

多管藻总酚降血糖作用实验研究

柳全文^{1,3}, 张婷⁴, 刘珂^{2*}, 范晓^{3*}, 韩丽君³, 李小荣¹

(1. 鲁东大学化学与材料科学学院, 山东烟台 264025; 2. 烟台大学药学院, 山东烟台 264003;

3. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 4. 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要:目的 研究多管藻总酚(total phenols from *Polysiphonia urceolata*, TPPU)对正常小鼠和四氧嘧啶糖尿病小鼠糖耐量及空腹血糖的影响,并探讨其降糖作用机制。方法 观察TPPU对 α -葡萄糖苷酶活性的体外抑制作用;测定TPPU对蛋白质酪氨酸磷酸酯酶1B(PTP1B)抑制活性;正常小鼠ig给药,测定空腹血糖和糖耐量;四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型ig给药,测定空腹血糖及糖耐量。结果 TPPU 15 g/L能够显著抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,抑制率达75.12%;有明显的体外抑制PTP1B活性的作用,其IC₅₀为5.7 μ mol/L;TPPU对正常小鼠无降血糖作用,但可使糖耐量曲线趋于平缓;能够显著提高四氧嘧啶致糖尿病小鼠糖耐量,降低实验性糖尿病小鼠的空腹血糖。结论 TPPU具有一定的降血糖作用。

关键词:多管藻;糖耐量; α -葡萄糖苷酶;蛋白质酪氨酸磷酸酯酶1B(PTP1B)

中图分类号:R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)03-0415-04

Experimental study on antidiabetic effect of total phenols from *Polysiphonia urceolata*LIU Quan-wen^{1,3}, ZHANG Ting⁴, LIU Ke², FAN Xiao³, HAN Li-jun³, LI Xiao-rong¹

(1. School of Chemistry & Material Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. School of Pharmacy,

Yantai University, Yantai 264003, China; 3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences,

Qingdao 266071, China; 4. School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Key words: *Polysiphonia urceolata* (Lightf.) Grev.; glucose tolerance; α -glucosidase; PTP1B

多管藻 *Polysiphonia urceolata* (Lightf.) Grev. 广泛分布于我国山东沿海,前期曾经采用高通量方法对山东沿海海藻进行活性筛选,发现多管藻的乙醇、氯仿提取物对KB细胞或HT-29细胞具有选择抑制活性^[1]。本课题组对海藻提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂进行初步筛选实验中发现多管藻提取物对酶活性抑制率达到46.31%^[2];同时也对分布于青岛沿海的多管藻中的酚类物质进行了初步的实验研究^[3]。为了扩大多管藻生物活性应用研究,本实验从降血糖作用角度,系统研究了多管藻总酚(total phenols from *Polysiphonia urceolata*, TPPU)对正常小鼠和糖尿病小鼠糖耐量及空腹血糖的影响,并探讨了其对 α -葡萄糖苷酶和蛋白质酪氨酸磷酸酯酶(PTP1B)活性的抑制作用。

1 材料

1.1 药物:TPPU,从青岛沿海的多管藻 *P. urceolata* (Lightf.) Grev. 中提取得到,其质量分数>60%,多管藻样品由中国科学院海洋研究所范

晓研究员鉴定。拜糖平,德国拜耳公司,批号19990205;降糖灵片,江苏省金坛市制药厂生产,批号020514。

1.2 动物:清洁级昆明种小鼠,雄性,体重(25 \pm 2)g,由山东省天然药物工程技术研究中心动物实验中心提供,合格证号:SYXK(鲁)20030020。

1.3 试剂与仪器:血糖试剂盒(保定长城临床试剂公司);血糖仪(强生); α -葡萄糖苷酶(type I, Sigma);四氧嘧啶,Sigma公司生产;甲醇、二甲亚砜(DMSO)等溶剂、化学试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制作用:参考文献方法^[4]。小鼠小肠黏膜糖苷酶的提取:取小鼠上端小肠(包括十二指肠和空肠上部)20g,加4℃预冷的pH 6.8磷酸盐缓冲液60mL,匀浆,4℃4000 r/min离心20min,取上清液分装入试管中,-20℃冷冻备用,制得酶提取液。取酶液0.2mL,加pH 6.8磷酸盐缓冲液0.7mL,37℃水浴10min,加入

