

栀子抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究

肖小华*, 王丽华, 徐丽瑛, 丁琦, 李艳, 曾宪仪
(江西省药物研究所, 南昌 330029)

[摘要] 目的:研究栀子中 α -葡萄糖苷酶活性抑制成分。方法:采用4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)法,反应体系为67 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液870 μ L,1 g·L⁻¹谷胱甘肽溶液25 μ L,2.74 U·mL⁻¹ α -葡萄糖苷酶溶液35 μ L,15 mmol·L⁻¹ pNPG溶液70 μ L,0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃溶液4 mL,测定栀子各提取部位对 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用。结果:栀子总提取物、环烯醚萜类、栀子黄色素类在质量浓度50.0,100.0 g·L⁻¹时能显著抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,抑制率分别为61.47%,83.20%;34.27%,55.73%;78.13%,96.93%。结论:栀子提取物对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用,有效部位可能为环烯醚萜类和栀子黄色素类。

[关键词] 栀子;环烯醚萜类;栀子黄色素类; α -葡萄糖苷酶;抑制剂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0210-03

[doi] 10.11653/syjf2013080210

Study on Inhibition of Gardeniae Fructus Extracts on Alpha-glucosidase

XIAO Xiao-hua*, WANG Li-hua, XU Li-ying, DING Qi, LI Yan, ZENG Xian-yi
(Jiangxi Institute of Materia Medica, Nanchang 330029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effects of Gardeniae Fructus extracts on alpha-glucosidase activity. **Method:** The inhibitory activities of each extracted parts of *Gardenia jasminoides* against alpha-glucosidase were tested by the colorimetry of PNPG, the reaction system of which included 67 mmol·L⁻¹ potassium phosphate buffer 870 μ L, 1 g·L⁻¹ glutathione solution 25 μ L, 2.74 U·mL⁻¹ α -glucosidase solution 35 μ L, 15 mmol·L⁻¹ PNPG solution 70 μ L, 0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ solution 4 mL. **Result:** At concentrations of 50, 100 g·L⁻¹, Gardeniae Fructus total extract, iridoids and gardenia yellow reduced significantly the activities of alpha-glucosidase with inhibitory rates of 61.47%, 83.20%; 34.27%, 55.73%; 78.13%, 96.93%. **Conclusion:** Gardeniae Fructus extracts have the inhibitory effects on alpha-glucosidase, and the active position is probably Iridoids and Gardenia yellow.

[Key words] *Gardenia jasminoides*; iridoids; gardenia yellow; alpha-glucosidase; inhibitors

栀子为茜草科植物栀子的干燥成熟果实,化学成分主要包括环烯醚萜苷类、二萜类(西红花苷类)、有机酸酯类以及其他类化合物。栀子主产于江西、浙江、福建、湖南、广东等地^[1-2],《本草纲目》曾记载栀子具有解5种黄病,利五淋,通小便,解消渴,明目的功效,其中“解消渴”与糖尿病的临床相

关症状有关^[3]。因此,为探讨栀子对糖尿病作用的机制,我们利用体外筛选模型,对中药栀子不同提取有效部位进行 α -葡萄糖苷酶抑制作用试验。

1 材料

1.1 受试物 栀子总提取物:50%乙醇渗漉得渗漉液,再减压回收溶剂、得到栀子总提取物浸膏,得率为43.16%;环烯醚萜类:栀子总提取物浸膏上大孔吸附树脂,再经25%乙醇洗脱所得,得率为7.39%;栀子黄色素类:栀子总提取物浸膏上大孔吸附树脂,再经70%乙醇洗脱所得,得率为5.56%;以上供试品均由江西省药物研究所天然药物室提供。

配制:上述栀子提取物分别用蒸馏水溶解,配制

[收稿日期] 20121114(004)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI04B01)

[通讯作者] *肖小华,副研究员,从事新药的药理毒理研究工作, Tel: 13870601153, E-mail: xiaohe200305@yahoo.com.cn

成质量浓度为 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

1.2 阳性对照药 阿卡波糖片, 拜耳医药保健有限公司, 批号 BJ07287。

1.3 试剂 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase, Sigma 公司, 批号 1001134428), 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG, Sigma 公司, 批号 101027065), 还原型谷胱甘肽 (Reduced glutathione, Sigma 公司, 批号 1001005780)。

1.4 仪器 BT-224 半自动生化分析仪, 意大利产。

1.5 溶液的配制 还原型谷胱甘肽 ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$): 25.157 mg 溶于 25.16 mL 水中; α -葡萄糖苷酶 ($2.74\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$): 0.827 mg 溶于 3.44 mL 磷酸缓冲液中; PNPG ($15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): 309.0 mg 溶于 68.4 mL 水中。

