

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^A

董志超^{1*}, 何际婵¹, 王天群², 王新春², 晏小霞¹, 王建荣¹(1.中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室,海南儋州 571737;2.哈尔滨医科大学附属第二医院急诊科,哈尔滨 150086)

中图分类号 R285;R961.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4421-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.02

摘要 目的:研究肉桂提取物对 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。方法:采用大鼠肠 α -葡萄糖苷酶体外活性抑制实验观察肉桂提取物的抑制作用,并采用酶动力学分析模块法对肉桂提取物抑制 α -葡萄糖苷酶动力学进行研究。采用腹腔注射链脲佐菌素以复制大鼠糖尿病模型,观察肉桂提取物对麦芽糖和蔗糖负荷餐后高血糖的抑制效果。结果:体外实验表明,肉桂提取物对大鼠肠 α -葡萄糖苷酶的抑制作用呈剂量依赖性,其半数抑制浓度值为529 $\mu\text{g/ml}$,酶动力学数据符合竞争性抑制的特征。在体实验表明,300、600 mg/kg 的肉桂提取物能明显缓解糖尿病模型大鼠麦芽糖和蔗糖负荷餐后血糖的升高,但不能缓解葡萄糖负荷餐后血糖的升高。结论:肉桂提取物可缓解餐后血糖升高,其机制可能与抑制 α -葡萄糖苷酶的活性有关。
关键词 肉桂; α -葡萄糖苷酶;大鼠;餐后血糖

Inhibitory Effects of *Cinnamomum cassia* Extract on α -glucosidase Activity and Postprandial Hyperglycemia in Diabetic Rats

DONG Zhi-chao¹, HE Ji-chan¹, WANG Tian-qun², WANG Xin-chun², YAN Xiao-xia¹, WANG Jian-rong¹(1.Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Utilization, Ministry of Agriculture, Hainan Danzhou 571737, China; 2.Emergency Department, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of *Cinnamomum cassia* extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia in diabetic rats. METHODS: The inhibitory effects of *C. cassia* extract were observed by studying the activity of rat intestinal α -glucosidase in vitro. The kinetics of enzyme inhibition was studied by EKM method. The diabetic rat model was induced by STZ, and therapeutic efficacy of *C. cassia* extracts for postprandial hyperglycemia after disaccharide loading was observed. RESULTS: *in vitro* studies had indicated inhibitory activity of *C. cassia* extract against α -glucosidase in dose-dependent manner with the IC_{50} value of 529 $\mu\text{g/ml}$. Enzyme kinetics data was up to a competitive mode of inhibition. *in vivo* animal experiments showed that *C. cassia* extracts (300 mg/kg and 600 mg/kg) could alleviate postprandial hyperglycemia significantly in maltose and sucrose loaded STZ induced diabetic rats but not in glucose-loaded rats. CONCLUSIONS: *C. cassia* extracts can inhibit postprandial hyperglycemia, which may be associated with the inhibition of α -glucosidase activity.

KEY WORDS *Cinnamomum cassia*; α -glucosidase; Rat; Postprandial hyperglycemia

2型糖尿病患者由于胰岛素分泌不足及分泌高峰延迟,不足以控制餐后血糖,其餐后血糖持续增高,致使与进食相关的第1时相胰岛素分泌严重减弱或消失餐后血糖^[1]。餐后高血糖是糖尿病血管病变的主要危险因素。餐后血糖的急剧变化较

之慢性持续性高血糖更能特异地触发氧化应激反应。由此提示治疗目标不仅要降低平均血糖浓度,而且要减少急性血糖波动^[2]。

α -葡萄糖苷酶抑制剂可抑制小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶的活

8(6):555.
[13] Saad EI, El-Gowilly SM, Sherhaa MO, et al. Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of α -lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats[J]. *Food Chem Toxicol*

[△]基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(No.1630032013017)

* 副研究员。研究方向:南药产品研发。E-mail: dongzc2002@aliyun.com

ca, 2010, 48(7):1 869.

[14] Pal R, Rana SV, Vaiphei K, et al. Isoniazid-rifampicin induced lipid changes in rats[J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 389(1/2):55.

[15] Faraci FM, Didion SP. Vascular protection superoxide dismutase forms in the vessel wall [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1):1 367.

