

文章编号:1001-6880(2016)6-0916-06

微生物来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂 高通量筛选模型的建立和初步应用

于彩云¹,赵莉莉²,张晶晶¹,魏 涛^{1*}¹北京联合大学 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室,北京 100191;²中国医学科学院 北京协和医学院医药生物技术研究所,北京 100050

摘要:本研究用昆明种小鼠十二指肠上段提取的 α -葡萄糖苷酶,以 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷为反应底物,建立 α -葡萄糖苷酶抑制剂高通量筛选模型。用该模型对 1276 株放线菌和 132 株细菌等共计 2224 个发酵液粗提物样品进行筛选。初筛得到抑制率超过 50% 的阳性样品 23 个,初筛阳性率为 1.03%。将阳性菌株再次进行发酵提取,得到新发酵液的阳性样品数为 17,复筛阳性率为 0.74%。其中细菌 3 株,放线菌 13 株。3 个阳性样品经 α -葡萄糖苷酶验证后的抑制率均在 75% 以上。本研究建立的 α -糖苷酶抑制剂高通量筛选模型具有很强的实用价值,可用于新型糖尿病药物的开发。

关键词: α -葡萄糖苷酶抑制剂;高通量筛选模型;微生物发酵液粗提物;糖尿病

中图分类号:Q815;R977.1 + 5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.017

Development and Preliminary Application of High Throughput Screening Model of α -Glycosidase Inhibitor from Microorganism

YU Cai-yun¹, ZHAO Li-li², ZHANG Jing-jing¹, WEI Tao^{1*}¹Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Function Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China;²Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: The α -glycosidase was extracted from the upper duodenum of Kunming mice. 4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside was used as substrate to establish a high throughput drug screening model of α -glycosidase inhibitor. A total of 2224 microbial fermentation extracts, including 1276 strains of actinomycetes and 132 strains of bacteria, were screened. 23 positive samples were obtained, with a 1.03% positive rate at the first screening. The 23 strains were fermented and extracted for a second time, 17 positive samples were obtained, with 3 bacterium and 13 actinomycetes. The positive rate was 0.74%. 3 Positive samples were verified by α -glycosidase to have inhibitory effects higher than 75%. In conclusion, the developed α -glycosidase inhibitor high-throughput screening model had high practical value for developing new hypoglycemic drugs.

Key words: Alpha-glycosidase inhibitor;high-throughput screening model;microbial fermentation extract;Diabetes Mellitus

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)是一种常见的内分泌代谢性疾病。其基本病理特点为胰岛素分泌绝对或相对不足,或外周组织对胰岛素不敏感,引起以糖代谢紊乱为主,并包括脂肪、蛋白质代谢紊乱的一种全身综合性疾病^[1]。临床药物主要有胰岛素、双胍类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、磺脲类、噻唑烷二酮类和格列奈类等^[2]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂因其具有较

好的降糖疗效且对人体脏器无明显毒副作用^[3],成为Ⅱ型糖尿病的首选药物。常见的筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的方法有以淀粉、蔗糖和 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)^[4]作为底物启动酶动力学反应体系的体外模拟筛选模型。传统的筛选方法所需的检测样品量大,费时费力。 α -葡萄糖苷酶抑制剂的高通量筛选(High throughput screening, HTS)^[5]基于传统筛选原理,以减少测定所需样品量和高特异性等方面优于传统筛选方法而被广泛使用。

微生物在自然界中广泛存在且数量巨大,与人类的生活密不可分,很多药物来源于微生物的次级代谢产物,如 α -葡萄糖苷酶抑制物质最初就筛选于

收稿日期:2015-12-07 接受日期:2016-04-05

基金项目:北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室开放课题(ZK70201405);国家微生物资源平台(NIMR-2015-3)

* 通讯作者 Tel:86-10-62004604;E-mail:weitao@buu.edu.cn

放线菌属及链霉菌属微生物的次级代谢产物^[6]。天然产物来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂报道很多,这些报道的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂结构多为多糖类、生物碱类、皂苷类和黄酮类^[7],其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性互有差异。本研究通过建立以昆明种小鼠小肠上段提取的 α -葡萄糖苷酶为酶、4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷为反应底物的高通量筛选模型,期望在微生物菌种次级代谢产物中发现新型的酶抑制剂,为开发有效的新型抗糖尿病药物,延缓餐后高血糖、辅助降糖活性因子等奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

