

竹叶椒对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机制研究

宋彤彤, 郭涛*, 章聚宝, 吴鹏法, 魏黎阳, 谭素北

(兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 采用体外抑制模型方法评价竹叶椒生物碱对 α -葡萄糖苷酶 (酵母菌来源、小鼠小肠来源) 抑制作用, 并采用 Lineweaver-Burk 双倒数法分析其抑制 α -葡萄糖苷酶活性的机制。结果显示, 竹叶椒脂溶性生物碱和水溶性生物碱都对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用。竹叶椒脂溶性生物碱和水溶性生物碱对酵母来源 α -葡萄糖苷酶 IC_{50} (半数抑制浓度) 分别为 (0.73 ± 0.17) mg/mL、 (2.74 ± 0.28) mg/mL; 脂溶性生物碱对小鼠小肠来源 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 (1.94 ± 0.13) mg/mL。动力学研究表明, 竹叶椒生物碱提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型为典型的非竞争性抑制。竹叶椒生物碱对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制作用, 为进一步的开发利用提供强有力的理论依据。

关键词: 竹叶椒; α -糖苷酶; 生物碱; 非竞争性抑制

中图分类号: TS 201.4 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.009

Study on the Inhibition Against α -glycosidase and Mechanism of *Zanthoxylum armature* DC.

SONG Tongtong, GUO Tao*, ZHANG Jubao, WU Pengfa, WEI Liyang, TAN Subei

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Study on the inhibition of alkaloids from *Zanthoxylum armatum* DC. on α -glucosidase and mechanism. The inhibitory activity of alkaloids from *Zanthoxylum armatum* against α -glucosidase (from yeast and murine small intestine) were evaluated using vitro model, and the mechanism was analyzed using Lineweaver-Burk double-reciprocal analysis. Our results revealed that fat-soluble and dissoluble alkaloids both had significant inhibition on α -glucosidase, IC_{50} values for α -glucosidase from yeast were (0.73 ± 0.17) mg/mL, (2.74 ± 0.28) mg/mL, respectively. Ones for α -glucosidase from murine small intestine were (1.94 ± 0.13) mg/mL. Moreover, the results of kinetic studies demonstrated inhibitive mechanism of alkaloids is noncompetition inhibition. The results suggested that alkaloids can effectively inhibit the α -glucosidase, and provide strong rationale for further exploitation and utilization.

Keywords: *Zanthoxylum armatum* DC., α -glucosidase, alkaloid, non-competitive inhibition

收稿日期: 2016-10-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81360476)。

* 通信作者: 郭涛 (1976—), 男, 博士, 副教授, 主要从事药食两用资源开发利用研究。E-mail: gt010010@163.com

引用本文: 宋彤彤, 郭涛, 章聚宝, 等. 竹叶椒对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机制研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 58-62.

竹叶椒 (*Zuuthoxylum urmutum* DC.) 是常见的药食两用植物,芸香科花椒属。对竹叶椒的化学成分研究显示,竹叶椒含有酰胺、生物碱、木脂素、黄酮、香豆素、三萜等成分^[1-6]。其中双四氢呋喃木脂素和喹啉类生物碱是竹叶椒的特征性成分^[7]。

糖尿病是由于胰岛素分泌不足和胰岛素作用缺陷或者两者共同作用所导致的碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢紊乱疾病。 α -葡萄糖苷酶是位于小肠刷状缘的消化碳水化合物的关键酶,其是引起餐后血糖升高的主要的酶之一。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以延缓所摄入碳水化合物的消化吸收,降低了餐后血糖和胰岛素的峰值。抑制 α -葡萄糖苷酶的作用成为阻止餐后高血糖的主要治疗策略^[7-11]。目前临床应用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂多是生物合成或半生物合成药,种类少、价格贵、副作用大^[12]。当前从天然产物,尤其是从常用的药食两用植物中开发降血糖的 α -葡萄糖苷酶抑制剂成为研究者关注的热点^[13-14]。作者研究发现竹叶椒醇提物具有抑制 α -葡萄糖苷酶的活性^[15-16]。针对竹叶椒乙醇部位提取物中所含有的生物碱,包括脂溶性和水溶性生物碱,进行有关 α -葡萄糖苷酶的研究(抑制作用及作用机理),为竹叶椒资源的进一步的开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

