

## $\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂桑枝总生物碱的抗糖尿病作用研究

刘率男, 刘 泉, 孙素娟, 李彩娜, 环 奕, 陈跃腾, 汪仁芸, 夏学军,  
刘志华, 刘玉玲, 谢明智, 申竹芳\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 晶型药物研究北京市重点实验室, 中国医学科学院糖尿病研究中心, 北京 100050)

**摘要:** 桑枝总生物碱 (Sangzhi alkaloids, SZ-A) 是来源于中药桑枝的具有  $\alpha$  葡萄糖苷酶抑制活性的有效组分。本研究在酶学和整体动物水平, 考察 SZ-A 对几种糖苷酶的抑制特点和抗糖尿病作用。基于酶活性评价体系, 分别考察了 SZ-A 对蔗糖酶、麦芽糖酶及淀粉酶的抑制作用, 计算半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值; 在正常小鼠和四氧嘧啶 (alloxan) 高血糖小鼠中, 考察单次灌胃 SZ-A 对多糖和葡萄糖负荷后血糖升高的影响; 在链脲霉素 (STZ) 糖尿病大鼠和高脂喂养的肥胖 C57 小鼠 (HFC57) 中, 考察长期给予 SZ-A 对糖脂代谢紊乱的改善作用。动物实验操作过程依照中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所实验动物管理与动物福利委员会的要求执行。结果显示, SZ-A 对蔗糖酶和麦芽糖酶活性抑制的  $IC_{50}$  分别为 21.9 和 40.4  $ng \cdot mL^{-1}$ , 对淀粉酶几乎无抑制作用。SZ-A 能显著降低正常和高血糖小鼠蔗糖和淀粉负荷后的血糖峰值和血糖时间曲线下面积, 抑制餐后血糖的升高; 但对葡萄糖负荷后的血糖升高无影响。在 STZ 糖尿病大鼠中, SZ-A 给药 3 周后, 可显著降低其随机及空腹血糖、血甘油三酯 (TG) 和胆固醇 (TC)、糖化血清蛋白及尿糖水平。在糖尿病前期动物模型 HFC57 小鼠中, SZ-A 给药 6 周后, 可显著降低随机和空腹血糖、血 TC 及基础胰岛素水平, 改善糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗状态, 改善葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能。综上, SZ-A 是一种高选择性的双糖酶抑制剂; 单次给药可显著抑制正常及糖尿病小鼠多糖负荷后的血糖升高, 长期给药可改善糖尿病前期及糖尿病动物的糖脂代谢紊乱。SZ-A 通过抑制  $\alpha$  葡萄糖苷酶活性控制糖尿病状态下的餐后血糖的波动, 长期应用可能有益于减缓糖尿病及其并发症的发生和发展。

**关键词:** 桑枝总生物碱;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂; 糖尿病前期; 2 型糖尿病

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1225-09

## Anti-diabetic effects of the fraction of alkaloids from *Ramulus Mori*, an innovative Sangzhi alkaloids as an $\alpha$ -glucosidase inhibitor

LIU Shuai-nan, LIU Quan, SUN Su-juan, LI Cai-na, HUAN Yi, CHEN Yue-teng, WANG Ren-yun,  
XIA Xue-jun, LIU Zhi-hua, LIU Yu-ling, XIE Ming-zhi, SHEN Zhu-fang\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulations, Beijing Key Laboratory of Polymorphic Drugs, Diabetes Research Center of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Sangzhi alkaloids (SZ-A) are derived from traditional Chinese medicine *Ramulus Mori*, serving well as an innovative antidiabetic drug, due to  $\alpha$ -glucosidase inhibition. To evaluate the potency of glucosidase

收稿日期: 2019-03-28; 修回日期: 2019-05-09.

基金项目: 重大新药创制国家科技重大专项 (2018ZX09711001-009-014, 2018ZX09711001-003-011); 中医药管理局新药开发专项基金 (国中医药科 DLX006A); 北京市科委创新药物研究基金 (D0206001041891).

\*通讯作者 Tel: 86-10-83172669, E-mail: shenzhf@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0212

inhibitory effect of SZ-A, the enzyme-based screening platforms, including sucrase, maltase and amylase were established, and  $IC_{50}$  was calculated. The effects of SZ-A on postprandial blood glucose at a single dose, oral sucrose, starch and glucose loading were determined in normal ICR mice and alloxan-induced hyperglycemic mice. To confirm the anti-diabetic effects of SZ-A on glucose and lipid metabolism after long-term administration, the postprandial and fasting blood glucose, serum insulin, urinary glucose levels, glycosylated serum proteins and blood lipid levels were determined in high-fat fed C57 obese mice (pre-diabetic HFC57 mice) and diabetic rats induced by streptozotocin (STZ). The Experimental Animal Welfare Ethics Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College approved all of the protocols for this research. We found that SZ-A exhibited a significant inhibitory effect on the sucrase and maltase. SZ-A showed no effect on amylase. In normal ICR mice and alloxan-induced hyperglycemic mice, SZ-A at a single dose significantly delayed and reduced the peak of blood glucose after sucrose or starch loading, but showed no effect on the increase of blood glucose after glucose loading. In STZ diabetic rats, SZ-A significantly reduced the postprandial or fasting blood glucose levels, glycosylated serum proteins and urinary glucose. SZ-A also reduced serum triglyceride (TG) and cholesterol (TC) levels after 3 weeks of treatment. SZ-A ameliorated the postprandial blood glucose or the fasting blood glucose elevation, and reduced the incidence of hyperglycemia in HFC57 mice. SZ-A decreased the basal insulin level, improved insulin sensitivity, and ameliorated glucose intolerance in pre-diabetic HFC57 mice. Our results indicated that SZ-A had a novel inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase, especially on disaccharidases. SZ-A at a single dose significantly reduced the peak of blood glucose elevation and delayed the increase of blood glucose in normal and diabetic mice after disaccharide and polysaccharide loading. Long-term SZ-A treatment improved glucose and lipid metabolic profiles by delaying carbohydrate absorption from the intestine and reduced the postprandial blood glucose levels in both pre-diabetic and diabetic animal models. Therefore, SZ-A application may display a beneficial role in preventing the development and complications of diabetes.

