

抗糖尿病天然药物的 PPAR γ 活性部位筛选林叶新^{1,2*}, 夏之宁²¹南宁职业技术学院, 南宁 530001; ²重庆大学生物工程学院, 重庆 400030

摘要: PPAR γ 是过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs) 的其中一个亚型, 与糖尿病等代谢疾病在内的慢性疾病密切相关, 近年来, PPAR γ 已成为糖尿病类新药研发的热门靶点。本文利用在 HeLa 细胞上构建以 PPAR γ 为靶点的高通量筛选模型, 从 12 种天然药物的 58 种不同极性提取物中筛选和评价出了对 PPAR γ 具有高活性的 8 个部位, 分别是绿萝花的乙酸乙酯萃取物 (EB1)、正己烷提取物 (EA) 和正丁醇萃取物 (EB2), 黄连的 EB1 部分, 翼首草的 EA、乙醇提取物剩余部分 (EB3) 和水提取物多糖部分 (EC) 以及猪牙皂的 EB1 部分, 其最高激活倍数分别相当于阳性对照 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 罗格列酮的 253%、199%、121%、127%、121%、107%、109% 和 105%。为开发用于治疗糖尿病及其并发症的新型、安全和高效率的天然药物提供了理论和实验依据。

关键词: 天然药物; 糖尿病; PPAR γ ; PPAR γ 激动剂

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.007

Screening Active Fractions of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ in Natural Medicines with Potential Antidiabetic Activity

LIN Ye-xin^{1,2*}, XIA Zhi-ning²¹Nanning College for Vocational Technology, Guangxi Nanning 410004, China;²College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China

Abstract: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ is one of the subtypes of PPAR, which are closely related to human chronic diseases, such as diabetes mellitus and the other metabolic diseases. In recent years, PPAR γ has been as hot target for new drug development in treatment of diabetes area. Therefore, one type of high-throughput screening model for PPAR γ was constructed at HeLa cell in present study, and the 58 different polar extracts from 12 kinds natural medicines were screened using this model. The results showed that EtOAc extract (EB1), n-hexane extract (EA) and n-butyl alcohol extract from *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae) flower, EtOAc extract (EB1) from *Coptis Chinensis* Franch of Sichuan, n-hexane extract (EA), supernatant of H₂O extract (EC) and the remains of EtOH extract (EB3) from *Pterocephalus hookeri* (C. B. Clarke) Hoeck, and EtOAc extract (EB1) from *Fructus Gleditsiae Abnormalis* displayed the most remarkable activity for PPAR γ , the maximum fold activation of 8 different polarity fractions compared to the positive control (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rosiglitazone), were 253%, 199%, 121%, 127%, 121%, 109%, 107% and 105%, respectively. This study provided the theories and experimental foundation for exploiting the novel, safe and high-efficiency natural medicines for the treatment of diabetes mellitus and its complication.

Key words: natural medicines; diabetes mellitus; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; PPAR γ agonist

过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators activated receptor, PPAR) 属于核受体超家族的配体激活转录因子^[1]。研究表明, PPARs 参与的生物学效应包括了调节血脂激活基因转录、胰岛素敏感、脂质代谢、炎症反应、细胞增殖等重要生化反应及生物调节过程^[2], 且与人类的慢性疾病密切相关, 包括糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化及癌症等代

谢疾病^[3]。

PPARs 有三种不同的亚型: α 、 β 和 γ , 通过激活不同的亚型, 在人体中所发挥的作用机制各不相同。其中, PPAR γ 是 PPARs 三个亚型中被研究得最多的药物靶点的, 它在多种细胞的增殖与分化过程中起着重要的调节作用, 激活 PPAR γ 可以促进脂肪细胞分化, 降低血脂浓度; 增强脂肪组织中 GLUT4 的合成; 改善肿瘤坏死因子诱导 (TNF- α) 的胰岛素抵抗; 抗动脉粥样硬化、减少炎症的发生、治疗癌症等作

用^[4-7]。常用的胰岛素增敏剂——噻唑烷二酮类 (TZD) 药物就是 PPAR γ 的特异性高亲和力的配体。

随着关于 PPAR γ 合成类药物, 毒副作用的报道层出不穷, 如长期服用噻唑烷二酮 (TZDs) 类药物会导致病人体重增加、水肿, 并增加罹患心肌梗塞的风险, 同时还会产生肝毒性^[8,9]; 以及人们健康意识的不断增强, 和天然药物显现出来的具有较好治疗和预防疾病的重要特点, 使得 PPAR γ 成为用来筛选和开发新型的抗糖尿病天然药物的热门靶点^[10,11]。目前, 从具有治疗糖尿病作用及其并发症的天然产物中发掘出的有效成分并不多, 且没有对成分进行多靶点或相关药理作用的系统研究。虽然不少研究已针对 PPAR γ 来筛选和开发抗糖尿病的天然药物, 但并没有获得太多实质的成果。然而怎样才能快速的从天然药物中, 寻找到 PPARs 高活性激动剂, 更是成为近几年包括糖尿病在内的代谢综合症药物研发的主要研究趋势。

本文利用前期已经构建好的包含靶点 PPAR γ 的高通量筛选模型, 对具有治疗糖尿病、降血脂和抗炎作用的 12 种天然产物进行研究, 并对这些药物进行系统的提取, 力求找到具有 PPAR γ 激活作用的有效部位。所选的 12 种药材中, 8 种通过中医药文献或秘方获悉, 它们是治疗糖尿病的经验方中的常用药材 (川黄连、女贞子、猪牙皂、广西山楂、石斛、桑叶、丹参和泽泻)^[12-14]; 4 种是在民间有着良好口碑的验方中效果优良, 且能显著降低人体血糖、血脂、或抗炎作用的民族药材 (绿萝花、林檎叶、翼首草、灰兜巴)^[15-18]。为更好的开发用于治疗糖尿病及其并发症的新型、安全和高效的天然药物提供了理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

