

• 方药研究 •

亚麻子水提液对 DPP-4 及 α -葡萄糖苷酶活性抑制实验研究*

张碧激, 李继安, 田春雨, 周雪梅, 王晨斌, 徐雪梅, 焦子珊, 喇孝瑾[△]

(华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 通过观察亚麻子水提液对二肽基肽酶-4(DPP-4)、 α -葡萄糖苷酶抑制作用,为该药防治糖尿病提供实验依据。方法 ①以 DPP-4 酶、缓冲液、底物建立 DPP-4 抑制剂的体外筛选体系,对亚麻子水提液进行抑制实验,采用发色底物法测定吸光度(OD),计算 DPP-4 抑制率及 IC₅₀ 值;②以蔗糖为底物建立 α -葡萄糖苷酶活性抑制模型,采用葡萄糖氧化酶法测定亚麻子水提液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,计算其抑制率和 IC₅₀ 值。结果 ①亚麻子具有轻度 DPP-4 抑制作用,其 IC₅₀ 值 738.20mg/L;②亚麻子具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用,其 IC₅₀ 值为 365.9mg/mL。结论 亚麻子水提液可一定程度地抑制 DPP-4 及 α -葡萄糖苷酶活性。

关键词: 亚麻子; DPP-4; α -葡萄糖苷酶; 2 型糖尿病

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)03-0014-03

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.004

亚麻 *Linum usitatissimum* L 为一年生或多年生草本植物,其种子作为一种功能性食物,近年来受到广泛的关注,有研究显示亚麻子油可以降低空腹血糖(FBG),改善糖耐量,抗氧化作用也较明显^[1],其具有抗氧化、预防糖尿病发生和保护肾脏的作用,同时对糖尿病肾病小鼠也具有保护作用^[2-5]。DPP-4 属于丝氨酸蛋白酶,在人体内广泛分布^[6]。DPP-4 对肠促胰岛素的主要成分胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和葡萄糖依赖性促胰岛素肽(GIP)有降解作用,从而导致 GLP-1 和 GLP 的生理活性受到明显影响^[7]。 α -葡萄糖苷酶与代谢紊乱性疾病如糖尿病、癌症和病毒感染等^[8-10]有密切关系,所以对 DPP-4 和 α -葡萄糖苷酶的研究在防治糖尿病的研究领域中成为热点问题。本实验通过观察亚麻子水提液对 DPP-4、 α -葡萄糖苷酶抑制作用,为该药防治糖尿病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂

1.1.1 药物

取亚麻子 50g 粉碎,购买于同仁堂股份有限公司(唐山文化路店),加 8 倍量水,80℃水浴 5h,

700W 超声提取 2h,静置后离心,12 000 转 20min,分别留取上清液备用;磷酸西格列汀片(杭州默沙东制药有限公司,产品批号:k005113);阿卡波糖(批号:100808-201203)购于中国食品药品检定研究院。

1.1.2 主要试剂

二肽基肽酶-4(sigma,批号:SLBK3698V)、甘氨酸脯氨酸对硝基苯胺(sigma,批号:SLBJ8491V)、 α -葡萄糖苷酶(sigma,批号:Lot # SLBJ8746V)。

1.1.3 主要实验仪器

M200PRO 酶标仪(TECANM200);BS224S 精密电子天平(SARTORIUS)。

1.2 实验方法

1.2.1 DPP-4 抑制实验

根据文献[11]并稍加调整建立 DPP-4 抑制剂体外筛选模型,设空白对照组(缓冲液+底物)、阴性对照组(缓冲液+酶+底物)、阳性对照组(磷酸西格列汀片+酶+缓冲液+底物)、阳性空白组(磷酸西格列汀片+缓冲液+底物)、亚麻子组(亚麻子+酶+缓冲液+底物)、亚麻空白组(亚麻子+缓冲液+底物)6 组,每组设 3 个复孔。药物设 5 个浓度,25,50,100,

* 基金项目:河北省国际合作项目(14397705D);河北省中医药管理局科研计划项目(2013066)

收稿日期:2016-05-02

作者简介:张碧激(1991-),女,河北唐山人,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治糖脂代谢疾病。

[△]通信作者:喇孝瑾,E-mail:13730505300@163.com

200,400mg/L 浓度梯度^[12],测定吸光度 A 值,计算抑制率。抑制率计算公式:〔(阴性对照组-空白对照组)-(阳性对照组-阳性空白组)〕/〔(阴性对照组-阴性空白组)〕 $\times 100\%$ ^[13]。

