

老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

苟琳¹, 钟昱阳², 阳艺², 王西瑶^{2*}

(1. 四川农业大学生命科学学院, 2. 四川农业大学农学院, 四川 成都 611130)

摘要: 为探讨老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用, 以老鹰茶为材料, 经乙醇浸提得乙醇提取物, 并通过高效液相色谱法对乙醇提取物主要成分进行分析, 进而测定其对 α -葡萄糖苷酶活性的影响。结果表明, 老鹰茶乙醇提取物主要活性成分为黄酮类物质, 该提取物对 α -葡萄糖苷酶活性有较强的抑制作用, 其半抑制质量浓度 (IC_{50}) 为 0.12 mg/mL。进一步的酶动力学研究表明其抑制机理为可逆混合型抑制, 对游离酶的抑制常数 (K_1) 为 0.058 mg/mL, 而对酶-底物络合物的抑制常数 (K_{1S}) 为 0.178 mg/mL。由此可知, 老鹰茶乙醇提取物能有效抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。该结果揭示老鹰茶有望成为抑制 α -葡萄糖苷酶活性的保健或医疗产品原料, 具有值得深入研究和开发应用的潜在价值。

关键词: 老鹰茶; α -葡萄糖苷酶; 抑制作用; 乙醇提取物

中图分类号: Q 356.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2016)06-0842-05

α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase) 对糖的分解代谢具有重要作用, 是能从低聚糖的非还原末端催化 α -1,4 糖苷键水解释放出葡萄糖的一类酶, 主要有麦芽糖酶、蔗糖酶、异构麦芽糖酶、乳糖酶等^[1]。已有的研究结果显示, 糖尿病、肥胖症和高血脂等很多代谢性疾病都与 α -葡萄糖苷酶有关^[2]。对于糖尿病患者而言, 抑制 α -葡萄糖苷酶的活性可有效地降低餐后血糖的水平, 有利于控制糖尿病的发展及预防并发症的发生。因此, 寻找有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂便成为了糖尿病治疗药物研发的一个重要途径。植物中存在着多种生物活性成分, 大都具有重要的生物学功能。李春英等^[3] 在研究中发现辣椒叶的乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶具有抑制作用。

老鹰茶通常是指由植物毛豹皮樟 (*Litsea coreana* var. *lanuginosa*) 的叶加工制成的茶品, 毛豹皮樟为樟科木姜子属植物^[4], 在我国的四川、贵州和云南等地分布较广, 民间常将毛豹皮樟的叶经干燥处理后作为茶饮, 具有生津止渴、清热解毒的功效。有研究表明老鹰茶中含有多糖^[5]、多酚^[6] 和黄酮^[7] 等多种生物活性成分。Jia 等^[8] 还报道了从老鹰茶中分离得到的多糖具有抗氧化作用。

本课题组在 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选的研究中发现老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性具有抑制作用, 但相关的酶学研究鲜见报道。本研究中试图从酶学角度了解老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响, 探讨其对酶作用的机理, 以期老鹰茶作为相关天然药物的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

老鹰茶来自于四川省雅安市老鹰茶开发繁殖场, 由当年生长的毛豹皮樟嫩叶制成。

主要试剂: α -葡萄糖苷酶 (G0660-750UN)、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG, N1377-1G) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 四氢呋喃 (色谱纯) 购自德国 Merck 公司, 甲醇 (色谱纯) 购自美国 Fisher 公司, 芦丁对照品购自中国生物制品检定研究院, 磷酸氢二钠和磷酸二氢钠等试剂为国产分析纯。

主要仪器: 高速万能粉碎机 (FW80 型) 购自北京市永光明医疗仪器厂, 三孔电热恒温水槽 (DK-8D 型) 购自上海齐欣科学仪器有限公司, 电子分析天平

收稿日期: 2015-10-31 录用日期: 2016-02-23

基金项目: 国家自然科学基金 (31071433)

* 通信作者: wxyrtl@163.com

引文格式: 苟琳, 钟昱阳, 阳艺, 等. 老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(6): 842-846.

