

消渴丸中药成分对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究

钱瑾¹, 黎明¹, 吴嘉瑞², 向红丁^{1*}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 北京协和医院 内分泌科 卫生部内分泌重点实验室, 北京 100730;
2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 研究消渴丸中药成分对大鼠肠黏膜 α -葡萄糖苷酶是否有抑制作用, 以探讨消渴丸中药成分的降糖作用机制。**方法:** 用大鼠小肠上段提取 α -葡萄糖苷酶, 1:5 稀释使酶反应速度达到试剂盒测定要求。以 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖作为底物, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿卡波糖为阳性对照, 分别加入不同浓度的消渴丸全药、消渴丸中药和格列本脲, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 40 min 后, 在 550 nm 波长下测定吸光度(A)。通过测定反应体系中葡萄糖生成量并计算酶活性的抑制率来判断消渴丸中药成分对大鼠肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性的影响。**结果:** 阿卡波糖($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 86.3%。消渴丸中药成分($2 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用(抑制率 18.8% ~ 35.7%)。**结论:** 消渴丸中药成分对大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶具有一定抑制作用。

[关键词] 消渴丸; α -葡萄糖苷酶; 抑制剂; 糖尿病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0173-04

The Inhibiting Effect of Compositions from Xiaoke Pill on the α -glucosidase

QIAN Jin¹, LI Ming¹, WU Jia-rui², XIANG Hong-ding^{1*}

(1. Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study whether the composition from Xiaoke pill has the inhibiting effect on the α -glucosidase, and find out the mechanism of reducing the blood glucose l. **Method:** The α -glucosidase was prepared from the upper part of rat small intestine and diluted by 5 times in order to reach the requirement of the kit. Sucrose ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) was used as the substrate, and acarbose ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) as the positive control. Different concentrations of Xiaoke pill, the composition and glibenclamide were added into the reaction system. the absorbance of the system at 550 nm was measured after reacting for 40 min under the temperature of $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The α -glucosidase activity was detected by measuring the concentration of glucose produced. The inhibition ratio was calculated. **Result:** Acarbose ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) was shown to be an α -glucosidase inhibitor with an evident inhibition ratio (86.3%). The composition ($2\text{-}200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) had an inhibition ratio of 18.8% -35.7%. **Conclusion:** The composition from Xiaoke pill has some inhibiting effect on the α -glucosidase of rat small intestine.

[Key words] Xiaoke pill; α -glucosidase; inhibitor; diabetes mellitus

消渴丸是一种中、西药复方制剂, 在临床糖尿病

治疗中应用广泛。既往研究表明, 消渴丸对糖尿病治疗有较好的作用, 对糖尿病各种并发症的预防及治疗也有一定意义^[1-2]。消渴丸中西药成分格列本脲的降糖机制已经明确, 但到目前为止, 有关消渴丸中药成分防治糖尿病及其并发症作用机制的研究还不够充分^[3], 为此, 进一步对消渴丸中药成分的作用机制加以研究实属必要, 明确其作用机制将有利于对消渴丸用药指征及药量的把握并降低其副作用。在临床应用中, 消渴丸全药和格列本脲相比, 对

[收稿日期] 20110805(008)

[基金项目] 北京市大学生科研创新计划项目 (2009ZLGC0612)

[第一作者] 钱瑾, 博士生在读, 主要从事糖尿病中药治疗相关研究, Tel: 13811648217, E-mail: qianj04@163.com

[通讯作者] * 向红丁, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事糖尿病诊疗相关研究, Tel: 13801361353, E-mail: xianghd@vip.sohu.net

餐后血糖的下降作用更为持久和显著^[4]。而在各类降糖药物中,α-葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖具有明确的降低餐后血糖的作用^[5]。α-葡萄糖苷酶主要存在于动物的小肠黏膜上,其主要生理作用是促进葡萄糖的吸收^[6]。所以本实验选取大鼠小肠黏膜提取 α-葡萄糖苷酶来研究消渴丸中药成分是否对 α-葡萄糖苷酶有抑制作用,以探讨消渴丸中药成分的降糖作用机制。

