

知母盐制前后对 α -葡萄糖苷酶抑制作用比较

吴莹 高慧 宋泽璧

摘要 目的 比较知母和盐知母提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,从体外方面探讨知母不同炮制品的降血糖作用。**方法** 以对-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为底物,采用 HPLC 法分析水解产物中的对-硝基酚(PNP)浓度,比较知母、盐知母 5 种不同浓度的水煎液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。**结果** 在低浓度下,各组均表现出较弱的抑制作用;在 2.6 ~ 65mg/ml 浓度下,知母、盐知母水煎液均表现出一定的抑制作用,盐知母抑制作用强于知母,与浓度呈正相关,且优于阳性对照阿卡波糖。**结论** 知母和盐知母均能抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,盐制后作用增强。

关键词 知母 炮制 α -葡萄糖苷酶 高效液相层析

[中图分类号] R9 [文献标识码] A

Comparion on the Inhibitory Activities of α -glucosidase from Anemarrhenae Rhizoma before and after Processed with Salt-water. Wu Ying, Gao Hui, Song Zebi. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine(TCM), Liaoning 116600, China

Abstract Objective To compare the inhibitory effect of anemarrhenae rhizoma and salt anemarrhenae rhizoma on α -glucosidase, thus to investigate the hypoglycemic effect of different processed products of anemarrhenae rhizoma in vitro. **Methods** PNPG was taken as the substrate, the inhibitory activity against α -glucosidase of 5 different concentrations extracts were analyzed with the contents of PNP in hydrolyzate by HPLC method. **Results** All groups showed weak inhibition at low concentrations. In 2.6 ~ 65mg/ml concentrations, anemarrhenae rhizoma and salt anemarrhenae rhizoma groups showed a certain inhibition, which was positively correlated with the concentration. The salt group was stronger than anemarrhenae rhizoma group, and better than the positive control group acarbose. **Conclusion** Both anemarrhenae rhizoma and salt anemarrhenae rhizoma can inhibit α -glucosidase activity and enhance hypoglycemic effect significantly after processing.

Key words Anemarrhenae rhizoma; Processed with salt-water; α -Glucosidase; HPLC

血糖的主要来源是食物中的糖类和碳水化合物,经过 α -葡萄糖苷酶催化水解生成单糖。 α -葡萄糖苷酶主要分布于小肠黏膜刷状缘上,包含有麦芽糖酶、异麦芽糖酶、蔗糖酶和海藻糖酶等^[1]。因此 α -葡萄糖苷酶是血糖产生的关键酶,有效抑制可延缓寡糖的水解和单糖的吸收,从而降低餐后血糖。目前, α -葡萄糖苷酶抑制剂已成为临床降低餐后血糖的一线药物,如阿卡波糖、米格列醇,但其有胃肠胀气、腹部不适及腹泻等不良反应^[2]。因此,以 α -葡萄糖苷酶为作用靶点,从药用植物中筛选不良反应的糖尿病治疗药已成为研究热点。

知母为百合科植物知母(*Anemarrhena asphode-*

loides Bge)的干燥根茎,是传统的常用中药。味苦、甘,性寒,归肺、胃、肾经,具有清热泻火、滋阴润燥的功效,用于外感热病,高热烦渴,骨蒸潮热等症^[3]。盐知母是知母的主流炮制品种,历版《中国药典》均有记载,传统理论认为知母盐炙后能够引药入肾经,增强滋阴降火的作用。本课题组在前期进行知母药效学研究时对其降血糖作用进行了初探,发现知母盐炙后降血糖作用明显增强^[4-6]。本研究从酶学的角度,研究知母和盐知母水煎液对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,从体外方面深入比较知母不同炮制品的降血糖作用,初步解析盐知母增效机制。