Citation: GOU L, ZHONG Y Y, YANG Y, et al. Inhibitory effect of ethanol extract from Hawk tea on α -glucosidase[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2016, 55(6): 842-846. (in Chinese)



(BS210S 型)购自 Sartorius 公司,紫外可见分光光度计(UV-1240 型)购自日本岛津公司,高效液相色谱(HPLC)仪(Agilent1260 型)购自安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 老鹰茶乙醇提取物的制备

老鹰茶原材料经 60 °C 烘干,粉碎,过筛备用。称取 1.0 g 老鹰茶干粉,置于 100 mL 三角瓶中,加入 60% (体积分数,下同)乙醇 30 mL,60 °C 恒温浸提 2 h,8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。余下的残渣另加 30 mL 60%乙醇,60 °C 恒温浸提 1 h,8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。合并 2 次上清液并定容至 100 mL,即得老鹰茶乙醇提取液,质量浓度为 10 mg/mL。

1.2.2 主要成分的 HPLC 分析

参照文献[9]对老鹰茶乙醇提取物进行检测分析,以芦丁作为标示物质。色谱条件:色谱柱 Lichrospher C8,250 mm×4.0 mm×5 μ m;柱温 30 °C;检测波长 280 nm;流速 1.0 mL/min;进样量 20 μ L。流动相 A(体积比为 1:19 的四氢呋喃/磷酸二氢钠溶液(15.6 g/L,pH 3.0)),流动相 B(体积比为 2:3 的四氢呋喃/磷酸二氢钠溶液(15.6 g/L,pH 3.0)),梯度洗脱。

供试品溶液:取老鹰茶乙醇提取液 1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用流动相 B 稀释至刻度,摇匀,即得。

芦丁对照品溶液:取 10.05 mg 芦丁对照品用 2.0 mL 甲醇溶解,再用流动相 B 定容至 10 mL,从中精密量取 1.0 mL,置于 50 mL 容量瓶中,用流动相 B 稀释至刻度,摇匀,即得。

1.2.3 对 α -葡萄糖苷酶活性影响的测定

参考文献[10]的方法,测活体系总体积为 800 μ L,含 100 mmol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液,2 mmol/L PNPG(作为底物),加入 15 μ L 125 μ g/mL α -葡萄糖苷酶溶液,立即混匀,于 37 °C 恒温条件下,测定 400 nm 处吸光度随时间的变化值,由直线的斜率求酶活性,即用每分钟吸光度的变化值(ΔOD)表示其酶活性大小。

分析老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响,以 PNPG 为底物,加入不同浓度的老鹰茶乙醇提取物,其他条件与上述 α -葡萄糖苷酶活性测定相同,测定不同浓度老鹰茶乙醇提取物处理下 α -葡萄糖苷酶的活性。老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的相对剩余活性按下式计算:

$$\text{相对剩余活性} = A_1/A_0 \times 100\%,$$

式中 A_0 为不含提取物时的酶活性(ΔOD_0), A_1 为含提取物时的酶活性(ΔOD_1)。

1.2.4 对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学分析

在上述测活体系中,改变酶浓度,保持 PNPG 浓度不变,测定不同浓度老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响。以酶促反应速度对酶浓度作图,判断老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用机理。

进而在测活体系中,通过固定 α -葡萄糖苷酶的浓度,改变 PNPG 浓度,测定不同浓度老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响。经 Lineweaver-Burk 双倒数作图,确定老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型。并以斜率和截距对老鹰茶乙醇提取物浓度二次作图,求抑制常数。

2 结果与分析

2.1 老鹰茶乙醇提取物的主要成分分析

利用 HPLC 对老鹰茶乙醇提取物进行主要成分定性分析,以芦丁作为标示物质,得芦丁对照品的谱图(图 1(a))和老鹰茶乙醇提取物的谱图(图 1(b))。由图 1(b)可知,老鹰茶乙醇提取物经色谱分析获得 18 个峰,箭头所示峰与图 1(a)中芦丁对照品色谱图中芦丁极为相似,可初步定性为黄酮类物质芦丁,且测得该峰面积约占 49.66%。由此可知,老鹰茶乙醇提取物以黄酮类物质为主。

2.2 老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

研究老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响,在不同浓度老鹰茶乙醇提取物处理下测定 α -葡萄糖苷酶的活性,以不加老鹰茶乙醇提取物为对照,获得各浓度下 α -葡萄糖苷酶的相对剩余活性。结果如图 2 所示:老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性具有较明显的抑制作用,随提取物浓度增大,酶的相对剩余活性下降;提取物质量浓度在 0.03~0.25 mg/mL 范围内,酶的相对剩余活性下降较明显,导致酶的相对剩余活性下降至 50% 的提取物浓度,即半抑制质量浓度(IC_{50})为 0.12 mg/mL。

