

文章编号:1007-2985(2020)02-0054-04

多穗柯提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选^{*}

方海莲,刘妹玲,李诗瑶,肖竹平

(吉首大学民族药解析与创制湖南省工程实验室,湖南 吉首 416000)



摘 要:为了探究多穗柯不同提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,采用不同溶剂回流提取和不同极性剂溶剂萃取 2 种方法得到多穗柯提取液,分别建立体外 α -葡萄糖苷酶抑制模型,对提取液进行活性筛选,分析提取物浓度与抑制活性的关系,筛选出抑制效果最佳的提取方法.结果表明,甲醇提取物($IC_{50}=34.30$ mg/L)和正丁醇萃取物($IC_{50}=30.47$ mg/L)的抑制效果更接近于阿卡波糖($IC_{50}=25.26$ mg/L).

关键词:多穗柯; α -葡萄糖苷酶;抑制剂;血糖

中图分类号:R284.2

文献标志码:A

DOI:10.13438/j.cnki.jdzk.2020.02.012

糖尿病是一种常见的代谢性内分泌疾病,因为胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用障碍所致,其中 95% 以上为 2 型糖尿病^[1-2].糖尿病是目前医治成本最高、负担最重的慢性病之一,并且可引发多种并发症,如糖尿病肾病、糖尿病足、糖尿病酮症酸中毒、糖尿病视网膜病变等^[3-4].国际糖尿病联盟(IDF)最新发布的数据显示,目前全球有 4.63 亿人患有糖尿病,预计到 2030 年,糖尿病患者总数将增至 5.78 亿^[5]. α -葡萄糖苷酶是一类主要分布于小肠粘膜刷状缘上、能断裂非还原末端的 α -葡萄糖苷键、水解食物中二糖及多糖的常见酶.通过抑制 α -葡萄糖苷水解酶的作用,能有效减少或抑制糖类的水解,延缓糖类的吸收,从而降低血糖浓度^[6-7].目前临床治疗糖尿病的方法几乎都是利用药物来降低血糖含量,如二甲双胍、磺酰脲类、阿卡波糖等药物,虽然控制血糖的效果很好,但是往往不能治疗由糖尿病引发的各种并发症,而且这类药物通常会有严重的副作用,长期服用会对患者的机体造成一定的损害及耐药性^[8-11].作为另一种选择,已有越来越多的专业人士在探索利用天然产物来预防和治疗糖尿病.天然产物虽然见效慢,但由于是多种成分的组合,各成分的作用机制不同,存在协同增效作用,往往能取得良好的治疗效果,因此,许多专家通过不同的实验筛选出了降糖活性较好的中药^[12].

多穗柯(*Lithocarpus polystachyus* Rehd.),别名胖桐、甜味茶等,壳斗科柯属常绿乔木,药食同源植物,在我国主产于江西、广西及湖南等省,兼具茶、糖、药 3 种功能,民间俗称“甜茶”.其嫩叶具有甜味,属高甜度、低热能的天然甜味剂^[13].数百年来,“甜茶”一直被用作治疗多种疾病的传统中草药^[14],以叶入药,具

^{*} 收稿日期:2020-02-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21867010);湘西自治州科技计划项目(2018LXSF0215110);2019 年吉首大学研究生科研创新项目(JGY201924)

通信作者:肖竹平(1972—),男,湖南邵阳人,吉首大学化学化工学院教授,博士,主要从事天然产物改造与新药发现研究.E-mail:xiaozhuping2005@163.com.

有清热利尿、滋润肝肾、润肺镇咳等功效,可用于防治温热痢疾、皮肤瘙痒、痈疽恶疮等症,同时还具有“三抗”(抗氧化、抗过敏、抗癌变)、“三降”(降血压、降血糖、降血脂)作用^[15-19]。在本研究中,笔者采用不同溶剂(二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、水)提取法和不同溶剂(乙酸乙酯、正丁醇、水层)萃取法得到多穗柯提取物,并分别测定提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,筛选出具有最佳抑制效果的活性提取物,以便为后期降糖药物的研制提供参考。

1 实验材料与仪器

1.1 材料与试剂

材料:多穗柯叶,采集于湖南省邵阳市。试剂:石油醚(沸程 60~90 °C),二氯甲烷,乙酸乙酯,甲醇,正丁醇,二甲双胍,购于国药集团; α -葡萄糖苷酶(G5003-100UN Sigma 公司),对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG, Sigma 公司),对硝基苯酚(PNP, Macklin 公司),阿卡波糖(Acarbose, 拜耳公司),无水碳酸钠,磷酸二氢钾,磷酸氢二钾。所有试剂均为分析纯。蒸馏水自制。