竹叶椒:广西南宁市售商品; α -葡萄糖苷酶、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷:美国 Sigma 公司产品;二甲亚砜(DMSO)、磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):天津市大茂化学试剂厂产品。

试验动物为清洁级昆明小鼠:体质量 20 g 左右(合格证号:医动字第 14.005,小鼠许可证号:SCXK(甘)2013-0002);购自兰州大学动物实验中心。

1.2 仪器与设备

UV-6100S 型紫外可见分光光度计:上海元析仪器有限公司产品;KQ-50DB 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;FA2004 电子分析天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 生物碱制备 参照文献方法^[15],取竹叶椒粉末 200 g,在 75 °C 下用体积分数 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,过滤后合并滤液,减压浓缩至粘

稠状且无乙醇味,得乙醇部位提取浸膏。浸膏用蒸馏水混悬,并用质量分数 2% 硫酸调节 pH 至 2,将所得混合物摇匀静置后抽滤,弃滤渣得酸水液。浓氨水调节滤液 pH 至 9~10 左右后加氯仿萃取得脂溶性生物碱。水层继续用 2% 的 NaOH 调 pH>12 后用正丁醇萃取得水溶性生物碱。提取流程见图。

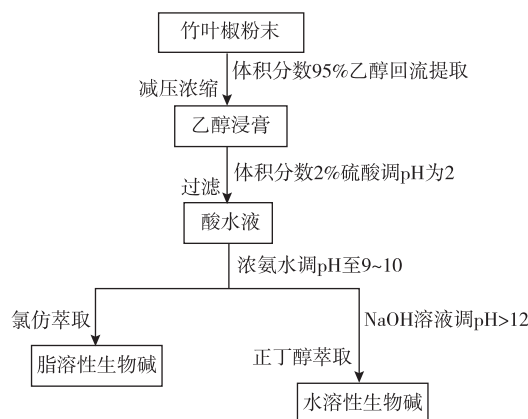


图 1 生物碱提取流程

Fig. 1 Extraction of alkaloid

1.3.2 小鼠小肠 α -葡萄糖苷酶的制备 依据文献方法^[17],颈椎脱位处死小鼠,立即取出小鼠小肠。小鼠肠道内的脂肪组织使用质量分数 0.9% NaCl 溶液和 10 mmol/mL 的磷酸钠缓冲液 PBS (pH 7.0) 清洗,洗净后用剪刀将小鼠小肠纵向切开,将小肠剪碎。加入 4 °C 预冷的磷酸钠 PBS 缓冲液 (pH 7.0),体积比为 1:3。混合物研磨均匀,离心,条件是 4 °C, 8 000 r/min, 20 min,吸取上清液后分装,冻藏,温度为 -20 °C,以备用。

1.3.3 竹叶椒提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响 参照文献方法^[18]并稍做修改。 α -葡萄糖苷酶溶液 15 μL (10 U/mL) 与 30 μL 竹叶椒生物碱 (浓度为 0.25~5.0 mg/mL) 溶液混合均匀后,加入 1 860 μL 磷酸缓冲液 (pH 6.8),将混合液放置于恒温培养箱中,在 37 °C 下孵化 20 min,取出后加入 30 μL PNPG (浓度为 10 mmol/L),再次放入恒温培养箱中,在 37 °C 下孵化 30 min,取出后添加 1 980 μL 碳酸钠 (浓度为 1 mol/L) 以终止酶促反应。立即加入蒸馏水将混合液稀释到 10 mL,利用紫外分光光度计测定其吸光值。分光光度计波长为 410 nm。空白组样品溶液由 30 μL 磷酸缓冲液 PBS 代替。每组实验做 3 次平行对照。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}})}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

1.3.4 酶抑制动力学 参照文献方法 [19], 将 10 mmol/L PNPG 稀释成 0.25, 0.5, 1, 2, 10 mmol/L 溶液。取在 10 mL 试管中加入 30 μ L PNPG, 1 260 μ L 磷酸缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 下恒温孵化 30 min, 加入 15 μ L α -葡萄糖苷酶溶液 (10 U/mL), 立即在 410 nm 波长下测定, 然后依次用未加生物碱样品的溶液、2.5 mg/mL 竹叶椒脂溶性、2.5 mg/mL 水溶性生物碱代替相应的磷酸缓冲液进行测定。再依照 Lineweaver-Burk 双倒数作图法研究抑制机理, 分析相应的动力学最大速度 ($V_{\max}$) 和米氏常数 (K_m)。每组实验做 3 次平行对照。