(收稿日期:2013-08-08 修回日期:2013-09-10)

性,延缓葡萄糖在肠道的吸收,从而有效降低餐后高血糖^[3-4]。 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,但其有胃肠胀气、腹部不适及腹泻等副作用。因此,以 α -葡萄糖苷酶为作用靶点,从药用植物中筛选低副作用糖尿病治疗药已成为研究热点^[5-6]。

药用肉桂是樟科植物 *Cinnamomum cassia* Presl 的树皮,传统中医认为具有补火助阳、引火归源、散寒止痛、活血痛经之功效。现代研究认为,肉桂及其提取物具有提高胰岛素敏感性、抗炎、抗氧化等作用。既往对于肉桂抗糖尿病作用的研究有所报道,而相对缺少肉桂对餐后血糖作用的研究。本文笔拟研究肉桂提取物对 α -葡萄糖苷酶活性及对糖尿病模型大鼠餐后血糖升高的抑制作用,以期对肉桂用于糖尿病的防治提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

TGL-20B 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);BP211D 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);One Touch Ultra 型血糖仪及试纸(美国强生公司)。

1.2 药材

肉桂于2012年5月购自广西玉林中药材市场,产地广西平南县,经笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

大鼠小肠丙酮粉、链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司);4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,德国 Calbiochem 公司);阿卡波糖(德国拜耳公司)。

1.4 动物

清洁级健康 Wistar 大鼠,♂,体质量 160~210 g,购于吉林大学基础医学院[实验动物使用许可证号:SYXK(吉)2003-0001]。室温保持(24±2)℃,湿度为35%~45%,12 h 交替照明,常规饲料,任意摄取食、水。

2 方法

2.1 肉桂提取物的制备

药材经粉碎后,参考文献^[7]方法加蒸馏水索氏提取器回流提取。提取后趁热过滤,提取液经冷冻干燥成提取物,肉桂提取物的得率为8.4%。

2.2 肉桂提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制实验

2.2.1 大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶提取液的制备^[8] 将200 mg 大鼠小肠丙酮粉加入4 ml 冰浴的PBS(50 mmol/L, pH 6.8)中,在超声波处理(15 min)下溶解,4℃下10 000 g 离心30 min,取上清液于4℃贮藏,备用。

2.2.2 α -葡萄糖苷酶活性的抑制实验 在96孔板每孔中加入肉桂提取液(实验组)、阿卡波糖溶液(阳性对照组)或去离子水(阴性对照组)80 μ l,加入50 μ l的对硝基酚- β -葡萄糖苷 PNPG 底物溶液(20×10⁻³ mol/L,用0.1 mol/L pH7.4的PBS制备),混匀后置于37℃水浴中预保温5 min,再加入50 μ l 大鼠 α -葡萄糖苷酶提取液,37℃下反应15 min,加入0.2 mol/L Na₂CO₃溶液140 μ l 终止反应,用酶标仪于405 nm 波长处测定吸光度。样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率按下式计算:抑制率(%)=[(阴性对照组吸光度-实验组吸光度)/阴性对照组吸光度]×100%。当样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为50%时,将样品质量浓度定为半数抑制浓度(IC₅₀)值。

2.2.3 肉桂提取物抑制 α -葡萄糖苷酶动力学分析 在PNPG 底物不同浓度(0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L)情况下,观察不同质量浓度肉桂提取物(0、0.5、1.0 mg/ml)对反应速率的影响。采用 SigmaPlot 12.3 软件、酶动力学分析模块(EKM)法求得最大反应速率(V_{max})和米氏常数(K_m)值。

2.3 肉桂提取物对糖尿病模型大鼠餐后血糖的影响^[9]

2.3.1 复制模型 STZ 临用前以无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液制备成 pH 4.2、质量浓度为 2.5 g/L 的工作液;一次性 ip STZ (45 mg/kg),注射后 72 h 尾静脉采血,测空腹 12 h 的血糖,血糖值高于 13.9 mmol/L 并稳定 1 周的大鼠即为糖尿病模型大鼠。

2.3.2 糖尿病模型大鼠口服麦芽糖负荷实验 实验分为四组,即模型(等容生理盐水)组、阿卡波糖(5 mg/kg)组与肉桂提取物高、低剂量(600、300 mg/kg)组。禁食 6 h 后,一次性 ig 麦芽糖(2 g/kg)同时 ig 给药,尾静脉采血,测定 ig 给药后 0、30、60、120 min 的血糖值,制备浓度-血糖曲线,GraphPad Prism 5 软件计算时间-曲线下面积(Area under the curve, AUC)。

2.3.3 糖尿病模型大鼠口服蔗糖负荷实验 实验分为四组,即模型(等容生理盐水)组、阿卡波糖(5 mg/kg)组与肉桂提取物高、低剂量(600、300 mg/kg)组。禁食 6 h 后,一次性 ig 蔗糖(2 g/kg)同时 ig 给药,尾静脉采血,测定 ig 给药后 0、30、60、120 min 的血糖值,制备浓度-血糖曲线,GraphPad Prism 5 软件计算 AUC。

