

# 骨碎补与夜交藤组合物对 $\alpha$ -糖苷酶活性的影响

吴慧平<sup>1</sup>, 陈建伟<sup>2</sup>, 许婷婷<sup>1</sup>, 席昱<sup>3</sup>, 戴晓明<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210046; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;  
3. 江苏省肿瘤医院药剂科, 南京 210009)

**[摘要]** **目的:** 研究骨碎补与夜交藤组合物对  $\alpha$ -糖苷酶活性的影响。**方法:** 设酶、骨碎补与夜交藤组合物的提取物、拜唐苹阳性药和空白对照, 以及中药组合物的提取物空白对照。把阳性药和以上中药组合物的提取物, 加入到  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -麦芽糖酶不同微量反应体系中, 分别用 Bernfeld 法、葡萄糖氧化酶(GOD)法测其酶活性。**结果:** 骨碎补与夜交藤组合物的水提取物和浸膏对  $\alpha$ -糖苷酶中的  $\alpha$ -麦芽糖酶活性均有明显的抑制作用, 与拜唐苹的作用一致, 其抑制存在量效关系, 但呈可逆性、混合性抑制。**结论:** 骨碎补与夜交藤组合物的水提取物、浸膏是对  $\alpha$ -糖苷酶起抑制作用的主要部位。

**[关键词]** 骨碎补与夜交藤组合物;  $\alpha$ -糖苷酶; 酶抑制剂

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0181-04

## Effect of the Combination of *Drynaria fortunei* and *Polygonum multiflorum* on Alpha-glycosidase Activity

WU Hui-ping<sup>1</sup>, CHEN Jian-wei<sup>2</sup>, XU Ting-ting<sup>1</sup>, XI Yu<sup>3</sup>, DAI Xiao-ming<sup>1\*</sup>

(1. College of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;  
2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;  
3. Pharmacology Department, Jiangsu Tumor Hospital, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of the combination of *Drynaria fortunei* and *Polygonum multiflorum* on alpha-glycosidase activity. **Method:** Following groups including enzyme, the combination of extracts of *D. fortunei* and *P. multiflorum*, acarbose and the positive drug, blank control and controls of the herbal extracts were established. The activity of different micro reaction systems like  $\alpha$ -amylase or  $\alpha$ -maltase, which were added to acarbose and the above corresponding groups, was determined by Bernfeld, and GOD. **Result:** The aqueous extract, sodden ointment of the combination of *D. fortunei* and *P. multiflorum* showed significant inhibition on  $\alpha$ -maltase's activity with dose-effect relationship, consistent with the role of acarbose, but the inhibition was reversible and mixed. **Conclusion:** The aqueous extract and sodden ointment of *D. fortunei* and *P. multiflorum* combination have inhibition on  $\alpha$ -glycosidase.

**[Key words]** combination of *Drynaria fortunei* and *Polygonum multiflorum*; apha-glycosidase; enzyme inhibitor

据中国糖尿病和代谢综合征研究组最新统计, 我国 20 岁以上人群糖尿病总体患病率已达 9.7%; 糖尿病前期的患病率则高达 15.5%。经推算我国

总糖尿病患病人数在 9 200 万以上<sup>[1]</sup>, 居世界首位; 糖尿病前期人数达 14 800 万以上<sup>[1]</sup>。后者与糖尿病的转化率关系密切, 干预已迫在眉睫。

**[收稿日期]** 20110827(009)

**[基金项目]** 江苏省中西医结合优势学科

**[第一作者]** 吴慧平, 副教授, 硕士生导师, 从事中药对糖尿病前期干预研究, Tel:025-85811558, E-mail: wuhuiping625@sohu.com

**[通讯作者]** \*戴晓明, 教授, 硕士生导师, Tel:025-85811560, E-mail: jsnjdxm@163.com

糖尿病前期分类中的葡萄糖耐量缺损类型,其临床特征为餐后高血糖。餐后高血糖是引起血管等并发症的物质基础<sup>[2]</sup>。20 世纪 70 年代西药  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂的问世,降低了糖尿病的发病率和并发症<sup>[3]</sup>。

