

海洋新化合物 A1998 降血糖作用机制研究[△]

中山大学药理学系药物药理研究室(广州 510275) 许东晖* 许实波

摘要 海洋新化合物 A1998 6.4, 19.2, 57.6 mg/kg 剂量可明显降低四氧嘧啶及链脲霉素所致小鼠糖尿病模型的血糖含量, 增加 AlCl₃ 所致急性衰老大鼠血细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性, 使 AlCl₃ 所致急性衰老大鼠细胞膜上活性受到损伤的 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性恢复, 增强胰岛细胞对葡萄糖反应的敏感性, 从而起到降低血糖的作用。

关键词 新化合物 A1998 Na⁺, K⁺-ATP 酶 降血糖

Hypoglycemic Effect and Mechanism of A1998—a New Steroid from Marine Origin

Xu Donghui and Xu Shibo (Section of Drugs and Pharmacology, Department of Pharmacy, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract The new compound A1998, di(3 β -hydroxy-androst-5-en-17-one) adipate was isolated and modified from the marine creature of *Asterias amurensis*. At doses of 6.4, 19.2 and 57.6 mg/kg (*po*), it can markedly reduce blood glucose level of diabetic mice induced by alloxan or streptozotocin; increase the activities of Na⁺, K⁺-ATPase on red cell membrane of acute senescent mice induced by AlCl₃, and increase the sensitivity of islet of Langerhans to reduce blood glucose.

Key words A1998 new steroid hypoglycemic action Na⁺, K⁺-ATPase

海洋新化合物 A1998 是从海洋生物海星(多棘海盘车) *Asterias amurensis* 中分离并经结构修饰获得的新化合物, 已获国家医药用途发明专利(公开号 CN1176786A), 海星含有甾醇、皂苷、萜类等多种活性物质, 具有抗癌、抗菌等药理作用^[1,2], 我们对 A1998 降血糖药理作用及机制进行了实验研究。

1 材料

1.1 药品及样品: 己二酸(5-雄甾烯-17-酮-3 β -羟基)二酯, 代号 A1998. 国家医药用途发明专利, 由中山大学药理学系药物化学研究室提供; 阳性对照药: 格列本脲片, 津卫药准字(1981)第 001231 号, 天津市力生制药厂; 链脲霉素(Streptozotocin), 由 Sigma Chemical

Co. 生产; 四氧嘧啶(Alloxan), 由 Sigma Chemical Co. 生产; 血糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法), (93)卫药准字 D-21-7 号, 保定长城临床试剂公司; Ouabain(哇巴因), 由 Japan Nacalai Tesque 生产。

1.2 动物: NIH 系小鼠, 体重(20 \pm 2) g, 合格证号 97A018, S D 系大鼠, 体重(250 \pm 20) g, 实验动物合格证号: 97A017, 由广东省医学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 实验值均采用美国 Primer of Biostatistics 统计软件进行统计学处理, 并用 *t*-test 分析 *t* 值法分析组间差异的显著性, 结果以均值 \pm 标准差表示($\bar{x}\pm s$)。

* Address: Xu Donghui, Department of Pharmacy, Zhongshan University, Guangzhou

许东晖 男, 中山大学药理学系讲师, 天然药物学博士, 广东省药理学会理事, 曾在加拿大蒙特利尔心脏研究所从事老年性痴呆症、心律失常、脑中风相关基因的克隆, 分别建立高通量药物筛选模型。“海洋天然活性产物抗氧化的应用研究”获 1998 年广东省高校科技进步二等奖, 《天然产物生理活性研究论文专辑》(2 册) 获 1996 年广东省高教厅科技进步二等奖, 获承担国家新药研究基金项目等多项国家级项目, 获国家发明专利 3 项。

[△] 国家“九·五”重点科技攻关项目《海洋生物活性物质》(编号 96-C02-04-01)

