

马齿苋活性成分中 葡萄糖苷酶抑制剂的筛选

白冰¹,李玉萍¹,叶军²,王得解¹,周春丽¹,苏虎¹

(1. 江西科技师范学院生命科学学院,江西南昌 330013; 2. 厦门大学生命科学学院生命医学系教育部重点实验室,福建厦门 361005)

摘要 [目的] 观察马齿苋活性成分对兔小肠黏膜 葡萄糖苷酶活性的影响,筛选 葡萄糖苷酶抑制剂。[方法] 提取分离马齿苋活性成分,在体外建立微量酶反应体系,pNPG作为底物,以阿卡波糖为参照,检测马齿苋活性成分对 葡萄糖苷酶活性的影响。[结果] 马齿苋总提取液、粗多糖和总生物碱对 葡萄糖苷酶具有明显抑制作用,抑制效果接近于阿卡波糖,不饱和脂肪酸和总黄酮无抑制作用。[结论] 马齿苋防治糖尿病的主要成分是生物碱和多糖,可能具有阿卡波糖样的降糖机制。

关键词 马齿苋;活性成分; 葡萄糖苷酶;抑制剂

中图分类号 S567.23⁹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)02-00657-02

Screening of α -glucosidase Inhibitors in Active Constituents from *Portulaca oleracea* L.

BAI Bing et al (School of Life Sciences, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013)

Abstract [Objective] The research aimed to observe the effects of active constituents from *Portulaca oleracea* L. on α -glucosidase activity in intestine mucosa to screen α -glucosidase inhibitors [Method] The active constituents were extracted from *Portulaca oleracea* L. The trace enzyme reaction system was constructed in vitro. Taking the pNPG as substrate, and acarbose as control, the effects of the active constituents from *Portulaca oleracea* L. on α -glucosidase activity. [Result] Total extraction, alkaloids and polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. could obviously inhibit α -glucosidase activity, but polyunsaturated fatty acid and flavonoids had no inhibition. [Conclusion] The main active constituents are alkaloids and polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. for preventing diabetes, and the hypoglycemic mechanism is similar to acarbose.

Key words *Portulaca oleracea* L.; Active constituents; α -glucosidase; Inhibitor

药食两用植物马齿苋 (*Portulaca oleracea* L.)对人体具有多种药理作用,如提高人体免疫力、防治心脏病、降血压、降血糖和改善糖尿病症状、抗癌等,这些功效与其含有去甲基肾上腺素、多糖、不饱和脂肪酸、生物碱、黄酮类、强心甙和葱醌甙等生物活性成分有关^[1]。已有研究表明,单味中药马齿苋或不同部位有效成分降糖效果显著,可以防治 II型糖尿病^[2-4]。笔者在前期试验中也发现,马齿苋总提取液和多糖对糖尿病小鼠具有明显的降糖作用,并能改善糖负荷后小鼠的葡萄糖耐受量,但关于其降糖作用的机制目前尚不清楚。为此,笔者通过在体外建立酶反应体系,将提取分离马齿苋多种活性成分进行高通量快速筛选,观察分析马齿苋有效成分对 葡萄糖苷酶活性的影响,旨在为进一步研究马齿苋发挥作用的规律性和本质性的内容,及有效成分降糖机制奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 马齿苋于 2005年 9月购于江西省南昌市农贸市场,经江西科技师范学院药学院药理学教研室鉴定,用清水洗净,沥干水分,60℃鼓风干燥 6 h,粉碎备用。4-硝基酚-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG),为德国 E Merck公司产品;阿卡波糖,商品名拜糖平,批号 101907,为德国拜耳(Bayer)公司产品;其余试剂均为国产分析纯,为国药集团生产。全自动酶标仪, Multiscan Mk3, labsystem s公司生产。

1.2 马齿苋活性成分的分离提取 称取上述备用马齿苋干粉 50 g,加蒸馏水(按 1:30的比例分 3次加蒸馏水),煮沸后煎 20 min,取上清液减压浓缩使其生药浓度为 2 g/L,得粗提取液,置 4℃冰箱保存备用。同时,称取相同重量的马齿苋