1.1.1 材料

实验菌株: 大肠杆菌 Top10F (上海北诺生物科技有限公司)。质粒: pGL4.35 (luc2p/9XGAL4 UAS/Hygro) (产品号码: E1370), 美国 Promega 公司; 实验室自组合质粒, pBIND-PPAR γ -LBD^[19]。细胞: HeLa 细胞, 中国典型培养物保藏中心。

中药材: 川黄连、女贞子、猪牙皂、广西山楂、石斛、桑叶、丹参、泽泻, 购于重庆康济跃洪药业有限公司。民族药材: 绿萝花, 购于西藏恒生堂药物药材开发有限公司; 林檎叶, 购于广西柳州药材批发站; 翼

首草, 购于安徽亳州福春堂药业; 灰兜巴, 购于四川峨眉仙山中药有限公司。

为确保所选待测药物原料物种的真实和正确性, 获得药物的渠道全是通过正规药店购买, 并已经通过重庆大学化学化工学院的杨丰庆副教授鉴定, 凭证标本存放于重庆大学化学化工学院夏之宁教授实验室中。

1.1.2 试剂

质粒抽提试剂盒, Bright-GloTM 荧光底物 (美国 Promega 公司); FuGENE HD 转染试剂 (美国 Reagent 公司); 胎牛血清 (FBS) (美国 GIBCO 公司); 含酚红的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 细胞培养基 (粉状) (美国 HyClone 公司); 罗格列酮、二甲基亚砷 (DMSO) (美国 Sigma 分装); 正己烷、无水乙醇、乙酸乙酯、正丁醇等其他化学试剂 [重庆川东化工 (集团) 有限公司, AR 级]。

1.1.3 仪器

AY120 电子天平, 日本岛津公司; AL204-IC 电子天平, pH 计 (上海) 梅特勒-托利多仪器有限公司; 移液枪, 法国 Gilson 公司; 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; 微孔板 (96 孔) 和细胞培养板 (6 孔), 美国 Corning Costar 公司; CO₂ 细胞培养孵箱, 德国 Heraeus 公司; 超净工作台, 上海跃进医疗器械厂; 倒置荧光相差显微镜, 日本 Nikon 公司; VeritasTM 微孔板发光检测仪, 美国 Promega 公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣升华仪器厂; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PPAR γ 高通量细胞筛选模型的构建

将重组质粒 pBIND-PPAR γ -LBD 与 pGL4.35 的报告基因, 共同转入 HeLa 细胞中, 用 PPAR γ 激动剂罗格列酮作为检验标准, 通过测定荧光酶素的表达率, 确定 PPAR γ 筛选实验的条件 (包括: 药物作用时间, 荧光底物稀释倍数, 和每孔细胞数), 并用 Z'-因子对此筛选模型进行评估, 以构建一种简单、稳定和有效的高通量筛选模型。具体构建方法参见文献^[19]。

1.2.2 细胞筛选模型实验

在 6 孔板中, 用转染试剂 FuGENE HD 将重组质粒 pBIND-PPAR γ -LBD 和报告基因 pGL4.35, 以瞬时转染的方式转入融合率达 70% ~ 90% 的 HeLa 细胞中, 板内细胞数为 2×10^5 个/mL。每孔转入的总

DNA 的量为 2 μg , 受体与报告基因的比例为 1:4, 即 0.4 μg pBIND-PPAR γ -LBD 质粒和 1.6 μg 的 pGL4.35 质粒, 之后置于孵箱中培养 24 h; 将 6 孔板中的细胞转入 96 孔板中, 每孔细胞数为 2×10^4 个/mL, 培养 24 h; 取出, 加入阳性药与待测样品后, 培养 24 h 后加入已稀释了 5 倍的荧光酶试剂; 避光等待 5 min 后, 用 Veritas™ 微孔板发光检测仪的 aBright-Glo™ 荧光酶分析系统, 测定 96 孔板中各孔的荧光酶活性。

1.2.3 待测样品的配制

天然药物提取物及阳性对照, 均用 DMSO 溶解配制成一定的母液, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 由于提取物极性的不同, 在 DMSO 中的溶解性也不同, 因此样品之间的母液浓度有一定差异, 天然药物样品的母液浓度范围为 400 ~ 100 mg/mL; 当需要测定 PPARs 活性时, 需要先用含有胎牛血清的细胞培养液 DMEM 对样品母液进行稀释, 再加入 96 孔板中相应的位置, 确保 DMSO 含量 < 0.1%/孔。每种提取物至少配制 6 个不同浓度的样品, 进行 PPAR γ 活性实验。

1.2.4 原料预处理

中药材均在药店进行粉碎, 过 60 目筛, 每种称取 50.0 g, 密封好, 存放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 备用。

民族药材用剪刀剪碎后, 每种药材称取 50.0 g, 密封, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 备用。