收稿日期:2006-07-17

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30530080);国家“863”高技术发展计划专项(2001AA620403);鲁东大学博士基金项目(20062901)

作者简介:柳全文(1974—),男,山东烟台人,副教授,博士,从事药物化学的教学和研究工作。E-mail: qwliu2001@yahoo.com.cn

*通讯作者 刘珂 范晓

0.5 mol/L 蔗糖 0.1 mL, 反应 20 min 后, 加入 0.1 mol/L Na₂CO₃ 1 mL 终止反应。酶法测定葡萄糖浓度, 平行测定 3 管。以在 37 °C、pH 6.8 条件下, 1 L 溶液中每分钟生成 1 μmol 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

分别取药液 0.2 mL (空白对照组加同体积蒸馏水), 加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 0.6 mL, 加酶液 0.1 mL, 37 °C 水浴 10 min, 其余同酶活性测定。计算药物对 α-葡萄糖苷酶的抑制率。

抑制率 = (对照组酶活力 - 药物组酶活力) / 对照组酶活力 × 100%

2.2 体外抑制 PTP1B 活性试验: 利用分子生物学手段在大肠杆菌系统表达人源 PTP1B (hPTP1B) 催化活性域, 经纯化后的 hPTP1B 重组蛋白能水解底物对硝基苯磷酸二钠盐 (pNPP) 的磷酸键, 得到的产物在 410 nm 处有很强的光吸收, 因此可以通过直接检测 410 nm 处吸光度值来观察酶的活性变化以及化合物对酶活性的抑制情况。标准的测活体系如下: 10 mmol/L Tris · Cl, pH 7.6, 10 mmol/L pNPP, 2% DMSO, 100 nmol/L hPTP1B。动态测定波长为 410 nm 处的吸光度值, 时间为 3 min, 其动力学曲线一级反应的斜率作为酶的活性指标。筛选结果是首先观察 TPPU 对酶活性的抑制率, 确定抑制率略高于 50% 时的 TPPU 质量浓度, 然后在此质量浓度上下配制成 5 个质量浓度, 进行线性回归, 筛选出 IC₅₀。实验中阳性对照正钒酸钠的 IC₅₀ 为 2 μmol/L。

2.3 对正常小鼠糖耐量的影响: 雄性小鼠 60 只, 体重 24~28 g, 测空腹血糖值后, 随机分为 5 组: 生理盐水对照组; TPPU 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组; 拜糖平 (18.5 mg/kg) 组。各组分别 ig 0.5 mL 药液, 10 min 后 ig 淀粉 (10 g/kg) 0.5 mL, 分别于给淀粉后 0.5、1、2 h 尾部取血测血糖值。

2.4 对四氧嘧啶模型小鼠糖耐量的影响: 雄性小鼠 64 只, 分成 3 组, 禁食 (不禁水) 12 h 后, 尾 iv 55 mg/kg 新配制的四氧嘧啶生理盐水液, 连续 3 次, 每天 1 次。72 h 后尾部取血测血糖值, 选血糖值 > 11 mmol/L 的小鼠 50 只, 随机分为 5 组: 模型组, TPPU 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组, 拜糖平 (18.5 mg/kg) 组, 各组分别 ig 0.5 mL 药液, 10 min 后 ig 淀粉 (10 g/kg) 0.5 mL, 分别于给淀粉后 0.5、1、2 h 尾部取血测血糖值。

2.5 对小鼠空腹血糖的影响

2.5.1 对正常小鼠空腹血糖的影响: 雄性小鼠 50 只, 待其空腹 6 h 后测定血糖, 根据血糖值随机分为 5 组, 分别为正常对照组; TPPU 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组; 降糖灵 (100 mg/kg) 组。各组 ig 给药, 每天 1 次, 连续 7 d, 末次 ig 2 h 后禁食 12 h, 小鼠尾部取血测血糖值。

2.5.2 对四氧嘧啶模型小鼠空腹血糖的影响: 小鼠按 2.4 项方法复制四氧嘧啶模型, 取雄性模型小鼠 60 只, 随机分 5 组: 模型组; TPPU 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组; 降糖灵 (100 mg/kg) 组, 各组 ig 给药, 每天 1 次, 连续给药 30 d, 每 10 天称体重 1 次, 根据体重调整给药量; 分别于第 10、20、30 天末次 ig 给药 2 h 后禁食 12 h, 小鼠尾部取血测血糖值。另设正常对照组, 小鼠不造模, 于相应时间测血糖值。

