

枇杷叶中三萜酸类成分 抗糖尿病及其并发症的体外活性研究

陈 剑, 吴月娴, 吕 寒, 简瞰昱, 丁晓琴, 李佳伟, 刘 艳, 任冰如^①

(江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省抗糖尿病药物筛选技术服务中心, 江苏 南京 210014)

Study on *in vitro* activities of triterpene acids from leaf of *Eriobotrya japonica* against diabetes and its complications

CHEN Jian, WU Yuexian, LYU Han, JIAN Tunyu, DING Xiaoqin, LI Jiawei, LIU Yan, REN Bingru^① (Jiangsu Provincial Service Center for Anti-diabetic Drugs Screening, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(3): 78-80

Abstract: *In vitro* inhibitory effects of six triterpene acids (including euscaphic acid, tormentic acid, corosolic acid, maslinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid) from leaf of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. on α -glucosidase activity and production of nonenzymatic glycosylation products Amadori and AGEs were studied. The results show that the six triterpene acids have strong inhibitory effects on α -glucosidase activity, with semi-inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.76-35.45 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, in which, ursolic acid has the strongest inhibitory effect. The six triterpene acids show inhibitory effects on Amadori formation, and the inhibitory effects decrease significantly with the decrease of mass concentration, in which, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ euscaphic acid has the strongest inhibitory effect, with inhibition rate of 83.63%; however, the six triterpene acids have no evident inhibitory effect on AGEs formation, and the inhibition rate of 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ euscaphic acid has the strongest inhibitory effect, but the inhibition rate is only 18.71%. In conclusion, triterpene acids from leaf of *E. japonica* have potential therapeutic effects on diabetes and its complications.

关键词: 枇杷叶; 三萜酸类成分; α -葡萄糖苷酶; 非酶糖化反应产物

Key words: leaf of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.; triterpene acids; α -glucosidase; nonenzymatic glycation product

中图分类号: Q946.8; R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)03-0078-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.03.12

糖尿病属于多病因的代谢性疾病,显著临床特征为慢性高血糖,并常伴有糖、脂肪和蛋白质代谢紊乱。随着患病时间延长,若病人体内代谢紊乱得不到很好地控制,容易产生心脑血管疾病、肾功能衰竭、肢体坏疽和昏迷等并发症^[1]。中草药在治疗糖尿病上具有独特疗效^[2],从中草药资源中寻找治疗糖尿病及其并发症的天然产物已成为研究热点^[2]。

枇杷[*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]干燥叶为常用中药材,具有清肺止咳和降逆止呕等作用,主要用于治疗呼吸系统疾病^[3]。近年来,相关研究发现枇杷叶富含三萜酸类、黄酮类及倍半萜苷类等活性成分^[4-8],具有显著的降血糖作用^[9]。鉴于此,作者对枇杷叶中6个三萜酸类成分在体外抑制与糖尿病及其并发症相关的 α -葡萄糖苷酶活性和非酶糖化反应产物(Amadori和AGEs)形成的能力进行了研究,以期应用枇杷叶治疗糖尿病及其并发症提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的6个三萜酸类成分(包括蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗素酸、齐墩果酸和熊果酸)均为前期从枇杷叶中分离获得^[8],纯度在95%以上。

主要试剂: α -葡萄糖苷酶和牛血清白蛋白(BSA)购自美国Sigma-Aldrich公司;对硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃苷(pNPG)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;氯化硝基四氮唑蓝(NBT)购自上海恒星应用化学研究所;阿卡波糖购自德国Bayer公司;葡萄糖、质量分数0.02%叠氮化钠、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠均为分析纯,购自国药集团上海化学试剂有限公司。

主要仪器有Mettler EL204电子天平(瑞士Mettler Toledo

收稿日期: 2020-01-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773885; 81703224)

作者简介: 陈 剑(1980—),男,浙江杭州人,博士,副研究员,主要从事药用植物学方面的研究工作。

^①通信作者 E-mail: binguren@126.com

公司)、MD SpectraMax Plus 384 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)、Thermo Finnipipette 精密单通道加样器(美国 Thermo Fisher 公司)和 Vortex-5 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品溶液制备 精密称取蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗索酸、齐墩果酸和熊果酸各 5.0 mg,先用无水乙醇定容至 5.0 mL,配制质量浓度 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液,再逐级稀释成质量浓度 50、20 和 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品溶液。

1.2.2 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率测定 参照左袁袁等^[10]的方法测定。在 96 孔板中依次加入 $2 \text{ } \mu\text{L}$ α -葡萄糖苷酶液和 $78 \text{ } \mu\text{L}$ $67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 6.8), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴孵育 10 min;向溶液中加入 $20 \text{ } \mu\text{L}$ pNPG, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴孵育 10 min;使用酶标仪在波长 405 nm 条件下测定反应液的吸光度(A_0)。采用等体积磷酸盐缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶液,按照上述操作测定反应液的吸光度(A_0')。