2.3 老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制动力学

在测活体系中,以 2 mmol/L PNPG 为底物,改变 α -葡萄糖苷酶的用量,测定不同浓度老鹰茶乙醇提取物处理下 α -葡萄糖苷酶的活性。以酶活性对酶量作图,得

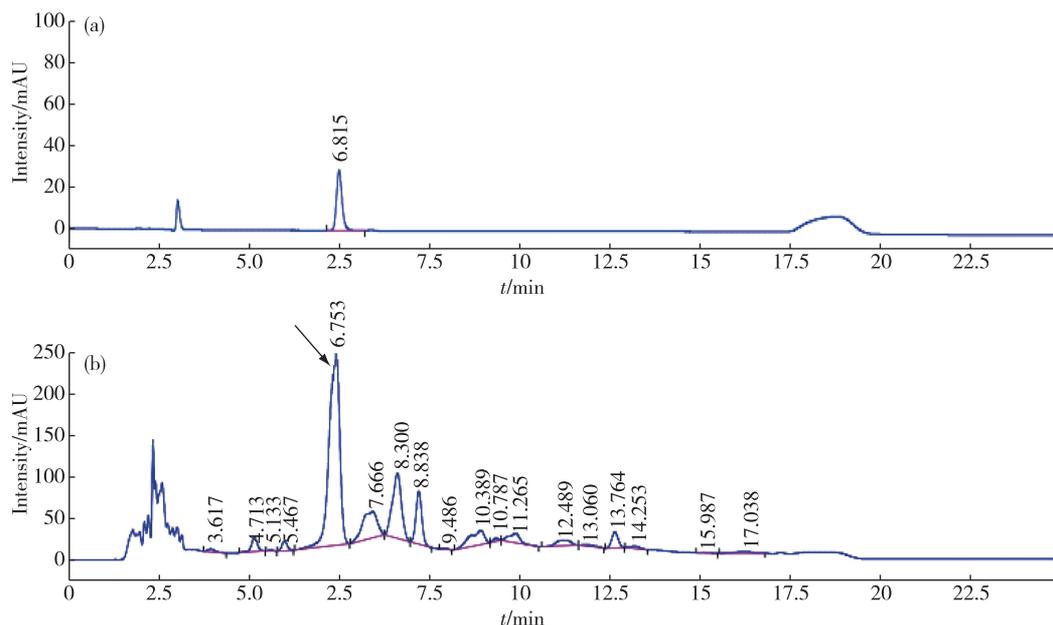


图 1 芦丁(a)及老鹰茶醇提取物(b)的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of rutin (a) and ethanol extract from Hawk tea(b)

一组经过原点的直线(图 3).由图可知,随着老鹰茶乙醇提取物浓度增加,直线斜率下降,表明老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用为可逆抑制^[11],即酶活性的下降,是由老鹰茶乙醇提取物的浓度增加所致,而不是因酶量的减少造成.

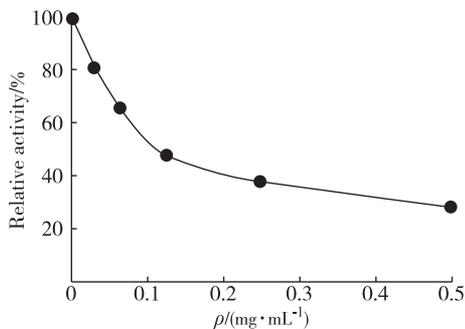


图 2 老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用
Fig. 2 The inhibition on the activity of α -glucosidase by ethanol extract from Hawk tea

老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型判定,则在测活体系中通过固定酶浓度而改变 PNPG 的浓度,测得不同浓度老鹰茶乙醇提取物处理下 α -葡萄糖苷酶的活性.经 Lineweaver-Burk 双倒数作图,得一组相交于第二象限的直线,随着老鹰茶乙醇提取物浓度的改变,图中直线的斜率和截距都发生变化(图 4 (a)).米氏常数 (K_m , 游离酶的 K_m 值为 4.84 mmol/L)随老鹰茶乙醇提取物浓度的增大而增大,最

