

表 4 地龙提取物中游离氨基酸成分分析
Table 4 Analysis of free amino acid content
in *Pheretima* extracts

| 氨基酸 | 质量分数/% | 氨基酸 | 质量分数/% |
|--------|--------|------|--------|
| 牛磺酸 | 0.48 | 异亮氨酸 | 2.31 |
| 天冬氨酸 | 0.173 | 亮氨酸 | 5.92 |
| 苏氨酸 | 1.10 | 酪氨酸 | 0.354 |
| 丝氨酸 | 0.832 | 苯丙氨酸 | 2.95 |
| 谷氨酸 | 0.572 | 赖氨酸 | 1.31 |
| 甘氨酸 | 0.635 | 组氨酸 | 0.332 |
| 丙氨酸 | 3.2 | 色氨酸 | 0.295 |
| γ-氨基丁酸 | 0.194 | 精氨酸 | 0.922 |
| 缬氨酸 | 2.50 | 脯氨酸 | 1.17 |
| 蛋氨酸 | 0.746 | 总氨基酸 | 26 |

3 讨论

实验结果表明,地龙提取物可明显延长小鼠凝血、出血时间及家兔离体血浆复钙时间,提示地龙提取物能抑制内源性凝血系统,具有抗凝血作用。

地龙提取物含有 19 种游离氨基酸,总量达 26% 以上。游离的谷氨酸、甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、和组氨酸或是神经递质或是递质的前体物质,且质量分数最高的几种氨基酸缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸为脑内的能源物质,上述物质易通过血脑屏障,具有促进神经细胞更新、调节神经递质代谢、维护神经功能及抗脑组织缺氧等作用。另外量较高的苯丙氨酸、赖氨酸和精氨酸在心血管方面也有重要的作用^[5],赖氨酸是优良的血栓预防剂,与蛋氨酸合用能抑制重高血压病^[6];苯丙氨酸能预防某些有高血压病家族史“易感者”发病,降低心血管疾病的发病率;还可对抗自由基,防治缺血-再灌注损伤^[7];精氨酸是人体半必需氨基酸,可通过 L-Agr-NO 途径扩张血管、抑制血小板聚集、减少氧自由基损伤,用于治疗缺血性心脏病、高血压、肺动脉高压症、动脉粥样硬化等疾病^[8]。综上所述,推测地龙提取物中所含有

的游离氨基酸可能是地龙抗凝血作用的主要有效成分。

以往的多数研究认为地龙纤溶酶是抗血栓活性的有效成分,但临床上用的多为口服制剂,而口服的酶制剂在消化系统易被水解为氨基酸进入血液,因而推测地龙纤溶酶口服时实际发挥疗效的物质可能是其水解产物。本实验所用的不含活性纤溶酶的提取物具有抗凝血活性,且主要含有丰富的游离氨基酸,所以推断其氨基酸可能是临床上实际发挥抗凝血疗效的物质。

References:

- [1] Zhu D C, Zhang L H, Wang Y J. Separating and screening of the anti-inflammatory part of *Lumbricus* animal [J]. *J Dalian Inst Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2004, 23(1): 34-38.
- [2] Chen X D, Tian D F, Liu H P, et al. An Investigation to the effect to *Pheretima* Decoction on bleeding time and blood clotting time in healthy young people [J]. *J Tradit Chin Med Univ Hunnan* (湖南中医学院学报), 2003, 23(2): 10-11.
- [3] Chen Q. *Experimental Methodology in Pharmacological of Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [4] Tang S S, Teng D, Wang X H. Pharmacodynamics of Agacutin: a thrombin-like enzyme from *Aghkistrodon acutus* [J]. *Acta Acad Med Xuzhou* (徐州医学院学报), 2005, 25(4): 308-312.
- [5] Lin Y Z, Lin X Y, Wan F D, et al. The preparation and biological activity of hydrolysate of swine brain [J]. *Amino Acids Biotic Resour* (氨基酸和生物资源), 1999, 21(3): 5-8.
- [6] Tian J B, Jia X B, Yang Z H, et al. Application, production and market expectation of L-Lysine [J]. *Amino Acids Biotic Resour* (氨基酸和生物资源), 2004, 26(1): 44-46.
- [7] Peng K Y, Jin X R. Effects of cysteine and phenylalanine on pulmonary circulation and cerebral blood flow in chronic hypoxic rats [J]. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 1996, 12(2): 153-156.
- [8] Zhang J F, Gao L R, Lin Q H. Effects of treatment of cardiovascular diseases [J]. *J Cardiovasc Pulmon Dis* (心肺血管病杂志), 1994, 13(2): 125-127.

