

• 药学 •

文章编号: 1002-0217(2017)06-0525-03

多糖碳点的制备及降血糖活性研究

王书生, 邵太丽

(皖南医学院 药学院, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究牛蒡多糖碳点(CDs)的制备及降血糖活性。方法: 从牛蒡根中提取多糖(分子量约4500 u), 以该多糖和枸橼酸为碳源, 280℃下反应30 min为CDs, 通过体外 α -葡萄糖苷酶抑制试验, 体内对高脂喂养联合链脲霉素诱导的糖尿病模型大鼠血糖水平试验研究其降血糖活性。结果: 体外抑制试验结果表明CDs浓度达到2.5 mg/mL时, 抑制率达到89.24%; 体内试验结果显示, 糖尿病大鼠治疗42 d后, CDs组血糖为14.12 mmol/L, 低于模型组的16.26 mmol/L。结论: CDs具有较强的抑制葡萄糖苷酶活性, 可降低糖尿病模型大鼠的血糖水平, 为进一步研究其体内降血糖机制奠定了基础。

【关键词】碳点; α -葡萄糖苷酶抑制活性; 降血糖活性

【中图分类号】R 285; R 284 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2017.06.004

Preparation of the polysaccharide-derived carbon dots and determination of the hypoglycemic activity

WANG Shusheng, SHAO Taili

School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To determine the hypoglycemic activity of *Arctium lappa* L. root polysaccharide-derived carbon dots (CDs). **Methods:** Polysaccharide (MW 4500) was extracted from the root of the *Arctium lappa* L. roots. CDs were prepared by pyrolyzation of the polysaccharide and citric acid under 280 °C for 0.5 h. *In vitro* technique was used to test α -glycosidase enzyme inhibition and the hypoglycemic activity of CDs in the model rats of diabetic peripheral neuritis induced by streptozotocin. **Results:** *In vitro* test indicated that the inhibition activity of α -glycosidase was up to 89.24% at concentration of CDs being 2.5 mg/mL, and rats treated with CDs had lower blood glucose level than those in the model group (14.12 mmol/L vs. 16.26 mmol/L) after intragastric administration for 42 days. **Conclusion:** CDs has strong activity to inhibit α -glycosidase and capability to reduce blood glucose level of diabetic model rats. Our findings may lay a foundation for further investigation of the CDs in the mechanism of regulating the blood sugar.

【Key words】 carbon dots; α -glucosidase inhibitory activity; hypoglycemic activity

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是严重威胁人们健康的慢性疾病之一^[1]。临床上降糖药物主要是化学药物,其效果好、见效快,但长期使用会产生抗药性和继发性失效,并伴随肝毒性、肾毒性及血糖波动频繁等不良反应,于是研究人员把目光投向了疗效好、毒性低的植物上^[2]。牛蒡根含有多糖类物质,具有明显的降血糖等活性^[3-7],由于水提取多糖结构不唯一,因此大多数提取的多糖分子量虽然相当,但却没有活性。荧光碳量子点自2004年报道以来,以其抗光漂白,生物相容性好,水溶性好,易功能

化等优势,在生物学及生物医学研究中显示出极大的应用潜力^[8-11]。本研究从牛蒡根中提取纯化得到牛蒡多糖,牛蒡多糖和枸橼酸在高温下反应得碳点(carbon dots, CDs),研究CDs体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性,以及降低链脲霉素诱导的糖尿病模型大鼠的血糖水平活性,为进一步研究该CDs的体内降血糖活性提供基础。

1 材料

1.1 试剂 实验所用水为超纯水,试剂均为分析

基金项目:安徽省教育厅人才项目(gxfxZD2016157);国家级大学生创新创业训练计划项目(201510368012)

收稿日期:2017-04-11

作者简介:王书生(1994-),男,2013级药学专业本科生,(电话)0553-3932026,(电子信箱)1334260315@qq.com;