1.2.5 天然药物不同极性组分的制备

所有待测天然药物按 1.2.4 的方法处理后, 依次用正己烷, 70% 乙醇和水, 以料液比为 1:30 的比例, 进行回流提取(绿萝花未提取水部分), 每种溶剂提取两次, 1 h/次。接着用乙酸乙酯, 以 1:1 的比例, 对已挥掉乙醇的醇提物进行液液萃取 3 次(此过程中, 绿萝花是依次用乙酸乙酯及正丁醇萃取); 水提物则经浓缩后, 加入无水乙醇至醇浓度至 60%, 沉淀多糖和蛋白质。最后, 每种天然药物均获得 5 种不同的极性组分(正己烷部分、乙酸乙酯部分、醇提物剩余部分、水提物上清液部分和醇沉部分)依次命名为 EA、EB1、EB3、EC 和 ED。但绿萝花的提取物稍有区别, 仅获得 4 种不同的极性部分(正己烷部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分和醇提物剩余部分)依次命名为 EA、EB1、EB2 和 EB3。最后共获得 58 种不同的提取物(女贞子无 ED 部分), 这些提取物中的溶剂均被移除并干燥后, 保存于 -20

$^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 备用。

1.2.6 数据分析与处理

在 96 孔板上进行的细胞实验中, 无论是阴性对照、阳性对照或待测药物, 每个样品在同一浓度下, 都需要设置 3 个复孔, 并重复进行 3 次独立的实验, 只有当每次实验获得的结果相近时, 才证明所获实验数据真实有效。阴性对照是已转染质粒并加了用于溶解药物的溶剂的细胞, 阳性对照为 PPAR γ 阳性药物作用的细胞。

药物激活倍数 = 阴性细胞荧光值/阳性细胞荧光值, 当激活倍数 > 1.5 倍时, 才认为测试样品对 PPAR γ 表现出激活作用。激活倍数均用平均值 \pm SD 值表示。

天然药物提取物相对激活倍数 = (提取物测试浓度范围内所获的最大激活倍数 / 同批次的阳性对照药物的激活倍数) \times 100%。

所有结果均使用 Origin 8.0 的单边方差分析来计算样品间的显著性差异, 显著水平 $P < 0.05$, 极显著水平 $P < 0.01$ 。

2 实验结果

2.1 天然药物不同极性部分的提取率

12 种药材, 依照 1.2.5 的流程进行提取后, 获得 58 种不同的待测物共提取率见表 1。

2.2 PPAR γ 活性成分的筛选

2.2.1 阳性药物罗格列酮与 PPAR γ 激活之间的剂量关系

罗格列酮对 PPAR γ 的激活能力呈现出一定的浓度依赖性(见图 1)。在测试的浓度范围内, 当罗格列酮的浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 PPAR γ 的激活倍数最高, 倍数变化范围为 3.8 ~ 5.8 倍; 而药物浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 PPAR γ 的激活能力与 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的相近, 倍数范围是 3.2 ~ 5.1 倍; 若罗格列酮的浓度 > 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 激活倍数开始呈现下降的趋势; 罗格列酮对于 PPAR γ 的 EC₅₀ 值为 0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (相当于 0.78 μM)。由于阳性药物在后期活性筛选过程里, 仅用于确定质粒是否转入细胞及是否能稳定表达的作用, 因此, 后期天然药物提取物试验中, 对照的阳性药物罗格列酮的浓度定为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2.2 天然药物提取物对 PPAR γ 的激活作用

用含有质粒 pBIND-PPAR γ -LBD 和报告基因 pGL4.35 的 HeLa 细胞模型, 测试 12 种天然药物的

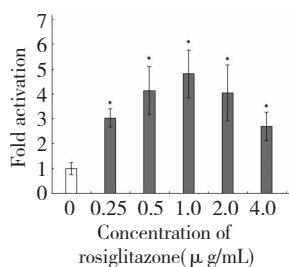
表 1 各天然药物不同极性部分的提取率

Table 1 Extraction yield of different polar fractions from natural medicines

编号 No.	药物名称 Herbal name	各部分提取率 Extraction yield (g/100 g)					
		EA	EB1	EB2	EB3	EC	ED
1	女贞子	1.31	1.78	-	4.48	2.36	-
2	猪牙皂	2.30	1.32	-	7.89	3.48	0.31
3	广西山楂	0.34	2.24	-	9.68	2.81	0.37
4	桑叶	1.11	0.81	-	4.31	1.44	1.06
5	川黄连	0.32	0.89	-	2.13	0.93	0.41
6	石斛	0.48	0.17	-	0.22	0.68	0.06
7	丹参	1.14	1.01	-	2.61	1.86	0.29
8	泽泻	0.51	1.39	-	8.14	2.31	0.33
9	绿萝花	1.25	2.78	4.5	1.01	-	-
10	尖嘴林檎	1.55	6.61	-	9.52	2.71	1.12
11	翼首草	1.33	1.43	-	1.93	2.31	1.01
12	灰兜巴	0.09	0.36	-	0.10	0.21	0.16

注:表中的“-”表示该药物无此部分提取物;EA:正己烷提取物;EB1:乙酸乙酯萃取物;EB2:正丁醇萃取物;EB3:乙醇提取物剩余部分;EC:水提物去多糖部分;ED:水提醇沉物部分。

Note:“-” indicated do not exist;EA, n-hexane extract; EB1, EtOAc extract; EB2: n-butanol extract; EB3, the remains of EtOH extract; EC, supernatant of H₂O extract; ED, alcohol precipitate.

