

垫状卷柏和夏枯草提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用研究

晏英^{1,2*}, 王丹¹, 张雄¹, 彭明友¹, 鄢小燕¹,
徐冉¹, 李毅¹, 杨小生³

(1. 贵州医科大学 药学院/贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004;

2. 贵州医科大学 医药卫生管理学院, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

摘要:采用体外抑制模型方法评价垫状卷柏和夏枯草不同提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。经酶促动力学与 Lineweaver-Burk 双倒数法探讨抑制作用最强提取物(高活性部位)对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制机制,同时探讨两者之间的协同作用。结果表明:垫状卷柏植物 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物和夏枯草水提物的大孔树脂 70% 乙醇洗脱物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用(IC_{50} 分别为 8.17 μ g/mL 和 2.05 μ g/mL)显著强于其他提取物和阳性对照阿卡波糖。动力学研究表明,垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为混合 I 型竞争性抑制。两者单用或联合用药的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,用抑制浓度的分数之值(SFIC)及等效剂量分析方法评价联合用药的作用性质,结果显示联合用药时其 SFIC 值均小于或等于 1,表明两者组合物对抑制 α -葡萄糖苷酶活性具有协同增效的作用。本研究首次报道具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的中药组合物,明确垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型,为合理开发垫状卷柏和夏枯草提供理论依据。

关键词:垫状卷柏;夏枯草; α -葡萄糖苷酶;酶促反应动力学;竞争性抑制

中图分类号:R284.1 **文献标识码:**A

文章编号:1008-0457(2022)05-0035-08

国际 DOI 编码:10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2022.05.006

糖尿病是由胰岛素分泌不足引起的一种以高血糖为特征的代谢性疾病,与恶性肿瘤、心血管疾病并称世界三大疾病。近年来,随着环境污染加重、生活方式的改变、人口老龄化加剧等因素导致糖尿病日益恶化,患病人数呈指数增长,且呈现年轻化趋势^[1-2]。

α -葡萄糖苷酶的主要作用是将碳水化合物分解成葡萄糖, α -葡萄糖苷酶抑制剂可以有效阻断该过程,以此达到控制餐后血糖,有效降低餐后血糖的峰值,是 2 型糖尿病的有效治疗方案之一^[3-5]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂安全性高,是少数能干预糖耐量受损的口服降糖药之一,在 2 型糖尿病治疗中具有明显优势。目前,临床上常用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂有阿卡波糖、米格列醇及伏格列波糖等,但常常会引起严重的肠道副作用而限制使用^[6-7]。我

国在中药治疗糖尿病方面历史悠久,大量文献报道多种天然活性成分表现出良好的对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,如皂苷、黄酮、多糖、生物碱等,这些天然来源成分的 α -葡萄糖苷酶抑制剂将成为研究与治疗 2 型糖尿病的潜在资源^[8-14]。

本课题组采用体外酶学评价模型筛选体系,评价了数百种黔产中药提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,发现卷柏属植物垫状卷柏和夏枯草属植物夏枯草具有较强的 α -糖苷酶抑制活性。并发现垫状卷柏高活性部位提取物(简称 JYC)和夏枯草高活性部位提取物(简称 XXT),高于多倍量的阳性对照药物阿卡波糖。因此有必要继续对它们抑制活性的特征进行深入研究和探讨。其中,我们最感兴趣的特征有三个:(1)抑制强度,用 IC_{50} 、 K_i 和 K_{is} 等参数来衡量;(2)与酶的作用机制(是否竞争性);

收稿日期:2022-04-19;修回日期:2022-06-02

基金项目:国家自然科学基金项目(31760089);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzkwj2022-222);贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 393)

* 通讯作者:晏英(1985—),女,博士,副教授,主要从事天然药物化学活性成分研究,E-mail:crystal-yanying@126.com.

(3)两者联用的组合效应。下面将详细阐述和对比两组分各特征参数的试验结果,为其开发成为新型抗糖尿病中药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用垫状卷柏采自贵州省贵阳市药用植物园,夏枯草采自贵州省龙里县,由贵州中医药大学陈德媛教授分别鉴定为垫状卷柏(*Selaginella pulvinata*)和夏枯草(*Prunella vulgaris*),标本保存于贵州医科大学药学实验室。 α -葡萄糖苷酶对照品(SLBX6245,100UN,美国Sigma公司)、阿卡波糖对照品(J1824027,阿拉丁试剂有限公司)、4-硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃苷(pNPG,E1828029,阿拉丁试剂有限公司、其余试剂均为国产分析纯(国药集团化学试剂有限公司))。