从中药资源中寻找符合我国国情的  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂,截止到 2009 年底,据不完全统计已发现近 120 多种中药有  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂作用。至此,笔者筛选切入是以《中药学》为蓝本<sup>[4]</sup>,在剔除上述中药、有毒中药和已报道的降糖中药后,用来源于 *Saccharomyces cerevisiae* 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,对近 70 味常用中药进行筛选后,对其中有高效  $\alpha$ -糖苷酶抑制的中药进行 10 多种组合,再筛,发现骨碎补与夜交藤组合物的提取物  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂作用很显著。

## 1 材料

**1.1 药材** 骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎。夜交藤为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥藤茎<sup>[5]</sup>。2010 年初购于江苏省中医院,由本校药学院陈建伟教授鉴定。

**1.2 试剂**  $\alpha$ -淀粉酶来源于 *Bacillus subtilis*, 50 U·mg<sup>-1</sup>, 进口分装, 由上海伯奥生物科技有限公司供应; 马来酸, 购于 Sigma 公司; 葡萄糖氧化酶、麦芽糖, 均为 Amresco 进口分装; 可溶性淀粉 (批号 F20030529), 3,5-二硝基水杨酸 (批号 F20050904), 均为中国医药上海化学公司出品, 重蒸酚 (批号 20101022), 为南京奥多福尼生物科技有限公司产品, 上述以及其他国产试剂, 均为分析纯; 拜唐苹, 拜耳医药保健有限公司 (成分: 阿卡波糖, 每片含 50 mg, 批号 122321)。

**1.3 仪器** PowerWave340 型酶标仪 (Bio-Tek 公司, 美国), FA2004N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), TCL-16M 型高速台式冷冻离心机 (湘仪离心机厂), FSH-II 型高速电动匀浆机 (江苏金坛振兴仪器厂), 电热三用水箱 (北京医疗设备厂), WH-1 微型旋转混合仪 (上海沪西分析仪器有限公司), pH-25 型雷磁数显 pH 计 (上海精密科学设备有限公司), EPED 超纯水器 (南京易普易达科技发展有限公司)。

**1.4 动物** ICR 小鼠, 清洁级, 18~20 g, 18 只雌雄各半, 购于南京医科大学实验动物中心, 许可证号 SCXK(苏)2008-0004。

## 2 方法

**2.1 组合物的提取物制备** 在骨碎补与夜交藤组

合物的水提取物制备中, 首先按骨碎补与夜交藤饮片 1:1 称重, 加 20 倍蒸馏水, 室温冷浸 2 h, 隔水煎煮 1 h, 过滤, 再加蒸馏水重复煎煮一次; 合并 2 次滤液, 冷却至室温后离心, 上清液加热浓缩; 其组合物的浸膏制备过程, 是向组合物的水提浓缩液中加入乙醇, 达其体积浓度 50%, 混匀, 4 °C 冰箱过夜后离心, 取上清液加热浓缩得浸膏; 其组合物的多糖制备, 是在上述醇沉离心得到的沉淀物中, 分别依次加入无水乙醇、丙酮、乙醚, 混匀, 离心, 得到的沉淀物经室温下挥干至粉末状为粗多糖。上述每步制备完成后, 均加蒸馏水定容至相当生药 0.5 g·mL<sup>-1</sup>, 置于 4 °C 保存<sup>[6]</sup>。

**2.2 抑制  $\alpha$ -淀粉酶活性微量测定** 对赵修南法<sup>[7]</sup>即 3,5-二硝基水杨酸方法 (3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric assays, Bernfeld method) 测定  $\alpha$ -淀粉酶活性进行改良, 设  $\alpha$ -淀粉酶管、骨碎补与夜交藤组合物的提取物管、拜唐苹阳性药对照管、空白对照管、组合物提取物空白对照管。在骨碎补与夜交藤组合物的提取物、拜唐苹阳性药对照的 AP 管内, 分别加入 5  $\mu$ L 相当生药 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 g·mL<sup>-1</sup> 组合物的提取物和 5 g·L<sup>-1</sup> 拜唐苹, 并与 20  $\mu$ L 由 12.2 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.0 磷酸缓冲液配制的 10 U·mL<sup>-1</sup>  $\alpha$ -淀粉酶, 混匀, 37 °C 水浴保温 10 min 后, 加入 20  $\mu$ L 由磷酸缓冲液和生理盐水配制的 1% 淀粉溶液, 混匀, 重新置于 37 °C 水浴保温 15 min, 然后再加入 50  $\mu$ L 3,5-二硝基水杨酸试剂, 混匀, 沸水浴内保温 10 min, 冷却, 加蒸馏水补足至 1 mL, 再分别取各管反应液 200  $\mu$ L 置于 96 孔板内, 于 546 nm 处检测吸光度 (A)。  $\alpha$ -淀粉酶管除不加药物、空白对照管不加酶液外, 均由蒸馏水补足体积, 其他操作同药物管。组合物的提取物空白对照管所加提取物浓度、量与组合物的提取物管平行, 其他操作同空白对照管。  $\alpha$ -淀粉酶抑制率计算公式如下:

$$\text{酶活性抑制率} = \frac{[(\alpha\text{-淀粉酶管 } A - \text{空白对照管 } A) - (\text{组合物的提取物管 } A - \text{组合物的提取物管空白对照管 } A)]}{(\alpha\text{-淀粉酶管 } A - \text{空白对照管 } A)} \times 100\%$$

**2.3 抑制正常 ICR 小鼠小肠  $\alpha$ -麦芽糖酶活性微量测定** 小鼠禁食 24 h 后, 颈椎脱臼处死, 立即取小肠上端 (约 10 cm), 用冷生理盐水冲洗数次, 称重, 剪碎, 加 5 倍 4 °C 预冷的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH 6.8 磷酸缓冲液, 冰浴、10 000 r·min<sup>-1</sup>, 匀浆, 4 °C、4 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 20 min, 取上清液分装, -20 °C 冷冻保存<sup>[8]</sup>; 并用双缩脲蛋白定量为 9.61 g·L<sup>-1</sup>。使用前上清液需由上述磷酸缓冲液等量稀释后, 用于组合

物的提取物浓度梯度对酶活性测定;对酶抑制种类和类型鉴别测定时,其上清液需以1:5磷酸缓冲液稀释后再用。

对文献[9]涉及的 $\alpha$ -麦芽糖酶测定方法,即葡萄糖氧化酶法(glucose oxidase, GOD)进行改良,实验孔别设置同2.2。在96孔板上,组合物的提取物孔、拜唐苹阳性药对照孔均加入1.5  $\mu\text{L}$  小肠匀浆,5  $\mu\text{L}$  组合物的提取物和拜唐苹,其浓度同2.2,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温10 min后,再分别加入5  $\mu\text{L}$  42  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  麦芽糖的马来酸缓冲液,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 温孵30 min后,加入5  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 终止反应。然后,分别在各孔反应液中加入酶酚试剂200  $\mu\text{L}$ ,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温15 min后,于波长505 nm处检测A。 $\alpha$ -麦芽糖酶孔除不加药物、空白对照孔内不加底物外,均由蒸馏水补足体积,其他操作同药物孔。组合物的提取物空白对照孔所加中药浓度、量与组合物的提取物孔平行,其他操作同空白对照孔。小肠 $\alpha$ -麦芽糖酶抑制率计算方法,同2.2。

**2.4 组合物的提取物对正常 ICR 小鼠小肠  $\alpha$ -麦芽糖酶抑制种类鉴别的测定** 中药孔取5  $\mu\text{L}$  相当生药0.025  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组合物的水提物和浸膏,分别加入到1,2,4  $\mu\text{L}$ ,1:5稀释的正常 ICR 小鼠小肠 $\alpha$ -麦芽

糖酶液,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温10 min后,再分别加入10  $\mu\text{L}$  的42  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  麦芽糖的马来酸缓冲液,其他操作同2.3; $\alpha$ -麦芽糖酶孔、空白对照孔、中药空白对照孔的操作,与2.3同。

**2.5 组合物的提取物对正常 ICR 小鼠小肠  $\alpha$ -麦芽糖酶可逆性抑制类型的测定** 5  $\mu\text{L}$  相当生药0.025  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组合物的水提物和浸膏,分别加入不同浓度(0.042,0.168,0.336,0.504  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的麦芽糖溶液,测定该酶活力,用Lineweaver-Burk 双倒数作图法,确立可逆性抑制类型。