1276 株放线菌和 132 株细菌(共计 1408 株)及其发酵液粗提物样品(共计 2224)均来源并保藏于中国医学科学院医药生物技术研究所国家微生物资源平台药用微生物资源子平台。菌株发酵及其抽提由平台工作人员按照 7 mL 新鲜发酵液与等体积丙酮的配比进行抽提,离心,上清液真空离心浓缩,挥干后用 1 mL DMSO 溶解的步骤统一操作完成。

SPF 级昆明种雌性小鼠,12 周龄,体重 28~32 g,购自中国食品药品检定研究院[许可证号:SCXK(京)2009-0017]。

1.2 试剂

4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG, Sigma 公司);阿卡波糖片(Acarbose, 德国拜耳公司);对硝基苯酚(pNP, 天津市福晨化学试剂厂); α -葡萄糖苷酶(上海源叶生物科技有限公司);磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、NaCl、Na₂CO₃、DMSO、甘油(丙三醇)等均为国产分析纯试剂。

1.3 实验仪器

Polar Fluostar 多功能荧光检测仪,德国 BMG 公司;低温高速离心机,美国 Sigma 公司;全自动新型生化培养箱(ZSD-1160),上海智城分析仪器制造有限公司;超声波清洗机(WF-180),宁波海曙五方超声设备有限公司。

2 实验方法

2.1 鼠源 α -葡萄糖苷酶的提取与不同条件保存^[8,9]

剪取小鼠十二指肠上段部分约 10 cm 左右,纵向剖开,用预冷的 0.9% 盐水充分冲洗,后用干净载玻片刮取小肠内表面,将刮取物按以下四种方式处

理,分别记为方法 1、方法 2、方法 3 和方法 4。

方法 1: 将刮取物按约 1:5 加入预冷的磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8, 0.1 mol/L), 在冰浴上用匀浆器匀浆, 匀浆液于 4000 rpm 条件下离心 20 min, 取上清液分装, 于 -80 °C 保存备用。

方法 2: 将刮取物按约 1:5 加入预冷的磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8, 0.1 mol/L), 在冰浴上用匀浆器匀浆, 匀浆液于 4000 rpm 条件下离心 20 min, 取上清液分装, 先于 -20 °C 保存过夜, 后放入 -80 °C 保存备用。

方法 3: 将刮取物按约 1:5 加入预冷的磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8, 0.1 mol/L, 10% 甘油), 在冰浴上用匀浆器匀浆, 匀浆液于 4000 rpm 条件下离心 20 min, 取上清液分装, 于 -80 °C 保存备用。

方法 4: 将刮取物按约 1:5 加入预冷的磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8, 0.1 mol/L, 20% 甘油), 在冰浴上用匀浆器匀浆, 匀浆液于 4000 rpm 条件下离心 20 min, 取上清液分装, 于 -80 °C 保存备用。

2.2 鼠源 α -葡萄糖苷酶活力^[10]

37 °C 时 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中, 1 min α -葡萄糖苷酶催化 pNPG 反应生成 1 μmol/L pNP 的酶量, 规定为一个 α -葡萄糖苷酶活力单位。

2.3 反应时间与 pNP 生成量的关系

采用表 1 所示反应体系, 酶与 PBS(pH 6.8)混匀后在 37 °C 温浴 15 min 后加入底物 2.5 mmol/L pNPG, 继续在 37 °C 下分别反应 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 h 后, 加入终止液 Na₂CO₃ 溶液(0.2 mol/L), 分别测定其 405 nm 的吸光度值。

表 1 鼠源 α -葡萄糖苷酶活性测定体系

Table 1 The testing system of mouse α -glycosidase activity

组分 Component	用量 Dosage (μL)
α -glycosidase	20
PBS	110
pNPG	20
Na ₂ CO ₃	100

2.4 酶与 pNP 生成量的关系

在 250 μL 的反应体系中, 分别加入 0%、4%、8%、12%、16%、20%、24% 反应体系体积的鼠源 α -葡萄糖苷酶及相应体积 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液, 于 37 °C 温浴 15 min, 之后加入 20 μL pNPG(2.5 mmol/L), 于 37 °C 下反应 2 h, 加入 100 μL 0.2 mol/L Na₂CO₃ 溶液, 分别测定其 405 nm 的吸光度值(鼠源

