

金芪降糖片组分体外抗糖尿病的作用及机制

王月^{1,2}, 王涛³, 吴建霞⁴, 武忠¹, 郭利平^{2*}

(1. 内蒙古自治区人民医院, 呼和浩特 010017; 2. 天津中医药大学, 天津 300193;
3. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193; 4. 郑州人民医院 颐和医院, 郑州 450047)

[摘要] **目的:**探讨金芪降糖片各组分体外抗糖尿病的作用及机制。**方法:**采用 DPPH 自由基清除, 活性氧自由基清除, AGEs 形成抑制, α -糖苷酶抑制, 醛糖还原酶抑制, 脂肪酶抑制, 脂多糖 (LPS) 诱发小鼠腹腔巨噬细胞活化一氧化氮 (NO) 释放抑制建立系统的体外抗糖尿病活性评价筛选模型, 考察金芪降糖片的 4 个标准组分芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸、黄连总生物碱对以上各模型的作用。**结果:**芪总黄酮、金银花总有机酸、黄连总生物碱具有清除 DPPH 自由基和活性氧自由基活性; 各组分对 AGEs 形成无明显抑制活性; 芪总黄酮、金银花总有机酸对糖苷酶有抑制活性; 芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸对醛糖还原酶有抑制活性; 芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸对胰脂肪酶具有抑制活性; 芪总皂苷、黄连总生物碱对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 有抑制作用。**结论:**金芪降糖片具有多组分多靶点协同抗糖尿病的作用, 机制涉及抑制 α -糖苷酶、抑制脂肪酶、清除自由基、抑制醛糖还原酶、抑制 NO 释放。

[关键词] 糖尿病; 金芪降糖组分; 体外活性筛选

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0105-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160105

Anti-diabetic Effect and Mechanism of Components in Jinqi Jiangtang Tablet *in Vitro* WANG Yue^{1,2}, WANG Tao³, WU Jian-xia⁴, WU Zhong^{1*}, GUO Li-ping² (1. Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China; 3. Research Institute of TCM, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 4. Yihe Hospital of Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450047, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-diabetic effect and mechanism of components in Jinqi Jiangtang tablet *in vitro*. **Method:** A systematic anti-diabetic activity evaluation screening model *in vitro* was established by scavenging DPPH free radicals, reactive oxygen free radicals, and inhibiting advanced glycation end products formation, alpha-glucosidase and aldose reductase, lipase, NO production from LPS-activated mice macrophages, in order to detect the effect of four standard components—total flavonoids of Astragalus, total saponins of Astragalus, total organic acids of Honeysuckle, Berberine alkaloids in Jinqi Jiangtang tablet on the above mechanisms. **Result:** Total flavonoids of Astragalus, total organic acids of Honeysuckle, Berberine alkaloids showed scavenging activity on DPPH free radicals and reactive oxygen free radicals; all components showed no inhibitory activity on advanced glycation end products formation; total flavonoids of astragalus, total organic acids of Honeysuckle showed inhibitory activity of alpha-glucosidase; total flavonoids of Astragalus, total saponins of Astragalus, Total organic acids of Honeysuckle showed inhibitory activity of aldose reductase; total flavonoids of Astragalus, total saponins of Astragalus, total organic acids of Honeysuckle showed inhibitory activity of lipase; total saponins of Astragalus, Berberine alkaloids showed inhibitory effects of NO production from LPS-induced mice macrophages. **Conclusion:** Jinqi Jiangtang tablet has multi-component and multi-target synergistic anti-diabetic effect and achieves the mechanisms by inhibiting alpha-glucosidase, inhibiting lipase, scavenging free radicals,

[收稿日期] 20140727(018)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2009CB523003)

[第一作者] 王月, 博士, 医师, 从事中医内科临床工作, Tel:0471-6620702, E-mail:wangyue_ebm@foxmail.com

[通讯作者] * 郭利平, 博士生导师, 主任医师, 从事中医内科临床工作, E-mail:lpqtjn@163.com

inhibiting aldose reductase and inhibiting the release of NO.

