

柿叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

王明贤^{1*}, 胡思进²

(1. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000; 2. 广州中医药大学药学院 2010 级博士生, 广州 510120)

[摘要] 目的: 研究柿叶黄酮 (FLDK) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。方法: 采用酶抑制剂筛选模型观察柿叶黄酮 0.25 ~ 8.0 mg·mL⁻¹ 对大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶的作用, 用人类结肠癌细胞株 (Caco-2) 细胞筛选模型观察柿叶黄酮 0.1 mg·mL⁻¹ 对麦芽糖酶、蔗糖酶的作用。结果: 在酶抑制剂筛选模型体外实验中, FLDK 对蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶活性的抑制作用呈浓度依赖性, 当质量浓度达 8.0 mg·L⁻¹ 时, 其对蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶的抑制作用均超过 70%。在人类结肠 Caco-2 细胞中, FLDK 对蔗糖酶、麦芽糖酶的抑制作用均超过 75%。结论: FLDK 对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制作用, 可用于防治糖尿病。

[关键词] 柿叶黄酮; α -葡萄糖苷酶; 血糖; 糖尿病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0232-03

柿叶为柿 *Diospyros kaki* L f 的干燥叶。柿叶含有黄酮类、生物碱、挥发油、鞣质、酚类、香素、三萜类、多糖、有机酸、 β -胡萝卜素、维生素 C 等多种成分^[1]。其中主要成分是柿叶黄酮 (flavone from leaves of *Disopyros kaki*, FLDK)。研究表明柿叶醇提取物^[2]、水提取物^[3]、柿叶黄酮^[4]、柿叶多糖^[5]均有较强的降糖作用。

α -葡萄糖苷酶抑制剂 (α -GI) 能与小肠中的 α -葡萄糖苷酶的中心活性部位结合, 阻抑酶活性的发挥, 阻滞双糖水解为单糖, 吸收时间后延, 从而对降低餐后高血糖起到有益的作用^[6]。第三类降糖药

α -GI 常作为降低餐后血糖的一线药物^[7]。从天然产物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂日益受到重视^[8]。本实验研究 FLDK 对 α -葡萄糖苷酶活性影响, 旨在进一步探讨柿叶的降糖作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 180 ~ 220 g, 购自四川省医科院实验动物研究所, 合格证号 SCXK(川)2004-16。动物自由摄食和饮水, 动物室温度 21 ~ 23 °C, 相对湿度 50% ~ 55%。每天给予 12 h 光照和 12 h 黑暗的人工照明环境。

1.2 细胞系及培养条件 人类结肠癌细胞系 (Caco-2) (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心), 用含 10% 的胎牛血清和双抗 (青霉素和链霉素 100 U·mL⁻¹) 的 DMEM 培养液于 37 °C, 5% CO₂ 条件下贴壁培养。在细胞长至对数增长期时,

[收稿日期] 20120305(215)

[通讯作者] * 王明贤, 副教授, 从事天然药物与生物化学研究, Tel: 1389064542, E-mail: 1347386821@qq.com

[5] 郑志, 陈海冰, 许迅, 等. ACEI 对糖尿病大鼠视网膜 VEGF 表达的作用 [J]. 眼科研究, 2008, 26(4): 270.
[6] LI H, DU Y M, GUO L, et al. The role of hERG1 K⁺ channels and a functional link between hERG1 K⁺ channels and SDF-1 in acute leukemic cell migration [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(13): 2256.
[7] LI H, GUO L, JIE S, et al. Berberine inhibits SDF-1-induced AML cells and leukemic stem cells migration via regulation of SDF-1 level in bone marrow stromal cells [J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62(9): 573.
[8] Liang J F, Wang H K, Xiao H, et al. Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 71.
[9] 顾宇, 陆枫林. 血管内皮生长因子在肝癌中的作用

[J]. 现代医学, 2009, 37(5): 386.

[10] Su L, Xu X, Zhao H, et al. *In vitro* and *in vivo* antiangiogenic activity of a novel decapeptide derived from human tissue-type plasminogen activator kringle 2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(4): 1012.
[11] Xu Y, Zhao H, Zheng Y, et al. A novel antiangiogenic peptide derived from hepatocyte growth factor inhibits neovascularization *in vitro* and *in vivo* [J]. Mol Vis, 2010, 16: 1982.
[12] Ciulla T A, Rosenfeld P J. Anti-vascular endothelial growth fact therapy for neovascular ocular diseases other than age-related macular degeneration [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2009, 20(3): 166.