α -葡萄糖苷酶溶液均使用 pH6.8 的磷酸盐缓冲液稀释至相应浓度,因此在该部分试验中虽然改变了酶的体积及缓冲液的体积,但改变的只有酶的终浓度这一个条件)。

2.5 终止液与 pNP 生成量的关系

在 250 μL 的反应体系中,加入 20 μL 鼠源 α -葡萄糖苷酶及相应体积 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(使反应终体积保持 250 μL),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 15 min,之后加入 20 μL pNPG(2.5 mmol/L),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 h,分别加入 10%、20%、30%、40%、50% 反应体系体积的反应终止液 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液,分别测定其 405 nm 的吸光度值。

2.6 模型有效性的验证

以阿卡波糖为阳性对照,磷酸盐缓冲液为阴性对照,验证模型有效性。在该筛选模型下,通过测定不同浓度(0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4 mg/mL)的阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果,以阿卡波糖浓度为横坐标、抑制率为纵坐标,绘制抑制活性曲线。计算公式如下:

$$\text{抑制率 \%} = \frac{(A_{\text{阴性对照均值}} - A_{\text{阳性对照均值}})}{A_{\text{阴性对照均值}}} \times 100\%$$

2.7 二甲基亚砜与 pNP 生成量的关系

在 250 μL 的反应体系中,在该筛选模型下,通

表 2 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选体系

Table 2 The screening system of mouse α -glycosidase inhibitory activity

组分 Component	样品测定组 Sample screening group	阴性对照组 Negative control group	阳性对照组 Positive control group	空白对照组 Control group
α -glycosidase	+	+	+	-
Sample	+	-	-	-
Acarbose	-	-	+	-
DMSO	-	+	+	+
pNPG(2.5 mmol/L)	+	+	+	+
Na_2CO_3 (0.2 mol/L)	+	+	+	+

注:“+”表示加入;“-”表示不加入。

Note: “+” indicated adding; “-” indicated not adding.

2.10 阳性样品的 α -葡萄糖苷酶的商品酶验证

将酶冻干粉用磷酸缓冲液配制成溶液,分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。稀释成相应浓度的工作液,取代鼠源 α -葡萄糖苷酶,对筛选得到的阳性样品的抑酶活性进行验证。

2.11 数据统计分析

试验结果采用 SPSS12.0 统计软件,one-way ANOVA 进行方差分析,均值比较用 LSD 和 Duncan 法。

过测定不同反应体系体积(0、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、10%) 的 DMSO 对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果,以 DMSO 体积为横坐标、OD 值为纵坐标,绘制曲线,以检验 DMSO 对体系的影响。

2.8 模型信噪比的确定^[11]

在反应体系中分别加入缓冲液、缓冲液和底物、缓冲液和酶、缓冲液和终止液及正常体系,检测不同组分对吸光度值的影响并计算筛选模型信噪比 S/N:

$$S/N = \text{正常酶反应体系吸光度值}/\text{其他成分吸光度值平均值}$$

2.9 样品筛选

筛选按表 2 进行。采用终浓度为 4 mg/mL 的阿卡波糖作为阳性对照,使用 96 孔板进行微生物发酵液粗提物样品的筛选。2 μL 样品与 20 μL 酶混合,并用磷酸盐缓冲液(pH6.8)补齐至 130 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min,然后加入 20 μL 2.5 mmol/L 浓度的底物 pNPG,反应 2 h 后,再加入 100 μL 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 终止液,检测 405 nm 处吸光度值大小。阴性对照以 2 μL DMSO 溶液替代样品。酶相对抑制率计算公式如下:

$$\text{酶相对抑制率 \%} = (A_{\text{阴性对照平均值}} - A_{\text{样品值}}) / (A_{\text{阴性对照平均值}} - A_{\text{阳性样品对照平均值}}) \times 100\%$$

Table 2 The screening system of mouse α -glycosidase inhibitory activity

3 结果分析

3.1 pNP 标准曲线

将 1.0 mol/L pNP 溶液用磷酸盐缓冲溶液(pH6.8)稀释成相应浓度,取 150 μL 与 100 μL 的 Na_2CO_3 (0.2 mol/L)于 96 孔板中,在 405 nm 处测吸光度值。平行试验 3 次。以吸光度值为纵坐标,pNP 浓度为横坐标,绘制标准曲线。经计算 pNP 的

