

α -葡萄糖苷酶抑制剂固定化酶模型的建立及其对孔雀草不同组分的筛选

朱连连, 栾晓宁, 窦德强*

辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

摘要: 目的 建立筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的固定化酶筛选模型, 进行孔雀草中活性组分的筛选研究。方法 采用共价交联法固定 α -葡萄糖苷酶, 模拟其在体内小肠壁上的情况, 建立固定化酶筛选模型。使用 α -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖对该模型进行验证。然后用该筛选模型对孔雀草 4 种提取组分进行筛选。结果 固定化酶的筛选模型更稳定, 且可重复利用。孔雀草水煎液和上清液组分对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最强, 醇沉组分次之, 挥发油组分几乎无抑制作用。结论 该筛选模型能很好地进行中药体外 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选。

关键词: 固定化酶; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 孔雀草; 筛选

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2018)11 - 2776 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.11.003

Establishment of an immobilized enzyme model for α -glucosidase inhibitor and screening on the compositions in *Tagetes patula*

ZHU Lian-lian, LUAN Xiao-ning, DOU De-qiang

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish a screening model of immobilized enzymes for α -glucosidase inhibitors, and study the activities of the compositions in *Tagetes patula*. **Methods** Immobilization of α -glucosidase by covalent crosslinking was carried out, the situation on the intestinal membrane *in vivo* was simulated, and a screening model for α -glucosidase inhibitors was established. The model was validated by means of a standard α -glucosidase inhibitor acarbose. The model was used to screen the α -glucosidase inhibitors from four kinds of extract components in *T. patula*. **Results** The immobilized enzyme screening model was more stable, and could be reused. Water solution and the supernatant fluid composition in *T. patula* had the strongest inhibition for α -glucosidase enzymes, and then followed by alcohol precipitation components, but volatile oil components almost had no inhibition. **Conclusion** The screening model can be used for screening of α -glucosidase inhibitors for traditional Chinese medicine *in vitro*.

Key words: immobilized enzyme; α -glucosidase inhibitor; *Tagetes patula* L.; screening

α -葡萄糖苷酶可使复合碳水化合物分解成为人体可以吸收的单糖, 而 α -葡萄糖苷酶抑制剂通过竞争性的抑制 α -葡萄糖苷酶, 延缓和阻碍碳水化合物的消化, 延缓来自低聚糖、双糖和多糖的葡萄糖吸收, 有效推迟并减缓糖尿病患者餐后血糖升高的时间和进程, 有助于控制糖尿病的发展^[1]。目前众多学者对于 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选的方法已经进行了大量的研究, 主要有酶-抑制剂模型^[2]、高通量模型^[3]、细胞模型^[4]和高血糖动物体内筛选模型^[5]。大多以对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG)、淀

粉、蔗糖和麦芽糖等为底物来筛选游离 α -葡萄糖苷酶抑制剂。而体内筛选模型实验周期较长, 耗资大, 无法做到多种化合物同时快速的筛选。孔雀草 *Tagetes patula* L. 是菊科万寿菊属一年生草本植物, 原产墨西哥, 分布于四川、贵州、云南等地, 在国内作为经济美观的观赏性植物。国外学者研究表明, 孔雀草具有抗氧化、抗菌、抗炎、治疗心血管疾病等药理活性, 俄罗斯高加索地区居民常食用孔雀草, 有延年益寿之效。尽管孔雀草有多种药理作用, 但我国将花期过后的孔雀草草本废弃, 造成对孔雀草

收稿日期: 2018-07-01

作者简介: 朱连连 (1991—), 男, 硕士研究生, 从事中药药效 (性) 物质基础及新药开发研究工作。E-mail: lianlian Zhu1991@126.com

*通信作者 窦德强 (1967—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药药效 (性) 物质基础及新药开发研究工作。E-mail: deqiangdou@126.com

资源极大的浪费。本课题前期对孔雀草茎叶化学成分进行了提取、分离、纯化和鉴定^[6]。本实验采用应用最广的且最稳定的共价结合交联法对 α -葡萄糖苷酶进行固定,将其做成筛选模型化,用阿卡波糖进行稳定性验证,并从孔雀草中提取了挥发油、水煎液、醇沉、上清液4个不同组分,用此模型进行 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选和半数抑制浓度(IC₅₀)的测定。

