

论著

L-阿拉伯糖对 α-葡萄糖苷酶抑制活性的体外试验研究

姚晓芬^{1,2}, 王鑫¹, 应茵¹, 王竹², 张立实¹, 杨月欣²

(1. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050)

摘要:目的 探讨 L-阿拉伯糖对小肠 α-葡萄糖苷酶的抑制作用及与阿卡波糖的联用效应。方法 利用体外实验,提取大鼠小肠粘膜上清液为 α-葡萄糖苷酶粗酶液,分别以终浓度为 60 mg/ml 蔗糖、20 mg/ml 麦芽糖/α-糊精为底物,建立最佳抑制反应体系,测定 L-阿拉伯糖对 α-葡萄糖苷酶抑制活性(IC₅₀)及抑制作用类型;采用 4×3 析因设计,研究 L-阿拉伯糖与阿卡波糖联用效果。结果 以蔗糖、麦芽糖、α-糊精为底物时,L-阿拉伯糖对小肠 α-葡萄糖苷酶活性均有一定抑制作用,但选择性较高地抑制蔗糖酶活性,当 L-阿拉伯糖添加量为 0.5% 蔗糖浓度时酶活性抑制百分率 >50%,最高酶活性抑制百分率约 93%,且有良好剂量-反应关系,IC₅₀ 为 0.164 mg/ml,抑制类型为反竞争性抑制(K_i, 0.558 mg/ml);与阿卡波糖联用二者有交互作用,尤其以蔗糖为底物时联用效果较明显,联合应用可能提高了抑制活性。结论 L-阿拉伯糖有抑制 α-葡萄糖苷酶活性作用,尤其对蔗糖酶有良好的选择性抑制;在 α-葡萄糖苷酶抑制作用方面,其与阿卡波糖有一定联用效果,L-阿拉伯糖在含糖食品中可能有较良好的实际应用前景。

关键词:α-葡萄糖苷酶;α-葡萄糖苷酶抑制剂;L-阿拉伯糖;降血糖机制

中图分类号:R977.15 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)02-0102-04

Inhibitory effect of L-arabinose on α-glucosidase tested *in vitro*

Yao Xiaofen, Wang Xin, Ying Yin, Wang Zhu, Zhang Lishi, Yang Yuexin

(West China School of Public Health, Sichuan University, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of L-arabinose and L-arabinose combined with acarbose on the activities of α-glucosidase *in vitro*. **Methods** The homogenate of α-glucosidase prepared by scraping mucosa from small intestine of rats was incubated with sucrose, maltose and α-dextrin (in a final concentration of 60 mg/ml, 20 mg/ml and 20 mg/ml respectively) as optimal reaction systems to determine the inhibitory effects of L-arabinose on the activities of α-glucosidase (IC₅₀) and the type of inhibition. **Results** L-arabinose inhibited the activities of α-glucosidase in a dose-dependent manner, especially selectively inhibiting the activity of sucrase in an uncompetitive manner (K_i, 0.558 mg/ml) with an IC₅₀ of 0.164 mg/ml. The combination of L-arabinose with acarbose might enhance the effect of inhibition, especially while using sucrose as substrate. **Conclusion** L-arabinose inhibited the activities of α-glucosidase, especially the activities of sucrase. The combination of L-arabinose with acarbose might increase the inhibitory effect. L-Arabinose might have good prospects for practical application in sweet food.

