

- 1388.
- [9] Rocks D, Lilliehook B, Larsson R, et al. Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122(2): 249-256.
- [10] Guo R F, Ward P A. Role of oxidants in lung injury during sepsis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(11): 1991-2002.
- [11] Salvemini D, Muscoli C, Riley D P, et al. Superoxide dismutase mimetics [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2002, 15(5): 439-447.
- [12] 吴碧华, 杨得本, 龙存国, 等. 甘草总黄酮的体外抗氧化作用 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8(36): 8262-8263.
- [13] Moraes T J, Zurawska J H, Downey G P. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury [J]. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13(1): 21-27.

苦瓜蛋白酶抑制剂对苦瓜降糖多肽活性的保护作用

付中平, 刘红雨, 鲁 岚, 陈子君, 周吉燕, 王富军*

(上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要:目的 探讨苦瓜蛋白酶抑制剂对苦瓜降糖多肽口服降糖活性的保护作用。方法 单次 iv 四氧嘧啶 80 mg/kg 给药建立糖尿病小鼠模型。以降糖多肽 (20、10、5 mg/kg) iv 给药, 于 0.5、2、4、6、8 h 尾静脉取血测定空腹血糖; 测定在不同降糖多肽与蛋白酶抑制剂配伍剂量下, ig 给药 21 d 后的空腹血糖值; 以降糖作用显著的配伍比例, ig 给药 7、14、21 d 和停止给药 7 d 后测定血糖。结果 降糖多肽于 iv 给药 4 h 后, 高、中、低 3 个剂量均表现出显著降血糖效应 ($P < 0.05, 0.01$); 降糖多肽与抑制剂 (300+300)、(100+100)、(100+50)、(100+25) mg/kg 4 个配伍剂量组 ig 给药 21 d 后表现出显著降血糖效应, 且以后两个剂量组 ig 给药的降血糖作用为更佳, 停药 7 d 后给药组血糖值与模型组无显著差异。结论 苦瓜蛋白酶抑制剂在 ig 给药过程中能够使苦瓜降糖多肽免遭消化系统的蛋白水解酶破坏而起保护作用, 维持其降血糖药效, 该作用与两者间的配伍剂量有关。

关键词: 苦瓜; 降糖多肽; 蛋白酶抑制剂; 糖尿病

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1259-04

Protection of protease inhibitor of *Momordica charantia* on activity of hypoglycemic peptides from *M. charantia*

FU Zhong-ping, LIU Hong-yu, LU Lan, CHEN Zi-jun, ZHOU Ji-yan, WANG Fu-jun

(Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract : Objective To study the protection of protease inhibitor of *Momordica charantia* on activity of hypoglycemic peptides from *M. charantia* by ig administration. **Methods** An experimental diabetic mouse model was successfully induced by once iv injection of alloxan at a dose of 80 mg/kg. Diabetic mice were administered with the hypoglycemic peptides (20, 10, and 5 mg/kg) by iv injection and blood glucose level was tested at 0.5, 2, 4, 6, and 8 h. Different ratios of hypoglycemic peptides and protease inhibitor were given to diabetic mice for 21 d and then the blood glucose level was determined. The blood glucose level in the drug administration group, which showed significant hypoglycemic effect after 21 d ig administration, at different time points of 7, 14, and 21 d after ig administration and 7 d after administration withdrawal, was measured. **Results** The hypoglycemic peptides showed significant hypoglycemic effect after 4 h iv injection ($P < 0.05$ and 0.01). Four mixtures of hypoglycemic peptides and inhibitors [(300+300), (100+100), (100+50), and (100+25) mg/kg] showed significant hypoglycemic effect after 21 d ig administration ($P < 0.05$ and 0.01), and the hypoglycemic effects of the last two groups are better. The blood glucose level had no statistical difference between the test group and the control group after 7 d administration withdrawal. **Conclusion** The protease inhibitors of *M. charantia* could protect the activity of the hypoglycemic peptide during ig administration, which relates to the ratio of hypoglycemic peptide and inhibitors.