1.2 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)、HP8345 紫外分光光度计(美国惠普公司)、MR-96A 多功能酶标仪(瑞士TECAN有限公司)、KQ-100B 型超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司)、BSA224S 型电子天平(德国赛多利斯公司)、SQP 型十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司)、101 型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司)、HH-2 数显恒温水浴锅(金坛市天瑞仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 垫状卷柏提取物制备

干燥垫状卷柏药材 500 g,粉碎,用 5 倍量 95% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩得到 95% 乙醇浸膏 21.8 g,加适量水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,得到石油醚萃取物 0.12 g,乙酸乙酯萃取物 2.1 g,水层 17.9 g,另取干燥垫状卷柏药材粉末 500 g,用水煎煮 2 次,每次 1 h,得到的垫状卷柏药渣再用 5 倍量 95% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩得到 95% 乙醇浸膏 17.1 g,加适量水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,得到石油醚萃取物 0.1 g,乙酸乙酯萃取物 1.9 g,水层 14.3 g。将卷柏各提取物用 DMSO 溶解,配制成浓度为 10 g/L 的溶液备用。

1.3.2 夏枯草提取物制备

干燥夏枯草药材粉末 500 g,粉碎,用水煎煮 2 次,每次 1 h,药液合并过大孔树脂柱层析,先用水

洗脱得到水层,再用 70% 乙醇洗脱得到 70% 乙醇洗脱物,水煎煮后得到的夏枯草药渣再用 5 倍量 70% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩得到 70% 乙醇浸膏 23.6 g,加适量水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,得到石油醚萃取物 0.14 g,乙酸乙酯萃取物 2.5 g,水层 19.2 g。将夏枯草各提取物用 DMSO 溶解,配制成浓度为 10 g/L 的溶液备用。

1.3.3 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

建立 pNPG 的体外评价模型进行活性测试^[9]。将垫状卷柏和夏枯草提取物配制成不同浓度的样品溶液,试验分为空白组、空白对照组、样品组、样品空白组。空白组在 96 孔板中加 PBS 溶液 10 μ L,空白对照组在 96 孔板中加 DMSO 代替样液 10 μ L,样品组、样品空白组在 96 孔板中加 DMSO 溶解的样液 10 μ L,每组 3 复孔,分别加入 60 μ L 0.1 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8),空白对照组和样品空白组加入 10 μ L 0.1 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8),其他各组加入 10 μ L α -葡萄糖苷酶磷酸缓冲溶液(2 U/mL),在恒温振荡器中 37 $^{\circ}$ C 保温 15 min 后取出,随即加入 20 μ L 5 mmol/L pNPG 溶液,充分混匀,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,结束后加入 50 μ L 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应。以阿卡波糖为阳性对照,在 405 nm 处测定吸光值,酶抑制率 $I\% = [(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4) / A_1 - A_2] \times 100$ (A_1 :空白组吸光值, A_2 :空白对照组吸光值, A_3 :样品组吸光值, A_4 :样品空白组吸光值),计算出各样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率,求出相应的 IC_{50} 值。

1.3.4 垫状卷柏和夏枯草高活性部位的确定

将垫状卷柏、夏枯草的各提取物及阳性对照物阿卡波糖配制成不同质量浓度的样品液,按照“1.3.3”方法分别测定不同浓度垫状卷柏和夏枯草各提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,抑制活性最高的提取物为 α -葡萄糖苷酶抑制活性的高活性部位。

1.3.5 α -葡萄糖苷酶抑制的抑制动力学分析

按照“1.3.3”方法分别测定不同浓度垫状卷柏和夏枯草高活性部位与酶浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 U/mL 时反应的初速度,底物最终浓度为 0.5 mmol/L,每个浓度重复三次,以酶浓度 E (U/mL) 为横坐标,反应初速度 V ($\Delta\text{OD}/\text{min}$) 为纵坐标作图,利用图的特征推断酶的结合方式。垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型由 Lineweaver-Burk 方法确定^[15]。配制不

同浓度的垫状卷柏和夏枯草高活性部位,分别与浓度为 4.0、5.0、6.0、8.0、10.0 mmol/L 的底物溶液,混匀,加入 0.8 U/mL α-葡萄糖苷酶溶液,测定 α-葡萄糖苷酶抑制的反应速率 V 。以底物浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标进行 Lineweave-Burk 双倒数作图分析。以直线的斜率和对 Y 轴的截距分别对垫状卷柏和夏枯草高活性部位浓度二次作图,分别求出垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α-葡萄糖苷酶的抑制常数 (K_i) 和对酶—底物络合物抑制常数 (K_{is}),由此判断酶的抑制类型。

