

滇结香花对 α 葡萄糖苷酶的抑制活性

耿燕, 阳红梅, 许泓瑜, 史劲松*

(江南大学药学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 对产于西藏的滇结香花选取极性大小不同的正己烷、石油醚、乙酸乙酯、甲醇、水依次进行提取; 建立体外 α 葡萄糖苷酶抑制模型, 对提取物进行活性评价; 选择活性较高的组分进行小鼠急性毒性及对高血糖模型小鼠降糖作用评价。结果显示, 滇结香花水提取物 (EMW, 1 000 mg/kg) 对酵母和大鼠来源的 α -葡萄糖苷酶均具有较好的体外抑制活性, 活性高于阳性对照阿卡波糖。EMW 并未发现明显的毒副作用, EMW 中高剂量 (每千克体重用药量) 200 mg/kg 和 300 mg/kg 给药对小鼠高血糖模型具有良好的降血糖作用。研究表明, EMW 具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制及体内降糖活性。

关键词: 滇结香; α -葡萄糖苷酶; 急性毒性实验; 降血糖

中图分类号: R 284 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)09—0967—05

α -Glucosidase Inhibitory Activity of the Alabastrum of *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meissn

GENG Yan, YANG Hong-mei, XU Hong-yu, SHI Jin-song*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Jiangsu Wuxi 214122, China)

Abstract: *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meissn, a medicinal herb endemic to the Tibetan region, is used to treat Diabetes. The aim of this study is to identify the active ingredients of different extracts from the alabastrum of *E. gardneri* by the yeast and the rat intestinal α -glucosidase inhibitory assay. The alabastrum of *E. gardneri* was partitioned sequentially with n-hexane, petroleum ether, ethyl acetate, methanol, and water. Its α -glucosidase inhibitory activity was assayed by the method of 96-microplates. Acute toxicity study of active components for inhibition of α -glucosidase was carried out in Kunming mice of both sexes. A mouse model of diabetic disease induced by alloxan was used to evaluation of hypoglycemic activity. The results showed that yeast α -glucosidase inhibitory activity of petroleum ether extracts, ethyl acetate extracts, methanol extracts and water extracts were higher than that of positive control Acarbose, but only water extracts of *E. gardneri* (EMW, 1 000 mg/kg) had the rat intestinal α -glucosidase inhibitory activity. EMW treatment was not acutely toxic to the mice. EMW at doses of 200 mg/kg and 300 mg/kg

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201020); 江苏省自然科学基金项目 (BK2010142)。

作者简介: 耿燕 (1984—), 女, 理学博士, 副教授, 主要从事天然药物筛选及分子机制研究。E-mail: gengyanjnu@163.com

* 通信作者: 史劲松 (1971—), 江苏泗阳人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物活性物质的制备、分离和衍生开发。

E-mail: shijs@163.com

significantly decreased blood glucose in diabetic mice. The results indicate that EMW has a better yeast and rat intestinal α -glucosidase inhibitory activity in vitro and possesses antihyperglycaemic effect significantly in vivo.

Keywords: *Edgeworthia Meissn*, α -glucosidase, acute toxicity studies, antihyperglycaemic effect

滇结香 (*Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meissn) 主要产于西藏和云南地区^[1-2], 其俗名为西藏绿萝花, 据《藏医养身图说》, 主治糖尿病、冠心病、高血压、高血脂、血管炎及脉管炎等。结香花 (*Edgeworthia chrysantha*) 常作为密蒙花 (*Buddliga officinalis*) 的伪品进行销售^[3-4]。而绿萝花为天南星科 (Araceae) 植物, 与结香在外形上差异很多, 二者混淆的原因可能在于“萝(梦)花”与“萝花”的误读和误解^[5]。目前, 据国内外文献报道, 已从结香中分离出的化合物主要有香豆素类、黄酮类、甾类、有机酸及含氮化合物等, 具有抗菌、消炎和镇痛的作用^[1-2]。西藏当地居民将滇结香花通过泡水饮用的方式来治疗糖尿病等慢性疾病, 但未探明作用机理。有文献报道, 结香中的瑞香黄烷素能抑制肠道上皮的 α 葡萄糖苷酶活性^[6], 抑制小肠 α 葡萄糖苷酶活性是药物降血糖机理之一^[7-9], 故拟通过研究西藏产滇结香花提取物对 α 葡萄糖苷酶活性的影响来探寻其活性物质。滇结香花在民间有广泛的用途, 但笔者未见对其安全性评价的资料, 作者通过对其活性较好的组分进行体内急毒评价, 并在小鼠高血糖模型基础上研究其降糖活性, 为深入开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