[Key words] diabetes; Jinqi Jiangtang components; *in vitro* activity screening

糖尿病是一种慢性终生性疾病,是继肿瘤、心脑血管疾病之后,威胁人类健康的第三大杀手^[1],全球每 10 s 就有 1 人死于糖尿病,我国糖尿病患者数已经达到 9 240 万^[2],居世界第二位。随着人口老龄化进程及饮食结构的改变,糖尿病的患病率还将继续增加。

糖尿病属中医“消渴病”范畴,基本病机为阴津亏损、燥热偏胜,治疗应清热润燥、养阴生津。金芪降糖片来源于《千金方》之千金黄连丸,由黄连、黄芪、金银花组成,具有清热益气、生津止渴之功效,临床上用于治疗 2 型糖尿病。药理实验证明^[3],金芪降糖片中多种化学组分从改善糖脂代谢、改善胰岛素抵抗、抗氧化、免疫调节等多个环节,通过整体、细胞、分子等不同药理水平发挥抗糖尿病的作用。临床研究表明:金芪降糖片与降糖西药合用能够更好地降低血糖^[4-5]、降低糖化血红蛋白^[4]、减轻胰岛素抵抗^[5]、预防或延缓微血管病变^[6],同时可减少低血糖的发生率^[4,7],减少胰岛素用量^[7],有效改善血糖波动。其降血糖作用和缓而持久,且副作用小,不易产生耐药性,易被患者接受,可长期服用。

糖尿病发生发展的机制复杂,中药具有多成分多靶点的特性。本研究以金芪降糖组分为实验对象,建立系统的体外活性评价模型,筛选金芪降糖片中具有抗糖尿病作用的有效组分,探讨金芪降糖片可能的作用机制,为其治疗 2 型糖尿病提供实验依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 金芪降糖片 4 个标准组分:黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸、黄连总生物碱,由天津中医药大学中药学院邓雁如教授工作组分别以黄芪、金银花、黄连为原材料,采用标准组分制备工艺流程提取制备而成,并通过指纹图谱等化学表征以及多次成分含量测定,确证黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸、黄连总生物碱作为金芪降糖片标准组分的准确性及稳定性。用二甲亚砜(DMSO)配成 $64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。实验前用相应缓冲液倍比稀释成所需浓度梯度。各样品溶液在全培养基终浓度 DMSO 含量小于 0.1%,在其他缓冲液终浓度 DMSO 含量小于 2.5%,预实验表明该浓度 DMSO 对实验无影响。黄嘌呤(批号 20091012),黄嘌呤氧化酶(批号 20101121),辅脱氢

酶 II (NADP, 批号 20100211),还原型辅酶 II (NADPH,批号 20090709),以上由日本和光纯药株式会社生产。葡萄糖(GLU)试剂盒(批号 081101,中生北控生物科技股份有限公司)。游离脂肪酸(FFA)测试盒,为日本和光纯药株式会社生产。

1.2 仪器 Flex Station 3 型多功能读板机(美国 MD 公司),DHG-9101-2SA 型电热恒温鼓风干燥箱(扬州鸿都电子有限公司),DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司),Forma3110 型 CO_2 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),DC300F 型倒置相差显微(德国 Leica 公司),D-37520 型高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司),T18 型电动匀浆机(德国 IKA 公司),pH 计(德国 Mettler Toledo 公司)。

2 方法

2.1 DPPH 自由基清除 用无水乙醇稀释样品溶液。设对照组、样品组、空白组,每组 4 个复孔。各组加无水乙醇 $50 \text{ } \mu\text{L}$, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液 $100 \text{ } \mu\text{L}$,样品组和空白组加 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 乙醇溶液 $50 \text{ } \mu\text{L}$,样品组和对照组加样品 $1\ 000 \text{ } \mu\text{L}$,空白组加无水乙醇 $1\ 000 \text{ } \mu\text{L}$ 。混匀后室温放置 30 min,测定 517 nm 吸光度 A 。

$$\text{清除率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{样品组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.2 活性氧自由基清除 用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠缓冲溶液(pH 10.2)稀释样品溶液。设对照组、样品组、空白组,每组 4 个复孔。各组加 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄嘌呤 $120 \text{ } \mu\text{L}$, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA $40 \text{ } \mu\text{L}$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠缓冲溶液 $920 \text{ } \mu\text{L}$, $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ WST-1 溶液 $40 \text{ } \mu\text{L}$,样品组和对照组加样品 $40 \text{ } \mu\text{L}$,空白组加 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠缓冲溶液 $40 \text{ } \mu\text{L}$ 。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 预热 10 min 后,样品组和空白组加黄嘌呤氧化酶 $40 \text{ } \mu\text{L}$,对照组加蒸馏水 $40 \text{ } \mu\text{L}$,反应 20 min,加入 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl $40 \text{ } \mu\text{L}$ 终止反应,加入 $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ WST-1 水溶液 $40 \text{ } \mu\text{L}$,于 450 nm 测定 A 。清除率的计算同 2.1 项。

