

苦瓜皂甙降糖机理研究

石雪萍¹, 姚惠源²

(1. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 本研究从苦瓜皂甙对 α -葡萄糖苷酶的活性影响, 口服耐糖量试验, 苦瓜皂甙对小鼠肝糖原和胰岛素水平影响这几个方面研究了苦瓜皂甙的净血糖机理。结果表明, 苦瓜皂甙对 α -葡萄糖苷酶没有抑制作用, 葡萄糖耐量试验表明苦瓜皂甙能够使葡萄糖表现为正常耐量, 苦瓜皂甙还能使小鼠的肝糖原升高, 但对小鼠的胰岛素水平没影响, 这些结果表明: 苦瓜皂甙不是通过抑制 α -葡萄糖苷酶的活性来降低血糖, 苦瓜皂甙能够使受损的胰岛 β 细胞恢复正常的分泌功能。苦瓜皂甙可能是通过刺激肝糖原合成来降低血糖作用。

关键词: 苦瓜; 降血糖; 机理

In vivo Study on Hypoglycemic Mechanism of *Momordica charantia* L. Saponins

SHI Xue-ping¹, YAO Hui-yuan²

(1. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The α -glucosidase activity, the oral glucose tolerance of normal and diabetic mice, the contents of glycogen and insulin were respectively studied to find the hypoglycemic mechanism of saponins from *Momordica charantia* L. The results showed that the saponins have no α -glucosidase inhibition activity. But the saponins can lower the oral glucose tolerance of both normal and diabetic mice and they also affect the glycogen of the normal and diabetic mice. From these results we concluded that the hypoglycemic activity would stimulate the glycogen synthesizing. They significantly improve the oral glucose tolerance of both normal and diabetic mice. This showed that the mechanism is a combination of recovering the β -cells activity in the islet and inhibiting glycogenic output of the mice.

Key words: *Momordica charantia* L.; hypoglycemic; mechanism

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0366-03

苦瓜是一种常见蔬菜, 中医认为它性味苦寒, 具有清凉解热的作用。现代医学研究证明苦瓜具有抗肿瘤、提高免疫功能、降血糖等作用^[1-4]。糖尿病(DM)是一种常见的具有遗传倾向的全身性代谢疾病, 其特点是病因复杂、病程长、难根治。糖尿病病理生理改变是胰岛素分泌相对或绝对不足, 引起糖、脂肪、蛋白质和继发的维生素、水、电解质代谢紊乱, 表现为血糖及尿糖升高, 多食、多饮、多尿、口干及全身无力等症状^[5]。

皂甙是苦瓜中的主要活性成分, 为了了解苦瓜皂甙的降血糖机理, 本实验在借鉴临床应用药物的药理和作用机制的基础上, 从以下几个方面来研究苦瓜皂甙的降血糖机制: 苦瓜皂甙对 α -葡萄糖苷酶活性的影响; 苦瓜皂甙对小鼠口服葡萄糖耐糖量的影响; 苦瓜皂甙对肝糖原合成和对小鼠血清胰岛素的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

健康小鼠 无锡市江原医院。

对硝基- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG) 美国Ameresco公司; α -葡萄糖苷酶、四氧嘧啶(Alloxan) 美国Sigma公司; 肝糖原测定试剂盒 南京建成生物工程研究所; 葡萄糖、蒽酮、磷酸盐、二甲亚砜、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇等。

722分光光度计 上海第二光学仪器厂; 恒温水浴锅H.S.G-II C4 余姚江南仪器仪表厂。

1.2 方法

1.2.1 苦瓜皂甙的提取分离

适量苦瓜干, 粉碎, 称重, 加20倍的95%乙醇70℃下三次提取, 每次3h。过滤得到苦瓜乙醇提取液。减压浓缩石油醚脱脂, 蒸发至浸膏状。然后将浸膏分散至乙酸乙酯中萃取5次, 取水相, 将其分配于正丁醇-水溶液中(正丁醇:水为1:1), 萃取5次, 至正丁醇相几乎没有颜色, 合并正丁醇相, 浓缩干燥备用。TLC定性检测含有大部分苦瓜皂甙, 香草醛-浓硫酸法测定总皂甙含量为41.5%。