滇结香 (西藏绿萝花), 由西藏月王生物科技有限公司提供; 经鉴定为滇结香, 为瑞香科, 结香属植物, 标本保藏于中国科学院昆明植物研究所植物标本室。阿卡波糖, 购自德国拜耳公司; α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase, EC 3.2.1.20)、4-硝基苯 a-D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG), 购自 sigma 公司; 谷丙转氨酶试剂盒及谷草转氨酶试剂盒, 购自南京建成科技有限公司; 其余试剂为分析纯, 购自国药集团化学有限公司。

1.2 实验动物

6~8 周昆明小鼠, 购自上海斯莱克动物实验中心 (合格证号: SCXK (沪) 2003-0003); 健康雄性 SD

(Sprague Dawley) 大鼠, 体重 200~240 g, 3 月龄, 购自上海斯莱克动物实验中心 (合格证号: SCXK (沪) 2007-0005)。

1.3 仪器

EL204 型电子天平, 博特勒托利多公司制造; UV-2100 型紫外分光光度计, 上海 UNICO 仪器有限公司制造; GZX-9070MBE 数显鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂制造; RE-52A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器有限公司制; 恒温水浴循环锅, 美国 POLYSCIENCE 制; SpectrAA 220 型原子吸收分光光度计, Varian 公司制; UV1800 型紫外分光光度计, 上海美诺达科技有限公司制; Triad 冷冻干燥仪, 美国 Labeonco 公司制; MULTISKAN ASCENT 酶标仪, 赛默飞世尔仪器有限公司制。

2 方法

2.1 α -葡萄糖苷酶体外抑制实验

分别选用 Sigma 公司的酵母源 α -葡萄糖苷酶及自提的大鼠 α -葡萄糖苷酶, 提取方法参考文献 [10]。对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的具体实验方法及数据处理见文献 [11]。

2.2 小鼠急性毒性实验

选取正常昆明小鼠, 随机分为 4 个剂量组 ($n=10$), 雌雄各半, 共 8 组, 灌胃给药: 正常对照组; 滇结香水提物 (EMW) 给药组 (1 000、2 500、5 000 mg/kg)。观察 14 d 后, 通过摘眼球的方式采取动物的血液, 静置 3~4 h, 血液分层后, 2500 r/min 离心 40 min, 取上清液, 以备血清生化学指标检测, 然后将各组动物处死, 摘取小鼠肝脏等器官, 冲洗干净并称重。血清中谷草转氨酶与谷丙转氨酶的测定按试剂盒说明。动物颈椎脱臼处死, 观察心、肝、肾、肺、脾、脑、胃等器官的体积、颜色、质地及质量等的改变, 计算器官指数。器官指数=器官质量/小鼠体质量。