### 3 结果

**3.1 组合物的提取物对  $\alpha$ -淀粉酶活性的影响** 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  拜唐苹阳性药对 $\alpha$ -淀粉酶抑制率为61.65%  $\pm$  2.35%,但从表1可见,骨碎补与夜交藤组合物的提取物对 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制作用均很低,其中粗多糖部分无抑制作用。

**3.2 组合物的提取物对  $\alpha$ -麦芽糖酶活性的抑制作用** 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  拜唐苹阳性药对 $\alpha$ -麦芽糖酶抑制率为96.91%  $\pm$  0.01%,骨碎补与夜交藤组合物的水提物和浸膏对正常 ICR 小鼠小肠 $\alpha$ -麦芽糖酶活性均有抑制作用,呈明显的量效关系,结果见表2。其粗多糖部分对该酶抑制作用较低。

表1 骨碎补与夜交藤组合物的提取物对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

剂量 / $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%		
	组合物水提物	组合物浸膏	组合物粗多糖
0.025	8.99 $\pm$ 0.94	5.75 $\pm$ 0.11	-4.12 $\pm$ 1.33
0.05	18.86 $\pm$ 7.16	17.72 $\pm$ 2.22	-7.3 $\pm$ 2.19
0.10	20.64 $\pm$ 1.26	21.17 $\pm$ 2.84	9.15 $\pm$ 0.18
0.15	25.01 $\pm$ 0.72	27.67 $\pm$ 2.13	1.96 $\pm$ 1.21
0.20	25.14 $\pm$ 3.05	29.51 $\pm$ 3.46	-4.73 $\pm$ 1.32

表2 骨碎补与夜交藤组合物的提取物对 $\alpha$ -麦芽糖酶活性的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

剂量 / $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%		
	组合物水提物	组合物浸膏	组合物粗多糖
0.025	49.51 $\pm$ 10.83	58.04 $\pm$ 2.71	16.42 $\pm$ 1.75
0.05	68.05 $\pm$ 2.95	69.49 $\pm$ 0.91	16.96 $\pm$ 4.73
0.10	78.45 $\pm$ 1.17	84.85 $\pm$ 0.37	18.31 $\pm$ 1.49
0.15	89.34 $\pm$ 3.26	91.99 $\pm$ 1.48	26.33 $\pm$ 1.57
0.20	96.69 $\pm$ 4.43	99.09 $\pm$ 0.18	27.18 $\pm$ 4.41

**3.3 组合物的提取物对  $\alpha$ -麦芽糖酶的抑制种类鉴定分析** 由图1可知,以不同酶量反应的初速度,对酶量作图得到一组通过原点的直线,并且在测酶活体系中加入其组合物的水提物和浸膏后,直线通过

原点斜率下降,这说明其组合物的水提物和浸膏对正常 ICR 小鼠小肠 $\alpha$ -麦芽糖酶的抑制作用属于可逆过程。

**3.4 组合物的提取物对  $\alpha$ -麦芽糖酶可逆性抑制类**

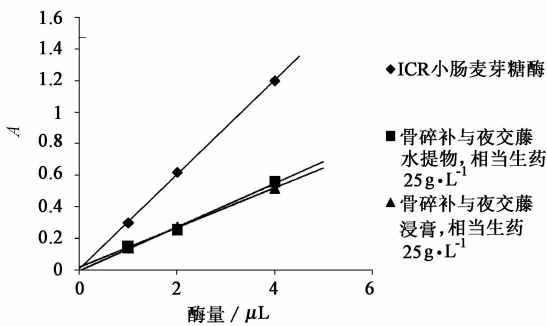


图 1 骨碎补与夜交藤组合物的提取物  
对小肠  $\alpha$ -麦芽糖酶的可逆性抑制

型分析 按 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,以  $1/A$  即  $(1/V)$  为纵坐标,  $1/[S]$  为横坐标。如图 2 所示,无抑制剂存在时和加入一定量的骨碎补与夜交藤组合物的水提物和浸膏后,得到的三条双倒数直线相交于第二象限,横轴截距和纵轴截距都因加入其组合物的水提物和浸膏而改变,  $K_m$  增大,  $V_{max}$  下降,从该酶的可逆性抑制动力学特征可知<sup>[10]</sup>,为混合性抑制类型。

