

绿茶提取物对小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶和葡萄糖转运能力的影响

全吉淑¹, 尹学哲², 柳明珠¹, 沈明花¹, 金 明¹

(1. 延边大学医学院 生物化学教研室, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学医学院附属医院, 吉林 延吉 133000)

茶叶对人体具有多种药理作用, 如降血糖、调血脂和抗氧化^[1]等, 这些作用是以茶叶中所含的茶多酚和茶多糖等活性物质为基础的。绿茶因富含茶多酚等有效成分, 具有很好的保健作用, 因此近年来作为一种畅销茶饮料走入人们的生活。笔者在动物实验中也发现, 绿茶对糖尿病大鼠具有明显的降糖作用, 主要表现在糖尿病大鼠负荷蔗糖或淀粉后其糖耐量的改善上。但关于绿茶降糖作用的机制目前尚不清楚。本研究绿茶提取物对大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性和兔小肠刷状缘囊泡葡萄糖转运能力的影响, 以期揭示绿茶降糖作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器: 日本 IWAKI 公司 REN-1 型旋转蒸发器、EYELA 公司 FDU-830 型冷冻干燥仪、东芝 HITACHI U-2010 型紫外分光光度仪和美国 Wallac 1209 Rackbeta 闪烁计数器。

1.2 绿茶提取物的制备: 绿茶为市售品, 江苏省溧阳市桂林茶场产品。100 g 绿茶用 2 L 蒸馏水浸泡过夜。重复提取 3 次后, 将提取液合并, 经减压蒸馏、冷冻干燥得干粉。此干粉为富含茶多酚的绿茶提取物 (其含茶多酚 37.9%, 茶多糖 6.1%)。

1.3 大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶冻干粉的制备: 将大鼠小肠解冻, 刮取黏膜, 在 5 倍体积含 5 mmol/L EDTA 的 pH 7.0 的 100 mmol/L 磷酸缓冲液中匀浆, $21\,000\times g$ 离心 60 min, 所得沉淀用 5 倍体积含 0.1% TritonX-100 的 pH 7.0、100 mmol/L 磷酸缓冲液在 4℃ 搅拌溶解 60 min。将其在 4℃、 $110\,000\times g$ 离心 90 min, 所得悬浮液用 pH 7.0、10 mmol/L 磷酸缓冲液在 4℃ 透析 24 h 后, 冷冻干燥即可得到 α -葡萄糖苷酶冻干粉^[2]。

1.4 蔗糖酶、麦芽糖酶及 α -葡萄糖苷酶活性的测定: 小肠黏膜蔗糖酶和麦芽糖酶活性的测定分两步进行。首先分别以蔗糖和麦芽糖为底物进行酶解反应, 标准反应液分别含 700 μ L 50 mmol/L 底物,

200 μ L 测试液和 100 μ L 酶液 (0.066 U)。在 37℃ 反应 30 min 后, 用 1.5 mL 2 mol/L Tris 液终止反应。取 50 μ L 反应液, 利用葡萄糖发色试剂盒 (Wako 公司) 以葡萄糖氧化酶法测定生成的葡萄糖含量^[2]。抑制酶活性 50% 时所需的绿茶提取物浓度定义为 IC_{50} 。 α -葡萄糖苷酶活性的测定则按文献方法进行^[3]。即取 10 μ L 测试液与 240 μ L 酶液 (0.053 U), 在 37℃ 预热 5 min 后, 加 750 μ L 10 mmol/L 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷溶液为底物, 置 37℃ 继续反应 15 min。用 0.5 mL Tris 溶液终止反应, 测定 400 nm 处吸光度 (A) 值。所用绿茶提取物质量浓度为 0.1~6 g/L, 并采用 Excel 软件计算 IC_{50} 值。

1.5 兔小肠上皮刷状缘囊泡悬液的制备^[4]: 将兔小肠剪断并用冷生理盐水充分洗涤后, 采用 $MgCl_2$ 沉淀法和序列离心法制备兔小肠上皮刷状缘囊泡悬液。首先将兔小肠浸泡于 300 mL 含 50 mmol/L 甘露醇的 pH 7.4 的 2 mmol/L HEPES [N -(2-hydroxyethyl) piperazine - N' -(2-ethanesulfonic acid)]-Tris 缓冲液中, 用载玻片将小肠黏膜刮下, 在冰浴以最大速度匀浆 2 min。加入 0.61 g 固体 $MgCl_2$ 后, 继续在冰浴中搅拌 20 min 以沉淀膜囊泡。4℃、 $3\,000\times g$ 离心 15 min 去除肌肉碎块, 4℃、 $35\,000\times g$ 继续离心 30 min 以分离膜囊泡。倾去上清液, 将所得囊泡用 10 mL 含 100 mmol/L 甘露醇、0.1 mmol/L $MgSO_4$ 的 pH 7.4 的 2 mmol/L HEPES-Tris 缓冲液溶解, 4℃、 $35\,000\times g$ 离心 40 min 以纯化膜囊泡, 所得囊泡用 3 倍体积含 300 mmol/L 甘露醇、0.1 mmol/L $MgSO_4$ 的 pH 7.4 的 10 mmol/L HEPES-Tris 缓冲液溶解, 用注射针头反复抽吸几次即可得到刷状缘囊泡悬液。用 Lowry 法测得含蛋白质约为 8~10 g/L。

1.6 小肠上皮刷状缘葡萄糖转运活性的测定: 以 3H -D-葡萄糖为底物, 采用快速过滤法^[5]测定刷状缘

收稿日期: 2004-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39960073)