2.3 高血糖模型的建立

90 只 4 周龄雄性昆明小鼠禁食 12 h 后剪尾取血, 用 Free-style 血糖试纸测定基础血糖水平, 随机

分为正常对照组(10只)和模型组(80只)。模型对照组根据体重左下腹腔注射 ALX 150 mg/kg, 正常对照组注射生理盐水,观察 3 d。在给药第 4 天后血糖上升到(7.5±1.237) mmol/L,再次注射 50 mg/(kg·d),测定空腹血糖水平,第 7 天测定其血糖,血糖水平 \geq 11.1 mmol/L 确定为高血糖模型。建模成功率为 70%。将建好的糖尿病动物模型随机分为 EMW 高剂量组(300 mg/kg)、EMW 中剂量组(200 mg/kg)、EMW 低剂量组(100 mg/kg)、阿卡波糖对照组(20 mg/kg)、生理盐水对照组。实验期间观察小鼠皮毛、进食、饮水、尿量、体重等生理情况。给药后 0、0.5、1、2、3、4、5、6 h 采集血样,血糖仪测定血糖值。计算给药后不同时间的血糖质量分数,即

$$w = \frac{\text{给药后 } t \text{ 时刻血糖值}}{\text{给药后 } 0 \text{ h 血糖值}} \times 100\%$$

各组分给药后 0 h 血糖质量分数为 100%。

2.4 数据统计

根据 One-Way ANOVA 统计学处理实验结果,结果用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)标示,显著水平为 $p < 0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 滇结香花活性物质的粗提

称取 150 g 滇结香花,按溶剂的极性大小不同,选择正己烷、石油醚、乙酸乙酯、甲醇、水 1 500 mL 依次提取 2 h,每种溶剂提 3 次,合并提取液,抽滤掉滇结香花渣滓,滤液旋转蒸发浓缩至适宜体积。浓缩后有机溶剂粗提物用离心浓缩仪离心浓缩至粉末,水粗提物用冻干机冻干至粉末,备用。滇结香花的正己烷提取率为 7.34%、石油醚提取率为 14.13%、乙酸乙酯提取率为 8.74%、甲醇提取率为 11.08%、水提取率为 12.24%。

3.2 滇结香花各溶剂粗提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的初步研究

分别测定滇结香花的 5 种提取物和阳性对照阿卡波糖在相同系列质量浓度下(1 000 mg/kg、1 500 mg/kg、2 000 mg/kg) 其对酵母源与大鼠源 α 葡萄糖苷酶的抑制活性。表 1 显示各粗提取物在不同筛选浓度下,抑制效果变化不大,除正己烷提取物外,质量浓度 1 000 mg/kg 时,其它 5 种提取物对酵母来源 α 葡萄糖苷酶的抑制活性均高于阳性对照药阿卡波糖((30.67 \pm 1.32)%),且存在显著差异($p <$

0.05 或 $p < 0.01$)。而对大鼠源 α 葡萄糖苷酶,仅有水提物的抑制活性((34.20 \pm 1.36)%)高于阿卡波糖((28.80 \pm 1.78)%),且存在显著差异($p < 0.05$)。表明仅有 EMW 质量浓度 1 000 mg/kg 时具有较好的酵母源和大鼠源 α 葡萄糖苷酶抑制活性。有文献报道,酵母来源 α 葡萄糖苷酶体外抑制实验存在一定的假阳性情况^[8-9],应优先考虑采用动物来源的 α 葡萄糖苷酶,综合考虑,滇结香花水提取物体外抑制活性最好。

表 1 滇结香花提取物对酵母和大鼠来源 α -葡萄糖苷酶的体外抑制活性

Table 1 Yeast and rat intestinal α -glucosidase inhibitory activity of different extracts from *E.gardneri* in vitro

