

# 瑶药葫芦钻中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性部位的筛选<sup>△</sup>

许有瑞\*, 伊辉, 张可锋, 廖迎#, 林家逊, 段小群(桂林医学院药学院, 桂林 541004)

中图分类号 R963 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2235-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.20

**摘要** 目的:从瑶药葫芦钻中筛选出具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的有效部位。方法:将葫芦钻水提物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取得到不同极性部位,分别测定各部位对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性,并对筛选出的活性强且得率相对较高的部位进行酶抑制动力学研究;考察各部位对葡萄糖、蔗糖和淀粉负荷小鼠血糖值的影响(以阿卡波糖片为阳性对照)。结果:体外酶活性抑制试验显示,葫芦钻乙酸乙酯部位[得率为0.40%、酶活性抑制率为(72.90±2.85)%]具有较强的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,且呈现出剂量依赖的快速非竞争性可逆抑制类型。体内耐糖量实验结果表明,阿卡波糖片和葫芦钻各部位对葡萄糖负荷小鼠的血糖值均没有影响( $P>0.05$ ),而阿卡波糖片和葫芦钻乙酸乙酯部位能降低蔗糖负荷小鼠30、60 min的血糖值以及淀粉负荷小鼠30、60、120 min的血糖值( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:乙酸乙酯部位是瑶药葫芦钻中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的有效部位。

**关键词** 瑶药;葫芦钻; $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂;不同极性部位;小鼠;耐糖量实验

## Screening of the $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Active Part from Yao Medicine *Pothos chinensis*

XU Yourui, YI Hui, ZHANG Kefeng, LIAO Ying, LIN Jiaxun, DUAN Xiaoqun (School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To screen the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory active part from *Pothos chinensis*. METHODS: The aqueous extractions of *P. chinensis* were extracted by petroleum, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol in turn to obtain different polar parts. Effect of each part on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity was determined, and enzyme inhibition kinetics was conducted for the screened parts with strong activity and relatively high yield rate; effects of each part on blood glucose level of mice loaded with glucose, sucrose and starch were respectively determined (using Acacostide tablet as positive control). RESULTS: Enzyme inhibition kinetics *in vitro* showed the ethyl acetate part [yield rate was 0.40%, enzyme activity inhibition rate was (72.90±2.85)%] had strong  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and showed a dose-dependent, fast, non-competitive and reversible model. Results of *in vivo* glucose tolerance indicated that Acacostide tablet and each part of *P. chinensis* had no effects on blood glucose level of glucose-loaded mice ( $P>0.05$ ); while Acacostide tablet and ethyl acetate part in *P. chinensis* could reduce 30, 60 min blood glucose level of sucrose-loaded mice and 30, 60, 120 min blood glucose level of starch-loaded mice ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). CONCLUSIONS: Ethyl acetate part is the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory active part from Yao medicine *P. chinensis*.

**KEYWORDS** Yao medicine; *Pothos chinensis*;  $\alpha$ -glucosidase inhibitor; Different polar parts; Mice; Glucose tolerance test

$\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)是一类酶的总称,其能从含有 $\alpha$ -糖苷键的底物中催化水解 $\alpha$ -葡萄糖基,主要存在于小肠刷状缘膜上皮细胞中,能够将双糖或多糖水解为可以被小肠吸收的单糖,是食物中碳水化合物水解的关键酶。因此,抑制该酶可以有效地减少食物中碳水化合物的吸收,一定程度改善餐后高血糖的症状<sup>[1]</sup>。

葫芦钻为天南星科石柑属石柑子[*Pothos chinensis* (Raf.) Merr.]的全草,系传统瑶药“十八钻”之一,又名上树葫芦、石葫芦茶、藤桔、柚子枫、石蒲藤等,主要分布于广东、广西、贵州、四川、云南等地<sup>[2]</sup>。其味淡、涩,性凉,在瑶医用药中属“风打相兼”类,具清热解毒、凉血止血、利尿消肌等功效,是我国南方瑶、壮等少数民族常用的药材之一<sup>[3-4]</sup>。有关葫芦钻化学成分的研究表明,其含有

酚酸等有机酸类<sup>[5-7]</sup>、黄酮碳苷类<sup>[8]</sup>、挥发油<sup>[9]</sup>、蒽醌、香豆素、萜类等化合物<sup>[10-11]</sup>。现代药理研究表明,其具有抗肿瘤<sup>[12]</sup>、抗氧化<sup>[13-14]</sup>、降血糖<sup>[15]</sup>等作用,然而尚缺乏对其更深入的作用机制及相关物质基础的研究。鉴于此,本研究结合体外酶抑制活性试验与体内糖耐量实验从葫芦钻中筛选出具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的有效部位,为进一步从中提取分离 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂提供参考。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

