

泽泻对鼠源 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

易醒^{1*}, 桂菲菲¹, 尹红梅¹, 卢艳梅¹, 肖小年²

¹南昌大学 中德食品工程中心; ²南昌大学 中德联合研究院, 南昌 330047

摘要: 采用单因素实验和正交试验, 优化了鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外微量筛选模型, 并应用该模型研究泽泻正丁醇萃取部分(AOB)在体外对小鼠 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。结果显示, AOB 体外具有较强的小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶抑制活性, IC_{50} 为 126 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。灌胃 10 d 后, AOB 能有效地抑制小鼠体内 α -葡萄糖苷酶活性, 其活性明显低于生理盐水组。AOB 是潜在的高效 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

关键词: 泽泻; 正丁醇萃取物; α -葡萄糖苷酶; 抑制作用; 筛选模型

中图分类号: R284. 2; R587. 1; R965. 1; R977. 3; Q556⁺. 2 文献标识码: A

Inhibitory Effects of *Alisma orientalis* Extracts on α -Glucosidase of Mice

YI Xing^{1*}, GUI Fei-fei¹, YIN Hong-mei¹, LU Yang-mei¹, XIAO Xiao-nian²

¹Sino-German Food Engineering Center, Nanchang University; ²Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang, 330047

Abstract: Slight modifications of microplate-based screening model were carried out with single factor and orthogonal experiments. The inhibitory effect of n-butanol fraction of *Alisma orientalis* (AOB) on mice intestinal α -glucosidase was assayed by this model. The results showed that AOB significantly inhibited mice intestinal α -glucosidase activity with a dose dependent manner with IC_{50} value of 126 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *in vitro* and suppressed intestinal α -glucosidase activities in normal mice compared with control group after orally administered for 10 days. AOB has the potential to inhibit activities of mice α -glucosidase.

Key words: *Alisma orientalis*; n-butanol fraction; α -glucosidase; inhibition; screening model

泽泻为泽泻科植物泽泻 [*Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.] 的块茎, 主产于江西、福建和四川, 2002 年国家卫生部明确泽泻为可用于保健食品的物料。其性味甘、淡、寒, 具有利水、渗湿、泄热之功效, 现代研究发现泽泻具有抑制动脉粥样硬化、降血脂、利尿、降血压、抗炎、免疫调节、降血糖等功效^[1]。泽泻为古代消渴病方、现代糖尿病方和糖尿病并发症方中使用频率较高的一味中药。目前, 大量文献报道泽泻提取物具有降血糖的作用。如: 杨新波等报道泽泻提取物能降低小鼠血糖和甘油三酯水平, 能明显对抗糖尿病小鼠升高的肌酐、甘油三酯和谷丙转氨酶, 对化学性胰岛损伤具有保护作用^[2,3]。Lau CH 等报道泽泻水提取物能抑制小肠对葡萄糖的吸收, 同时刺激成纤维细胞和脂肪细胞吸收葡萄糖, 加速糖异生途径的进程, 从而降低血糖浓

度^[4]。富晓楠报道泽泻的 50% 乙醇提取物 (50 mg/mL) 对体外 α -糖苷酶抑制剂筛选模型的抑制率为 43%, 阿卡波糖在相同条件下的抑制率为 97%^[5]。Li Q 等对泽泻的乙醇提取物进行降血糖作用研究时, 发现它可通过抑制 α -糖苷酶的活性和提高脂肪细胞对葡萄糖的转运而发挥作用^[6]。本实验室的研究也发现, 泽泻正丁醇萃取部分可以有效抑制 α -葡萄糖苷酶的活性^[7]。从现有的研究报道看, 应用酶法研究泽泻降血糖多数是采用酵母属来源的 α -葡萄糖苷酶, 而对来自哺乳动物源的 α -葡萄糖苷酶活性的影响情况尚不清楚。

我国有丰富的泽泻资源, 对泽泻抑制 α -葡萄糖苷酶的活性研究还不够全面。鉴于此, 笔者试图在前期研究的基础上, 利用正交试验设计对经典的 PNPG 筛选法进行改良, 以小鼠源 α -葡萄糖苷酶为反应酶, 构建体外鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制剂微量筛选模型, 并应用该模型对泽泻提取物进行抑制鼠源 α -葡萄糖苷酶活性的研究。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

泽泻,购自江西广昌县,由江西中医学院刘庆华老师鉴定为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.,按中国药典 2010 年版,炮制得到饮片;4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,购自 Sigma 公司);还原型谷胱甘肽(购自上海蓝季科技股份有限公司);阿卡波糖片(拜耳医药保健有限公司);对硝基苯(PNP)、碳酸钠、二甲基亚砜(DMSO)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠等均为分析纯。

