

• 研究报告 •

4种海星的 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

张改云¹, 范林², 侯忠海², 张玉便¹, 杨艳柳¹ (1. 国家海洋局第三海洋研究所生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620)

[摘要] 目的 寻找具有降糖活性作用的海星并确定其活性部位。方法 首先采用正常和糖尿病小鼠口服糖耐量试验, 比较4种海星粗提物改善口服糖耐量的作用, 然后利用体外 α -葡萄糖苷酶抑制剂模型进一步确定具有改善口服糖耐量作用的海星中抑制 α -葡萄糖苷酶的活性部位。结果 罗氏海盘车粗提物对正常小鼠和糖尿病小鼠餐后0.5、1 h血糖均有显著降低作用, 其中的正丁醇部位具有很强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结论 罗氏海盘车的正丁醇部位具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用。

[关键词] 海星; 罗氏海盘车; 糖耐量; α -葡萄糖苷酶; 四氧嘧啶

[中图分类号] R282.74 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)04-0284-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.04.012

Inhibitory activity of α -glucosidase in four starfishes

ZHANG Gaiyun¹, FAN Lin², HOU Zhonghai², ZHANG Yubian¹, YANG Yanliu¹ (1. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 2. School of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

[Abstract] **Objective** To search for starfishes with hypoglycemic activity and orientate the bioactive fractions. **Methods** Firstly, the crude extracts of four starfishes were subjected to oral glucose tolerance test on normal and diabetic mice. And then the *in vitro* α -glucosidase activity assay was introduced to confirm the bioactive fractions. **Results** The crude extract of *Asterias rollestoni* could lower the blood glucose of normal and diabetic mice after 0.5 h and 1 h. Furthermore, its *n*-BuOH fraction exhibited potent α -glucosidase inhibitory activity. **Conclusion** The *n*-BuOH extract of *Asterias rollestoni* had a potent α -glucosidase inhibitory activity.

[Key words] starfish; *Asterias rollestoni*; glucose tolerance; α -glucosidase; alloxan

糖尿病是以持续高血糖为基本生化特征的一种常见的内分泌代谢性疾病。目前临床上常用的口服降血糖药物主要有磺脲类、双胍类、噻唑烷二酮类、非磺脲类 ATP 敏感性钾通道抑制剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等。临床上使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂主要为阿卡波糖和伏格列波糖。近年来,天然产物来源的抑制葡萄糖苷酶的研究已成为糖尿病治疗药物研究的热点之一^[1]。海星是一种营养丰富、价值极高的海洋动物,不仅能食用和饲用,而且可以药用,具有一定的经济和药用价值及良好的开发利用前景。现代药理研究表明,海星具有抗癌、抗病毒、抗细菌、抗真菌、溶血、抗动脉粥样硬化、降压、抗炎等活性^[2]。笔者采用小鼠口服糖耐量试验结合体外 α -葡萄糖苷酶抑制剂模型研究了4种海星对 α -葡萄糖苷酶抑制作用及其活性部位。

1 材料

1.1 仪器与试剂 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, pNPG, Sigma 公司)、阿卡波糖(acarbose, 拜耳医药保健有限公司)、四氧嘧啶(USA, Sigma 公司)、葡萄糖测定试剂盒(北京普利来生物制品有限公司)、血糖仪(EZ Smart 型,台湾台欣公司)、血糖试纸(EZ Smart 血糖测试片)。

1.2 药物 海星样品:4种海星均购自厦门市第八海鲜市场,由国家海洋局第三海洋研究所生态室王建军博士分别鉴定为:罗氏海盘车(*Asterias rollestoni* Bell)、飞白枫海星(*Archaster typicus*)、骑士章海星(*Stellaster equestris* Retzius)和中华疣海星(*Pentaster chinensis*)。

1.3 动物 清洁级 ICR 小鼠,18~22 g 雄性,购自斯莱克实验动物有限公司。动物合格证号:SCXK(沪)2012-0002。饲养条件:动物进入实验室后,小鼠每笼放养10只,饲养3 d后用于实验,由专人饲养管理。动物室光照充足,通风和空调设备良好,室

[基金项目] 福建省科技计划农业科技重点项目(2011N0019)。

[作者简介] 张改云,博士,副研究员。Tel: (0592) 2195833, E-mail: zhanggyun@126.com。

温控制在 20 ~ 25 °C, 相对湿度为 60% ~ 70%。实验室按常规定期消毒。

2 方法

2.1 海星提取方法 将 4 种海星各 100 g 用剪刀剪碎, 分别加入 70% 的乙醇 200 ml, 超声提取 3 次, 每次 30 min, 合并滤液, 减压浓缩蒸干即得海星的粗提物。