干粉,分别采用周晶等^[5]、上官新晨等^[6]、黄阿根等^[7]的方法提取马齿苋粗多糖、不饱和脂肪酸、生物碱、黄酮及定量,所得样品 4℃干燥保存备用。临用时配制使用。

1.3 溶液的配制 磷酸盐缓冲液:用蒸馏水配制成浓度为 67 mmol/L 的 KH_2PO_4 缓冲液(pH值 6.8)。底物(pNPG)溶液:用 67 mmol/L KH_2PO_4 缓冲液配制成 0.01 mol/L pNPG,反应终止液:0.1 mol/L Na_2CO_3 溶液。阳性对照药品阿卡波糖溶液:将拜糖平研碎,溶于蒸馏水后过滤,取上清液配制成浓度为 3.75、7.5、15、30、60、120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液。

1.4 兔小肠黏膜匀浆的制备 雌雄兔兼用,禁食 1晚后耳静脉空气栓塞处死,立即取出小肠,用冰冷生理盐水冲洗后,翻转小肠再多次漂洗,将洗净的小肠置冰台上,用滤纸吸干小肠上的黏液后用载玻片轻刮下小肠黏膜。称取一定量的小肠黏膜,加 4℃预冷的磷酸缓冲液(1:5),匀浆,4℃、10 000 r/min离心 20 min,取上清液分装, -20℃冷冻保存备用。

1.5 马齿苋活性成分中 葡萄糖苷酶抑制剂的筛选

1.5.1 葡萄糖苷酶活性的测定。根据 Pierre等^[8]的方法,以 pNPG为底物,于波长 400 nm处测定 葡萄糖苷酶的活性。其中,酶活力单位定义为:在 37℃、pH值 6.8条件下,1 min内水解 pNPG释放 1 μmol 对硝基酚(PNP)所需的酶量。抑制剂活力单位定义为:在相同条件下降低 1个酶活力单位所需的抑制剂量。

抑制剂活力 = 标准样的酶活力 - 加入抑制后酶活力

抑制率 (%) = (抑制剂活力 / 酶活力) \times 100。

1.5.2 马齿苋活性成分对 葡萄糖苷酶活性的影响。根据 Pierre等^[8]的方法改良,快速筛选在 96孔板上进行,分别设 3个组:空白对照组(缓冲液 + 底物 + 酶液),阳性对照组(阿卡波糖 + 底物 + 酶液),样品测定组(样品 + 底物 + 酶液)。酶反应系统总体积为 200 μl 。其中,9 μl 小肠黏膜上清液,4 μl pNPG溶液(0.01 mol/L),另包括不同体积的磷酸钾缓冲液(67 mmol/L,pH值 6.8)和待测样品。37℃反应 10

基金项目 江西省教育厅科技项目(赣教技字[2007]285号);江西科技师范学院人才创新基金项目(2005)。

作者简介 白冰(1987-),男,河北石家庄人,本科,专业:生物工程。通讯作者,博士,教授, E-mail: liyp20012000@yahoo.com.cn。

收稿日期 2008-10-31

min,加入 138 μl Na₂CO₃ (0.1 mol/L)溶液终止反应,测定在酶作用下释放出的对硝基酚的吸光度值。

1.6 数据统计与分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料用方差分析法分析,用 *t*检验统计处理。 $P < 0.05$ 认为 2个变量之间有统计学显著性差异。

2 结果与分析

2.1 阿卡波糖对 葡萄糖苷酶活性的抑制作用 从图 1可以看出,在酶反应体系中加入 3.75 μg/ml阿卡波糖时,对葡萄糖苷酶的抑制率为 27.35%;当加入的阿卡波糖浓度为 7.5 μg/ml时其抑制率显著增加至 42.59%;但当大于 7.5 μg/ml时,随着浓度的增加拜糖平的抑制作用未见明显增加,抑制率稳定在 45.00%~56.00%。