1.2 仪器设备

KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HHS II-2 型电热恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂);循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);Hidolph Hei-VAP Value 旋转蒸发仪(德国海道夫集团);电子天平 ME204E(梅特勒-托利多仪器有限公司);DHG-9240A 立式电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司);万能粉碎机(德清拜杰电器有限公司);Spectra Max Plus 384 酶标仪(美国美谷分子仪器有限公司);高速台式离心机;索氏提取器。

2 实验方法

2.1 多穗柯叶的预处理

多穗柯叶去除杂质和枝杆,晒干,用恒温干燥箱 60 °C 干燥 4 h,再用粉碎机粉碎,过 50 目筛备用。在圆底烧瓶中用石油醚按料液比 1:10(g:mL) 90 °C 回流提取 2 h,冷却抽滤。滤液经旋转蒸发仪浓缩回收石油醚,残渣干燥称重,得预处理样品用于活性成分的提取。

2.2 多穗柯提取物的制备

取多穗柯预处理样品 2 份各 50 g,分别用溶剂提取法和萃取法制备提取物。一份按液料比 1:10(g:mL)的配比依次用二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、蒸馏水提取,在 80 °C 恒温水浴锅中各回流提取 2 次,每次 2 h,趁热抽滤,合并相同溶剂滤液,浓缩分别得到二氯甲烷提取物、乙酸乙酯提取物、甲醇提取物、蒸馏水提取物。另一份用 70%乙醇提取后,用旋转蒸发仪浓缩回收乙醇,然后依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取,分别得到乙酸乙酯层、正丁醇层萃取物和水层提取物。

2.3 提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

采用 PNPG 法进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定^[20]。将所得的活性物质用 0.2 mol/L PBS(pH 值 6.8)溶解,置于 4 °C 冰箱中备用。活性检测在 96 孔板上进行。实验组加 25 μ L 样品液和 25 μ L α -葡萄糖苷酶(0.2 U/mL),对照组用等体积的 PBS 代替样品液,背景组用等体积的 PBS 代替 α -葡萄糖苷酶溶液,空白组加 50 μ L PBS。在 37 °C 恒温箱下培养 15 min 后,每孔加 50 μ L PNPG 底物(2 mmol/L),再在 37 °C 恒温箱下培养 20 min,每孔加 100 μ L 浓度为 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应并显色,在酶标仪 405 nm 处测 OD 值(A),抑制活性用半抑制浓度 IC_{50} 表示。抑制率 I 按如下公式计算:

$$I = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{实验}} - A_{\text{背景}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%.$$

3 结果与分析

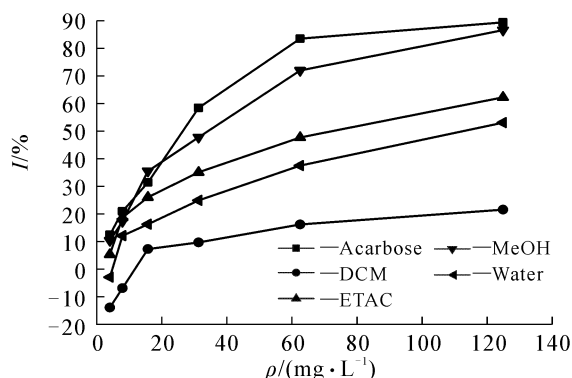


图 1 不同极性提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制曲线

Fig. 1 Inhibition Rate Curve of Different Polar Extracts Against α -Glucosidase

3.2 不同萃取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

将 70%乙醇溶液提取得到的总活性成分依次采用不同极性溶剂进行萃取,分离活性部位,然后以阿卡波糖(Acarbose)为阳性对照,测定不同质量浓度萃取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性.实验结果如图 2 所示.根据实验数据可以得出,正丁醇(NBA)萃取物、乙酸乙酯(ETAC)萃取物、水层(Water)都有不同程度的抑制活性,其中正丁醇(NBA)萃取物 IC_{50} 为 30.47 mg/L,抑制效果最接近阿卡波糖(Acarbose)的 IC_{50} ,适于获取用以抑制 α -葡萄糖苷酶的活性物质.

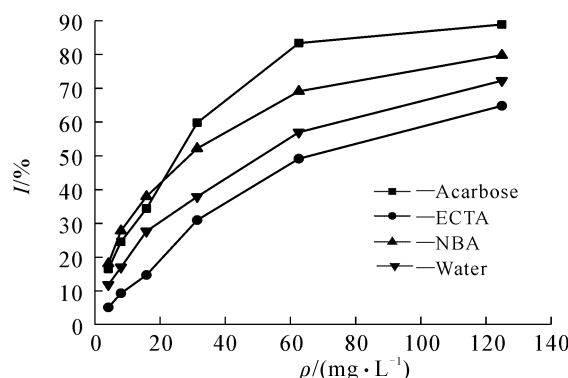


图 2 不同极性萃取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制曲线

Fig. 2 Inhibition Rate Curve of Different Polar Extract Liquor Against α -Glucosidase

4 结论

使用不同的方法制备了多穗柯提取物(萃取物),并比较了提取物(萃取物)对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,发现高极性溶剂提取物(萃取物)的抑制活性较好,说明高极性溶剂提取物(萃取物)是 α -葡萄糖苷酶的抑制活性部位.笔者初步筛选出抑制 α -葡萄糖苷酶的多穗柯活性成分,甲醇提取物($IC_{50} = 34.30$ mg/L)和正丁醇萃取物($IC_{50} = 30.47$ mg/L)抑制效果更接近于阿卡波糖($IC_{50} = 25.26$ mg/L),为进一步研究多穗柯提取物(萃取物)的降糖活性及其机制奠定基础.