**Key words:** Sangzhi alkaloids;  $\alpha$ -glucosidase inhibitor; pre-diabetes; type 2 diabetes

国际糖尿病联盟 (IDF) 糖尿病概览数据显示<sup>[1,2]</sup>: 至2017年,我国糖尿病人数已达1.14亿,其中2型糖尿病患者占90%以上,需长期口服降糖药物以控制高血糖及并发症的发生和发展。在庞大糖尿病患者人群及后备军(糖尿病前期)用药市场的需求下,全球抗糖尿病创新药物的研发逐渐走向新高。

$\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂通过抑制肠黏膜刷状缘糖苷酶活性,减缓寡糖、双糖水解为单糖的速度,以降低和延缓餐后血糖的上升。因此,在调节餐后血糖方面优于其他降糖药物,能有效延缓糖尿病前期患者向2型糖尿病的发展,降低糖尿病发病率,且对糖尿病并发症有很好的预防作用<sup>[3]</sup>。最新《ADA糖尿病治疗指南》和《中国2型糖尿病防治指南2017版》均指出, $\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂可作为一线治疗药物单独使用,还可与其他口服抗糖尿病药物或胰岛素联合,用于2型糖尿病的全程治疗<sup>[4]</sup>。我国的饮食结构特点是以碳水化合物为主,且新诊断2型糖尿病患者中,以餐后血糖升高为特点的比例可达80%~85%,因此,糖苷酶抑制剂是更适合中国糖尿病人群的抗糖尿病药物<sup>[5]</sup>。阿卡波糖(acarbose)作为首个上市的糖苷酶抑制剂,一直位居我国口服降糖药物榜首。

我国丰富的中草药资源宝库及古籍中记载的多种治疗糖尿病(消渴症)方剂,为探寻传统天然药材资源中的 $\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂提供了重要线索。课题组采用体外酶学筛选体系,评价了数百种中药提取物的糖苷酶抑制活性,发现桑属系列药材(特别是桑枝的水提取物)具有较强的糖苷酶抑制活性<sup>[6,7]</sup>。经多学科合作研究,确定了桑枝有效部位提取物中主要活性成分是一组多羟基生物碱及其苷类,通过后续工艺优化,总生物碱含量可达到50%以上,故命名为桑枝总生物碱(简称SZ-A)。本研究将在离体酶学和几种糖尿病动物模型中考察SZ-A的降糖活性和作用特点,为其开发成新型抗糖尿病中药提供依据。

## 材料与方法

**药品、试剂及实验仪器** SZ-A为中国医学科学院药物研究所提供,总生物碱含量53.4%。阿卡波糖(德国拜耳公司);血糖、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司;糖化血清蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;链脲霉素(streptozotocin, STZ)、 $\alpha$ 淀粉酶,购自Sigma公司;葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和四氧嘧啶等其他试剂均为国产分析纯;小

鼠超敏胰岛素 ELISA 试剂盒, ALPCO 公司;  $\mu$ -Quant 酶标仪 (美国 BIO-TEK 公司); 3-18K 型低温高速离心机 (德国 Sigma 公司); HZQ-C 空气浴震荡器 (哈尔滨东明医疗仪器厂); BS110S 天平 (德国 Sartorius 公司)。

**$\alpha$  葡萄糖苷酶离体酶学活性评价方法** 蔗糖和麦芽糖在  $\alpha$  葡萄糖苷酶的作用下分解为葡萄糖。通过测定反应体系中葡萄糖的生成量, 判断受试样品对蔗糖酶和麦芽糖酶活性的抑制作用。淀粉在淀粉酶的作用下分解, 通过测定反应体系中淀粉的剩余量, 判断受试样品对淀粉酶的抑制活性。酶制备及抑制活性评价体系参考本实验室已建立的方法<sup>[8]</sup>。

**糖尿病和糖尿病前期肥胖性胰岛素抵抗动物模型的形成** 雄性 ICR 小鼠 (22~24 g), 雄性 SD 大鼠 (150~170 g) 均购自北京维通利华生物科技股份有限公司, 许可证号为 SCXK (京) 2016-0006; 雄性 C57BL/6J 小鼠 (26~28 g), 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号为 SCXK (京) 2014-0004; 所有动物均饲养于 SPF 级动物房。所用实验动物模型如下: ① 四氧嘧啶高血糖小鼠: 正常 ICR 小鼠尾静脉注射四氧嘧啶 (alloxan)  $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 72 h 后预测血糖 (葡萄糖氧化酶法, 下同), 选用血糖大于  $250 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  的小鼠进行实验分组。② 链脲霉素糖尿病大鼠: 雄性 SD 大鼠腹腔注射 STZ  $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (柠檬酸缓冲液配制), 72 h 后预测血糖, 选用血糖大于  $300 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  的大鼠并参照体重进行实验分组, 正常 SD 大鼠腹腔注射柠檬酸缓冲液作为正常对照组。③ 糖尿病前期肥胖性胰岛素抵抗小鼠: 正常 C57 小鼠, 以高脂饲料 (RD12942) 饲养 5 个月后, 体重接近 50 g, 即形成糖尿病前期肥胖性胰岛素抵抗 C57 小鼠 (HFC57) 模型, 伴有空腹血糖升高、胰岛素抵抗、高胆固醇血症和高胰岛素血症等特征。动物实验操作过程均依照中国医学科学院北京协和医学院《药物研究所动物实验中心标准操作规程》及实验动物管理与动物福利委员会的要求执行。