材料与方法

1. 材料与仪器:知母(河北省易县太行植物开发有限公司,批号:1105065),阿卡波糖(拜耳医药保健有限公司,批号:BJ09769),对-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,纯度 99%,Sigma 公司),牛血清白蛋白(BSA,纯度 $\geq 95\%$,Sigma 公司), α -葡萄糖苷酶(纯度 $\geq 10\text{U/mg}$,Sigma 公司),其余试剂均为色谱级,水为娃哈哈纯净水。Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),UV 检测器;电热恒温水浴锅(北

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102810);国家教育部博士学科点专项基金资助项目(20012133120009)

作者单位:116600 大连,辽宁中医药大学药学院(吴莹、高慧、宋泽璧);国家中医药管理局中药炮制原理解析重点研究室(高慧);辽宁省中药炮制工程技术研究中心(高慧)

通讯作者:高慧,电子信箱:gaohuitcm@163.com

京市长风仪器仪表公司);XW-80A 漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);RE-52C 系列旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);pH 值酸度计(上海鹏顺科学仪器有限公司)

2. 药物制备:(1)盐知母的制备:按前期优选的炮制工艺自行炮制^[6];每 100g 知母饮片加入 30ml(含 3g 食盐)的盐水拌匀润透,在 150~160℃ 下炒制 8min,得率 98%。(2)知母水煎液制备及试液配制:①生知母和盐知母水煎液制备:取生、盐知母饮片 13g,加水 200ml 煎煮 2 次,每次 1h,合并煎液浓缩至 200ml,分别制成浓度为 0.1、0.52、2.6、13、65mg/ml 的生、盐知母水煎液;②磷酸盐缓冲溶液制备:将 7.65g K₂HPO₄·3H₂O、4.57g K₂HPO₄ 溶解于蒸馏水中,调整 pH 值至 6.8;③α-葡萄糖苷酶溶液制备:称取 0.001g 固体酶,用含 0.2% BSA 磷酸缓冲溶液定容于 10ml 容量瓶中,得 0.1U/ml 含 0.2% BSA 的 α-葡萄糖苷酶溶液;④PNPG 溶液制备:精密称取 0.024g PNPG,用缓冲溶液定容于 10ml 容量瓶中,得 8mmol/L 的 PNPG 溶液;⑤Na₂CO₃ 终止剂溶液制备:取 2.12g Na₂CO₃,用蒸馏水溶解,定容于 100ml 容量瓶中,得 0.2mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液。

3. 分组:阳性对照组(阿卡波糖),空白对照(等体积的磷酸盐缓冲溶液代替酶液),阴性对照(等体积的甲醇代替磷酸盐缓冲溶液)以及 5 种不同浓度知母、盐知母的水煎液组。

4. PNP 的定量分析:(1)层析条件:ECOSIL C₁₈ AQ,5μm,4.6mm×250mm;流动相:A 为乙腈,B 为含 0.1% 磷酸的水溶

液,梯度洗脱条件见表 1;流速:1.0ml/min;进样量:20μl;柱温:30℃;检测波长:314nm。(2)PNP 标准曲线:精确称取 PNP 对照品,用磷酸盐缓冲溶液溶解,配成 6mmol/L 的 PNP 溶液,将溶液稀释,测定 0.0025、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8mmol/L 浓度下的峰面积,并绘制标准曲线。

表 1 流动相梯度条件

时间 (min)	乙腈 (A) (%)
0	20
8	30
13	80
17	20
22	20

5. 不同提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制活性的测定:选择对酶活性影响较小的甲醇溶解^[7]。在离心管中加入 10μl 不同浓度水煎液、30μl α-葡萄糖苷酶,震荡混匀,37℃ 孵育 20min,加入 40μl PNPG 开启反应,震荡混匀,37℃ 反应 30min 后,加入 60μl Na₂CO₃ 终止反应,加超纯水稀释至 500μl,滤膜过滤后,通过 HPLC 法检测产物 PNP 的浓度,计算 α-葡萄糖苷酶的活性(图 1)。按以下公式计算抑制率:抑制率(%) = $\frac{A-B}{A} \times 100\%$ (A. 不加待测样品时 PNP 的浓度;B. 加入待测样品后 PNP 的浓度)。