[责任编辑 何伟]

消化收获细胞,以 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL密度接种于6孔板的多聚碳酸酯膜上,每天换液。

1.3 试剂与药物 FLDK的制备^[9]:柿叶以70%乙醇回流提取,提取液减压浓缩,用20% NaOH调pH至9~10后用石油醚萃取除去叶绿素,弃醚相,水相用15% HCl调pH至5~6后再用乙酸乙酯反复萃取,弃水相,乙酸乙酯相浓缩干燥后得总黄酮,以芦丁为对照品,经高效液相色谱测得含黄酮量>64.5%。阿卡波糖(拜唐苹,中国北京拜耳医药保健有限公司,批号1003540)。 α -葡萄糖苷酶、4-硝基酚- α -D吡喃葡萄糖苷(pNPG)、谷胱甘肽均购自Sigma公司。 Na_2CO_3 (分析纯,天津塘沽化学试剂厂);葡萄糖测试盒(上海荣盛生物技术有限公司,批号100951)。

1.4 仪器 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),BS210S 1/万天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), CO_2 细胞培养箱(日本Sanyo公司),DHP-9032恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠小肠中 α -葡萄糖苷酶的提取 参照文献[10]方法,Wistar大鼠乙醚麻醉后,解剖剪取十二指肠10 cm左右,剖开,用冷生理盐水充分冲洗,用干净的载玻片刮取小肠内表面,将刮取物约按1:4加入冷 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.8),冰浴匀浆,匀浆液 $10\,000 \times g$ 离心(4°C)30 min,上清液分装于 -20°C 保存备用。

2.2 FLDK对大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性影响 参照文献[11]方法,反应液中FLDK质量浓度分别为0.25,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,阳性对照组加入阿卡波糖 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,加入蔗糖、乳糖、和麦芽糖,浓度分别为8.4,4.2,4.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 37°C 温浴30 min,加入Tris HCl终止反应,用葡萄糖测试盒测定终反应液中葡萄糖含量。计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{给药组葡萄糖含量} / \text{对照组葡萄糖含量}) \times 100\%$$

2.3 FLDK对Caco-2细胞 α -葡萄糖苷酶活性的影响 参照文献[12]方法,接种Caco-2细胞于6孔板的多聚碳酸酯膜上14~15 d后,可得到腔侧和基底侧的Caco-2单细胞层,用PBS液冲洗以除去葡萄糖。含有 $28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖或 $28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽糖的950 μL PBS作为底物,FLDK($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,DMSO作为溶剂)50 μL 加入Caco-2细胞的腔侧, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素及 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,2,3,4,6-五-O-乙酰-D-葡萄糖(PGG)作为阳性对照,另外加入

1 mL PBS在基底侧。 37°C 孵育2 h后,分别吸取浸渍细胞两面的液体100 μL 在96孔板内,测定游离葡萄糖的浓度。

2.4 统计学处理 采用SPSS 16.0统计分析软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FLDK对大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性的影响 FLDK对蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶活性的抑制作用呈浓度依赖性。当质量浓度达 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶的抑制作用与阿卡波糖相当。阿卡波糖对蔗糖酶和麦芽糖酶有明显抑制作用,但对乳糖酶没有抑制作用。见表1。

表1 FLDK对大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率		
		蔗糖酶	麦芽糖酶	乳糖酶
FLDK	0.25	2.7 ± 1.5	6.4 ± 7.3	10.3 ± 5.1
	0.5	8.5 ± 3.2	15.3 ± 8.8	21.2 ± 6.3
	1.0	14.5 ± 4.2	24.2 ± 9.2	33.5 ± 7.9
	2.0	43.6 ± 6.9	47.7 ± 10.5	52.4 ± 9.8
	4.0	59.4 ± 10.2	65.5 ± 12.4	60.5 ± 12.3
	8.0	75.2 ± 14.3	79.2 ± 14.3	78.7 ± 13.4
阿卡波糖	2.0	73.2 ± 13.9	76.7 ± 14.1	17.8 ± 6.6