**单次给药对小鼠蔗糖、淀粉和葡萄糖耐量的影响** 正常雄性 ICR 小鼠 (或四氧嘧啶高血糖小鼠) 50 只, 按体重 (或血糖) 均分为对照组、阳性药物阿卡波糖组 (Acar,  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  B.W., ig) 和不同剂量 SZ-A 组 ( $10, 20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  B.W., ig), 每组 10 只。分别进行口服蔗糖 ( $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、淀粉 ( $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和葡萄糖 ( $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 耐量实验。测定空腹血糖及给药后 30、60、120 min 的血糖值, 并计算血糖曲线下面积 (AUC)。

**对 STZ 糖尿病大鼠糖脂代谢的影响** 链脲霉素糖尿病大鼠 50 只, 参照血糖和体重均分为 5 组 ( $n=10$ ), 一组饲以高蔗糖饲料作为糖尿病对照组 (Con), 一组饲以含阿卡波糖的高蔗糖饲料 (Acar,  $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  diet.),

另 3 组分别饲以含不同剂量 SZ-A 的高蔗糖饲料 ( $0.3, 0.6$  和  $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  diet.)。正常对照组 (Nor) 饲以普通饲料。以上各组动物均自由摄食、饮水。每天观察动物一般状态, 记录摄食量和饮水量。每周测定随机血糖, 给药 3 周后, 测定空腹血糖、血脂 (血 TG、血 TC)、糖化血清蛋白, 用代谢笼收集尿液以测定尿糖含量。

**对糖尿病前期 HFC57 小鼠糖脂代谢的影响** 选用空腹血糖在  $150 \sim 180 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  的肥胖性胰岛素抵抗 HFC57 小鼠 20 只, 并参照血脂和体重均分为两组 ( $n=10$ )。一组灌胃蒸馏水作为模型对照组 (Con), 一组灌胃桑枝总生物碱 (SZ-A,  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  B.W.); 另取正常 C57 小鼠作为正常对照组 ( $n=10$ , Nor, 饲以普通饲料), 以蒸馏水灌胃。给药共 6 周, 期间从第 3 周开始, 每周测定随机血糖和空腹血糖, 第 4 周进行口服葡萄糖耐量实验, 并测定 0 和 15 min 的血清胰岛素水平, 计算糖刺激后 15 min 的胰岛素分泌倍数; 第 6 周进行胰岛素耐量实验, 并测定空腹血清胰岛素; 实验结束时, 测定血 TG 和血 TC 水平。

**胰岛素耐量实验 (ITT)** 实验当天, 动物禁食 4 h, 皮下注射常规胰岛素溶液 ( $0.4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 测定注射前 (0 min) 和注射后 40、90 min 各时间点的血糖水平, 并计算血糖 AUC。

**统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析进行统计学分析,  $P < 0.05$  表示有显著性差异, 绘图软件采用 Graph-Pad Prism 6。

## 结果

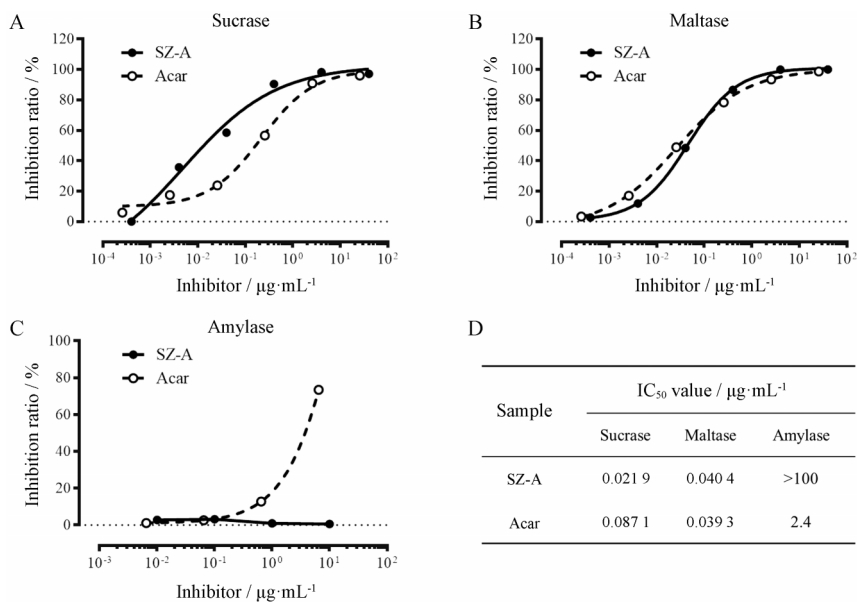
### 1 SZ-A 对 $\alpha$ 葡萄糖苷酶 (蔗糖酶、麦芽糖酶、淀粉酶) 活性的抑制作用

如图 1 所示, SZ-A 抑制蔗糖酶活性的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $21.9 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 作用略强于阿卡波糖 ( $87.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); 抑制麦芽糖酶活性的  $\text{IC}_{50}$  为  $40.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 作用与阿卡波糖相当 ( $39.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); SZ-A 在  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度时, 对淀粉酶无抑制作用, 而阿卡波糖对淀粉酶活性抑制的  $\text{IC}_{50}$  为  $2.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 这表明 SZ-A 是一种较强的双糖酶抑制剂。