2.3.4 糖尿病大鼠口服葡萄糖负荷实验 实验分为二组,即模型(等容生理盐水)组与肉桂提取物(600 mg/kg)组。禁食 6 h 后,一次性 ig 葡萄糖(2 g/kg)同时 ig 给药,尾静脉采血,测定 ig 给药后 0、30、60、120 min 的血糖值,制备浓度-血糖曲线,GraphPad Prism 5 软件计算 AUC。

2.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理, SigmaPlot 12.3 软件进行酶动力学分析。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 α -葡萄糖苷酶活性的抑制实验

肉桂提取物能有效抑制 α -葡萄糖苷酶活性,随着给药质量浓度的提高,抑制效果亦提高,呈剂量依赖性。其 IC₅₀ 为 529 μ g/ml,阳性对照药阿卡波糖的 IC₅₀ 值为 34.9 μ g/ml。肉桂提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用见图 1。

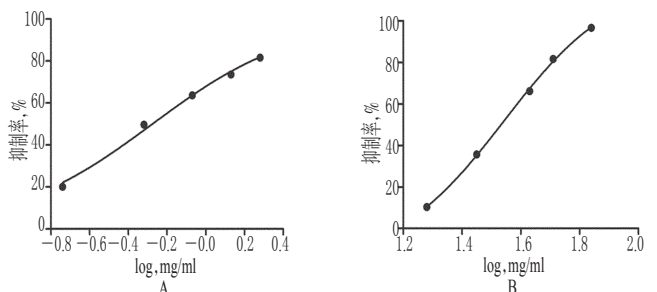


图1 肉桂提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

A. 肉桂提取物; B. 阿卡波糖

Fig 1 Inhibitory effects of *C. cassia* extracts on the activity of α -glucosidase

A. *C. cassia* extracts; B. acarbose

3.2 肉桂提取物抑制 α -葡萄糖苷酶动力学分析

K_m 值随着肉桂提取物质量浓度的增加而增大, V_{max} 值保持不变, 表明肉桂提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的作用方式为竞争性抑制。肉桂提取物抑制 α -葡萄糖苷酶动力学见表1。

表1 肉桂提取物抑制 α -葡萄糖苷酶动力学

Tab 1 Kinetic analysis of α -glucosidase inhibited by *C. cassia* extracts

肉桂提取物, mg/ml	V_{max} , mmol/min	K_m , mmol/L
0	1.01	0.92
0.5	1.01	1.44
1	1.01	2.06

3.3 糖尿病模型大鼠口服麦芽糖负荷实验

与模型组比较, 肉桂提取物高、中剂量组各时间点大鼠血糖浓度显著降低($P < 0.01$), 表明肉桂提取物能够显著抑制麦芽糖负荷后的血糖升高; 肉桂提取物高剂量组大鼠血糖浓度显著低于肉桂提取物低剂量组, 而显著高于阿卡波糖组($P < 0.01$), 表明600 mg/kg肉桂提取物的作用强度要高于300 mg/kg, 而低于阿卡波糖。糖尿病模型大鼠麦芽糖负荷曲线见图2; 各组AUC见图3。

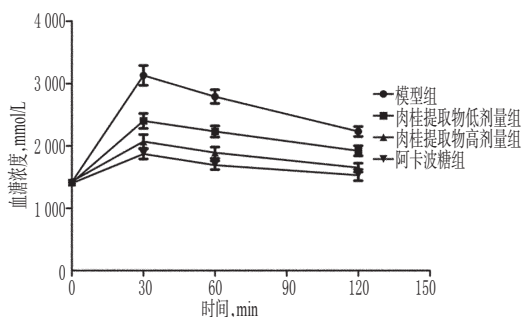


图2 糖尿病模型大鼠麦芽糖负荷曲线

Fig 2 Maltose-loading curves of diabetic rats with intragastric administration

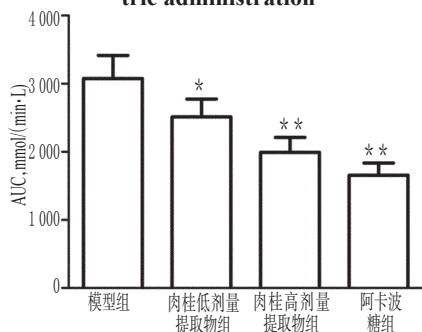


图3 各组AUC

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 3 AUC of different groups

vs.model group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 糖尿病模型大鼠口服蔗糖负荷实验