3 结果

3.1 对 α-葡萄糖苷酶的体外抑制活性: 结果表明, 当 TPPU 质量浓度为 5 g/L 时, 抑制率为 52%, 当 TPPU 质量浓度达到 15 g/L 时能够显著抑制 α-葡萄糖苷酶的活性, 抑制率达 75.12%, 此后随质量浓度升高抑制率无明显改变; 阳性对照药 α-葡萄糖苷酶抑制剂拜糖平 1.25 g/L 时抑制率为 92.99%, 说明 TPPU 在质量浓度高于 15 g/L 时, 具有较好的 α-葡萄糖苷酶抑制作用。

3.2 体外对 PTP1B 的抑制活性: TPPU 有明显的体外抑制 PTP1B 活性的作用, 其 ID₅₀ 为 5.7 μmol/L。

3.3 对正常小鼠糖耐量的影响: 由表 1 可见, 正常小鼠给淀粉后 0.5、1 h 血糖显著升高。TPPU 能够显著降低小鼠给淀粉后 0.5、1 h 血糖值, 高剂量还能够显著降低 2 h 血糖值。

表 1 TPPU 对正常小鼠糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 1 Effect of TPPU on glucose tolerance in normal mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	空腹血糖/ (mmol · L ⁻¹)	给淀粉后血糖/(mmol · L ⁻¹)		
			0.5 h	1 h	2 h
对照		3.11 ± 0.10	15.10 ± 3.02	15.80 ± 3.58	6.55 ± 1.49
TPPU	50	3.46 ± 0.43	13.02 ± 1.98	14.80 ± 2.38	5.38 ± 2.09
	100	3.04 ± 0.78	8.92 ± 2.18*	9.65 ± 2.54*	5.71 ± 1.89
	200	3.28 ± 0.52	6.75 ± 2.21**	7.00 ± 2.23**	5.01 ± 2.10
拜糖平	18.5	3.29 ± 0.51	4.03 ± 0.70**	5.09 ± 1.01**	3.69 ± 0.81**

与对照组比较: *P < 0.05 **P < 0.01

*P < 0.05 **P < 0.01 vs control group

3.4 对四氧嘧啶模型小鼠糖耐量的影响: 由表 2 可见, 模型小鼠给淀粉后 0.5、1 h 血糖显著升高, TPPU 中、高剂量组能够显著降低模型小鼠给淀粉后 0.5、1 h 血糖值。

表 2 TPPU 对四氧嘧啶模型小鼠糖耐量的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of TPPU on glucose tolerance in alloxan-induced diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	空腹血糖值/ (mmol·L ⁻¹)	给淀粉后血糖/(mmol·L ⁻¹)		
			0.5 h	1 h	2 h
模型	—	15.86±2.33	29.30±3.11	30.12±2.61	20.08±2.17
TPPU	50	16.51±3.14	26.70±3.15	27.91±2.98	18.36±3.24
	100	16.94±4.17	22.90±2.08*	23.22±3.01*	18.04±3.03
	200	17.01±3.22	19.50±3.23*	18.04±2.57**	17.96±2.32
拜糖平	18.5	15.91±2.25	17.60±0.46**	18.30±1.22*	16.33±0.79**

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

3.5 对小鼠空腹血糖的影响:TPPU 对正常小鼠空腹血糖的影响见表 3,与正常对照组相比,TPPU 低、中、高剂量组空腹血糖均无明显变化,说明对正常小鼠空腹血糖无明显影响。TPPU 对四氧嘧啶模型小鼠空腹血糖的影响见表 4,正常对照组与模型组比较有显著差异(P<0.01),说明造模是成功的,TPPU 低、中、高剂量组与模型组相比,高剂量组在第 20 天血糖已显著降低,中剂量组在第 30 天血糖显著降低。

表 3 TPPU 对正常小鼠空腹血糖值的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of TPPU on fasting blood glucose level in normal mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)	
		给药前	给药后
对照	—	3.66±0.87	3.60±0.78
TPPU	50	3.70±1.01	3.68±0.88
	100	3.58±0.90	3.34±1.16
	200	3.62±0.92	3.41±0.95
降糖灵	100	3.70±0.77	3.32±0.89