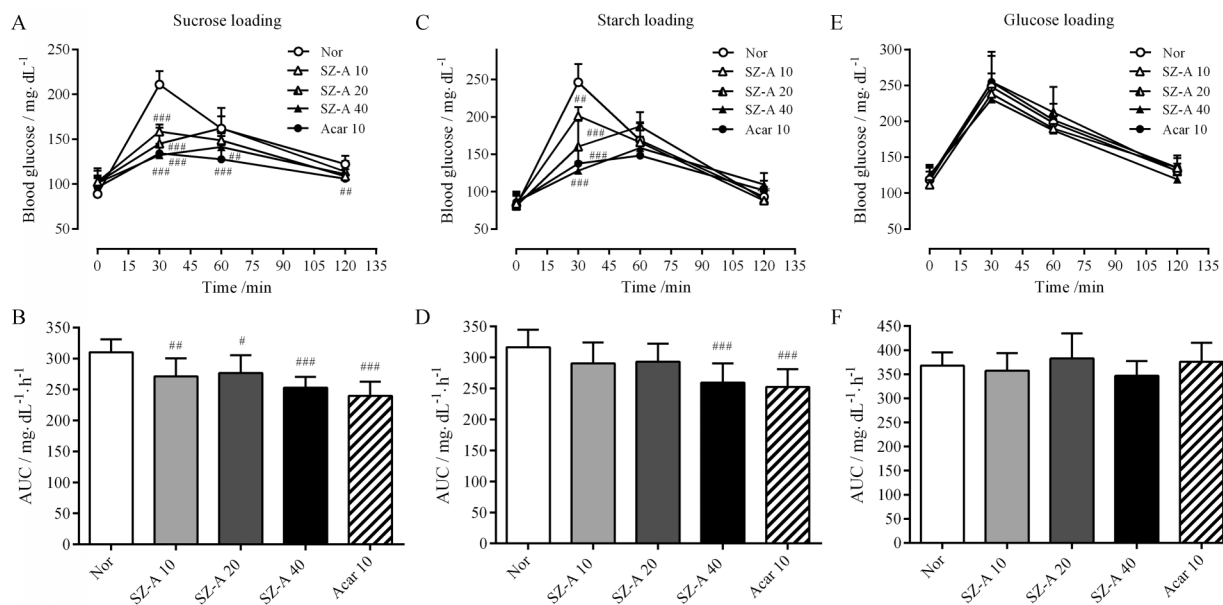
### 2 SZ-A 单次给药对正常小鼠口服蔗糖、淀粉及葡萄糖负荷后血糖水平的影响

为了验证 SZ-A 的降糖活性和作用机制, 首先以正常 ICR 小鼠为模型, 观察单次口服给药后, 对蔗糖 (双糖)、淀粉 (多糖) 及葡萄糖 (单糖) 负荷后血糖水平的影响。

图 2A 和 B 所示, SZ-A 在  $10 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量范围内, 单次给药能使正常小鼠蔗糖负荷后血糖峰值明显降



**Figure 1** The inhibitory effects of SZ-A against  $\alpha$ -glucosidase, including sucrase (A), maltase (B) and amylase (C). D: The IC<sub>50</sub> values on sucrase, maltase and amylase, respectively. SZ-A: Sangzhi alkaloids; Acar: Acarbose.  $n = 10, \bar{x} \pm s$



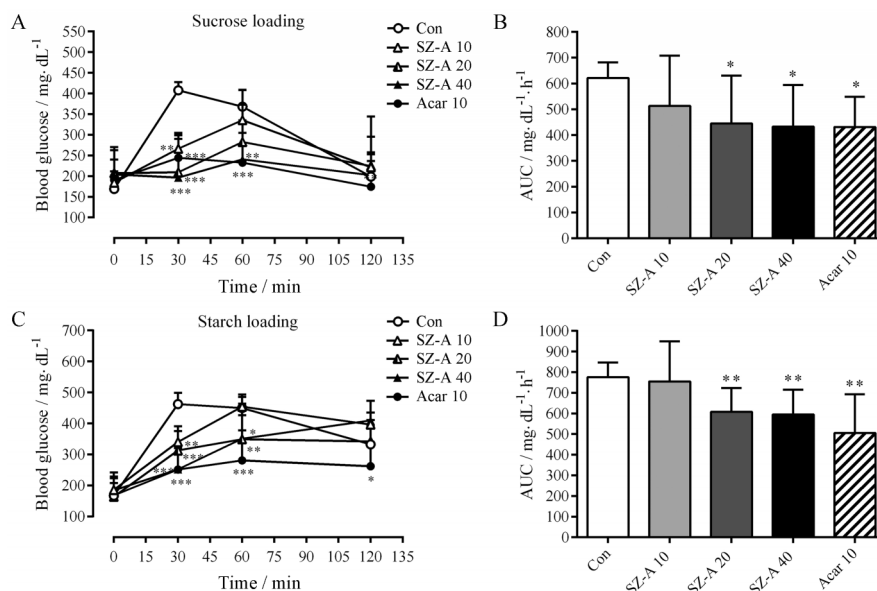
**Figure 2** Effects of SZ-A at a single dose (10, 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup>) on blood glucose and area under the blood glucose concentration time curve (AUC) after oral sucrose (A, B), starch (C, D) and glucose (E, F) loading in normal ICR mice.  $n = 10, \bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs Nor. Acar: 10 mg·kg<sup>-1</sup>

低 ( $P < 0.001$ ), 峰值时间后移, 血糖曲线下面积 (AUC) 显著降低 ( $P < 0.01$ ); 图2C和D所示, SZ-A在10~40 mg·kg<sup>-1</sup>剂量范围内, 降低正常小鼠淀粉负荷后的血糖峰值, 且大剂量组的血糖曲线下面积明显降低 ( $P < 0.001$ ); 图2E和F结果显示, SZ-A各剂量组对正常小鼠葡萄糖负荷后各时间点的血糖均无影响。表明SZ-A的作用靶点确为 $\alpha$ 葡萄糖苷酶, 对葡萄糖自胃肠道的吸收无直接影响。

### 3 SZ-A 单次给药对四氧嘧啶高糖小鼠口服蔗糖和淀粉负荷后血糖水平的影响

为进一步验证SZ-A的降血糖作用, 以四氧嘧啶高血糖小鼠为模型, 观察单次口服给药后, 对蔗糖和淀粉负荷后血糖水平的影响。

图3A和B所示, SZ-A在20和40 mg·kg<sup>-1</sup>剂量下, 可降低四氧嘧啶糖尿病小鼠蔗糖负荷后的血糖峰值 ( $P < 0.01, P < 0.001$ ), 使峰值时间后移, 并降低血糖曲线下