参考文献:

- [1] 中华医学会糖尿病分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J].中国实用内科杂志,2018,38(4):292-344.
- [2] 中华中医药学会糖尿病分会.糖尿病中医诊疗标准[J].世界中西医结合杂志,2011,6(6):540-547.
- [3] BROWNLEE M. The Pathobiology of Diabetic Complications; A Unifying Mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [4] 陈梦婷,张殷建.中医药防治糖尿病视网膜病变的机制研究进展[J].上海中医药大学学报,2020,34(1):94-100.
- [5] SILINK M. Fore Word of Diabetes Atlas[M/OL].[2020-01-12].<http://www.eatlas.Idf.org/nersc269.html>.2019.
- [6] 缪子敬,李志万,周学海,等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展[J].广东化工,2019,46(17):96-97;101.
- [7] 史敏,陈雷,孟婷婷,等.天然产物降糖作用研究新进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(32):27-28.
- [8] 范莉,王业玲,唐丽.天然来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法的研究进展[J].天然产物研究与开发,2016,28(2): 313-321;306.

- [9] XU S S, ZHANG H B, ZHOU J P, et al. Advances of New Antidiabetic Drugs[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2011, 42(2): 97-106.
- [10] EVANS J M M, OGSTON S A, EMSLIE-SMITH A, et al. Risk of Mortality and Adverse Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes: A Comparison of Patients Treated with Sulfonylureas and Metformin[J]. Diabetologia, 2006, 49(5): 930-936.
- [11] WU T, TRAHAI R L G, LITTLE T J, et al. Effects of Vildagliptin and Metformin on Blood Pressure and Heart Rate Responses to Small Intestinal Glucose in Type 2 Diabetes[J]. Diabetes Care, 2017, 40(5): 702-705.
- [12] 吴少锦, 邹荣灿, 焦思棋, 等. 青钱柳抑制 α -淀粉酶活性筛选研究[J]. 食品科技, 2018, 43(5): 224-227.
- [13] 雷鸣, 徐应淑, 徐凡, 等. 多穗石柯化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 176-180.
- [14] HOU S Z, CHEN S X, HUANG S, et al. The Hypoglycemic Activity of *Lithocarpus Polystachyus* Rehd. Leaves in the Experimental Hyperglycemic Rats[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1): 142-149.
- [15] 黄松, 罗明琰, 陶艳, 等. 甜茶质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(23): 2176-2178.
- [16] 韦宝伟, 李茂, 李伟芳. 多穗柯总黄酮的降糖作用[J]. 内科, 2008, 3(4): 510-512.
- [17] 董华强, 宁正祥, 于立静, 等. 多穗柯黄酮根皮苷对糖尿病小鼠的降血糖血脂效果[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 714-718.
- [18] 李晚谊, 李瑞英. 云南甜茶抗过敏有效成分初步研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2001, 23(6): 461-463.
- [19] 李胜华, 伍贤进, 向晓军. 多穗柯有效成分的提取及抑菌效果研究[J]. 食品科技, 2010, 35(3): 211-214.
- [20] 李婷, 张小东, 宋聿文, 等. 一种用微孔板筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的方法[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(10): 1128-1134.

Inhibitory Activity Screening of Extract from *Lithocarpus Polystachyus* Rehd. Against α -Glucosidase

FANG Hailian, LIU Meiling, LI Shiyao, XIAO Zhuping

(Hunan Engineering Laboratory for Analysis and Development of Ethnomedicine, Jishou University, Jishou 416000, Hunan China)

Abstract: The inhibitory activity of extract from *Lithocarpus polystachyus* Rehd. against α -glucosidase has been researched. The extract was obtained through reflux extraction with different solvents and leaching with different polar solvents. By establishing α -glucosidase inhibitory model in vitro, the activity of extracts from the leaf of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. was screened, and the relationship between inhibitory activity and concentration of the extract was researched. Results show that inhibition effect of methanol extract ($IC_{50} = 34.30$ mg/L) and *n*-butanol extract ($IC_{50} = 30.47$ mg/L) was closer to that of acarbose ($IC_{50} = 25.26$ mg/L).

Key words: *Lithocarpus polystachyus* Rehd.; α -glucosidase; inhibitor; blood glucose

(责任编辑 易必武)