2.3 非酶蛋白质糖基化终末产物(AGEs)形成抑制 用 $67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.2)稀释样品溶液。设对照组、样品组、空白组,每组 4 个复孔。各组加 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖缓冲液 $100 \text{ } \mu\text{L}$,样品组和空白组加 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 缓冲液 $100 \text{ } \mu\text{L}$,对照组加 $67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 $100 \text{ } \mu\text{L}$,样品组和对照组加样

品 25 μL , 空白组加 67 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 25 μL , 封口, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 48 h。取 20 μL 反应溶液加入 200 μL 蒸馏水, 在激发波长 370 nm, 检测波长 440 nm 条件测定荧光 A 。抑制率的计算同 2.1 项。

2.4 LPS 诱发小鼠腹腔巨噬细胞活化 NO 释放抑制 巨噬细胞原代培养: 配置质量分数为 4% 的 TGC 培养基, 120 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 灭菌, 小鼠腹腔内注射 2 mL。4 d 后处死小鼠, 腹部消毒, 暴露腹膜, 沿腹直肌快速注射入 12 mL 冷 PBS 溶液, 拔出注射器后按摩腹部。在下腹部刺入注射针, 吸出腹腔内 PBS 溶液, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 去上清, 加入适量的冷 PBS 溶液, 低速振荡, 使细胞混悬, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min 离心, 回收 PBS 溶液中的巨噬细胞。沉淀中加入 10 mL 全培养基(5% 血清, 1% 双抗, 94% RPMI-1640 培养基), 重悬种植于 96 孔板, CO_2 培养箱培养 1 h, 振摇, 吸去上清液, 加入 PBS 溶液 60 μL , 振摇, 吸去上清液, 再加入全培养基培养。

模型的建立: 设置空白组、模型组, 每组 6 个复孔。将小鼠腹腔巨噬细胞悬液 (5×10^6 个细胞/mL) 种植于 96 孔板, 100 μL /孔; 种植 1 h 差速后模型组加入 100 μL 的 LPS, 继续培养 20 h 后检测细胞上清液 NO 含量。倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。

标准曲线制作: 用在 CO_2 恒温培养箱放置与细胞培养时间相同的全培养基作为溶剂, 配制 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠溶液, 用倍比稀释法配成 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠溶液。取细胞培养上清液(各浓度亚硝酸钠溶液) 100 μL , 加入 100 μL Griess 试剂(精确称取对氨基磺酸铵 1.0 g, N -(1-萘基)乙二胺盐酸盐 0.1 g, 磷酸 2.5 g, 用蒸馏水定容到 100 mL), 37 $^{\circ}\text{C}$, 反应 10 min, 在 570 nm 检测 A 。

NO 的检测: 用全培养基稀释样品溶液(100, 50, 25, 12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。设空白组, 模型组, 样品对照组, 每组 6 个复孔。待细胞贴壁后模型组加入脂多糖(LPS); 样品对照组加入样品; 样品组加入 LPS 和样品; 空白组正常培养, 培养 20 h 后检测细胞上清液 NO 和最大样品浓度时细胞活力。抑制率的计算同 2.1 项。

2.5 醛糖还原酶抑制 醛糖还原酶的提取: Wistar 大鼠 20 只, 雄性, 体重(200 \pm 10) g, 颈椎脱臼处死, 立即摘取眼球, 采用后路手术法分离晶状体(冰浴), 放入 20 mL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇含有 135 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0)中, 匀浆, 100 000 $\times g$,

4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min., 取上清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

标准曲线的制作: 180 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0) 2 450 μL , 1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锂溶液 700 μL , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL-甘油醛溶液 700 μL , 二甲基亚砜 350 μL , 提取的醛糖还原酶溶液 1 400 μL 和 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸 2 100 μL 混合后取出 600 μL , 分别加入 NADP 溶液 0, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (终浓度), 各测试管分别加入 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑含 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 室温放冷后于激发波长 360 nm, 吸收波长 460 nm 检测荧光 A 。