邵太丽,女,副教授,博士,(电子信箱)shaotl@mail.ahnu.edu.cn,通信作者。

纯。4-硝基- α -D-吡喃葡萄糖苷(p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, PNPG)、 α -葡萄糖苷酶(Sigma)、阿卡波糖(Acarbose)(Sigma)、链脲霉素(streptozotocin, STZ)(Sigma)、枸橼酸(国药)、96孔可拆酶标版、透析袋MD45(1000)(上海易佰聚经贸有限公司)、0.22 μ m 微滤膜、D101 吸附大孔树脂(深圳市宝安区硕科来实验设备销售中心)。

1.2 仪器 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), 高速冷冻离心机(JW-3021 HR), FD8-3 冷冻干燥机(GOLD-SIM 中国分公司), DHG-9070 电热恒温鼓风干燥箱(金坛市荣华仪器制造有限公司), 聚四氟乙烯反应釜(芜湖市标科仪器销售部), 荧光酶标仪(深圳山特电子有限公司), 血糖仪及标配试纸(罗氏), FA2014N 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司), 艾科浦纯水机(颐洋企业发展有限公司)。

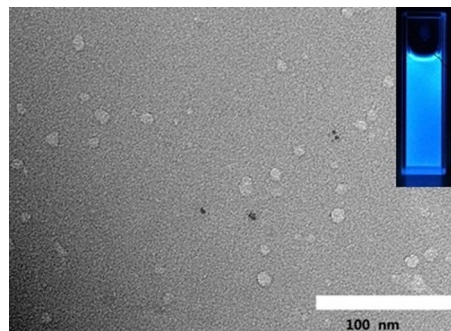
1.3 药材及动物 鲜牛蒡购自徐州丁氏百年食品有限公司, 存放于皖南医学院中心实验室。180 ~ 200 g 雄性 SD 大鼠 40 只(南京青龙山动物繁殖厂)。

2 方法和结果

2.1 牛蒡多糖的提取和分离 本课题组对牛蒡多糖的热水提取法进行了改造优化, 其工艺流程如下: 将鲜牛蒡洗净、去皮、切片, 按照 250 g/L 料液比 80 $^{\circ}$ C 水提取 2 次, 第 1 次提取 3 h, 第 2 次提取 2 h, 合并两次提取液浓缩至一定体积, 用 3 倍体积 95% 乙醇醇沉, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。5000 r/min 离心 5 min 获得沉淀, 沉淀以水溶解并再次离心去除不溶物, 取上清液浓缩到一定容量, 采用 Sevage 法(氯仿:正丁醇 = 4:1, 糖溶液:Sevage 试剂 = 4:1, V/V)脱蛋白, 直至交界面无变性蛋白为止, 取上层水相溶液经旋转蒸发除去残留有机试剂, 并经过 D101 吸附大孔树脂脱色, 收集脱色溶液, 经过 0.22 μ m 微滤膜过滤除菌, 采用截留分子质量为 1000 u 的透析袋 4 $^{\circ}$ C 下流水透析 48 h, 将得到的溶液冷冻干燥得到牛蒡粗多糖成品。粗糖复溶后经过 Sephadex G-400 凝胶柱分离得到单一组份, 采用高效液相色谱分析后认为是牛蒡多糖纯品(分子质量约 4500 u), 与文献^[12-13]报道相近。

2.2 CDs 的制备及表征 称取牛蒡粗多糖和枸橼酸各 1 g 左右, 置于内衬聚四氟乙烯反应釜中, 加入 10 mL 蒸馏水, 搅拌溶解。将反应釜放置于 280 $^{\circ}$ C 干燥箱中反应 30 min。反应结束后, 将反应液倒出过滤, 滤液经 5000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集上清液。取上清液过 0.22 μ m 滤膜两次, 过滤后的上清

液装入截留分子质量 1000 u 的即用型高精度 RC 透析袋中透析 48 h, 将得到的溶液冷冻干燥得 CDs。称取微量冻干品, 加蒸馏水溶解, 在 365 nm 的紫外灯照射下, 具蓝色荧光, 如图 1。