**Figure 3** Effects of SZ-A at a single dose (10, 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup>) on blood glucose and area under the blood glucose AUC after oral sucrose (A, B) and starch (C, D) loading in alloxan-induced hyperglycemic mice.  $n = 10, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con. Acar: 10 mg·kg<sup>-1</sup>

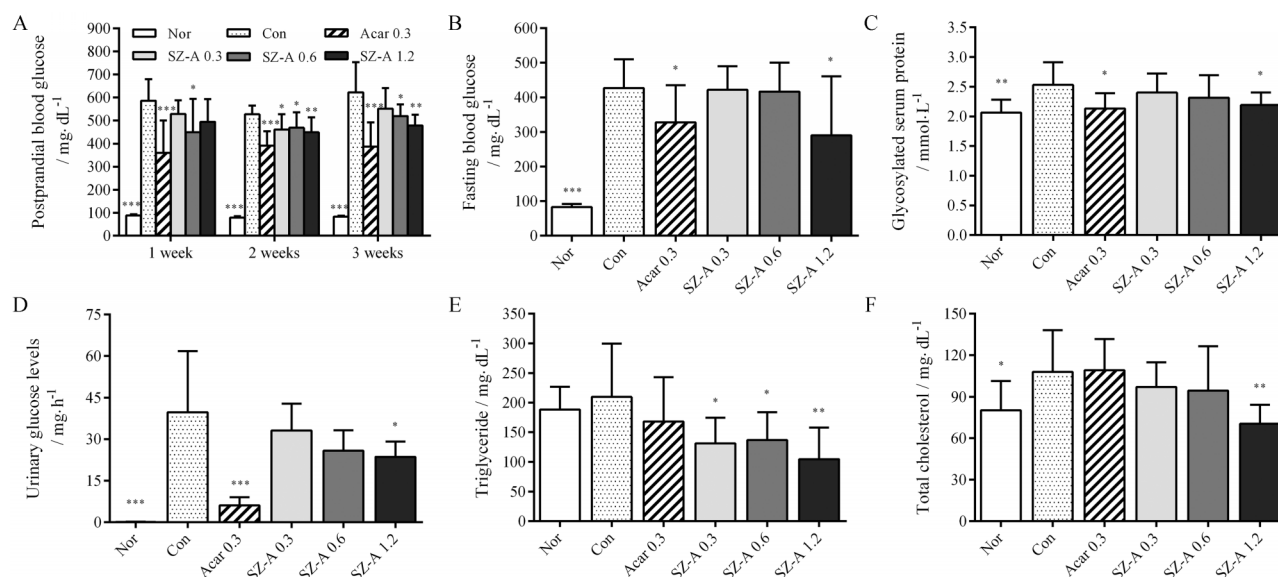
面积 ( $P < 0.05$ ); 图 3C 和 D 所示, SZ-A 在 20 和 40 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量下, 亦可降低四氧嘧啶高血糖小鼠淀粉负荷后血糖峰值及血糖曲线下面积 ( $P < 0.01$ ).

#### 4 SZ-A 长期给药对 STZ 高血糖大鼠糖脂代谢状态的影响

为了考察长期给予 SZ-A 的抗糖尿病作用, 在链脲霉素高血糖大鼠模型中, 连续给药 3 周, 监测其对糖脂代谢的影响。根据糖苷酶抑制剂的作用机制及临床用药特点, 采用药物与高蔗糖饲料混合喂养的方式给药。

图 4A 所示, 给药 1 周后, SZ-A 各剂量组的随机血糖均有所降低 (中剂量组,  $P < 0.05$ ); 给药 2 周时, 3 个剂量组的随机血糖均显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 给药 3 周时, 除随机血糖降低外, 大剂量组的空腹血糖水平也明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 4B), 且糖化血清蛋白 (GSP) 水平显著低于 Con 组 ( $P < 0.05$ , 图 4C), 尿糖含量亦显著减少 ( $P < 0.05$ , 图 4D)。

给药 3 周后, SZ-A 各剂量组的血甘油三酯水平显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 图 4E), 且呈一定量效



**Figure 4** Effects of SZ-A (0.3, 0.6, 1.2 g·kg<sup>-1</sup> diet.) on glucose and lipid metabolism after long-term treatment in STZ-induced hyperglycemic rats. A: Postprandial blood glucose levels; B: Fasting blood glucose; C: Glycosylated serum protein levels; D: Urinary glucose levels; E: Blood triglyceride levels; F: Blood total cholesterol levels.  $n = 10, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con. Acar: 0.3 g·kg<sup>-1</sup> diet