抑制剂	提取溶剂	筛选浓度/(mg/kg)	抑制率/%	
			酵母源	大鼠源
滇结香花	正己烷	1 000	24.40 \pm 1.81	13.96 \pm 0.98
	石油醚	1 000	50.12 \pm 3.52*	22.08 \pm 0.45
	乙酸乙酯	1 000	76.34 \pm 4.23**	12.31 \pm 0.89
	甲醇	1 000	45.96 \pm 2.25*	8.61 \pm 0.05
	水	1 000	78.57 \pm 5.01**	34.20 \pm 1.36*
阿卡波糖		1 000	30.67 \pm 1.32	28.80 \pm 1.78
滇结香花	正己烷	1 500	29.03 \pm 1.43	14.43 \pm 0.54**
	石油醚	1 500	NT	NT
	乙酸乙酯	1 500	71.09 \pm 4.75**	12.63 \pm 0.45**
	甲醇	1 500	56.06 \pm 2.67	10.75 \pm 0.62**
	水	1 500	77.92 \pm 5.34**	35.44 \pm 6.54
阿卡波糖		1 500	50.06 \pm 3.42	53.14 \pm 4.97
滇结香花	正己烷	2 000	31.77 \pm 2.48**	16.13 \pm 0.43**
	石油醚	2 000	NT	NT
	乙酸乙酯	2 000	NT	NT
	甲醇	2 000	64.60 \pm 5.37	9.87 \pm 0.63**
	水	2 000	77.56 \pm 6.81	45.95 \pm 2.56**
阿卡波糖		2 000	76.54 \pm 5.32	70.10 \pm 6.49

注:与对照组阿卡波糖相比较,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。NT 为未测定。

3.3 滇结香花水粗提取物急性毒性作用初步研究

选择有较明显抑制 α -葡萄糖苷酶活性的水提物进行急性毒性初探。经预试,无法做出 LD50,滇结香花水提取物致死量大于 5 000 mg/kg,毒性较

低。不同滇结香水提物给药组(1 000、2 500、5 000 mg/kg)一次给药观察 14 d 期间小鼠的死亡率为 0。小鼠饮食、饮水、体重、皮毛与正常组比较,没有统计学差异。其谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)的活性与正常组比较(图 1),没有显著差别。心、肝、肾、肺、脾、脑、胃等器官指数显示(表 2-3),滇结香花水提物无明显的器官毒副作用。

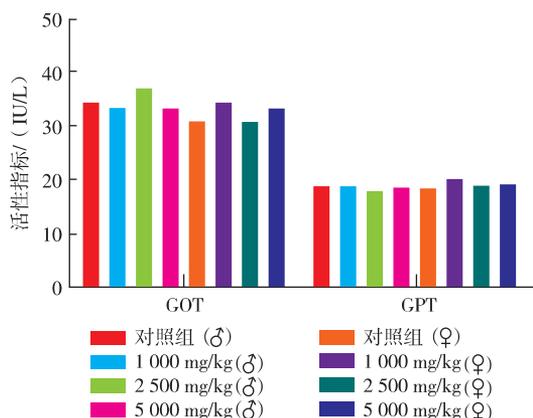


图 1 滇结香花水提物一次灌胃 14 d 后对小鼠 GOT 和 GPT 的影响

Fig. 1 Effect of oral administration of EMW once on the activity of GOT and GPT in mice after 14 days

表 2 雄性小鼠一次灌胃滇结香花水提物 14 d 后其器官指数 (mean±SD, n=10)

Tab. 2 Organ index of oral administration of EMW once in male mice after 14 days (mean±SD, n=10)

器官	对照组	1 000 mg/kg	2 500 mg/kg	5 000 mg/kg
心	5.46±0.71	5.79±0.43	5.00±0.99	4.89±0.26*
肝	38.21±1.41	38.66±1.92	40.47±1.77	39.21±1.79
肾	13.67±0.76	13.50±1.28	14.17±0.74	13.72±0.65
肺	5.16±0.62	5.40±0.45	4.89±0.25	5.18±0.68
脾	2.13±0.13	2.30±0.35	2.18±0.42	2.21±0.46
脑	9.6±0.49	9.81±0.58	9.33±1.15	9.13±1.04
胃	7.14±0.73	7.12±0.52	7.19±1.03	7.12±0.80

3.4 滇结香花水提物对高血糖模型组小鼠的影响

滇结香花水提物在体外有较高的 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用且无明显毒副作用,进一步在动物整体水平考察其降血糖的活性。如图 2 所示,阿卡波糖给药 0.5 h 后即可下调高血糖模型小鼠血糖水平,给药 1~3 h 血糖下降幅度最大,与对照组相比存在显著差异 ($p<0.05$),给药 4 h 后血糖回升至 0 h 浓度。EMW 高中低剂量给药在 1 h 后都可下调小鼠

