

# Radicamine B 体外抑制小肠葡萄糖的吸收作用

孟爱国<sup>1</sup>, 刘春艳<sup>2\*</sup>, 马红翠<sup>2</sup>

(1. 河北联合大学附属医院, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学药学院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的: 探讨 radicamine B 对大鼠体外小肠葡萄糖吸收的影响。方法: 采用  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制实验及酶抑制动力学实验和离体大鼠小肠葡萄糖吸收模型来研究 radicamine B 的抑制作用。结果: radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和大鼠体外小肠葡萄糖的吸收均呈剂量依赖性抑制作用, 其  $IC_{50}$  分别为 2.19, 0.094  $g \cdot L^{-1}$ , 与拜糖平相比较无显著性差异。而且 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性属于竞争性抑制,  $K_i = 6.3 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$ 。结论: radicamine B 能显著抑制小肠葡萄糖的吸收, 有望成为一种治疗糖尿病的药物。

**[关键词]** radicamine B;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂; 抑制作用; 拜糖平; 葡萄糖吸收

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0217-04

## Radicamine B Inhibits Glucose Absorption in Rat Intestines *in vitro*

MENG Ai-guo<sup>1</sup>, LIU Chun-yan<sup>2\*</sup>, MA Hong-cui<sup>2</sup>

(1. Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan 063000, China;  
2. Department of Pharmacy, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect of radicamine B on glucose absorption in rat intestines *in vitro*. **Method:** The inhibitory effect of radicamine B was evaluated by  $\alpha$ -glucosidase inhibitory test, inhibitory kinetics assay and assay of glucose absorption in rat intestines *in vitro*. **Result:** Radicamine B showed an inhibitory effect on both  $\alpha$ -glucosidase and glucose's absorption in the small intestine in a dose-dependent manner and the  $IC_{50}$  value were 2.19  $g \cdot L^{-1}$  and 0.094  $g \cdot L^{-1}$ , respectively. No significant difference was found between acarbose and radicamine B in the inhibitory effect on intestinal glucose absorption. In addition, the inhibitory pattern of radicamine B was competitive enzyme inhibition with its  $K_i$  of  $6.3 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$ . **Conclusion:** Radicamine B significantly inhibites glucose absorption in the small intestine. It indicates that radicamine B might be a novel therapeutic drug for diabetes.

**[收稿日期]** 20110406(013)

**[基金项目]** 河北省自然科学基金——青年基金(C2010001761)

**[第一作者]** 孟爱国, 博士, Tel:0315-3725732

**[通讯作者]** \* 刘春艳, 博士, 副教授, Tel:0315-3725706

炎症反应治疗作用的临床研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(10): 584.

[9] 李志军, 李银平, 王今达. 肺与大肠相表里学说与多器官功能障碍综合征[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(3): 131.

[10] 王今达. 开展中西医结合治疗急性危重病的思路和方法[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(6): 323.

[11] 王今达, 高天元, 崔乃杰, 等. 祖国医学“肺与大肠相

表里”学说的临床意义及本质探讨[J]. 中西医结合杂志, 1982, 2(2): 77.

[12] 雷澍, 方强, 张勤. 大黄蒽醌衍生物对大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(6): 370.

[13] 邓时贵, 巫莉萍, 黄海定. AQP<sub>1</sub>, AQP<sub>5</sub>, mRNA 表达与肺卫失宣肺损伤的相关性及大黄的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 177.

[责任编辑 何伟]

[Key words] radicamine B;  $\alpha$ -glucosidase inhibitor; inhibitory effect; acarbose; glucose absorption

随着糖尿病患病人数大量增加,糖尿病的治疗已经成为全球性的卫生健康问题。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶是一类具有糖结构的新型抗糖尿病药物,已经被广泛用于临床,例如阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇<sup>[1-2]</sup>。这类药物可以明显降低 2 型糖尿病患者餐后血糖水平,减少糖尿病并发症的发生。radicamine B 是从半边莲中分离到的吡咯烷型生物碱(图 1),对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有显著抑制作用<sup>[3]</sup>。本课题组首先纠正了 radicamine B 的构型,确定其为 (2R,3R,4R,5R)<sup>[4]</sup>,然后以 D-阿拉伯糖为原料,完成了 radicamine B 的全合成<sup>[5]</sup>。本文以拜糖平为阳性对照品,通过  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制模型<sup>[6]</sup>和离体大鼠小肠葡萄糖吸收模型<sup>[7]</sup>对 radicamine B 抑制小肠葡萄糖吸收作用进行体外研究,为进一步研究体内降糖作用奠定基础。