关系, 大剂量组亦能够显著降低血总胆固醇水平 ( $P < 0.01$ , 图4F)。

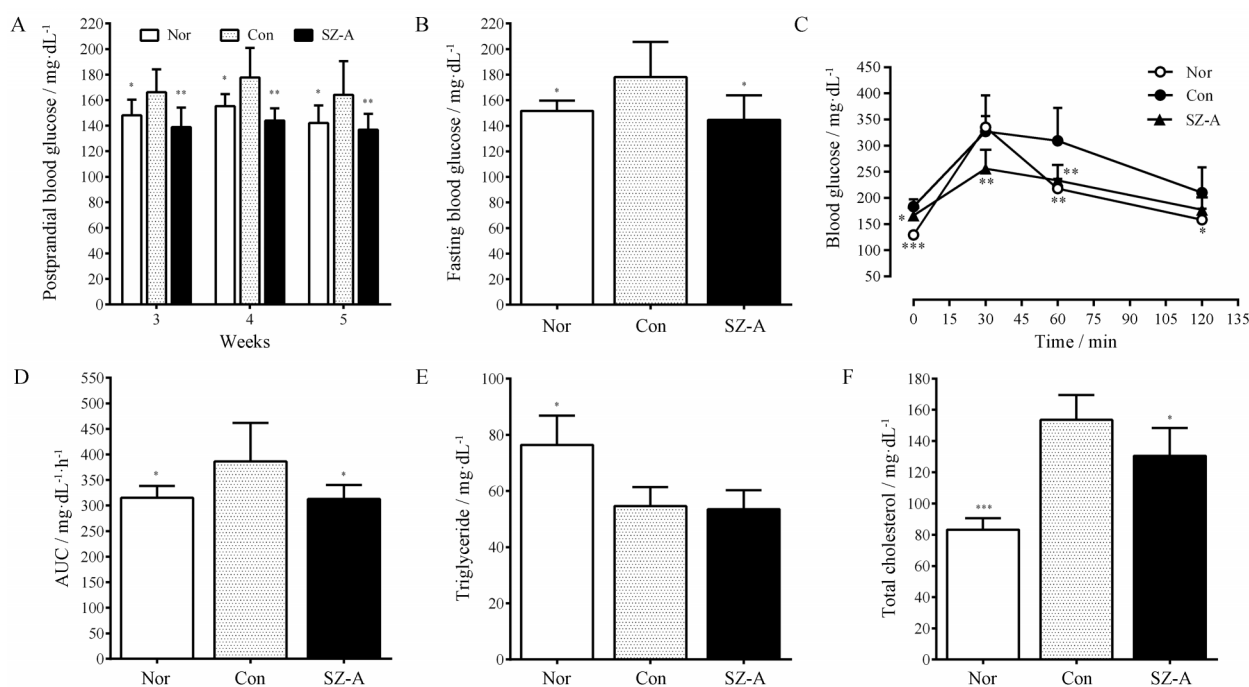
### 5 SZ-A 长期给药对糖尿病前期肥胖性胰岛素抵抗 C57 小鼠 (HFC57) 的糖脂代谢紊乱状态的影响

在糖尿病前期 C57 小鼠 (HFC57) 模型中, 通过灌胃给药方式长期给予 SZ-A ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 考察 SZ-A 对糖脂代谢的影响以及是否存在抑制糖苷酶以外的药物作用途径或靶点。图 5A 所示, 给药 3 周后, SZ-A 显著降低 HFC57 小鼠的随机血糖 ( $P < 0.01$ ); 给药第 6 周时, SZ-A 显著降低 HFC57 小鼠的空腹血糖 ( $P < 0.05$ , 图 5B); 给药 4 周后, SZ-A 显著降低 HFC57 小鼠口服葡萄糖后 30 和 60 min 的血糖水平 ( $P < 0.01$ , 图 5C), 降低血糖时间曲线下面积 ( $P < 0.05$ , 图 5D); 至给药结束时,

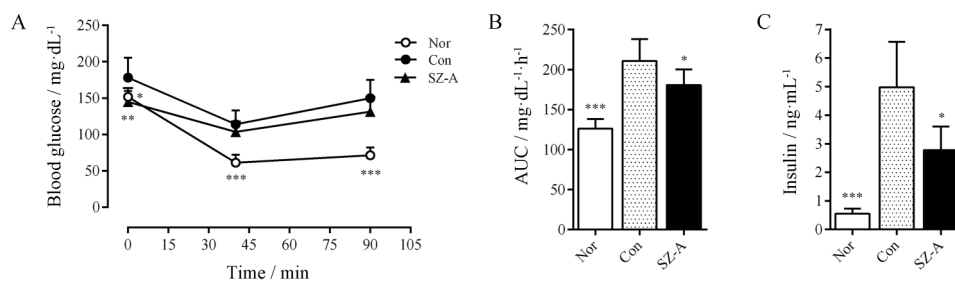
SZ-A 对 HFC57 小鼠的血甘油三酯水平无显著影响 (图 5E), 但可显著降低血胆固醇水平 ( $P < 0.05$ , 图 5F)。表明 SZ-A 长期灌胃给药后, 可控制糖尿病前期 HFC57 小鼠的随机及空腹血糖, 延缓糖尿病的发生, 改善其糖脂代谢紊乱。

### 6 SZ-A 长期给药对糖尿病前期肥胖性胰岛素抵抗 C57 小鼠 (HFC57) 的胰岛素抵抗状态的影响

为考察 SZ-A 是否影响胰岛素敏感性, 在 HFC57 小鼠给药 6 周后, 进行 ITT 实验。如图 6A 所示, SZ-A 不仅显著降低 HFC57 小鼠的空腹血糖 ( $P < 0.01$ ), 也降低了 ITT 中的血糖 AUC ( $P < 0.05$ , 图 6B); 同时, SZ-A 可显著降低 HFC57 小鼠的空腹血清胰岛素水平 ( $P < 0.05$ , 图 6C)。表明长期给予 SZ-A 对 HFC57 小鼠的胰



**Figure 5** Effects of SZ-A ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) on glucose and lipid metabolism after long-term treatment in high fat diet induced insulin resistant obese C57 mice (HFC57). A: Postprandial blood glucose levels; B: Fasting blood glucose; C: Blood glucose levels in oral glucose tolerance test (OGTT); D: AUC of OGTT; E: Blood triglyceride levels; F: Blood total cholesterol levels.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con

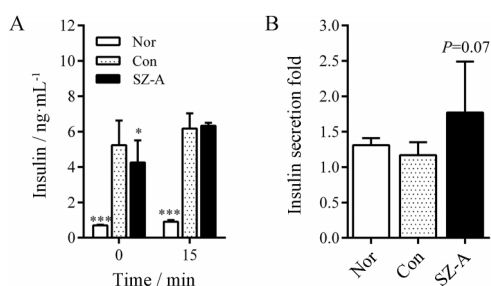


**Figure 6** Effects of SZ-A ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) on insulin sensitivity after 6 weeks treatment in high fat diet induced insulin resistant obese C57 mice (HFC57). A: Plasma glucose levels in insulin tolerance test (ITT); B: Area AUC of ITT; C: Plasma insulin levels.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con