1.3.6 垫状卷柏和夏枯草高活性部位的组合效应

根据两种药物的组合原则^[16],在垫状卷柏和夏枯草高活性部位称样量恒定的前提下,确定 7 种不同的组合方式,如表 1 所示。采用“1.3.3 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定”的方法,对垫状卷柏和夏枯草高活性部位的组合方式测定抑制活性,并计算 IC_{50} 值。采用抑制浓度的分数之和值 (SFIC) 及等效剂量分析方法评价联合用药的作用性质^[17]。抑制浓度的分数之和 (SFIC) 按以下公式计算: $SFIC = \text{一个药物联用时的 } IC_{50} \text{ 值} / \text{这个药物单用时的 } IC_{50} \text{ 值} + \text{另一药物联用时的 } IC_{50} \text{ 值} / \text{另一药物单用时的 } IC_{50} \text{ 值}$ 。当 SFIC 值小于、大于或者是等于 1.0,则分别被认为两者联用时具有增效、拮抗和相加作用。另外得到相应的等效剂量分析图,如果折线图呈现凹形或凸型则认为联用时两药物相互作用的本质为增效或拮抗作用。

表 1 JYC 与 XXT 的配比组合			
Tab.1 The ratio of JYC and XXT			
编号	样品	配比	称样量/mg
1	JYC	1	6
2	JYC: XXT	5: 1	JYC 5.0 XXT 1.0
3	JYC: XXT	3: 1	JYC 4.5 XXT 1.5
4	JYC: XXT	1: 1	JYC 3.0 XXT 3.0
5	JYC: XXT	1: 3	JYC 1.5 XXT 4.5
6	JYC: XXT	1: 5	JYC 1.0 XXT 5.0
7	XXT	1	6

2 结果与分析

2.1 垫状卷柏各提取物 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定

垫状卷柏各提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制作用结果见表 2。试验结果表明,除了垫状卷柏水提取物及其过大孔树脂后水洗脱部分外,阿卡波糖和垫状卷柏各提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性均呈现随着剂量升高而增强的趋势。其中垫状卷柏植物

水提后 95% 醇提物的乙酸乙酯萃取物,垫状卷柏植物 95% 醇提物的乙酸乙酯萃取物的抑制作用明显强于阳性药阿卡波糖,且垫状卷柏植物 95% 醇提物的乙酸乙酯萃取物 JYC 的抑制作用最强,为垫状卷柏高活性部位。

表 2 垫状卷柏提取物的 α-葡萄糖苷酶活性筛选结果
Tab.2 The α-glucosidase inhibition activity of extracts from *Selaginella tamariscina*

样品	终浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率/($1\% \pm \text{SD}$)
JSC-1	1	-4.54 ± 0.01
	10	-6.88 ± 0.01
	100	-10.12 ± 0.04
JSC-2	1	-5.12 ± 0.01
	10	-7.26 ± 0.04
	100	-11.35 ± 0.05
JCT-1	1	16.57 ± 0.05
	10	23.28 ± 0.04
	100	70.58 ± 0.03
JSC-3	1	9.05 ± 0.05
	10	25.47 ± 0.03
	100	80.36 ± 0.05
JYC-1	1	24.16 ± 0.06
	10	54.53 ± 0.03
	100	90.18 ± 0.02
JCT	1	17.58 ± 0.08
	10	25.58 ± 0.02
	100	73.58 ± 0.04
JSC	1	10.04 ± 0.05
	10	26.47 ± 0.04
	100	83.36 ± 0.03
JYC	1	26.16 ± 0.07
	10	55.55 ± 0.04
	100	95.20 ± 0.01
Acar	64.561	1.82 ± 0.01
	645.61	53.60 ± 0.01
	6456.1	89.46 ± 0.01

注:JSC-1 为垫状卷柏水提取物;JSC-2 为垫状卷柏水提取物过大孔树脂后水洗脱部分;JCT-1 为垫状卷柏水提后 95% 醇提取物;JSC-3 为垫状卷柏水提后 95% 醇提物的石油醚萃取物;JYC-1 为垫状卷柏水提后 95% 醇提物的乙酸乙酯萃取物;JCT 为垫状卷柏 95% 醇提取物;JSC 为垫状卷柏 95% 醇提物的石油醚萃取物;JYC 为垫状卷柏 95% 醇提取物萃取的乙酸乙酯萃取物,Acar 为阳性对照药物阿卡波糖。