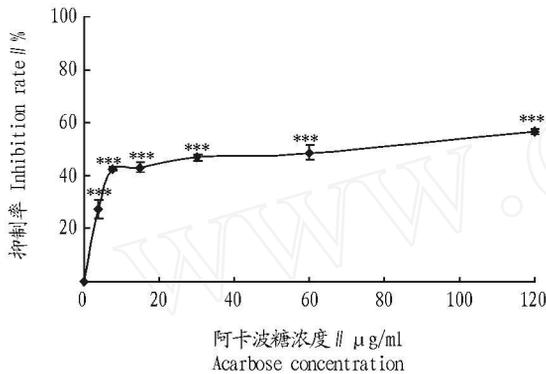


图 1 阿卡波糖对 葡萄糖苷酶活性的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of acarbose on α-glucosidase activity

2.2 马齿苋活性成分中 葡萄糖苷酶抑制作用的筛选结果

从图 2~4可以看出,马齿苋总生物碱、粗多糖、总提取液对 葡萄糖苷酶有明显的抑制作用 ($P < 0.05$, $*** P < 0.001$),且呈剂量依存关系。其中,总生物碱抑制作用最强,抑制率达 80% ($*** P < 0.001$)。但总黄酮和多不饱和脂肪酸无 葡萄糖苷酶抑制活性。