虎杖提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

郑晓媛, 杜俊蓉*, 杨芳, 彭海燕, 陈维, 喻冬柯

(四川大学华西药学院 药理教研室, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 研究虎杖水溶性提取物对 α-葡萄糖苷酶的作用。方法 采用大孔吸附树脂柱色谱法进行虎杖水溶性总提取物初步分离, 研究其总提取物和不同组分对 α-葡萄糖苷酶活性的影响及其抑制反应的类型。结果 虎杖总提取物 (RRPC) 与 30% 醇洗脱物 (RRPC II) 对 α-葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 分别为 74.15 μg/mL, 而蒸馏水 (RRPC

收稿日期: 2006-10-13

基金项目: 四川大学辐射物理及技术教育部重点实验室开放基金资助 (LF04004)

* 通讯作者 杜俊蓉 Tel: (028) 85503938 E-mail: dujro7@gmail.com

I)、50% 乙醇 (RRPC III)、70% 乙醇 (RRPC IV)、95% 乙醇 (RRPC V) 洗脱物的 IC_{50} 均大于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 RRPC 及 RRPC I 能显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性,RRPC I 的抑制机制为可逆性的非竞争性抑制。

关键词:虎杖提取物; α -葡萄糖苷酶;非竞争性抑制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)05-0735-04

Inhibition of extracts from *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati* on α -glucosidase

ZHENG Xiao-yuan, DU Jun-rong, YANG Fang, PENG Hai-yan, CHEN Chu, YU Dong-ke

(Department of Pharmacology, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Key words: *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati* (RRPC); α -glucosidase; noncompetitive inhibition

虎杖为蓼科蓼属植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根与根茎,其具有活血镇痛、清热利湿、解毒、化痰止咳等功效。近期实验研究显示,虎杖鞣质具有显著降低正常小鼠及四氧嘧啶所致糖尿病小鼠血糖的作用^[1],其机制与其抑制体外 α -葡萄糖苷酶活性作用有关^[2]。虎杖化学成分复杂,除虎杖鞣质外,还含有白藜芦醇、槲皮素等多酚类化合物。近年来文献报道多酚类化合物具有多种药理活性,例如对 α -葡萄糖苷酶活性有抑制作用^[3-5]。本实验通过建立 α -葡萄糖苷酶体外筛选模型,结合虎杖水溶性提取物的柱色谱分离法,进一步探讨虎杖调节血糖的主要有效组分及其机制。

1 材料

虎杖药材 *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati* (RRPC) 购于北京同仁堂成都分店,由华西药学院陈雏鉴定; α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20),猪胰淀粉酶 (EC 3.2.1.1, type VI-B) 和 4-硝基酚- α -D-呋喃葡萄糖苷 (pNP-G) 均购于美国 Sigma 公司。虎杖苷对照品,批号 111575-200301,中国药品生物制品检定所;D101 型大孔吸附树脂,天津市海光化工有限公司;阿卡波糖 (拜糖平),批号 107212,德国拜耳公司;其余试剂均为国产分析纯。透析袋 (德国 Serua 公司,清除限相对分子质量 8 000 ~ 15 000)。旋转蒸发器 (R-201 型,上海申顺生物科技有限公司),冷冻干燥机 (Moduly D 型, Thermo Savant 公司),台式离心机 (LD4-2A 型,北京医用离心机厂),紫外可见分光光度计 (UV-2102C 型,美国 UNIC 公司),电热恒温水槽 (DK-600 型,上海精宏实验设备有限公司)。高效液相色谱仪 (10 ATVP, 日本岛津),紫外可见光检测器 (SPK-10 AVP, 日本岛津)。