Key words: *Momordica charantia* L.; hypoglycemic peptide; protease inhibitor; diabetes

* 收稿日期: 2008-12-22

基金项目: 国家“十一五”科技攻关资助项目 (2006BAI06A16); 上海市科委资助项目 (04DZ19818)

作者简介: 付中平 (1982—), 男, 江西上高县人, 硕士研究生, 主要从事生物活性物质分离纯化与性质研究。

Tel: 15950470592 E-mail: fzping2003@hotmail.com

*通讯作者 王富军 Tel: (021) 51322515 E-mail: wfj@shutcm.edu.cn

苦瓜 *Momordica charantia* L. 为葫芦科苦瓜属一年生草质藤木植物,性味苦寒,具有清热解毒、清火明目、滋养强壮、降血糖、抗肿瘤等功效^[1,2]。Khanna 等^[3]从苦瓜和苦瓜籽中分离纯化得到一种具有显著降血糖活性的多肽类物质,但研究表明苦瓜降糖活性多肽一般不具备口服降糖活性^[4],亦未见对降糖多肽在口服过程中活性保护方面的研究报道。本研究观察苦瓜内源蛋白酶抑制剂对降糖多肽口服给药活性的保护作用,并进一步探讨降糖多肽和抑制剂的配伍比例与药效方面的关系,为后续的深入研究和临床应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 药物:苦瓜籽购自四川德昌,主要为种都华绿、种都刺皇和广汉特大青丰3个品种。苦瓜籽经粉碎后,按酸醇提取法^[3]提取降糖多肽组分,将丙酮沉淀的组分加入适量 pH 4.0, 10 mmol/L 醋酸钠缓冲液溶解,经 Sephadex G50 分子筛分离,收集活性组分 P2^[4],冷冻干燥后苦瓜降糖多肽。苦瓜籽粉,经丙酮脱脂后按照 Nobuaki 等^[5]采用的方法提取抑制剂组分,提取液经沸水浴热变性 10 min,去除杂蛋白,硫酸铵分级沉淀收集 50%~90% 饱和度组分,透析脱盐后冷冻干燥,得苦瓜蛋白酶抑制剂^[6]。

1.2 动物:昆明种小鼠,体质量 20~22 g,雄性,由上海斯莱克实验动物有限公司提供。

1.3 试剂与仪器:盐酸二甲双胍购自上海施贵宝公司;四氧嘧啶购自 Sigma;稳捷型血糖试纸,美国理康公司,批号:278134A;稳捷基础加倍型血糖监测仪,美国理康公司;7020 全自动生化分析仪,日本日立。

2 实验方法

2.1 小鼠糖尿病模型的制备^[7]:四氧嘧啶临用前用注射用生理盐水配成 8 mg/mL。雄性昆明小鼠禁食 12 h 后,单次 iv 四氧嘧啶 80 mg/kg,4 h 后 ig 50% 葡萄糖溶液 0.8 mL/只,3 d 后取尾血测空腹血糖,空腹血糖 ≥ 20 mmol/L 的动物作为高血糖模

型小鼠,对照组单次 iv 同体积注射用生理盐水。

2.2 降糖多肽的药效试验:将高血糖模型小鼠随机分为模型组,降糖多肽高、中、低剂量 (20、10、5 mg/kg) 组,每组 10 只。各组小鼠单次 iv 给药 (10 mL/kg),模型组和对照组给予同体积生理盐水。给药后 0.5、2、4、6、8 h 尾部取血测定血糖值。

2.3 降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂联合药效试验:将高血糖模型小鼠随机分为模型组,盐酸二甲双胍组 (150 mg/kg),降糖多肽组 (300 mg/kg),苦瓜蛋白酶抑制剂组 (300 mg/kg),降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂配伍高剂量组 (500 mg/kg + 500 mg/kg)、中剂量组 (300 mg/kg + 300 mg/kg)、低剂量组 (100 mg/kg + 100 mg/kg),每组 10 只。各组小鼠每天 ig 给药 1 次,连续 21 d,模型组和对照组给予同体积 (10 mL/kg) 生理盐水,给药结束后尾部取血测定空腹血糖。

2.4 降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂的不同配伍比例对降糖作用的影响:根据降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂联合口服药效结果,将降糖多肽和苦瓜蛋白酶抑制剂组分以不同配伍进行药效试验。并对药效显著的剂量组小鼠分别于 ig 给药 7、14、21 d 以及停止给药 7 d (第 28 天) 后尾部取血测空腹血糖。