醛糖还原酶活性评价: 用 180 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0) 稀释样品溶液。设对照组, 样品组, 空白组, 每组 4 个复孔。180 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0) 225 μL , 1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锂溶液 50 μL , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL-甘油醛溶液 50 μL , 提取的醛糖还原酶溶液 100 μL 和样品溶液 25 μL 混合, 30 $^{\circ}\text{C}$ 预热 3 min, 加入 0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH 溶液 50 μL , 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 加入 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸 150 μL 终止反应。醛糖还原酶活力单位定义: 于 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, 每分钟生成 1 μmol NADP 定义为一个酶活力单位。抑制率的计算同 2.1 项。

2.6 α -糖苷酶抑制 α -糖苷酶提取: 动物同 2.5 项, 颈椎脱臼处死, 取出小肠, 纵切, 用生理盐水洗净, 刮取黏膜组织, 放入 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 溶液中, 匀浆。加入 CaCl_2 粉末, 冰水放置 15 min, 3 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液, 27 000 $\times g$ 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

α -糖苷酶活性测定: 用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺丁烯二酸缓冲液稀释样品溶液。设对照组、样品组、空白组, 每组 4 个复孔。调节恒温摇床至 37 $^{\circ}\text{C}$, 各组加 74 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖(麦芽糖) 50 μL , α -糖苷酶溶液 25 μL , 蒸馏水 400 μL , 对照组即刻沸水浴 2 min 灭活处理, 样品组和对对照组加样品 25 μL , 空白组加蒸馏水 25 μL , 反应 30 min。放置至室温后, 取反应液 50 μL 加入 96 孔板中, 用葡萄糖试剂盒测试反应溶液中葡萄糖含量。对照组生成的葡萄糖与空白组生成的葡萄糖浓度差控制在 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (蔗糖底物) 和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (麦芽糖底物)。 α -糖苷酶活力单位定义: 于 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.0, 每分钟生成 1 mg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。抑制率 = $(A - B)/(A - C) \times 100\%$, 其中 A 为对照组生成葡萄糖量, B 为样品组生成葡萄糖量, C 为空白组生成葡萄糖量, 利用

Excel 计算出 IC_{50} 。

2.7 脂肪酶抑制 用含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 的缓冲液 (pH 7.0) 稀释样品溶液。设对照组、样品组、空白组, 每组 4 个复孔。调节恒温摇床至 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 各组加基质溶液 $50 \text{ }\mu\text{L}$, 样品组和空白组加脂肪酶溶液 $50 \text{ }\mu\text{L}$, 对照组加缓冲液 $50 \text{ }\mu\text{L}$, 样品组和对照组加样品 $25 \text{ }\mu\text{L}$, 空白组加缓冲液 $25 \text{ }\mu\text{L}$, 反应 30 min 后放入沸水浴中 2 min 灭活。取反应液 $50 \text{ }\mu\text{L}$ 加入 96 孔板中, 游离脂肪酸试剂盒提供的标准液用双蒸水稀释成 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 $\text{mEq} \cdot \text{L}^{-1}$, 绘制标准曲线。按游离脂肪酸试剂盒检测生成的游离脂肪酸。空白组生成的游离脂肪酸浓度与对照组生成的游离脂肪酸浓度差值控制在 1.9 ~ 2.1 mEq 。脂肪酶活力单位定义: 于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6.0, 每分钟生成 1 mEq 游离脂肪酸定义为一个酶活力单位。抑制率 = $(A - B) / (A - C) \times 100\%$, 其中 A 为对照组生成游离脂肪酸量, B 为样品组生成游离脂肪酸量, C 为空白组生成游离脂肪酸量。利用 Excel 计算出 IC_{50} 。

3 结果

3.1 金芪组分对 DPPH 自由基、活性氧自由基、AGEs 形成的影响 金芪降糖方各组分与维生素 C 比较, 黄芪总黄酮、金银花总有机酸显示较强的 DPPH 自由基和活性氧自由基清除活性, 但不及维生素 C, 黄连总生物碱也有一定的清除 DPPH 自由基和活性氧自由基的作用, 而黄芪总皂苷在此浓度下未表现出明显清除自由基活性。金芪降糖方各组分均未表现出抑制 AGEs 交联形成的作用。各组分半数有效率的浓度见表 1。