与模型组比较, 肉桂提取物高、低剂量组各时间点大鼠血糖浓度显著降低($P < 0.01$), 表明肉桂提取物能显著抑制蔗糖负荷后的血糖升高; 肉桂提取物高剂量组大鼠血糖浓度显著低于肉桂提取物低剂量组, 而显著高于阿卡波糖组($P < 0.01$), 表明600 mg/kg肉桂提取物的作用强度要高于300 mg/kg, 而低于阿卡波糖。糖尿病模型大鼠蔗糖负荷曲线见图4; 各组AUC见图5。

3.5 糖尿病模型大鼠口服葡萄糖负荷实验

与模型组比较, 肉桂提取物组AUC差异无统计学意义

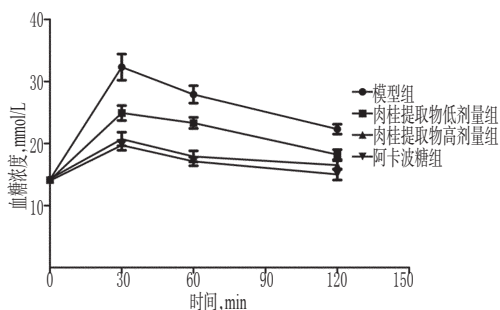


图4 糖尿病模型大鼠蔗糖负荷曲线

Fig 4 Sucrose-loading curves of diabetic rats with intragastric administration

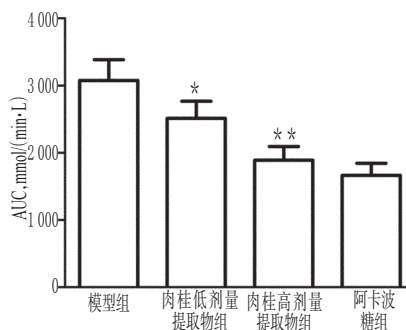


图5 各组AUC

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 5 AUC of different groups

vs.model group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

($P < 0.01$), 表明肉桂提取物对葡萄糖负荷后血糖的升高无明显作用。糖尿病模型大鼠葡萄糖负荷曲线见图6; 各AUC见图7。

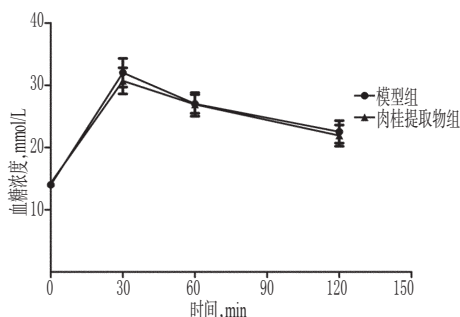


图6 糖尿病模型大鼠葡萄糖负荷曲线

Fig 6 Glucose-loading curves of diabetic rats with intragastric administration

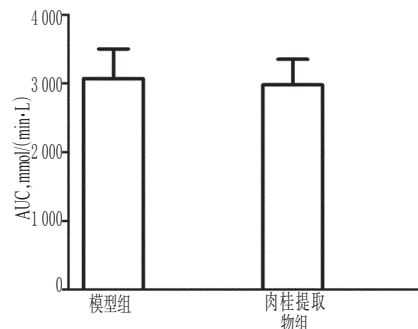


图7 各组AUC

Fig 7 AUC of different groups

4 讨论

进食富含碳水化合物的食物可引起血糖急剧升高,其机制主要是 α -葡萄糖苷酶在小肠内将复杂碳水化合物中的麦芽糖、蔗糖分解成可吸收的单糖,导致食物中所含糖分被快速吸收。 α -葡萄糖苷酶抑制剂能抑制麦芽糖、蔗糖的消化过程,减轻餐后高血糖,从而使整体血糖趋于平稳^[10]。

有研究显示,肉桂提取物能强烈抑制酵母 α -葡萄糖苷酶的活性^[11]。大多数植物来源的抑制剂虽然对酵母 α -葡萄糖苷酶具有良好的抑制作用,但对哺乳动物的 α -葡萄糖苷酶却无效。因此,笔者利用大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶来评价肉桂提取物的抑制效果。本研究显示,肉桂提取物能显著抑制哺乳动物的 α -葡萄糖苷酶活性,提示肉桂提取物中含有酶抑制作用的活性成分。为了进一步明确其作用机制,笔者对酶动力学研究的数据进行了EKM分析,结果表明肉桂提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制的作用方式为竞争性抑制,这与阿卡波糖的作用^[11]相似。