表 4 TPPU 对四氧嘧啶模型小鼠空腹血糖的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of TPPU on fasting blood glucose level in alloxan-induced diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)			
		给药前	给药第 10 天	给药第 20 天	给药第 30 天
正常	—	3.50±0.13**	3.47±0.20**	3.59±0.34**	3.60±0.56**
模型	—	18.06±2.31	20.86±2.98	21.89±3.55	22.67±3.79
TPPU	50	17.77±3.94	21.19±4.89	20.35±4.98	17.49±3.76
	100	18.42±3.45	22.25±3.48	19.02±4.02	15.69±3.91*
	200	19.23±3.37	20.59±4.07	16.05±3.46*	14.37±3.37*
降糖灵	100	18.29±3.87	21.01±3.13	16.11±2.45*	14.82±3.24*

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

4 讨论

α -葡萄糖苷酶能催化 α -1,4-糖苷键水解,是小肠内麦芽糖、蔗糖等寡糖水解的酶^[5]。抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,可使葡萄糖的生成和吸收减缓,降低餐

后血糖峰值,调整血糖水平,从而减少高血糖对胰腺的刺激,提高胰岛素敏感性,保护胰腺的功能,有效预防并改善糖尿病并发症的发生和发展^[6]。本实验发现,TPPU 具有 α -葡萄糖苷酶抑制剂的作用,能够明显提高小鼠糖耐量,降低餐后血糖。

PTP1B 酶抑制剂具有独特的治疗 2 型糖尿病的作用机制,因为胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发生、发展过程中的关键因素,而特定蛋白质酪氨酸磷酸酯酶(PTPases)和胰岛素通路中酪氨酸激酶间酶活性的不平衡可能是引起 2 型糖尿病胰岛素抵抗的原因。胰岛素通过与其受体胞外 α 亚单位结合激活受体胞内 β 亚单位内在的酪氨酸激酶活性,导致调节结构域中关键的酪氨酸残基自身磷酸化,从而完全激活胰岛素受体酪氨酸激酶活性,胰岛素受体酪氨酸激酶再通过磷酸化其底物将信号传递下去。随着对细胞内胰岛素作用通路中可逆性酪氨酸磷酸化认识的加深,PTPases 在平衡该通路中相关蛋白酪氨酸磷酸化水平中的作用越来越受到重视^[7]。PTP1B 是最早被纯化和确定生物学特征的 PTPase,全长大约 5.0×10^4 。Elchebly 等^[8]报道,运用同源重组的方法产生的 PTP1B 基因敲除的小鼠生长正常,有生殖力,对胰岛素敏感性显著增强,而且这一增强作用与肝脏和骨骼肌中胰岛素受体及胰岛素受体底物 1 磷酸化水平的增强相关,因此,通过寻找选择性作用于该通路中 PTPases 的抑制剂抑制其活性,加强和延长胰岛素信号,成为越来越受重视的治疗 2 型糖尿病的新途径。TPPU 具有 PTP1B 酶抑制剂作用。

本研究发现 TPPU 对正常小鼠无降血糖作用,但可使糖耐量曲线趋于平缓;TPPU 能够显著降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖,提高模型小鼠糖耐量,这可能是因为 TPPU 能够促进已损伤胰岛 β 细胞的修复与再生,增强胰岛的分泌功能。此外,这一结果进一步说明可能与 TPPU 增强组织靶细胞胰岛素受体的敏感性有关。

鉴于 TPPU 良好的降糖作用,建议对其体内的次生代谢产物做进一步的研究,以 α -葡萄糖苷酶抑制作用和 PTP1B 酶抑制活性为活性指导,对其化学成分进行提取、分离、结构鉴定以及对其单一酚类成分进行降血糖活性研究,从而寻找具有治疗糖尿病开发前景的活性先导化合物。

References:

[1] Xu N J, Fan X, Han L J, et al. Screening marine algae from Shandong coast for antitumor activity [J]. *Oceanol Limnol Sin* (海洋与湖沼), 2001, 32(4): 408-413.
[2] Li X C, Fan X, Han L J, et al. Screening for α -glucosidase