收稿日期: 2006-12-30

作者简介: 石雪萍(1974-), 女, 博士, 主要从事为食品功能性成分的研究与开发。E-mail: stbdw@yahoo.com.cn

1.2.2 α -葡萄糖苷酶的活性测定方法

1.2.2.1 受试药物的制备

苦瓜皂甙溶于生理盐水,使成0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0、20.0mg/ml(皂甙含量)的溶液。

1.2.2.2 α -葡萄糖苷酶的活力测定

以pNPG为底物,反应系统为:磷酸缓冲液(pH6.8),受试苦瓜提取物两种溶液20 μ l与 α -葡萄糖苷酶(0.02U/ μ l)混合,37℃温育10min,加入麦芽糖,在37℃继续温育10min。然后放入80~85℃水浴中使酶灭活终止反应。在405nm处测定吸光度,计算反应中形成的硝基苯酚,硝基苯酚的相成速率与酶的活性成正比,以不加酶上清液以及受试药物的反应体系为空白管调零,以不加受试药物反应体系管为100%,计算药物对 α -葡萄糖苷酶的抑制百分率。

α -葡萄糖苷酶活力单位定义:pH6.8,37℃时每min释放1 μ mol PNP为一个活力单位。抑制剂活力单位定义:pH6.8,37℃时使一个酶活力单位失活为一个抑制活力单位^[6-7]。

$$\text{抑制百分率} = \frac{\text{抑制活力}}{\text{酶活力}} \times 100\%$$

1.2.3 小鼠耐糖量试验

小鼠随机分组,试验前禁食不禁水12h,试验当天按剂量为200mg/kg·d腹腔注射四氧嘧啶,72h后测定空腹血糖值。选择血糖浓度在10mmol/L以上的小鼠分为阴性对照组和MEC-B治疗组,每组10只。治疗组小鼠连续给药7d,末次给药前禁食3h,测定血糖值(0min),给药后1h按照2.5g/kg灌胃葡萄糖,随后30、60、120min测定血糖值。空白对照组与阴性对照组小鼠腹腔注射同剂量的生理盐水,其他操作同MEC-B治疗组。

1.2.4 肝糖原含量测定(萘酚法)

肝糖原的提取:处死动物,取肝脏,冲掉血液,称重。

肝糖原的测定:肝糖原试剂盒法。

样品前处理:取样 取新鲜肝脏用生理盐水漂洗后,滤纸吸干,称重;水解 按照样本重量(mg):碱液体积(μ l)=1:3,一起加入试管中,沸水浴20min,流水冷却。将糖原水解液进一步制备成糖元检测液,1%糖元检测液加水量为肝脏重量 \times 96(μ l)。操作具体如表1所示。

表1 肝糖原的测定方法
Table 1 Assay of glycogen

试剂	空白管	标准管	测定管
蒸馏水(ml)	1.0		0.9
0.01mg/ml标准(ml)		1.0	
糖原检测液(ml)			0.1
显色液(ml)	2	2	2

混匀后沸水中煮5min,冷却后于620nm波长,空白管调零,测定各管的OD值。肝糖原含量的计算:

肝糖原(mg/g肝重)=OD样品/OD标准 \times (标准管含量)0.01mg \times (测试前稀释倍数)100 \times (测试过程稀释倍数)10 \div 1.11。

式中,1.11为此法测得的葡萄糖含量换算成糖原含量的系数,即100 μ g糖原用萘酚试剂显色的颜色相当于111 μ g葡萄糖用萘酚试剂显色的颜色。

1.2.5 小鼠血清胰岛素水平检测(放免试剂盒法)

以上各组小鼠,眼眶取血,离心管中加入肝素钠抗凝,37℃水浴1h,取出于3000r/min离心3~5min,吸出上层血清,送至江苏省无锡市江原医院检验科,保存于低温冰箱中,用放射免疫法测定血清胰岛素水平。

2 结果与分析

2.1 苦瓜皂甙对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

α -葡萄糖苷酶存在于小肠刷状缘膜的近腔上皮细胞内,主要作用是使淀粉、糊精、麦芽糖和蔗糖等降解为单糖。 α -糖苷酶抑制剂是目前研究较多的糖尿病口服降糖药物,对葡萄糖苷酶有高度的亲和性,作用在小肠粘膜刷状缘,可通过延缓碳水化合物在肠道的消化和吸收,抑制餐后血糖水平的升高,同时在一定程度上能降低空腹血糖^[8]。筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂大多以pNPG为底物,测定 α -葡萄糖苷酶抑制活性,主要测定麦芽糖酶活性^[9]。pNPG作为底物与麦芽糖作为底物相似,且所获抑制活性的结果也较一致^[10]。测定MEC-B是否对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用,对探讨MEC-B降血糖的机理具有重要意义。