3.2 FLDK对Caco-2细胞 α -葡萄糖苷酶活性的影响 FLDK对麦芽糖酶和蔗糖酶活性均有较好的抑制作用,达75%以上。PGG对蔗糖酶抑制作用<50%,而黄芩素则对麦芽糖酶没有抑制作用。见图1。

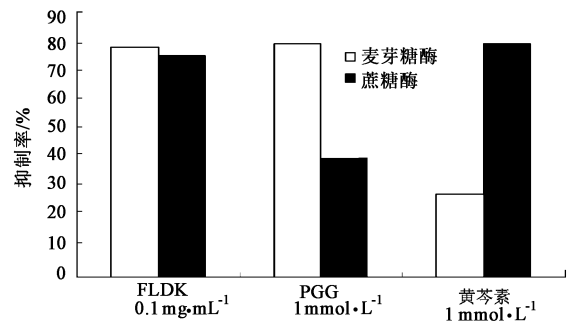


图1 FLDK对Caco-2细胞 α -葡萄糖苷酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

糖尿病是目前仅次于肿瘤和心、脑血管病的常见病,严重威胁着生命健康。近来研究发现其病发

过程中往往先出现餐后高血糖,而后发展成糖尿病^[6]。我国饮食以碳水化合物为主,因而糖苷酶抑制剂能更好的发挥其降糖效果。

α -GI 主要有 3 个来源,一是从微生物的代谢产物中得到,如阿卡波糖;二是采用化学合成;三是从天然产物中提取。天然植物/传统中草药在降血糖、糖尿病防治中发挥着重要作用,现在发现含有 α -葡萄糖苷酶抑制剂的药用植物有 120 余种^[13],是 α -葡萄糖苷酶抑制剂主要来源。

α -GI 可抑制葡萄糖苷酶的活性,使葡萄糖的生成和吸收减缓,从而减低餐后血糖峰值,调整血糖水平;并且减少血糖对胰腺的刺激,提高胰岛素的敏感性,保护胰腺的功能,有效预防并改善并发症的发生和发展^[6]。本实验采用传统的以乳糖、蔗糖、麦芽糖为底物的酶抑制剂筛选模型及 Caco-2 细胞筛选模型,后者含有人体小肠的酶体系,能够反映人体内的情况,从而更好地筛选出对人小肠 α -葡萄糖苷酶有抑制作用的活性成分,避免了假阳性的出现^[6]。

本实验结果表明,FLDK 对大鼠小肠蔗糖酶、麦芽糖酶及乳糖酶活性均有较好的抑制作用,阿卡波糖对蔗糖酶和麦芽糖酶有明显抑制作用,但对乳糖酶没有抑制作用,提示 FLDK 降糖作用有别于阿卡波糖。同样在人类结肠 Caco-2 细胞实验中,FLDK 均表现出对蔗糖酶、麦芽糖酶有较好的抑制作用。从这二个模型可以看出 FLDK 对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制作用,可用于防治糖尿病。

[参考文献]

[1] 郭玫,董小萍,徐文萍. 柿叶的研究概况[J]. 甘肃中医学院学报,2000,17(增刊):78.
[2] 徐锦龙,王一奇,徐佳丽,等. 柿叶提取物对高血糖大鼠血糖及肝糖原含量的影响[J]. 中华中医药学刊,

2010,28(2):413.

[3] 胡忠泽,王立克,杨久峰,等. 柿叶水提取物对糖尿病小鼠降血糖作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2006,13(5):333.
[4] 高永峰,高允生,辛晓明. 柿叶总黄酮对糖尿病小鼠降血糖降血脂作用及其机制研究[J]. 泰山医学院学报,2009,30(4):245.
[5] 邓航,贺敏,李江,等. 柿叶多糖对糖尿病小鼠降血糖作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):114.
[6] 陈静,程永强,刘晓庆,等. 食品中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展[J]. 食品科学,2007,28(4):360.
[7] 顾觉奋,陈紫娟. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究及应用[J]. 药学进展,2009,33(2):62.
[8] 易醒,仲秋晨,焦爽,等. 泽泻提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的研究[J]. 食品与发酵工业,2011,37(5):115.
[9] 陈丽,梁宇红,裴世成,等. 柿叶总黄酮对高脂血症大鼠血脂和血液流变学的影响[J]. 中成药,2011,33(8):1397.
[10] 张素军,瞿伟菁,周淑云. 蒺藜皂苷对大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 中国中药杂志,2006,(11):910.
[11] 王波,刘衡川,洪君蓉,等. 番石榴叶水提取物对糖尿病小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 四川大学学报:医学版,2007,38(2):298.
[12] 景赞,曾维才,罗静雯,等. 西青果提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的研究(III)[J]. 食品科学,2010,37(7):284.
[13] 季芳,肖国春,董莉,等. 药用植物来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究进展[J]. 中国中药杂志,2010,(12):1633.

[责任编辑 何伟]