2.2 A1998对四氧嘧啶所致小鼠糖尿病模型的影响:选择健康NIH系小鼠,雄性,(20±2)g,80只,随机选择10只小鼠作为正常对照组,另外70只禁食12h后,ip四氧嘧啶250mg/kg体重,6h后ip2.5g/kg的葡萄糖液,使小鼠安全渡过低血糖相,随后小鼠提供食物和饮水,36h后再禁食12h,从小鼠眼眶静脉取血,测定血糖值,选择血糖值大于11.1mmol/L的小鼠50只,随机分成5组,即高血糖对照组、A1998低、中、高剂量组、阳性对照组(格列本脲组),连同正常对照组,按表1剂量ig,连续给受试样品12d。末次给受试样品前禁食12h,小鼠给受试样品后1h眼眶静脉取血,采用血糖测定试剂盒测定血糖含量,结果见表1。

表1 A1998对四氧嘧啶所致小鼠糖尿病模型的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	血糖值(mmol/L)	降糖率(%)
正常对照	1%CMC	5.87±0.97***	—
高血糖对照	1%CMC	22.11±1.94	—
A1998	6.4	19.33±1.24**	12.6
	19.2	14.69±1.52***	33.6
	57.6	9.23±1.01***	58.3
格列本脲	3.9	15.73±1.28***	28.9

与高血糖对照组相比: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

从表1结果可知,新化合物A1998 6.4, 19.2, 57.6 mg/kg 体重给受试样品剂量小鼠血清血糖值(mmol/L)分别为19.33±1.24 ($P<0.01$), 14.69±1.52 ($P<0.001$), 9.23±1.01 ($P<0.001$), 降糖率分别为12.6%, 33.6%和58.3%, 与高血糖对照组相比,具有非常显著性差异,而且具有明显的量效关系。

2.3 对链脲霉素所致小鼠糖尿病模型的影响:实验动物,分组及操作同2.1,同链脲霉素代替四氧嘧啶,结果见表2。

结果可知,新化合物A1998 6.4, 19.2, 57.6 mg/kg 体重给受试样品剂量小鼠血清血糖值(mmol/L)分别为18.93±1.20 ($P<0.001$), 15.49±1.22 ($P<0.001$), 10.46±0.90 ($P<0.001$), 降糖率分别为18.5%, 33.3%和54.9%, 与高血糖对照组相比,具

有非常显著性差异,而且具有明显的量效关系。

表2 A1998对链脲霉素所致小鼠糖尿病模型的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	血糖值(mmol/L)	降糖率(%)
正常对照	1%CMC	6.18±0.88***	—
高血糖对照	1%CMC	23.21±1.24	—
A1998	6.4	18.93±1.20***	18.5
	19.2	15.49±1.22***	33.3
	57.6	10.46±0.90***	54.9
格列本脲	3.9	16.89±1.38***	27.2

与高血糖对照组相比: *** $P<0.001$

2.4 对细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP酶活性的影响:连续15d sc $AlCl_3$ 70 mg/kg 所致急性衰老大鼠在戊巴比妥钠麻醉下(40 mg/kg, ip),颈动脉取血4.5 mL,用柠檬酸钠13.8% (血样-柠檬酸钠溶液1:9)抗凝,立即离心(3 000 r/min, 10 min)。弃去血浆及表面绒毛状细胞层,用3~5倍体积预冷的生理盐水悬洗红细胞1次,在同样条件下离心,红细胞用40倍体积预冷的10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6~7.8)溶血,后者在4℃静置1h左右,然后离心(12 000 r/min, 6 min, 6℃)。弃去上清液,用同样缓冲液将沉淀反复洗3次,每次在同样条件下离心,最后将呈乳白色的红细胞膜用上述缓冲液制成每毫升约1~1.5 mg 蛋白膜悬液,按下列步骤(表3)测定不同浓度受试样品A1998对ATP酶活性的影响。

采用Folin酚法测定蛋白含量,以0.2 mmol/L KH_2PO_4 测各样品中磷含量Pi值。

Pi 值×稀释倍数×时间倍数×1 mg pr/mL = 酶活单位(μ mol/L·mg·pr/h)。

总酶活性 - Mg^{2+} -ATP酶活性 = Na^+ , K^+ -ATP酶活性

表4结果得知,新化合物A1998在 10×10^{-5} , 50×10^{-5} mol/L 给受试样品浓度下能够增加 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase活性(μ mol/L·mg·pr/h),分别为53.7±13.2 ($P<0.05$), 60.3±14.9 ($P<0.01$), 能够增加 Mg^{2+} -ATPase活性(μ mol/L·mg·pr/h), 分别为29.4±7.0 ($P<0.05$), 32.9±7.4 ($P<0.05$), 能够增加 Na^+ , K^+ -ATPase活性