2.2 夏枯草各提取物 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定

夏枯草各提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制作用结果见表 3。试验结果表明,夏枯草水提取物的大孔树脂 70% 乙醇洗脱物,夏枯草水提后 70% 醇提取物,夏枯草水提后 70% 乙醇提取物得乙酸乙酯萃取物的抑制作用明显强于阳性药阿卡波糖,且夏枯草水提取物的大孔树脂 70% 乙醇洗脱物 XXT 的抑制作用最

强,为夏枯草的高活性部位。

表 3 夏枯草粗提物部分的 α -葡萄糖苷酶活性筛选结果

Tab.3 The α -glucosidase inhibition activity of extracts from *Prunella vulgaris* Linn

样品名	终浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	抑制率/ $(\% \pm \text{SD})$
XST	1	10.85 ± 0.07
	10	55.98 ± 0.01
	100	93.49 ± 0.01
XXT	1	75.50 ± 0.04
	10	93.42 ± 0.01
	100	98.66 ± 0.01
XCT	1	4.03 ± 0.04
	10	56.57 ± 0.01
	100	94.95 ± 0.01
XSY	1	-11.41 ± 0.18
	10	6.50 ± 0.02
	100	42.19 ± 0.04
XZY	1	7.82 ± 0.02
	10	32.77 ± 0.01
	100	88.45 ± 0.01
Acar	64.561	1.82 ± 0.01
	645.61	53.60 ± 0.01
	6456.1	89.46 ± 0.01

注:XST为夏枯草水提物;XXT为夏枯草的水提物大孔树脂70%乙醇洗脱物;XCT为夏枯草水提后70%醇提物;XSY为枯草水提后70%乙醇提物的石油醚萃取物;XZY为夏枯草水提后70%乙醇提物的乙酸乙酯萃取物,Acar为阳性对照药物阿卡波糖。

2.3 垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制分析

不同浓度的高活性部位,改变酶的浓度,通过酶活力对不同浓度的酶作图得到一组直线,如图1和图2。所有的直线均呈线性关系,且经过原点。另外,随着提取物浓度的增加,直线的斜率在减小,说明垫状卷柏和夏枯草高活性部位浓度,没有改变酶的数量,而是降低了酶的活性。因此,垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用是可逆的。

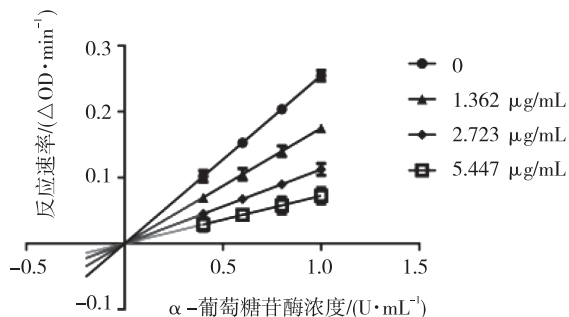


图1 垫状卷柏高活性部位酶浓度与反应初速率图

Fig.1 Relationship between enzyme concentration and initial reaction velocity of the most effective part from *Selaginella pulvinata*

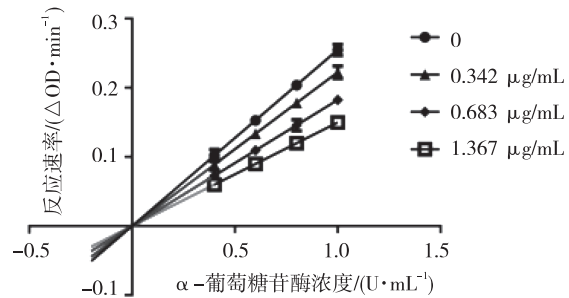


图2 夏枯草高活性部位酶浓度与反应初速率图

Fig.2 Relationship between enzyme concentration and initial reaction velocity of the most effective part from *Prunella vulgaris*