1 实验材料

1.1 仪器

UV-2100 紫外分光光度计(上海优尼科有限公司);SHZ-82 型恒温振荡器(国华企业);Acculab 型万分之一分析天平、CP225D 型十万分之一分析天平(德国赛多利斯公司);XHF-D 型高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司);磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);PHS-3C 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);YQ-A3-SS-048 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司);SRT-202 型滚轴混合器混合(其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 试剂

阿卡波糖片(拜耳医药保健有限公司,规格 50 mg,产品批号 20170206);4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG, AR 98%,货号 N-1377, Sigma 公司);水为纯净水;壳聚糖(批号 523B033,北京索莱宝公司);戊二醛(G105906-500mL,货号 D1529002,高纯度医用级,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);三聚磷酸钠(TPP,货号 J1527025, AR 98%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);磷酸二氢钠(分析纯,含量不少于 99.0%,批号 20170307,沈阳经济开发区试剂厂);磷酸氢二钠(分析纯,含量不少于 99.0%,批号 20170118,天津市大茂化学试剂厂)。孔雀草采自辽宁省大连市,经辽宁中医药大学鉴定教研室王冰教授鉴定为菊科植物孔雀草 *Tagetes patula* L. 的干燥全草。

1.3 实验动物

SD 大鼠,辽宁长生生物技术有限公司提供,使用许可证号 SCXK(辽)2015-0001。

2 方法与结果

2.1 粗酶液的制备

SD 大鼠禁食 1 d,脱臼处死后,取其小肠轻挤排除内容物后,于冰板上剪开取大鼠上端小肠(十二指肠部分),剖开小肠并翻转暴露肠,刮取黏膜,用 4 °C 预冷的磷酸缓冲液(PBS)冲洗后拭干称定

质量,按质量体积比 1:3 加入 4 °C 预冷的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)匀浆,将浆液置冰箱冷藏 5 h 以使浸提物充分溶解。在 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,-20 °C 保存备用。经酶活力测定为 300 000 U/g,淡黄色液体,相对分子质量约为 6.85×10^4 ,无臭无味,溶于水,不溶于乙醚和乙醇。合适的作用温度 50~55 °C(50 °C 最优),合适的作用 pH 4.8~5.4(pH 值为 5.0 最优)。

2.2 α -葡萄糖苷酶的固定化

2.2.1 凝胶珠的制备^[7] 称取 0.5 g 壳聚糖,缓慢加入到 1%醋酸溶液 20 mL 中,用磁力搅拌器搅拌,溶解至无沉淀、无大的气泡,然后关掉磁力搅拌器,静置至里面的小气泡排净。将 4 °C 的 2%三聚磷酸钠(TPP)置于烧杯中,并用 5 mL 注射器吸取混悬液缓慢滴入其中(滴入过程中固定滴距为 6 cm,滴速为 30 滴/min),白色球状凝胶珠瞬时形成,勿搅拌防止凝胶珠变形,并在 TPP 溶液中放置 3 h。

2.2.2 凝胶珠的活化和酶固定化 取 1 g 凝胶珠,加入到 0.075%聚乙烯亚胺(pH 10)溶液 10 mL 中,放在滚轴混合器混合 1 h,蒸馏水洗净,再加入到 0.5%戊二醛 10 mL 中,放在滚轴混合器混合 1 h,缓冲溶液洗净,完成凝胶珠的活化。将上述凝胶珠加入 α -葡萄糖苷酶溶液 1 mL、缓冲溶液 3 mL,放在滚轴混合器混合 16 h(过夜),完成酶的固定化,放在缓冲溶液中保存。

2.2.3 酶活的测定(pNPG 法) 固定化酶:称凝胶珠 0.25 g,加入 pNPG(5 mmol/L,缓冲溶液配制)0.9 mL,37 °C 水浴 20 min,加入 2 mol/L Na₂CO₃ 溶液 1 mL 停止反应,冷却至室温。用紫外分光光度计读取 400 nm 处的吸光度值,在 1 min 内催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚所消耗的酶量定义为 1 个酶活单位(1 U)。