图中为荧光图, 在紫外灯 365 nm 激发下。

图 1 CDs 的透射电镜图

2.3 CDs 体外抑制 α -葡萄糖苷酶的活性 参考文献[14-16], 以 CDs 为抑制剂, PNPG 为底物, Acarbose 作为阳性对照, 检测对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。优化酶促反应后, 得到最佳反应条件为: 溶剂为 pH 6.8 PBS 缓冲液, Acarbose 与 CDs (0.078 ~ 2.5 mg/mL) 分别与 20 μ L α -葡萄糖苷酶 (1U/mL) 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 加入底物 PNPG (5 mmol/L) 20 μ L 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后, 加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 100 μ L 终止反应。反应产物在 405 nm 处测定吸光度。反应分为空白对照组、CDs 组、阳性对照组, 每组均设置本底对照。样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率 (%) = $[1 - (A_s - A_c) / A_0] \times 100\%$ 式中: A_s 为 CDs 或 Acarbose 反应组吸收度 (CDs 组或阳性对照组), A_c 为各组自身本底对照吸收度; A_0 为等量 PBS 代替样品溶液的吸收度 (空白对照组)。结果如表 1 所示, CDs 浓度为 2.5 mg/mL 时, 抑制率为 89.24%, 具有良好的抑制活性。

表 1 CDs 和 Acarbose 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

c/(mg/mL)	Inhibitory rate/%	
	Acarbose	CDs
0.078	22.12 \pm 10.70 ^a	2.31 \pm 1.18 ^a
0.156	34.44 \pm 6.74 ^{ab}	12.38 \pm 3.36 ^b
0.313	47.58 \pm 11.71 ^{bc}	34.41 \pm 2.94 ^c
0.625	62.12 \pm 10.47 ^{cd}	64.88 \pm 9.38 ^d
1.250	72.84 \pm 9.60 ^{de}	84.94 \pm 3.10 ^e
2.500	82.67 \pm 4.49 ^e	89.24 \pm 1.67 ^e
F	18.600	203.837
P	0.000	0.000

注: 多组间两两比较, 符号完全不同表示 $P < 0.05$ 。

2.4 CDs 体内降血糖活性 参考文献 [6 - 7], 大鼠适应性喂养 1 周, 随机分成两组, 空白组 (Control) 10 只, 给予普通饲料喂养。模型组 30 只, 给予高脂饲料喂养。4 周后, 模型组禁食过夜, 腹腔注射 STZ (35 mg /kg, STZ 溶于 0.05 mol /L 柠檬酸缓冲液)。血糖稳定 1 周后, 检测造模大鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 以 FBG >11.1 mmol /L 为糖尿病模型建造成功。统计成模 24 只, 随机等分成 3 组, 每组 8 只, 分别为模型对照组 (Model)、Acarbose 组 (200 mg /kg)、CDs 组 (200 mg /kg)。所有大鼠口服灌胃给药, 每天 1 次, 连续 6 周, 给药治疗后每周剪尾采血, 监测血糖, 连续测 6 周。结果如表 2, 经过 6 周治疗后, CDs 组与模型对照组对比血糖下降为 14.12 mmol /L, 低于模型组的 16.26 mmol /L, 其中 Acarbose 组血糖为 13.41 mmol /L。初步表明 CDs 在体内具有一定的降血糖活性, 其降低血糖的机制可能与抑制 α -葡萄糖苷酶活性有关^[6]。

表 2 各组 CDs 降大鼠血糖活性

Group	Dose / (mg/kg)	FBG / (mmol/L)	
		0 week	6 week
Control	-	5.04 ± 0.42 ^a	4.85 ± 0.45 ^a
Model	-	16.95 ± 2.07 ^b	16.26 ± 1.09 ^b
Acarbose	200	17.35 ± 2.70 ^b	13.41 ± 1.83 ^b
CDs	200	17.10 ± 2.55 ^b	14.12 ± 1.37 ^c
F		64.279	122.125
P		0.000	0.000