Key words: α-glucosidase; α-glucosidase inhibitor; L-arabinose; hypoglycemic mechanism

糖尿病患者严格控制血糖对预防和减轻并发症有积极作用,不仅是控制空腹血糖,餐后血糖控制也极为重要。有研究证实,人体摄入一些糖类后对餐后血糖(PBG)有很好的控制作用,其中一些是由于在小肠较难被消化吸收,如低聚果糖等,另一些可能有 α-葡萄糖苷酶抑制活性,摄入此类糖后可减缓或抑制碳水化合物的消化吸收,从而避免了餐

后高血糖发生^[1-2]。目前临床常用 α-葡萄糖苷酶抑制剂类药物主要为阿卡波糖或其类似物,可竞争性抑制多种 α-葡萄糖苷酶(如蔗糖酶、麦芽糖酶、淀粉葡萄糖苷酶等)的活性,长期使用可能会出现胃肠胀气、腹痛、腹泻等消化道副反应^[3],因此,寻找更安全高效的 α-葡萄糖苷酶抑制剂成为研究热点。L-阿拉伯糖为一种戊醛单糖,广泛存在于天然食物中(水果中很少含有,玉米皮、甘蔗渣中富含),近年被不断开发利用,2008 年被我国卫生部批准为新资源食品。现有部分研究显示其可降低大鼠体重及餐后血糖^[4-6],那么此作用是否可能由其对小肠 α-葡萄糖苷酶活性抑制作用引起,当使用不同寡糖为

收稿日期:2011-10-12

基金项目:十一五国家科技支撑计划(2006BAD27B01)

作者简介:姚晓芬 女 硕士生 E-mail:xiaofen_1017@163.com

通信作者:杨月欣 女 博士生导师

张立实 男 博士生导师

底物时其抑制活性是否存在差别,与阿卡波糖抑制 α -葡萄糖苷酶作用是否不同及与其联用效果如何,本研究利用体外实验对上述方面进行研究,以探讨 *L*-阿拉伯糖对小肠 α -葡萄糖苷酶活性的影响,为实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

麦芽糖购于 Sigma 公司; *L*-阿拉伯糖, α -糊精, 蔗糖, 阿卡波糖。血糖试剂盒购自北京中生北控生物科技股份有限公司; 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白测定试剂盒购于北京赛驰生物科技有限公司。

pH6.8, 0.1 mol/L 马来酸钠缓冲液: 1.16 g 马来酸溶解于 18.8 ml 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 并定容至 100 ml, 实验中各溶液用此缓冲液配制。

1.2 方法

1.2.1 大鼠小肠 α -葡萄糖苷酶液提取与制备

10 只清洁级雄性 Wistar 大鼠, 180 ~ 200 g, 禁食 12 h, 乙醚麻醉, 迅速解剖剪取小肠上段 30 cm, 于冰板上中间剖开, 冰生理盐水冲洗后用一干净载玻片轻轻刮取小肠内容物, 并加入约 4 倍体积 pH6.8 浓度 0.1 mol/L 的冰马来酸钠缓冲液, 之后在碎冰中使用玻璃匀浆器匀浆, 于 4 °C 低温离心机以 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液分装于 1.5 ml 离心管, 立即放入 -40 °C 冰箱中冷冻备用^[7-9]。小肠粘膜上清液中蛋白质采用 BCA 蛋白试剂盒进行测定, 浓度为 8.2 mg/ml。

1.2.2 *L*-阿拉伯糖对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

参照文献[7-8], 经预实验后作适当修改, 取一套测试管, 终反应体积为 500 μ l, 依次加入适量小肠粘膜上清液(蔗糖为底物时为 50 μ l, 麦芽糖和 α -糊精为底物时为 20 μ l), 100 μ l 不同浓度 *L*-阿拉伯糖溶液, 马来酸钠缓冲液补足至 300 μ l, 混匀后 (37 \pm 0.5) °C 水浴预热 5 min, 加入 200 μ l 底物溶液(蔗糖终浓度为 60 mg/ml, 麦芽糖、 α -糊精溶液终浓度为 20 mg/ml), 准确反应 15 min, 沸水浴失活, 测定反应体系中葡萄糖生成量, 分别计算 3 种底物时, *L*-阿拉伯糖的 α -葡萄糖苷酶活性抑制百分率, 确定最佳的酶活性抑制效果。同时设置空白对照组和阿卡波糖阳性对照组。