1.3.5 数据统计分析 数据统计分析利用 SPSS 20.0 统计软件包进行。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用方差分析及 LSD 法比较各组的 IC_{50} 值。P 值小于 0.05 被认为具有显著性差异。

2 结果

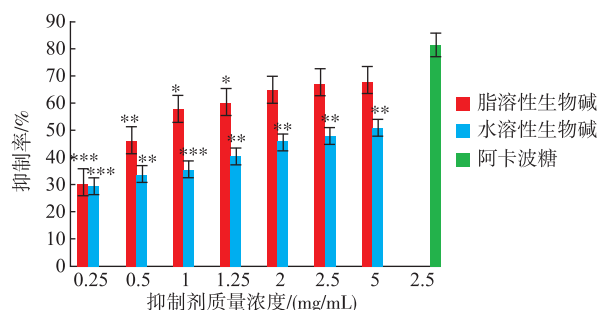
2.1 竹叶椒生物碱对酿酒酵母来源 α -葡萄糖苷酶和小鼠小肠来源 α -葡萄糖苷酶活性影响

如图 2 所示, 竹叶椒水溶性生物碱和脂溶性生物碱对 α -葡萄糖苷酶都有一定的抑制作用。两种生物碱在 0.25~5.0 mg/mL 范围内, 随着质量浓度的升高, 其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用逐渐升高, 呈现抑制强度的浓度依赖关系。当质量浓度为 5 mg/mL 时, 水溶性生物碱的抑制率达到 50.69%, 脂溶性生物碱的抑制率达到 67.90%。由图 2 可知, 每一个测试浓度下, 脂溶性生物碱对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用高于水溶性生物碱的作用。在 2~5 mg/mL 范围内脂溶性生物碱与阳性对照相比, 无显著性差异, 其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用接近阳性对照。

竹叶椒水溶性生物碱对酿酒酵母来源 α -葡萄糖苷酶半数抑制 IC_{50} 值为 (2.744 $\pm$ 0.285) mg/mL, 脂溶性生物碱对 α -葡萄糖苷酶半数抑制 IC_{50} 值为 (0.734 $\pm$ 0.173) mg/mL (表 1)。阳性对照阿卡波糖 IC_{50} 值为 (0.810 $\pm$ 0.109) mg/mL。

如图 3 所示, 竹叶椒水溶性生物碱和脂溶性生物碱对小鼠小肠来源的 α -葡萄糖苷酶有很强的抑制作用。两种生物碱在 0.25~5.0 mg/mL 的范围内, 其抑制活性与浓度呈正相关性。在质量浓度为 10 mg/mL 时, 水溶性生物碱对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

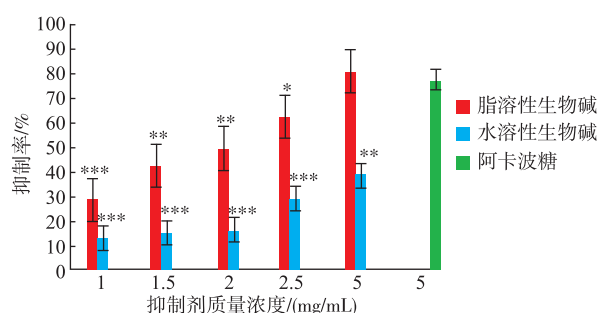
达到 41.10%, 脂溶性生物碱为 80.60%。每一个对应的质量浓度下, 脂溶性生物碱对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用明显大于水溶性生物碱的作用。竹叶椒脂溶性生物碱在质量浓度为 5~10 mg/mL 时, 与阳性对照相比无显著性差异, 其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用接近阳性对照。



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

图 2 竹叶椒生物碱对 α -葡萄糖苷酶 (酿酒酵母) 活性的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of α -glycosidase enzymes of alkaloid from *Zanthoxylum armatum* DC.



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

图 3 竹叶椒生物碱对 α -葡萄糖苷酶 (小鼠小肠) 活性的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of rat small intestine α -glycosidase enzymes of alkaloid from *Zanthoxylum armatum* DC.

