

血脂灵片对脂肪酸合酶的体外抑制作用

王鹏, 高敏艳, 高岚, 肖学风*
(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] **目的:**研究血脂灵片对脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)的体外抑制作用,并初步探索其作用机制。**方法:**以乙酰辅酶 A (AcCoA), 丙二酰辅酶 A (MalCoA), 乙酰乙酰辅酶 A (AcAcCoA), 乙酰乙酸乙酯, 丁烯酸乙酯, 原型辅酶 II (NADPH) 等为底物, 采用紫外分光光度法, 通过测定 340 nm 下 NADPH 吸光度值的变化进行 FAS 活性测定, 研究不同剂量血脂灵片对 FAS 全反应及不同活性中心的体外抑制作用。**结果:**血脂灵片对 FAS 具有抑制作用, 给药浓度达到 150 mg·L⁻¹ 时, 能够抑制 51% 的酶活性, 且对 FAS 的抑制具有剂量和时间依赖关系。对于 FAS 的不同活性中心, 血脂灵片作用不同, 其对烯酰还原反应和 AcAcCoA 还原反应的抑制稍强于酮酰还原反应, 随着给药浓度的增加, 对各活性中心的抑制能力逐渐增强, 当给药浓度达到 150 mg·L⁻¹ 时, 各个活性中心剩余活性均小于 70%, 但仍保留有 50% 以上的剩余活性。**结论:**血脂灵片对 FAS 具有一定的抑制作用, 且对 FAS 的抑制是通过作用于多个位点实现的。实验为血脂灵片降血脂作用与靶点 FAS 有关的推断提供了实验依据, 并为血脂灵片应用于肥胖症等 FAS 靶点相关疾病提供了参考。

[关键词] 血脂灵片; 脂肪酸合酶; 抑制作用; 抑制机制; 降血脂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0180-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121029.1633.005.html>

[网络出版时间] 2012-10-29 16:33

Inhibition of Fatty Acid Synthase *in vitro* by Xuezhiling Tablets

WANG Peng, GAO Min-yan, GAO Lan, XIAO Xue-feng*
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibition of fatty acid synthase (FAS) by Xuezhiling tablets *in vitro*, and explore its mechanism of action. **Method:** The ultraviolet spectroscopy was used to evaluate the activity of FAS through monitoring the alteration of absorbance (A) value of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and the substrates were respectively acetyl coenzyme A (AcCoA), malonyl-CoA (MalCoA), acetoacetyl-coenzymeA (AcAcCoA), ethyl acetoacetate, ethyl crotonate, NADPH for different active sites. The inhibition of FAS by overall reduction and different active sites was separately detected after the treatment with different doses of Xuezhiling tablets. **Result:** The activity of FAS could be inhibited by Xuezhiling tablets. After the treatment with Xuezhiling tablets (150 mg·L⁻¹), the inhibition ratio was 51% with manner if time and dose relationship. For the different active sites of FAS, Xuezhiling tablets displayed different abilities. It showed more potential in inhibiting the enoyl reduction and AcAcCoA reduction than keto-acyl reduction, and it was also dose dependent for the different active sites. The residual activity of different active sites was less than 70%, and more than 50%, when FAS was treated with Xuezhiling tablets at the concentration of 150 mg·L⁻¹. **Conclusion:** FAS can be inhibited by Xuezhiling tablets, and this ability was attributed to inhibit the different active sites of FAS. This article prove that the ratiocination about the lowering blood lipids of Xuezhiling tablets is related to FAS and it can be a reference for Xuezhiling tablets used for obesity and other disease that related to FAS.

[收稿日期] 20120628(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973932)

[第一作者] 王鹏, 硕士研究生, E-mail: binbinmanzhouli@126.com

[通讯作者] *肖学风, 教授, 从事中药药动力学, 代谢组学研究, Tel: 022-81820938, E-mail: kai1219@163.com

[Key words] Xuezhiling tablets; fatty acid synthase (FAS); inhibitory action; inhibition mechanisms; lowering blood fat

血脂灵片由4味药组成:制首乌、决明子、泽泻、山楂。其中,制首乌为君,功能补肝肾,益精血^[1],辅以决明子降压降脂,明目通便^[2],佐用泽泻利水渗湿^[3],外加山楂消食化积,散瘀行滞^[4],四药合用补泻并施,虚实兼顾,具有化浊降脂,润肠通便的功效,用于痰浊阻滞型高脂血症,症见头昏胸闷、大便干燥^[5]。早期文献^[6]表明,血脂灵片亦有良好的减肥作用。

脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)是内源性脂肪酸合成的关键酶,广泛存在于动、植物细胞中,是一种复杂的多酶复合物,为2条完全相同的多肽链(亚基)首尾相连组成的二聚体,每条多肽链除含有7个活性中心(其中每条多肽链的N端包含 β -酮酯酰合成酶(-ketoacyl synthase, KS)、乙酰/丙二酰转移酶(acetyl/malonyl transferase, MAT)以及脱水酶(dehydrase, DH);而C端则含有烯酰还原酶(enoyl reductase, ER)、 β -酮脂酰还原酶(-ketoacyl reductase, KR)、酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)、硫酯酶(thioesterase, TE), DH和ER之间由600个稳定二聚体结构的氨基酸残基组成的核心区域所分隔^[7-8])以外,还含有一个4'-磷酸泛酰巯基乙胺辅基(即ACP-4-PP活臂)^[9-10]。

近年来,许多研究成果提示FAS的表达水平与肥胖等疾病具有相关性,可以作为寻找肥胖、高血脂和肿瘤预防和治疗的靶标^[11-13]。目前关于血脂灵片降脂作用机制是否与降脂靶点FAS有关,以及血脂灵片是否具有应用于肥胖症等FAS靶点相关疾病的潜力尚未见报道。由于人类FAS的各种酶活性与其他动物的FAS活性相当^[14],因此,笔者进行了一系列体外实验,研究血脂灵片对鸭肝FAS的全反应活性和不同活性中心反应活性的抑制,判断其抑制作用及作用机制,进而推测FAS是否为血脂灵片降血脂的靶点。

1 材料

1.1 仪器 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), ZK-82A型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂),1/万电子天平(瑞士Mettler Toledo公司),UV-2401PC型紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 试药 血脂灵片(自制),所用药物炒决明子(批号09070851),山楂(批号09050871),制首乌(批号09060831),泽泻(批号09040861)均购自河

北省安国市神禾中药材饮片有限责任公司。二硫代苏糖醇(DTT)、乙酰辅酶A(AcCoA)、丙二酰辅酶A(MalCoA)、乙酰乙酰辅酶A(AcAcCoA)、还原型辅酶II(NADPH)、丁烯酸乙酯(均为Sigma公司分装产品);其他试剂均为国产分析纯;FAS系从新鲜鸭肝中分离提纯,其制备和存储采用Tian等报道的方法^[15],制得的FAS活力达到 $4.51 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 方法

2.1 血脂灵片的制备 参照药典方法进行血脂灵片的制备,制得的血脂灵片各项指标符合药典规定,其中指标成分大黄素质量分数 $0.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷质量分数 $8.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 FAS反应活性测定 采用紫外分光光度法,分别进行不同剂量血脂灵片对鸭肝FAS全反应和不同活性中心抑制作用的测定,测定方法参照文献方法^[16]制定,具体测定方法如下。

2.2.1 全反应活性(overall reduction)测定 以 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AcCoA, $12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MalCoA, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH为底物,反应体系为含有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸(EDTA), $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0)缓冲液。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育恒温,加入 $40 \mu\text{g}$ 酶液,反应时加入NADPH启动反应,监测 340 nm 波长下吸光度(A)的变化,以初速度计算FAS活性,反应总体积 2 mL 。

2.2.2 酮酰还原反应(keto-acyl reduction)活性测定 以 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰乙酸乙酯, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH为底物,反应体系为含有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0)缓冲液。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育恒温,加入 $40 \mu\text{g}$ 酶液,反应时加入NADPH启动反应,监测 340 nm 波长下A的变化,以初速度计算FAS活性,反应总体积 2 mL 。

2.2.3 烯酰还原反应(enoyl reduction)活性测定 以 $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁烯酸乙酯, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH为底物,反应体系为含有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0)缓冲液。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育恒温,加入 $40 \mu\text{g}$ 酶液,反应时加入NADPH启动反应,监测 340 nm 波长下A的变化,以初速度计算FAS活性,反应总体积 2 mL 。

2.2.4 AcAcCoA还原反应(AcAcCoA reduction)活

性测定 以 $31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AcAcCoA, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH 为底物,反应体系为含有 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 的 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0) 缓冲液。37 °C 温育恒温,加入 $40 \mu\text{g}$ 酶液,反应时加入 NADPH 启动反应,监测 340 nm 波长下 A 的变化,以初速度计算 FAS 活性,反应总体积 2 mL。此测活包含转酰、酮酰还原、脱水、烯酰还原等活性中心的反应。

2.3 快结合可逆抑制作用的测定 将血脂灵片以 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0) 缓冲液溶解至预定质量浓度 (0, 15, 30, 50, 100, 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),取 1 mL 加入酶液和底物的混合物后,按照上述方法测定酶活性为 A,空白缓冲液对照的酶活性为 A_0 , A/A_0 为剩余活性 (residual activity, RA), RA 越小,表明酶反应抑制程度越高,样品抑制能力越强。