2.4 垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学研究

采用酶动力学方法探讨垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制机制。根据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线作图法,分别作出阿卡波糖、垫状卷柏和夏枯草高活性部位的抑制动力学曲线,确定抑制类型和抑制常数。如图3、图4和图5所示,分析发现,阿卡波糖所有直线与Y轴相交于一点,说明阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶属于竞争性抑制。垫状卷柏和夏枯草高活性部位的 Lineweaver-Burk 曲线均为一组相交于第二象限的直线,随着体系中垫状卷柏和夏枯草高活性部位浓度增大, V_m 减小,米氏常数 (K_m) 增大,表现为混合 I 型竞争性抑制。结果表明,垫状卷柏和夏枯草高活性部位同时与结合酶 (ES) 及游离酶 (E) 结合,且抑制常数 $K_{is} > K_i$ 。以双倒数直线的斜率和截距分别对垫状卷柏和夏枯草高活性部位浓度作图(图4b、4c、5b、5c),均为直线,分别求得垫状卷柏高活性部位的 $K_i = 0.022 \mu\text{g/mL}$, $K_{is} = 0.040 \mu\text{g/mL}$,夏枯草高活性部位的 $K_i = 0.010 \mu\text{g/mL}$, $K_{is} = 0.017 \mu\text{g/mL}$ 。竞争性抑制作用强于反竞争性抑制作用,垫状卷柏和夏枯草高活性部位对游离酶的抑制作用强于其对酶—底物复合物的抑制作用。

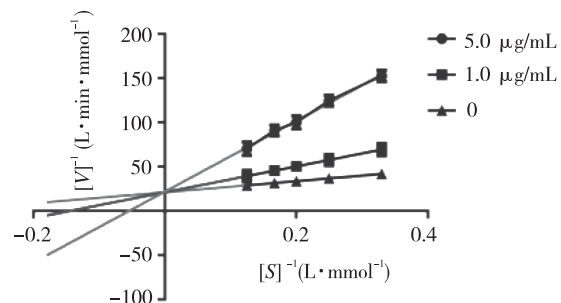
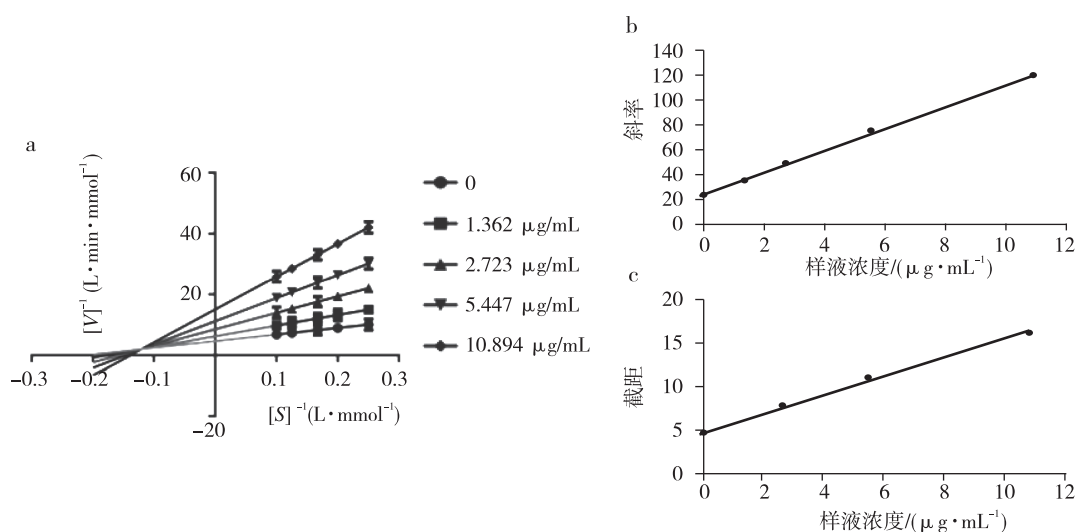