图 1 罗格列酮与 PPAR γ 激活作用之间的剂量关系Fig. 1 The dose relationship between rosiglitazone and the activation of PPAR γ

不同极性的提取物(共 58 种)对 PPAR γ 的激活能力。

由于不同的天然药物,测试的时间和批次不一样,阳性药物的激活倍数之间存在一定的差异。整个测试过程中,0.5 $\mu\text{g/mL}$ 阳性药物罗格列酮对 PPAR γ 激活倍数的变化范围为:2.74 ~ 4.78 倍。现按照相对激活倍数的大小重新排列天然药物的活性顺序,以此确定不同提取物对 PPAR γ 激活能力的强弱性(见表 2)。

如表 2 的数据所示,58 种不同极性的提取物中,只有 28 种提取物对 PPAR γ 表现出了激活能力,在测试的浓度范围内,最高激活倍数 > 1.5 倍;另外 30 种提取物对 PPAR γ 没有表现出激活作用,最大

激活倍数均 < 1.5 倍,且相对于阳性药物罗格列酮的激活倍数 < 20%;测试的 12 种天然药物中,只有中药泽泻,其 5 种不同极性的提取物均对 PPAR γ 都没有激活作用;所获得的提取物中有 8 种,在其被测试的浓度范围内,显现出来的对 PPAR γ 的最大激活倍数,均高于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 阳性药物罗格列酮,它们分别是绿萝花的 EB1、EA 和 EB2,黄连的 EB1 部分,翼首草的 EA、EC 和 EB3,以及猪牙皂的 EB1 部分,分别相当于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 罗格列酮激活能力的 253%、199%、121%、127%、121%、109%、107% 和 105%。

绿萝花的 EA、EB1 和 EB2 部分,川黄连的 EB1 部分,翼首草的 EA、EB3 和 EC 部分,以及猪牙皂的 EB1 部分的最大激活倍数高于同批次阳性药物 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 罗格列酮,对其进行作图分析,了解活性部位浓度变化与 PPAR γ 活性的关系,以及同一药物不同提取物对 PPAR γ 激活作用的影响(图 2)。

8 种不同的提取物中,绿萝花的 EB1 部分活性最显著,作用浓度在 6.25 ~ 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,激活能力呈现浓度依赖现象;其次是 EA 部分,在浓度低于 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,也存在浓度依赖的趋势,见图 2(A)。如图所示,在测试的浓度范围内,绿萝花 EB1 的最大激活倍数高于 EA 和 EB2 的,这

表 2 不同天然药物提取物对 PPAR γ 的激活作用Table 2 The activation of PPAR γ by various natural medicines

序号 No.	提取物 ^a Extract	最大激活倍数下的浓度 Concentration at maximum fold activation ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	最大激活倍数 Maximum fold activation (mean \pm SD)	与 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 罗格列酮 的相对激活倍数 ^d Relative fold activation to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rosiglitazone (%)
1	EG-EB1	100.0	11.52 \pm 0.96 ^b (4.55) ^c	253
2	EG-EA	400.0	9.05 \pm 0.86 (4.55)	199
3	CC-EB1	100.0	3.48 \pm 0.55 (2.74)	127
4	EG-EB2	800.0	5.50 \pm 0.60 (4.55)	121
5	PH-EA	400.0	4.06 \pm 0.49 (3.36)	121
6	PH-EC	400.0	3.65 \pm 0.58 (3.36)	109
7	PH-EB3	25.0	3.61 \pm 0.62 (3.36)	107
8	FG-EB1	50.0	5.02 \pm 0.63 (4.78)	105
9	PH-EB1	100.0	3.31 \pm 0.62 (3.36)	99
10	FM-EA	12.5	4.37 \pm 0.56 (4.53)	96
11	FM-EB3	12.5	3.99 \pm 0.41 (4.53)	88
12	MD-EB1	200.0	3.11 \pm 0.60 (3.82)	81
13	HU-EA	200.0	2.73 \pm 0.33 (3.48)	78
14	SM-EB1	50.0	3.02 \pm 0.66 (4.54)	66
15	CP-EB1	50.0	3.08 \pm 0.35 (4.68)	66
16	HU-EB1	50.0	2.26 \pm 0.22 (3.48)	65
17	FG-EA	100.0	2.69 \pm 0.26 (4.78)	56
18	DE-EB1	100.0	2.60 \pm 0.35 (4.70)	55
19	EG-EB3	400.0	2.44 \pm 0.22 (4.55)	54
20	SM-EC	25.0	2.43 \pm 0.27 (4.54)	54
21	MD-EC	200.0	1.99 \pm 0.28 (3.82)	52
22	HU-EB3	400.0	1.63 \pm 0.14 (3.48)	47
23	MD-EA	200.0	1.74 \pm 0.14 (3.82)	46
24	SM-EA	2.5	2.02 \pm 0.17 (4.54)	44
25	CP-EA	100.0	2.03 \pm 0.17 (4.68)	43
26	LL-EA	200.0	1.69 \pm 0.22 (4.52)	37
27	FG-ED	100.0	1.72 \pm 0.28 (4.78)	36
28	DE-EA	50.0	1.67 \pm 0.33 (4.70)	35
29	DE-EC	200.0	1.60 \pm 0.31 (4.70)	34
30	LL-EB1, EB3, EC; FG-EB3, EC; CP-EB3, EC, ED; FM-EB1, EC, ED; CC-EA, EB3, EC, ED; DE-EB3, ED; SM-EB3, ED; RA-EA, EB1, EB3, EC, ED; MD-EB3, ED; PH-ED; HU-EC, ED;	50.0 ~ 800.0	< 1.5 (2.74 ~ 4.78)	< 1

注: a. 缩写: LL, 女贞子; FG, 猪牙皂; CP, 广西山楂; FM, 桑叶; CC, 川黄连; DE, 石斛; SM, 丹参; RA, 泽泻; EG, 绿萝花; MD, 林檎叶; PH, 翼首草; HU, 灰兜巴; EA, 正己烷提取物; EB1, 乙酸乙酯萃取物; EB2, 正丁醇萃取物; EB3, 乙醇提取物剩余部分; EC, 水提物去多糖部分; ED, 水提醇沉物部分;

b. 各待测物的激活倍数的计算, 是相对于空白对照 DMSO (设为 1.0) 而言的。数据显示的是测试的该提取物的所有浓度中, 显现出来的最大激活倍数, 值为: 激活倍数的平均值 \pm 标准偏差 ($n=3$);

c. 括号里的数值是同批试验中 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 罗格列酮的激活倍数;

d. (各天然药物不同极性提取物的最大激活倍数 vs 空白 DMSO) / (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的罗格列酮激活倍数 vs 空白 DMSO) \times 100。