2.4 慢结合不可逆抑制作用的测定 将 $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血脂灵片溶液与 FAS 于 37 °C 放置预定时间后,取一定体积加入反应体系按照上述方法测定酶活性为 A_t ,空白缓冲液对照的酶活性为 A_0 , A_t/A_0 为该时刻酶的剩余活性 (RA)。测定一系列间隔时间点的剩余活性,观察血脂灵片对 FAS 的慢结合抑制。

3 结果

3.1 血脂灵片对 FAS 各个活性中心的快结合抑制能力测定 血脂灵片对 FAS 具有抑制作用,抑制能力呈现出剂量依赖性,给药质量浓度达到 $150 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能够抑制 50% 以上的酶活性。对于 FAS 的不同活性部位,血脂灵片作用不同,其对烯酰还原反应和 AcAcCoA 还原反应的抑制稍强于酮酰还原反应,随着给药浓度的增加,对各活性中心的抑制能力逐渐增强,也呈现出剂量依赖性,当血脂灵片给药浓度达到 $150 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,各个活性中心剩余活性均小于 70%,但仍然保持着 50% 以上的酶活性。由于几个活性中心剩余活性差别不大,与全反应也没有呈现出数量级的区别,证明血脂灵片对 FAS 的抑制是通过作用于多个位点实现的。见表 1。

3.2 血脂灵片 $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 FAS 慢结合抑制能力测定 慢结合抑制一般为抑制剂和酶共价反应造成的,通常需要较长的时间,酶在此时的失活为不可逆失活。由表 2 可见,血脂灵片在 $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度下,对 FAS 的抑制作用随着时间的延长,剩余活性逐渐降低,呈现出一定的时间依赖性,但不是特别明显,活性的降低主要还是在抑制剂和酶接触的最初 5 min,在 10 ~ 60 min 整个时间段内,酶活性降低并不显著,即快结合仍是血脂灵片致使 FAS 活性

降低的主要原因,见表 2。

表 1 血脂灵片对 FAS 快结合抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	剩余活性/%			
	全反应	酮酰还原 反应	烯酰还原 反应	AcAcCoA 还原反应
0	100.0 ± 19.7	100.0 ± 37.3	100.0 ± 12.4	100.0 ± 18.9
15	91.8 ± 11.4	98.4 ± 12.8	95.3 ± 23.3	95.0 ± 23.8
30	78.2 ± 21.4	82.8 ± 31.1	88.0 ± 9.2	89.2 ± 21.3
50	61.9 ± 23.8	80.3 ± 16.4	75.5 ± 15.8	72.5 ± 43.3
100	53.1 ± 26.1	72.1 ± 10.2	70.3 ± 28.4	66.7 ± 1.4
150	49.0 ± 16.2	66.4 ± 4.3	51.0 ± 7.7	52.5 ± 20.5

表 2 血脂灵片 $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 FAS 全反应慢结合抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间/min	剩余活性/%
0	100.0 ± 20.7
5	77.5 ± 34.1
10	67.4 ± 14.3
20	64.5 ± 21.9
30	57.2 ± 13.3
60	49.3 ± 27.2

4 讨论

FAS 是由 2 条完全相同的多肽链 (亚基) 首尾相连组成的二聚体,每条多肽链的 6 个酶活性中心或酰基载体蛋白的任何一个被抑制都会影响到整个酶的活性,并且相对位置的变化、活臂运动规律的破坏及双亚基解聚等变化都会导致酶失活。作者参考文献^[16]方法,在 pH 7.0 的缓冲体系中加入不同底物,利用 NADPH 在反应中转变为 NADP,导致 340 nm 下吸光度值变化,间接测定酶的活性,进而测定血脂灵片对鸭肝 FAS 全反应和不同活性中心的抑制能力,判断血脂灵片对 FAS 的抑制作用,并初步推测了其作用机制。通常进行 FAS 活性测定时,是加入酶液启动反应,由于本实验在操作过程中发现,调零后加入酶液在 340 nm 处有一定的吸收,这可能是由于所提取的酶纯度不够,含有其他杂质的原因。由于所加 FAS 为溶液状态,杂质会以均态存在,若杂质对 NADPH 的吸光度有影响,每次的微小影响可以相互抵消,并且实验过程中,并未观察到 FAS 因杂质的存在而活性显著降低,因此,本实验实际操作时,加入 NADPH 以启动反应。