图3 阿卡波糖 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

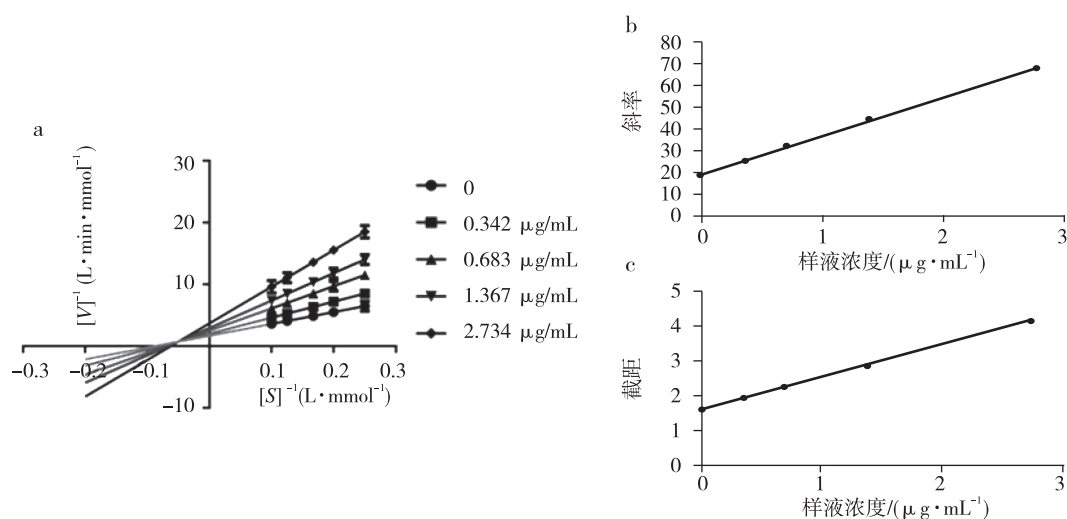
Fig.3 Lineweaver-Burk plot of acarbose



注:a 为曲线中垫状卷柏高活性部位浓度图;b 为斜率对样液浓度作图;c 为截距对样液浓度作图。

图4 Lineweaver-Burk 图法测定垫状卷柏高活性部位抑制 α -葡萄糖苷酶的机制

Fig.4 Lineweaver-Burk plot for the determination of the inhibitory mechanism of the most effective part from *Selaginella pulvinata* on α -glucosidase



注:a 为夏枯草高活性部位浓度图;b 为斜率对样液浓度作图;c 为截距对样液浓度作图。

图5 Lineweaver-Burk 图法测定夏枯草高活性部位抑制 α -葡萄糖苷酶的机制

Fig.5 Lineweaver-Burk plot for the determination of the inhibitory mechanism of the most effective part from *Prunella vulgaris* on α -glucosidase

2.5 垫状卷柏和夏枯草高活性部位的组合效应

2.5.1 JYC 与 XXT 配比组合的 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

将 JYC 与 XXT 7 种配比组合分别配制成不同质量浓度的样品液,阳性对照品阿卡波糖制备成质量浓度分别为 10、1、0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 。JYC 与 XXT 7 种配比组合和阿卡波糖的 α -葡萄糖苷酶抑制活性及 IC_{50} 值见表 4,结果显示,JYC 与 XXT 的 7 种配比组合的 α -葡萄糖苷酶抑制活性均明显强于阳性对照阿卡波糖,当 JYC 与 XXT 按 1:3 组合时, α -葡

萄糖苷酶抑制活性最高,为最佳组合。

2.5.2 JYC 与 XXT 组合效应的计算

JYC 与 XXT 配比组合的 SFIC 和 FIC 值(药物联用时的 IC_{50} 值/这个药物单用时的 IC_{50} 值),见表 5,结果显示,当 JYC 与 XXT 配比为 5:1、3:1、1:1 时,各组 SFIC 值均小于 1.0,两者具有协同增效的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,当 JYC 与 XXT 配比为 1:3、1:5 时,各组 SFIC 值约等于 1.0,两者具有协同相加的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

表 4 JYC 与 XXT 的抑制活性筛选结果

Tab. 4 The α -glucosidase inhibition activity of JYC and XXT

样品	终浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率 /($I\% \pm \text{SD}$)	IC_{50} /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
JYC	1	22.84 ± 0.06	8.17
	5	32.86 ± 0.03	
	10	55.98 ± 0.01	
	50	74.65 ± 0.01	
	100	87.30 ± 0.01	
J: X = 5: 1	1	24.54 ± 0.10	3.38
	5	51.08 ± 0.01	
	10	77.57 ± 0.03	
	50	95.43 ± 0.01	
	100	97.38 ± 0.01	
J: X = 3: 1	1	38.33 ± 0.10	1.94
	5	62.37 ± 0.08	
	10	84.13 ± 0.01	
	50	97.20 ± 0.01	
	100	97.21 ± 0.01	
J: X = 1: 1	1	16.06 ± 0.02	2.40
	5	75.29 ± 0.02	
	10	94.81 ± 0.01	
	50	91.99 ± 0.01	
	100	98.83 ± 0.01	
J: X = 1: 3	1	23.14 ± 0.01	2.61
	5	69.30 ± 0.02	
	10	86.31 ± 0.02	
	50	97.62 ± 0.01	
	100	99.59 ± 0.01	
J: X = 1: 5	1	21.66 ± 0.04	2.48
	5	72.30 ± 0.01	
	10	89.92 ± 0.02	
	50	97.90 ± 0.01	
	100	99.68 ± 0.01	
XXT	1	30.18 ± 0.05	2.05
	5	72.47 ± 0.07	
	10	85.39 ± 0.01	
	50	97.85 ± 0.01	
	100	98.20 ± 0.03	
Acar	64.561	1.82 ± 0.01	929.66
	645.61	53.60 ± 0.01	
	6456.1	89.46 ± 0.01	