1 材料

1.1 动物 选用正常雄性 Wistar 大鼠(200~220 g,中国医学科学院实验动物研究所),用于提取肠黏膜 α-葡萄糖苷酶。

1.2 药物与试剂 消渴丸(中、西药复方制剂,主要成分包括葛根、地黄、黄芪、天花粉、玉米须、五味子、山药,每 0.25 g 成品消渴丸含有 0.25 mg 格列本脲)、消渴丸纯中药粉末、格列本脲粉末均由广州中一药业有限公司提供,批号 M00293。阿卡波糖(拜唐苹),拜耳医药保健有限公司提供,批号 119871。葡萄糖测定试剂盒(氧化酶法,最佳工作波长 550~555 nm),北京普利来生物制品有限公司提供,批号 E1010-0908。

1.3 仪器 HR-120 电子分析天平(日本,AND),85-2 型磁力搅拌器(武汉格莱美检测设备有限公司),TGL-20MS 高速冷冻离心机(20 000 r·min⁻¹,4 ℃,Saltyxiangyi),-20 ℃冰箱(海尔),37 ℃温育箱(上海精密实验设备有限公司),Multiskan MK3 酶标仪(400~750 nm,0~3.0 A,芬兰雷勃)。

2 方法

2.1 α-葡萄糖苷酶提取^[7] Wistar 大鼠禁食 3 h,断头处死取小肠上段(自十二指肠约 10 cm),用预冷的生理盐水冲洗两次,取黏膜层,按 1:10 比例用 0.5 mol·L⁻¹ NaCl-KCl 缓冲液(pH 7.0)稀释并匀浆,20 000 r·min⁻¹离心 30 min(4 ℃),沉淀用预冷的生理盐水洗 2 次,均在 20 000 r·min⁻¹离心 30 min,沉淀用生理盐水按 1:5 稀释,500 r·min⁻¹离心 10 min(4 ℃),上清液分装于 -20 ℃冰箱保存备用。

2.2 酶浓度的确定 将提取的酶液用生理盐水稀释成不同的倍数(2,5,10,20,50,100 倍),取 25 μL 加入 10 g·L⁻¹ 的蔗糖溶液 5 μL,0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)20 μL,葡萄糖氧化酶液 250 μL,37 ℃反应 40 min 后,在 550 nm 波长下测定吸光度(A),根据葡萄糖的生成量确定试验中所需的 α-葡萄糖苷酶浓度。本实验中当酶浓度稀释 5 倍时,酶

反应速度可达到试剂盒测定要求(吸光度值在线性测定范围内, $R^2 = 0.9908$)。因此,将提取的酶液按 1:5 倍稀释后用于后续试验。

2.3 α-葡萄糖苷酶活性的抑制实验 取 96 孔微板为反应载体,最终反应体积为 50 μL。用阿卡波糖为阳性对照药,同时设定底物空白对照,酶空白对照,酶活性对照。样品分为 4 组,分别加入阿卡波糖、消渴丸全药、消渴丸中药成分、格列本脲。浓度选择标准:参照《国产格列本脲和二甲双胍复方制剂在健康志愿者的药代动力学和生物等效性》^[8],研究选择格列本脲质量浓度分别为 2,20,200 μg·L⁻¹。每粒成品消渴丸 0.25 g 含有格列本脲 0.25 mg,据此选择相应的中药和成品剂量分别为:消渴丸全药质量浓度:2,20,200 mg·L⁻¹;消渴丸中药成分质量浓度:2,20,200 mg·L⁻¹;阿卡波糖质量浓度:1 g·L⁻¹^[9]。采用葡萄糖氧化酶法,在 550 nm 波长测定吸光度(A),通过测定反应体系中葡萄糖生成量的多少,衡量样品对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用。

表 1 α-葡萄糖苷酶活性的抑制实验操作流程

试剂	底物 空白管	酶空白管	酶活性 对照管	样品管
生理盐水/μL	-	25	-	-
PBS/μL	25	20	20	-
α-葡萄糖苷酶液/μL	25	-	25	25
样品/μL	-	-	-	20
蔗糖/μL	-	5	5	5
混合均匀,37 ℃反应 40 min				
葡萄糖氧化酶液/μL	150	150	150	150

注:37 ℃反应 40 min 后,550 nm 下测定吸光度(A)。每个浓度样本重复测定 6 次,取平均值。

2.4 抑制率的计算 样品对酶活性的抑制率按下式计算:

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

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同浓度的消渴丸全药与格列本脲、消渴丸中药成分与格列本脲、消渴丸全药与消渴丸中药成分对 α-葡萄糖苷酶的抑制率分别进行配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶有很好的抑制作用抑制率(86.3 ± 1.8)%,格列本脲对 α-葡萄糖苷酶几乎没有抑制作用(0.2~2.5)%。消渴丸中药和全药的抑制率都显著高于格列本脲。通过对同种药