Note: a. Abbreviation: LL, *Ligustrum lucidum* Ait.; FG, *Fructus Gleditsiae Abnormalis*; CP, *Crataegus pinnatifida* Bge L. of Guangxi; FM, *Folium Mori*; CC, *Coptis Chinensis* Franch. of Sichuan; DE, *Dedrobium*; SM, *Salvia Miltiorrhiza* Bunge.; RA, *Rhizoma alismatis*; EG, *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae) flower; MD, *Malus doumeri* (Bois) Chev. leaves; PH, *Pteroccephalus hookeri* (C. B. Clarke) Hoeck; HU, *Huidouba*. EA, n-hexane extract; EB1, EtOAc extract; EB2, n-butanol extract; EB3, the remains of EtOH extract; EC, supernatant of H₂O extract; ED, alcohol precipitate;

b. Bioactivity is given as fold activation of DMSO (1.0). Results were expressed as maximum fold activation of PPAR γ (mean \pm SD, $n=3$);

c. Data in the brackets were the fold activation of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rosiglitazone in the same bath of experiment.

d. The maximum fold activation of extracts vs vehicle DMSO/0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rosiglitazone vs vehicle DMSO \times 100.

三种提取物的最大激活倍数分别为 11.52、9.05 和 5.5 倍。EB3 的激活能力最差,在浓度为 400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,激活倍数仅为 2.44 (见表 2)。当 EB1 及 EA 的测试浓度分别高于 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 激活能力出现突然下降的趋势;然而从图 2(A) 观察到,只有 EB2 浓度高至 800.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,激活倍数仍然呈现上升的趋势,最大激活倍数为 5.5 倍。

川黄连的 5 种不同提取物中,只有 EB1 部分对 PPAR γ 显现出激活能力,且在 12.5 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,呈现浓度依赖性,最大激活倍数为 3.48 倍,当浓度高于 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,激活能力出现下降,并在浓度达到 400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,激活倍数接近 0.0,应该是高浓度的此提取物对转染了质粒的 HeLa 细胞具有毒性,影响细胞生理状态,从而无法

使质粒正常表达活性,如图 2(B) 所示。

翼首草除了小极性 EA 部分对 PPAR γ 具有较强的激活作用外,其大极性提取物 EB3 和 EC 部分也能有效的激活 PPAR γ ,在测试的浓度范围内(12.5 ~ 400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),EA 和 EC 的激活能力随着浓度的增加不断增大,获得的最大激活倍数分别是 4.06 倍和 3.05 倍。但 EB3 部分在浓度高于 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后,激活能力出现下降的趋势,当浓度达到 400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,激活倍数不足 1.0,详见图 2(C)。另外,翼首草的 EB1 部分,在浓度为 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,呈现出的对 PPAR γ 的最高激活倍数仅为 3.31 倍,是其 4 种有 PPAR γ 活性的提取物中,激活作用最弱的一种(见表 2)。

猪牙皂的 5 种不同提取中,EB1 部分对 PPAR γ

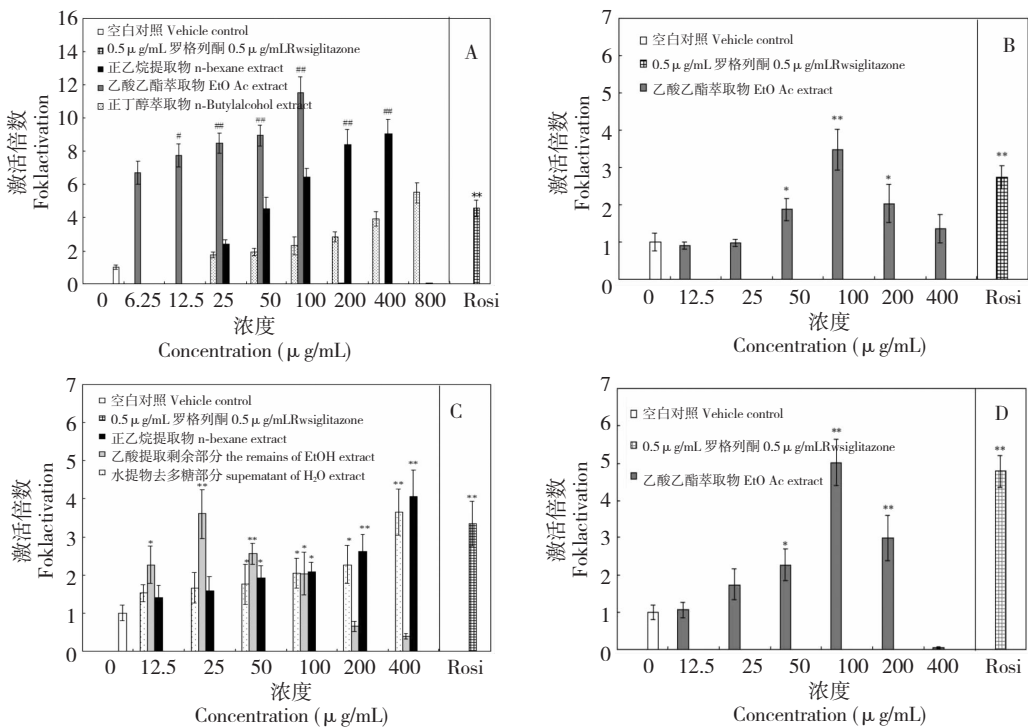


图 2 绿萝花(A)、川黄连(B)、翼首草(C)和猪牙皂(D)不同提取物分别对 PPAR γ 的激活作用

Fig. 2 Fold activation of PPAR γ by different extract of *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae) flower (A), *Coptis Chinensis* Franch of Sichuan (B), *Pteroccephalus hookeri* (C. B. Clarke) Hoeck (C) and *Fructus Gleditsiae Abnormalis* (D)