实验确定 α -葡萄糖苷酶活的条件为:100 μ l酶液以10mmol/L pNPG作为底物,pH6.8条件下,37℃反应2h。按照此条件对苦瓜乙醇提取物中苦瓜皂甙进行实验,结果见表2。

表2 苦瓜提取物酶反应实验结果
Table 2 Experiment results of enzyme reaction of *Momordica charantia* L.extract

苦瓜皂甙浓度 (mg/ml)	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0	10.0	20.0
抑制率(%)	1.21	1.23	2.86	1.90	2.36	2.78	3.42	4.65

由以上实验结果表明:苦瓜皂甙对 α -葡萄糖苷酶的抑制率很低,随着浓度的增大,抑制率有所变化,但是抑制率都很低。可以得出结论:苦瓜皂甙对 α -葡萄糖苷酶没有抑制活性,苦瓜皂甙不是通过抑制 α -葡萄糖苷酶的活性来降低血糖的。

2.2 苦瓜皂甙对小鼠耐糖量的影响

葡萄糖耐量试验(OGTT):正常情况下,在一次摄入大量葡萄糖后,通过体内的各种调节机制的调节,血糖浓度仅为暂时升高,2h后恢复到正常水平,这种现象称为“耐糖现象”。耐糖试验一般来通过口服葡萄糖耐量试验(OGTT)来衡量。口服葡萄糖耐量试验2h后消失在7.8mmol/L以下是正常的。餐后2h血糖在7.8~

表3 苦瓜皂甙对小鼠耐糖量的影响(mmol/L, $\bar{X} \pm SD$)
Table 3 Effects of saponins on glucose tolerance in mice (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$)

处理	实验前	0min	30min	60min	120min
正常对照组	5.16±0.21	5.33±0.35	10.34±0.68	8.42±0.36	5.01±0.38
模型对照组	15.23±1.35	15.35±1.02	19.24±2.67	18.85±1.83	18.97±2.48
苦瓜皂甙实验组	14.97±2.34	5.92±0.76	12.32±1.23	9.75±0.78	5.21±0.27

11.1mmol/L 为称为耐糖量异常(IGT)。正常人口服葡萄糖后,葡萄糖几乎全部被肠道吸收,血糖迅速上升,并刺激胰岛素分泌,肝糖原合成增加、分解抑制,肝糖原输出减少,体内组织对葡萄糖的利用增加。口服葡萄糖后30~60min 血浆血糖达到最高峰,以后迅速下降,在2h 左右下降到接近正常水平。当机体耐糖量减低时,血糖水平难以保持这一状态。耐糖量减低时血糖曲线表现为上升后下降缓慢,2h 候仍保持在较高水平。通过葡萄糖耐量试验可以了解个体对葡萄糖的负荷能力,评估胰岛细胞的功能状态。表3 是苦瓜皂甙影响小鼠耐糖量结果。

由表3 可以看出,空白对照组小鼠耐糖量正常,其血糖值在30min 时达到最大,120min 时降至正常水平。模型对照组小鼠的血糖在30min 时也达到最大,随着时间推移,血糖没有下降,表现为耐糖量低(IGT)。苦瓜皂甙实验组治疗7d 后,血糖值降至正常水平,口服葡萄糖耐量试验表现为正常耐受量。

2.3 苦瓜皂甙对正常小鼠和糖尿病小鼠肝糖原和血清胰岛素水平的影响

糖原是葡萄糖的储存形式。当机体细胞中能量充足时,葡萄糖转变成糖原而储存能量。当机体能量供应不足时,糖原分解产生ATP,以保证不间断地供应生命活动所需的能量。糖原的分解与合成受胰岛素、肾上腺素等激素的调节。正常情况下,为维持体内血糖水平的稳定,胰岛素促进糖原的合成,抑制糖原的分解。胰岛素由于胰岛素抵抗的存在,糖尿病大鼠胰岛素对肝脏、肌肉组织糖代谢的生理作用减弱。机体糖原合成减少,分解增加,导致血糖升高,肝糖原、肌糖原降低。肝脏、肌肉、脂肪组织中糖原含量的变化可反应机体组织对胰岛素敏感程度。