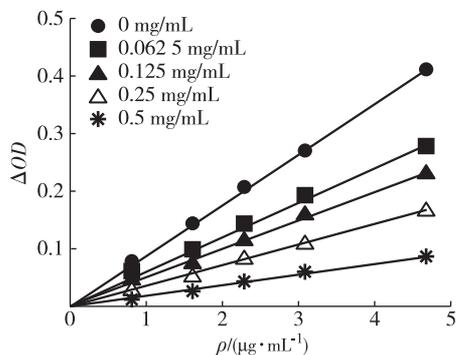
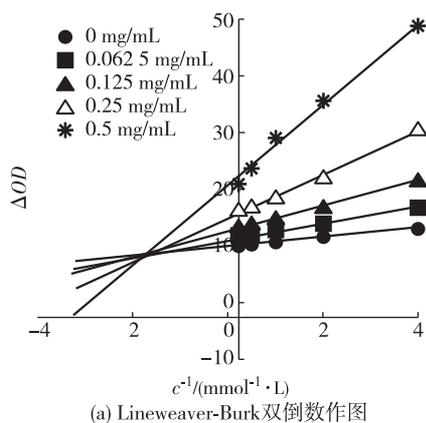


图 3 老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制机理
Fig. 3 The inhibition mechanism of ethanol extract from Hawk tea on the activity of α -glucosidase

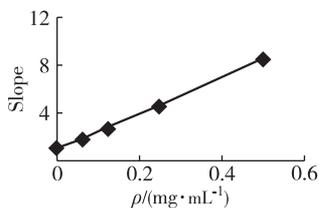
大反应速度 (V_m) 则随着提取物浓度的增大而下降,结果表明老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为混合型抑制^[12].再以双倒数图直线的斜率和纵轴截距分别对老鹰茶乙醇提取物浓度二次作图(图 4(b)和(c)),即可求得抑制剂对游离酶的抑制常数 (K_I) 为 0.058 mg/mL ,对酶-底物络合物的抑制常数 (K_{IS}) 为 0.178 mg/mL .

3 讨论

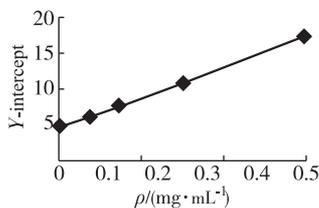
α -葡萄糖苷酶抑制剂在许多疾病的治疗中得到应用,尤其是在糖尿病的预防和治疗中,现阶段治疗糖



(a) Lineweaver-Burk 双倒数作图



(b) 斜率对效应物浓度作图



(c) 截距对效应物浓度作图

图 4 老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制类型判断和抑制常数测定

Fig. 4 Determination of the inhibition type and inhibition constants of ethanol extract from Hawk tea on the activity of α -glucosidase

尿病的常用药物阿卡波糖^[13]便是典型的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。目前,尽管阿卡波糖在糖尿病的治疗中得到了广泛使用,但存在一定的副作用,并不是理想的糖尿病治疗药物。人们更希望能找到特异、高效和安全的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,用于开发出治疗糖尿病以及其他相关疾病的有效药物。一些天然植物便具有这样的潜在特质。近年来,国内外学者对天然植物提取物生物学功能的研究越来越重视。因此从天然植物提取物中寻找有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂具有重要意义。

已有研究表明某些植物中存在的生物活性物质对 α -葡萄糖苷酶具有抑制作用^[14]。Kim 等^[15]从鸭跖草 (*Commelina communis*) 中提取的几种生物活性成分对 α -葡萄糖苷酶均具有抑制作用。Yoshikawa 等^[16]从巴西一种传统药物 *Salacia reticulata* 叶中提取到的黄酮类物质对 α -葡萄糖苷酶也有抑制作用。除此之外,竺琴等^[17]还发现西藏绿萝花 (*Scindapsas aureus*) 提取物对 α -葡萄糖苷酶具有抑制效果。本实验室在筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂过程中,发现老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶有较强的抑制作用。本研究结果表明,老鹰茶乙醇提取物主要含黄酮类生物活性成分,且该老鹰茶乙醇提取物能有效地抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, IC_{50} 为 0.012 mg/mL,说明老鹰茶中含有对

α -葡萄糖苷酶活性起到抑制作用的天然生物活性物质。进一步的动力学研究则表明,老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制机理为可逆混合型抑制,即老鹰茶乙醇提取物可与酶分子通过可逆结合来抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。