按照上述操作在 96 孔板中依次加入 $2 \text{ } \mu\text{L}$ α -葡萄糖苷酶液、 $77 \text{ } \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液和 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 样品溶液,相同条件下测定反应液的吸光度(A_1)。采用等体积磷酸盐缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶液,按照上述操作测定反应液的吸光度(A_1')。以阿卡波糖为阳性对照,每个样品溶液重复测定 3 次。 α -葡萄糖苷酶活性抑制率(IR)根据公式“ $IR = [(A_0 - A_0') - (A_1 - A_1')] / (A_0 - A_0') \times 100\%$ ”计算,据此计算供试样品和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶活性的半抑制浓度(IC_{50})。

1.2.3 对非酶糖化反应产物的抑制率测定

1.2.3.1 非酶糖化反应体系的建立 参照文献^[11]中的方法,将葡萄糖和 BSA 先用浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液(pH 7.4)溶解,再加入质量分数 0.02% 叠氮化钠和不同浓度样品溶液,使葡萄糖终浓度为 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,BSA 终浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;摇匀,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中避光孵育 15 d。设置 4 个对照组,分别为 A(加葡萄糖和 BSA)、B(只加 BSA)、C(加样品和葡萄糖)和 D(加样品和 BSA)。

1.2.3.2 对 Amadori 形成的抑制率测定 取上述各组反应溶液 $50 \text{ } \mu\text{L}$,加入 2.0 mL $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NBT 溶液,涡旋混匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴孵育 15 min;向溶液中加入 0.1 mL 体积分数 15% 乙酸溶液,并置于冰水浴中终止反应;吸取 $150 \text{ } \mu\text{L}$ 溶液,在波长 530 nm 条件下测定反应液的吸光度(A)。每个样品溶液重复测定 3 次。供试样品对 Amadori 形成的抑制率(IR_1)根据公式“ $IR_1 = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{C}} - A_{\text{D}}) / (A_{\text{A}} - A_{\text{B}})] \times 100\%$ ”计算。

1.2.3.3 对 AGEs 形成的抑制率测定 采取上述方法构建反应体系,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中避光孵育 60 d;采用酶标仪分别在激发波长 370 nm、发射波长 440 nm、狭缝宽度 1 nm 条件下测定反应液的荧光值(F)。每个样品溶液重复测定 3 次,结果取平均值。供试样品对 AGEs 形成的抑制率(IR_2)根据公式“ $IR_2 = [1 - (F_{\text{样品}} - F_{\text{C}} - F_{\text{D}}) / (F_{\text{A}} - F_{\text{B}})] \times 100\%$ ”计算。

1.3 数据统计分析

采用 SPSS 21.0 统计分析软件对实验数据进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多重比较。

2 结果和分析

2.1 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

枇杷叶中不同三萜酸类成分对 α -葡萄糖苷酶活性的半抑制浓度(IC_{50})见表 1。由表 1 可见:枇杷叶中供试的 6 个三萜酸类成分对 α -葡萄糖苷酶活性均有较强的抑制作用,且对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力显著($P < 0.05$)高于阿卡波糖。各三萜酸类成分对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力差异显著。其中,熊果酸对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力最强, IC_{50} 值仅 $0.76 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;接下来依次为科罗索酸、齐墩果酸、马斯里酸、委陵菜酸、蔷薇酸, IC_{50} 值分别为 1.14、1.27、1.86、10.68、35.45 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 枇杷叶中不同三萜酸类成分对 α -葡萄糖苷酶活性的半抑制浓度(IC_{50}) ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾
Table 1 Semi-inhibitory concentration (IC_{50}) of different triterpene acids from leaf of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. on α -glucosidase activity ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

三萜酸类成分 Triterpene acids	$IC_{50} / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
蔷薇酸 Euscaphic acid	35.45±0.02b
委陵菜酸 Tormentic acid	10.68±0.03c
科罗索酸 Corosolic acid	1.14±0.01f
马斯里酸 Maslinic acid	1.86±0.01d
齐墩果酸 Oleanolic acid	1.27±0.01e
熊果酸 Ursolic acid	0.76±0.01g
阿卡波糖 Acarbose	569.23±5.02a

¹⁾ 同列中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

2.2 对非酶糖化反应产物的抑制作用

不同质量浓度枇杷叶中三萜酸类成分对 Amadori 形成的抑制率见表 2。由表 2 可见:枇杷叶中供试的 6 个三萜酸类成分均可抑制非酶糖化反应早期产物 Amadori 的形成,且抑制作用随着质量浓度降低而显著下降。在不同质量浓度条件下,6 个三萜酸类成分表现为蔷薇酸对 Amadori 形成的抑制率最高,科罗索酸次之,委陵菜酸和马斯里酸居中,熊果酸较低,齐墩果酸最低。尤其在 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 条件下,蔷薇酸、科罗索酸、委陵菜酸和马斯里酸对 Amadori 形成的抑制率均在 65% 以上。