1.2.3 *L*-阿拉伯糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用类型研究

选择有最佳抑制效果的底物蔗糖, 其终浓度分别为 1.25、2.5、5、10、15、20 mg/ml, *L*-阿拉伯糖终浓度分别为 0、0.1、0.6 mg/ml, 按 1.2.2 方法测定体系中葡萄糖生成量, 分别以 1/S 和 1/V 为横纵坐标, 绘制 Lineweaver-Burk 图, 确定 *L*-阿拉伯糖对 α -葡萄

糖苷酶的抑制作用类型及 K_i 值^[10]。

1.2.4 阿卡波糖和 *L*-阿拉伯糖联合应用的 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

以蔗糖和 α -糊精为底物, 采用 4 \times 3 析因设计, 以蔗糖为底物时, *L*-阿拉伯糖终浓度为 0、0.04、0.2、0.4 mg/ml, 阿卡波糖终浓度为 0、0.4、4.0 μ g/ml; 以 α -糊精为底物时, *L*-阿拉伯糖终浓度为 0、1.0、2.0、10.0 mg/ml, 阿卡波糖终浓度为 0、0.2、2.0 μ g/ml。按照 1.2.2 方法, 测定阿卡波糖和 *L*-阿拉伯糖联合应用对小肠 α -葡萄糖苷酶的酶活性抑制百分率及分析二者是否存在交互作用。

1.2.5 结果表述及数据处理

用葡萄糖氧化酶法测反应体系中葡萄糖量, 采用平行管并重复 3 次测定, 求得平均值, 所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计算各组酶活性抑制百分率[酶活性抑制百分率 (inhibitory ratio, %) = (空白组 A - 抑制组 A) / (空白组 A - 空白组本底 A) \times 100%, A 为体系中葡萄糖测定吸光度值]及使用 SPSS 17.0 计算半数抑制浓度 IC_{50} (抑制 50% 酶活力时所需抑制剂浓度); *L*-阿拉伯糖和阿卡波糖联用时, 使用析因分析, $P < 0.05$, 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *L*-阿拉伯糖抑制小肠 α -葡萄糖苷酶活性测定

2.1.1 以蔗糖为底物, *L*-阿拉伯糖对小肠 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

图 1 可见, 以蔗糖为底物时 *L*-阿拉伯糖对小肠 α -葡萄糖苷酶有较高抑制率, 且有良好剂量-反应关系。当添加 *L*-阿拉伯糖终浓度为 0.3 mg/ml (约为 0.5% 蔗糖含量) 时, 酶活性抑制百分率达 54.1%; 为 6 mg/ml (约为 10% 蔗糖含量) 时酶活性抑制百分率基本达到顶峰, 约 92.1%, 终浓度为 6 mg/ml *L*-阿拉伯糖与终浓度为 0.06 mg/ml 阿卡波糖的酶活性抑制百分率相近。 *L*-阿拉伯糖的 IC_{50} 为 0.164 mg/ml。

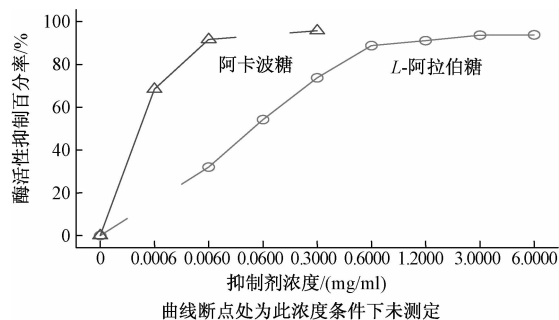


图 1 以蔗糖为底物, *L*-阿拉伯糖对 α -葡萄糖苷酶活性抑制曲线

Figure 1 The inhibitory curve of *L*-arabinose on sucrose
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

2.1.2 以麦芽糖、α-糊精为底物, L-阿拉伯糖对小肠 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