本实验将小鼠分组,每组8 只,试验组按照剂量300mg/kg·d 灌胃苦瓜皂甙,其他组灌胃生理盐水,一周后测定肝糖原含量与胰岛素水平,结果见表4。

表4 苦瓜提取物对正常小鼠和糖尿病小鼠肝糖原的影响($\bar{X} \pm ASD$)
Table 4 Effects of saponins on glycogen in both normal and diabetic rats ($\bar{X} \pm ASD$)

组别	动物数	肝糖原(mg/g)	胰岛素($\mu U/ml$)
正常对照组	8	3.13±0.67	32.45±4.97
模型对照组	8	2.21±0.82	18.74±2.25
正常小鼠灌胃苦瓜皂甙	8	4.31±1.02**	31.23±4.56
糖尿病小鼠灌胃苦瓜皂甙	8	4.19±1.23**	18.38±1.74

注:**表示 $p \leq 0.01$,说明与正常对照组和模型对照组比较差异显著。

实验结果表明,7d 后苦瓜皂甙对糖尿病小鼠和正

常小鼠肝糖原影响差异显著($p \leq 0.01$),对糖尿病小鼠的血清胰岛素几乎没有影响。由此推测苦瓜皂甙降血糖作用与增加肝糖原合成有关。苦瓜皂甙对小鼠耐糖量有明显改善,也表明它可以使小鼠胰岛 β 细胞的功能有所增强^[11]。王先远等人^[12]研究表明苦瓜皂甙不影响血液中的胰岛素水平,苦瓜皂甙可能是通过调节糖皮质激素水平,调节酶活力,刺激糖元合成来降低血糖水平的。本实验肝糖原水平增加也正说明了这一观点。

3 结 论

3.1 苦瓜皂甙在酶反应最佳条件下,对 α -葡萄糖苷酶活性抑制率很低,从而得出结论苦瓜皂甙不是通过抑制 α -葡萄糖苷酶来降低血糖的。

3.2 口服耐糖量试验表明,苦瓜皂甙能够使受损的胰岛 β 细胞恢复正常的分泌功能。

3.3 通过肝糖原试验得出如下结论:苦瓜皂甙对正常和糖尿病小鼠的肝糖原都有所增加,表明苦瓜皂甙可能是通过刺激肝糖原合成来降低血糖作用。

参考文献:

- [1] 程光文,陈青山,张绪中. 苦瓜对小鼠免疫功能的影响[J]. 中草药, 1995, 26(10): 535-536.
- [2] SARKAR S, PRANAVA M, MARITA R. Demonstration of the hypoglycemic action of *Momordica charantia* in validated animal model of diabetes[J]. Pharmacol Res, 1996, 33(1): 1-4.
- [3] ALMED I, ADEGHATE E, SHARMA A K, et al. Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1998, 40(3): 145-151.
- [4] 王先远,高兰兴. 苦瓜提取物MAP30抗病毒的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(2): 6-11.
- [5] GROOP L C, BONADONNA R C, PRATO D S, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance[J]. J Clin Invest, 1989, 84: 205-213.
- [6] 罗培,莫正纪. 优化山茱萸中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的提取工艺[J]. 华西药杂志, 2004, 19(4): 273-274.
- [7] 沈忠明,李英,姜宏,等. 降糖中药对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 中国生化医药杂志, 2000, 21(2): 69-70.
- [8] 全吉淑,尹学哲,金明,等. 大豆皂苷对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 中药材, 2003, 26(9): 654-656.
- [9] PIERRE C, ROLAND R, TREMBLAY P. Nitrophenol- α -glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen[J]. The Journal of Clinical Chemistry, 1978, 24: 208-211.
- [10] 高小平,张蔚瑜,邹文俊,等. 中药提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 11(16): 536-538.
- [11] 骆静,王玉坤,王棘,等. 苦瓜醇提物的降血糖作用[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(5): 31-33.
- [12] 王先远,金宏,许志勤,等. 苦瓜皂甙降血糖作用及其机制初探[J]. 氨基酸与生物资源, 2001, 23(3): 42-45.