

· 中药化学 ·

小叶金露梅对醛糖还原酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用*孙玉侠¹ 曾阳¹ 张倩茹¹ 余涛¹ 李美华¹ 赵得萍^{2#}

(1 青海师范大学生命与地理科学学院 青藏高原环境与资源教育部重点实验室 青海 810008;

2 中国科学院西北高原生物研究所)

摘要: 目的 对小叶金露梅不同提取部位的 α -葡萄糖苷酶(AG)和醛糖还原酶(AR)抑制活性进行研究,找寻天然的AG和AR抑制剂。方法 体外实验通过 α -葡萄糖苷酶抑制剂和醛糖还原酶抑制剂筛选模型,对小叶金露梅乙酸乙酯部位(总黄酮)、石油醚部位和水层部位提取物的AG和AR抑制活性进行测定;体内实验进行小叶金露梅总黄酮对小鼠糖耐量的测定。结果 小叶金露梅总黄酮部位对AG和AR有较高的抑制活性,而且总黄酮部位抑制AG活性的作用强于阿卡波糖。同时,小叶金露梅总黄酮高、低剂量均能提高小鼠的糖耐量。结论 小叶金露梅总黄酮对 α -葡萄糖苷酶和醛糖还原酶具有抑制活性。

关键词: 小叶金露梅; α -葡萄糖苷酶; 醛糖还原酶; 抑制活性; 糖耐量

中图分类号: R284.2

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2016.07.012

Inhibition of *Potentilla parvifolia* on alpha-glucosidase and aldose reductase*

SUN Yuxia¹, ZENG Yang¹, ZHANG Qianru¹, YU Tao¹, LI Meihua¹, ZHAO Deping^{2#}

(1 Lab of Tibet Plateau Environment and Resources, Key Lab of Ministry of Education, School of Life Science and Geography, Qinghai Normal University, Qinghai 810008; 2 Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences)

Abstract: Objective To study the inhibitory effects on α -glucosidase (AG) and aldose reductase (AR) extracted from *Potentilla parvifolia* in different solvents, and to find out natural inhibitors of AG and AR. **Methods** With a combined vitro and vivo experiment design, this study measured the in vitro inhibitory effects of AG and AR extraction from *Potentilla Parvifolia* in three solvents: ethyl acetate (total flavonoids), petroleum ether and water through AG inhibitors and AR inhibitory activity screening models. In vivo effects of total flavonoids from *Potentilla Parvifolia* on impaired glucose tolerance of mice were also measured. **Results** Extraction of *Potentilla Parvifolia* in total flavonoids demonstrated a stronger inhibitory effect on AR and AG. Its inhibitory effect on AG was higher than that of acarbose. Meanwhile, both high and low dose of total flavonoids improved glucose tolerance in mice. **Conclusion** Total flavonoids in *Potentilla parvifolia* exhibits inhibitory effects on AG and AR.

Keywords: *Potentilla parvifolia*; α -glucosidase; aldose reductase; inhibitory activity; glucose tolerance

小叶金露梅(*Potentilla parvifolia*)又名班纳合,系蔷薇科委陵菜属植物,主要分布在青藏高原,是高寒地区一种典型的落叶灌木^[1]。同时,小叶金露梅

也是一种藏药(藏语:班玛),在《晶珠本草》中记载其主治消化不良和肺病,现代医药研究表明小叶金露梅的叶和花可入药,味微苦,性寒,具有清暑热、益

孙玉侠,女,在读硕士生

通信作者: 赵得萍,女,硕士,研究方向: 科技管理, E-mail: dpzhao@nwipb.cas.cn

* 青海省自然科学基金项目(No. 2015-ZJ-907); 青藏高原药用动植物资源重点实验室项目(No. 2014-z-y25)

脑清心、调经、健胃、固齿、治疗妇女病等功能^[2]。

委陵菜属植物翻白草 (*Potentilla discolor* Bunge.)^[3-6]、朝天委陵菜 (*Potentilla supina* Linn.)^[7]、蛇含委陵菜 (*Potentilla kleiniana* Wight et Arn.)^[8]等的提取物或化学成分在抗2型糖尿病中具有较好的活性,但同属植物小叶金露梅在此方面的研究鲜有报道。 α -葡萄糖苷酶(AG)和醛糖还原酶(AR)是2型糖尿病中2种重要的酶,AG和AR抑制剂是预防、延缓和治疗2型糖尿病并发症的重要药物。本文通过测定小叶金露梅不同提取部位对AG和AR抑制活性,找出小叶金露梅提取物中具有较高活性的AG和AR抑制剂。