作为对体外实验的验证,笔者以糖尿病大鼠为模型,研究了肉桂提取物对麦芽糖和蔗糖负荷后餐后血糖的变化。理论上, α -葡萄糖苷酶抑制剂能抑制麦芽糖、蔗糖的消化吸收,而不能抑制单糖(葡萄糖)的吸收。研究结果显示,肉桂提取物能显著降低麦芽糖和蔗糖负荷所导致的餐后高血糖。考虑到肉桂提取物可能通过提高胰岛素敏感性等其它机制降低餐后血糖,笔者也观察了肉桂提取物对糖尿病模型大鼠葡萄糖负荷餐后血糖的影响,结果表明肉桂提取物对葡萄糖负荷餐后高血糖无明显作用。以上结果提示,肉桂提取物主要是通过抑制小肠内 α -葡萄糖苷酶的活性而抑制麦芽糖和蔗糖负荷所导致的餐后高血糖。

肉桂含有多种活性化合物,包括黄酮类、苷类物质等^[12],其中何种成分具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用目前尚无定论,还需进一步研究。

参考文献

[1] Parkin CG, Brooks N. Is postprandial glucose control important? Is it practical in primary care settings?[J]. *Clinical Diabetes*, 2002, 22(20):71.
[2] Couturier K, Batandier C, Awada M, et al. Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body composition in an animal model of the metabolic syndrome[J]. *Arch*

Biochem Biophys, 2010, 50(1):158.

[3] Aryangat AV, Gerich JE. Type 2 diabetes: postprandial hyperglycemia and increased cardiovascular risk[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2010, 5(6):145.
[4] Hogan S, Zhang L, Li J, et al. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2010, 12(7):71.
[5] Nakagawa K. Studies targeting α -glucosidase inhibition, antiangiogenic effects, and lipid modification regulation: background, evaluation, and challenges in the development of food ingredients for therapeutic purposes[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(5):900
[6] Mehanna A. Antidiabetic agents: past, present and future [J]. *Future Med Chem*, 2013, 5(4):411
[7] Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, et al. Cinnamon improves glucose and lipids in people with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(12):3 215.
[8] Jo SH, Ka EH, Lee HS, et al. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin[J]. *Int J Appl Res*, 2009, 2(4):52.
[9] Ranasinghe P, Perera S, Gunatilake M, et al. Effects of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) on blood glucose and lipids in a diabetic and healthy rat model[J]. *Pharmacognosy Res*, 2012, 4(2):73.
[10] Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes[J]. *JAMA*, 2006, 295(14):1 681
[11] Derosa G, Maffioli P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice[J]. *Arch Med Sci*, 2012, 8(5):899.
[12] Akilen R, Tsiami A, Devendra D, et al. Cinnamon in glycaemic control: systematic review and meta analysis[J]. *Clin Nutr*, 2012, 31(5):609.

(收稿日期:2013-09-03 修回日期:2013-09-26)

国家卫生和计划生育委员会召开部分省市食品安全工作座谈会

本刊讯 为推动各地卫生计生部门认真贯彻落实国务院食品安全委员会第一次全体会议精神,2013年11月14日,国家卫生和计划生育委员会在杭州召开部分省市食品安全工作座谈会,陈啸宏副主任作书面讲话。

座谈会上,浙江、广东、云南、四川、甘肃等省卫生计生部门分管食品安全工作的厅(委)负责同志介绍了工作进展和主要做法。与会同志就机构改革和职能转变中进一步加强各地卫生计生系统食品安全工作,充分发挥卫生计生系统专业作用,更好地服务于百姓健康和食品安全展开热烈讨论,对《食品安全法》修订提出意见和建议。

陈啸宏指出,按照国家卫生和计划生育委员会关于食品

安全工作的总体部署,在地方党委、政府的领导下,各地卫生计生部门开拓进取,扎实工作,食品安全标准管理、风险监测和风险交流等各方面工作取得了显著成绩。他强调,面对新形势新任务,各级卫生计生部门要高度重视食品安全工作,进一步增强责任感。在机构改革和职能转变中,加强政策研究,建立健全工作体系,强化人才队伍建设,保障建设投入。要深入贯彻学习刚刚闭幕的党的“十八届三中全会”精神,进一步理清思路、明确定位,充分发挥卫生计生系统专业优势,提高食品安全工作能力。要对照年初确定的各项任务安排,加大力度,统筹推进,确保高质量完成全年任务,抓紧筹划2014年工作。