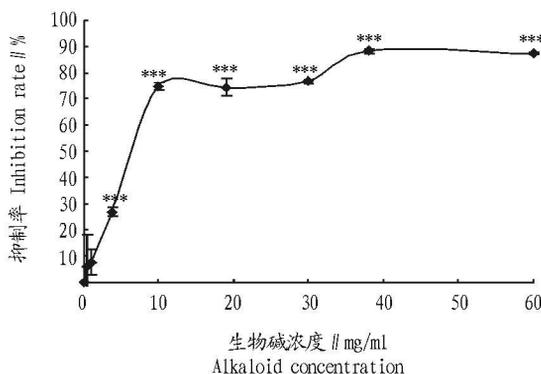


图 2 马齿苋总生物碱对 葡萄糖苷酶活性的抑制作用

Fig 2 Inhibitory effect of alkaloid in purslane on α-glucosidase activity

根据体外生物活性检测结果可知,马齿苋总提取液和粗多糖对 葡萄糖苷酶活性的抑制效果接近阿卡波糖,而生物碱的抑制作用优于阿卡波糖。

3 结论与讨论

糖尿病是一组由遗传和环境因素相互作用而引起的,是因胰岛素分泌绝对或相对不足以及靶组织对胰岛素敏感性降低所致机体糖、脂肪、蛋白质、水和电解质等代谢紊乱的临

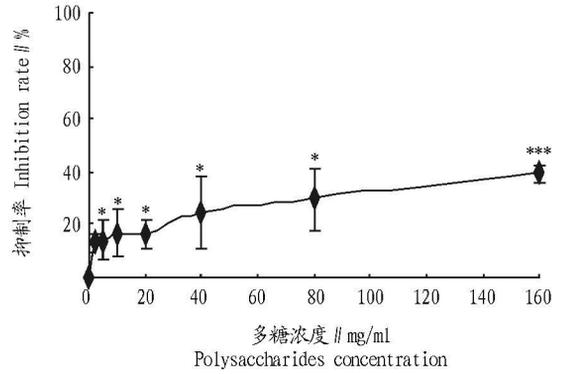


图 3 马齿苋粗多糖对 葡萄糖苷酶活性的抑制作用

Fig 3 Inhibitory effect of polysaccharide in purslane on α-glucosidase activity

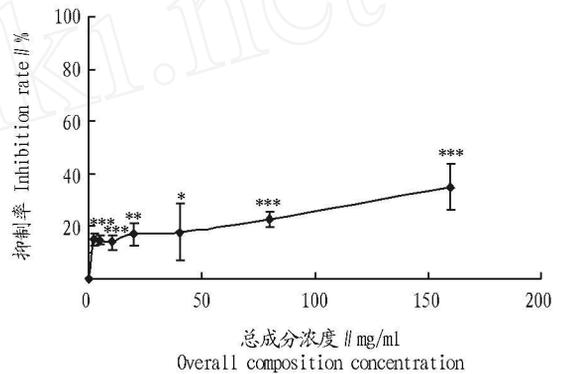


图 4 马齿苋总提取液对 葡萄糖苷酶活性的抑制作用

Fig 4 Inhibitory effect of the extract from purslane on α-glucosidase activity

床综合症。饮食中的淀粉、糊精、麦芽糖、蔗糖等碳水化合物在小肠刷状缘上 葡萄糖苷酶的作用下,释放葡萄糖并经小肠吸收进入血液,是餐后血糖升高的主要原因,餐后血糖升高可引起胰岛素敏感性降低从而加重病情并导致严重的并发症^[9-10]。因此,葡萄糖苷酶抑制剂可以减缓肠道葡萄糖的生成速度,防治餐后高血糖症和缓解高胰岛素血症,同时可以提高糖耐量,从而可达到防治糖尿病及其并发症发生的目的^[9-10]。寻找合适的抑制剂用于调控 葡萄糖苷酶的活性是防治糖尿病的有效途径之一。

国外在 20世纪 70年代中期就开始研究 葡萄糖苷酶的抑制剂及其降血糖作用^[11-12]。阿卡波糖是 葡萄糖苷酶抑制剂的典型代表,它通过抑制 葡萄糖苷酶作用而延迟葡萄糖的肠道吸收来抑制餐后血糖的上升,从而预防或延缓糖尿病的发生和发展^[13]。

近年来,随着高新技术在食品科学和中药现代化中的应用,从药食两用植物中筛选 葡萄糖苷酶抑制剂的研究获得重视,学者们发现了许多天然的 葡萄糖苷酶抑制剂,如杜仲槲皮素、杨梅酮、木犀草素、大豆异黄酮、大豆皂苷、茶多酚、桑叶总黄酮,以及大黄、山茱萸、赤芍、五倍子、广西血竭、五味子和虎杖等提取物。马齿苋成分的分离提取和总提取液的降血糖作用开始受广泛关注^[14],但马齿苋活性成分中 葡萄糖苷酶抑制剂的筛选研究还未见报道。

该研究以 葡萄糖苷酶为作用靶点,建立体外 葡萄糖苷酶抑制剂的筛选研究还未见报道。
(下转第 660页)

0.016 0, 0.019 2, 0.022 4, 0.025 6, 0.028 8, 0.032 0 mg/ml在紫外可见分光光度计上,于 330 nm测定其吸光度,并绘制工作曲线。标准曲线线性方程为: $A = -0.12575 + 59.18527C$, $r = 0.9997$ 。

2.3 绿原酸含量测定结果 取“1.3.1”样品液,于 330 nm处测定其吸光度。3次平均吸光度值为 1.105。带入标准曲线中计算,浓度为 0.020 8 mg/ml。雪莲果中绿原酸的含量

为 0.052%。

2.4 精密度的实验 按“1.3.1”的方法制备样品液,3次测定的吸光度值分别为 0.964 2, 0.915 2, 0.967 0, RSD为 3.07%。

2.5 回收率实验 在 3份样品液中,分别加入浓度为 0.016 0, 0.019 2, 0.022 4 mg/ml的绿原酸标准溶液 9 ml,摇匀后于 330 nm处测定其吸光度。回收率结果见表 1。

表 1 加标回收率实验结果

Table 1 Test result of the recovery rate of standard

序号 Code	样品量 mg Sample amount	加标准样品量 mg Standard sample amount	理论值 mg Theoretical value	测定值 mg Measured value	回收率 % Recovery rate	平均回收率 % Average recovery rate
1	0.199 8	0.144 0	0.343 8	0.351 2	105.14	105.85
2	0.199 8	0.172 8	0.372 6	0.392 8	105.90	
3	0.199 8	0.201 6	0.401 4	0.414 5	106.50	

3 结论

采用分光光度法测定雪莲果中绿原酸的含量, RSD值为 3.07%,平均回收率为 105.85%。该方法操作简单,精密度高,回收率高。测得雪莲果中绿原酸的含量为 0.052%。

参考文献

- [1] 李卓亚. 雪莲果的化学成分及其药理作用的研究进展 [J]. 食品与药品, 2007(9): 41 - 43
- [2] 饶之坤, 封良燕, 张虽栓, 等. 雪莲果营养成分分析研究 [J]. 云南化工, 2007, 34(1): 52 - 53