表 1 金芪降糖方组分对 DPPH 自由基, 活性氧自由基, AGEs 形成的 IC_{50}

Table 1 IC_{50} of Jinqi Jiangtang tablet components for DPPH free radical scavenging, reactive oxygen free radical scavenging and inhibition of AGEs

样品	DPPH 自由基	活性氧自由基	AGEs 形成
黄芪总黄酮	16.0	9.8	>400
黄芪总皂苷	>100	>100	>400
金银花总有机酸	15.5	10.0	>400
黄连总生物碱	79.8	20.4	>400
维生素 C	4.25	-	-
氨基胍	-	-	1 200

3.2 金芪组分对 α -糖苷酶的影响 金芪降糖方各组分与阿卡波糖比较, 黄芪总黄酮、金银花总有机酸

对 α -糖苷酶(麦芽糖酶、蔗糖酶)均有抑制作用, 但不及阿卡波糖, 黄芪总皂苷、黄连总生物碱在此浓度下未表现出明显抑制 α -糖苷酶活性。各组分半数有效率时的浓度见表 2。

表 2 金芪降糖方组分对 α -糖苷酶的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of Jinqi Jiangtang tablet components for inhibition of alpha-glucosidase

样品	α -糖苷酶	
	麦芽糖酶	蔗糖酶
黄芪总黄酮	115.4	236
黄芪总皂苷	>400	>400
金银花总有机酸	241.9	125
黄连总生物碱	>400	>400
阿卡波糖	0.69	0.75

3.3 金芪组分对脂肪酶, NO 释放, 醛糖还原酶的影响 金芪降糖方各组分与奥利司他 (Orlistat) 比较, 黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸对脂肪酶有抑制活性, 但不及奥利司他, 黄连总生物碱在此浓度下未表现出明显抑制脂肪酶活性。黄芪总皂苷、黄连总生物碱对 LPS 诱发小鼠腹腔巨噬细胞活化 NO 释放有抑制作用。黄芪总黄酮、金银花总有机酸对醛糖还原酶有较强的抑制活性, 黄芪总皂苷亦对醛糖还原酶有抑制活性。各组分半数有效率时的浓度见表 3。

表 3 金芪降糖方组分对脂肪酶, NO 释放, 醛糖还原酶的 IC_{50}

Table 3 IC_{50} of Jinqi Jiangtang tablet components for lipase, aldose reductase and inhibition of NO production from LPS-activated mice macrophages

样品	脂肪酶	NO 释放	醛糖还原酶
黄芪总黄酮	237.7	>100	4.10
黄芪总皂苷	399.8	51.5	33.46
金银花总有机酸	275.7	>100	5.93
黄连总生物碱	>400	76.9	>400
Orlistat	36 ¹⁾	-	-

注: ¹⁾ 表示单位为 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

金芪降糖片是依据传统古方、结合现代实验药理学方法进行优化组合、经中法两国医学家临床研究确证为安全有效的现代中药^[8], 是传统医药学与现代医药学结合的产物, 也是我国实行《新药审批办法》以来第一个被批准的治疗糖尿病的新型中成药。本实验通过对金芪降糖的 4 个标准组分进行系统的体外筛选, 得出结论: 金芪降糖片具有多组分多

靶点协同抗糖尿病的作用, 机制涉及抑制 α -糖苷酶、抑制脂肪酶、清除自由基、抑制醛糖还原酶、抑制 NO 释放。

α -糖苷酶在餐后血糖的吸收中起主要作用, 在糖尿病的发生发展过程中, 餐后高血糖对机体的危害远远超过空腹高血糖, 降低餐后血糖是预防糖尿病, 减少并发症和降低死亡率的重要措施之一^[9]。 α -糖苷酶抑制剂能够有效降低餐后血糖, 并且有一定改善胰岛素抵抗作用^[10], 本实验结果表明金芪组分中黄芪总黄酮、金银花总有机酸对 α -糖苷酶有抑制活性, 金芪降糖片可以算做一种 α -糖苷酶抑制剂。

肥胖是胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的重要危险因素^[11], 胰脂肪酶是水解食物脂肪最重要的酶^[12], 本实验结果表明金芪组分中黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸对胰脂肪酶有抑制活性。

