

阿尔泰独尾草和异翅独尾草提取物 PTP1B 抑制作用及动力学研究

谢连珍^{1,2,3}, 肖佳琪^{1,2}, 李 勋^{1,2}, 信学雷^{1,2*}, 阿吉艾克拜尔·艾萨^{1,2*}

¹中国科学院新疆理化技术研究所; ²新疆特有药用资源利用重点实验室, 乌鲁木齐 830011;

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B) 在胰岛素信号通路中起负调控作用, PTP1B 过表达使胰岛素受体蛋白酪氨酸去磷酸化而导致机体对胰岛素不敏感, 继而产生 2 型糖尿病胰岛素抵抗。因此, PTP1B 是筛选治疗糖尿病活性成分的重要靶点。本文通过体外人源 PTP1B 抑制剂筛选模型, 以活性为导向对新疆两种特有独尾草进行抑制活性筛选。结果表明, 两种独尾草属植物均具有良好的 PTP1B 抑制活性 (IC_{50} 分别为 17.85 和 33.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在阿尔泰独尾草进一步分离得到化合物大黄酚-8-甲基乙酯, 抑制活性为 $26.15 \pm 0.5 \mu\text{M}$, 酶反应动力学研究表明其抑制类型为混合型抑制, 抑制常数 K_i 值为 $39.12 \pm 8.56 \mu\text{M}$ 。本研究为异翅独尾草的进一步分离提供了理论依据。

关键词: 2 型糖尿病; 蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B; 兽药; 酶动力学

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.001

PTP1B Inhibitory Effect and Kinetics of *Eremurus altaicus* (Pall.) *Stev. and Eremurus anisopterus* (Kar. et Kir.) Regel Extract

XIE Lian-zhen^{1,2,3}, XIAO Jia-qi^{1,2}, LI Xun^{1,2}, XIN Xue-lei^{1,2*}, AISA Hajiakber^{1,2*}

¹Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences; ²Key

Laboratory of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization Urumqi 830011, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: PTP1B plays an important role in the negative regulation of insulin signaling pathway. Overexpression of it leads to dephosphorylate the tyrosine residues of insulin receptor proteins, which is primarily responsible for insulin resistance in type 2 diabetes. Therefore, PTP1B are potential target for screening active ingredients of diabetes treatment. Inhibitory of PTP1B oriented, two specific Uygur herbs *Eremurus altaicus* and *Eremurus anisopterus* showed good inhibitory effect on PTP1B with IC_{50} of 17.85 and 33.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The compound isolated from *E. altaicus* showed good inhibitory effect with IC_{50} of $26.15 \pm 0.5 \mu\text{M}$; The enzyme kinetic studies revealed mixed-type inhibition type with the inhibitory constants (K_i) of $39.12 \pm 8.56 \mu\text{M}$. The study provided active guidance and theoretical basis for further isolation and purification of *E. anisopterus*.

Key words: T2DM; protein tyrosine phosphatase 1B; Uygur herbs; enzyme kinetic

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 和肥胖症都伴随着胰岛素敏感组织中的胰岛素敏感性降低即胰岛素抵抗, 胰岛素抵抗是由于胰岛素信号在传导中信号减弱或紊乱, 从而引起肌肉、肝脏及脂肪组织中的糖脂代谢平衡失调^[1]。

研究表明, 在 T2DM 患者脂肪细胞, 骨骼肌和肝脏中蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 活性增强或表达过度, PTP1B 是胰岛素信号转导通路中关键的负调节蛋白, 其作用通过阻断胰岛素刺激的胰岛素受体 (IR) 的酪氨酸磷酸化, 进而影响胰岛素受体 (IRS-1) 的磷酸化和其下游通路, 引发机体胰岛素作用紊乱, 血液中的葡萄糖不能正常进入组织细胞而被利用, 人体血糖升高而导致糖尿病^[2,3]。

在 2 型糖尿病大鼠中, 剔除蛋白酪氨酸磷酸酶

收稿日期: 2016-07-04 接受日期: 2016-11-14

基金项目: 国际 (地区) 合作与交流项目, 重点国际 (地区) 合作研究项目 (31110103908); 新疆维吾尔自治区国际科技合作项目 (20126023)