L-阿拉伯糖对小肠 α-葡萄糖苷酶分解麦芽糖和 α-糊精仍有一定抑制作用, 同样存在剂量-反应关

系, 但远低于以蔗糖为底物时对酶活性的抑制作用; 而阿卡波糖对 3 种底物中 α-糊精分解的抑制作用最优(见图 1 与表 1)。

表 1 麦芽糖和 α-糊精为底物, L-阿拉伯糖对小肠 α-葡萄糖苷酶的酶活性抑制百分率

Table 1 The inhibitory effect of L-arabinose on mlatase and α-dextrinase (n=6, $\bar{x} \pm s$)

抑制剂	抑制剂浓度(mg/ml)	α-糊精为底物酶活性抑制百分率(%)	麦芽糖为底物酶活性抑制百分率(%)
L-阿拉伯糖	2	10.7 ± 2.6	26.6 ± 0.7
	10	16.9 ± 1.0	39.5 ± 3.9
	20	26.8 ± 8.2	36.7 ± 3.4
阿卡波糖	0.06	-	61.5 ± 0.8
	0.2	98.6 ± 2.7	-
	0.6	-	78.1 ± 0.9
	2	99.7 ± 1.1	-

注: - 表示未检测。

2.2 L-阿拉伯糖对 α-葡萄糖苷酶抑制作用类型

蔗糖为底物时 L-阿拉伯糖对 α-葡萄糖苷酶活性抑制率有极大优势, 因此选择蔗糖为底物, 对 L-阿拉伯糖的抑制作用类型进行研究, 绘制 Lineweaver-Burk 图(图 2)^[10]。可见, 随着 L-阿拉伯糖浓度增加, Km 和 Vmax(给定条件下的最大反应速度)值均减小, 由此 L-阿拉伯糖对蔗糖为底物时 α-葡萄糖苷酶的抑制作用类型为反竞争性抑制, Ki(抑制常数)为 0.558 mg/ml。

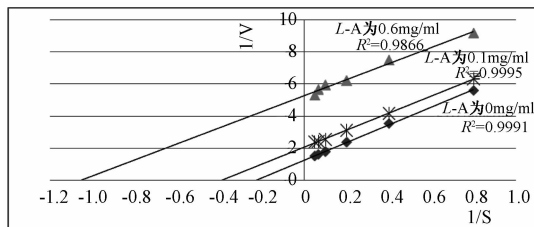


图 2 蔗糖为底物时, L-阿拉伯糖对 α-葡萄糖苷酶抑制效应的 Lineweaver-Burk 图

Figure 2 Kinetic analysis for the inhibition of L-arabinose on the activity of sucrase (n=6)

2.3 L-阿拉伯糖与阿卡波糖联合应用对小肠 α-葡萄糖苷酶抑制活性影响

2.3.1 蔗糖为底物时, L-阿拉伯糖与阿卡波糖联用的 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定

阿卡波糖和 L-阿拉伯糖联用结果(表 2), 采用析因分析二者间关系, P < 0.05, 具有交互作用, L-阿拉伯糖的使用对阿卡波糖的抑制活性有影响。表 2 可见, 二者联用对蔗糖分解的抑制效果优于各自单用, 且有剂量-反应关系。另外, 当阿卡波糖添加量为 0.4 μg/ml 时, 二者联用的剂量-反应关系更为明显, 也达到了良好的抑制水平, 如与 0.4 mg/ml L-阿拉伯糖联用, 酶活性抑制百分率达到了 75%。

2.3.2 α-糊精为底物时, L-阿拉伯糖与阿卡波糖联合应用对小肠 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

采用析因分析, P < 0.05, α-糊精为底物时二者仍有交互作用。从表 3 中可见当阿卡波糖浓度为 2 μg/ml 时, 与 L-阿拉伯糖联用效果很弱, 且基本无剂量-反应关系; 当浓度为 0.2 μg/ml 时, 与 L-阿拉伯糖联用后抑制效果高于各自单用, 且存在剂量-反