2.5 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

3 结果与分析

3.1 降糖多肽对高血糖模型小鼠的降血糖作用:对照组小鼠的血糖值与模型组相比,在各时间点均表现出显著差异 ($P < 0.01$);降糖多肽高、中、低剂量组与模型组相比,在给药后 4、6、8 h 时,血糖值均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),结果见表 1。表明降糖多肽 P2 对高血糖模型小鼠具有非常显著的降血糖效应。

3.2 苦瓜蛋白酶抑制剂对苦瓜降糖多肽活性的保护作用:对照组小鼠的血糖值与模型组相比,具有显

表 1 苦瓜降糖多肽 iv 给药对糖尿病模型小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	血糖值/(mmol · L ⁻¹)				
		0.5 h	2 h	4 h	6 h	8 h
对照	-	6.07 ± 0.73 **	5.28 ± 0.78 **	4.67 ± 1.53 **	3.83 ± 1.04 **	3.24 ± 0.81 **
模型	-	22.93 ± 1.42	21.72 ± 1.84	20.93 ± 1.51	18.98 ± 1.32	19.89 ± 1.93
苦瓜降糖多肽	20	24.60 ± 1.34	23.27 ± 1.51	19.42 ± 1.16 *	16.42 ± 1.36 **	15.12 ± 2.01 **
	10	23.24 ± 1.29	22.89 ± 1.44	16.87 ± 3.13 **	16.15 ± 3.53 **	15.00 ± 3.67 **
	5	22.10 ± 1.46	21.80 ± 1.95	16.06 ± 3.22 **	14.88 ± 3.56 **	12.47 ± 3.59 **

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

著差异 ($P < 0.01$); 盐酸二甲双胍组与模型组相比, 能显著降低模型小鼠的血糖值 ($P < 0.01$); 降糖多肽组与模型组相比, 其血糖值反而略有所升高, 没有表现出降糖效应, 没有重复出顾俊峰等^[8]的实验结果; 苦瓜蛋白酶抑制剂组与模型组相比, 没有表现出显著的降糖效应; 降糖多肽与蛋白酶抑制剂配伍的 3 个剂量组与模型组相比, 中剂量 (300 mg/kg + 300 mg/kg) 和低剂量 (100 mg/kg + 100 mg/kg) 表现出显著的降血糖效应 ($P < 0.01$), 高剂量 (500 mg/kg + 500 mg/kg) 无显著降糖活性, 表明苦瓜蛋白酶抑制剂对降糖多肽活性的保护作用与剂量有关。结果见表 2。

表 2 苦瓜降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂联合 ig 给药对糖尿病模型小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of hypoglycemic peptides and protease inhibitors from *M. charantia* by ig administration on blood glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)
对照	-	5.62 ± 0.91 ^{**}
模型	-	33.57 ± 7.73
盐酸二甲双胍	150	15.75 ± 4.38 ^{**}
苦瓜降糖多肽	300	35.16 ± 4.85
苦瓜蛋白酶抑制剂	300	40.89 ± 5.32
苦瓜降糖多肽 + 苦瓜蛋白酶抑制剂	500 + 500	34.04 ± 10.50
	300 + 300	25.01 ± 9.58 ^{**}
	100 + 100	23.29 ± 6.91 ^{**}

与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.3 苦瓜降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂的不同配伍对降糖作用的影响: 根据 3.2 项结果, 设计不同的降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂的配伍比例, 与模型组相比, 100 mg/kg + 100 mg/kg 配伍剂量表现出显著的降血糖效应 ($P < 0.05$), 降低降糖多肽剂量或升高苦瓜蛋白酶抑制剂的量均没有表现出显著的降血糖活性, 结果见表 3。以降糖多肽为 100 mg/kg 时, 将苦瓜蛋白酶抑制剂的量降低, 和模型组相比, 高、中、低 3 个剂量均具有显著的降血糖效应 ($P < 0.01$), 且中剂量 100 mg/kg + 50 mg/kg 相比于高剂量 100 mg/kg + 100 mg/kg 具有显著差异 ($P < 0.05$), 低剂量与高剂量相比差异不显著 ($P > 0.05$), 结果见表 4。