- [3] 刘军海, 袁爱泳. 绿原酸的提取分离及含量测定 [J]. 中国油脂, 2005, 30(3): 54 - 56
- [4] 刘青. 高效液相色谱法测定银翘解毒片中绿原酸的含量 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 873
- [5] ZHOU J Y, LAO H, LI L P, et al Determination of emodin and chrysophanol contents in callus of *Cassia tora* L. leaf [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 60 - 62
- [6] 赵润琴, 方东军, 马旭. HPLC法测定银翘解毒颗粒中绿原酸的含量 [J]. 中医学报, 2004, 32(5): 31 - 32

(上接第 658页)

糖苷酶抑制剂微量筛选模型,并将总提取液和分离所得组分分别进行筛选和生物活性评价,结果显示总提取液具有不同程度的葡萄糖苷酶抑制活性。这与其他文献结果相符^[2-4]。这说明马齿苋降血糖作用机制之一是抑制葡萄糖苷酶活性,可能具有阿卡波糖的作用特性和药效机理。同时,该研究首次发现,马齿苋多糖和生物碱分别具有不同程度的葡萄糖苷酶抑制活性,特别是生物碱类抑制作用,足够剂量时几乎可完全抑制葡萄糖苷酶的活性,而马齿苋总黄酮和不饱和脂肪酸无抑制作用。这与该课题组正在观察的动物药理试验结果相似。由此可以推论,生物碱和多糖是葡萄糖苷酶活性抑制的主要有效成分。至于马齿苋生物碱和多糖的具体化学成分与结构,以及有无其他降糖机制等问题尚待深入研究。

综上所述,该研究提示马齿苋降糖作用与马齿苋中的生物碱类和多糖类组分的葡萄糖苷酶抑制活性有关,阐明了马齿苋降血糖作用的机制,并为更好地开发利用马齿苋提供了试验依据。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 289
- [2] WANG H Diabetic mellitus treated with single *Portulaca oleracea* [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 1990, 25(11): 516 - 518

- [3] XIAO F Y, LU F E, XU L J. Effects of the different fractions of *Portulaca oleracea* on morphological changes of pancreas islets in type 2 diabetic rats [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2006, 12(5): 392 - 395
- [4] SHEN L, LU F E. Effects of *Portulaca oleracea* on insulin resistance in type 2 diabetic rats [J]. Chin Hosp Pharm J, 2005, 25(4): 293 - 295
- [5] ZHOU J, LU J W, FU J W, et al Isolation and assaying of polysaccharides in *Portulaca oleracea* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2001, 32(2): 124 - 125
- [6] SHANGGUAN X C, LI J S, CHEN J P, et al Polyunsaturated fatty acid separation from the seed kernel oil of *Pinus amandii* via urea clathration [J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2004, 24(7): 1303 - 1307
- [7] HUANG A, SHIH F, WEI H, et al A comparative study on blood lipid regulatory function between flavonoids and alkaloids from lotus leaf [J]. Cullinary Science Journal of Yangzhou University, 2006, 3: 23 - 25
- [8] PIERRE C, ROLAND R, TREMBLAY D, et al P-Nitrophenol- α -glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen [J]. J Clin Chem, 1978, 24(2): 208 - 211
- [9] FLORISA, PETER L, RENIER P, et al α -glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2005, 28(1): 154 - 163
- [10] LEVETAN C. Oral antidiabetic agents in type 2 diabetes [J]. Curr Med Res Opin, 2007, 23(4): 945 - 952
- [11] HORII S, FUKASE H. Synthesis of α -glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral anti-diabetic agents [J]. The Journal of Medical Chemistry, 1986, 29: 1038 - 1046
- [12] CHEN X L, FAN Y X, ZHENG Y G, et al Properties and production of valienamine and its related analogues [J]. Chem Rev, 2003, 103: 1955 - 1977
- [13] MARTIN A E, MONTGOMERY P A. Acarbose: An α -glucosidase inhibitor [J]. Am J Health Syth Pharm, 1996, 53(9): 2277 - 2290
- [14] LING Y H, WANG X L, WANG Y, et al Inhibition of 34 kinds of Chinese herbal medicines on α -glucosidase activity [J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2004, 4: 36 - 38