胰岛素敏感性和高胰岛素血症有改善作用。

### 7 SZ-A 长期给药对糖尿病前期肥胖性胰岛素抵抗 C57 小鼠 (HFC57) 的胰岛素分泌功能的影响

为考察 SZ-A 是否影响胰岛素分泌功能, 在口服葡萄糖耐量实验中, 同时测定了基础 (0 min) 和葡萄糖负荷后 15 min 的血清胰岛素水平, 结果如图 7 所示, SZ-A 可显著降低 HFC57 小鼠的基础胰岛素水平 ( $P < 0.05$ , 图 7A); 与 Con 组相比, SZ-A 虽对葡萄糖负荷后 15 min 的胰岛素水平无显著影响, 但能使葡萄糖刺激后 15 min 的胰岛素分泌倍数增加 51.3% ( $P = 0.07$ , 图 7B)。表明长期给予 SZ-A 可一定程度增加 HFC57 小鼠  $\beta$  细胞对葡萄糖的反应性, 改善葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能。



**Figure 7** Effects of SZ-A ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) on oral glucose stimulated insulin secretion after 4 weeks treatment in high fat diet induced insulin resistant obese C57 mice (HFC57). A: Blood insulin levels before and after oral glucose loading; B: Insulin secretion fold at 15 min after oral glucose loading compared with basal levels.  $n = 8-10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con

### 讨论

上世纪 90 年代初, 首个  $\alpha$  葡萄糖苷酶抑制剂德国拜耳的阿卡波糖上市, 目前, 该类药品已成为糖尿病治疗的一线用药<sup>[9]</sup>。虽然随着“糖耐量异常 (IGT) 患者餐后血糖控制”适应症的增加, 阿卡波糖的市场空间进一步扩大<sup>[10]</sup>, 但其肠胀气的不良反应一定程度限制了该药的临床应用。该不良反应主要源于阿卡波糖对淀粉酶有较强的抑制作用, 从而导致食物中的淀粉水解受影响而引起肠胀气<sup>[11]</sup>。因此, 特异性抑制双糖酶, 降低或消除对淀粉酶的抑制作用, 将可能减轻该类药物的胃肠胀气不良反应, 如目前已上市的伏格列波糖、米格列醇等。而发现具有更高选择性的新型糖苷酶抑制剂, 这也将成为研发该类药品的发展趋势之一。

中草药是我国具有原创优势的天然产物资源宝库, 从中发现结构新颖、具有生物活性的物质, 是发掘天然产物创新药物的重要途径之一<sup>[12]</sup>。特别是结合现代分离及分析技术手段, 有针对性地对“中药宝库”进行化学成分和药理活性研究, 将是我国天然产物新药研发的优势所在<sup>[13]</sup>。20 世纪 90 年代初, 受阿卡波糖进

口我国的启发, 本实验室率先在国内建立了灵敏可靠的  $\alpha$  葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法, 并对数百种中草药提取物进行活性评价, 发现桑属系列植物均具有很强的糖苷酶抑制活性。从药理学经济和药用资源可持续发展的角度考虑, 桑枝与桑叶或桑白皮等相比, 其资源丰富, 价格低廉, 最具产业化发展优势。因此, 本研究重点进行了桑枝提取物的活性成份分析和抗糖尿病作用评价。

为提升具有我国自主知识产权的中药品种市场竞争力, 填补有效部位降糖药物的研究空白, 课题组对桑枝有效部位及其制剂进行了深入研究。首先, 对桑枝提取物的多个部位、不同组分进行分离、纯化和结构鉴定, 结合体外药理学活性示踪方法 (即  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性评价), 发现桑枝总生物碱部位对  $\alpha$  葡萄糖苷酶活性抑制的  $\text{IC}_{50}$  小于  $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此, 确定了桑枝降血糖的有效部位是总生物碱组分。组成成分鉴定结果显示, 有效部位主要由 1-脱氧野尻霉素 (1-deoxyojirimycin, DNJ)、莽麦碱 (fagomine, FAG) 和 1,4-二脱氧-1,4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇 (1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, DAB) 等结构类似的水溶性多羟基生物碱或苷类组成<sup>[14]</sup>。最终, 以 DNJ 为对照品, 确定了优化工艺制备的有效部位提取物中总生物碱含量可达 50% 以上, 故此命名为 SZ-A<sup>[15]</sup>。

酶学水平研究显示, SZ-A 对蔗糖酶和麦芽糖酶具有较强抑制活性, 但对淀粉酶几乎无抑制作用, 明确了 SZ-A 是一个选择性的双糖酶抑制剂。根据  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的作用特点, 本研究在正常 ICR 小鼠和四氧嘧啶高血糖小鼠, 发现单次给予 SZ-A 对口服蔗糖、淀粉负荷后血糖水平有显著降低作用, 但对葡萄糖负荷后的血糖上升无影响。结果验证了 SZ-A 不抑制肠道对葡萄糖的吸收, 而是通过抑制  $\alpha$  葡萄糖苷酶活性以减缓碳水化合物水解为葡萄糖的进程, 控制餐后血糖的升高。

根据该类药品的作用特点, 在 STZ 糖尿病大鼠中, 采用了 SZ-A 与高蔗糖饲料混合的方式给药, 连续治疗 3 周。结果显示, SZ-A 可改善模型大鼠的糖脂代谢紊乱状态。在给药期间, 通过对摄食、饮水量及体重的监测, 在该模型中, SZ-A 对高血糖大鼠的摄食量、饮水量以及体重无明显影响。该结果提示, SZ-A 的降血糖作用与实验动物的摄食饮水关系不大。另外, 在前期研究中, 课题组采用四氧嘧啶高血糖大鼠模型, 发现桑枝的水提物亦可改善其空腹和随机血糖、血果糖氨、尿糖及血脂等指标, 对糖尿病肾病也具有一定改善作用<sup>[16]</sup>。上述结果证实, 在高血糖大鼠模型中, 长期给予 SZ-A 有利于其糖脂代谢紊乱的改善, 对糖尿病及其并发症