* 通讯作者 E-mail: xinxl@ms.xjb.ac.cn; haji@ms.xjb.ac.cn

后,不仅胰岛素敏感性增高,而且糖尿病症状也有所改善。敲除健康小鼠的 PTP1B 基因,表现出胰岛素敏感性的提高,且在高脂饮食的诱导下小鼠不发展为 2 型糖尿病和肥胖症^[4,6]。因此,PTP1B 是引起胰岛素抵抗的重要原因,PTP1B 是治疗糖尿病和肥胖症的重要靶点,通过抑制胰岛素敏感组织中的 PTP1B 的活性,对糖尿病和肥胖症的治疗都将会显著改善,寻找 PTP1B 特异性的抑制剂有着广阔的应用前景。

独尾草属植物(*Eremurus*)属于百合科(*Liliaceae*),属约 20 多种,分布于中亚及西亚的山地和平原沙漠地区:我国有 4 种,1 种产西南,3 种产新疆^[7,8],其中阿尔泰独尾草 [*Eremurus altaicus* (Pall.) Stev.] 普遍分布于天山北麓海拔 1300 ~ 2200 m 处的山地草甸,异翅独尾草 [*Eremurus anisopterus* (Kar. et Kir.) Regel] 和粗柄独尾草(*Eremurus inderiensis*) 生长于固定、半固定沙丘及沙地。独尾草具有较好的药用价值,已有悠久的民间食用和药用历史,以根入药具祛风除湿、补肾强身之功能^[9]。独尾草根中含有蒽醌类化合物,具有消炎、抗癌、增强免疫力等功能,独尾草所含多糖在抗衰老、抗溃疡、降血糖、降血脂方面也有明显作用^[10,11]。

重组表达的 PTP1B 具有很好的酪氨酸磷酸酶活性,在体外能使胰岛素受体去磷酸化^[12,13]。本研究采用在大肠杆菌中构建人源的 PTP1B 催化结构域,以 PTP1B 抑制活力为导向,对阿尔泰独尾草和异翅独尾草提取物进行降糖活性筛选,根据活性追踪获得两种独尾草属植物中有效抑制 PTP1B 活性的组分及单体并对其中活性单体进行酶动力学研究,为其进一步深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

重组 PTP1B 蛋白表达菌株 pET-30a-PTP1B1-321 大肠杆菌为本实验室保种、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、对硝基苯磷酸二钠(pNPP)、Tryptone、Yeast Extract、Q-Sepharose Fast Flow 和 SP-Sephadex、二硫苏糖醇(DTT)、钼酸钠(NaVO_4)购于 Sigma 公司,离心超滤管购于默克密理博公司,咪唑购于捷瑞生物有限公司,其他均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

Chromeleon 色谱工作站,制备型 HPLC (美国

DIONEX 公司):P680 HPLC 泵,UVD170U 紫外检测器(四波长),四元溶剂系统,在线脱气机,柱层析硅胶(100 ~ 200 目,200 ~ 300 目),高效液相色谱中甲醇、乙腈均为 HPLC 级别(美国 Merck 公司),超净工作台,全温度恒温摇床,高速冷冻离心机(Beckman, 美国),超声破碎仪(宁波新艺生物科技股份有限公司),酶标仪(SpectraMax M5,美国),96 微孔板(Corning Incorporated 公司,美国)。

1.3 药材鉴定

阿尔泰独尾 [*Eremurus altaicus* (Pall.) Stev.] 和异翅独尾草 [*Eremurus anisopterus* (Kar. et Kir.) Regel] 分别采于新疆阿尔泰和沙湾,由中国科学院新疆生态地理研究所标本馆沈冠冕研究员鉴定。标本保存于中国科学院新疆理化技术研究所。

1.4 实验方法

1.4.1 阿尔泰独尾草提取物制备

参照 Li X^[14] 等方法制备阿尔泰独尾草组分及化合物单体,阿尔泰独尾草全草 4.2 kg,粉碎后,用室温 95% 乙醇冷浸提取 5 次,每次 24 h,滤液浓缩得到 190 g 总浸膏,加水混悬,分别用正己烷、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,分别得到阿尔泰独尾草提取总浸膏 (EEA)、正己烷部位 (EAH)、乙腈部位 (ECN)、乙酸乙酯部位 (EAC)、正丁醇部位 (ENB)、萃余部位水部位 (WEA),对乙腈部位进一步分离得到馏分 ECN1-ECN12,并分离得到 5 个化合物,对乙酸乙酯部位进行正相硅胶柱(石油醚:乙酸乙酯 = 100:1 ~ 0:1)得到馏分 EAC1-EAC11,进一步分离得到 5 个化合物。