表 3 不同浓度 A1998 对 ATP 酶活性影响的测定步骤

试剂	底物管(mL)	总酶(mL)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATP		Mg ²⁺ -ATP	
			酶(mL)		酶(mL)	
250 mmol/L Tris-HCl	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
50 mmol/L MgCl ₂	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
1 mol/L NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
150 mmol/L KCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2 mmol/L Ouabain	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
1 mmol/L CaCl ₂	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
A1998 10 ⁻⁵ mmol/L	—	0.1	—	0.1	—	0.1
膜蛋白	—	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
40 mmol/L Na ₂ ATP	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
H ₂ O	0.4	0.05	0.15	0.05	0.15	0.25

注:37 C,水浴 30 min。

表 4 A1998 对红细胞膜 Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase, Na⁺, K⁺-ATPase 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 ($\times 10^{-5}$ mol/L)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase	Mg ²⁺ -ATPase	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
		(μ mol/L · mg · pr/h)	(μ mol/L · mg · pr/h)	(μ mol/L · mg · pr/h)
空白对照组	—	39.6 ± 14.5	23.5 ± 5.0	15.5 ± 2.7
A1998	1.0	41.7 ± 14.1 [△]	24.6 ± 4.9 [△]	16.8 ± 3.0 [△]
	5.0	47.1 ± 10.0 [△]	24.7 ± 5.1 [△]	18.6 ± 3.0*
	10.0	53.7 ± 13.2*	29.4 ± 7.0*	21.9 ± 4.3***
	50.0	60.3 ± 14.9**	32.9 ± 7.4*	23.8 ± 4.1***

与空白对照组相比:△P>0.05 *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

(μ mol/L · mg · pr/h), 分别为 21.9 ± 4.3 (P<0.001), 23.8 ± 4.1 (P<0.001), 与空白对照组相比, 具有显著性差异。

3 讨论

肌醇代谢异常与糖尿病有密切关系:已知游离肌醇的去路主要是进入二磷酸磷脂酰肌醇循环,合成磷脂酰肌醇(PI)。而PI合成酶能促使胞苷二酸磷-二酰基甘油(CDP-DG)和肌醇合成PI。细胞内高水平的肌醇(1.5 mmol/L)是维持适当PI水平所必需的。糖尿病时会降低CDP-二酰基转移酶及催化合成肌醇-1磷酸的合成酶活性,造成PI合成减少。更主要的是,对于糖尿病患者高血糖水平会干扰肾脏对肌醇-1磷酸的吸收。肌醇的吸收是一个耗能和依赖Na⁺的过程。对于糖尿病患者,高血糖促使D-葡萄糖和肌醇相互争夺肌醇载体,使肌醇重吸收减少,造成肌醇尿,由于细胞内肌醇水平降低,引起细胞膜上PI水平下降,使细胞膜上Na⁺, K⁺-ATP酶活性降低。糖尿病与该酶活性减少有关。胰岛素降低血糖的作用机制是在于胰岛

素结合到细胞膜受体后,激活胞内的肌醇磷脂特异性磷脂酶C(PI-PLC),把细胞膜上与PI联结的多糖水解,生成专门传递胰岛素生物信号的第二信使——磷酸肌醇聚糖^[3]。

在实验性糖尿病动物模型中,发现周围神经肌醇水平降低,同时运动神经水平的葡萄糖抑制肾中肌醇的重吸收,从而反常地增加肌醇的排出。糖尿病患者周围神经病变与Na⁺, K⁺-ATP酶活性减少有关。四氧嘧啶或链脲霉素化学试剂诱导的高血糖模型作用机制是利用四氧嘧啶或链脲霉素破坏胰岛细胞,使胰岛素分泌不足而引起高血糖药理模型。从四氧嘧啶或链脲霉素所致小鼠糖尿病模型可知,A1998具有明显的降血糖作用,与高血糖对照组相比,具有非常显著性差异,而具有明显的量效关系。