综上所述,本研究从理论上阐述了老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,并通过实验获知该提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制表现为可逆混合型抑制,拓展了老鹰茶的生物活性功效,为老鹰茶作为天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂的开发应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 王翼,张旭. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展[J].海峡药学,2009,21(9):4-6.
- [2] 郭风霞,曾阳,徐萌,等.葡萄糖苷酶抑制剂的药理研究进展[J].青海师范大学学报(自然科学版),2011,27(1):63-66.
- [3] 李春英,杨彦,李赫,等.辣椒叶提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2013,39(2):173-177.
- [4] 中国科学院昆明植物研究所.云南植物志(第三卷)[M].北京:科学出版社,1983:34.
- [5] JIA X J, DING C B, YUAN S, et al. Extraction, purification and characterization of polysaccharides from Hawk tea[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99:319-324.
- [6] 沈君子,叶明,舒阿庆,等.老鹰茶 (*Litsea coreana*. var. *lanuginosa*) 多酚类化合物的提取纯化及 EGCG 含量测定[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2010,36(3):329-334.
- [7] 陈玉璞,程文明,李俊.老鹰茶中黄酮类化学成分分析[J].安徽医科大学学报,2008,43(1):65-67.
- [8] JIA X J, DONG L H, YANG Y, et al. Preliminary structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from Hawk tea (*Litsea coreana* var. *lanuginosa*) [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95:195-199.
- [9] European Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia: rutoside trihydrate [M]. 8th ed. Strasbourg: EDQM, 2013:3187-3188.
- [10] 陈良华,刘轩,明艳林,等.叶下珠提取物对酪氨酸酶的抑制和抗氧化作用[J].厦门大学学报(自然科学版),2012,51(3):410-414.
- [11] 郑成已,郭云集,梁戈,等.苯丙酸对蘑菇酪氨酸酶活力的抑制作用[J].厦门大学学报(自然科学版),2012,51(1):117-120.
- [12] MATSUI T, UEDA T, OKI T, et al. Alpha-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.
- [13] 刘志峰, 李春梅, 李敏, 等. α -糖苷酶抑制剂阿卡波糖的临床药理作用[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(9): 965-968.
- [14] 高小平, 张蔚瑜, 邹文俊, 等. 中药提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J]. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(6): 536-538.
- [15] KIM H S, KIM Y H. Alpha-glucosidase inhibitors from *Commelina communis* [J]. *Planta Med*, 1999, 65(5): 437-439.
- [16] YOSHIKAWA M, MORIKAWA T. Absolute stereo-structure of potent alpha-glucosidase inhibitor, salacinol, with unique thiosugar sulfonium sulfate inner salt structure from *Salacia reticulata* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10(5): 1547-1554.
- [17] 竺琴, 绽放焜, 杜志云, 等. 西藏绿萝花提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制及抗氧化作用[J]. *中药材*, 2009, 32(1): 89-92.

Inhibitory Effect of Ethanol Extract from Hawk Tea on α -Glucosidase

GOU Lin¹, ZHONG Yuyang², YANG Yi², WANG Xiyao^{2*}

(1. College of Biology and Science, Sichuan Agriculture University,

2. College of Agronomy, Sichuan Agriculture University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In this study, we explored the inhibitory effect of ethanol extract from Hawk tea on α -glucosidase. We used Hawk tea as the raw material and obtained ethanol extract through ethanol extraction, and then analyzed the main ingredient of the ethanol extract using high performance liquid chromatography. Data showed that the main active substance of ethanol extract from Hawk tea was flavonoid constituent, which showed a strong inhibitory effect on the activity of α -glucosidase. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was 0.12 mg/mL. Furthermore, enzyme kinetics analysis demonstrated a reversible mixed inhibition mechanism, where the inhibition constant for resolvase (K_1) was 0.058 mg/mL, while the inhibition constant for enzyme-substrate complexes (K_{IS}) was 0.178 mg/mL. In summary, the ethanol extract from Hawk tea contained bioactive compounds against α -glucosidase, which could effectively inhibit the activity of α -glucosidase. This result reveals that Hawk tea is a potential raw material for the development of α -glucosidase-inhibition relevant health care and medical products.

Key words: Hawk tea; α -glucosidase; inhibition; ethanol extract