1.4.2 异翅独尾草提取物制备

异翅独尾草全草 3 kg,粉碎后,用 95% 乙醇冷浸提取 5 次,每次 24 h,滤液浓缩得到浸膏 218 g,加水混悬,分别用石油醚、乙腈、乙酸乙酯萃取,经浓缩至浸膏 (EEA),得石油醚部位 (EPE)、乙腈部位 (EAC) 和乙酸乙酯部位 (EAE);取乙酸乙酯部位,经 200-300 目硅胶色谱柱(石油醚-乙酸乙酯 50:1、30:1、20:1、10:1、5:1、3:1、1:1、0:1)梯度洗脱划分为 EAE-1 ~ EAE-6,EAE-4 段经甲醇溶解后,得到溶解部位 EAE-4-M1,经过制备液相得到两个化合物和小极性部位 X-B。

1.4.3 PTP1B 的制备、纯化及活性测定

将含 pET-30a-PTP1B1-321 的大肠杆菌进行培养,经 0.4 mM IPTG 诱导 4.0 h,12000 rpm 离心 10 min,收集菌体,冰浴超声破碎后,4 °C,12000 rpm 离

心 8 min, 取上清上 Ni^{2+} 亲和层析柱充分结合, 用 50 和 100 mM 的咪唑洗脱, 4 °C 轻微搅拌透析过夜, 使用 Millipore Amicon Ultra-15 离心超滤管进行浓缩, 蛋白浓缩液于 -80 °C 保存。使用时先配制成工作液置冰上待加样用。

PTP1B 抑制剂筛选模型的建立及验证: 微量法测定所获重组 PTP1B 的活性^[15], 略作修改。pNPP 是 PTP1B 的有效底物, 其磷酸基团被 PTP1B 脱去后生成对硝基苯酚, 发生颜色反应, 对硝基苯酚在 405 nm 处有吸收。测定反应总体积 200 μL , 将缓冲液稀释的 179 μL PTP1B 酶液中加入 1 μL DMSO, 室温孵育 5 min, 再加入 2.0 mM pNPP, 室温避光孵育 30 min, 在 405 nm 处测定吸收值为 0.70 ~ 0.90 时即为工作酶液, 备用。

按上述活性测定方法, 两种独尾草提取物用 DMSO 溶解, 按不同剂量加入, 405 nm 处测定吸收值, 每个实验重复 3 次, 以不含酶溶液体系为空白。按抑制率 = $1 - [(\text{OD}_{405} \text{ 抑制剂} - \text{OD}_{405} \text{ 抑制剂空白}) / (\text{OD}_{405} \text{ 酶活} - \text{OD}_{405} \text{ 酶活空白})] \times 100\%$, 求得不同浓度的抑制率, 用 Origin 8.5 计算提取物对 PTP1B 的半数抑制浓度 (IC_{50})。

为验证模型的可靠性, 采用多数文献报道的 PTP1B 特异性抑制剂 NaVO_4 进行 IC_{50} 测定。

1.4.4 单体、组分对 PTP1B 抑制类型的测定

以抑酶活性较好的阿尔泰独尾草单体 Chrysophanol-8-methyl ether 和异翅独尾草组分 X-B 为抑制剂, 取 Chrysophanol-8-methyl ether 浓度为 80 μM 、40 μM 和 20 μM , X-B 为 8.0、4.0 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 底物 pNPP 浓度为 2.0 mM、1.0 mM 和 0.5 mM 时对 PTP1B 的抑制反应速度, 应用 Origin 8.5 软件作图, 以底物浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标, 反应速度的倒数 $1/V$ 为纵坐标作图, 绘制双倒数图 (Lineweaver-Burk plots) 判断其抑制类型; 以抑制剂的浓度 $1/[I]$ 为横坐标, 反应速率的倒数 $1/V$ 为纵坐标绘制单倒数图 (Dixon plots) 求抑制常数 K_i 。