2 实验方法

2.1 树脂的预处理及活化: D101 型大孔吸附树脂经蒸馏水冲洗、95% 乙醇浸泡过夜后,装入玻璃柱中,再用蒸馏水冲洗至流出液无醇味。继续依次用 2

倍柱体积的 3% 氢氧化钠溶液、4 倍柱体积的蒸馏水、2 倍柱体积的 0.1 mol/L 盐酸冲洗,最后用蒸馏水冲洗至 pH 中性。

2.2 样品的制备及主成分测定: 将干燥的药材粉碎,用 5 倍体积的蒸馏水保持微沸状态 1 h,用纱布滤出药液。重复煎煮 1 次,合并两次药液。将药液于 4 000 $\times g$ 离心 3 min,收集上清液,其中 1/5 总提取物 (RRPC) 留样,另外 4/5 总提取物用于上柱。将药液上柱后,依次用 4 倍体积的蒸馏水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇和 95% 乙醇洗脱。蒸馏水洗脱液 (RRPC I)、30% 乙醇洗脱液 (RRPC II)、50% 乙醇洗脱液 (RRPC III)、70% 乙醇洗脱液 (RRPC IV)、95% 乙醇洗脱液 (RRPC V) 与 RRPC 分别用旋转蒸发器减压浓缩、冷冻干燥成冻干粉。样品低温干燥保存备用。根据《中国药典》2005 年版中虎杖中虎杖苷的测定方法,对各虎杖提取物进行测定 (HPLC 法)。RRPC、RRPC I、RRPC II、RRPC III、RRPC IV 和 RRPC V 的虎杖苷质量分数为 0.005%、0.009%、9.87%、39.19%、20.83% 和 0.31%。

2.3 α -葡萄糖苷酶抑制试验: 参照 Matsui 等方法^[3]略作改进,以 pNP-G 为底物测定 α -葡萄糖苷酶的活性。将 α -葡萄糖苷酶 (0.01 U, 0.01 mL) 与虎杖提取物溶液 (0.5 mg/mL, 0.2 mL) 或阿卡波糖 (100 mg/mL, 0.2 mL) 混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 5 min 后加入底物 pNP-G 以启动反应。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后,加入 0.1 mol/L Na_2CO_3 1 mL 终止反应。于 405 nm 处测定在酶作用下从 pNP-G 中释放出的对硝基苯 (pNP) 的吸光度值。酶活力单位定义为: 在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.8 的条件下,1 min 内水解 pNP-G 释放 1 μmol pNP 所需的酶量,计算抑制率。酶抑制试验重复 3 次,每次 3 个复管。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

为测定 RRPC 和 RRPC I 的用量对酶活性的影响及二者的 IC_{50} , 分别加入质量浓度递增的

RRPC 及 RRPC I 到酶活力测定系统中,同上测定酶活性,采用 Bliss 法计算 IC₅₀。

2.4 α-淀粉酶抑制试验:根据 Bernfeld 等方法^[6]略作改进,以淀粉为底物测定 α-淀粉酶的活性。α-淀粉酶 (0.01 U, 0.01 mL) 与虎杖提取物溶液 (0.8 mg/mL, 0.2 mL) 或阿卡波糖 (160 mg/mL, 0.2 mL) 混合,在 37 °C 水浴中孵育 5 min 后加入 4% 淀粉以启动反应。反应在 37 °C 进行 15 min,取出 0.2 mL 反应液加入 0.1 mL DNS 试剂 (96 mmol/L 3,5-二硝基水杨酸, 5.31 mol/L 酒石酸钠钾, 2 mol/L NaOH) 中,置于 95 °C 水浴中反应 15 min,取出,加入 0.9 mL 蒸馏水稀释后,于 540 nm 处测定吸光度值。酶活力单位定义为:在 37 °C, pH 6.9 的条件下,3 min 内水解淀粉释放 1.0 mg 麦芽糖所需的酶量,计算抑制率。酶抑制试验重复 3 次,每次 3 个复管。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

2.5 透析试验:根据 Lee 等的方法^[5],取 0.5 mL α-葡萄糖苷酶溶液 (1 U/mL) 与 1 mg RRPC I 混合,在 37 °C 水浴中预处理 1 h 后,在 4 °C 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 中透析 24 h,其间每 8 h 更换磷酸缓冲液。同时,另取 0.5 mL α-葡萄糖苷酶溶液与 1 mg RRPC I 混合,不参与透析,4 °C 保存 24 h 作为对照。在透析结束后,将透析袋中溶液分别稀释 10、50、100、500、1 000 倍后,同 2.3 项方法测定其残留酶活性。

2.6 α-葡萄糖苷酶的抑制动力学:参照 Lee 等的方法^[5],以浓度递增的 pNP-G (0.125~2 mmol/L) 为底物,测定不同质量浓度 RRPC I 对酶活性的影响,由 Lineweaver-Burk 双倒数作图法确定受试物的酶抑制反应的类型。

2.7 数据统计方法:由酶抑制试验所测得吸光度值计算抑制率,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 酶抑制试验:结果见表 1。在 α-葡萄糖苷酶抑制试验中,RRPC I、RRPC III、RRPC IV、RRPC V 的 IC₅₀ 均大于 200 μg/mL,而 RRPC 与 RRPC II 的 IC₅₀ 分别为 74、15 μg/mL,提示 RRPC II 富集了虎杖抑制 α-葡萄糖苷酶的主要有效组分。不同质量浓度 RRPC 及 RRPC II 对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用见图 1。