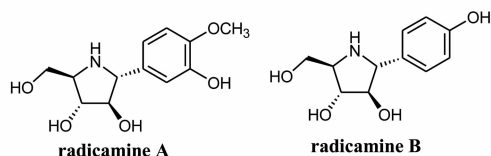


图 1 radicamines A and B

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** radicamine B(课题组制备,含量 98.5% 以上), $\alpha$ -葡萄糖苷酶(美国 Sigma 公司),4-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(美国 Sigma 公司),拜糖平(唐山市医药公司),其余试剂均为国产分析纯试剂,GLu 血糖试剂盒(上海中西生化试剂有限公司)。

**1.2 动物** Wister 大鼠中国医科大学动物中心提供,合格证号 SCXK(辽)2008-0011,二级;大鼠离体肠营养液选用 Kreb's 缓冲液配制而成,pH 7.4。

**1.3 仪器** Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo Electron 公司)。

## 2 方法

### 2.1 radicamine B 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用

**2.1.1  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制模型的建立** 根据 Tremblay 等<sup>[5]</sup>的方法测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,即以 4-硝基苯葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, PNPG)为底物,0.1 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液为终止液,于 400 nm 处比色测定。其中酶活力单位定义为:在 37 °C, pH 6.8 的条件下,1 min 内水

解 PNPG 释放 1 mol·L<sup>-1</sup> 所需的酶量。抑制剂活力单位定义为:在相同的条件下降低 1 个酶活力单位所需的抑制剂量。

**2.1.2 不同浓度的 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用** 取 5mg·L<sup>-1</sup> 的拜糖平或 0,0.5,1,2,4,6,8 mg·L<sup>-1</sup> 的 radicamine B,测定其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性,平行试验 3 次。根据抑制率计算 radicamine B 半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>。

$$\text{抑制率} = (\text{抑制剂活力} / \text{酶活力}) \times 100\%$$

**2.1.3 不同作用时间的 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用** 取 2 mg·L<sup>-1</sup> 的 radicamine B,在 37 °C 分别保温 2,5,8,15,20,30,40 min 后测定其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性,平行试验 3 次。

**2.1.4 不同温度的 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用** 取 2 mg·L<sup>-1</sup> 的 radicamine B,分别在 20,30,40,50,60,70,80 °C 保温 30 min 后测定其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性,平行试验 3 次。

**2.1.5 抑制作用类型的确定** 在一定抑制剂浓度条件下,分别加入不同浓度(1,2,4,6,8 g·L<sup>-1</sup>)的底物,测定酶活力;改变抑制剂浓度(分别为 0,1,2,4 mg·L<sup>-1</sup>),可得到一系列不同底物浓度条件下的酶活力。按 Lineweave-Burk 作图确定抑制类型和抑制常数,计算 Ki 常数。

### 2.2 radicamine B 对小肠葡萄糖吸收的抑制作用

**2.2.1 翻转离体小肠囊腔的制作** 参照文献[6]方法,实验大鼠禁食不禁水 24 h,处死,剖开腹腔,在十二指肠上端切开取出整段小肠,剪去约 10 cm 左右的十二指肠部分,余下肠段用 37 °C 的生理盐水冲洗内容物,小心地剥离肠系膜和脂肪,不能损伤肠壁,然后用 37 °C 的大鼠离体肠营养液洗干净后剪成 6 cm 等长的肠段。肠段一端结扎后,用灌胃针将肠段翻转使其黏膜面朝外,注入 1 mL 营养液后结扎另一端即可。

**2.2.2 反应体系的优化** 实验前分别对蔗糖的浓度、作用时间和阳性对照品拜糖平的浓度等条件进行筛选:蔗糖最适浓度为 0.8 mol·L<sup>-1</sup>,反应最佳时间为 90 min,对照品拜糖平最佳浓度为 0.5 g·L<sup>-1</sup>。