游离酶:取游离纤维素酶 0.05 mL,加入 0.9 mL pNPG,37 °C 水浴 20 min,加入 2 mol/L Na₂CO₃ 溶液 1 mL 停止反应,冷却至室温,加入 2 mL 缓冲溶液,用紫外分光光度计读取 400 nm 处的吸光度值,以不加酶作空白。

2.2.4 固定化酶操作稳定性(回收次数)测定 称固定化酶凝胶珠 0.25 g,加入 pNPG(5 mmol/L,使用 pH 6 的缓冲溶液配制)0.9 mL,在 50 °C 水浴锅中反应 20 min,取出,分离凝胶珠和反应液。凝胶珠洗净,继续进行第 2 次催化反应。如此重复操作上述过程,共进行 11 次,以考察固定化酶连续操

作稳定性。每次的反应液加入 2 mol/L Na₂CO₃ 溶液 1 mL 停止反应，冷却至室温。用紫外分光光度计读取 400 nm 处的吸光度值。可以看出，固定化的酶在重复使用 11 次后酶活力还在 90% 多，说明酶与载体间的吸附作用较稳定，证明固定化酶可以连续操作。但重复操作时，受机械强度干扰，仍然不可避免会有酶的流失，致使循环使用固定化酶水解底物的活性逐渐降低。

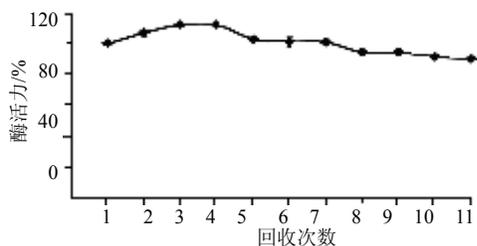


图 1 固定化酶操作稳定性试验 (回收次数)

Fig. 1 Operational stability (recovery times) of immobilized enzyme

2.2.5 米氏常数的测定^[8] 称固定化酶凝胶珠 0.1g，加入 0.5 mL 1、3、5、7、10、15 mmol/L (缓冲溶液配制) pNPG，在 70 °C 水浴锅中反应 15 min，反应液加入 2 mol/L Na₂CO₃ 溶液 1 mL 停止反应，冷却至室温。紫外分光光度计读取 400 nm 处吸光度值。游离酶：取 0.1 mL 游离纤维素酶，加入 0.5 mL pNPG，以下步骤同上。计算固定化酶和游离酶的酶催化反应初速度 (V)。以 pNPG 浓度 (S) 为横坐标，平均吸光度为 v，S/v 为纵坐标，斜率为 1/V_{max}，横截距为 -K_m，纵截距为 K_m/V_{max}。可得方程，固定化酶：Y=0.652 8 X+5.255 3，R²=0.982 3；游离酶：Y=0.202 0 X+0.489 8，R²=0.996 6。计算得游离酶的 K_m=2.42 mol/L，V_{max}=4.95 mmol/(L·min)，固定化酶的 K_m=8.05 mol/L，V_{max}=1.53 mmol/(L·min)。实验得到固定化酶的米氏常数高于游离酶，可能是由于一部分酶分子被固定结合在凝胶珠表面的聚合物层内部，当底物和酶分子接触时，受到了较大的立体空间阻碍作用，从而使得固定化酶较游离酶有着与底物较小的亲和力。

2.2.6 固定化酶红外光谱特征 胺化壳聚糖在 3 400 cm⁻¹ 处出现了 NH₂ 的特征吸收峰，表明壳聚糖被聚乙烯亚胺胺化，活化壳聚糖在 1 730 cm⁻¹ 处出现了 C=O 的特征吸收峰，证明其为戊二醛中的一个醛基；在 1 640 cm⁻¹ 处出现了 C=N 的特征吸收峰，

表明戊二醛的另一个醛基与聚乙烯亚胺的胺基发生了反应。3 540 cm⁻¹ 处出现的宽峰表示出现了更多的 NH₂，证明 α-葡萄糖苷酶通过共价结合固定到了壳聚糖载体上，出现了更多的 NH₂。见图 2。