UV-1750型紫外-可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司);PHS-2C型pH计(上海三信仪表厂);电子天平(上海梅特勒公司)。

#### 1.2 药材、药品与试剂

葫芦钻购于桂林市六合路中草药市场,由桂林医学院张可锋讲师鉴定为天南星科石柑属石柑子[*Pothos chinensis* (Raf.) Merr.]的全草;阿卡波糖片(拜耳医药保健有限公司,批号:BJ14499,规格:50 mg/片); $\alpha$ -葡萄糖苷酶(10 U/mg)、4-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)购自美国Sigma公司;葡萄糖测试试剂盒(中生北控生物科

<sup>△</sup> 基金项目:桂林医学院高层次人才科研启动项目(No. KY2014016)

\* 讲师,博士。研究方向:中药活性成分的研究与开发。电话:0773-2303446。E-mail: xuyourui@sina.com

# 通信作者:实验师。研究方向:中药活性成分。电话:0773-2303446。E-mail: 849169006@qq.com

技股份有限公司,批号:143291);其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

SPF级健康KM小鼠,♂,体质量为(20±2)g,由兰州大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK(甘)2009-0004。

## 2 方法

### 2.1 葫芦钴各部位的提取与分离

取干燥葫芦钴2kg,切碎,按药材与蒸馏水1:10(*m/V*)的比例加热回流提取7次,每次1.5h,合并提取液,抽滤,减压浓缩至2L。取100mL浓缩液真空干燥,其余浓缩液依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收溶剂,低温真空干燥得石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和剩余水部位(依次简称为PF、EAF、nBF、WF),称质量、计算得率。

### 2.2 葫芦钴各部位对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

以PNPG为底物,利用 $\alpha$ -葡萄糖苷酶催化水解PNPG产生对硝基酚(PNP),以一定时间内反应体系中PNP的含量变化来计算样品提取物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性。具体按如下反应体系<sup>[6]</sup>进行:取0.1mol/L的磷酸盐缓冲液2mL,加入待测样品提取物100 $\mu$ L与PNPG(终浓度为2mmol/L),然后加入 $\alpha$ -葡萄糖苷酶0.05U,37℃反应15min后,加入0.1mol/L碳酸钠(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)溶液4mL终止反应。在397nm波长处测定吸光度(*A*)值,计算酶活性抑制率 $\{[A_0 - (A_1 - A_2)]/A_0 \times 100\%$ ,*A*<sub>0</sub>:空白,即不加样品反应后的*A*值;*A*<sub>1</sub>:加入样品反应后的*A*值;*A*<sub>2</sub>:背景,即只加样品的*A*值}。

### 2.3 EAF的酶抑制动力学试验

在EAF质量浓度分别为0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5mg/mL时,测定其酶抑制活性,考察EAF不同质量浓度对酶活性的影响;在EAF质量浓度为5mg/mL的条件下,分别测定反应时间为1、3、5、10、15、20min的酶抑制活性,考察EAF不同反应时间对酶活性的影响;在酶浓度为0.24、0.36、0.48、0.60U/mL时测定EAF质量浓度分别为0、5mg/mL时的酶抑制活性,考察其抑制作用的可逆性;取0.5、1、1.7、2mmol/L 4个浓度的PNPG与1、2、5mg/mL 3个质量浓度的EAF,分别测定反应速率,由Lineweaver Burk作图法绘制EAF的酶抑制动力学曲线,考察其抑制作用类型。

### 2.4 葫芦钴各部位对小鼠耐糖量的影响实验

将小鼠适应性喂养3d后,按照体质量大小编号,依据随机数字表将其分成16组,每组10只,分别为1个正常组、3个阿卡波糖片组(25mg/kg)、3个生理盐水组、3个葫芦钴EAF组(75mg/kg)、3个葫芦钴nBF组(75mg/kg)和3个葫芦钴WF组(75mg/kg),分别进行葡萄糖、蔗糖和淀粉耐糖量实验。试验前禁食12h,然后ig受试药物(10mL/kg)与葡萄糖(2g/kg)或蔗糖(4g/kg)或淀粉(6g/kg)。分别在给药后30、60、120min时经眼眶静脉采血,按试剂盒说明书方法测定血糖值。

### 2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计学软件进行统计学分析。数据

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和*t*检验进行组间比较。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 葫芦钴各部位的得率与酶活性抑制率测定结果

葫芦钴各部位的得率与酶活性抑制率测定结果见表1。

表1 葫芦钴各部位的得率与酶活性抑制率测定结果(*n*=3,%)

Tab 1 Results of yield rate and enzyme activity inhibition rate of each part from *P. chinensis*(*n*=3,%)