此外,在 α-淀粉酶抑制试验中,仅 RRPC 对 α-淀粉酶有轻度抑制作用。

3.2 透析试验:以相同量的酶反应所得的测定值为

表 1 虎杖各提取物对 α-葡萄糖苷酶与 α-淀粉酶的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Inhibition of RRPC extracts on α-glucosidase and α-amylase ($\bar{x} \pm s, n=9$)

| 组别 | ρ / (mg · mL ⁻¹) | α-葡萄糖苷酶抑制率/% | α-淀粉酶抑制率/% |
|----------|------------------------------|--------------|------------|
| 阿卡波糖 | 40 | 87.5 ± 7.7 | 72.3 ± 6.4 |
| RRPC | 0.2 | 70.5 ± 5.8 | 16.9 ± 5.0 |
| RRPC I | 0.2 | 24.2 ± 6.1 | 22.3 ± 5.8 |
| RRPC II | 0.2 | 90.3 ± 5.4 | 16.9 ± 5.5 |
| RRPC III | 0.2 | 43.5 ± 6.5 | 9.7 ± 4.2 |
| RRPC IV | 0.2 | 8.0 ± 4.7 | 2.6 ± 3.2 |
| RRPC V | 0.2 | 12.0 ± 3.5 | 1.8 ± 3.0 |

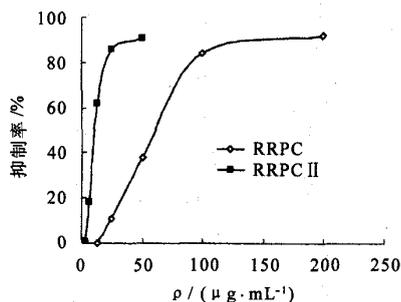


图 1 RRPC 及 RRPC II 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of RRPC and RRPC II on α-glucosidase 100%, 计算其他透析或放置的酶相对活性。以相对酶活性为纵坐标,稀释度的对数为横坐标作反应的不可逆性图。图 2 显示:未加 RRPC II 的 α-葡萄糖苷酶活性透析前后没有显著改变,而被 RRPC II 组分显著抑制的酶活性在透析后能基本恢复,表明 RRPC II 对 α-葡萄糖苷酶的抑制反应是可逆的。

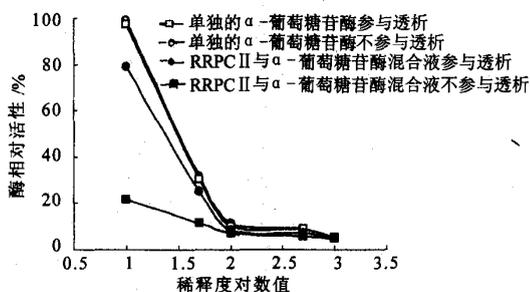


图 2 RRPC II 抑制反应的可逆性

Fig. 2 Reversibility of inhibitory reaction of RRPC II

3.3 α-葡萄糖苷酶的抑制动力学:RRPC II 对 α-葡萄糖苷酶抑制反应的类型由 Lineweaver-Burk 双倒数作图法确定。图 3 显示 RRPC II 对 α-葡萄糖苷酶的抑制程度与抑制剂浓度成正比,最大反应速率 (V_{\max} , 纵截距) 随抑制剂增加而变小,而米氏常数 (K_m 值, 横截距为 $-1/K_m$) 不变,提示其竞争类型为非竞争性抑制, K_m 值为 1.8 mmol/L。

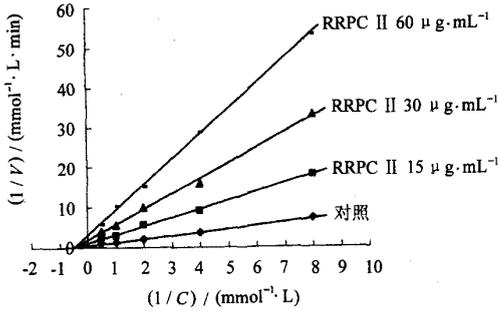


图 3 RRPC II 对 α -葡萄糖苷酶抑制程度的双倒数动力学
Fig. 3 Double reciprocal plots for kinetic analysis of inhibition on α -glucosidase by RRPC II

4 讨论

糖尿病是目前严重危害人类健康的主要疾病之一,可分为胰岛素依赖型(1型,即IDDM)和非胰岛素依赖型(2型,即NIDDM),2型糖尿病患者占糖尿病患者的95%以上,其治疗是以降低血糖水平及减轻症状为主要目标。