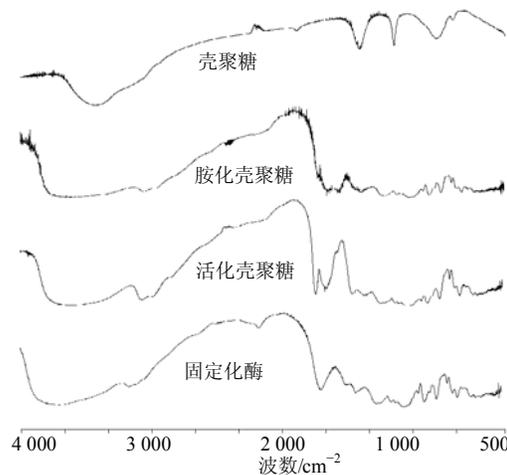


图 2 不同过程凝胶珠红外色谱图

Fig. 2 Different process of gel beads IR chromatograms

2.2.7 固定化酶扫描电镜 观察卡拉胶在活化和固定酶后的微观形貌变化。未活化前，孔隙大，随着胺化和活化，凝胶珠表面附着越来越多的物质，酶固定化后表面的孔隙尺寸变小，酶固定化表面积增加。未活化前，凝胶珠在工作电压 15 kv 下易碎，固定化后，凝胶珠变得更坚固，形状完好。扫描电子显微镜图见图 3。

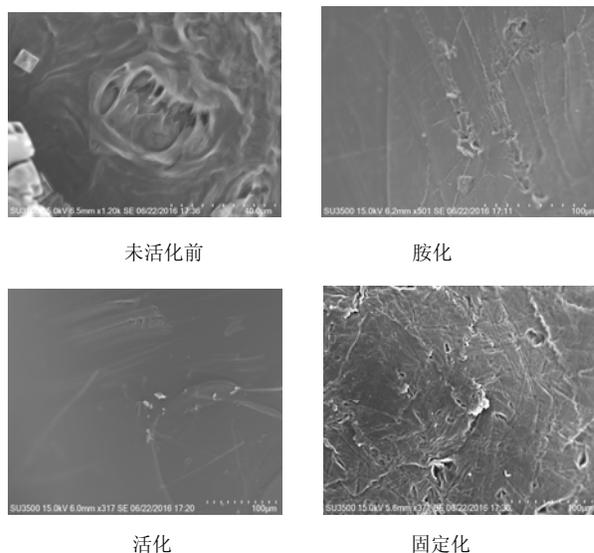


图 3 不同过程凝胶珠表面扫描电镜图

Fig. 3 Different process gel bead surface scanning electron microscopy (SEM)

2.3 固定化模型的检测方法

2.3.1 阿卡波糖溶液配制: 取阿卡波糖片 10 mg, 研碎, 加超纯水 10 mL, 37 °C 溶解, 离心, 取上清液 (浓度为 1 mg/mL), 即得。

2.3.2 检测体系 在 5 mL EP 管中进行, 反应体系为: 0.1 g 固定化酶凝胶珠, 加入 0.2 mL 抑制剂, 37 °C 温浴 10 min 后, 加入 5 mmol/L pNPG 0.4 mL 混匀后 37 °C 温浴 20 min。最后加入 2 mol/L Na₂CO₃ 溶液 0.5 mL 终止反应, 于 400 nm 波长下测定吸光度值。以 0.2 mL 抑制剂, 0.4 mL pNPG 和 0.5 mL 的 Na₂CO₃ 溶液为空白。

2.3.3 稳定性试验 体系中分别加入 6 份 1 mg/mL 阿卡波糖溶液, 测定吸光度值, 并计算 RSD 值。分别量取 0.025 mL 游离酶或固定酶, 加入 1 mg/mL 阿卡波糖溶液 2 mL, 其他步骤同上, 计算 RSD 值。可知固定化酶模型的 RSD 值为 1.2%, 游离酶的 RSD 值为 4.2%, 所以固定化酶模型更稳定。