部位	得率	酶活性抑制率( $\bar{x} \pm s$ )
总提物	5.76	17.65±1.59
PF	0.01	88.44±4.61
EAF	0.40	72.90±2.85
nBF	0.67	34.02±1.07
WF	4.64	20.26±1.73

由表1可知,葫芦钴各部位中WF的得率最大,PF的得率最小,分别占总提物的80%和1%;葫芦钴EAF和nBF的得率分别为0.40%和0.67%,分别占总提物的7%和12%,可见葫芦钴中主要含强极性成分。但对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性则是随着极性渐大而渐小,即WF的酶抑制活性最弱,而弱极性的PF和EAF则活性最强。此外,由于PF的活性虽然最强,但得率太低,故选择EAF作为后续酶抑制动力学试验的研究对象。

### 3.2 EAF的酶抑制动力学试验结果

EAF的酶抑制动力学试验结果详见图1。

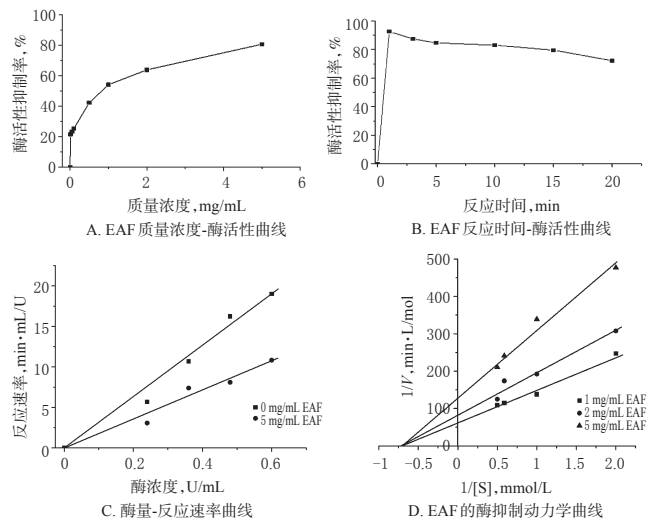


图1 EAF的酶抑制动力学试验结果

Fig 1 Results of enzyme inhibition kinetic test

由图1A可知,EAF的酶活性抑制率随EAF质量浓度的增加逐渐增大,且呈浓度依赖关系,半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为0.74mg/mL。由图1B可知,当EAF的质量浓度为5mg/mL时,可快速抑制酶活性,且在1min内酶活性抑制率就可以达到最大值,之后稍呈下降趋势。由图1C可知,EAF对酶抑制类型属可逆性抑制。由图1D可知,EAF对酶的抑制呈非竞争性抑制类型,米氏常数*K*<sub>m</sub>=1.43mmol/L。

### 3.3 葫芦钴各部位对小鼠耐糖量的影响测定结果

葫芦钴各部位对小鼠耐糖量的影响测定结果见表2。

表2 各组小鼠耐糖量实验测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 2 Results of glucose tolerance test in mice of each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

糖类型	组别	剂量, mg/kg	血糖值,mmol/L		
			30 min	60 min	120 min
空白	正常组		5.319±0.642	5.570±0.547	5.421±0.619
葡萄糖	阿卡波糖片组	25	13.394±0.862	10.617±1.128	8.035±0.687
	生理盐水组		13.724±1.065	10.491±0.817	8.348±0.793
	EAF组	75	13.637±1.239	10.480±0.772	8.425±0.934
	nBF组	75	12.915±0.994	10.011±0.948	7.962±0.571
	WF组	75	12.586±1.028	9.743±0.902	7.284±0.748
蔗糖	阿卡波糖片组	25	8.352±0.601**	7.809±0.834**	7.167±0.580*
	生理盐水组		11.871±0.726	10.816±0.892	9.332±0.813
	EAF组	75	8.754±0.656**	8.152±0.773*	7.586±0.794
	nBF组	75	10.391±0.948	9.735±0.832	9.474±0.896
	WF组	75	10.735±0.911	10.207±0.985	9.492±0.867
淀粉	阿卡波糖片组	25	7.942±0.734**	7.367±0.861**	6.701±0.841**
	生理盐水组		10.196±0.981	8.572±0.890	7.783±0.770
	EAF组	75	8.210±0.844**	7.428±0.738**	6.952±0.672*
	nBF组	75	9.924±0.739	8.761±0.856	7.907±0.847
	WF组	75	10.047±0.872	8.642±0.621	8.034±0.728

注:分别与各类型耐糖量实验中的生理盐水组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. normal saline group in each type of glucose tolerance test respectively,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