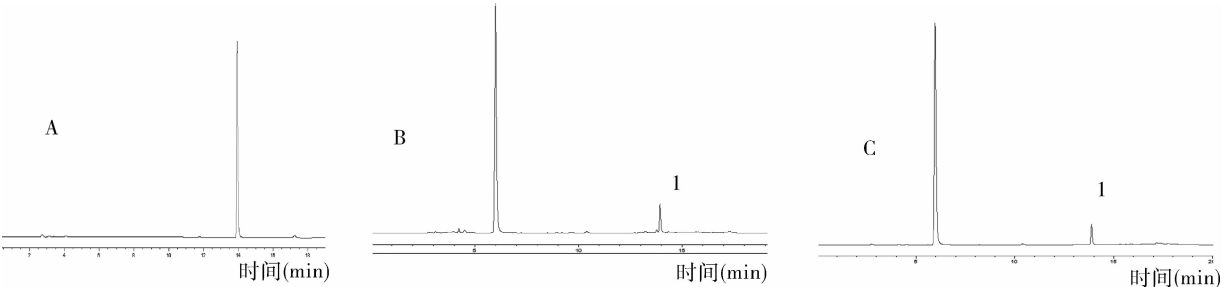


图 1 PNP 对照品、知母和盐知母 HPLC 图

A. 对照品;B. 知母;C. 盐知母;1. PNP

结 果

1. PNP 标准工作曲线:根据方程,求得回归方程为 $y = 655.36x - 573.61$, $R^2 = 0.9996$,说明 PNP 在 0.0025~0.8mmol/L 线性关系良好。

2. 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用:在 0.1、0.52mg/ml 浓度下,给药组均表现出较弱的抑制作用;在 2.6~65mg/ml 浓度下,给药组均具有较强 α-葡萄糖苷酶的抑制作用,盐知母优于知母和阿卡波糖,且与浓度呈正相关(图 2)。

讨 论

本实验以 PNPG 为底物,通过 HPLC 法定量测定水解产物中 PNP 浓度,进而比较知母和盐知母 5 种不同浓度水煎液对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用。

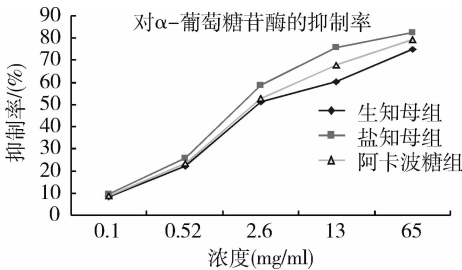


图 2 不同浓度给药组对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制率

与其他方法如比色法、纸层析法相比,该方法准确,简便易于操作,更加适合 α-葡萄糖苷酶抑制作用的定量测定。

实验结果显示,在 0.1、0.52mg/ml 浓度下,各给药组的抑制作用较弱。在 2.6~65mg/ml 浓度

下,知母和盐知母的水煎液均具有较强的抑制作用,盐知母抑制作用强于生知母,且优于阿卡波糖。实验结果表明,在一定浓度下,生知母、盐知母均能竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,与阿卡波糖作用方式一样,通过与底物PNPG竞相争夺 α -葡萄糖苷酶上的结合位点,从而抑制 α -葡萄糖苷酶活性。对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用是知母降糖作用机制之一,知母盐制后增强对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,且与浓度呈正相关。

中医的消渴症是指以多饮、多尿、多食及消瘦、疲乏、尿甜为主要特征的综合病证,其基本病机为阴津亏耗,燥热偏盛。知母滋阴降火,与消渴症病机相吻合。盐炙可引药入肾经,更好地滋补了肾阴,从而增效,符合中医理论。本实验结果与前期研究“知母盐炙后降糖作用增强”相一致,在今后的研究中,笔者将对盐知母降血糖作用的物质基础进行深入研究,以解析盐知母的增效机制。

