

## 三清降糖方对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的研究

高秀娟, 吴范武\*, 江春花, 李继安, 喇孝瑾  
(河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** **目的:**观察三清降糖方对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响。**方法:**提取大鼠小肠的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,测定其含量,通过正交试验确定最佳反应体系,制备三清降糖方水提制剂和醇提制剂,分别配制成 25, 2.5, 0.25, 0.025, 0.002 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,以阿卡波糖为阳性药对照组,用葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖含量,计算抑制率。**结果:**三清降糖方水提制剂、醇提制剂对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制有明显的浓度-效应关系。质量浓度为 25  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  三清降糖方水提制剂对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制率为  $(64.85 \pm 10.5)\%$ ,与 2.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的阿卡波糖抑制率相当。**结论:**三清降糖方具有抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的作用。

**[关键词]** 三清降糖方; 水提制剂; 醇提制剂;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0247-03

## Study on $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Effect of Sanqing Jiangtang Fang

GAO Xiu-juan, WU Fan-wu\*, JIANG Chun-hua, LI Ji-an, LA Xiao-jin

(Traditional Chinese Medicine College, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the influence of Sanqing Jiangtang Fang on  $\alpha$ -glucosidase activity. **Method:**  $\alpha$ -glucosidase from small intestine of rats was extracted and the content was determined. The optimal reaction system was set by orthogonal experiment. Sanqing Jiangtang Fang was extracted with water and ethanol respectively and prepared into solutions at 25, 2.5, 0.25, 0.025, 0.002 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Acarbose was used as the positive drug. The content of glucose was measured by glucose oxidase method to evaluate the inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase. The inhibitory rate was calculated. **Result:** Water-extraction preparation and ethanol-extraction preparation of Sanqing Jiangtang Fang could inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity, and showed marked concentration-effect relationship. The inhibitory effect of water-extraction preparation at 25  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  was  $64.85\% \pm 10.5\%$ , which was in correspondence to acarbose at 2.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . **Conclusion:** Sanqing Jiangtang Fang can inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity.

**[Key words]** Sanqing Jiangtang Fang; water-extraction preparation; ethanol-extraction preparation;  $\alpha$ -glucosidase

糖尿病是一组以慢性血葡萄糖水平增高为特征的代谢性疾病,其发病率在全球范围内呈逐渐增高趋势。我们在前期的动物实验中观察到三清降糖方对 2 型糖尿病大鼠有较好的降糖作用,尤其对餐后血糖的降低作用较显著<sup>[1]</sup>,为探讨其可能的降糖作

用机制,我们观察三清降糖方对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响。

### 1 材料

**1.1 药物** 三清降糖方由黄连、黄芩、知母、生地、黄、桑白皮、地骨皮、干姜 7 味药物组成,配伍比例为 5:5:5:5:5:3:3,饮片购自药都集团茗都中药饮片有限公司,批号 090101,阿卡波糖购自北京拜耳医药保健有限公司,批号 H19990205。

**1.2 动物** SPF 级 Wistar 雄性大鼠 10 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号 SLXK(京)2009-0004,饲养于河北联合大学屏障环境动物实验室,使用证明编号 MY10DXK07,室温 20  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 45% ~ 60%,光暗周期(12 h/

**[收稿日期]** 20111122(001)

**[基金项目]** 唐山市科技局攻关项目(10140201A-18)

**[第一作者]** 高秀娟,硕士研究生,讲师,从事中医药治疗代谢性疾病的临床与实验研究 Tel: 13933435015, 0315-3725022

**[通讯作者]** \* 吴范武,硕士,副教授,从事中医药治疗代谢性疾病研究, Tel: 0315-3726334, E-mail: w\_f\_w@sina.com

12 h)。给予普通标准饲料饲养,自由饮水。

## 2 方法

**2.1 三清降糖方的水提制剂的制备** 取三清降糖方中药物,加 8 倍量水煎煮 2 h,过滤,得到水煎液和药渣。药渣加 8 倍量水煎煮 2 h,过滤,得到水煎液。2 次得到的水煎液合并、浓缩、干燥,电热鼓风干燥箱 60 ℃ 烤干、粉碎,得到提取物,称为三清降糖方水提制剂。

