

药组均有抑制 SHR 进行性血压增高的趋势。给药 4 周、8 周养血清脑颗粒各剂量组均表现出降压效果; 基因谱表达结果表明, 两种荧光信号的比值小于 0.5 或大于 2 的基因有 121 个, 其中低表达的基因有 94 个, 高表达的基因 27 个, 养血清脑颗粒对 SHR 脑差异表达的已知基因 27 个, 其中表达上调 5 个, 下调 22 个。其中炎症相关基因 4 个, 包括 NM_002965、AJ131563、NM_012904、X73371; 与免疫相关基因 2 个, 包括 L22655、M28671; 与细胞内信号转导相关基因 4 个, 包括 NM_019140、NM_013197、NM_012564、NM_017293; 与药物代谢相关基因 2 个, 包括 NM_023025、BC087008; 与增殖相关基因 3 个, 包括 NM_173096、X52711、L09752; 与细胞发育和功能相关基因 3 个, 包括 NM_019140、NM_013013、NM_031635; 与细胞功能相关基因 2 个, 包括 M17084、NM_013096; DNA

合成相关基因 1 个, 即 NM_022183; 与血管扩张相关基因 1 个, NM_013096。养血清脑颗粒对高血压的调控可能是多方面的, 尽管目前尚不能完全解释这些基因的生物学功能与生理病理机制及基因群之间的相互作用, 但是本研究表明, 养血清脑颗粒可影响模型组大鼠基因表达, 从基因水平上阐释了养血清脑颗粒的药理作用, 同时为利用基因芯片技术探索药物作用的机制和作用靶点提供了思路与借鉴。

References:

- [1] Hu L M, Li J, Gao X M, *et al.* Effect of Yangxue Qingnao Granule on renal hypertension in rats and its mechanism [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2005, 39 (4): 47-49.
- [2] Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 467-470.
- [3] Schena M, Shalon D, Heller R, *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 93(20): 10614-10619.

大豆异黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究

全吉淑¹, 尹学哲², 柳明珠¹, 沈明花¹, 朴春梅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)

良好地控制血糖是糖尿病治疗的基本目标。英国糖尿病前瞻性研究(UKPDS)证明严格的血糖控制可以减少Ⅱ型糖尿病患者慢性血管并发症的发生^[1]。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碳水化合物的消化和吸收达到降低餐后高血糖目的口服降糖药, 其作用特点是在碳水化合物的消化最后一步抑制双糖降解为单糖^[2]。由于其独特的优势, 目前在临床上已广泛应用。最近笔者在动物实验中发现富含异黄酮的大豆胚轴提取物具有抑制糖尿病大鼠血糖增高和改善糖耐量的功效^[3]。在此基础上, 本研究从大豆胚轴分离纯化大豆异黄酮单体, 研究其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并对其抑制作用的性质进行分析。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器: 酵母 α -葡萄糖苷酶 (source: *Saccharomyces sp.*) 和牛血清白蛋白为日本 Wako 产品。Yamato GA32 型喷雾干燥机、Iwaki REN-1

型旋转蒸发仪、Eyela FDU-830 型冷冻干燥仪、Hitachi U-2010 型紫外分光光度仪和 Hitachi 高效液相色谱仪均为日本产。

1.2 大豆异黄酮的分离: 大豆冷冻干燥后剥离胚轴。将 3 kg 大豆胚轴用 12 L 50% 甲醇溶液提取后喷雾干燥得干粉 652 g。干粉用 10% 甲醇溶液溶解, 上 C₁₈ 反相色谱柱 (YMC, ODS-A60-S150, 5 cm×74 cm), 依次用 10%~100% 甲醇溶液梯度洗脱并收集各流出部分。大豆异黄酮单体的分离采用高效液相色谱法^[4], 色谱柱为 YMC ODS-AM-303 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相为含 1 mL 三氟乙酸的乙腈, 采用 15%~35% 乙腈线性梯度洗脱 50 min 和 35% 乙腈洗脱 5 min, 检测波长为 260 nm。所得大豆异黄酮组分为: 大豆苷 26 mg、黄豆苷 20 mg、染料木苷 12 mg、丙二酰大豆苷 122 mg、丙二酰黄豆苷 64 mg、丙二酰染料木苷 36 mg、大豆素 15 mg、黄豆苷元 10 mg、金雀异黄素 4 mg。

收稿日期: 2005-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30360113)

作者简介: 全吉淑 (1968—), 女 (朝鲜族), 吉林省延吉市人, 硕士, 副教授, 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