血糖水平,但低剂量(100 mg/kg)给药 3 h 后血糖回升至原来浓度。EMW 中剂量给药(200 mg/kg)3 h 后小鼠血糖下降幅度最大,2~4 h 小鼠血糖质量比数对照组相比存在显著差异($p<0.05$),5 h 后血糖回升至 0 h 浓度。EMW 高剂量给药(300 mg/kg)4 h 后血糖下降幅度最大,2~5 h 与对照组相比存在显著差异($p<0.05$),给药 6 h 后血糖回升至 0 h 浓度。滇结香花水提物对高血糖模型小鼠的降血糖幅度大小、药效持续时间与给药浓度成正比,与阳性药物相比对血糖控制作用更持久并且效果温和。

表 3 雌性小鼠一次灌胃滇结香花水提物 14 d 后其器官指数 (mean±SD, n=10)

Tab. 3 Organ index of oral administration of EMW once in female mice after 14 days (mean±SD, n=10)

器官	对照组	1 000 mg/kg	2 500 mg/kg	5 000 mg/kg
心	5.21±0.31	5.32±0.70	5.24±0.34	4.99±0.46
肝	39.89±1.46	36.68±1.92	38.26±2.39	41.53±2.19
肾	12.25±0.92	13.32±0.95	11.31±0.98	11.44±0.93
肺	5.79±0.22	6.26±0.73	5.54±0.53	5.54±0.31
脾	2.71±0.24	2.57±0.24	2.70±0.33	2.65±0.32
脑	9.31±0.43	9.40±1.06	9.32±0.62	9.46±0.58
胃	7.32±0.55	7.44±0.36	7.76±0.46	7.25±0.62

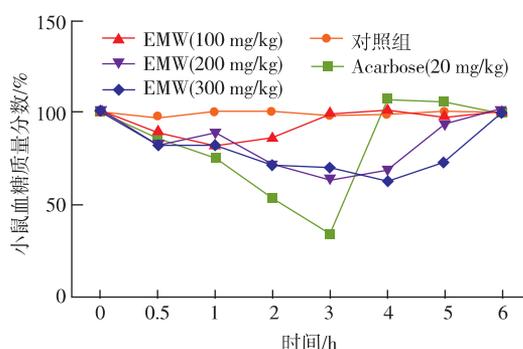


图 2 滇结香花水提物对高血糖模型小鼠血糖的影响
Fig. 2 Effect of EMW on the blood concentration in hyperglycemia mice

4 结语

目前医学界已将 α -葡萄糖苷酶抑制剂列为第 3 类口服降糖药^[12]。此类药物对一、二型糖尿病均适用。代表药物如阿卡波糖,其作用机制为抑制位于小肠绒毛上皮细胞刷状缘的 α -糖苷酶的活性从而抑制二糖和低聚糖降解为单糖如葡萄糖,进而延缓

葡萄糖的吸收,并转化葡萄糖依赖的肠激素的释放,但其有腹部不适、腹泻、胃肠胀气等不良反应。中药等天然药物降血糖疗效明确,副作用小^[13],作者采用 α 葡萄糖苷酶体外抑制模型对产于西藏地区的滇结香花进行降糖活性组分筛选,结果表明,滇结香花水提取物体外抑制活性最好。小鼠急性毒性

实验表明滇结香花水提取物无明显毒副作用,且水提物对小鼠高血糖模型有一定的降糖作用,故可对该提取物进行进一步分离纯化,追踪其活性成分,并在动物整体水平评价其降糖作用,进而研究其调节血糖的机制,这些研究将有助于开发治疗糖尿病的新药。

参考文献:

- [1] 徐玲,蔡正洪. 结香的化学成分及药理研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(31):19110-19111.
XU Ling,CAI Zheng-hong. Research progress of chemical composition and pharmacological action of *Edgeworthia chrysantha Lindl*[J]. **Journal of Anhui Agri Sci**,2011,39(31):19110-19111. (in Chinese)
- [2] HU X J,JIN H Z,XU W Z, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Edgeworthia chrysantha* and its effective chemical constituents[J]. **Biol Pharm Bull**,2008,31(9):1761-1765.
- [3] PU Y H,WANG X Y. The differentiation between *Buddliga Officinalis Maxim* and *Edgeworthia chrysantha Lindl*[J]. **Lishizhen medicine and Materia Medica Research**,2007,18(6):M0007.
- [4] 李秀兰,孙光洁,戴树培,等. 密蒙花/结香有效成分的抑菌作用[J]. 西北药学杂志,1996,11(4):165-166.
LI Xiu-lan,SUN Guang-jie,DAI Shu-pei, et al. Antibacterial effect of active components of *Buddliga Officinalis Maxim/Edgeworthia chrysantha lindl*[J]. **Northwest Pharmaceutical Journal**,1996,11(4):165-166. (in Chinese)
- [5] 竺琴,张焜,杜志云,等. 西藏绿萝花提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制及抗氧化作用[J]. 中药材,2009,32(1):89-92.
ZHU Qin,ZHANG Kun,DU Zhi-yun, et al. Study on inhibitive effect of extracts from *scindapsus aureus* on α -glucosidase and its antioxidant activity[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**,2009,32(1):89-92. (in Chinese)
- [6] Zhou T,Zhang S W,Liu S S, et al. Daphnodorin dimers from *Edgeworthia chrysantha* with α -glucosidase inhibitory activity[J]. **Phytochemistry Letters**,2010,3(4):242-247.
- [7] Ye E,Shen Z,Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb(*Ramulus moil*) in normal and diabetic rats and mice[J]. **Phytomedicine**,2002,9(2):161-166.
- [8] 朱运平,李秀婷,李里特. 天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂来源及应用研究现状[J]. 中国食品学报,2011(4):154-160.
ZHU Yun-ping,LI Xiu-ting,LI Li-te. The source of the natural α -glucosidase inhibitor and its application research situation[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2011(4):154-160. (in Chinese)
- [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(10):740-743.
ZHANG Ran,LIU Quan,SHEN Zu-fang, et al. High throughput screening of α -Glucosidase inhibitors; application to hypoglycemic traditional Chinese medicine[J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**,2007(10):740-743. (in Chinese)
- [10] 张海凤,董亚琳,胡萨萨,等. 5种中药对两种不同来源 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用比较[J]. 中药材,2008,31(7):1024-1027.
ZHANG Hai-fang,DONG Ya-lin,HU Sa-sa, et al. Compare of five kinds of traditional Chinese medicines on the inhibition activity of two different sources of α -glucosidase [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**,2008,31(7):1024-1027. (in Chinese)
- [11] 常星,崔维恒,张俊柯,等. 内蒙古产柽柳和多枝柽柳 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J]. 天然产物研究与开发,2011,23:146-148.
CHANG Xin,CUI Wei-hen,ZHANG Jun-ke, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of *Tamarix chinensis Lour.* and *Tamarix ramosissima Ledeb.* in Nei-Menggu[J]. **Nat Prod Res Dev**,2011,23:146-148. (in Chinese)
- [12] 孙会仙,李瑞林,赵尚清. 糖尿病药物治疗进展[J]. 中国医院用药评价与分析,2011(1):94-96.
SUN Hui-xian,LI Rui-lin,ZHAO Shang-qing. Advances in the treatment of diabetes drugs[J]. **Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China**,2011(1):94-96. (in Chinese)
- [13] 贾安,杨义芳,黄涛,等. 中药及天然药物中抗糖尿病活性成分研究进展[J]. 中药材,2012(5):822-826.
JIA An,YANG Yi-fang,HUANG Tao, et al. Research progress of antidiabetic active ingredient in traditional Chinese medicine and natural medicine[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**,2012(5):822-826. (in Chinese)