表 2 以蔗糖为底物时, L-阿拉伯糖与阿卡波糖联用的酶活性抑制百分率

Table 2 The inhibitory ratio of L-arabinose combined with acarbose on enzymatic activities when sucrose was used as

substrate(n=6, $\bar{x} \pm s$)

阿卡波糖(μg/ml)	酶活性抑制百分率(%)			
	0 mg/ml L-阿拉伯糖	0.04 mg/ml L-阿拉伯糖	0.2 mg/ml L-阿拉伯糖	0.4 mg/ml L-阿拉伯糖
0	0	23.56 ± 3.53	53.25 ± 2.10	65.54 ± 1.94
0.4	27.50 ± 2.76	42.82 ± 2.60	65.69 ± 1.68	74.95 ± 1.15
4.0	66.47 ± 0.71	72.31 ± 0.49	82.34 ± 0.54	86.31 ± 0.13

应关系, 但联用效果仍较弱。可能主要由于 L-阿拉伯糖对 α-糊精酶的抑制率较低, 而阿卡波糖对此酶的抑制作用又非常明显, 二者联用效果基本被阿卡波糖抑制作用所掩盖。

3 讨论

3.1 L-阿拉伯糖基本特性及大鼠 α-葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型

L-阿拉伯糖是一种具有天然甜味的戊醛单糖, 实验中发现其不被大鼠小肠 α-葡萄糖苷酶分解, 推测在体内可能被直接吸收。有实验证实其吸收率低, 5 周龄雄性 Wistar 大鼠灌胃 1 g/kg L-阿拉伯糖后不同时间测定血浆 L-阿拉伯糖浓度很低, 且从尿液排出量仅为摄入量的 3.5%, 证明了 L-阿拉伯糖的低吸收率, 而这种低吸收性便于其在肠道内更好地发挥 α-葡萄糖苷酶的抑制作用^[8]。本实验采用

表3 以 α -糊精为底物时, L-阿拉伯糖和阿卡波糖联用的酶活性抑制百分率Table 3 The inhibitory ratio of L-arabinose combined with acarbose on enzymatic activities when α -dextrin was used as the substrate ($n=6, \bar{x} \pm s$)

阿卡波糖($\mu\text{g/ml}$)	酶活性抑制百分率(%)			
	0 mg/ml L-阿拉伯糖	1.0 mg/ml L-阿拉伯糖	2.0 mg/ml L-阿拉伯糖	10.0 mg/ml L-阿拉伯糖
0	0	17.44 \pm 4.03	21.43 \pm 4.22	25.01 \pm 2.75
0.2	43.12 \pm 1.97	45.37 \pm 3.06	52.40 \pm 1.76	55.40 \pm 3.22
2.0	85.54 \pm 1.23	84.79 \pm 1.55	85.20 \pm 1.56	85.47 \pm 2.02

了大鼠小肠组织离体酶,分别以蔗糖、麦芽糖、 α -糊精等 α -葡萄糖苷酶的直接水解物为底物建立酶抑制筛选模型,相对于以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为底物的筛选模型,不仅具有经济、快捷的体外筛选优势,同时具有定向筛选特点,得到的抑制 α -葡萄糖苷酶的靶向作用比较具体、明确,且假阳性率较低^[11]。另外,选用大鼠小肠粘膜组织上清液作为酶液,相较传统酵母来源酶其遗传表型更接近人体,使得体外筛选情况更接近于体内实验情况,为进一步的体内实验奠定良好基础。

3.2 L-阿拉伯糖高选择性抑制蔗糖酶活性及与阿卡波糖的联合应用

本研究证实 L-阿拉伯糖具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用,尤其明显抑制了蔗糖酶活性,当其添加量为 0.5% 蔗糖浓度时已有良好抑制效果,当添加量为 10% 蔗糖浓度时,酶活性抑制百分率基本达顶峰,且 L-阿拉伯糖对蔗糖酶为反竞争性抑制,提示 L-阿拉伯糖对蔗糖-蔗糖酶中间体有高亲和力,形成蔗糖-蔗糖酶-L-阿拉伯糖三聚体后使酶活性中心空间结构发生一定改变,从而降低其酶活性,与 Seri 等^[8]研究一致,也推测 L-阿拉伯糖可降低寡糖在肠道消化吸收来减缓或降低餐后血糖升高,尤其对蔗糖摄入后餐后血糖升高有良好的控制作用。