标准曲线方程为 $Y = 0.0119X + 0.0672$, $R^2 = 0.9992$ 。

3.2 不同保存方式对酶活的影响

从图 1 可见,按 1.2.1 中的方法 1 所示方式保存酶,两个月后酶活为 77.10 U/mL,与方法 2 (53.05 U/mL)、方法 3 (40.13 U/mL)、方法 4 (27.09 U/mL) 比较,经 SPSS12.0 统计软件统计,组间方差分析显示,差异极显著 ($P < 0.01$)。提示,鼠源 α -葡萄糖苷酶的保存过程中不添加甘油且提取后快速置入-80℃中,其酶活力损失最小。因此,为最大程度的保存批量提取的鼠源 α -葡萄糖苷酶的活性,选择方法 1 所示方法保存酶以进行后续试验。

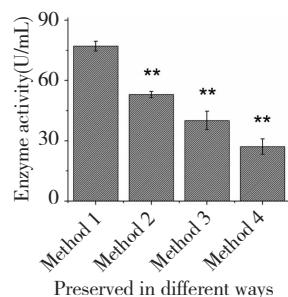


图 1 不同保存方式对酶活的影响

Fig. 1 Effect of different preservation methods on enzyme activity

Note: ** $P < 0.01$, vs method 1.

3.3 反应时间与 pNP 生成量的关系

由图 2 可见,随着反应时间的延长,吸光度值增长。当反应时间为 3.5 h 时,吸光度值趋于稳定。

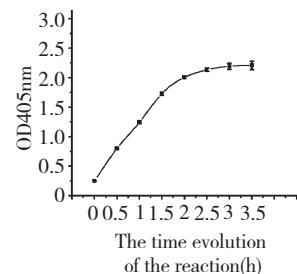


图 2 反应时间对 pNP 生成量的影响

Fig. 2 Effects of reaction time on pNP generation

3.4 酶与 pNP 生成量的关系

从图 3 可见,不同的酶用量其酶解率有显著差异。随着酶用量的增加,吸光度值增长。当体系中酶用量增加到 24% 时,反应趋于稳定。

3.5 终止液对 pNP 生成量的影响

从图 4 可见,随终止液用量增加(250 μL 的反

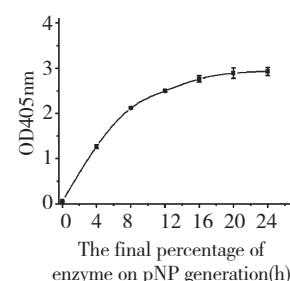


图 3 酶对 pNP 生成量的影响

Fig. 3 Effects of enzyme on pNP generation

应体系中终浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mol/L),吸光度值增加。在 40% 的用量时,数值趋于稳定,并与 50% 用量无显著差异。

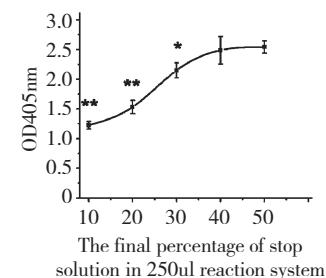


图 4 终止液对 pNP 生成量的影响

Fig. 4 Effects of stop solution on pNP formation

Note: ** $P < 0.01$, vs 40%; * $P < 0.05$, vs 40%.

3.6 筛选模型有效性的验证

考虑到试验操作的时效性与经济性,最终确定的反应条件为酶 8%,终止液 40%,反应时间 2 h。通过所建立的筛选模型,测定了不同终浓度的阿卡波糖对酶的抑制率。由图 5 可见,该模型能够灵敏的检测到 0.01 mg/mL 以上终浓度的阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,说明该筛选模型灵敏度高,可行性较强。