作者简介: 全吉淑 (1968—), 女 (朝鲜族), 吉林省延吉市人, 副教授, 硕士, 主要研究方向为中草药中生物活性物质的分离及其药理作用研究。Tel: (0433) 2660588 E-mail: quanjs@public.yj.jl.cn

囊泡葡萄糖转运能力。将 20 μL 测试液与 20 μL 含 0.2 mmol/L 葡萄糖、0.3 MBq/mL ^3H -D-葡萄糖、200 mmol/L NaSCN、200 mmol/L 甘露醇的 pH 7.4 的 20 mmol/L HEPES-Tris 缓冲液混合后,加 20 μL 囊泡悬液在 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 s。加 1 mL 含 200 mmol/L NaCl、250 $\mu\text{mol/L}$ phlorizin 的 pH 7.4 的 10 mmol/L HEPES-Tris 冷终止液以终止反应。反应液中的囊泡立即抽滤到 Milipore HA 0.45 μm 过滤膜上,并用 1 mL 终止液重复洗涤 2 次。过滤膜立即放入闪烁瓶用闪烁计数器测定放射性。抑制葡萄糖转运活性 50% 时所需的提取物浓度定义为 IC_{50} 。所用绿茶提取物质量浓度为 0.1~1 g/L,并采用 Excel 软件计算 IC_{50} 值。

2 结果

2.1 绿茶提取物对大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性的影响:见表 1。绿茶提取物降低大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性,且呈剂量依赖性关系(图 1)。绿茶提取物对麦芽糖酶的 IC_{50} 值仅为 0.245 g/L,抑制活性最为明显。本实验同时测定富含多酚的乌龙茶和橄榄菜提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,绿茶提取物对麦芽糖酶抑制作用均强于二者,对蔗糖酶抑制作用较弱于乌龙茶,但明显强于橄榄菜提取物。

2.2 绿茶提取物对兔小肠刷状缘囊泡葡萄糖转运能力的影响:绿茶提取物降低兔小肠刷状缘囊泡的葡萄糖转运能力,且呈剂量依赖性关系(表 1)。将绿

表 1 绿茶提取物对小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性和葡萄糖转运能力的影响

Table 1 Effects of green tea extract on activities of α -glucosidase and glucose in transport ability of mucous membrane in small intestine

测试样品	$\text{IC}_{50}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$			
	α -葡萄糖苷酶 ($K_m=0.60 \text{ mol/L}$)	麦芽糖酶 ($K_m=1.67 \text{ mmol/L}$)	蔗糖酶 ($K_m=21.2 \text{ mmol/L}$)	葡萄糖 转运
绿茶提取物	0.584	0.245	2.92	3.49
乌龙茶提取物	0.826	0.312	2.53	—
橄榄菜提取物	0.176	0.361	4.01	—

茶提取液与刷状缘囊泡悬液保温时,保温时间(即作用时间)对葡萄糖转运作用的抑制效应几乎无影响,仅需作用几秒即可,说明其对刷状缘囊泡葡萄糖转运的抑制作用为快速反应。

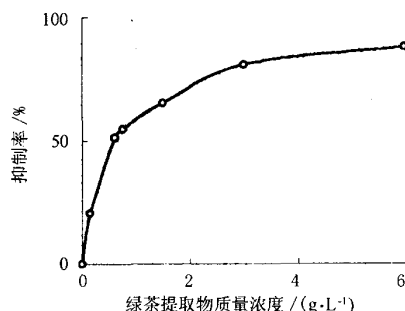


图 1 绿茶提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制效应

Fig. 1 Inhibition of green tea extract on α -glucosidase activities

3 讨论

在糖尿病降糖药物家族里 α -葡萄糖苷酶抑制剂是一组通过延缓糖的消化来达到降低餐后高血糖目的的口服降糖药,其作用特点是在糖消化的最后一步抑制双糖降解为单糖^[5]。其中与餐后血糖密切相关的主要有麦芽糖酶和蔗糖酶。肠道对葡萄糖的吸收则以葡萄糖转运体的主动吸收来完成,因此抑制葡萄糖转运活性也是降低餐后血糖的重要环节之一。本实验结果表明,绿茶提取物降低大鼠小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶活性,尤其明显降低麦芽糖酶活性;同时降低兔小肠刷状缘囊泡的葡萄糖转运能力,从而能够延缓糖类在肠道中的消化和吸收。笔者在动物实验中发现绿茶提取物对糖尿病模型大鼠具有明显降糖作用,尤其明显抑制负荷蔗糖或淀粉后血糖的持续升高趋势。这可能与绿茶提取物对小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶抑制及葡萄糖转运能力抑制有关。

References:

- [1] Deng Z Y, Tao B Y, Li X L, *et al.* Effect of tea on blood glucose, blood lipids and antioxidative activity in old rats [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), 1998, 18(2): 74-77.
- [2] Kawatama J, Kasai T S. α -Glucosidase inhibitor [P]. JP: 2000-229874A, 2000-08-22.
- [3] Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, *et al.* Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(1): 177-178.
- [4] Vedavanam K, Sriyanta S, O'Reilly J, *et al.* Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE) [J]. *Phytother Res*, 1999, 13: 601-608.
- [5] Garriga C, Moret6 M, Planas J M. Hexose transport in the apical and basolateral membranes of enterocytes in chickens adapted to high and low NaCl intakes [J]. *J Physiol*, 1999, 514(1): 189-199.