物不同浓度的组内方差分析,消渴丸中药成分 $P < 0.05$,说明中药成分的浓度不同会对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用产生影响;进一步用 χ^2 线性趋势检验, $P < 0.05$,说明抑制作用强弱可能与浓度有线性相关趋势(表2)。

表2 各样品对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	A	抑制率/%
消渴丸全药	2	0.949 ± 0.028 ¹⁾	13.6 ± 2.0 ¹⁾
	20	0.922 ± 0.062 ¹⁾	16.1 ± 6.0 ¹⁾
	200	0.903 ± 0.071 ¹⁾	17.8 ± 7.0 ¹⁾
消渴丸中药	2	0.894 ± 0.098 ²⁾	18.8 ± 9.0 ¹⁾
	20	0.733 ± 0.099 ²⁾	34.2 ± 9.4 ¹⁾
	200	0.718 ± 0.117 ²⁾	35.7 ± 11.4 ¹⁾
格列本脲	0.002	1.083 ± 0.014 ²⁾	0.5 ± 3.4 ²⁾
	0.020	1.038 ± 0.122	0.2 ± 1.4
	0.200	1.062 ± 0.038	2.5 ± 4.2
阿卡波糖	1 000	0.192 ± 0.014	86.3 ± 1.8 ²⁾
酶空白对照	-	0.049 ± 0.024	-
酶活性对照	-	1.089 ± 0.012	-

注:与酶活性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

糖尿病患者的长期高血糖状态可引起微血管和大血管以及神经损害^[10],导致眼、肾、心血管、神经系统等功能障碍,产生多种并发症^[11]。因此,严格控制血糖是糖尿病治疗的基本要求。糖尿病属于中医“消渴病”范畴,中医中药治疗糖尿病有着悠久的历史^[12]。但大部分中药控制血糖的机制不明,不利于临床用药指征及药量的把握。

消渴丸作为一种中、西药复方制剂,在临床糖尿病治疗中应用广泛。其中黄芪、山药均为补气药^[13],山药兼养阴之功,天花粉、地黄、葛根具有良好的清热、养阴、生津功效^[14],诸药合用,气阴双补,生津止渴,对消渴病具有良好的治疗效果^[15]。我国糖尿病患者人数多,发病率高,而血糖控制达标率低^[16],研究消渴丸的中药有效成分,有利于明确消渴丸的用药指征和剂量,并且可以进一步发掘中药在糖尿病治疗中的作用。

实验中阳性对照阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为86.3%,而阴性对照格列本脲的抑制率仅为0.2%~2.5%,充分说明本实验方法有较好的敏感性和特异性。实验结果得出,消渴丸中药成分对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为18.8%~35.7%,相对于格列本脲来说,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这说明消渴丸的中药成分中可能含有与 α -葡萄糖苷

酶抑制剂作用类似的成分。但与阳性对照相比,消渴丸中药成分的抑制作用没有阿卡波糖明显,消渴丸中药成分复杂,其降糖作用机制不一定是单一的,具体作用于 α -葡萄糖苷酶的成分有待进一步的分离提纯确定。

实验结果中,相同浓度的消渴丸全药对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用低于中药成分。成品消渴丸中只含有极少量的格列本脲,且格列本脲的降糖机制主要是刺激胰岛 β 细胞释放胰岛素^[10],对 α -葡萄糖苷酶没有明确的抑制作用。所以,分析消渴丸全药对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用低于中药成分的原因除实验误差外,也可能是因为消渴丸成品在制备过程中添加的少量赋形剂造成的影响。

[参考文献]