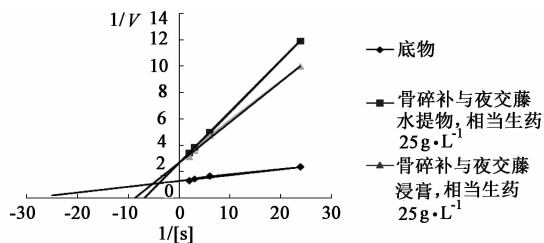


图 2 骨碎补与夜交藤组合物的提取物  
对小肠  $\alpha$ -麦芽糖酶的混合性抑制类型

#### 4 讨论

基于  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂的药理是通过延缓碳水化合物在小肠上部的吸收,而降低餐后血糖。适用于以碳水化合物为主要食物成分和餐后血糖升高的患者<sup>[11]</sup>。因此,从中药资源中筛选高效的  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂,符合从国人饮食结构习惯,来干预葡萄糖耐量缺损。

本研究中发现骨碎补与夜交藤组合物的水提物和浸膏对  $\alpha$ -糖苷酶主要的抑制靶点在小鼠肠源型  $\alpha$ -麦芽糖酶,与阳性药  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂——拜唐苹的作用一致,与骨碎补单味药相应提取部位的作用一致。骨碎补与夜交藤组合物的水提物和浸膏对该酶抑制程度,与其浓度呈正相关,抑制类型为可逆性、混合性抑制。骨碎补单味药也有类似作用,笔者已另文报道<sup>[12]</sup>。

本研究中骨碎补与夜交藤组合物,其生药比为 1:1,其用量是骨碎补单味药用量的 1/2。根据中医药基础理论,认为骨碎补具有补肾助阳,强骨,续伤

镇痛,温脾止泻功效。在本方中抑制  $\alpha$ -糖苷酶的作用,可能通过补肾温脾,调节脾运化水谷,化生气血,降低餐后高血糖,干预葡萄糖耐量缺损。夜交藤有养心安神,祛风,通络的功效。与骨碎补配伍,不仅用量比单味药少一半,亦达到对  $\alpha$ -糖苷酶抑制的同样效果,还能调和阴阳,然不寐之源,其行经络,通血脉,可能对“糖毒”引起的神经系统和心血管并发症起到防治作用。采用此组合物进行研究,已起到对  $\alpha$ -糖苷酶抑制的协同效应。

骨碎补单味药,骨碎补与夜交藤组合物的提取物对  $\alpha$ -糖苷酶抑制作用均为首次发现,已做专利申请,其申请号 201010219915.3<sup>[6]</sup>。同时,其提取物还兼有抑制黄嘌呤氧化酶的作用,笔者将另文报道。本项研究将为骨碎补与夜交藤组合物,体内干预葡萄糖耐量缺损提供重要的依据。

#### [参考文献]

- [1] Wenyang Yang, Juming Lu, Jianping Weng, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med, 2010, 362(12):1090.
- [2] Ceriello A, Colagiuri S. International Diabetes Federation guideline for management of postmeal glucose: a review of recommendations [J]. Diabet Med, 2008, 25(10):1151.
- [3] 吴文炎. 糖尿病前期的转归、危害及干预策略 [J]. 中华全科医学, 2010, 8(1):88.
- [4] 成都中医学院. 中药学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1978:225.
- [5] 中国药典. 一部 [S]. 2010:239, 248.
- [6] 吴慧平, 席昱, 陈美娟, 等. 具有抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和黄嘌呤氧化酶作用的中药提取物及制法和用途 [P]. CN: 201010219915.3.
- [7] 赵修南, 贾启燕, 单俊杰.  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂筛选方法的优化 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(5):321.
- [8] 刘志峰, 李萍, 李慎军, 等. 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.
- [9] 戴岳, 夏玉凤, 林巴茏. 地肤子正丁醇部分降糖机制的研究 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19(5):21.
- [10] 袁勤生. 现代酶学 [M]. 上海:华东理工大学出版社, 2007:38.
- [11] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南. 2010 版 [EB]. 丁香园论坛 (转载), 2011:3.
- [12] 席昱, 许婷婷, 吴慧平. 骨碎补对  $\alpha$ -糖苷酶活性的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6):617.

[责任编辑 聂淑琴]