1 试剂与材料

1.1 主要仪器

EYELA型旋转蒸发器(日本东京理化器械株式会社),Bio-Rad XMARK全自动酶标仪[伯乐生命科学产品(上海)有限公司],Thermo-Shaker 孵育器[托赫机电科技(上海)有限公司],不可拆96孔板(德国Greiner公司)。

1.2 药材

小叶金露梅采集于青海省大通达阪山,由青海师范大学生命与地理科学学院马继雄教授鉴定为*Potentilla parvifolia*的枝叶。

1.3 试剂

α -葡萄糖苷酶、醛糖还原酶(美国Sigma公司),对硝基苯基-A-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,美国Sigma公司),阿卡波糖(德国Bayer公司),乙酸乙酯、石油醚、乙醇均为分析纯。

1.4 动物

昆明种小鼠40只,6~8周龄,体重(20±2)g,由兰州大学医学实验动物中心提供,合格证号SCZK(甘)2012-0004。

2 方法与结果

2.1 小叶金露梅石油醚部位、总黄酮和水层部位的制备

将小叶金露梅枝叶原料粉碎,70%乙醇回流提取3次,每次1h,抽滤并合并,滤液真空浓缩后分散于等量水中,用石油醚萃取,萃取液真空干燥得石油醚部位。上述萃取所得水层用乙酸乙酯萃取,萃取液真空干燥得乙酸乙酯部位,即总黄酮。水层真空干燥得水层部位。

2.2 AG抑制活性的测定

2.2.1 AG活性的测定方法

AG抑制活性测定用全自动酶标仪,反应在不

可拆96孔板中进行。反应体系为200 μ L:在125 μ L磷酸缓冲液和 8.92×10^{-3} mol/L的PNPG 25 μ L中分别加入不同浓度的样品25 μ L和0.05 U/mL的AG 25 μ L,并用蒸馏水代替酶液作空白对照,每个样品同一浓度下设置3个平行。反应体系置于恒温孵育器37 $^{\circ}$ C温浴20 min,迅速在全自动酶标仪400 nm波长下测定吸光度值(OD)。

为了消除样品和底物PNPG对测定结果的影响,需要测定样品和底物的背景OD值。用50 mol/L的磷酸盐缓冲液代替样品和底物进行校正。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_1 - A_3) - (A_2 - A_4)}{A_1 - A_3} \times 100$$

A_1 :原有的酶活力; A_2 :加入抑制剂后的酶活力; A_3 :PNPG背景; A_4 :样品背景。

2.2.2 AG标准曲线的测定及绘制

按照2.2.1项下方法在无抑制剂的条件下,分别测定AG浓度梯度为0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.10,0.12 U/mL时的酶溶液在400 nm处的OD值。绘制出标准曲线,求得回归方程为 $Y = 6.2347X + 0.0020$, $r^2 = 0.9989$,说明PNPG在0.02~0.12 U/mL范围内线性关系良好。

2.2.3 小叶金露梅各提取部位AG抑制活性的测定及结果

按照2.2.1项下方法分别在相同样品浓度(0.625 g/L)下,测定各样品对AG抑制活性的OD值,并计算抑制率,同时采用SPSS 17.0计算半抑制浓度(IC₅₀)。结果见表1。

表1 各提取部位对AG的抑制率

Table 1 Various extracts on inhibition rate of AG

样品 Sample	样品浓度 Concentration (g/L)	抑制率 Inhibition rate (%)	IC ₅₀ (g/L)
石油醚部位 Petroleum ether layer	0.625	60.56	0.506
水层部位 Water layer	0.625	7.57	—
乙酸乙酯部位 Ethylacetate layer	0.625	93.16	0.067
阿卡波糖 Acarbose	25.000	75.98	9.623

注:阿卡波糖为阳性药物。

Note: Acarbose as a positive control drug.