2.3.4 固定化模型的验证 称取 0.1 g 固定化酶于 5 mL EP 管中, 加入 0.2 mL 不同浓度的 (0.0625、0.125、0.25、0.5、0.75 mg/mL) 阿卡波糖溶液, 于 37 °C 水浴 10 min 后, 加入 5 mmol/L pNPG 0.4 mL, 于 37 °C 水浴 20 min 后, 加 1 mol/L Na₂CO₃ 0.5 mL 终止反应, 400 nm 下测定吸光度值。不加固定化酶, 只加液体即 0.2 mL 抑制剂、0.4 mL pNPG 和 0.5 mL Na₂CO₃ 作为空白对照。取游离酶 0.025 mL, 其他步骤同固定酶。对于抑制剂, 以浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标, 进行回归, 用 SPSS 软件计算 50% 抑制率处的浓度, 即得该抑制剂的 IC₅₀ 值。见图 4。

$$\text{抑制率} = (A_0 - A_i) / A_0$$

A₀ 为未加抑制剂时酶与底物反应后的吸光度值 (扣除相应空白), A_i 为加入抑制剂后酶反应的吸光度值 (扣除相应空白)

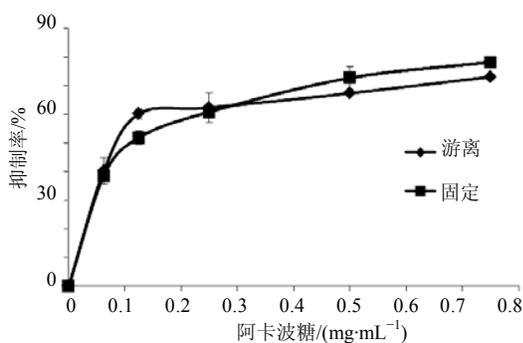


图 4 不同阿卡波糖对游离酶和固定酶的抑制率

Fig. 4 Inhibition rate of acarbose concentration on free and immobilized enzyme activity

对固定化和游离的 α-葡萄糖苷酶的抑制作用比较, 在固定底物和酶浓度的情况下, 改变阿卡波糖的浓度, 以阿卡波糖浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标, 做回归曲线, 于 50% 抑制率处得到 IC₅₀。游离酶的 IC₅₀ 为 0.087 5 mg/mL, 固定酶 IC₅₀ 为 0.112 5 mg/mL, 证明该固定化模型可用于从中药中筛选 α-葡萄糖苷酶抑制剂。

2.4 孔雀草 4 种组分的抑制剂筛选和 IC₅₀ 值计算

2.4.1 孔雀草水煎液的制备 孔雀草用剪刀剪碎, 铁研船、打粉机搅碎。称取 100 g 粗粉, 第 1 次加 10 倍量水, 浸润 4 h, 文火煎煮提取 1 h, 静置冷却后, 滤布滤过, 滤渣加 8 倍量水, 文火再次煎煮 1 h, 水煎液静置放凉后, 滤布滤过, 合并两次水煎液滤液, 减压浓缩回收溶剂, 剩余少量溶剂置低温冷冻干燥机冻干, 计算得收率为 24.7%;

2.4.2 孔雀草挥发油、上清和醇沉组分的制备 称取 1 kg 孔雀草粗粉, 第 1 次加 10 倍量水, 浸渍 4 h, 文火煎煮提取 1 h, 同时提取挥发油; 静置冷却后, 水煎液滤布滤过, 滤渣加 8 倍量水, 文火再次煎煮 1 h, 同时提取挥发油, 水煎液静置放凉后, 滤布滤过, 合并两次水煎液滤液, 将合并后的水煎液沉降、离心、浓缩至 1 L。调节乙醇体积分数至 70%, 醇沉 2 次, 将醇沉物与上清液各自合并, 65 °C 严格控温, 回收溶剂, 剩余少量溶剂, 置减压干燥箱内干燥 12 h。经计算孔雀草挥发油、上清及醇沉组分的收率分别为 0.2%、19.6% 及 12.8%。

2.4.3 提取物溶液配制 分别精密称取孔雀草的水煎液、醇沉组分和上清液组分提取物冻干粉适量, 加超纯水溶解, 配成浓度为 1 mg/mL (组分质量计) 的溶液。孔雀草挥发油、水煎液、醇沉组分和上清液组分浓度按生药量计分别为 500、4.049、7.813、5.102 mg/mL。

2.4.4 活性筛选和 IC₅₀ 值计算 比较孔雀草的 4 种组分挥发油、水煎液、醇沉、上清液在相同浓度 1 mg/mL 下对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用大小。每组以不加固定酶为的空白 (即各自样液、底物和终止液), 以消除假阳性结果。取各抑制剂浓度均为 1 mg/mL (组分质量计), 在相同条件下与底物反应, 结果见表 1。