阿卡波糖为临床常用 α -葡萄糖苷酶抑制剂类药物,其化学结构复杂,主要来源于微生物发酵,对多种 α -葡萄糖苷酶具有良好抑制作用,但长期使用可能出现胃肠胀气、腹痛、腹泻^[3]等副反应,与胰岛素或磺酰脲类药物合用可能增加低血糖危险^[12],其与 L-阿拉伯糖的抑制类型不同,为竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶活性。从实验结果看,以蔗糖为底物时,二者有良好的联合应用效果,联用可降低阿卡波糖用量,而 L-阿拉伯糖来源于天然食物,不易被消化吸收,为低毒性物质。LD₅₀为 20 g/kg BW^[8],且选择性抑制蔗糖酶活性,这样联用有可能会提高使用安全性。不过二者的联用效果仍需进一步动物实验加以验证。

蔗糖安全、优质,在饮料、糖果等食品加工中被广泛应用,目前我国人均蔗糖摄入量在逐年增加,尤其是对含糖饮料消费较高人群其蔗糖摄入量可

能更高。而 L-阿拉伯糖作为可抑制蔗糖消化吸收的天然物质,可能有广阔应用前景,如在不改变食品口感的前提下,可通过在含糖食品中添加 L-阿拉伯糖或用其替代部分蔗糖,发挥 L-阿拉伯糖对摄入含糖食品后血糖快速上升的抑制作用,对蔗糖摄入量较高人群的血糖升高及肥胖防控可能有长远意义,可对 L-阿拉伯糖添加到含糖食品(如饮料、糕点等)中的实际应用作进一步研究。

参考文献

- [1] TOELLER M. Nutritional recommendations for diabetic patients and treatment with alpha-glucosidase inhibitors [J]. *Drugs*, 1992,44:313-320.
- [2] LEOVITZ H E. Oral antidiabetic agents. The emergence of alpha-glucosidase inhibitors[J]. *Drugs*, 1992,44:1321-1328.
- [3] 廖名龙. 拜唐平片[J]. *中国新药杂志*, 1995,4(6):29.
- [4] PREUSS H G, BOBBY E, DEBASIS B, et al. Inhibition by natural dietary substances of gastrointestinal absorption of starch and sucrose in rats and pigs:1. Acute studies[J]. *Int J Med Sci*, 2007,4(4):196-202.
- [5] PREUSS H G, BOBBY E, DEBASIS B, et al. Inhibition by natural dietary substances of gastrointestinal absorption of starch and sucrose in rats 2. Subchronic studies[J]. *Int J Med Sci*, 2007,4(4):209-215.
- [6] 何丽. L-阿拉伯糖对正常及高糖高脂喂养大鼠生长及糖脂代谢的影响[J]. *中国食品卫生杂志*, 2009,21(5):406-409.
- [7] DAHLQVIST A. Assay of intestinal disaccharidases [J]. *Anal Biochem*, 1968,22(1):99-107.
- [8] SERI K, SANAI K, MATSUO N, et al. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals [J]. *Metabolism*, 1996,45(11):1368-1374.
- [9] MATSUO T, IZUMORI K. d-Psicose inhibits intestinal alpha-glucosidase and suppresses the glycemic response after ingestion of carbohydrates in rats[J]. *Clin Biochem Nutr*, 2009,45(2):202-206.
- [10] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. *生物化学教程*[M]. 北京:高等教育出版社,2008:158-159.
- [11] 吴鹏飞,许杨,李艳萍. α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2008,35(1):9-12.
- [12] BALFOUR J A, MCTAVISH D. Acarbose. An update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 1993,46(6):1025-1054.