2.3 AR抑制活性的测定

2.3.1 AR活性的测定方法

用全自动酶标仪测定酶的活性,反应在不可拆96孔板中进行。反应体系为200 μ L:向反应孔中依

次加入 pH 6.2 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 100 μ L, 1.5 mmol/L NADPH 20 μ L, 5×10^{-6} U/L 的 AR 10 μ L, 加入 0.1 mol/L DL-甘油醛 20 μ L 启动反应, 用双蒸水补足体积, 空白用磷酸缓冲液代替底物 DL-甘油醛。在恒温孵育器 25 $^{\circ}$ C 下 3 min 混匀后连续测定 5 min 内 340 nm 处 OD 的下降值, 间接对各样品进行 AR 抑制活性测定。

抑制率(%) = (ΔA 反应/min - ΔA 空白/min) \times 100

ΔA 反应/min: 反应体系每分钟吸光度的下降值; ΔA 空白/min: 用磷酸缓冲液代替底物后每分钟吸光度的下降值。

2.3.2 小叶金露梅各提取部位 AR 抑制活性的测定及结果

分别在相同样品浓度(0.625 g/L)下, 按 2.3.1 项下方法测定各样品对 AR 抑制活性的 OD 值, 并计算抑制率, 同时采用 SPSS 17.0 计算半抑制浓度(IC₅₀)。结果见表 2。

2.4 小叶金露梅总黄酮对小鼠糖耐量的影响

正常血糖小鼠 32 只, 按体重随机分成 4 组, 每组 8 只, 适应性饲养 1 周, 禁食不禁水 12 h 后, 尾静脉采血测量小鼠空腹血糖值。分别用高、低剂量小

表 2 各提取部位对 AR 活性的抑制率

Table 2 Various extracts on inhibition rate of AR

样品 Sample	样品浓度 Concentration (g/L)	抑制率 Inhibition rate (%)	IC ₅₀ (g/L)
石油醚部位 Petroleum ether layer	0.625	26.87	—
水层部位 Water layer	0.625	36.34	—
乙酸乙酯部位 Ethylacetate layer	0.625	55.56	1.548
槲皮素 Quercetin	1.000	63.16	0.759

注: 槲皮素为阳性药物。

Note: Quercetin as a positive control drug.

叶金露梅总黄酮(1.0 g/kg、0.5 g/kg)、生理盐水、阿卡波糖(0.12 g/kg)给小鼠灌胃, 每天 1 次, 连续 7 d, 第 7 天灌胃后禁食 12 h, 第 8 天灌胃后用 6.0 g/kg 的淀粉给小鼠负荷剂量, 在 30、60、120 min 时间点测量小鼠血糖值并记录。小鼠血糖值呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 F 检验, 两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。结果见表 3。

表 3 总黄酮对淀粉负荷小鼠糖耐量的影响(mmol/L)

Table 3 Influence of total flavonoids on impaired glucose tolerance in mice with starch load(mmol/L)

组别 Group	剂量 Dose(g/kg)	正常 Normal condition	禁食 12 h 12 h fasting	30 min	60 min	120 min
对照组 Control group		7.50 \pm 0.38	5.50 \pm 1.31	15.70 \pm 3.15	13.30 \pm 3.73	12.90 \pm 2.64
阿卡波糖组 Acarbose group	0.12	6.60 \pm 0.82	5.12 \pm 1.34	10.10 \pm 3.55**	9.60 \pm 1.97	8.40 \pm 1.31
高剂量组 High-dose group	1.00	7.20 \pm 0.48	5.40 \pm 0.50	10.23 \pm 2.87**	10.02 \pm 2.40	9.02 \pm 1.00
低剂量组 Low-dose group	0.50	7.80 \pm 0.86	4.60 \pm 1.56	12.20 \pm 2.40*	11.80 \pm 2.92	10.80 \pm 1.82
F		1.626	1.478	0.043	1.290	0.107
P		1.235	0.270	0.021	0.987	0.954

注: 与对照组比较* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ compared with control group.

结果显示, 与对照组比较, 小叶金露梅总黄酮高、低剂量组均能提高小鼠的糖耐量, 在给药 30 min 后, 能明显降低淀粉负荷后小鼠的血糖值($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。小叶金露梅总黄酮高、低剂量组和阿卡波糖组在给药 60 min 和 120 min 后与对照组相比, 小鼠血糖降低, 但结果无明显差异。

3 讨论

AG 抑制剂可逆抑制 AG, 延缓碳水化合物的降解, 造成肠道葡萄糖的吸收缓慢, 延迟葡萄糖进入血液, 并因此降低血糖水平^[8]。目前 AG 抑制剂治疗 2 型糖尿病的代表药物是阿卡波糖, 阿卡波糖是一