1.2 实验动物

健康昆明种小鼠雌雄各半,体质量 22~28 g,由江西中医学院动物实验中心提供,清洁级,动物合格证号:JZDW No.:2010-0543。

1.3 仪器与设备

DNM-9602 酶标仪(北京普朗新技术有限公司);DP-A2160 全自动新型电热培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);TGL-12 型台式高速离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司);FLUKO F8 (F6/10)超细匀浆机(FLUKO 公司);EYELA N1001 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);96 孔酶标板、移液枪、眼科手术剪、眼科手术镊子等。

1.4 试验方法

1.4.1 泽泻提取物的制备

称取泽泻饮片 5 kg,加入 5 倍水于 60 °C 提取 1 h,提取 3 次,合并水提液,浓缩后醇沉,静置 24 h。取上清液离心后浓缩,分别用石油醚,乙酸乙酯,正丁醇按体积比 1:1 萃取三次,合并正丁醇萃取液,减压浓缩除去溶剂,得到泽泻正丁醇萃取部分(AOB) 50 g,备用。

1.4.2 鼠源 α -葡萄糖苷酶的提取

参考文献^[8]方法制备。

1.4.3 PNP 的标准曲线的绘制

96 孔酶标板为载体,67 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH6.8)配制 1000 μ mol/L PNP,稀释成 400、300、200、150、100、50、25、5、0 μ mol/L 不同浓度。分别取这 9 种不同浓度的 PNP 溶液 160 μ L,加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液 80 μ L,混匀。于酶标仪波长为 405 nm 处测定吸光度值,每个浓度溶液设 3 个复孔。以吸光度值为纵坐标,PNP 浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.4.4 酶活力测定

37 °C,pH6.8 反应条件下,1 min 内反应生成 1 μ mol PNP 所需的酶量,定义为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力(U)} = \frac{\text{PNP 生成量}(\mu\text{mol})}{\text{酶体积}(\mu\text{L}) \times \text{时间}(\text{min})}$$

1.4.5 鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制剂微量筛选模型的条件优化

1.4.5.1 反应时间对酶反应的影响

反应体系:磷酸钾缓冲液(pH6.8)110 μ L,加入 α -葡萄糖苷酶溶液 20 μ L,1 mg/mL 还原型谷胱甘肽 10 μ L,37 °C 温育 15 min 后加入 2.5 mmol/L PNPG 20 μ L,37 °C 恒温反应 5、10、15、20、25 min 后加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 80 μ L 终止反应。于酶标仪波长为 405 nm 处测定吸光度值^[9]。根据 PNP 的标准曲线算出 PNP 的浓度,以时间(min)为横坐标,PNP 的浓度(μ mol/L)为纵坐标绘制酶促反应速率曲线,比较酶反应速率大小确定酶反应的适宜时间。

1.4.5.2 酶添加量对酶反应的影响

应用 1.4.5.1 节反应体系,分别加入不同体积的酶液(5、8、11、14、17、20、23、26、29、32 μ L),实验中,通过调节磷酸钾缓冲液的量,使反应体系总体积为 240 μ L。37 °C 恒温反应 15 min,分别加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液 80 μ L 终止反应。于酶标仪波长为 405 nm 处测定吸光度值,计算酶活力,根据酶活力大小确定酶的适宜添加量。

1.4.5.3 底物添加量对酶反应的影响

应用 1.4.5.1 节反应体系,分别加入不同体积的 PNPG 溶液(5、8、11、14、17、20、23、26 μ L),实验中,通过调节磷酸钾缓冲液的量,使反应体系总体积为 240 μ L。37 °C 恒温反应 15 min,分别加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液 80 μ L 终止反应。于酶标仪波长为 405 nm 处测定吸光度值,计算酶活力,比较酶活力大小确定底物 PNPG 的适宜添加量。

1.4.5.4 正交试验

在上述单因素实验基础上,采用正交试验法在

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Analytical factors of orthogonal test

| 水平 Levels | 因素 Factors | | |
|--------------|---------------------------------|--|------------------------------|
| | A 反应时间 Reaction Time(min) | B 酶液添加量 Amount of Enzyme(μ L) | C PNPG 添加量 PNPG(μ L) |
| 1 | 10 | 20 | 14 |
| 2 | 15 | 23 | 17 |
| 3 | 20 | 26 | 20 |