注: 多组间两两比较, 符号不同表示 $P < 0.05$ 。

3 讨论

本文以牛蒡多糖和枸橼酸为碳源, 高温反应得到荧光 CDs, 通过体外 α -葡萄糖苷酶抑制试验来研究其降血糖活性, 体外抑制试验结果表明 CDs 浓度达到 2.5 mg/mL 时, 抑制率达 89.24% 以上, 表明该 CDs 具有较强的葡萄糖苷酶抑制活性; 体内试验在治疗 42 d 后, 模型对照组血糖为 16.26 mmol /L, 高于 CDs 组血糖 (14.12 mmol /L), 其中 Acarbose 组血糖为 13.41 mmol /L, 初步显示 CDs 能降低 DM 大鼠的血糖水平, 为进一步研究其体内降血糖活性及

机制奠定了基础。

【参考文献】

[1] 汪会琴, 胡如英, 武海滨. 2 型糖尿病报告发病率研究进展 [J]. 浙江预防医学, 2016, 28(1): 37 - 39.

[2] 侯小涛, 何耀涛, 杜正彩, 等. 降糖植物多糖来源及其降糖活性研究 [J]. 食品与药品, 2017, 35(2): 358 - 360.

[3] 魏东. 牛蒡抗氧化降血脂保健功能研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(2): 380 - 383.

[4] 陈世雄, 陈靠山. 牛蒡根化学成分及活性研究进展 [J]. 食品与药品, 2010, 12(7): 281 - 284.

[5] 张悦, 张锋. 牛蒡中水溶性膳食纤维的提取研究 [J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(3): 79 - 82.

[6] 王佳佳, 刘玮, 朱静, 等. 牛蒡多糖的降血糖活性 [J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(5): 455 - 459.

[7] 畅桀, 王宏伟, 何忠梅, 等. 植物乳杆菌 Sc52 联合牛蒡低聚果糖对 2 型糖尿病模型小鼠的治疗作用 [J]. 食品科学, 2015, 36(21): 214 - 220.

[8] LI HT, KANG ZH, LIU Y, *et al.* Carbon nanodots: synthesis, properties and applications [J]. J Mater Chem, 2012, 22: 24230.

[9] CHEN B, LI F, LI S, *et al.* Large scale synthesis of photoluminescent carbon nanodots and their application for bioimaging [J]. Nanoscale, 2013, 5: 1967 - 1971.

[10] SHAO TL, WANG GD, AN XT, *et al.* A reformative oxidation strategy using high concentration nitric acid for enhancing the emission performance of graphene quantum dots [J]. RSC Advances, 2014, 4: 47977 - 47981.

[11] SHAO TL, ZHANG P, TANG L, *et al.* Highly sensitive enzymatic determination of urea based on the pH-dependence of the fluorescence of graphene quantum dots [J]. Microchimica Acta, 2015, 182: 1431 - 1437.

[12] 郝林华, 陈磊, 陈靠山, 等. 牛蒡寡糖的理化性质及结构研究 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(6): 1 - 7.

[13] FU YL. Isolation, purification and structural elucidation of a fructan from *Arctium lappa* L [J]. J Med plants Res, 2009, 3(2): 171 - 173.

[14] YE XP, SONG CQ, YUAN P, *et al.* α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of common constituents from traditional Chinese medicine used for diabetes mellitus [J]. Chin J Nat Med, 2010, 8(5): 349 - 352.

[15] LIU L, DESEO MA, MORRIS C, *et al.* Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of wheat bran and germ [J]. Food Chem, 2011, 126(2): 553 - 561.

[16] LI T, ZHANG XD, SONG YW, *et al.* A microplate-based screening method for alpha-glucosidase inhibitors [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2005, 10(10): 123 - 126.