然而,这 6 个三萜酸类成分对非酶糖化反应终产物 AGEs 形成的抑制作用却较弱(数据表略),在抑制能力最强的 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 条件下,蔷薇酸、委陵菜酸、科罗索酸、马斯里酸、齐墩果酸和熊果酸对 AGEs 形成的抑制率仅分别为 18.71%、10.13%、12.43%、9.32%、2.13% 和 7.14%。

表 2 不同质量浓度枇杷叶中三萜酸类成分对 Amadori 形成的抑制率 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 2 Inhibition rate of triterpene acids from leaf of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. with different mass concentrations on Amadori formation ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

三萜酸类成分 Triterpene acids	不同质量浓度下的抑制率/% Inhibition rate under different mass concentrations		
	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
蔷薇酸 Euscaphic acid	83.63 \pm 2.60aA	64.68 \pm 3.75aB	32.45 \pm 3.53aC
委陵菜酸 Tormentic acid	65.69 \pm 3.86bA	46.74 \pm 4.86bB	14.67 \pm 3.09bC
科罗素酸 Corosolic acid	70.29 \pm 7.59bA	56.57 \pm 4.80aB	25.85 \pm 5.85aC
马斯里酸 Maslinic acid	65.57 \pm 5.13bA	42.57 \pm 7.43bB	16.57 \pm 6.74bC
齐墩果酸 Oleanolic acid	35.29 \pm 3.21dA	20.57 \pm 4.65cB	7.46 \pm 2.64cC
熊果酸 Ursolic acid	51.20 \pm 6.03cA	38.49 \pm 5.01bB	11.46 \pm 4.60bC

¹⁾ 同列中不同小写字母表示在同一质量浓度不同三萜酸类成分间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference among different triterpene acids with the same mass concentration; 同行中不同大写字母表示在同一三萜酸类成分不同质量浓度间差异显著 ($P < 0.05$) Different uppercases in the same row indicate the significant ($P < 0.05$) difference among different mass concentrations of the same triterpene acids.

3 讨 论

竞争性抑制小肠黏膜刷状缘内的 α -葡萄糖苷酶活性可使糖尿病患者餐后的血糖峰值渐变低平、波动减小^[12]。本研究中,枇杷叶中 6 个三萜酸类成分对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用显著强于阿卡波糖,说明枇杷叶中的三萜酸类成分具有降低糖尿病患者餐后血糖的潜在活性。

AGEs 大量产生是造成糖尿病患者出现动脉粥样硬化、微血管病变、视网膜病和糖尿病性肾病等并发症的重要原因。非酶糖化反应抑制剂可阻止 AGEs 形成,是预防糖尿病并发症发生和发展的重要药物^[13]。研究发现,多种中药成分(如葛根素、槲皮素、川芎嗪和山萘苣碱等)具有抑制 AGEs 形成的作用,其抑制机制主要有 2 种,分别为抑制非酶糖化反应早期产物 Amadori 的形成以及与 Amadori 反应阻止非酶糖化反应终产物 AGEs 的形成^[14]。本研究结果表明:枇杷叶三萜酸类成分对 Amadori 形成有显著抑制作用,但对 AGEs 形成的抑制作用较弱。

综上所述,枇杷叶中三萜酸类成分具有潜在的治疗糖尿病及其并发症的作用,但由于本实验仅为体外实验,关于其体内活性还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2013, 36: S67-S74.
- [2] LI W L, ZHENG H C, BUKURU J, et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 92: 1-21.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 204-205.
- [4] 任冰如, 陈智坤, 陈 剑, 等. 苏州西山岛产枇杷叶的药材品质分析[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(2): 119-120.
- [5] 吕 寒, 陈 剑, 李维林, 等. 枇杷叶中三萜酸类成分的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2791-2792.
- [6] 吕 寒, 于 盱, 陈 剑, 等. 枇杷叶黄酮类化学成分研究[J]. 中成药, 2014, 36(2): 329-332.
- [7] 赵 磊, 陈 剑, 印 敏, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析枇杷叶的倍半萜苷类化合物[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1498-1502.
- [8] 吕 寒, 陈 剑, 李维林, 等. 枇杷叶中三萜类化学成分的研究[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1351-1354.
- [9] LÜ H, CHEN J, LI W L, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the total triterpene acid fraction from Folium Eriobotryae[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 122: 486-491.
- [10] 左袁袁, 吕 寒, 吴月娟, 等. 不同产地菱角壳(欧菱果壳)中总多酚含量及抗氧化活性和对 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(3): 112-114.
- [11] 焦中高, 张春岭, 刘杰超, 等. 枣核多酚提取物对体外蛋白质非酶糖化的抑制作用[J]. 中国食品添加剂, 2014(6): 71-76.
- [12] 王 谦, 张 璐, 边晓丽, 等. α -葡萄糖苷酶抑制剂及构效关系的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(2): 189-195.
- [13] 李 才, 侯芳玉, 刘忠英. 糖基化终产物形成抑制剂研究的进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(2): 85-88.
- [14] 韩 莹, 史道华. 非酶糖基化终末产物所致疾病的中药干预[J]. 中草药, 2005, 36(6): 938-941.

(责任编辑: 佟金凤)