96孔酶板上进行试验,确定酶反应的最佳条件。正交试验选定3因素3水平,采用的正交表为 $L_9(3^4)$,见表1。

1.4.5.5 DMSO对酶反应的影响

在1.4.5.4节建立的反应体系中,分别添加适量的DMSO,使反应体系中DMSO的终体积分数为0、0.25%、0.4%、0.55%、0.7%、0.85%、1%。待反应终止后,于酶标仪波长为405 nm处测定吸光度值,根据吸光值大小,考察DMSO对酶反应的影响。

1.4.6 泽泻正丁醇萃取部分对鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

采用建立的筛选模型,加入0.2% DMSO溶液配置的不同浓度的被测样品液20 μL 。由于试样颜色可能影响吸光度值,同时设一组空白(不加样品)和一组背景(不加酶液而加样品)。实验以阿卡波糖做阳性对照。反应后于酶标仪405 nm波长处测定吸光度值(A)。根据空白组、样品组、背景组的吸光度值(A空白、A样品、A背景),计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}})}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

$A_{\text{空白}}$: 不加被测样品的酶反应后的吸光值;

$A_{\text{样品}}$: 加入被测样品后酶反应的吸光值;

$A_{\text{背景}}$: 不加酶加样品的反应体系吸光值。

1.4.7 小鼠连续灌胃泽泻正丁醇萃取部分后 α -葡萄糖苷酶活性的测定

昆明种小鼠随机分成4组:①生理盐水对照组;②阿卡波糖组(10 mg/Kg);③AOB低剂量组(1 g/Kg);④AOB高剂量组(2 g/Kg)。每组10只,雌雄各半。分别以生理盐水、阿卡波糖和AOB水溶液连续灌胃10 d,第11 d处死,立即取出小肠,制备 α -葡萄糖苷酶溶液。Bradford法测定酶液的蛋白质总量,采用1.4.5节建立的体系测定酶活性。考虑到各组酶反应中酶量的不同,为便于比较,实验结果表示为酶的比活力,即mU/g protein。

2 试验结果

2.1 PNP标准曲线

PNP的浓度和吸光度值之间的回归方程为: $Y = 0.0012X + 0.0494$, $R^2 = 0.9997$, Y: 吸光度值, X: PNP的浓度($\mu\text{mol/L}$),通过吸光度值可以在标准曲线上计算样品中的PNP的浓度。

2.2 鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型的影响因素

实验中采用小鼠小肠内的 α -葡萄糖苷酶为酶

系,固定酶反应温度为37 $^{\circ}\text{C}$, pH6.8,旨在模拟人体体内 α -葡萄糖苷酶的存在环境,使建立的体外筛选模型更加接近人体真实情况,筛选结果更准确。在其它条件一致的情况下,考察反应时间、酶液添加量和底物添加量对酶反应的影响。结果见图1~图3。

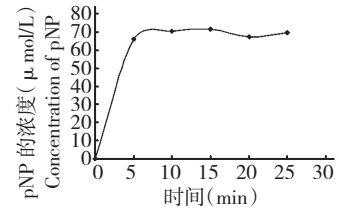


图1 酶促反应速率曲线($\bar{x}, n=3$)

Fig. 1 Enzymatic reaction rate curve($\bar{x}, n=3$)

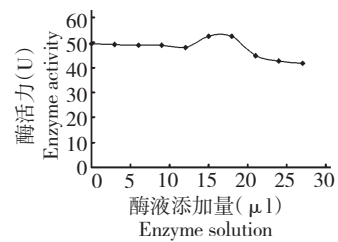


图2 酶液添加量对酶反应的影响($\bar{x}, n=3$)

Fig. 2 Effect of adding amount of enzyme on its activity($\bar{x}, n=3$)

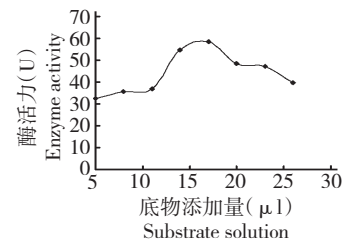


图3 底物PNPG添加量对酶反应的影响($\bar{x}, n=3$)

Fig. 3 Effect of substrate adding amount on enzyme activity($\bar{x}, n=3$)

由图1~图3可知,随着反应时间的增加,产物生成量不断增加,最后产物的生成量趋于平稳,反应15 min时,产物生成量最大;随着酶液和底物添加量增大,酶活力随着增大,当酶液添加量超过23 μL ,底物添加量超过17 μL 的时候,酶活力开始下降。所以确定反应适宜时间为15 min,酶液适宜添加量为23 μL ,底物适宜添加量为17 μL 。