2.2 α -葡萄糖苷酶标准曲线制作 用磷酸缓冲液配制 1 000 mol/L pNPG, 并稀释成 100、70、45、15、10、5、1 mol/L。分别取上述 7 种不同浓度的 pNPG 溶液各 100 ml, 加入 100 μ l 500 U/L α -葡萄糖苷酶, 置于 37 °C 恒温水浴箱 25 min; 然后加入 0.2 μ mol/L NaOH 溶液 100 ml, 混匀, 在 405 nm 下测定消光度 OD 值, 测 3 组, 取平均值。以 OD 值为纵坐标, 对硝基苯酚浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

2.3 测定 α -葡萄糖苷酶活力 在 112 μ l 磷酸钾缓冲液 (pH 6.8) 中加入 200 U/L α -葡萄糖苷酶 20 μ l、DMSO 8 μ l, 置于 37 °C 恒温水浴箱 15 min 后加入 2.5 mmol/L pNPG 20 μ l, 摇匀, 37 °C 温育 15 min, 再加入 0.2 mol/L Na₂CO₃ 溶液 80 μ l, 于 405 nm 波长下测 OD 值。

2.4 测定 α -葡萄糖苷酶抑制率 葡萄糖苷酶 10 μ l, 加入样品液 20 μ l (各药物的终浓度为 1 mg/ml), 于 37 °C 恒温水浴箱温育 15 min; 然后加入 70 μ l pNPG 溶液, 于 37 °C 水浴反应 25 min; 再加入 70 μ l 0.15 mol/L 的 NaOH 溶液终止反应, 放入 37 °C 恒温水浴箱显色 15 min。在 405 nm 处测定吸光度 (A_n)。以 PBS 溶液代替酶液作为阴性对照 (A_1); 以 PBS 溶液代替样品液作为空白对照 (A_0); 1 mg/ml 的阿卡波糖溶液代替样品液作为阳性对照。葡萄糖苷酶的抑制率 (I) = $[A_0 - (A_n - A_1)] / A_0 \times 100\%$ 。

2.5 高血糖小鼠口服糖耐量试验 取 ICR 小鼠 60 只, 造模前禁食 16 h, 饮水不限。四氧嘧啶用蒸馏水新鲜配制成浓度为 6 mg/ml 的溶液, 以 60 mg/kg (0.2 ml/20 g, iv) 造模。48 h 后血糖仪测量血糖值, 取血糖值不低于 14.5 mmol/L 者用于实验。模型动物 60 只随机分成 6 组, 每组 10 只, 即模型对照组、阿卡波糖组、4 种海星粗提物组 (相当于海星 10 g/kg, iv); 另取 10 只正常小鼠为空白组。

所有小鼠禁食 12 h, 给予灌胃药物 (受试药阳性阿卡波糖, 对照生理盐水) 30 min 后, 麦芽糖按 2.5 g/kg 体重的剂量灌胃, 分别在 0、45、90 min 从尾静脉采血, 检测血糖变化。

2.6 正常小鼠口服糖耐量试验 取 ICR 小鼠 60 只, 按体重随机分成 6 组, 即空白组、阿卡波糖组、4 种海星粗提物组 (相当于海星 10 g/kg, iv), 每组 10

只。所有小鼠禁食 12 h, 给予灌胃药物 (受试药阳性阿卡波糖, 对照生理盐水) 30 min 后, 麦芽糖按 2.5 g/kg 体重的剂量灌胃, 分别在 0、45、90 min 从尾静脉采血, 检测血糖变化。

2.7 统计学处理方法 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 以单因素方差分析比较组间数据差异的显著性, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

3 实验结果

3.1 α -葡萄糖苷酶标准曲线 如图 1 所示, α -葡萄糖苷酶标准曲线为 $Y = 0.005X + 0.044$, $r = 0.9995$, 其线性良好。

