 $v_{\max}$ 值变小, $K_m$ 值也变小,而 $v_{\max}/K_m$ 值不变.这表明了尼古丁是脂肪酶的反竞争性抑止剂.脂肪酶活性降低,预计导致人体内酯解困难,可吸收的游离脂肪酸减少.从而

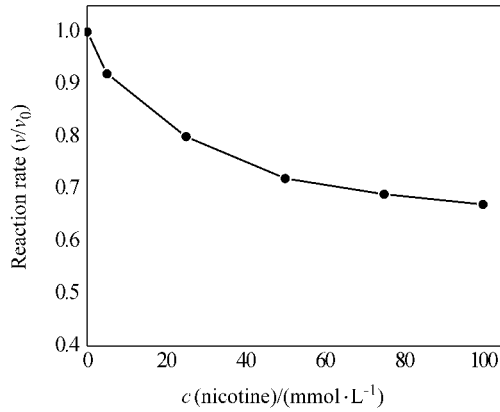


图4 不同的尼古丁浓度对脂肪酶初始反应速度的影响

Figure 4 Effects of nicotine concentration on initial reaction rate

有可能直接导致吸烟人群体重较低;而在戒烟后,脂肪酶的

活性恢复,戒烟人群的体重也会比吸烟时有所增加,直达到体内新的代谢平衡.

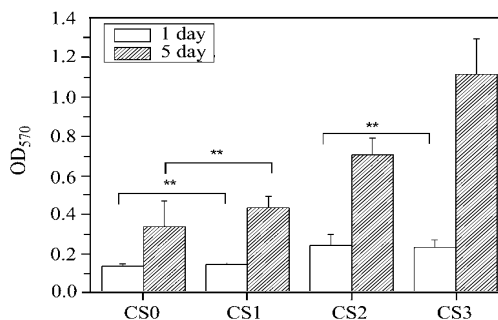
## References

- 1 Li, M. D.; Kane, J. K.; Konu, O. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3(8), 899.
- 2 Saah, M. I.; Raygada, M.; Grunberg, N. E. *Life Sci.* **1994**, 55(12), 925.
- 3 Swislocki, A. L. M. *Metabolism* **2003**, 52(1), 67.
- 4 Nicklas, B. J.; Tomoyasu, N.; Muir, J.; Goldberg, A. P. *Metabolism* **1999**, 48(6), 804.
- 5 Layten, D. D.; Nielsen, M. T. *Tobacco*, Vol. 27, Blackwell Science Limited, Oxford, **1999**, p. 380.
- 6 Tilbeurgh, H. V.; Bezzin, S. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1441, 173.

(A0308251 PAN, B. F.; LING, J.)

### Growth of Human Fetal Lung Fibroblasts on the Natural Biomaterial Chitosan Scaffold

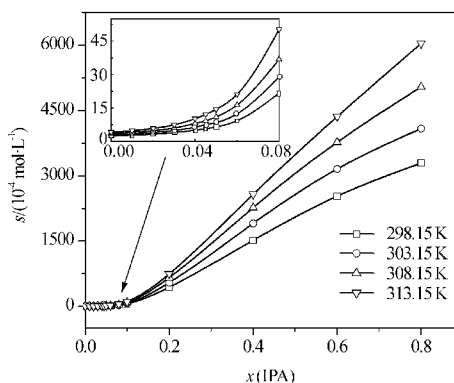
CHEN, Guang; ZHOU, Ping; PAN, Luan Feng; MEI, Na; WU, Chuan Gen; CHEN, Xin; SHAO, Zheng Zhong  
*Acta Chimica Sinica* 2004, 62(10), 992



Human fetal lung fibroblasts are cultured on a series of chitosan scaffolds for one day and five days, respectively. The rate of cell proliferation depends remarkably on the pore sizes of scaffolds, where the order of pore sizes is CS0 (non-porous) < CS1 (35 ± 8) μm < CS2 (50 ± 12) μm < CS3 (100 ± 20) μm. The plots shows evidently that more cells proliferate on the scaffolds with bigger pores after 5 days.

### Effect of Intermolecular Interactions on the Thermodynamic Properties of Transfer of Naphthalene in Water-isopropyl alcohol Solutions

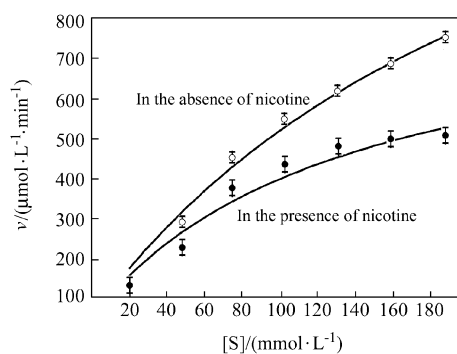
ZHOU, Bao-Xue; CAI, Wei-Min; He, Zheng Guang; Cai, Jun; ZOU, Li-Zhuang  
*Acta Chimica Sinica* 2004, 62(10), 998



The solubilities of naphthalene in H<sub>2</sub>O-isopropyl alcohol (IPA) mixtures increase with increasing  $x(\text{IPA})$  very slowly at low  $x(\text{IPA})$  and sharply at  $x(\text{IPA}) = 0.06$ .

### Study of Nicotine Acting as an Uncompetitive Inhibitor of Lipase

LIN, Lin; CHAN, Shek-Kiu; ZHAO, Fu-Qun; TANG, Ying-Wu; ZHANG, Fu-Shi\*  
*Acta Chimica Sinica* 2004, 62(10), 1003



The aim of the study is to determine the role of nicotine as a lipase inhibitor in fat and fatty acid metabolism. We have shown that the activity of lipase (hollow dots) was reduced to 50% (solid dots) at lipase concentration of 7 mg/mL. Nicotine is demonstrated to be an uncompetitive inhibitor of lipase.