3.7 二甲基亚砜(DMSO)与 pNP 生成量的关系

从图 6 可见,DMSO 低于 10% 时,趋势平稳。

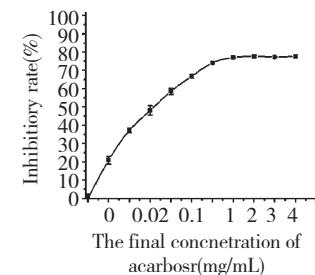


图 5 阿卡波糖对酶的抑制作用

Fig. 5 Effects of acarbose on the reaction system

因此,在250 μL反应体系中加入2 μL DMSO对体系没有影响。在后续筛选样品时,以2 μL DMSO溶解样品可行。

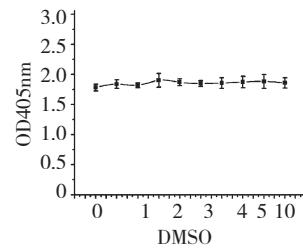


图6 DMSO对pNP生成量的影响

Fig. 6 The effect of DMSO on enzyme reaction system

3.8 模型信噪比

从图7可见,磷酸盐缓冲液、底物和终止液对该反应的影响较弱。鼠源α-葡萄糖苷酶对该反应体系的影响较其他组分大,推测原因是该酶经人工粗提,取自小鼠小肠,后期处理不充分,未经纯化,含有的杂质影响最终结果。经过计算,该模型的信噪比为9.372,远超于3,符合筛选模型的要求。

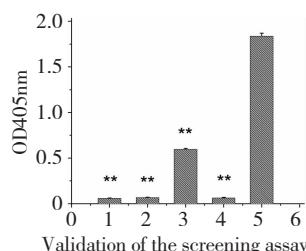


图7 反应体系中各组分对吸光度值的影响

Fig. 7 Effect of single component on the assay

注:1:缓冲液;2:缓冲液+底物;3:缓冲液+酶;4:缓冲液+终止液;5:正常体系对照

Note: 1: Buffer; 2: Buffer + substrate; 3: Buffer + α-Glycosidase; 4: Buffer + Na₂CO₃; 5: Buffer + substrate + α-Glycosidase + Na₂CO₃; * * P < 0.01, vs control, * P < 0.05, vs control

3.9 样品筛选及标准品验证结果

共筛选微生物发酵液粗提物样品2224份。将酶水平初筛抑制率大于50%和复筛抑制率大于50%的样品定为阳性样品。经过筛选,初筛得到阳性样品23个,阳性率为1.00%。I09AA-02503、I09AB-02503号样品属于同一菌株的不同发酵样品。将此22株阳性菌株重新进行活化发酵提取,得到阳性样品17个,阳性率为0.74%,其中细菌3株,放线菌13株。采用商品化的α-葡萄糖苷酶对该筛选样品进行验证,除四个样品抑制活性低于

50%,其余13个样品的抑制率均超50%,其中三个样品的抑制率大于75%,有较好的研究价值。在初筛与复筛筛选方法相同、阈值相同的情况下,仍得到不同的阳性筛选率,分析原因可能有以下几种情况:1)筛选所用样品为微生物发酵液粗提物,成分复杂;2)初筛和复筛样品是经过不同批次的发酵液纯化得到,在发酵培养基、发酵条件等方面具有差异;3)高通量筛选所用的样品量微量,易在实验过程中出现人为操作失误;4)自提鼠源α-葡萄糖苷酶为酶粗提物,成分复杂,可能会对试验结果产生影响。表3实验结果显示,商品化的α-葡萄糖苷酶与自提鼠源α-葡萄糖苷酶相比,阳性率下降0.18%,抑制率平均下降15.56%。自提鼠源α-葡萄糖苷酶可以减少遗漏阳性样品的概率,提高筛选得率,因此该筛选模型具有可行性。

4 讨论

α-葡萄糖苷酶(α-Glycosidase)是一类主要分布于小肠上皮绒毛膜刷状沿上,可降解包括蔗糖、麦芽糖、乳糖在内的一系列低聚糖的糖苷酶,主要断裂低聚糖非还原末端的α-1,4糖苷键^[12]。α-葡萄糖苷酶抑制剂(α-Glycosidase inhibitors, α-GI)可竞争性抑制葡萄糖苷水解酶,进而抑制多糖及蔗糖的分解,抑制碳水化合物在小肠上部的吸收,减缓餐后血糖的升高,预防因血糖波动引发的心血管疾病等。