2.3 鼠源酶抑制剂筛选模型的优化条件

采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验,以酶活为指标,正交试验结果如表2所示。

表 2 正交试验结果($\bar{x}, n=3$)Table 2 Results of orthogonal tests ($\bar{x}, n=3$)

| No. | A | B | C | 4 | 酶活力 Enzyme activity/U |
|-------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 57.60 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 51.83 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 55.85 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 46.07 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 44.23 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 32.62 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 39.65 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 28.09 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 25.88 |
| k_1 | 55.093 | 47.773 | 39.437 | 42.570 | |
| k_2 | 40.973 | 41.383 | 41.260 | 41.367 | |
| k_3 | 31.207 | 38.117 | 46.577 | 43.337 | |
| R | 23.886 | 9.656 | 7.140 | 1.970 | |

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

| 方差来源 Source of variation | 平方和 Sum of square | 自由度 Degree of freedom | F | 显著性 Significant difference |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------|----------------------------------|
| A | 865.335 | 2 | 146.246 | ** |
| B | 144.754 | 2 | 24.464 | |
| C | 82.571 | 2 | 13.955 | |
| Error | 5.92 | 2 | | |

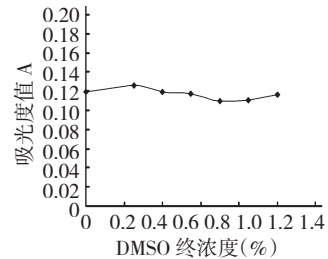
** 差异极其显著 ($P < 0.01$)。

** Extremely significant difference ($P < 0.01$)。

由正交试验结果分析可知,反应时间、酶液添加量和底物添加量对实验结果的影响按大小依次为:A(反应时间) > B(酶液添加量) > C(底物 PNPG 添加量)。根据极差值分析的结果,体外鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制剂微量筛选模型的最佳反应条件为 $A_1B_1C_3$,即:反应时间 10 min,酶液添加量 20 μL ,底物添加量 20 μL 。优化后最终确定的反应体系:磷酸钾缓冲液 (pH6.8) 110 μL ,加入 α -葡萄糖苷酶溶液 20 μL ,1 mg/mL 还原型谷胱甘肽 10 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 温育 15 min 后加入 2.5 mmol/L PNPG 20 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 10 min 后加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 80 μL 终止反应。在此条件下,酶活力平均值为 85.6 U。方差分析结果见表 3,通过 F 值和显著性分析可知,A 因素具有显著差异,具有统计学意义。

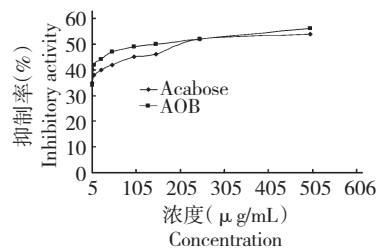
2.4 DMSO 对酶反应的影响

DMSO 作为一种高效的助溶剂广泛用于中药活性成分的研究,属于微毒类试剂,因此实验控制 DMSO 的终浓度在 1% 以内。不同终浓度的 DMSO 对酶反应的影响如图 4 所示,随着 DMSO 的终浓度的增大,吸光度值先略微增大,0.4% 之后呈下降趋势。结果表明,DMSO 对酶反应的影响整体不是很大,但为了保证酶活力所受影响最小,利于吸光度值的测定,DMSO 的终浓度宜控制在 0.4% 以下。

图 4 DMSO 对酶反应的影响($\bar{x}, n=3$)Fig. 4 Effect of DMSO on enzyme activity ($\bar{x}, n=3$)

2.5 AOB 抑制鼠源 α -葡萄糖苷酶活性

AOB 和阿卡波糖对离体 α -葡萄糖苷酶抑制活性如图 5 所示。结果表明,AOB 的离体 α -葡萄糖苷酶抑制活性随浓度的增加而升高,表现出一定剂量相关性;AOB 和阿卡波糖的半抑制浓度分别为 126 $\mu\text{g/mL}$ 和 251 $\mu\text{g/mL}$;与阿卡波糖相比,AOB 表现出更强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

图 5 AOB 对小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶抑制活性($\bar{x}, n=3$)Fig. 5 Inhibitory activities of AOB on α -glucosidase *in vitro* ($\bar{x}, n=3$)

2.6 连续灌胃 AOB 对小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性的影响

为了研究 AOB 连续灌胃对小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性的影响,实验中给小鼠连续灌胃 10 d 后测定各组实验小鼠的小肠 α -葡萄糖苷酶与底物 PNPG 反应后的吸光度值,计算并比较各组实验小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶的比活力,以探讨 AOB 对小鼠体内