注:图中的数值均是用平均值和SD值来表示,每个样品设置3个复孔,并重复进行3次独立的实验;0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 罗格列酮为阳性对照;待测样品对比空白对照 DMSO(设置为 1.0),* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;待测样品对比阳性对照 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 罗格列酮,# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(A) 为不同浓度的绿萝花正己烷提取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物对 PPAR γ 的激活能力;(B) 为不同浓度的川黄连乙酸乙酯萃取物对 PPAR γ 的激活能力;(C) 为不同浓度的翼首草正己烷提取物、乙醇提取物剩余部分和水提取物去多糖部分对 PPAR γ 的激活能力;(D) 为不同浓度的猪牙皂乙酸乙酯萃取物对 PPAR γ 的激活能力。

Note: The data were expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Rosiglitazone (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was the positive control in each experiment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DMSO (set to 1.0), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rosiglitazone. (A) n-hexane extract, EtOAc extract and n-butyl alcohol extract from the flower of *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae) for PPAR γ ; (B) EtOAc extract from *Coptis Chinensis* Franch of Sichuan for PPAR γ . (C) n-hexane extract, the remains of EtOH extract and supernatant of H $_2$ O extract from *Pteroccephalus hookeri* (C. B. Clarke) Hoeck for PPAR γ . (D) EtOAc extract from *Fructus Gleditsiae Abnormalis* for PPAR γ .

的激活能力最明显。且在浓度范围为 12.5 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 激活作用与浓度之间呈现依赖性, 最高激活倍数为 5.02 倍, 当 EB1 作用浓度高于 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 激活能力逐渐减弱, 且作用浓度为 400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 激活倍数接近 0.0, 这可能是因为高浓度的样品对载体细胞造成毒性, 导致 PPAR γ 活性无法表达造成的, 如图 2(D) 所示。猪牙皂的小极性部位 EA 对 PPAR γ 的激活作用却不是那么明显, 在测试的浓度范围内, 获得的最大激活倍数仅为 2.69 倍; 但在这 58 种提取物中, 只有猪牙皂的 ED 部分, 对 PPAR γ 表现出有激活作用, 在浓度为 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 激活倍数为 1.72 倍。

3 讨论与结论

通过对 12 种天然药物的 58 种不同提取物, 开

表 3 天然药物不同提取物对 PPAR γ 激活能力的强弱顺序

Table 3 Strong-to-weak sequence of different extracts from natural medicines for the activation of PPAR γ

顺序 ^a Order	对 PPAR γ 有激活作用的活性部位 Active fractions										
	EG ^b	CC	PH	FG	FM	MD	HU	SM	CP	DE	LL
1	EB1 ^{c,d}	EB1	EA	EB1	EA	EB1	EA	EB1	EB1	EB1	EA
2	EA	-	EC	EA	EB3	EC	EB1	EC	EA	EA	-
3	EB2	-	EB3	ED	-	EA	EB3	EA	-	EC	-
4	EB3	-	EB1	-	-	-	-	-	-	-	-

注: a. 同一天然药物中, 其不同提取物对 PPAR γ 激活能力的强弱顺序; b. 药物名称缩写: LL, 女贞子; FG, 猪牙皂; CP, 广西山楂; FM, 桑叶; CC, 川黄连; DE, 石斛; SM, 丹参; EG, 绿萝花; MD, 林檎叶; PH, 翼首草; HU, 灰兜巴; c. 提取部分名称缩写: EA, 正己烷提取物; EB1, 乙酸乙酯萃取物; EB2, 正丁醇萃取物; EB3, 乙醇提取物剩余部分; EC, 水提物去多糖部分; ED, 水提醇沉物部分; d. 带有下划线的提取物, 是在测试浓度范围内, 最高激活倍数高于同批次阳性药的活性部位。

Note: a: Strong-to-weak sequence of different extracts of one herb; b: Abbreviation: LL, *Ligustrum lucidum* Ait.; FG, *Fructus Gleditsiae Abnormalis*; CP, *Craetaegus pinnatifida* Bge L. of Guangxi; FM, *Folium Mori*; CC, *Coptis Chinensis* Franch of Sichuan; DE, *Dedrobium*; SM, *Salvia Miltiorrhiza* Bunge.; EG, *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae) flower; MD, *Malus doumeri* (Bois) Chev. leaves; PH, *Pteroccephalus hookeri* (C. B. Clarke) Hoec; HU, *Huidouba*. c: EA, n-hexane extract; EB1, EtOAc extract; EB2; n-butanol extract; EB3, the remains of EtOH extract; EC, supernatant of H₂O extract; ED, alcohol precipitate; d: Underlined sample was the sample with the highest activation fold.