**2.2 三清降糖方醇提制剂的制备** 取三清降糖方中药物,加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 h,过滤,得到醇提液和药渣。药渣加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 h,过滤,得到醇提液。两次得到的醇提液合并、浓缩、电热鼓风干燥箱 60 ℃ 烤干、粉碎,得到提取物,称为三清降糖方醇提制剂。

### 2.3 大鼠小肠 α-葡萄糖苷酶的提取与含量测定

**2.3.1 大鼠小肠 α-葡萄糖苷酶的提取** 正常雄性 Wister 大鼠,先空腹 24 h 处理。颈部脱臼处死大鼠,沿腹白线解剖,取小肠大约 20 cm,剪成小段,5 cm/段,放在预冷的生理盐水中清洗干净,在磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)中清洗,置于干净培养皿中,剪刀剪开小肠,干净载玻片刮取小肠黏膜表面物质,5 mL 注射器定容,加入约 2 倍量 PBS,在玻璃匀浆皿中匀浆,匀浆液低温离心机 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,离心后取上清液,在试管内混合均匀,分装进冻存管, -20 ℃ 冻存。

### 2.3.2 大鼠小肠 α-葡萄糖苷酶液蛋白浓度的测定

配置标准蛋白测定试剂盒(胎牛血清白蛋白)工作液,根据对照品的测定结果绘制蛋白浓度曲线,先给散点图,再加趋势线,显示公式。测得 BSA 标准曲线  $Y = 2\ 897.1X - 383.99$ ,  $R^2 = 0.996\ 9$ 。测得大鼠小肠提取得到的酶液蛋白的浓度为样品吸光度  $3\ 388.03\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.4 α-葡萄糖苷酶抑制作用药物筛选体外模型反应体系的优化** 实验前分别对 α-葡萄糖苷酶抑制作用药物筛选体外模型的底物浓度、酶液量和反应时间 3 个条件进行筛选,建立最佳反应体系。最佳反应体系的筛选采用正交实验设计。得到最佳反应

因素为:底物用  $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的麦芽糖,酶液浓度为稀释 8 倍的酶,反应时间为 30 min。

**2.5 待测药液的制备** 分别精确称取三清降糖方水提物、醇提物各 500 mg,溶于水,定容至 20 mL,即  $25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,  $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,倍比稀释 2.5, 0.25, 0.025, 0.002 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液, -4 ℃ 保存。

**阿卡波糖溶液:**阿卡波糖片溶于纯净水,配制成  $25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,倍比稀释至 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , -4 ℃ 保存。

**2.6 检测方法** 本检测以 2 mL 一次性试管为反应载体,设定反应体积为 1 mL。优化后的反应体系为:加待测药液 100 μL, PBS 缓冲液 300 μL,再加入稀释的大鼠小肠 α-葡萄糖苷酶 50 μL,混匀,放入 37 ℃ 细胞培养箱 10 min 后,加入  $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  麦芽糖 50 μL,混匀后 37 ℃ 细胞培养箱反应 30 min。最后加入  $0.2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 500 μL 终止反应。

反应体系中生成的葡萄糖用葡萄糖氧化酶法测定。提前 20 min 从冰箱中取出试剂盒,以平衡至室温。根据用量酶试剂和酚试剂按 1:1 体积混合制成工作试剂。在 96 板每孔中加入样品 20 μL 与工作试剂 200 μL,混合均匀后 37 ℃,放入培养箱保温 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(A)。每份样品用 3 个复管,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{对照}} - A_{\text{背景}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})} \times 100\%$$

**2.7 统计方法** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用统计软件 SPSS 13.0 进行,进行组间 t 检验比较。P < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

三清降糖方的水提制剂,醇提制剂对 α-葡萄糖苷酶的活性有较强的抑制作用,显示明显的浓度-效应关系,其中水提制剂抑制作用较强,当水提制剂的浓度为  $25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,相当于  $2.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  阿卡波糖浓度,其抑制率均达到了 60% 以上。见表 1。