1.3 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定: α -葡萄糖苷酶的抑制活性的测定采用渡边等^[5]的方法。将 α -葡萄糖苷酶溶于含有 1 g/L 牛血清白蛋白的 pH 7.0, 100 mmol/L 磷酸缓冲液中作为酶液,4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷溶于相同缓冲液中作为底物液。取 10 μ L 样品、240 μ L (0.053 U) 酶液和 750 μ L 底物液,在 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min。用 0.5 mL Tris 溶液终止反应,测 $A_{400\text{ nm}}$,计算半数抑制浓度 IC_{50} 值。 IC_{50} 定义为抑制酶活性 50% 时所需的抑制剂浓度。计算 IC_{50} 时,所用样品浓度范围为抑制酶活性 40%~60%,并采用 Excel 软件计算 IC_{50} 值。

1.4 抑制作用类型的确定:改变酶反应体系的底物浓度,以 $1/[S]$ (底物浓度倒数) 为横坐标, $1/V$ (速度倒数) 为纵坐标绘制双倒数曲线。并加入金雀异黄酮使其终浓度分别为 5 和 10 μ mol/L,以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标作双倒数图。根据双倒数图确定抑制类型,根据双倒数方程计算 α -葡萄糖苷酶的米氏常数 K_m 及解离常数 K_i 。

2 结果

2.1 大豆异黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用:结果表明大豆异黄酮具有很强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,且呈明显剂量依赖关系,见图 1。异黄酮游离苷元对 α -葡萄糖苷酶抑制活性最强,大豆葡萄糖苷形式抑制活性较弱,丙二酰葡萄糖苷形式则无抑制活性,见表 1。大豆异黄酮苷元不同形式之间抑制活性也不同,其中金雀异黄酮抑制活性最强,大豆素次之,黄豆苷元为最弱。本实验同时测定了绿茶和乌龙茶水提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,二者的抑制活性较大豆异黄酮苷元及其糖苷比较,弱很多倍。

2.2 抑制作用类型的判断:以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标作双倒数曲线,见图 2。最大反应速度随抑制剂浓度的增大而变小,米氏常数保持不变,因此推测,金雀异黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用属于非竞争性

抑制。根据非竞争性抑制作用的动力学方程求得 $K_m=2.72\times10^{-3}\text{ mol/L}$, $K_i=6.31\times10^{-6}\text{ mol/L}$ 。

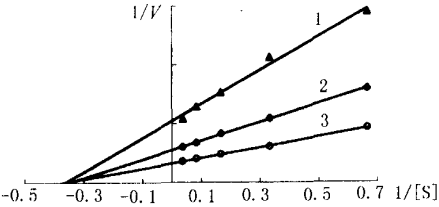
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

其中 V 为酶反应速度, $V_{\max}$ 为最大速度, $[S]$ 为底物浓度, $[I]$ 为抑制剂浓度, K_m 为酶的米氏常数, K_i 为酶的解离常数

表 1 大豆异黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制
Table 1 Inhibitory effect of soybean isoflavones on α -glucosidase activities

大豆异黄酮	$IC_{50}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
大豆素(二异黄酮)	7.1×10^{-5}
金雀异黄酮(染料木酮)	2.1×10^{-5}
黄豆苷元	1.5×10^{-4}
大豆苷	5.0×10^{-4}
染料木苷	1.9×10^{-4}
黄豆苷	6.0×10^{-4}
丙二酰葡萄糖苷	—
绿茶提取物	0.13
乌龙茶提取物	0.17

* : 绿茶和乌龙茶提取物的 IC_{50} 单位为 g/L
* : IC_{50} unit of green tea and oolong extracts is g/L



1-无抑制剂 2-金雀异黄酮 5 μ mol/L 3-金雀异黄酮 10 μ mol/L
1-without inhibitor 2-genistein 5 μ mol/L 3-genistein 10 μ mol/L

图 2 金雀异黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制的双倒数图
Fig. 2 Double-reciprocal plots of inhibition kinetics of genistein on α -glucosidase

3 讨论

已有足够的证据表明,增高的血糖水平在 II 型糖尿病慢性血管并发症特别是微血管并发症(肾病、视网膜病变和神经病变)的发生及发展过程中起了重要的作用,而严格的血糖控制则可以明显降低这些并发症的发生率。目前的降糖治疗有饮食控制、运动治疗、口服降糖药及胰岛素治疗等方法。 α -葡萄糖苷酶抑制剂通过延缓或减慢碳水化合物在肠道的消化和吸收,主要抑制餐后血糖水平的升高,同时也能在一定程度上降低空腹血糖,它的出现使口服降糖药物的行列增添了新的一员。

豆制品中富含的异黄酮类是近年来受到食品科学界广泛关注的非营养成分,它主要包括以糖苷结合形式存在的染料木苷、大豆苷和黄豆苷。大豆经加工、微生物发酵或体外酸水解作用,其糖苷部分脱