小肠 α -葡萄糖苷酶活性的影响。

图 6 是小鼠连续灌胃 10 d 后,各组的酶活力情况。生理盐水对照组的小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性为 2201.6 ± 1153.7 mU/g protein;阿卡波糖组的小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性为 1461.1 ± 378.7 mU/g protein,为生理盐水对照组酶活的 66.37%;AOB 低剂量组的小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性为 1363 ± 401 mU/g protein,为生理盐水对照组酶活的 61.91%;AOB 高剂量组的小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性为 1353 ± 882.1 mU/g protein,为生理盐水对照组酶活的 61.47%。上述结果表明,连续灌胃阿卡波糖和 AOB 都能抑制小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性,但经统计学计算,无显著性差异 ($P > 0.05$)。

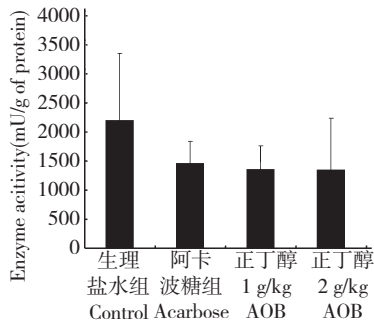


图 6 AOB 连续灌胃 10 d 对小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 The inhibition of mice intestinal α -glucosidase by AOB administrated for 10 days ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 结论

目前文献报道的体外筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂方法主要是由 PNPG 法和葡萄糖氧化酶法改良而来,且以 PNPG 法为主。本实验以 96 孔酶标板为载体,控制反应温度 37°C 、pH6.8 (模拟体内环境),以小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶为酶,通过对反应条件进行优化,构建鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型。该体外筛选模型所需样品量少,方法简便、经济、稳定、快速。对以后快速有效地从泽泻中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂活性成分非常有意义。

泽泻在我国有悠久的药用历史,被大量地应用于具有降血糖作用的方剂中,探索其降血糖的作用机制逐渐引起了研究人员的兴趣。前期的研究结果大多建立在抑制来自酵母 α -葡萄糖苷酶作用的基

础上,缺少对哺乳动物 α -葡萄糖苷酶活性影响的相关信息,本研究则针对来自小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶进行了抑制作用的考察。应用鼠源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型对泽泻提取物进行抑制活性研究,结果表明,AOB 能有效抑制离体小鼠 α -葡萄糖苷酶活性,并呈现一定剂量依赖性;连续灌胃 10 d 后,AOB 能有效抑制小鼠体内 α -葡萄糖苷酶活性。实验结果为探索泽泻降血糖作用机理的研究可提供一定的参考,同时可为泽泻的开发与利用提供理论依据。

参考文献

- Guo QH (郭钦惠), Shi FM (施发明), Yu LR (喻录容). Research status on *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. . *Modern Med Health* (现代医药卫生), 2010, 26: 1375-1376.
- Yang XB (杨新波), Huang ZM (黄正明), Cao WB (曹文斌), et al. Effects of *Rhizoma Alismatis* extract on blood biochemical indices and insulin in hyperglycemic mice. *Chin J Clin Rehab* (中国临床康复), 2004, 8: 1196-1197.
- Yang XB (杨新波), Huang ZM (黄正明), Chen HY (陈红艳), et al. Effects of different solvent extracts from *Alisma Orientalis* on blood glucose and biochemical indicators in diabetic mice. *Pharm J Chin PLA* (解放军药理学学报), 2006, 22: 419-421.
- Lau CH, Chan CM, Chan YW, et al. *In vitro* antidiabetic activities of five medicinal herbs used in Chinese medicinal formulae. *Phytother Res*, 2008, 22: 1384-1388.
- Fu XN (富晓楠). Screening and inhibition kinetics of α -glucosidase inhibitors *in vitro*. Sichun: Southwest Jiaotong University (西南交通大学), MSc. 2008.
- Li Q, Qu HB. Study on the hypoglycemic activities and metabolism of alcohol extract of *Alismatis Rhizoma*. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1046-1053.
- Yi X (易醒), Zhong QC (仲秋晨), Jiao S (焦爽), et al. Study on the α -glucosidase inhibitor from *Alisma orientalis*. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2011, 37: 115-117.
- Zhang SJ (张素军), Qu WJ (瞿伟菁), Zhou SY (周淑云). Inhibitory effects of saponins from *Tribulus terrestris* on α -glucosidase in small intestines of rats. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2006, 31: 910-913.
- Yang FM (杨付梅), Sun QY (孙黔云). Study on microassay for screening α -glucosidase inhibitors by orthogonal matrix method. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2009, 25: 1113-1116.