2 方法

2.1 反应体系优化^[4-6] 根据 Tremblay 等的方法测定 α -葡萄糖苷酶活性, 在磷酸钾缓冲液 (pH 6.8) 体系中, 反应温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 以 PNPG 为反应底物, 加入 α -葡萄糖苷酶, 以 Na_2CO_3 为终止液。PNPG 溶液无色, 但经 α -葡萄糖苷酶水解释放出对硝基苯酚 (PNP), PNP 在碱性条件下呈黄绿色, 在 400 nm 处有最大吸收, 当加入 α -葡萄糖苷酶抑制剂时, 可以抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 减少 PNP 的释放, 因此可以通过吸光度的变化来测定抑制活性。调整 α -葡萄糖苷酶和底物 PNPG 的浓度, α -葡萄糖苷酶浓度固定后, 当底物浓度增加吸光度值无明显变化时确定为最佳反应体系。

反应系统为 67 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液 (37 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.8) 870 μL , 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽溶液 25 μL , α -葡萄糖苷酶溶液 (0.91, 1.82, 2.74 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 35 μL , 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 10 min 后, 加入 PNPG 溶液 (5, 10, 15, 20, 25, 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 70 μL , 再置原水浴中继续保温 15 min 后, 再加入 4 mL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液, 冷却后, 以空白管调零, 于波长 405 nm 处测定在酶的作用下释放出对硝基酚 (PNP) 的 A 。

2.2 栀子提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性的测定 反应系统为 67 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液 (37 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.8) 870 μL , 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽溶液 25 μL , 2.74 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶溶液 35 μL , 与 10 μL 栀子提取物 (5.0, 10.0, 50.0, 100.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 10 μL 阿卡波糖 (阳性药对照管, 100.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 10 min 后, 加入 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPG 溶液 70 μL , 再置原水浴中继续保温 10 min 后, 加入 4 mL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液, 以空白管调零, 于波长 400 nm 处测定在酶的作用下释放出对硝基酚 (pNP) 的吸光度 (A)。其他操作同上。 α -葡萄糖苷酶管除不加提取物, 空白对照管内加 α -葡萄糖苷酶, 而不加 PNPG 外, 均由蒸馏水补足体积, 其他反应同前。中药空白对照管内除不加 PNPG 外, 需加入相应提取物, 其浓度、加量与中药管前平行, 其他操作同空白管。 α -葡萄糖苷酶抑制率计算公式如下:

$$\text{酶活性抑制率} = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}})] / (A_{\text{酶}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

2.3 统计学方法 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间用 DAS 3.0 软件进行 t 检验统计。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 最佳反应体系 PNPG 浓度 10 ~ 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 不同浓度的 α -葡萄糖苷酶与 PNPG 反应均出现拐点, 考虑反应敏感度, 选择斜率较大的曲线数据, 即: 2.74 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶溶液、15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPG 溶液。因此确定了 α -葡萄糖苷酶抑制试验最佳反应体系为 67 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液 870 μL , 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽溶液 25 μL , 2.74 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶溶液 35 μL , 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPG 溶液 70 μL , 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液 4 mL。见表 1。

3.2 栀子提取物对 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用 栀子总提取物、环烯醚萜类和栀子黄色素类对 α -葡萄糖苷酶均有抑制作用且环烯醚萜和栀子黄色素的抑制作用与其浓度有相关性, 栀子黄色素的抑制作用最强。见表 2, 图 1。

表 1 α -葡萄糖苷酶与 PNPG 反应关系 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

α -葡萄糖苷酶 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	各浓度 PNPG 溶液条件下 α -葡萄糖苷酶活性/ A					
	5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
0.91	0.093 \pm 0.009	0.122 \pm 0.010	0.127 \pm 0.010	0.128 \pm 0.002	0.135 \pm 0.009	0.132 \pm 0.002
1.82	0.206 \pm 0.002	0.258 \pm 0.010	0.269 \pm 0.015	0.266 \pm 0.014	0.279 \pm 0.003	0.281 \pm 0.011
2.74	0.263 \pm 0.004	0.333 \pm 0.013	0.356 \pm 0.006	0.358 \pm 0.021	0.369 \pm 0.003	0.364 \pm 0.003