2 结果与分析

2.1 阿尔泰独尾草提取物对 PTP1B 的抑制作用

对阿尔泰独尾草全草的总提取物 (EEA), 已经萃取后的正己烷部位 (EAH), 乙腈部位 (ECN), 乙

酸乙酯部位 (EAC), 正丁醇部位 (ENB), 水部位 (WEA) 进行 PTP1B 活性测定, 结果见表 1。

表 1 阿尔泰独尾草提取物 PTP1B 抑制活性

Table 1 The PTP1B inhibitory activity of different extracts from *E. altaicus*

项目 Item	样品 Sample	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	EEA	33.76 ± 0.83
2	EAH	16.03 ± 0.41
3	ECN	8.42 ± 0.52
4	EAC	9.27 ± 0.36
5	ENB	≥ 50
6	WEA	≥ 50
7	NaVO_4	2.22 ± 0.14

通过筛选阿尔泰独尾草萃取后的组分活性, 可以发现阿尔泰独尾草的乙腈部位 (ECN) PTP1B 抑制活性最佳, 因此我们对乙腈部位进行进一步的分离得到 11 个组分并进行了 PTP1B 活性检测, 结果显示均具有较好的 PTP1B 抑制活性 (表 2)。

表 2 阿尔泰独尾草乙腈部位各组分 PTP1B 的抑制活性结果

Table 2 The PTP1B inhibitory activity of different sections in EAC from *E. altaicus*

项目 Item	样品 Sample	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	EAC-1	4.80 ± 0.32
2	EAC-2	4.71 ± 0.18
3	EAC-3	2.52 ± 0.09
4	EAC-4	0.94 ± 0.11
5	EAC-5	0.79 ± 0.08
6	EAC-6	7.65 ± 0.54
7	EAC-7	0.67 ± 0.05
8	EAC-8	1.38 ± 0.09
9	EAC-9	30.83 ± 0.41
10	EAC-10	1.80 ± 0.10
11	EAC-11	0.46 ± 0.07
12	NaVO_4	2.22 ± 0.14

通过对阿尔泰独尾草全草的萃取各部位进行 PTP1B 活性筛选, 乙腈和乙酸乙酯部位具有很好的 PTP1B 活性, 进一步分离纯化得到乙腈部位中活性更加好的组分, 对阿尔泰独尾草全草乙腈部位和乙酸乙酯部位分离得到的 6 个萘醌类化合物进行

PTP1B 活性测定,发现有 3 个单体化合物具有 PTP1B 抑制活性(表 3),其中 Chrysophanol-8-methyl

ether 活性最佳,但活性不及组分显著突出,这说明有活性更好的单体存在或化合物间存在协同作用。

表 3 阿尔泰独尾草分离单体的 PTP1B 抑制活性

Table 3 The PTP1B inhibitory activity of the compounds in *E. altaicus*

项目 Item	样品 Sample	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ (μM)
1	2-acetyl-1,8-dimethoxy-3-methylnaphthalene	58.19 \pm 0.73	26.50 \pm 0.50
2	Aloesaponol III 8-methyl ether	\geq 500	-
3	Emodin	\geq 500	-
4	Chrysophanol	72.12 \pm 1.77	28.39 \pm 0.06
5	Chrysophanol-8-methyl ether	62.05 \pm 0.53	26.15 \pm 0.50
6	4,8-dihydroxy-5,6-dimethoxy-7-methyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one	\geq 500	-
7	NaVO ₄	2.22 \pm 0.14	12.07 \pm 0.76