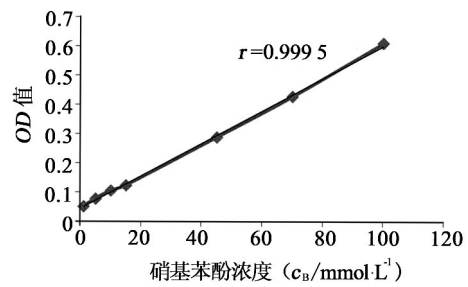


图 1 α -葡萄糖苷酶的标准曲线

3.2 海星提取物对正常小鼠口服糖耐量的影响 正常小鼠给予麦芽糖后, 各组小鼠血糖均升高, 30 min 后血糖持续恢复; 与 0 min 比较, 30、60 min 时血糖升高具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 0 min 比较, 阳性对照阿卡波糖组和罗氏海盘车粗提物组在 30、60、120 min 血糖升高不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 表明其对正常小鼠口服麦芽糖后血糖升高有一定抑制作用。而飞白枫海星、骑士章海星和中华疣海星粗提物则无显著改善正常小鼠口服糖耐量作用 (表 1)。

表 1 4 种海星提取物对正常小鼠糖耐量的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	血糖 ($c_n / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
	0 min	30 min	60 min	120 min
空白组	6.1 \pm 0.6	12.4 \pm 1.9 ²⁾	10.6 \pm 1.2 ²⁾	8.0 \pm 1.1
阿卡波糖组	6.4 \pm 0.6	8.4 \pm 1.3	7.9 \pm 1.7	7.0 \pm 1.4
罗氏海盘车组	6.6 \pm 0.8	8.7 \pm 1.5	8.3 \pm 1.8	7.1 \pm 1.4
飞白枫海星组	5.9 \pm 0.8	10.8 \pm 1.6 ²⁾	9.1 \pm 1.3 ¹⁾	7.0 \pm 1.2
骑士章海星组	6.5 \pm 0.5	12.5 \pm 1.2 ²⁾	10.8 \pm 1.7 ²⁾	8.3 \pm 1.2
中华疣海星组	5.9 \pm 0.8	9.8 \pm 1.6 ¹⁾	8.9 \pm 2.0	8.1 \pm 1.0

¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$ 与 0 min 比较

3.3 4 种海星提取物对高血糖小鼠口服糖耐量的影响 正常小鼠和高血糖小鼠灌胃麦芽糖后, 各组小

鼠血糖均升高 0.5 h 小鼠血糖均达到最高值,然后逐渐降低。阳性对照阿卡波糖组和罗氏海盘车粗提物组对四氧嘧啶性高血糖小鼠的糖耐量有明显改善作用(表 2)。

表 2 海星提取物对高血糖小鼠糖耐量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	血糖 ($c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
	0 min	30 min	60 min	120 min
空白组	6.2±0.9	12.7±2.0	9.8±2.3	7.5±1.3
模型组	18.5±5.6	32.0±5.8	29.2±4.1	26.2±4.9
阿卡波糖组	19.2±4.4	23.1±6.0 ²⁾	22.7±4.4 ¹⁾	20.6±4.8
罗氏海盘车组	18.7±4.9	23.7±4.7 ²⁾	23.2±4.2 ¹⁾	20.3±4.5
飞白枫海星组	19.6±4.2	29.9±6.9	27.7±6.5	24.9±6.9
骑士章海星组	19.4±5.5	31.1±6.7	28.2±5.2	23.2±6.0
中华疣海星组	19.5±4.4	29.1±6.5	27.9±6.0	24.8±6.2

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较

3.4 罗氏海盘车粗提物中不同活性部位对 α -葡萄糖苷酶的作用 笔者进一步对罗氏海盘车的粗提物用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇分别萃取,得到 4 个相应的萃取物,活性结果表明,其中正丁醇部位的 α -葡萄糖苷酶抑制活性最高,浓度为 1 mg/ml 时抑制率为 89.6%;其次为乙酸乙酯部分,抑制率为 60.2%,而石油醚和氯仿部分则活性较弱(表 3)。

表 3 罗氏海盘车不同提取部位与阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶影响的比较

	抑制率(%)
阿卡波糖	95.8±3.7
石油醚部位	17.4±1.3
氯仿部位	30.9±2.6
乙酸乙酯部位	60.2±2.8
正丁醇部位	89.6±4.3

4 讨论

α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)又称葡萄糖苷水解酶、麦芽糖酶,位于小肠刷状缘膜上皮细胞,能将双糖如蔗糖、麦芽糖等水解成可被小肠吸收的单糖,是食物中糖(碳水化合物)水解的关键酶。因此, α -葡萄糖苷酶抑制剂的作用机制是抑制糖在小肠上部的吸收,减少葡萄糖吸收入血,进而抑制餐后高血糖,改善对血糖的控制,降低餐后血糖升高的幅度,可减轻对胰岛 B 细胞的刺激,从而使血浆胰岛素分泌减少,起到缓解胰岛 B 细胞负荷的作用^[3]。1995 年,阿卡波糖(拜糖平,acarbose)被 FDA 批准用于临床,在 2 型糖尿病的治疗中发挥重要作用,但有一定的副作用。因此,有必要继续研发副作用小、疗效可靠的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。海星含有大量结构独