- [1] 桂建华. 消渴丸的安全合理使用[J]. 中医药信息, 2009,26(1):91.
- [2] 邬伟魁,张海燕,宋伟,等. 糖尿病血管并发症的中药防治[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):292.
- [3] 张萌佳,张洁. 糖尿病肾病中医药临床研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(7):95.
- [4] 胡凤平,冯所安,邓慧敏. 消渴丸与优降糖治疗糖尿病的疗效对比研究[J]. 中药新药与临床药理,1999,5(10):144.
- [5] Goke B, Herrmann-Rinke C. The evolving role of alpha-glucosidase inhibitors[J]. Diabetes Metab Rev, 1998, 14: 1S31.
- [6] 王吉耀. 内科学(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:988.
- [7] KIM Y M, HYEON M, RHOE H I. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark[J]. Carbohydr Res, 2004,339(3):715.
- [8] 李雪宁,陈伟力,徐红蓉,等. 国产格列本脲和二甲双胍复方制剂在健康志愿者的药代动力学和生物等效性[J]. 中国临床药理学杂志,2004,20(5):354.
- [9] 张冉,刘泉,申竹芳,等. 应用 α -葡萄糖苷酶抑制剂高通量筛选模型筛选降血糖中药[J]. 中国药学杂志, 2007(5):470.
- [10] 史轶繁. 协和内分泌和代谢学[M]. 北京:科学出版社,1999:1334.
- [11] 蒲翔,冯泳,何前松,等. 理气活血法对2型糖尿病模型大鼠血瘀状态的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(12):136.
- [12] 吴金环,顾红岩,喇孝瑾,等. 地黄与熟地黄对糖尿病小鼠血糖血脂的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(8):161.

猴头菌粉提取物对 2 型糖尿病小鼠降血糖作用研究

张文¹, 陈建伟^{1,2*}, 李祥¹, 张雯¹

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] **目的:**研究猴头菌粉提取物的降血糖活性。**方法:**健康雄性昆明小鼠,以 4 周高脂饮食诱发胰岛素抵抗,并以 ip 链脲佐菌素(STZ) 170 mg·kg⁻¹以诱发 2 型糖尿病。模型小鼠随机分组,ig 给予猴头菌粉各部位提取物 21 d,测定空腹血糖以筛选猴头菌粉降血糖活性部位,对筛选出的活性部位进行口服糖耐量实验。并于 HE 染色后,在光镜下观察其对糖尿病模型小鼠肝、肾、胰腺的组织形态学影响。**结果:**猴头菌粉多糖能对抗糖尿病小鼠体重减轻的症状,给予猴头菌粉多糖的 14, 21 d 小鼠血糖值与模型组相比较均出现非常显著性下降($P < 0.01$)。猴头菌粉多糖(400 mg·kg⁻¹)能提高糖尿病模型小鼠的葡萄糖耐量,并能对抗糖尿病导致的肝、肾、胰脏病变。**结论:**猴头菌粉多糖具有降血糖活性,且其提高糖耐量、保护脏器作用呈现一定的量效关系。

[关键词] 猴头菌粉多糖; 2 型糖尿病小鼠模型; 降血糖; 糖耐量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0176-05

Hypoglycemic Activity of the Extracts from the Powder of *Hericium erinaceus* Type 2 Diabetic Mellitus Mice

ZHANG Wen¹, CHEN Jian-wei^{1,2*}, LI Xiang¹, ZHANG Wen¹

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the hypoglycemic activity of the extracts from the powder of *Hericium erinaceus*. **Method:** Type 2 diabetic mellitus (DM) model was induced by both administration of high lipid food for four weeks and intraperitoneal injection of streptozotocin (170 mg · kg⁻¹). The hypoglycemic effective parts were selected by measuring fasting blood glucose after 21 days of intragastric administration. The oral glucose tolerance test was carried out to define the hypoglycemic activity of the extracts. The effects on pathological changes of hepatic tissue, kidney and pancreatic tissue were observed with Hematoxylin and Eosin staining (HE) under light microscope. **Result:** The polysaccharides from the powder of *H. erinaceus* showed the ability of resisting DM induced weight-loss. Compared with control group, the fasting blood glucose of the DM mice which were

[收稿日期] 20110831(009)

[基金项目] 江苏省优势学科建设工程项目(ysxk-2010);江苏省高校自然科学基金(02KJB360004)

[第一作者] 张文, 硕士在读

[通讯作者] * 陈建伟, 博士生导师, 教授, 从事中药品质评价与中药生物技术研究, Tel:025-85811695, E-mail:chenjw695@126.com

[13] 王春怡, 陈艳芬, 李卫民, 等. 黄芪葛根汤对实验性糖尿病及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):144.

[14] Stratton I M, Adler A I, Neil H A, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study [J]. BMJ, 2000,

321:405.

[15] 李家邦, 高鹏翔. 中医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007:366.

[16] 范军星, 王文娟, 吴凡, 等. 城市社区糖尿病患者治疗和控制现状研究[J]. 中国慢性病预防与控制, 2008, 16(4):340.

[责任编辑 聂淑琴]