结合现有的研究, 通常认为已知的 PPAR 的配体一般有两类, 一类是内源性配体 (通常是脂肪酸类及其衍生物), 另一类是合成类化合物 (包括抗炎药物、降血糖药物及胰岛素增敏剂)。且已明确 PPAR γ 的天然配体主要是不饱和脂肪酸^[20,21], 说明 PPAR γ 的受体易被小极性的化合物激活。也有越来越多的研究证明, 与脂肪酸类结构不相同的二级代谢产物, 能在微摩尔浓度级别上有效的激活 PPAR γ , 例如黄酮类、多酚类、萜类物质或有机酸类化合物, 这些化合物将为 PPARs 新的天然激动剂的开发提供新的化学结构^[22,23]。

同时, 根据本文中使用的提取溶剂性质分析^[24]: (1) 正己烷提取, 主要能获得的二级代谢产物

展的 PPAR γ 活性实验, 发现有 11 种天然药物对 PPAR γ 具有激活作用, 现对这 11 种天然药物进行重新分类排序, 按照其不同提取物对于 PPAR γ 激活能力的强弱顺序列表, 见表 3。

从表 3 中, 得知 11 种对 PPAR γ 有活性的天然药物里, 均是小极性或中等极性的提取活性较强, 其中有 4 种天然药物 (翼首草、桑叶、灰兜巴和女贞子) 的 EA 部分的活性强于它们其他的提取部位; 另外 7 种药物 (绿萝花、川黄连、猪牙皂、林檎叶、丹参、广西山楂和石斛) 都是 EB1 部分的活性最强, 即中等极性的提取物的活性较强; 所有提取物中, 除猪牙皂和石斛外, 其他药物的 ED 部分对 PPAR γ 均没有表现出激活作用, 但这两个提取物对 PPAR γ 激活作用都比较小, 与同批次阳性药物的激活倍数相比, 比值均 <40% (见表 2)。

包括有挥发油、脂肪酸、蜡、游离的甾体及部分萜类物质等; (2) 用乙酸乙酯溶剂提取的部位里, 通常含有黄酮类、萜类、游离生物碱、香豆素苷元及有机酸等物质; (3) 水提取物中则会含有多酚类、黄酮甙、生物碱盐、甾体皂苷等化合物。推断本实验测试的 12 种药材中 EA 部位之所以具有高 PPAR γ 激活性, 是因为正己烷提取物中通常含有脂肪酸类和萜类化合物, 易于与 PPAR γ 结合, 并激活受体表达; 而 EB1 的活性成分很可能来自黄酮类、萜类物质和有机酸类物质; EC 的活性成分, 可能是黄酮甙及多酚类化合物; 至于 ED 部分不能显著的激活 PPAR γ , 是由于此部分主要含有的化合物为多糖和蛋白质, 而这些大分子物质不易穿透细胞膜进入到细胞内部, 同时

PPAR γ 受体具有易于和疏水性化合物结合的特性,所以ED部分含有的大分子物质难以激活PPAR γ 。而所获得的58种提取物中有8种(分别来自4种不同天然药物),在其被测试的浓度范围内,显现出来的对PPAR γ 的最大激活倍数,均高于0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阳性药物罗格列酮,它们分别是绿萝花的EB1、EA和EB2,黄连的EB1部分,翼首草的EA、EC和EB3以及猪牙皂的EB1部分,分别相当于是0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 罗格列酮激活能力的253%、199%、121%、127%、121%、109%、107%和105%,对应浓度分别为100.0、400.0、800.0、100.0、400.0、400.0、25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。依据此结果,并结合前期我们对部分天然产物的研究和文献资料可知:产于西藏寒冷地带的绿萝花,其提取物中的EB1部分主要含有香豆素和黄酮类化合物^[25],EA部分含有亚麻酸和亚油酸类化合物等不饱和脂肪酸^[26],这些活性对PPAR γ 产生激活作用,而绿萝花发挥治疗糖尿病、高血脂、高血压及各种血管炎症等作用的其中一个药理通路,很可能就是通过激活PPAR γ 来实现的;中药中常用于治疗糖尿病的毛茛科植物黄连的提取物EB1、EA、EB3和EC,以及单体小檗碱^[22]都能有效的激活PPAR γ ,推测黄连或许是通过激活PPAR γ ,来发挥抗炎、治疗糖尿病和心血管疾病等多方面药理作用的^[27];在广西、湖南等地区 and 少数民族地区作为茶饮,已有多年历史的蔷薇科植物林檎叶的提取物EA、EB1和EC对PPAR γ 有激活作用,且以EB1部分的活性最强,推测其所具备的抗炎及降血脂作用^[17],很可能是通过激活PPAR γ 来实现的;豆科皂荚属植物猪牙皂,是民间验方中被用于治疗糖尿病的一味药物^[12],是被测试的12种天然药物中,唯一的一种其ED部分提取物对PPAR γ 具备激活能力的药物,EA和EB1部分对PPAR γ 也有激活作用,测猪牙皂有可能是通过激活PPAR γ 来发挥其在人体内,抗炎和降低血糖的药效作用的。

另外,需要补充说明的是:(1)由于本实验研究目的是筛选药物提取物是否对靶点有激活作用,构建模型的细胞仅是作为一个载体,并不影响试验的结果,所以选择了HeLa细胞,因为其作为一种癌症细胞,繁殖速度快,对环境要求低于其他人体组织的正常细胞,利于研究的顺利开展;(2)实验过程中发现,有些药物提取物浓度过高时,会对载体细胞产生毒性,进而影响质粒的表达和激活能力的体现,见图2。通常,细胞毒性从活性数据上最明显的表现是逐

渐降低,或是呈现的激活倍数直接低于1.0倍;(3)通过细胞毒性试验检测,MTT实验结果表明,本文所测试的提取物在其获得PPAR γ 最高激活倍数下的作用浓度,均不会抑制ECV-304细胞和RAW264.7细胞的增殖。