模型建立过程中,曾试图以α-葡萄糖苷酶商品酶或纯化后的酶制剂为试剂进行筛选实验,但其具有的缺点,如商品酶购买周期长、费用高昂,自制酶纯化周期长、工艺复杂等,与高通量筛选的高效性、快速性的初衷相悖,因此,最终选用鼠源α-葡萄糖苷酶粗提物为实验试剂进行筛选,且鼠源α-葡萄糖苷酶粗提物能够达到初步筛选要求。考虑到每批次、每只鼠的差异会影响酶的稳定性,因此设计了不同保存方式对酶活影响的试验研究,期望得到一个优良的保存方式,进而大量提取、保存酶,以减少实验过程中数据的不稳定问题及其他因素的影响。此外,由于鼠源α-葡萄糖苷酶的限速、限量问题,在实验过程中,更倾向于选择实验效果良好、酶用量相对少的试验方案。

本研究中经模型筛选及商品酶验证的13个阳性样品具有较高的研究价值。微生物发酵液粗提物中活性物质的分离纯化、抑制类型属于竞争性抑制或非竞争性抑制及IC₅₀的确定等将通过后续的试验进行深入研究。

表3 复筛阳性样品对 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Table 3 Inhibitory effect of positive samples

样品号 Sample		酶活抑制率 α -Glycosidase inhibitory rate of sample (%)	标准品酶活抑制率 α -Glycosidase inhibitory rate of standard (%)
1	I09AA-01509	87.7	77.85
2	I09AA-01526	54.0	39.66
3	I09AB-01654	81.6	82.54
4	I09BA-01814	75.5	42.04
5	I09AA-01815	60.8	68.01
6	I09AA-02216	62.4	41.91
7	I09AA-02286	82.2	57.53
8	I09AA-02326	65.2	56.25
9	I09AA-02351	65.4	55.99
10	I09AA-02354	83.7	71.29
11	I09AA-02355	63.6	59.97
12	I09AA-02415	86.7	83.44
13	I09AA-02503	93.3	65.57
14	I09AB-02503	98.2	64.09
15	I14BA-01156	61.9	44.09
16	I14BA-01160	95.2	67.95
17	I14AB-01133	95.7	70.45

参考文献

- Peng JY(彭金咏), Ji L(吉柳), Tang XQ(汤新强). Research progress of effect of anti-diabetic traditional Chinese medicines based on regulation of glucose metabolic enzyme. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2012, 23: 3519-3525.
- Zhang WB(张文博), Du WQ(杜伟奇), Shi XF(施秀芳), et al. Research progress of drugs for treatment of diabetes. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2005, 25: 70-72.
- Azuma K, Toyofuku Y, Iesaki T, et al. Acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor, improves endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki rats exhibiting repetitive blood glucose fluctuation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345: 688-693.
- Shen L(申琳), Wu TT(武婷婷), Liu WZ(刘万振), et al. Isolation and identification of a strain of α -glucosidase inhibitor-producing endophytic bacteria from mulberry. *Food Sci* (食品科学), 2011, 13: 205-208.
- Bai G(白钢), Meng P(孟鹏), Qi XZ(齐西珍), et al. Establishment and application of a high throughput screening model for alpha-glucosidase inhibitor. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2010, 8: 1080-1086.
- Campbell RK, Campbell LK, White JR. Insulin lispro: its role in the treatment of diabetes mellitus. *Ann Pharmacother*, 1996, 30: 1263-1271.
- Liu X(刘霞), Feng CG(冯长根), Chen L(陈凌). Progress on research of α -glucosidase Inhibitors from herbal medicines. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2005, 6: 669-672.
- Huang Z, Ma J, Yuan AH, et al. Isolation and screening of glycosidase inhibitors from Chinese medicines. *J Med Coll PLA*, 2004, 2: 108-111.
- Yin HM(尹红梅). Screening and inhibitory activities of α -glucosidase inhibitors from *Alisma orientalis*. Nanchang: Nanchang University, MSc. 2012.
- Kang WY(康文艺), Zhang L(张丽), Song YL(宋艳丽). α -Glucosidase inhibitors from *Luculia pinciana*. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2009, 4: 406-409.
- Zhang LR(张丽蓉), Zhao LL(赵莉莉), Yu LY(余利岩), et al. The establishment and application of high throughput screening model targeting *Mycobacterium tuberculosis* peptide deformylase. *Chin Med Biotechnol* (中国医药生物技术), 2012, 2: 110-115.
- Yi G(毅刚), Wang Q(王谦), Zhang L(张璐), et al. Progress in research of α -glucosidase inhibitors and the structure-activity relationship. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2014, 2: 189-195.