表 2 不同质量浓度的栀子提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

供试品	抑制率/%			
	5 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹	50 g·L ⁻¹	100 g·L ⁻¹
阿卡波糖	-	-	-	66.4 ± 2.0
总提取物	0.8 ± 4.5	9.3 ± 4.3	61.5 ± 3.0	83.2 ± 11.0
环烯醚萜类	6.8 ± 7.7	14.7 ± 2.6	34.3 ± 5.2 ^{2,4)}	55.7 ± 10.1 ¹⁾
栀子黄色素类	20.8 ± 3.6 ^{2,3)}	29.6 ± 3.9 ^{2,4)}	78.1 ± 8.4 ^{1,4)}	96.9 ± 1.0 ⁴⁾

注:与总提取物比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与环烯醚萜类比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

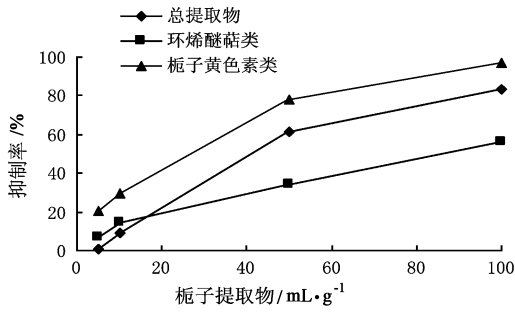


图 1 栀子提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用曲线

4 讨论

栀子作为传统中药,在临床上应用广泛,具有多种药理活性。已有文献报道,栀子及其有效部位对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠血糖有降低作用^[3]。栀子苷显著促进前脂肪细胞对葡萄糖的吸收,还具有剂量依赖性降低小鼠餐后血糖及糖尿病高血糖的作用^[7]。目前未见文献报道关于栀子对 α -糖苷酶活性的抑制作用,本实验从栀子中提取环烯醚萜类和栀子黄色素类等有效部位,并对其进行 α -糖苷酶活性抑制作用的研究,结果发现环烯醚萜类和栀子黄色素类物质对 α -葡萄糖苷酶的活性均有显著的抑制作用,100 g·L⁻¹的总提取物和栀子黄色素类物质对该酶的抑制活性比 100 g·L⁻¹的阿卡波糖高,

这为我们研究栀子的降血糖作用机制提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 游伟良,平其能,孙敏捷,等. 栀子苷的药理学研究新进展[J]. 药学进展,2012,36(4):158.
- [2] 杨全军,范明松,孙兆林,等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J]. 中国现代中药,2010,12(9):7.
- [3] 费曜,罗华丽,刘凡,等. 栀子对四氧嘧啶糖尿病小鼠糖代谢及肾功能的影响[J]. 中药药理与临床,2012,28(1):42.
- [4] 吴慧平,仲启亮,张喆,等. 蕨麻提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(1):4.
- [5] 项峥,窦德强. 牛蒡苷元 α -葡萄糖苷酶抑制活性的研究[J]. 中国现代中药,2009,11(5):28.
- [6] 张捷平,黄玲,施红,等. 女贞子多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 福建中医学院学报,2009,19(1):35.
- [7] 刘益华,李晶,林曼婷,等. 栀子有效成分栀子苷的现代研究进展[J]. 中国药学杂志,2012,47(6):406.

[责任编辑 聂淑琴]

《天津中医药》2013 年征订启事

《天津中医药》(原名《天津中医》)创刊于 1984 年,是由天津市卫生局主管、天津中医药大学、天津中医药学会和天津中西医结合学会主办的综合性中医药学术期刊。本刊继承与发展并重,中医与中药兼顾,理论与实践并举,坚持中医特色,内容丰富,实用性强,是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊、美国《化学文摘》(CA)俄罗斯《文摘杂志》(AJ)和波兰哥白尼索引(IC)源期刊、天津市一级期刊。2011 年被评为天津市优秀期刊、获得全国高校优秀科技期刊二等奖、第 3 届全国中医药优秀期刊奖。本刊设有专家论坛、名医精粹、博士之窗、临床论著、针灸与推拿、理论探讨、实验研究、中药研究、国际交流、留学生园地、科研动态、综述等专栏,以满足广大读者日益增长的需要。

本刊国内外公开发行,ISSN:1672-1519,CN:12-1349/R。国内邮发代号为 6-83,国外发行代号:1040-BM,2013 年每期定价 6.00 元,全年 6 期定价为 36 元。合订本 60 元。本刊编辑部也办理邮购。邮购地址:天津市南开区鞍山西道 312 号《天津中医药》编辑部收,邮编:300193,电话:(022)59596310,传真:(022)59596595,E-mail: xuebaobj@tjctcm.edu.cn; xuebaobj@126.com