**2.2.3 方法的建立** 取实验大鼠 8 只,雌雄各半,随机分为 radicamine B 的 6 个剂量组(设组名为 A1 ~ A6),拜糖平对照组,阴性对照组和空白组,制

备离体小肠外翻肠囊,每组  $n = 4$ 。按 2.2.1 所述方法制备大鼠肠囊,将各段肠囊分别放入等量的大鼠离体肠营养液中,加入蔗糖及拜糖平或 radicamine B,37 °C 震荡水浴 90 min,取出肠囊内液体,用葡萄糖试剂盒在 490 nm 波长测吸光度( $A$ ),计算药物对小肠葡萄糖吸收的抑制率,并根据抑制率计算 radicamine B 半数抑制浓度  $IC_{50}$ 。

**2.3 数据处理** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,本实验应用 SPSS 软件对数据进行系统分析,各浓度药物组与空白组、阴性对照组、阳性对照组的比较采用配对  $t$  检验, $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 radicamine B 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用

**3.1.1 不同浓度的 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用** 随着浓度的增加,radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率增强,且呈剂量依赖性,其半数抑制浓度  $IC_{50}$  2.19  $mg \cdot L^{-1}$ 。 $t$  检验显示,当浓度增加到 1  $mg \cdot L^{-1}$  时,radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有明显的抑制作用;当浓度超过 2  $mg \cdot L^{-1}$  时,抑制作用非常显著( $n = 4$ )。而且,在浓度相似的情况下,radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率与阳性对照拜糖平(5  $mg \cdot L^{-1}$  拜糖平抑制率为  $69.2\% \pm 4\%$ )相比较无显著性差别(见图 2)。

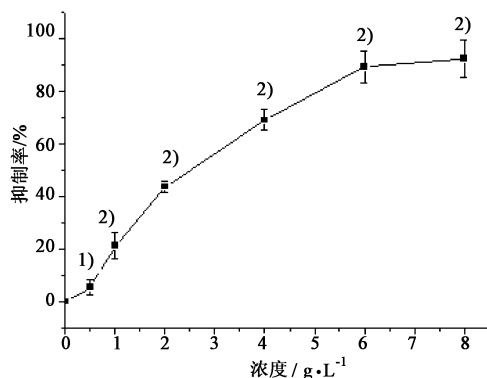
**3.1.2 不同作用时间的 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用** radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶作用 5 min 后,其抑制率几乎达到了 80%,10 min 后接近了 100% ( $n = 4$ ),说明 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶作用迅速,有较高的亲和性。

**3.1.3 不同温度的 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用** 在 20 ~ 80 °C 相同浓度下的 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性不随温度的变化而发生明显改变,抑制率几乎接近 100% ( $n = 4$ ),说明温度对该化合物活性无明显影响。

**3.1.4 抑制作用类型的确定** 按照 Lineweave-Burk 作图,绘制 radicamine B 的抑制作用动力学曲线(图 3),可知 radicamine B 是一种竞争性抑制剂。按图可求出  $\alpha$ -葡萄糖苷酶蔗糖底物的米氏常数  $K_m = 4.7 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$  ( $n = 4$ ),与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂 radicamine B 抑制能力有关的常数  $K_i = 6.3 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$ 。

#### 3.2 radicamine B 对小肠葡萄糖吸收的抑制作用

不同浓度 radicamine B 对离体大鼠小肠葡萄糖吸收的抑制作用呈剂量依赖性增强,其半数抑制浓度



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (图 4 同)

图 2 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用

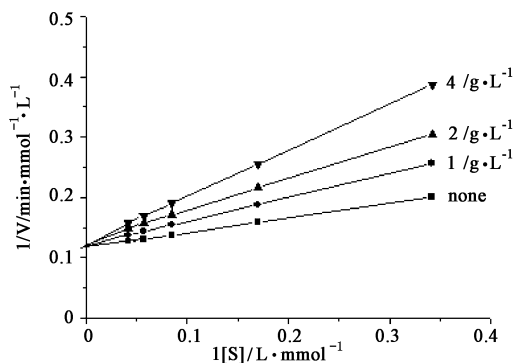


图 3 radicamine B Lineweave-Burk 的双倒数图

$IC_{50}$  0.094  $g \cdot L^{-1}$ 。 $t$  检验显示,当浓度达到 0.05  $g \cdot L^{-1}$  时,对小肠葡萄糖吸收的抑制作用明显;当浓度超过 0.1  $g \cdot L^{-1}$  时,抑制作用非常显著。我们还发现,在浓度相似的情况下 radicamine B 与阳性对照拜糖平(浓度 0.5  $g \cdot L^{-1}$  的拜糖平抑制率为  $90.2\% \pm 9\%$ ,平行试验 3 次)对小肠葡萄糖吸收的抑制作用无显著性差异(图 4)。