- inhibitors from the macroalgal extracts [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2002(2): 8-11.
- [3] Zhang L X, Hang H, Lu M S, *et al.* The preliminary studies of phenols in *Polysiphonia* [J]. *J Qingdao Univ* (青岛大学学报), 1999, 12(3): 82-85.
- [4] Huang Z, Ma J, Yuan A H, *et al.* Isolation and screening of glucosidase inhibitors from Chinese medicines [J]. *J Med Coll PLA* (军医大学学报), 2004, 19(2): 108.
- [5] Miller D, Crane R K. The digestive function of the epithelium of the small intestine. I. Localization of disaccharide hydrolysis in the isolated brush border portion of intestinal epithelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1961, 52: 293-298.
- [6] Fu Y, Hu B R, Tang Q, *et al.* Effect of jatrorrhizine, berberine, Huanglian Decoction and compound-mimic prescription on blood glucose in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 549-551.
- [7] Egawa K, Maegawa H, Shimizu S, *et al.* Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in L6 myocytes and fao hepatoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (13): 10207-10211.
- [8] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene [J]. *Science*, 1999, 283: 1544-1548.

人参总皂苷对人慢性粒细胞性白血病 K562 细胞 Fas、sFas 和 FasL 的影响

陈婷梅¹, 张 健², 曹唯希¹, 姜 容³, 王亚平³

(1. 重庆医科大学 医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学 组织胚胎学教研室, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400012)

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 是祖国医学“补气”要药, 人参总皂苷 (total saponins of *Panax ginseng*, TSPG) 是其主要有效部位。既往研究已经证明 TSPG 既能促进造血干/祖细胞增殖分化及其信号转导, 诱导造血生长因子基因表达^[1], 又能诱导白血病细胞凋亡和向较成熟细胞分化^[2,3]。诱导细胞凋亡的信号和转导途径多种多样, 其中 Fas-FasL 途径属于死亡因子及其受体介导的信号转导途径。本实验就 TSPG 诱导人慢性粒细胞性白血病 K562 细胞凋亡的信号转导机制进行探讨, 旨在为研究 TSPG 治疗白血病等肿瘤的机制提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 药物: TSPG 购自重庆中药研究所, 质量分数 95% 以上, 用 RPMI-1640 液配成所需浓度。

1.2 细胞株: 人慢性粒细胞性白血病细胞株 K562 细胞, 由本室保存, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 液常规传代培养。

1.3 试剂与仪器: RPMI-1640 培养基, 美国 Gibco 公司产品; 小牛血清购自杭州四季青公司。小鼠抗人 Fas、FasL 单克隆抗体、可溶性 Fas (soluble Fas, sFas) 检测 ELISA 试剂盒由 The Scripps Research Institute (San Diego) 罗云萍博士惠赠, SP 染色组

化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。酶标仪购自 Bio-Rad 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞处理^[2]: 取对数生长期 K562 细胞, 使终浓度为 1×10^5 /mL。实验组培养体积中加入 100 μ g/mL TSPG; 对照组加等量的 RPMI-1640 培养液。分别培养 3、6、9 d, 取样测定。

1.4.2 TSPG 对 K562 细胞 Fas 表达的影响: 取对照组和实验组细胞, PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次后, 离心甩片; 加入过氧化物酶阻断剂, 室温 10 min; 加封闭血清, 室温 15 min, 再加小鼠抗人 Fas 单克隆抗体 (工作浓度分别为 1:200), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 取出洗涤 3 次, 加链亲和素-过氧化物酶; 再加新鲜配制的 DAB 溶液, 用水冲洗, 苏木素复染, 待干镜检, 同时设立不加一抗 (以 PBS 代替) 的阴性对照; 图像分析仪计数每例 300 个细胞, 计算阳性表达率。

1.4.3 TSPG 对 K562 细胞 FasL 表达的影响: 取对照组和实验组细胞, 同上处理细胞进行免疫细胞化学染色, 小鼠抗人 FasL 单克隆抗体工作浓度为 1:100, 同时设立不加一抗的阴性对照组, 图像分析仪计数每例 300 个细胞, 计算阳性表达率。

1.4.4 TSPG 对 K562 细胞培养上清液中 sFas 水

收稿日期: 2006-09-08

作者简介: 陈婷梅 (1969—), 女, 重庆市人, 博士, 副教授, 主要研究方向为肿瘤细胞逆转、分化和凋亡及其机制的研究。

Tel: (023) 68485725(O) E-mail: chentingmei@sohu.com