可以看出, 浓度同为 1 mg/mL (组分质量计) 时, 孔雀草的水煎液和上清液组分对 α-葡萄糖苷酶的抑制率最强, 醇沉组分次之, 挥发油组分几乎无抑制作用。

表 1 孔雀草不同组分的抑制率

Table 1 Inhibition rate of *Tagetes patula* different components

组分	浓度/(mg·mL ⁻¹)	抑制率/%	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
挥发油	1	2.158	—
水煎液	1	98.570	0.610
醇沉	1	59.472	0.857
上清液	1	98.270	0.696
阿卡波糖	1	82.014	0.113

3 讨论

本研究是以 pNPG 为底物的固定化酶抑制剂筛选模型, 以 pNPG 为底物是目前从天然产物中筛选强活性降糖活性成分最常用、最经典的底物。本研究中利用固定化技术将 α -葡萄糖苷酶固定化, 酶上的氨基与载体相结合, 模拟了体内 α -葡萄糖苷酶 N 端在内 C 端在外, 跨越双分子层被固定在小肠上皮细胞膜上的状态。这种筛选方法既可排除作用于 N 端抑制剂的假阳性, 又可直接在体外评价 α -葡萄糖苷酶抑制剂的体内作用效果。

可以看出阿卡波糖对游离酶和固定酶的抑制效果相差不大, 阿卡波糖对两者的 IC₅₀ 分别为 0.087 5、0.1125 mg/mL, 固定化酶的 IC₅₀ 值大, 可能是因为酶被固定在凝胶载体上后, 与底物接触的空间受到限制, 而且在体内 α -葡萄糖苷酶是在小肠上皮细胞内, α -葡萄糖苷酶被固定后更能模拟体内环境, 可以避免体外筛选出现的假阳性现象, 提高筛选的正确度和效率, 且该筛选模型可以重复利用多次, α -葡萄糖苷酶的酶学性质研究中, 固定化的酶在重复使用 11 次后酶活力还在 90% 多, 说明该固定化酶性质稳定。在固定化模型的稳定性试验中, 固定化酶模型的 RSD 值 1.2%, 游离酶的 RSD 值 4.2%, 所以固定化酶模型更稳定, 说明建立的固定化 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选模型稳定可靠。

根据孔雀草中各组分对 α -葡萄糖苷酶抑制作用大小的研究结果表明, 上清液组分和水煎液组分较

阿卡波糖有较强的抑制率, 醇沉组分次之。据文献报道, 抗糖尿病天然产物活性成分有生物碱类、糖类、黄酮类、皂苷类和萜类^[9]。醇沉组分中主要含有多糖类成分, 抑制 α -葡萄糖苷酶的主要成分可能是醇沉中的多糖类成分。水煎液和上清液组分成分较复杂, 不能确定具体哪类成分具有抑制作用, 而且有关孔雀草降糖方面的研究尚无报道, 其机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 高小平, 张蔚瑜, 邹文俊, 等. 中药提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 536-538.
- [2] Anam K, Widharna R. M, Kusriani, D. α -Glucosidase inhibitor activity of *Terminalia* species [J]. *Int J Pharmacol*, 2009, 5(4): 277-280.
- [3] 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]. 中国药理学杂志, 2007, 42(10): 740-743.
- [4] 高 坤, 孙 进, 何仲贵. Caco 2 细胞模型在口服药物吸收研究中的应用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(6): 469-474.
- [5] Zhang A J, Rimando A M, Fish W, et al. Serviceberry [*Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt. ex. M. Roem (Rosaceae)] leaf extract inhibits mammalian α -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in a mouse model of diet-induced obesity and hyperglycemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2): 481-487.
- [6] 于 淼, 冉小库, 窦德强, 等. 孔雀草茎、叶化学成分的分鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 64-68.
- [7] 于兆慧, 刘其媛, 崔 莉, 等. 微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb1 制备人参稀有皂苷 Compound K 研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3092-3097.
- [8] 赵文恩. 生物化学 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2004: 87-89.
- [9] 尹红梅. 泽泻 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选及其活性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2012.