表 1 三清降糖方水提制剂,醇提制剂对 α-葡萄糖苷酶的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	各浓度对 α-葡萄糖苷酶的抑制率/%				
	$0.002\ 5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.025\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$2.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
三清降糖方水提	$6.69 \pm 1.02^{2)}$	$19.82 \pm 2.87^{1)}$	$36.93 \pm 7.01^{1)}$	$40.71 \pm 5.05^{2)}$	$64.85 \pm 10.5$
三清降糖方醇提	$4.90 \pm 0.96^{2)}$	$15.14 \pm 2.03^{2)}$	$24.77 \pm 4.32^{2)}$	$32.53 \pm 4.97^{2)}$	$47.16 \pm 5.14^{1)}$
阿卡波糖	$11.51 \pm 1.23$	$23.38 \pm 1.92$	$46.47 \pm 5.23$	$63.39 \pm 9.28$	$53.78 \pm 6.23$

注:与阿卡波糖组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01。

#### 4 讨论

迄今为止,许多学者在 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制模型方面进行了大量的研究工作。应用 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制体外模型,先后陆续发现了70多种中草药提取物具有抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的作用和数10种降糖活性因子<sup>[2]</sup>。实验中选用的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶大多为市售,其价格昂贵。本实验选取大鼠小肠提取的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶,因其来源简单,取材方便,成本低,与市售 $\alpha$ -葡萄糖苷酶比较,对体外筛选 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂研究结果无显著的影响<sup>[3]</sup>。

由于三清降糖方水提,醇提物都含有色素,结果采用葡萄糖试剂盒测定,其生成物通过酶标仪测定,测A表达。因为酶标仪测定结果是根据比色计的原理,必然不能避免中药液本身的颜色干扰,给实验结果造成一定的误差。实验可采用两种方法避免颜色干扰:离心后,加入活性炭脱去颜色,以使中药液变得澄清明亮<sup>[4]</sup>;设置背景对照,每个样品都要以PBS代替底物测定背景吸收,每批样品都要做空白对照,阴性对照,背景对照,各组均在同一条件下进行反应,结果可采用待测样品的吸光度减去背景对照的吸光处理数据<sup>[5]</sup>。我们在前期采用活性炭吸附色素的预实验中,药液经活性炭处理后,其抑制率明显下降,其原因可能是活性炭在吸附色素的同时,也将药物活性物质吸附,使其不能发挥药理作用。故本实验通过离心取上清液,并设置背景对照以保证实验结果的准确性,减少实验误差。

三清降糖方是依据临床实践中糖尿病患者多具有明显的热象,并且虚实夹杂的证候常见的特点,按照中医的辨证组方原则拟定的方药,意在肺,胃,肾同治,实热与虚热并清,在临床上获得很好的疗效。本实验建立筛选 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用的体外模型,应用不同浓度的三清降糖方水提制剂,醇提制剂进行干预,以阿卡波糖为阳性药对照组,观察其

对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响。结果显示,水提制剂对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性有较强作用,当质量浓度为 $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其抑制率为64.85%,且抑制曲线成逐渐上升趋势,呈现明显的浓度-抑制效应关系。阿卡波糖组在 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,呈现最高的抑制率,其抑制曲线较平滑。本实验中阿卡波糖的最大抑制率只有63.39%,比大多数国内报道的同类研究的抑制率偏低<sup>[6]</sup>。实际上药物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用受很多因素的影响,包括酶液的浓度,酶液的活力,反应体系中的反应体积,底物浓度,加酶的量,反应时间等。各不同实验室的抑制率之间因反应条件不同不具有可比性,本实验中设立阿卡波糖组只起到一个平行对照作用,并且在实验设计中既测定了从大鼠小肠提取得到的酶液蛋白浓度,也按正交实验的方法进行了反应体系的优化,其可重复性更强,结果更可靠。

#### [参考文献]

- [1] 吴范武,王雪,李继安,等. 三清降糖方对实验性2型糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):164.
- [2] 吴酬飞,许杨,李燕萍.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2008,35(1):9.
- [3] 张海凤,董亚琳,胡萨萨,等. 五种中药对两种不同来源 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用比较[J]. 中药材,2008,31(7):1024.
- [4] 沈忠明,李英,姜宏,等. 降糖中药对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 中国生化药物杂志,2000,21(20):69.
- [5] 赵建华. 芦笋边角料提取分离及活性研究[D]. 太原:山西大学,2009:3.
- [6] 刘志峰,李萍,李慎军. 5种中药体外 $\alpha$ -糖苷酶抑制作用的观察[J]. 山东中医杂志,2004,23(1):41.

[责任编辑 聂淑琴]