1.2.2 α -葡萄糖苷酶抑制实验

以 96 孔板为反应载体,每个样品做 2 个副孔。设定反应体积为 120 μ L。反应体系为:加入酶液 20 μ L,磷酸盐缓冲液(pH=6.8)60 μ L,分别加入不同浓度的亚麻子水提取液、阿卡波糖溶液 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 温箱反应 5min,然后加入 20 μ L 最适浓度的蔗糖溶液为底物,37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,加入 Na_2CO_3 溶液 100 μ L 终止反应。反应生成的葡萄糖,采用葡萄糖氧化酶法测定。用酶标仪在 650(单孔)nm 处测定吸光度 A,同时在 505(多孔)nm 处,测定吸光度 B。B-A 即得到排除中药提取物颜色的吸光度值(A 样品)^[14]。

α -葡萄糖苷酶抑制率计算公式如下:抑制率=〔(A 空白-A 样品)/A 空白〕 $\times 100\%$

1.3 数据统计分析

采用统计软件 SPSS 20.0 对实验所有数据进行统计分析,用回归法 $\rightarrow$ probit 计算 IC50 数值,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)统计学处理。

2 结果

2.1 抑制 DPP-4 体外筛选模型的优化结果

参考文献[5]方法并经反复摸索确定 100 μ L 反应体系,干预药物、酶、底物加入体系量均为 10 μ L,底物根据组别相应作加减处理。最佳条件确定为:酶浓度 4U/L,底物 0.05mmol/L,缓冲液 pH 8.2,温度 37 $^{\circ}$ C,反应时间 30min。亚麻子及磷酸西格列汀片实验结果,见表 1。

表 1 亚麻子水提液 DPP-4 抑制作用 IC50 测定结果

药物	质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率 (%)	IC 值 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
亚麻子	25	13.25 $\pm$ 0.67	738.20
	50	23.17 $\pm$ 0.87	
	100	29.78 $\pm$ 0.91	
	200	35.57 $\pm$ 0.84	
	400	40.21 $\pm$ 0.99	
磷酸西格列汀片	0.1	46.87 $\pm$ 1.21	0.11
	0.2	63.55 $\pm$ 0.69	
	0.3	72.93 $\pm$ 0.88	
	0.4	76.98 $\pm$ 0.83	
	0.5	80.46 $\pm$ 0.79	

2.2 α -葡萄糖苷酶抑制实验结果

通过三因素四水平正交实验得到优化的体外实验反应体系,确定最佳反应因素为,底物用 1mol/L 蔗糖,酶液浓度为 1.25mg/mL,反应时间为 40min。亚麻子及阿卡波糖实验结果,见表 2。

表 2 亚麻水提液 α -葡萄糖苷酶抑制作用 IC50 测定结果

药物	质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%	IC50 值 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
亚麻子	0.125	22.3 $\pm$ 0.87	365.9
	1.25	31.4 $\pm$ 0.64	
	12.5	41.8 $\pm$ 1.21	
	125	43.4 $\pm$ 1.45	
阿卡波糖	0.125	40.87 $\pm$ 1.13	0.39
	1.25	59.27 $\pm$ 1.57	
	12.5	78.18 $\pm$ 2.14	
	125	92.09 $\pm$ 2.01	

3 讨论

近年来 DPP-4 抑制剂已经成为 2 型糖尿病治疗中重要药物之一,目前上市的 DPP-4 抑制剂有西格列汀、维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利拉列汀 5 种,相比传统口服降糖药物,DPP-4 抑制剂可以有效降低 2 型糖尿病患者血糖水平并且不增加低血糖风险,不增加体重及胃肠道不适等不良反应,具有良好的安全性和耐受性。该类药物主要通过延长 GLP-1 半衰期发挥降糖作用,GLP-1 作为一种肠促胰岛素,GLP-1 发挥降糖作用的同时,对胰岛 β 细胞功能也有所改善^[15],进食营养物质时分泌增多,恢复正常时则减少,维持血糖动态平衡。 α -葡萄糖苷酶抑制剂是一类以延缓肠道碳水化合物吸收而达到治疗糖尿病的口服降糖药物,中药提取物对 α -葡萄糖苷酶活性影响的研究也越来越多^[16-17]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂是比较成熟的治疗糖尿病药物,其作用机制为:竞争性抑制位于小肠的各种 α -葡萄糖苷酶,使淀粉类分解为葡萄糖的速度减慢,从而减缓肠道内葡萄糖的吸收,降低餐后高血糖。中药自然资源广阔,作用缓和,可以通过多途径发挥作用,且安全性好,有研究显示亚麻子对糖脂代谢具有调节作用,其作用机制越来越受到中医学者的关注。