糖尿病以高血糖为主要特征,高血糖有两种情况:一为餐后高血糖,指食物消化吸收过程中的血糖高峰超越正常范围;另一为空腹血糖,指食物消化吸收完毕后的基础血糖高于正常。一直以来,对糖尿病的诊断标准及糖尿病治疗需达到的目标,多以空腹血糖为主。近年来,餐后高血糖在糖尿病的诊断、治疗目标及慢性并发症发病机制上的重要性受到愈来愈多的关注。一是由于餐后血糖过高,会通过“葡萄糖毒性作用”,加重胰岛素的分泌缺陷,机体处理餐后高血糖的能力进一步下降,基础状态下的血糖亦升高,即形成或加重2型糖尿病。二是餐后高血糖也会导致蛋白质的非酶糖化,从而引起进行性的大血管及微血管的病变,导致糖尿病并发症心脑血管甚至非糖尿病患者的心脑血管疾病,因此降低餐后高血糖的药物在治疗2型糖尿病及早期的糖耐量减低(IGT)状态非常重要^[7,8]。

现在临床上使用的治疗糖尿病药物主要有4类,即作用于胰岛 β -细胞、刺激胰岛素分泌的磺酰脲类;促进糖代谢的胍类;增强胰岛素作用、促进外周组织中葡萄糖利用的胰岛素增敏剂及 α -葡萄糖苷酶抑制剂,前3类都只能降低空腹血糖,仅有 α -葡萄糖苷酶抑制剂能降低餐后血糖。同时降低餐后高胰岛素血症,以达到减低葡萄糖毒性,减少并发症的发生。阿卡波糖作为广泛应用于临床的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,在治疗糖耐量减低、减少心脑血管并发症方面有明显疗效^[9]。

传统中药是筛选天然组分新的药理活性的资源宝库。新近文献报道虎杖同科植物大黄和虎杖鞣质可显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性^[2,10]。本实验采用大孔吸附树脂,通过不同体积分数乙醇洗脱剂极性差异及树脂分子筛作用将虎杖水提取物分离为5个组分,用 α -葡萄糖苷酶抑制试验跟踪有效组分,结果发现虎杖的 α -葡萄糖苷酶抑制成分主要富集在30%乙醇洗脱组分(RRPC I),进一步的酶抑制动力学试验证明RRPC I的抑制作用属于可逆性的非竞争性类型,而0.2 mg/mL RRPC I对酶活性的抑制率达到90.3%,与40 mg/mL的阳性对照药阿卡波糖87.5%的抑制率相当。此外,在检测酶反应可逆性的透析试验中,被RRPC I抑制的酶活性透析后可恢复大约80%,而透析后的RRPC I混合液颜色仍明显深于未加提取物的对照溶液,提示RRPC I中的有效成分应包括相对分子质量为8 000~15 000的不能透析出来的化合物。因此,进一步采用现代分离纯化技术深入研究虎杖抑制 α -葡萄糖苷酶的有效成分,有望发现新型的 α -葡萄糖苷酶的天然强效抑制剂。

References:

[1] Shen Z M, Yin J W, Yuan H B. The hypoglycemic effect of tannin from *Pol Ygonum Cus Pidotum* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16(3): 220-221.
 [2] Tang W Q, Shen Z M, Yin J W. Inhibitory activity to glycosidase of tannins from *Polygonum cuspidatum* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18(2): 226-228.
 [3] Matsui T, Ueda T, Oki T. α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins 1. survey of natural pigments with potent inhibitory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(4): 1948-1951.
 [4] Kim Y, Jeong Y, Wang M. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia [J]. *Nutrition*, 2005, 21: 756-761.
 [5] Lee D S L. Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor [J]. *FEBS Lett*, 2001, 501: 84-86.
 [6] Bernfeld P. Amylases, alpha and beta [J]. *Methods Enzymol*, 1955, 1: 149-158.
 [7] Baron A D. Postprandial hyperglycaemia and α -glucosidase inhibitors [J]. *Diab Res Clin Pract*, 1998, 40 Suppl: S51-S55.
 [8] Lebovitz H E. Effect of the postprandial state on non-traditional risk factors [J]. *Amer J Cardiol*, 2001, 88: 20H-25H.
 [9] Zhang X Y. The chemical constituent, pharmacology effect and extract of *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati*. [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 1999, 11(3): 13-15.
 [10] Liu Z F, Li P, Li S, et al. Inhibitory effect of five traditional Chinese herbs on α -glucosidase activity *in vitro* [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2004, 23(1): 41-42.