参考文献

- 1 张钟,吴文婷,王萍,等.荔枝水溶性多糖作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的活性测定[J].食品科学,2013,34(13):175-179
- 2 董志超,何际婵,王天群,等.肉桂提取物对 α -葡萄糖苷酶活性及糖尿病模型大鼠餐后高血糖的抑制作用[J].中国药房,2013,24(47):4421-4424
- 3 国家药典委员会.中国药典2010年版(一部)[S].北京:化学工业出版社,2010:197-198
- 4 高慧,佟连琨,贾天柱.知母、盐知母中芒果苷在大鼠体内的吸收动力学研究[A].中华中医学会.2010年中药炮制技术、学术交流暨产业发展高峰论坛论文集[C].2010
- 5 佟连琨,高慧,姜永粮,等.知母与盐知母对甲亢阴虚大鼠红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶影响的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):184-186
- 6 高慧.盐知母炮制原理研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2010
- 7 朱文佳,寇自农,张曦,等. α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选方法的研究[J].食品研究与开发,2012,33(8):171-175

(收稿日期:2014-05-26)

(修回日期:2014-06-16)

增强 CT 与 PET/CT 在诊断肺癌及其淋巴结转移中的价值

孙志超 吴仪仪 余仲飞 张 建 孔令山 左长京

摘 要 **目的** 比较增强 CT、 ^{18}F -FDG PET/CT 及其联合应用在肺癌诊断及区域淋巴结分期中价值。**方法** 分析 2010 年 8 月~2011 年 6 月因肺部实性病灶行增强 CT 及 ^{18}F -FDG PET/CT 检查的患者 122 例,其中恶性 82 例,良性 40 例。病理及临床影像随访结果作为“金标准”,将增强 CT 及 PET/CT 结果与其对照,并应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析增强 CT、 ^{18}F -FDG PET/CT 在肺癌及淋巴结的诊断中的价值。**结果** 病灶 SUVmax、CT 强化值及综合分析法诊断肺癌的敏感度、特异性、准确性、阳性预测值及阴性预测值分别为 89.0%、75.0%、84.4%、88.0% 和 76.9% (SUVmax);67.1%、82.5%、68.3%、88.7% 和 55.0% (强化值);96.3%、90.0%、94.3%、95.2% 和 92.3% (综合分析)。其中 SUVmax、综合分析法诊断肺癌方面比 CT 强化值具有更高的灵敏度、准确性及阴性预测值,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05),综合分析法比 PET/CT 的 SUVmax 在诊断肺癌方面具有更高的准确性,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在肺癌的区域淋巴结分析的准确性方面 PET/CT 较增强 CT 具有更高的准确性差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PET/CT 的 SUVmax 诊断肺癌相比增强 CT 的强化值具有更高的敏感度、准确性及阴性预测值,同时 PET/CT 在肺癌区域淋巴结转移分期的准确性显著高于增强 CT。PET 的标准化摄取值、增强 CT 的强化值及 CT 的形态学的综合分析有助于进一步提高肺癌的诊断准确性。

关键词 肺癌 淋巴结分期 体层摄影术 发射型计算机 对比增强

[中图分类号] R734

[文献标识码] A

Evaluation of Enhancement CT Combined with PET/CT in Diagnosis of Lung Cancer and Lymph Node. Sun Zhichao, Wu Yiyi, Yu Zhongfei, et al. Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310006, China

基金项目:上海市科委基金资助项目(08411967800);上海市卫生局基金资助项目(XBR2011040);上海市博士后面上基金资助项目(11R21410600);第二军医大学附属长海医院 1255 项目(CH125521103)

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学附属第一医院医学影像科(孙志超);200433 上海,第二军医大学长海医院核医学科(吴仪仪、张建、孔令山、左长京);200081 解放军 4111 医院 PET/CT 中心(余仲飞);200233 上海世正医学影像诊断中心(张建)

通讯作者:张建,电子邮箱:abiao xp@163.com