竹叶椒脂溶性生物碱对小鼠小肠来源 α -葡萄糖苷酶半数抑制 IC_{50} 值为 (1.944 $\pm$ 0.078) mg/mL, 而水溶性生物碱在质量浓度达到 10 mg/mL 时, 抑制率仍然没有达到 50%, 无法计算 IC_{50} 值。阳性对照阿卡波糖 IC_{50} 值为 (0.81 $\pm$ 0.11) mg/mL (表 1)。

2.2 竹叶椒生物碱对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制

选择 5 mg/mL 的竹叶椒水溶性生物碱、脂溶性生物碱以及不添加测试样品的空白对照, 分别加入 5 个不同质量浓度的 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) 并测定反应速度。根据 Lineweave-Burk

作图法,以 $[S]$ 的倒数为横坐标,反应速度 V 的倒数为纵坐标,绘制竹叶椒生物碱的抑制作用动力学曲线,从图4中可以看出其近似的斜线交于横坐标的一点;另一方面,就与纵轴的交点而言,脂溶性生物碱的数值大于水溶性生物碱,水溶性生物碱数值大于空白的,即它们的 V_m 不同,这些结果是典型的非竞争性抑制的特点,说明竹叶椒生物碱与酶与底物的结合物相互作用,对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用机制属于非竞争性抑制。

表1 竹叶椒生物碱和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用 IC_{50} 值比较

Table 1 Comparison of extracts and acarbose IC_{50} values of inhibition on α -glycosidase enzymes

样品	$IC_{50}/(mg/mL)$	
	α -糖苷酶(酿酒酵母来源)	α -糖苷酶(小鼠小肠来源)
阿卡波糖	0.81 ± 0.11	0.75 ± 0.09
水溶性生物碱	2.74 ± 0.28	NI
脂溶性生物碱	0.73 ± 0.17	1.94 ± 0.08

NI表示质量浓度超过10 mg/mL时,抑制率仍然达不到50%

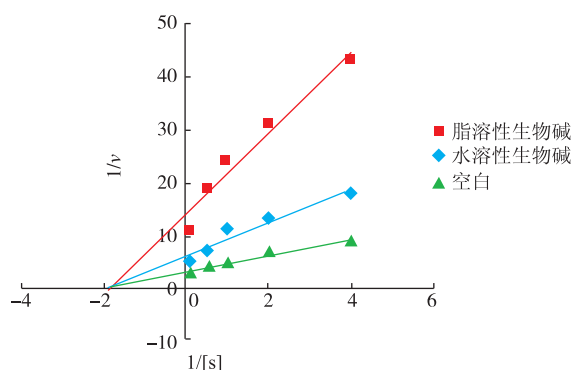


图4 不同底物质量浓度下竹叶椒生物碱的Lineweaver-Burk双倒数曲线

Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of extracts to the substrate PNPG at different concentration

参考文献:

- [1] BATOOL F, SABIR S M, ROCHA J, et al. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of fruit extract from *Zanthoxylum alatum*: a commonly used spice from Pakistan[J]. *Pak J Bot*, 2010, 42(6): 4299-4311.
- [2] LORDAN S, Smyth T J, SOLER V A, et al. The amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2170-2176.
- [3] GUO T, XIE H, XIA Y, et al. A new lignan and other constituents from *Zanthoxylum armatum* DC. [J]. *Natural Product Research*, 2012, 26(9): 859-864.

3 讨论

实验结果显示,竹叶椒生物碱对于酵母来源的 α -糖苷酶抑制作用高于试验所制备的小肠来源的 α -糖苷酶,一个可能原因是实验所制备的小肠来源 α -糖苷酶样品除了含有 α -糖苷酶,还有 α -淀粉酶、蔗糖酶等多种能分解糖的酶。在每个测试浓度下,脂溶性生物碱对 α -糖苷酶的抑制作用高于水溶性生物碱。脂溶性生物碱可能是抑制 α -糖苷酶的最主要的有效成分,这与脂溶性生物碱在竹叶椒中含量高,生物碱种类多等有密切关系。相关研究^[20]也发现,桑叶生物碱是桑叶抑制 α -葡萄糖苷酶的主要有效成分。另有文献报道^[21],木兰花碱对 α -葡萄糖苷酶抑制作用效果明显。而这种生物碱也被作者从脂溶性生物碱中分离得到。这些实验结果进一步证实竹叶椒生物碱类成分,尤其是脂溶性生物碱,可能是其抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性成分之一。

动力学研究表明,竹叶椒生物碱对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制为非竞争性抑制,说明其通过与酶和底物复合物结合而降低酶活性,达到抑制 α -葡萄糖苷酶的作用。