用 JYC 的 FIC 值(联用时的 IC_{50} 值/单用时的 IC_{50} 值)对应图中横坐标值,同时用 XXT 的 FIC 值对应图中纵坐标值作折线图,得出的等效剂量分析图呈现凹形(图 6),说明 JYC 和 XXT 联用时的相互作用本质为增效作用。

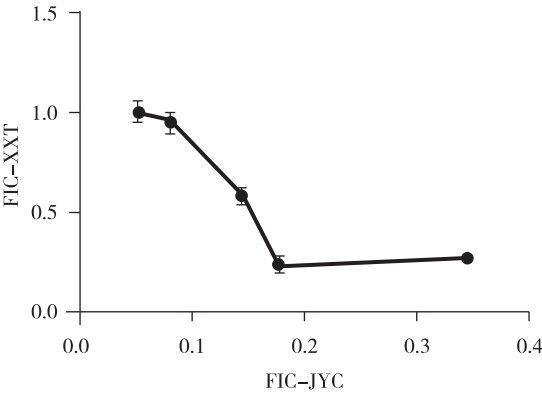


图 6 JYC 与 XXT 对 α -葡萄糖苷酶抑制作用等效剂量分系图

Fig. 6 Isobolograms of inhibition interaction between JYC and XXT against α -glucosidase

3 结论与讨论

通过体外 α -葡萄糖苷酶活性筛选的方法,得到垫状卷柏和夏枯草不同提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,其中垫状卷柏植物 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物和夏枯草水提取物的大孔树脂 70% 乙醇洗脱物的抑制作用最强,分别为垫状卷柏和夏枯草的高活性部位, IC_{50} 值分别为 $8.17 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $2.05 \mu\text{g}/\text{mL}$,均远低于阳性对照阿卡波糖。说明两者具有较强的抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用。通过 Lineweaver-Burk 双倒数曲线作图法探讨垫状卷柏和夏枯草高活性部位对 α -葡萄糖苷酶的竞争抑制作用类型,结果表明,随着垫状卷柏和夏枯草高活性部位浓度的增加, V_m 减小,米氏常数(K_m)增大,表现为混合 I 型竞争抑制。说明垫状卷柏和夏枯草高活性部位同时与结合酶(ES)及游离酶(E)结合,且抑制常数 $K_{is} > K_i$ 。竞争性抑制作用

表 5 JYC 与 XXT 的组合计算结果

Tab. 5 The result of combination between JYC and XXT

组合效应	J: X = 5: 1	J: X = 3: 1	J: X = 1: 1	J: X = 1: 3	J: X = 1: 5
FIC-JYC	0.345 ± 0.009	0.178 ± 0.010	0.147 ± 0.013	0.08 ± 0.012	0.051 ± 0.008
FIC-XXT	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.59 ± 0.03	0.96 ± 0.06	1.01 ± 0.05
SFIC	0.62	0.415	0.733	1.035	1.059
作用情况	增效	增效	增效	相加	相加

强于反竞争性抑制作用,垫状卷柏和夏枯草高活性部位对游离酶的抑制作用强于其对酶-底物复合物的抑制作用。该结论与黄晓冬等^[12]研究海藻铁钉菜对 α -葡萄糖苷酶抑制类型相一致。垫状卷柏和夏枯草可作为筛选有效降糖药物的研究对象,有望从中分离得到安全有效的天然来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

垫状卷柏和夏枯草高活性部位联用时的 SFIC

值小于或等于 1.0,得到的等效剂量分析图呈凹形,表明两者联用时抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用大于两种提取物作用的简单叠加,具有协同增效作用。首次发现当垫状卷柏和夏枯草高活性部位按 1:3 组合时, α -葡萄糖苷酶抑制活性最高,为最佳组合。不同药用植物提取物活性部位联合用药为糖尿病的预防或治疗提供新的思路。

(责任编辑:段丽丽)

参 考 文 献:

- [1] Donath M Y, Shoelson S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. Nature Reviews Immunology, 2011, 11(2): 98-107.
- [2] Nath M, Bhattacharjee K, Choudhury Y, et al. Pleiotropic effects of anti-diabetic drugs: A comprehensive review [J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 884(7): 1-11.
- [3] Joshi S R, Stanal E, Tong N, et al. Therapeutic potential of alpha-glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review [J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2015, 16(13): 1959-1981.
- [4] Garber A J, Abrahamson M J, Barailay J I, et al. Consensus statement by the american association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm-2018 executive summary [J]. Endocrine Practice, 2018, 24(1): 91-120.
- [5] Usman G, Mohammad N A, Muhammad Y, et al. Natural flavonoid α -glucosidase inhibitors from *Retama raetam*; enzyme inhibition and molecular docking reveal important interactions with the enzyme activesite [J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 87(3): 736-742.
- [6] Mao X M, He K, Shi J C. Safety and efficacy of acarbose in the treatment of diabetes in Chinese patients [J]. Therapeutics and Clinical Risk Management, 2014, 10(6): 505-511.
- [7] Chee B, Park B, Bartold P M. Periodontitis and type II diabetes: a two-way relationship [J]. International Journal of Evidence-Based Healthcare, 2013, 11(4): 317-329.
- [8] 郅丽超, 张琳依, 梁馨元, 等. 天然活性成分对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 6(12): 2276-2282.
- [9] 何贝桥, 张园园, 庄远杯, 等. 葫芦茶提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(12): 2026-2030.
- [10] 范莉, 王业玲, 唐丽. 天然来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(2): 313-321.
- [11] 阎成姐, 郭崇真, 林建阳. 新型 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 440-445.
- [12] 黄晓冬, 蔡琼瑶, 王远花, 等. 海藻铁钉菜抑制 α -葡萄糖苷酶活性部位的筛选及其反应动力学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 1(36): 16-20.
- [13] 缪子敬, 李志万, 周学海, 等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展[J]. 广东化工, 2019, 46(17): 96-101.
- [14] 刘率男, 刘泉, 孙素娟, 等. α -葡萄糖苷酶抑制剂桑枝总生物碱的抗糖尿病作用研究[J]. 药学报, 2019, 54(7): 1226-1232.

- [15] Wang M, Jiang J, Tian J, et al. Inhibitory mechanism of novel allosteric inhibitor, Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves proanthocyanidins against α -glucosidase [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56(3):286-294.
- [16] 孙广科, 中药及其成分伍组方的研究方法探析[J]. 中医中药, 2014, 12(13):292-293.
- [17] 涂洪谊, 陈卫民. DNA 甲基化转移酶抑制剂与胸苷酸合成酶抑制剂体外联合用药的抗肿瘤增效作用[J]. 生命科学研究, 2005, 9(24):365-369.

Inhibitory Activity of the Extracts from *Selaginella tamariscina* and *Prunella vulgaris* on Alfa-glucosidase

Yan Ying^{1,2*}, Wang Dan¹, Zhang Xiong¹, Pen Mingyou¹, Yan Xiaoyan¹, Xu Ran¹, Li Yi¹, Yang Xiaosheng³

(1. Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. School of Medicine and Health Management, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550014, China)

Abstract: The inhibitory activity of extracts from different *Selaginella tamariscina* and *Prunella vulgaris* on α -glucosidase was evaluated in vitro inhibition model. The enzymatic dynamics and Lineweaver-Burk double-reciprocal methods were used to analyze the inhibitory type of the best medicinal part on the activities of α -glucosidase, which was discussed of the synergistic effect. The results indicated that inhibitory activity of the ethyl acetate fraction of 95% ethanol extraction from *S. tamariscina* and 70% alcohol eluent fraction of water extraction from *P. vulgaris* on macroreticular resins had the stronger inhibition activity against α -glucosidase (IC_{50} to α -glucosidase were 8.17 μ g/mL and 2.05 μ g/mL, respectively) than other extracts and reference substance acarbose. Kinetic analysis showed that the inhibitory mechanism of the best medicinal part of *S. tamariscina* and *P. vulgaris* on α -glucosidase was mixed type I competitive inhibition. The α -glucosidase inhibitory activity of the two extracts alone or in combination were evaluated, the interaction the best medicinal parts of *S. tamariscina* and *P. vulgaris* was evaluated by both a value of a sum of fractional inhibitory concentration (SFIC) and an isobologram method. The results showed that all of the SFIC values of the combination two types of best medicinal parts were less than or equal to 1.0. These results indicated that the inhibition of α -glucosidase activity of the two compositions was greater than that of the simple superposition of two best medicinal parts, with a synergistic effect. This study first reported that traditional chinese medicine composition that inhibits α -Glucosidase activities, and the type of inhibition of α -Glucosidase by the highly active parts of *S. tamariscina* and *P. vulgaris* was clarified, which provides a reference for inhibitory type of the best effective fractions in reducing blood glucose and a basis for the development and utilization of *S. tamariscina* and *P. vulgaris*.

Keywords: *Selaginella tamariscina*; *Prunella vulgaris*; α -glucosidase; enzymatic reaction kinetics; competitive inhibition