由表2可知,在葡萄糖耐糖量实验中,阿卡波糖片和葫芦钴各部位对葡萄糖负荷小鼠的血糖值均没有影响( $P>0.05$ );而在蔗糖耐糖量实验中,阿卡波糖片和EAF均能够降低蔗糖负荷小鼠30、60 min时的血糖值( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );同样在淀粉耐糖量实验中,阿卡波糖片和EAF也能够降低淀粉负荷小鼠30、60、120 min时的血糖值( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。本研究结果与体外酶活性抑制试验筛选结果相一致,葫芦钴各部位中EAF在耐糖量实验中的活性也最强,同时也可初步判断其是通过抑制肠道内的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性来发挥降血糖作用。

## 4 讨论

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂能够有效地降低餐后高血糖,可用于糖尿病及其并发症的防治。因此,自从第一个 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂类降糖药——阿卡波糖片上市后,国内外研究者开始从天然产物中筛选更安全、有效的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,包括黄酮类、生物碱类、多糖类和多酚类等化合物<sup>[17]</sup>。本研究结合体外 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性试验与体内耐糖量实验对葫芦钴中具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的成分进行了筛选,体内外结果一致表明其活性成分主要存在于EAF,且EAF对酶的抑制呈非竞争性抑制类型。

由于葡萄糖是单糖,可直接在胃肠道内吸收,所以不受 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的影响;而作为双糖的蔗糖和多糖的淀粉,二者必须由 $\alpha$ -葡萄糖苷酶水解转化为葡萄糖才能被吸收。因此,在耐糖量实验中,阳性药物阿卡波糖片和葫芦钴EAF对葡萄糖耐糖量实验中小鼠的血

糖值均没有影响,而对蔗糖和淀粉耐糖量实验中小鼠的血糖值具有显著的降低作用,这也说明葫芦钴EAF和阿卡波糖片的体内降血糖作用机制相似。

此外,覃振林等<sup>[15]</sup>采用四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型和葡萄糖致高血糖小鼠模型研究了葫芦钴不同提取物的降血糖活性,结果水提醇沉(95%乙醇)后的上清液和沉淀物均可明显降低两种模型小鼠的血糖值,而70%乙醇提取物却无此作用。可见,葫芦钴中既存在弱极性的具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的降血糖成分,还存在强极性的具有其他作用机制的活性成分,对其降血糖机制还需更加深入的研究。

## 参考文献

- [1] Ashok KT, Ravindra MK, Sachin BA, et al. Reduction in post-prandial hyperglycemic excursion through  $\alpha$ -glucosidase inhibition by  $\beta$ -acetamido carbonyl compounds[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(14): 4130-4132.
- [2] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979, 13(2): 19.
- [3] 戴斌. 中国现代瑶药[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2009: 241-242.
- [4] 戴斌, 丘翠嫦, 李钊东, 等. 瑶医用品种调查报告[J]. 中草药, 1997, 28(12): 746-749.
- [5] 周法兴, 梁培瑜. 广西蛇药中藤桔及铁扫帚的酸性成分分离[J]. 中草药, 1980, 11(11): 523-525.
- [6] 尹文清, 张岩, 宋鑫明, 等. 石柑子总有机酸的提取工艺与含量测定[J]. 中药材, 2009, 32(1): 124-126.
- [7] 纪明昌, 郭大乐, 蒋舜媛, 等. 石柑子中酚酸类化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(4): 609-612.
- [8] Iwashina T, Peng CI, Kokubugata G. Flavone O- and C-glycosides from *Pothos chinensis* (Araceae)[J]. *Bull Natl Mus Nat Sci Ser B*, 2010, 36(1): 27-32.
- [9] 覃振林, 韦海英, 廖冬燕. 柚子枫挥发油化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1099-1100.
- [10] 曾立, 杨林, 周效思, 等. 瑶药葫芦钴化学成分的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 287-289.
- [11] 纪明昌, 肖世基, 蒋舜媛, 等. 石柑子的化学成分研究[J]. 中草药, 2015, 46(1): 28-32.
- [12] 黄琳芸, 余胜民, 钟鸣, 等. 瑶药葫芦钴提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1590-1591.
- [13] 尹文清, 张岩, 曾立, 等. 石柑子不同溶剂提取物及其总蒽醌的抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2009, 30(3): 7-8.
- [14] 黄琼, 施丽娟, 黄永春, 等. 石柑子提取物体外抗氧化活性的研究[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 108-111.
- [15] 覃振林, 韦海英, 廖冬燕, 等. 瑶药柚子枫提取物降血糖作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 108-110.
- [16] 许有瑞, 倪京满, 孟庆刚, 等. 甘草中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的初步研究[J]. 中药材, 2005, 28(10): 890-891.
- [17] 季芳, 肖国春, 董莉, 等. 药用植物来源的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1633-1640.

(收稿日期: 2016-08-21 修回日期: 2017-03-01)

(编辑: 林 静)