中国拥有世界上最丰富的药用植物资源,其在治疗糖尿病方面的应用和研究已有多年的历史,并拥有丰富的临床经验。但这些抗糖尿病天然药物的使用方式通常依靠经验来指导,对其真正的药理、有效的研究并不深入,不明确其中的作用机制和活性成分。需要利用现代化的、快速的、高效的技术,结合药物靶点作为基础,才能从这些药物中筛选出具有特异性的生物活性成分,为实现中药的现代化、国际化作出贡献。本研究通过利用以HeLa细胞为载体,并已包含报告基因pGL4.35(luc2P/9XGAL4UAS/Hygro)和质粒pBIND-PPA γ -LBD的高通量筛选模型,能有效的评价出12种天然药物提取物中具有PPAR γ 激活作用的部分。为开发新型的、安全的抗糖尿病天然药物提供了指导思想。后期,将依据本研究的结果,采用活性追踪指导的思想,对已知的具有高激活作用的8种提取物(绿萝花的EA、EB1和EB2,黄连的EB1部分,翼首草的EA、EB3和EC,以及猪牙皂的EB1部分)开展进一步的分离和纯化工作,以期找到强而有效的、安全的PPAR γ 高活性激动剂。

参考文献

- Francis GA, Annicotte JS, Auwerx J. PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3: 186-191.
- Guan Y, Breyer MD. Targeting Peroxisome Proliferator-activated receptors (PPARs) in kidney and urologic disease. *Minerva Urol Nefrol*, 2002, 54(2): 65-79.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 2000, 405: 421-424.
- Tordjman J, Chauvet G, Qlette J, et al. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 18785-18790.
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, et al. A futile cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med*, 2002, 8: 1122-1128.
- Shibasaki M, Takahashi K, Itou T, et al. A PPAR agonist improves TNF- α induced insulin resistance of adipose tissue in mice. *Biochem Biophys Res Com*, 2003, 309: 419-424.

- 7 Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cancers. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1):1-9.
- 8 Rubenstrunk A, Hanf R, Hum DW, *et al.* Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771:1065-1081.
- 9 Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, *et al.* Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *J Am Med Assoc*, 2004, 292:2585-2590.
- 10 Huang TH, Teoh AW, Lin B L, *et al.* The role of herbal PPAR modulators in the treatment of cardiometabolic syndrome. *Pharmacol Res*, 2009, 60:195-206.
- 11 Lin YX(林叶新), Xia ZN(夏之宁), Yang FQ(杨丰庆), *et al.* Research progress in the natural agonists for PPA receptors. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:998-1005.
- 12 Li WL, Zheng HC, Bukuru J, *et al.* Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*, 2004, 92(1):1-22.
- 13 Gao ZZ(高峥贞), Xia YF(夏玉凤), Wang Q(王强), *et al.* Studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Fructus Gleditsiae Abnormalis*. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2008, 27(1):1-4.
- 14 Kwok CY, Wong CNY, Yau MYC, *et al.* Consumption of dried fruit of *Crataegus pinnatifida* (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. *J Funct Foods*, 2010, 2:179-186.
- 15 Luo XW(罗小文), Gu J(顾建), Zhang E(张娥), *et al.* Anti-hyperlipidemia function of different active fractions from *Scindapsus aureus* the Tibetan medicine. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理与毒理学杂志), 2011, 25:98.
- 16 Ding ZZ(丁志忠), Gou RH(苟如虎), Wang YL(王亚玲), *et al.* Study on the chemical composition and medicinal value of *Pterocephali Herba*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2011, 39:17872-71873.
- 17 Li ZH(李忠海), Zhong HY(钟海雁), Wei YQ(魏元青). The research development of Utilization on *Mallus Doumeri* Leaf. *Food Sci Technol* (食品科技), 2002, 3:67-69.
- 18 Zhao JH(赵进航), Tian SQ(田淑琴). Study on diabetes mellitus therapeutic effects of traditional Chinese medicine compound HDB. *J Southwest Univ Nation; Nat Sci Edn* (西南民族大学学报, 自科版), 2008, 34:1186-1188.
- 19 Xia ZN, Lin YX, Guo LX, *et al.* Development of a cell-based high-throughput peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) screening model and its application for evaluation the extracts from *Rhizoma Coptis*. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 3:225-234.
- 20 Forman BM, Tontonoz P, Chen J, *et al.* 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, 1995, 83:803-812.
- 21 Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:4318-4323.
- 22 Huang TH, Kota BP, Razmovski V, *et al.* Herbal or natural medicine as modulators of perxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metaboliv syndrome. *Basic Clin Pharmacol*, 2005, 96(1):3-14.
- 23 Valeria D, Auria M, Sepe V, *et al.* Natural ligands for nuclear receptors: biology and potential therapeutic applications. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12:637-669.
- 24 Wu LJ(吴立军). Natural Pharmaceutical Chemistry (天然药物化学). Peking: People's Medical Publishing House, 2008, 18-35.
- 25 Xu P, Xia ZN, Lin YX. Chemical constituents from *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae). *Biochem Syst Ecol*, 2012, 45:148-150.
- 26 Han L(韩亮), Guo XL(郭晓玲), Feng YF(冯毅凡), *et al.* Study on the chemical constituents of volatile oil from *Lvluohua*. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2009, 5:148-150.
- 27 Yu YY(余园媛), Wang BC(王伯初), Peng L(彭亮), *et al.* Advances in pharmacological studies of *Coptis Chinese*. *J Chongqing Univ, Nat Sci Ed* (重庆大学学报, 自科报), 2006, 29:107-111.