2.2 阿尔泰独尾草单体 Chrysophanol-8-methyl ether 对 PTP1B 抑制作用类型和抑制常数 Ki

由图 1A 可知,Chrysophanol-8-methyl ether 对 PTP1B 的抑制作用为可以看出,Km 值随抑制剂浓

度的增大而增大,反应速率下降,因此,它对 PTP1B 的抑制类型为混合型抑制;抑制常数 Ki 值为 39.12 \pm 8.56 μM (图 1B)。

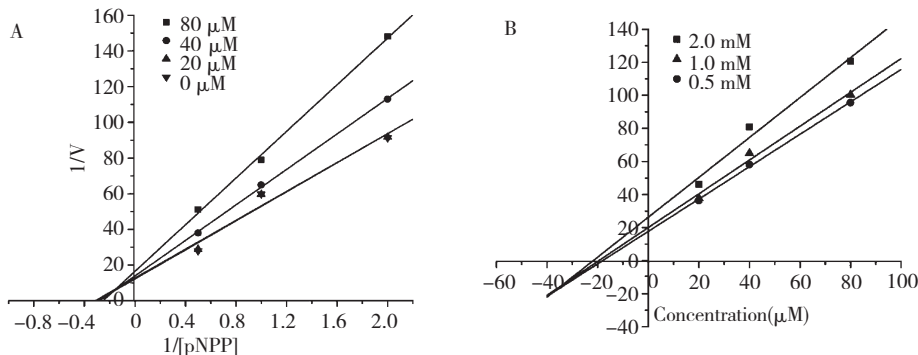


图 1 阿尔泰独尾草单体 Chrysophanol-8-methyl ether 对 PTP1B 抑制作用类型和抑制常数 Ki; (A) 双倒数曲线 Chrysophanol-8-methyl ether 对 PTP1B 抑制作用类型; (B) 单倒数曲线 Chrysophanol-8-methyl ether 对 PTP1B 抑制常数

Fig. 1 The inhibition type and constants Ki of PTP1B inhibition of Chrysophanol-8-methyl ether. (A) Lineweaver-Burk plots for PTP1B inhibition of chrysophanol-8-methyl ether; (B) Dixon plots for PTP1B inhibition of chrysophanol-8-methyl ether

2.3 异翅独尾草提取物对 PTP1B 的抑制作用

异翅独尾草提取部位对 PTP1B 抑制作用见表 4,结果表明异翅独尾草提取物具有抑制 PTP1B 的作用,且 95% 乙醇粗提物(EEA)对 PTP1B 已具有较强的抑制 PTP1B 的作用,IC₅₀为 17.85 \pm 1.21 $\mu\text{g/mL}$,对其进一步分离萃取得到的石油醚部位(EPE)、乙腈部位(EAC)和乙酸乙酯部位(EAE)中,乙酸乙酯部位对 PTP1B 的抑制作用最佳,IC₅₀为 1.66 \pm 0.19 $\mu\text{g/mL}$ 。

结果显示异翅独尾草乙酸乙酯部位有显著的

表 4 异翅独尾草提取物对 PTP1B 活性的影响

Table 4 Effects of three extracts from *E. anisopteris* on the PTP1B activity

项目 Item	样品 Sample	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	EEA	17.85 \pm 1.21
2	EPE	16.35 \pm 1.73
3	EAC	7.29 \pm 0.77
4	EAE	1.66 \pm 0.19
5	NaVO ₄	2.22 \pm 0.14

表 5 异翅独尾草乙酸乙酯部位各组分 PTP1B 的抑制活性
Table 5 The PTP1B inhibitory activity of the ethyl acetate extract of *E. anisopteris*

项目 Item	乙酸乙酯部位 Ethyl acetate extract	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	EAE-1	≥ 50
2	EAE-2	≥ 50
3	EAE-3	≥ 50
4	EAE-4	2.496 ± 0.19
5	EAE-5	≥ 50
6	EAE-6	≥ 50
7	X-B	3.31 ± 0.57
8	NaVO ₄	2.22 ± 0.14

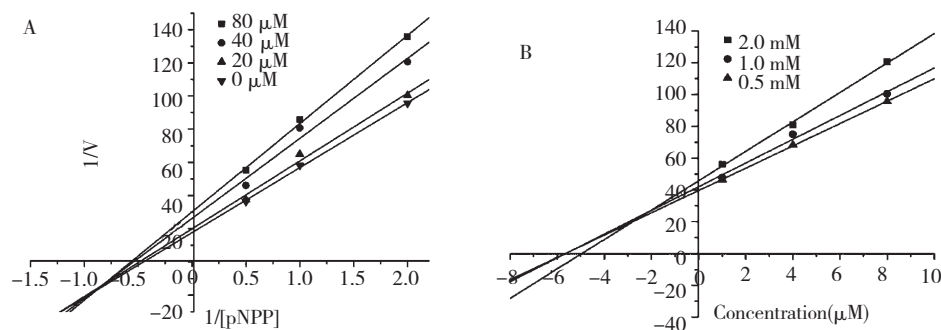


图 2 异翅独尾草小极性 X-B 对 PTP1B 抑制作用类型和抑制常数 K_i , (A) 双倒数曲线 X-B 对 PTP1B 抑制作用类型; (B) 单倒数曲线 X-B 对 PTP1B 抑制常数

Fig. 2 The inhibition type and constants K_i of PTP1B inhibition of X-B. (A) Lineweaver-Burk plots for PTP1B inhibition of X-B; (B) Dixon plots for PTP1B inhibition of X-B