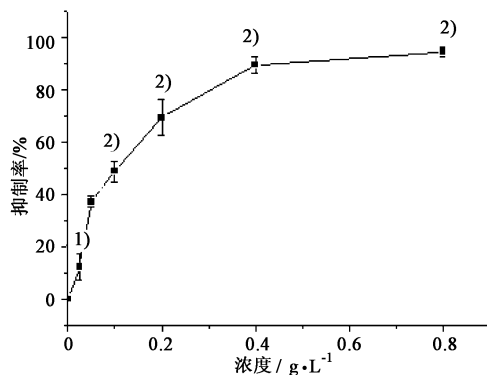


图 4 radicamine B 对小肠葡萄糖吸收的影响

### 4 讨论

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是一类新型的降血糖药物,通过抑制人小肠刷状缘细胞表面的  $\alpha$ -葡萄糖苷

酶活性,减缓葡萄糖的生成及吸收,同时增加肝脏及周围组织对胰岛素的敏感性,减少胰腺刺激的作用,来实现降糖及治疗糖尿病的目的<sup>[8]</sup>。本文通过  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制模型和离体大鼠小肠葡萄糖吸收模型,以临床一线用药拜糖平为阳性对照品,发现了天然产物 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有明显的抑制作用,与 Kusano 等报道的相一致<sup>[1]</sup>,且对小肠葡萄糖吸收有明显的抑制作用。我们还发现 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用呈剂量依赖性,其  $IC_{50}$  为  $2.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;而且 radicamine B 呈剂量依赖性抑制小肠对葡萄糖的吸收,其  $IC_{50}$  为  $0.094 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,两者均与拜糖平无显著性差异。

抑制动力学实验发现 radicamine B 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性属于竞争性抑制,  $K_i = 6.3 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显示 radicamine B 是竞争性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,抑制常数  $K_i$  较小,说明其抑制作用较大。综合以上实验结果,提示 radicamine B 可能是通过竞争性抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性来实现其抑制小肠葡萄糖吸收的,达到有效降糖作用,其作用机制与拜糖平相似,有关体内降糖活性试验正在进行中。

#### [参考文献]

[1] Tomohiro I, Nobuyuki K, Yuko K, et al. Suppressive Effect of a hot water extract of Adzuki Beans (*Vigna angularis*) on Hyperglycemia after Sucrose Loading in

Mice and Diabetic Rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(12): 2421.

- [2] Levettan C. Oral antidiabetic agents in type 2 diabetes [J]. *Curr Med Res Opin*, 2007, 23(4): 945.
- [3] Shibano M, Tsukamoto D, Masuda A, et al. Two New Pyrrolidine Alkaloids, Radicamines A and B, as Inhibitors of  $\alpha$ -Glucosidase from *Lobelia chinensis* LOUR [J], *Chem. Pharm. Bull.* 2001, 49(10):1362.
- [4] Liu C Y, Gao J C, Yang G, et al. Enantiospecific synthesis of (-)-radicamine B [J]. *Lett Org Chem*, 2007, 4(12): 556.
- [5] 刘春艳,孟爱国.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂 Radicamine B 的合成[J]. *合成化学*, 2010, 2010,18(4):462.
- [6] Chapdelaine P, Tremblay R R, Dubé J Y. P-Nitrophenol-alpha-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen [J]. *Clin Chem*, 1978, 24(2): 208.
- [7] Raeusen L C M D, Binder H J M D. Alteration of large intestinal electrolyte transport by vasoactive intestinal polypeptide in the rat [J]. *Gastroenterology*, 1977, 73(4): 790.
- [8] Horii S, Fukase H. Synthesis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of N-substituted valioli mine derivatives as potential oral antidiabetic agents [J]. *The Journal of Medical Chemistry*, 1986, 29: 1038.

[责任编辑 聂淑琴]