特的具有生物活性的代谢产物,如皂苷、生物碱、甾醇、多糖、维生素、蛋白质、多肽和氨基酸等,它们具有抗癌、抑菌、抗病毒、抗炎、降血压、降血糖和降血脂等活性^[4]。许东晖等^[5]研究发现从多棘海盘中分离并经结构修饰获得的海星甾醇 A1998 可明显降低四氧嘧啶及链脲霉素诱导的小鼠糖尿病模型的血糖含量,其机制与增强胰岛细胞对葡萄糖反应的敏感性有关。笔者研究了 4 种海星的降血糖作用,并发现抑制 α -葡萄糖苷酶的活性部位。

四氧嘧啶是一种特异性细胞毒性物质,可选择性损伤动物胰岛 B 细胞,促进氧自由基释放,直接破坏 B 细胞膜结构,损伤 DNA,使胰岛素合成障碍,空腹血糖升高。笔者采用四氧嘧啶造糖尿病小鼠模型,首先通过正常小鼠和糖尿病小鼠口服糖耐量试验^[6,7]比较研究了 4 种海星的乙醇提取物改善口服糖耐量的作用,发现罗氏海盘车的乙醇提取物具有显著改善正常小鼠和糖尿病小鼠口服糖耐量的作用,提示罗氏海盘车的乙醇提取物可能通过增加胰岛素分泌,提高胰岛素敏感性或抑制 α -葡萄糖苷酶起到降低餐后血糖的作用。由于罗氏海盘车的乙醇提取物不增加胰岛素分泌和胰岛素敏感性,而是具有抑制 α -葡萄糖苷酶的作用,减少麦芽糖水解为单糖,进而抑制餐后高血糖。笔者进一步建立体外 α -葡萄糖苷酶抑制剂模型^[8,9],确定罗氏海盘车粗提物中抑制 α -葡萄糖苷酶的活性部位,发现正丁醇萃取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性最高,其次为乙酸乙酯部位。罗氏海盘车属海星纲(Asterozoa) 钳棘目(Forcipulatida) 海盘车科(Asteriidae) 动物,资源丰富,在我国黄海有大量分布。在民间,罗氏海盘车常被用来预防或治疗胃溃疡、补肾壮阳等,具有较高的药用价值,文献报道了罗氏海盘车中含有微量元素、氨基酸、皂苷和腺苷等^[10]。笔者发现其大极性的正丁醇部位和中等极性的乙酸乙酯部位具有较好的抑制 α -葡萄糖苷酶活性,拓宽了其应用价值,但其具体的降糖活性成分尚有待进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 袁鑫,耿越. 海星生物活性成分的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(B12): 268-271.
- [2] 刘铁铮,郭爱洁,王桂春,等. 海星化学成分的生物活性及应用研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(13): 122-125.
- [3] Lee SM. The effect of chronic alpha-glucosidase inhibition on diabetic nephropathy in the Db/Db mouse [J]. Diabetes, 1982, 31(3): 249-254.
- [4] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京: 海洋出版社, 1990, 705-708.
- [5] 许东晖,许实波. 海洋新化合物 A1998 降血糖作用机制研究[J]. 中草药, 1999, 30(10): 752-755.

- [6] 韦宝伟,刘布鸣,曾宪彪,等. 木姜叶柯总黄酮对大小鼠血糖和糖耐量的影响[J]. 现代药物与临床,2012,27(1): 19-22.
- [7] 何敏,吴锋,徐济良. 灵芝多糖对小鼠糖耐量的影响[J]. 南通医学院学报,2004,24(4): 369-372.
- [8] 杨倩,张茜,张德甫,等. 11味中药提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J]. 时珍国医国药,2011,22(12): 3011-3012.
- [9] Si MM, Lou JS, Zhou CX, et al. Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* in vitro and in vivo[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128(1): 154-159.
- [10] 刘涛,詹永成,裴月湖. 罗氏海盘车中一个新的脑苷脂类化合物罗氏脑苷[D]. 中国天然药物,2007,5(3): 179-181.
[收稿日期] 2013-05-22 [修回日期] 2013-09-14
[本文编辑] 陈静