种生物合成的假性四糖, 能抑制小肠壁细胞的 AG 活性, 从而延缓肠道内寡糖、双糖或多糖的降解, 以达到降低餐后血糖的效果, 已经被广泛用来降低餐后高血糖^[9]。

研究发现多元醇代谢通路的激活与糖尿病慢性并发症有关, AR 是体内糖代谢多元醇通路的关键酶。天然成分, 如黄酮类化合物, 由于抑制某些酶, 如黄嘌呤氧化酶、醛糖还原酶, 和抗氧化活性, 具有对健康有益的特性^[10-11]。黄酮类化合物, 如槲皮素(quercitrin)、番石榴苷(guaijaverin)和 desmanthin 已被证明具有抑制 AR 活性的作用^[12]。

本实验通过小叶金露梅不同提取部位对 AG 和 AR 的抑制作用研究发现,在小叶金露梅总黄酮浓度为 0.625 g/L 时,具有较高的 AG 抑制活性,抑制率为 93.16%, IC_{50} 为 0.067 g/L,抑制活性优于阳性药物阿卡波糖(抑制率为 75.98%, IC_{50} 为 9.623 g/mL);在此浓度下,其亦具有显著的 AR 抑制活性,抑制率为 55.56%, IC_{50} 为 1.548 g/L,其抑制活性略低于阳性药物槲皮素(抑制率为 63.16%, IC_{50} 为 0.759 g/L)。糖耐量实验表明,小叶金露梅总黄酮的高、低剂量组均能提高小鼠的糖耐量,能明显降低淀粉负荷后小鼠的血糖值。淀粉在 AG 的作用下分解成单糖才能被小肠吸收。小叶金露梅总黄酮通过抑制小肠 AG 的活性,阻止淀粉水解成葡萄糖,达到调节餐后血糖的目的。小叶金露梅总黄酮能够降低对淀粉负荷后引起的高血糖,血糖值降低明显,说明小叶金露梅总黄酮具有 AG 抑制活性,与体外筛选结果一致。

综上,小叶金露梅提取物总黄酮中含有高的 AG 抑制活性成分和比较高的 AR 抑制活性成分,在实验剂量条件下具有明显的降血糖作用。此外,本文对其降糖机理进行了初步的探讨,为从天然植物中获得 AG 和 AR 抑制剂提供研究基础。

参考文献:

- [1] 傅立国,陈谭清,郎楷永,等. 中国高等植物[M]. 青岛: 青岛出版社,2003: 661.
- [2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社,1991: 196.
- [3] 孙海峰,杨婷,郭冷秋,等. 翻白草降糖作用有效部位的研究[J]. 植物研究,2010,30(3): 360-364.
- [4] 丛慧源,王颖,邓雁如. 2种近缘中药翻白草和仙鹤草的化学成分和降血糖活性比较[J]. 中草药,2015,46(16): 2484-2491.
- [5] SONG C, HUANG L, RONG L, et al. Anti-hyperglycemic effect of *Potentilla discolor* decoction on obese-diabetic (Ob-db) mice and its chemical composition[J]. *Fitoterapia* 2012, 83(8): 1474-1483.
- [6] YANG J, CHEN H, ZHANG L, et al. Anti-diabetic effect of standardized extract of *Potentilla discolor* Bunge and identification of its active components [J]. *Drug Dev Res*, 2010, 71(2): 127-132.
- [7] 郑广海. 朝天委陵菜降血糖活性成分研究[D]. 延吉: 延边大学,2011.
- [8] 李胜华,伍贤进,曾军英,等. 蛇含委陵菜总黄酮的体外和体内降血糖效果研究[J]. 食品科学,2014,35(11): 246-250.
- [9] 张瑞霞,杨凤英,卓文海,等. 阿卡波糖的研究进展[J]. 齐鲁药事,2012(6): 360-362.
- [10] PATEL DK, KUMAR R, PRASAD SK, et al. Antidiabetic and in vitro antioxidant potential of *Hybanthus enneaspermus* (Linn) F. Muell in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Asia Pac J Trop Biom*, 2011, 1(4): 316-322.
- [11] YAWADIO R, TANIMORI S, MORITA N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rice and their aldose reductase inhibitory activities [J]. *Food Chem*, 2007, 101(4): 1616-1625.
- [12] KATO A, YASUKO H, GOTO H, et al. Inhibitory effect of rhesinine isolated from *Evodia rutaecarpa* on aldose reductase activity [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(2-3): 258-261.

(收稿日期: 2015-12-17)