的发展也具有一定延缓作用。

$\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂在临床应用 20 余年, 该类药物为 2 型糖尿病患者带来的综合益处也日益显现。STOP-NIDDM 研究显示<sup>[17,18]</sup>, 采用阿卡波糖在糖尿病前期进行干预, 可显著降低 IGT 发展为新发糖尿病的几率; 在我国患者中, 阿卡波糖预防 IGT 进展为 2 型糖尿病的作用也得到证实<sup>[19]</sup>。因此, 本研究也采用了糖尿病前期 HFC57 小鼠为模型, 考察 SZ-A 长期给药是否能够延缓糖尿病的发生发展。另外, 为了在该模型中考察 SZ-A 是否具有糖苷酶以外的作用机制, 本研究采用了单次口服给药方式。结果表明, SZ-A 既可降低随机血糖、改善空腹血糖受损状况, 还可降低血胆固醇水平。这提示在糖尿病前期动物模型中, SZ-A 长期给药可一定程度改善脂代谢紊乱, 延缓其糖尿病发展进程。在该模型中也设立了阿卡波糖阳性对照组 (Acar), 至给药结束时, 均显示出明显的抗糖尿病作用, 这可能与其单一的抑制糖苷酶的作用机制有关。而 SZ-A 还可显著降低 HFC57 小鼠的基础血清胰岛素水平, 这提示 SZ-A 可能通过增加 HFC57 小鼠的胰岛素敏感性而降低空腹血清胰岛素水平。另外, SZ-A 还可一定程度增加口服葡萄糖刺激后 15 min 的胰岛素分泌倍数, 这提示长期给予 SZ-A 可一定程度增加糖尿病前期 HFC57 小鼠的胰岛  $\beta$  细胞对葡萄糖的反应性, 改善了葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能。在该模型中, 至给药结束时, 与 Con 组相比, SZ-A 组的体重无显著变化, 这与前期在 STZ 糖尿病大鼠中观察到的结果一致。在 HFC57 小鼠中, SZ-A 显示出上述多个药理作用可能源自其多组分的物质基础特点, 进而延伸其可能具有多靶点的特征。前期课题组对其具体生物碱成分进行了分析, 发现了一系列含量较高的典型生物碱 (如 DNJ 等), 因此, 在后续研究工作中, 课题组还将围绕上述几个药理作用, 进一步发掘它的作用靶点和具体抗糖尿病作用机制。

综上, SZ-A 是一种选择性双糖酶抑制剂, 可显著降低糖尿病前期和糖尿病动物的餐后血糖, 长期给药能有效控制血糖波动, 利于脂代谢紊乱状态的改善, 延缓糖尿病及其并发症的发生和发展。本研究为桑枝总生物碱开发成为新型抗糖尿病天然药物提供依据, 对填补我国抗糖尿病药物市场中天然药物有效部位品种的空缺, 满足国内糖尿病患者日益扩大的用药需求, 具有重要意义。

## References

- [1] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281.
- [2] No author listed. Q&A: key points for IDF Diabetes Atlas 2017 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 135: 235-236.
- [3] Joshi SR, Standl E, Tong N, et al. Therapeutic potential of alpha-glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16: 1959-1981.
- [4] Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, 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]. *Endocr Pract*, 2018, 24: 91-120.
- [5] He K, Shi JC, Mao XM. Safety and efficacy of acarbose in the treatment of diabetes in Chinese patients [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2014, 10: 505-511.
- [6] Ye F, Shen Z, Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb (*Ramulus mori*) in normal and diabetic rats and mice [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9: 161-166.
- [7] Liu YL, Shen ZF, Chen Z, et al. Use of the effective fraction of alkaloids Mulberry Twig in preparing hypoglycemic agents: CN, 101129476A [P]. 2008-02-27.
- [8] Zhang R, Liu Q, Shen ZF, et al. High throughput screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: application to hypoglycemic traditional Chinese medicine [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2007, 10: 740-743.
- [9] Ma RC. Acarbose: an alternative to metformin for first-line treatment in type 2 diabetes? [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2: 6-7.
- [10] Pan CY, Landen H. Post-marketing surveillance of acarbose treatment in patients with type 2 diabetes mellitus and subjects with impaired glucose tolerance in China [J]. *Clin Drug Investig*, 2007, 27: 397-405.
- [11] van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, et al. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28: 154-163.
- [12] Bent S, Ko R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review [J]. *Am J Med*, 2004, 116: 478-485.
- [13] Miao ZX, Wang YH. Application of NMR technique in the discovery and pharmacological studies of active substances from natural products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1383-1389.
- [14] Yang S, Mi J, Liu Z, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and elimination of three active alkaloids in rats after oral administration of the effective fraction of alkaloids from *Ramulus Mori*, an innovative hypoglycemic agent [J]. *Molecules*, 2017, 22: E1616.
- [15] Yang S, Wang B, Xia X, et al. Simultaneous quantification of three active alkaloids from a traditional Chinese medicine *Ramulus Mori* (Sangzhi) in rat plasma using liquid chromatography-tandem

- mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 109: 177-183.
- [16] Ye F, Shen ZF, Qiao FX, et al. Experimental treatment of complications in alloxan diabetic rats with alpha-glucosidase inhibitor from the Chinese medicinal herb *Ramulus Mori* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 108-112.
- [17] Tuomilehto J, Lindstrom J, Hellmich M, et al. Development and validation of a risk-score model for subjects with impaired glucose tolerance for the assessment of the risk of type 2 diabetes mellitus-the STOP-NIDDM risk-score [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87: 267-274.
- [18] Hanefeld M, Pistrosch F, Koehler C, et al. Conversion of IGT to type 2 diabetes mellitus is associated with incident cases of hypertension: a post-hoc analysis of the STOP-NIDDM trial [J]. *J Hypertens*, 2012, 30: 1440-1443.
- [19] Pan CY. Reducing the risk of type 2 diabetes: early identification of high-risk individuals and treatment with acarbose [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2007, 3: 141-148.