(上接第249页)

- [8] 吴文娟,胡绿荫,孙志华,等. 获得性免疫缺陷综合征患者白假丝酵母分离株基因型及耐药性分析[J]. 检验医学,2007,22(6): 684-687.
- [9] Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, et al. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability[J]. J Biol Chem, 2005, 280(21): 20558-20564.
- [10] Wullschlegel S, Loewth R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism[J]. Cell, 2006, 124(3): 471-484.
- [11] Rosenbach A, Dignard D, Pierce JV, et al. Adaptations of *Candida albicans* for growth in the mammalian Intestinal tract[J]. Eukaryot Cell, 2010, 9(7): 1075-1086.
- [12] Uhl MA, Biery M, Craiget N, et al. Haploin sufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans* [J]. EMBO, 2003, 22(11): 2668-2678.
- [13] Binda M, Péli-Gulli MP, Bonfils G, et al. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex [J]. Mol Cell, 2009, 35(5): 563-573.
- [14] Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, et al. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination [J]. Cell Microbiol, 2007, 9(12): 2938-2954.
- [15] Tsao CC, Chen YT, Lan CY. A small G protein Rhb1 and a GTPase-activating protein Tsc2 involved in nitrogen starvation-induced morphogenesis and cell wall integrity of *Candida albicans* [J]. Fungal Genet Biol, 2009, 46(2): 126-136.
- [16] Zacchi LF, Gomez-Raja J, Davis DA. Mds3 regulates morphogenesis in *Candida albicans* through the TOR pathway [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(14): 3695-3710.
- [17] Lee CM, Nantel A, Jiang LH, et al. The serine/threonine protein phosphatase SIT4 modulates yeast-to-hypha morphogenesis and virulence in *Candida albicans* [J]. Mol Microbiol, 2004, 51(3): 691-709.
- [18] Liao WL, Ramón AM, Fonzi WA. GLN3 encodes a global regulator of nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* [J]. Fungal Genet Biol, 2008, 45(4): 514-526.
- [19] Huber A, Bodenmiller B, Uotila A, et al. Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis [J]. Genes Dev, 2009, 23: 1929-1943.
- [20] Liu W, Zhao JW, Li XC, et al. The protein kinase CaSch9p is required for the cell growth, filamentation and virulence in the human fungal pathogen *Candida albicans* [J]. FEMS Yeast Res, 2010, 10(4): 462-470.
- [21] Li H, Tsang CK, Watkins M, et al. Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter [J]. Nature, 2006, 442: 1058-1061.
- [22] Strugill TW, Cohen A, Diefenbacher M, et al. TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells [J]. Eukaryot Cell, 2008, 7(10): 1819-1830.
- [23] Kim JE, Chen J. Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation [J]. PNAS, 2000, 97(26): 14340-14345.
- [24] Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices [J]. Clin Microbiol, 2004, 17(2): 255-267.
- [25] Bastidas RJ, Heitman J, Cardenas ME. The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans* [J]. PLoS Pathol, 2009, 5(2): e1000294.
- [26] Tsuchimori N, Sharkey LL, Fonzi WA, et al. Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells [J]. Infect Immun, 2000, 68(4): 1997-2002.
- [27] Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p [J]. Curr Biol, 2005, 15(12): 1150-1155.
- [28] Lempiäinen H, Uotila A, Urban J, et al. Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling [J]. Mol Cell, 2009, 33(6): 704-716.
- [29] Rohde JR, Cardenas ME. Nutrient signaling through TOR kinases controls gene expression and cellular differentiation in fungi [J]. Curr Top Microbiol, 2004, 279: 53-72.
- [30] Rohde JR, Bastidas R, Puria R, et al. Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(2): 153-160.
- [31] Zurita-Martine SA, Cardenas ME. Tor and cyclic AMP-Protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth [J]. Eukaryot Cell, 2005, 4(1): 63-71.
- [32] Pedrucci I, Dubouloz F, Cameroni E, et al. TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0 [J]. Mol Cell, 2003, 12(6): 1607-1613.
- [33] Soulard A, Cohenl A, Hall MN. TOR signaling in invertebrates [J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(6): 825-836.
[收稿日期] 2013-01-23 [修回日期] 2013-05-20
[本文编辑] 陈静 李春德