高血糖可快速诱导细胞内自由基生成^[13], 自由基可通过脂质过氧化损伤、糖基化作用、使 DNA 断链、抑制 ATP 的合成及助趋化作用等不同方式和途径损伤胰岛 β 细胞^[14]。本实验结果表明金芪组分中黄芪总黄酮、金银花总有机酸、黄连总生物碱均显示出较强的自由基清除活性。

醛糖还原酶是多元醇代谢途径的限速酶, 高血糖状态可激活多元醇通路, 引起山梨醇蓄积于多种组织中, 如晶状体、血管、神经及肾脏等, 促使糖尿病慢性并发症的发生^[15]。本实验结果表明金芪组分中黄芪总黄酮、金银花总有机酸、黄芪总皂苷对醛糖还原酶均有抑制活性, 金芪降糖片可以算做一种醛糖还原酶抑制剂。

高血糖可使 NO 生成增加^[16], 糖尿病血管并发症、糖尿病肾病、早期视网膜微血管损害均与此相关。本实验结果表明金芪组分中黄芪总皂苷、黄连总生物碱 LPS 诱发小鼠腹腔巨噬细胞活化 NO 释放。

本实验研究结果提示: 金芪降糖片 4 个标准组分分别针对不同的靶点相互配合, 协同发挥抗糖尿病的作用。前期已有研究通过动物和细胞实验证实了金芪降糖片的抗糖尿病作用及机制^[3,17], 本实验从体外活性评价的角度, 阐明了金芪降糖片抗糖尿病的作用机制, 为其防治糖尿病提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 潘长玉. 中国糖尿病控制现状——指南与实践的差距[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 2005, 25(3): 174-178.

[2] Yang W Y, Lu J M, Weng J P, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1010.

[3] 申竹芳. 金芪降糖片抗糖尿病的药理作用基础[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 2004, 24(3): 215-216.

[4] 顾文元. 金芪降糖片与格列齐特联合治疗 2 型糖尿病的临床观察[J]. 天津医科大学学报, 2004, 1(10): 87-89.

[5] 王自春, 王征. 金芪降糖片联合吡格列酮片治疗 2 型糖尿病高胰岛素血症的疗效观察[J]. 天津医药, 2013, 41(11): 1122-1123.

[6] 齐法莲, 徐军, 王滨, 等. 金芪降糖片对 2 型糖尿病患者血清 P-SLT, TNF- α 血糖及 HbA1c 的作用探讨[J]. 放射免疫学杂志, 2007, 20(1): 40-42.

[7] 陈绪忠. 金芪降糖片联合胰岛素治疗胰岛素抵抗患者低血糖发作临床研究[J]. 中医学报, 2014, 29(2): 192-194.

[8] M VRAY et al. Randomized study of glibenclamide versus traditional Chinese treatment in type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Metab, 1995, 6(21): 433-439.

[9] 尚健, 郭启煜. α -糖苷酶抑制药治疗糖尿病的研究[J]. 临床药物治疗杂志, 2010, 8(4): 39-43.

[10] Meneilly G S, Ryan E A, Radziuk J. Effect of acarbose on insulin sensitivity in elderly patients with diabetes[J]. Diabet Care, 2000, 23(8): 1162-1169.

[11] 张艳红, 杨伟, 冯明. 抵抗素与胰岛素抵抗、肥胖及 2 型糖尿病的关系[J]. 中国全科医学, 2010, 13(36): 4158-4160.

[12] Birari R B, Bhutani K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential[J]. Drug Discov Today, 2007, 12(19/20): 879-889.

[13] Maritim A C, Sanders R A, Watkins J B. Oxidative stress, antioxidants and diabetes: a review[J]. Biochem Mol Toxicol, 2003, 17(1): 24-38.

[14] 黄森. 氧自由基与糖尿病发病机制[J]. 实用临床医学, 2006, 7(4): 146-147.

[15] 番寿蕊, 杨红英. 醛糖还原酶与糖尿病慢性并发症变关系的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(1): 75-77.

[16] Ezzidi I, Mtraoui N, Mohamed M B, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a and 786T > C gene variants with diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Complication, 2008, 22(5): 331-338.

[17] Q Q, L X F, H W, et al. TG accumulation inhibitory effects of Jinqi formula by AMPK signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(1): 41-48.

[责任编辑 周冰冰]