3 讨论

到目前为止,对于 PTP1B 的抑制剂研究主要集中在化学合成和药用植物分离中,化学合成抑制剂在治疗糖尿病的同时,存在着不同程度的毒副作用。中药治疗糖尿病在中国有着悠久的历史,且取材方便,疗效稳定,不良反应少。对中药的研究有助于发现高活性、低毒性的有效降糖成分。

本文通过建立体外人源 PTP1B 抑制剂筛选模型,以新疆两种药食两用植物独尾草为对象,通过提取物对 PTP1B 的抑制活性为指导,从阿尔泰独尾草中分离出抑制活性较好的单体并对其进行酶动力学分析,确立单体抑制类型为混合型抑制,抑制常数为 $39.12 \pm 8.56 \mu\text{M}$ 。依据阿尔泰独尾草的以 PTP1B 抑制活性为导向对化合物分离方式,有关异翅独尾草对 PTP1B 酶产生抑制作用主要单体组分的分离、纯化、结构表征及其作用机理仍有待于进一步研究。

PTP1B 抑制活性,对异翅独尾草乙酸乙酯部位进行分离得到 6 个组分发现 EAE-4 对 PTP1B 抑制活性最佳(表 5),EAE-4 进一步分离得到两个化合物 1-O-heptatriacontanoyl glycerol 和 Chrysophanol 以及组分 X-B,化合物 1-O-heptatriacontanoyl glycerol 没有活性,Chrysophanol 活性见表 3。

2.4 异翅独尾草小极性 X-B 对 PTP1B 抑制作用类型和抑制常数 K_i

由图 2A 可知,X-B 对 PTP1B 的抑制作用为可以看出, K_m 值随抑制剂浓度的增大而增大,反应速率下降,因此,它对 PTP1B 的抑制类型为混合型抑制;抑制常数 K_i 值为 $2.85 \pm 0.93 \mu\text{g}/\text{mL}$ (图 2B)。

本研究结果为从维药中筛选治疗糖尿病天然药物及进一步分离化合物提供了药理学研究基础。

参考文献

- 1 Lei C, Dianna JM, Paul ZZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nature*, 2012, 8: 228-236.
- 2 Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E. Increased insulin sensitivity and obesity resistant in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 1999, 283: 1544-1548.
- 3 Cho SY, Baek JY, Ham SS, et al. PTP1B Inhibitors; Cyclopenta (d) (1,2) -oxazine derivatives. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2006, 16: 499-502.
- 4 Bakhtiyari S, Meshkani R, Taghikhani M. Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) knockdown improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Lipids*, 2010, 45: 237-244.
- 5 Gum RL, Gaede LL, Koterski SL, et al. Reduction of protein

- tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes*, 2003, 52:21-28.
- 6 Klamann LD, Boss O, Peroni OD, *et al.* Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B deficient mice. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:5479-5489.
- 7 Liu YX (刘嫫心). The Desert Flora of China. Beijing: Science Press, 1985. 3, 223-225.
- 8 Wang FZ (汪发缙), Tang J (唐进). Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press, 1980. 14, 37-38.
- 9 Li XS (李新生), Yang PJ (杨培君), Li HN (李会宁). Shi Can resources investigation in Shanxi Province (陕西地区石参资源的调查). *Amino Acids Biotic Res* (氨基酸和生物资源), 2002, 24(3):1-2.
- 10 Li C (李冲), Zhang YP (张应鹏), Zhang CZ (张承忠). The sole of anthraquinones constituents in *Eremurus*. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1999, 24:549-551.
- 11 Liu JR (刘金荣), Jiang FS (江发寿), Dan JM (但建民), *et al.* The ultrasonic extraction and the content determination of polysaccharide in *Eremurus*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) 2002, 33:322-323.
- 12 Sarabu R, Taub R, Grimsby J. Glucokinase activation-a strategy for T2D therapy: recent developments. *Drug Discov Today: Therapeut Strateg*, 2007, 4:111-115.
- 13 Kennedy BP, Ramachandran C. Protein Tyrosine phosphatase-1B in diabetes. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60:877-883.
- 14 Li X, Xie LZ, Li J, *et al.* A pair of new tetrahydro-naphthalenone enantiomers from *Eremurus altaicus* (Pall.) Stev. *Phytochem Lett*, 2015, 13:330-333.
- 15 Hung TM, Hoang DM, Kin JC, *et al.* Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory by dammaranes from Vietnamese Gao-Co-Lam tea. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124:240-245.