从实验结果看,血脂灵片对 FAS 具有一定的抑制能力。当血脂灵片给药浓度达到 $150 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,已经抑制了 50% 以上的酶活性,并且这种抑制作用呈现一定的时间依赖性。血脂灵片对 FAS 的各活性部位均有一定的抑制作用,并且在给药剂量范围内,对各个活性中心的抑制能力较均衡,没有对某一

个活性中心呈现出很强的抑制能力,证明血脂灵片对 FAS 的抑制作用是通过作用于多个活性中心实现的。由于血脂灵片给药浓度已经达到 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,按照 2 mL 的反应体积折算,已经达到 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相对于经典 FAS 抑制剂浅蓝菌素和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的半抑制浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[17]和 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[18]已经很大,因此,本实验没有继续升高考察浓度使各活性部位剩余活性降低到 50% 以下,只进行到了 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血脂灵片给药浓度,在此剂量范围内观察血脂灵片对 FAS 的抑制作用。

血脂灵片有文献报道了山楂,决明子和何首乌提取物对 FAS 的抑制作用:山楂水提物和醇提物对 FAS 均有一定的抑制作用,并且水提物对 FAS 的抑制能力较醇提物强^[19];决明子醇提物对 FAS 有一定的抑制作用,但水提物对 FAS 的抑制能力很弱^[19];何首乌提取物对 FAS 具有很强的抑制作用,并且抑制能力强于经典的 FAS 抑制剂浅蓝菌素和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)^[12],至于泽泻对 FAS 的抑制作用,作者尚未发现文献报道,因此,本实验亦进行了泽泻对 FAS 的抑制能力测定,结果显示泽泻水提物和醇提物对 FAS 的抑制能力均很弱(醇提物和水提物的给药质量浓度分别达到 $600, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,酶的剩余活性仍在 70% 以上,并且 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的给药浓度作用 1 h 后,酶仍然剩余约 70% 的活性),相比于血脂灵片对 FAS 的抑制能力,其不是主要的有效组分。

本实验为血脂灵片降血脂作用与靶点 FAS 有关的推断提供了实验依据,并且为血脂灵片应用于肥胖症等 FAS 靶点相关疾病提供了参考,有关血脂灵片中具体哪类物质对 FAS 具有抑制作用有待进一步考察。

[参考文献]

- [1] 宋俊英,余陈欢,吴巧凤. 生首乌及制首乌总多糖的含量测定[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(4): 419.
- [2] 张小斌. 调脂保健茶的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2006, 8(4): 148.
- [3] 曾春晖,杨柯,刘海燕,等. 不同产地泽泻盐炙前后成分差异及利尿作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 148.
- [4] 孙玉华,哈木拉提,徐磊,等. 降脂颗粒药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 215.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 696.

- [6] 蒋樟根. 治疗高脂血症新药——血脂灵片[J]. 现代应用药学, 1988, 5(1), 37.
- [7] Witkowski A, Joshi A K, Rangan V S, et al. Dibromopropanone cross-linking of the phosphopantetheine and active-site cysteine thiols of the animal fatty acid synthase can occur both inter-and intrasubunit. Reevaluation of the side-by-side, antiparallel subunit model[J]. *Biol Chem*, 1999, 274(17): 11557.
- [8] Chirala S S, Jayakumar A, Gu Z W, et al. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3104.
- [9] Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes [J]. *FASEB*, 1994, 8: 1248.
- [10] Rendina A R, Cheng D. Characterization of the inactivation of rat fatty acid synthase by C75: inhibition of partial reactions and protection by substrates[J]. *Biochem*, 2005, 388: 895.
- [11] Dridi S, Buysse J, Decuyper E, et al. Potential role of leptin in increase of fatty acid synthase gene expression in chicken liver[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2005, 29: 646.
- [12] 李丽春,吴晓东,田维熙. 何首乌提取物对脂肪酸合酶的抑制作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(3), 297.
- [13] Kuhajda F P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology [J]. *Nutrition*, 2000, 16: 202.
- [14] 李双明. 苯丙胺对大鼠肝脏毒性损害的实验研究[D]. 广州:暨南大学, 2007.
- [15] Tian W X, Hsu R Y, Wang Y S. Studies on the reactivity of the essential sulfhydryl groups as a conformational probe for the fatty acid synthetase of chicken liver[J]. *Biol Chem*, 1985, 260(20): 11375.
- [16] Fei Yu, Jing Gao, Yong Zeng, et al. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119: 252.
- [17] Vance D, Goldberg I, Mitsuhashi O, et al. Inhibition of fatty acid synthetase by the antibiotic cerulenin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, 48(3): 649.
- [18] Wang X, Tian W X. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(5): 1200.
- [19] 谢艳方,李珺,邹洪,等. 抗肿瘤中药中脂肪酸合酶抑制剂的筛选[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22: 117.

[责任编辑 聂淑琴]