3.4 苦瓜蛋白酶抑制剂与降糖多肽对高血糖模型小鼠降糖作用的时效关系: 与模型组相比, 对照组于第 7、14、21、28 天均具有显著差异 ($P < 0.01$); 连续 ig 给药期间, 与模型组相比, 降糖多肽与抑制剂组在给药 7 d 和 14 d 后并没有表现出显著的降血糖效应, 在给药 21 d 后才表现出显著的降血糖效应

表 3 苦瓜降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂不同配伍比例对糖尿病模型小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of different ratios of hypoglycemic peptides and protease inhibitors of *M. charantia* on blood glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)
对照	-	8.67 ± 1.27 ^{**}
模型	-	37.82 ± 2.38
盐酸二甲双胍	150	28.00 ± 7.96 ^{**}
苦瓜降糖多肽 + 苦瓜蛋白酶抑制剂	100 + 200	41.86 ± 4.31 [*]
	100 + 100	33.62 ± 3.79 [*]
	50 + 300	36.10 ± 3.41
	50 + 100	36.82 ± 3.56
	50 + 50	36.54 ± 3.90

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 4 苦瓜降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂不同配伍比例对糖尿病模型小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of different ratios of hypoglycemic peptides and protease inhibitors of *M. charantia* on blood glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)
对照	-	5.27 ± 0.38 ^{**}
模型	-	27.08 ± 1.23
盐酸二甲双胍	150	15.38 ± 3.76 ^{**}
苦瓜降糖多肽 + 苦瓜蛋白酶抑制剂	100 + 100	23.66 ± 2.22 ^{**}
	100 + 50	20.61 ± 3.63 ^{**}
	100 + 25	20.64 ± 4.32 ^{**}

与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

与 100 mg/kg + 100 mg/kg 组比较: $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ vs model group

$P < 0.05$ vs 100 mg/kg + 100 mg/kg group

($P < 0.01$), 停止给药 7 d 后, 降糖效应不显著, 与盐酸二甲双胍降糖时效基本一致, 结果见表 5。

4 讨论

目前临床治疗糖尿病除了 iv 胰岛素外, 主要是口服磺脲类、双胍类、葡萄糖苷酶抑制剂和噻唑烷酮类降糖药物。化学类降糖药物的口服会引起耐药性、乳酸中毒和肝肾损伤等一系列不良反应, 而注射治疗往往给患者造成很多不便, 因此迫切需要一种使用方便、疗效好、副作用小、可长期安全使用的治疗新药出现。苦瓜作为一种传统植物药材, 临床实践和动物试验都表明其具有显著的降血糖活性, 并且能够缓和减轻糖尿病引起的并发症。因此, 从苦瓜中研究开发出一种使用方便的糖尿病药物是当前医药界研究的一个热点问题。

本研究使用的苦瓜降糖多肽 P2 的主要成分与顾俊峰等^[8]纯化的降糖多肽相同, 其在 Sephadex G50 分离时表现为单一紫外吸收峰, PAGE 电泳检

表 5 苦瓜降糖多肽与苦瓜蛋白酶抑制剂对糖尿病模型小鼠降糖作用的时效关系 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 5 Time-effect relationship of hypoglycemic peptides and protease inhibitors of *M. charantia* by ig administration on blood glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	血糖值/(mmol · L ⁻¹)			
		7 d	14 d	21 d	28 d
对照	-	6.30 ± 0.79 **	6.45 ± 0.86 **	6.40 ± 0.53 **	6.21 ± 0.67 **
模型	-	27.10 ± 3.85	21.39 ± 4.29	26.40 ± 2.66	25.13 ± 1.66
苦瓜降糖多肽 + 苦瓜蛋白酶抑制剂	100 + 50	26.97 ± 2.56	23.07 ± 2.19	21.81 ± 2.69 **	24.47 ± 1.89
盐酸二甲双胍	150	24.27 ± 3.37	22.66 ± 3.91	23.10 ± 2.33 *	24.15 ± 2.12