4 结语

竹叶椒是常用的药食两用天然资源,在我国分布广泛。作者证实竹叶椒生物碱对 α -葡萄糖苷酶有良好的抑制作用,并发现其对 α -葡萄糖苷酶的作用机制为非竞争性抑制。后续深入开展竹叶椒生物碱类单体化合物的分离鉴定以及活性评价,从中发现高效、新型的生物碱类 α -葡萄糖苷酶抑制剂有广阔前景。

- [4] GUO T, DENG Y X, XIE H, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethyl acetate fraction from *Zanthoxylum armatum* DC. in mice[J]. **Fitoterapia**, 2011, 82(3):347-351.
- [5] PACHON G, RASSOANAIVO H, AZQUETA A, et al. Anticancer effect of a new benzophenanthridine isolated from *Zanthoxylum madagascariense* (Rutaceline)[J]. **Vivo**, 2007, 21(2):417-422.
- [6] LI Hang, LI Peng. Studies on the chemical constituents of *Zanthoxylum Armatum* DC [J]. **China Pharmacy**, 2006, 17(13):1035-1037. (in Chinese)
- [7] EZZATS M, SALAMA M M. A new α -glucosidase inhibitor from *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. growing in Egypt[J]. **Natural Product Research**, 2014, 28(11):812-818.
- [8] SUN Min, WANG Xinrong, LONG Quan et al. Screening of SH-9766, an Inhibitor of α -Glucosidase from Microorganisms and its Taxonomy[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(3):48-51. (in Chinese)
- [9] GERSHELL L. Type 2 diabetes market[J]. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2005, 4(5):367-368.
- [10] YANG Fumei, SUN Qianyun. Study on microassay for screening α -glucosidase inhibitors by orthogonal matrix method [J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2009, 25(8):1113-1116. (in Chinese)
- [11] GU Juefen, CHEN Zijuan. The studies and applications of α -glucosidase inhibitors [J]. **Progress in Pharmaceutical Science**, 2009, 33(2):62-67. (in Chinese)
- [12] ZHANG Y, PENG Y H, ZENG D Q, et al. Insecticidal activity of essential oil from *Zanthoxylum armatum* fruitification against two mosquito species[J]. **Guizhou**, 2010, 2:26-28.
- [13] ZHU Wenjia, ZHU Limin, ZHOU Fengwei, et al. Study on the inhibitory activities of twelve species of edible traditional Chinese medicines to α -glucosidase[J]. **Journal of Dalian Dalian Polytechnic University**, 2011, 30(5):325-328. (in Chinese)
- [14] JI Fang, XIAO Guochun, DONG Li, et al. α -glucosidase inhibitor from medicinal herbs [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2010, 35(12):1633-1640. (in Chinese)
- [15] GUO Tao, SUN Li, HUANG Yan, et al. Review research progress on pharmacological activities of past five years on *Zanthoxylum armatum* DC.[J]. **Modern Chinese Medicine**, 2013, 15(2):109-111. (in Chinese)
- [16] ZHANG Bingyun, SU Dan, GUO Tao, et al. Study on the inhibitory effect and inhibition mechanism on α -glycosidase of ethanol extract from *Zanthoxylum armatum* DC[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2015, 6(21):345-348. (in Chinese)
- [17] YU Z P, YIN Y G, ZHAO W Z, et al. Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase [J]. **Food Chemistry**, 2012, 135(3):2078-2085.
- [18] KANG Wenyi, ZHANG Li. α -glucosidase inhibitory of extracts of five genera of Gesneriaceae [J]. **Nat Prod Res Dev**, 2010, 22:122-125.
- [19] WIKUL A, DAMSUD T, KATAOKA K, et al. (+)-Pinoresinol is a putative hypoglycemic agent in defatted sesame (*Sesamum indicum*) seeds though inhibiting α -glucosidase[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2012, 22(16):5215-5217.
- [20] LI Luan, LU Juan, LI Yongji, et al. Screening of the components with hypoglycemic activity from mulberry leaves and its pharmacological study[J]. **Information on Traditional Chinese Medicine**, 2012, 29(5):10-14. (in Chinese)
- [21] ZHONG Wei, XIA Wenshui, CUI Baoliang, et al. Screening of lagerstroemia species leaves constituents hypoglycemic activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 25(3):67-71. (in Chinese)