Ca²⁺, Mg²⁺-ATP酶及Na⁺, K⁺-ATP酶活性实验中,证明A1998降血糖作用机制是通过增强细胞膜Na⁺, K⁺-ATP酶活性,使AlCl₃所致急性衰老大鼠细胞膜上活性受到损伤的Na⁺, K⁺-ATP酶活性恢复,从而提

高细胞膜上磷脂酰肌醇水平,有利于胰岛素更多结合到细胞膜受体,激活胞内 PI-PLC,生成专门传递胰岛素生物信号的第二信使——磷酸肌醇聚糖,增强胰岛细胞对葡萄糖反应的敏感性,从而对四氧嘧啶或链脲霉素化学试剂诱导的高血糖模型起到降低血糖

的作用。

参考文献

- 1 Bameet D, *et al.* Comp Biochem Physiol, 1988, 90B: 141
- 2 Minale L, *et al.* Nitural Products and Biological Activities. Tokyo: University of Tokyo Press, 1986: 59
- 3 林曙光, 等. 细胞信号转导系统基础医学与临床. 天津: 天津科学技术出版社, 1996: 224

(1999-03-28 收稿)

鲤鱼精巢 DNA 抗脂质过氧化作用研究

中山医科大学药理学教研室(广州 510089) 唐孝礼* 颜光美
广东药学院预防医学系卫生室 周永红
中山大学生命科学学院药理学系 许实波

摘要 鲤鱼精巢 DNA 对组织匀浆自发的或由 Fe²⁺-Cysteine 体系激发的脂质过氧化作用均有显著的抑制作用,在 0.16~100 μg/mL 浓度范围内有明显的剂量依赖关系;小鼠 ig DNA 15 d,其脑、心、肝中丙二醛生成量明显减少;小鼠 ig DNA 45 d,其脑和肝脏中的脂褐素含量明显低于空白对照组。

关键词 鲤鱼精巢 脱氧核糖核酸 脂质过氧化 脂褐素

Studies on the Anti-lipid Peroxidation of DNA from Carp Spermary

Tang Xiaoli, Zhou Yonghong, Xu Shibo, *et al.* (Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

Abstract The anti-lipid peroxidation effect of deoxyribonucleic acid from carp spermary (CSDNA) was studied. Results of the study showed that CSDNA could markedly inhibit either spontaneous lipid peroxidation or that induced by Fe²⁺-Cysteine system in tissue homogenates in a dose-dependent manner within the range of 0.16~100 μg/mL. MDA content in the brain, heart and liver of mice reduced obviously after ig administration of CSDNA for 15 d. Lipofuscin levels in the brain and liver of mice were significantly lowered after ig administration of CSDNA for 45 d as compared with the control.

Key words carp spermary deoxyribonucleic acid lipid peroxidation lipofuscin

鲤鱼既是一种常见食用鱼,又是一种常用滋补中药,性味甘平,入脾、肾经,能利水消肿,下气通乳。雄性鲤鱼在发情期,它的精巢约占体重的十分之一,精巢的主要成分是核蛋白,由鱼精蛋白和脱氧核糖核酸(DNA)组成。鲤鱼精巢的药用价值未见文献报道,为了

科学合理地利用鲤鱼精巢,我们进行了鲤鱼精巢 DNA 的分离提取及其药理作用研究,发现鲤鱼精巢 DNA 的毒性极低,为实际无毒级物质^[1];小鼠服用鲤鱼精巢 DNA 后,对动物体内自身 DNA 的损伤具有明显的保护作用^[2];鲤鱼精巢 DNA 对果蝇和小鼠的生

* Address: Tang Xiaoli, Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou
唐孝礼 男,1997年12月毕业于中山大学生命科学学院药理学系,博士学位,现在中山医科大学药理学教研室从事博士后研究工作,研究方向为衰老生物学和神经药理学。曾参加国家自然科学基金、广东省自然科学基金等多项科研课题,已发表论文10余篇。