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

测显示主要为相对分子质量在 13 000 的蛋白多肽组分。本研究采用单次 iv 给药观察其对实验性糖尿病模型小鼠血糖的影响,进一步确认了从苦瓜籽中分离提取到的降糖多肽具有显著的降血糖活性,而且以低剂量组的效果为最好,说明 iv 给药剂量还可以进一步降低,其最佳给药剂量尚需进一步研究确认。将这种降糖多肽以 300 mg/kg 剂量,单独连续 ig 给药 21 d 并没有发现显著的降血糖活性,这与顾俊峰等^[8]得到的结果不相一致,表明该多肽可能被动物消化系统中的各种蛋白水解酶所降解而丧失了其降糖活性。而且已有研究也表明经蛋白水解后的降糖多肽对正常小鼠无降血糖作用^[4]。文献资料表明,苦瓜和苦瓜籽中存在着多种蛋白酶抑制剂组分^[5,6],同时苦瓜全提物口服给药对高血糖模型动物具有显著的降血糖作用^[2]。本实验结果表明从苦瓜中分离的蛋白酶抑制剂单独 ig 给药同样也没有显著的降糖活性。以降糖多肽 ig 给药剂量 300 mg/kg 作为参考剂量设置高、中、低 3 个剂量,配伍相同量的苦瓜内源性蛋白酶抑制剂,与模型组相比,(500 + 500) mg/kg 剂量组未表现出显著的降血糖活性;而 (300 + 300) mg/kg 和 (100 + 100) mg/kg 剂量组则表现出显著的降血糖作用,且两组的降血糖作用效果基本相似,表明在 ig 给药过程中苦瓜内源性蛋白酶抑制剂对降糖多肽活性具有一定的保护作用,过多的饲喂降糖多肽和抑制剂的混合物并不能进一步提高其降糖作用效果,它的药理作用效果需要在一定的剂量范围内才能实现。

对降糖多肽和抑制剂配伍比例和给药剂量的进一步药效试验表明,抑制剂对降糖多肽的活性保护在一定浓度下就可实现,即降糖多肽与抑制剂两者之比为 1 : 1 ~ 4 : 1,且以降糖多肽为 100 mg/kg 的剂量时,降血糖效果为更好。过多的提高抑制剂的比例对降糖多肽的活性表现没有特别的作用,反而

可能会由于抑制剂组分的过量摄入而影响小鼠对整个蛋白质类营养物质的吸收,这从试验动物比对照动物平均体质量减轻的事实中看出(数据略)。对本实验过程中降糖作用显著的降糖多肽和抑制剂配伍剂量 (100 + 50) mg/kg 的时效研究表明,每天给药 1 次,连续给药 7 d 和 14 d 并无显著降糖作用,给药 21 d 后则显示显著的降糖作用 ($P < 0.05$ 、0.01),在停止给药 7 d 后小鼠血糖值又回升至与模型组相当水平,这表明在抑制剂保护下的降糖多肽口服给药方式,需经过一定的给药时间后才缓慢地发挥其降血糖作用,其降血糖作用特点是过程较为平缓,作用持续时间也较长,这与化学类口服降血糖药物的作用方式有显著的区别。从其药效作用的特点可以推测,苦瓜降糖多肽的作用机制似乎不是通过促进受损的胰岛 β 细胞的修复或再生发挥作用,而是充当了类似于直接替代缺失的胰岛素的作用,使体内的血糖值产生明显的降低,此推测有待进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] 柴瑞华,肖春莹,关健,等. 苦瓜总皂苷降血糖作用的研究[J]. 中草药, 2008, 39(5): 746-747.
- [2] 熊术道,尹丽慧,李景荣,等. 苦瓜蛋白抗肿瘤作用及其分子机制[J]. 中草药, 2008, 39(3): 408-411.
- [3] Khanna P. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source [J]. *J Nat Prod*, 1981, 44(6): 648-655.
- [4] 盛清凯,姚惠源. 苦瓜多肽-p 的分离及其降糖活性[J]. 无锡轻工大学学报, 2005, 24(1): 49-51.
- [5] Nobuaki H. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* Linn.) seeds: Purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors [J]. *J Biochem*, 1995, 117: 432-437.
- [6] 傅中平,周吉燕,王富军. 苦瓜中以蛋白酶抑制剂活性的测定方法研究[J]. 食品与药品, 2007, 9(4): 14-17.
- [7] 王柳萍,杨斌,周丽. 四氧嘧啶制备小鼠糖尿病模型的影响因素探讨[J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(1): 33-35.
- [8] 顾俊峰,钱英昊,王朔,等. 苦瓜种子提取一种活性成分——“降糖多肽”[J]. 实用糖尿病杂志, 2005, 13(1): 59-60.