亚麻又称胡麻,亚麻子又称胡麻子,是亚麻科、亚麻属的一年生或多年生草本植物亚麻的种子,富含高 α -亚麻酸以及亚麻胶、木酚素、膳食纤维等功

能性成分。本实验通过建立 DPP-4 抑制剂及 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选体系对亚麻子进行抑制实验,实验结果表明亚麻子对 DPP-4 抑制作用 IC₅₀ 为 738.20mg/L,对 α -葡萄糖苷酶抑制作用 IC₅₀ 为 365.9mg/L,这可能是该药物发挥降糖作用的可能机制,为亚麻子更好地应用于临床提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Hosseinian FS, Muir AD, Westcott ND, et al. AAPH-mediated antioxidant reactions of secoisolariciresinol and SDG[J]. Org Biomol Chem, 2007, 5 (4): 644-654.
- [2] 杨野全, 桂英, 刘雅娟, 等. 亚麻籽油对糖尿病大鼠辅助降血糖功能的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(9): 22-23.
- [3] 谢华, 徐丹凤, 陈艳秋, 等. 亚麻籽油对高脂诱导肥胖小鼠血糖和胰升血糖素样肽-1 分泌影响的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2015, 23(4): 356-359.
- [4] 徐海娥. 亚麻木酚素的提取及对糖尿病小鼠肾脏保护作用研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2007.
- [5] 侯英然, 薛福平. 亚麻籽膳食延缓糖尿病肾病发展的动物实验研究[J]. 山西医科大学学报, 2004, 35(6): 559-560.
- [6] Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV(CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides [J]. Regul Pept, 1999, 85 (1): 9-24.
- [7] Green BD, Flatt PR, Bailey CJ. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes [J]. Diabetes Vasc Dis Res, 2006, 3(3): 159-165.
- [8] Horii S, Fukase H, Matsuo T, et al. Synthesis and α -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents [J]. J Med Chem, 1986, 29(6): 1038-1046.
- [9] Ostrander GK, Scribner NK, Rohrschneider LR. Inhibition of v-fms-induced tumor growth in nude mice by castanospermine[J]. Cancer Res, 1988, 48(5): 1091-1094.
- [10] Gruters RA, Nessfjes JJ, Tersmette M, et al. Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase [J]. Nature, 1987, 330(6143): 74-77.
- [11] Yasuda N, Nagakura T, Inoue T, et al. E3024, 3-but-2-ynyl-5-methyl-2-piperazin-1-yl-3,5-dihydro-4H-imidazo [4,5-d]pyridazin-4-one tosylate, is a novel, selective and competitive dipeptidyl peptidase-IV inhibitor[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 548(1-3): 181-187.
- [12] 苗雷, 许泓瑜, 雷健勇, 等. 二肽基肽酶 IV 抑制剂体外筛选模型的建立及应用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(3): 411-414.
- [13] 刘彬, 齐云, 王敏, 等. 一种磷脂酶 A2 抑制剂体外筛选方法的建立[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 890-892.
- [14] 韩淑英, 李继安, 江春花, 等. 10 味中药提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(8): 1035-1037.
- [15] Riserus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes[J]. Prog Lipid Res, 2009, 48(1): 44-51.
- [16] 张素军, 瞿伟菁, 周淑云. 蒺藜皂苷对大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 910-913.
- [17] Hansawasdi C, Kawabata J. Alpha-glucosidase inhibitory effect of mulberry (Morus alba) leaves on Caco-2 [J]. Fitoterapia, 2006, 77(7-8): 568-573.

(编辑: 徐建平)

Experimental Study of Inhibit Activity of DPP-4 and α -glucosidase with Flaxseed Water Extraction Liquid

ZHANG Biwei, LI Jian, TIAN Chunyu, ZHOU Xuemei, WANG Chenbin,
XU Xuemei, JIAO Zishan, LA Xiaojin
(TCM of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

ABSTRACT: **Objective** Provide experimental basis through observing inhibit activity of DPP-4 and α -glucosidase with flaxseed water extraction liquid. **Methods** 1. Established in vitro screening system of DPP-4 inhibitor by using DPP-4 enzyme, buffer solution and substrate. Then carried on suppression experiment of flaxseed water extraction liquid and determined absorbance through chromogenic peptide substrate method. Finally, calculated the DPP-4 suppression rate and the IC₅₀ value. 2. Took sucrose as substrate to establish α -glucosidase enzyme activity inhibition model. Then determined inhibitory effect of flaxseed water extraction liquid on α -glucosidase enzyme. Finally, calculated the inhibition rate and IC₅₀ value. **Results** 1. Flaxseed can mildly inhibit DPP-4, its IC₅₀ value was 738.20mg/L. 2. Flaxseed can inhibit α -glucosidase enzyme, its IC₅₀ value was 365.9mg/mL. **Conclusion** Flaxseed water extraction liquid can inhibit the activity of DPP-4 and α -glucosidase enzyme to a certain degree.

KEY WORDS: flaxseed; DPP-4; α -glucosidase enzyme; type 2 diabetes