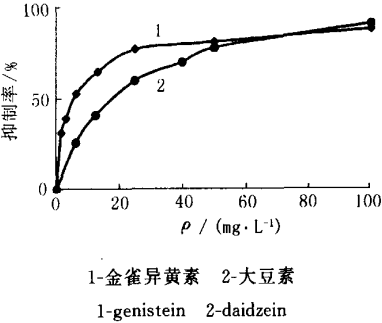


图 1 金雀异黄酮和大豆素对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用
Fig. 1 Inhibitory effects of genistein and daidzein on α -glucosidase activity

离,释放出游离形式染料木素、大豆素和黄豆素,这3种形式的异黄酮可被肠道有效吸收。本研究结果表明,大豆异黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用很强,均强于具有降糖减肥效用的绿茶和乌龙茶。其对 α -葡萄糖苷酶抑制活性由强到弱顺序为金雀异黄素>大豆素>黄豆苷元>染料木苷>大豆苷和黄豆苷,说明异黄酮环状结构的羟基和双键在酶抑制作用中起重要作用。根据双倒数作图确定抑制类型结果为非竞争性抑制作用,金雀异黄素对 α -葡萄糖苷酶抑制的米氏常数为 $2.72 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$,较小,说明大豆异黄酮与 α -葡萄糖苷酶亲和能力较强,抑制活性较高。大豆异黄酮广泛存在于大豆和豆制品中,这种存在形式也为人类摄入时的安全性提供了可靠

保证。因此,大豆异黄酮有望成为防治糖尿病的新的天然健康食品和药物。

References:

- [1] Mooradian A D, Thurman J E. Drug therapy of postprandial hyperglycemia [J]. *Drugs*, 1999, 57(1): 19-29.
- [2] Kim J S, Kwon C S, Son K H. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(11): 2458-2461.
- [3] Quan J S, Yin X Z, Jin M, et al. Effects of soybean hypocotyl extract on blood sugar, blood lipid and lipid peroxides in diabetic rats [J]. *J Med Sci Yanbian Univ* (延边大学医学学报), 2001, 24(4): 243-244.
- [4] Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill) [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2227-2233.
- [5] 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.

六味地黄制剂对糖尿病肾病大鼠肾功能的影响

吕妍,王新,唐方

(天津医科大学总医院 中医科,天津 300052)

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的严重并发症和主要死亡原因。目前尚缺乏有效的防治DN的手段。如何有效地治疗DN,延缓肾脏功能减退的进程,是广大临床医师必须面对并亟待解决的难题。本课题组通过观察六味地黄制剂对DN大鼠肾脏功能的影响,旨在阐释中医经典方药延缓和控制DN的作用机制。

1 材料

1.1 动物:雄性SD大鼠,平均体重(250 ± 20)g,批号SCXK(京)2002-0001,购自北京大学医学部。

1.2 药物:链脲佐菌素(STZ)购自Sigma公司;六味地黄制剂由天津乐仁堂制药厂提供,批号C058011。

1.3 试剂:尿蛋白试纸,购自广州市珠江生化试剂有限公司;尿蛋白、尿素氮(BUN)、血清肌酐酐(SCr、尿肌酐(UCr)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 主要仪器:乐康全活力型血糖仪及试纸,德国;TL-18M台式高速冷冻离心机,上海;H ZS-H水浴振荡器,上海;UV-Vis8500型紫外分光光度计,上海。

2 方法

2.1 实验分组、模型制备及给药:将45只实验大鼠在10%水合氯醛ip麻醉下行右侧肾脏结扎术,结扎肾动脉、肾静脉、输尿管。2周后,将术后大鼠随机分为对照组、模型组及给药组,每组15只。模型组和给药组大鼠禁食18h后,按50mg/kg ip 2% STZ(2g STZ溶于0.1mmol/L枸橼酸缓冲液中, pH 4.2)诱导糖尿病,再随机分为2周、4周和8周组,每组各5只。对照组ip等量枸橼酸缓冲液。对照组和模型组ig等量蒸馏水,给药组ig六味地黄制剂24.9g/kg(相当于人体给药量的10倍),每天2mL。各组均ig给药8周。造模注射48~72h后,以血糖 $\geq 13.6 \text{ mmol/L}$,尿蛋白+++为造模成功。模型成功率90%。各组大鼠于模型成功后,自由饮水2、4、8周,终止试验。分别称体重,留取24h尿样,尾静脉取血测血糖,股动脉取血,分离血清,冷藏备用。

2.2 观测指标:各组分别采用CBB法进行尿蛋白定量;采用苦味酸法测定SCr和UCr;采用二乙酰-肟法测定BUN,紫外分光光度计比色检测。计算肌酐消除率($\text{UCr} \times 24 \text{ h 尿量} / \text{SCr}$)。