

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.23.016

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)23-0076-05



基于活性成分和 α -葡萄糖苷酶抑制作用的组织培养 牡荆遗传稳定性评价*

周梅¹, 孟雪², 薛建平², 段永波², 赵丰兰^{2△}

(1. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230001; 2. 淮北师范大学生命科学学院·安徽省特色资源植物
利用工程实验室, 安徽 淮北 235000)

摘要:目的 评价组织培养牡荆的遗传稳定性。方法 考察4种溶剂对牡荆叶总黄酮的提取效果; 采用高效液相色谱(HPLC)法测定牡荆素含量, 并测试牡荆叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及动力学曲线。结果 不同溶剂对牡荆叶活性成分提取率从高到低依次为酸性乙醇(pH 1.33)、70%乙醇溶液、丙酮、乙酸乙酯。以酸性乙醇(pH 1.33)为溶剂的组织培养和野生牡荆叶中总黄酮含量以鲜重计分别为62.79 mg/g和60.35 mg/g, 牡荆素含量以鲜重计分别为132.20 μ g/g和126.12 μ g/g, 提取物对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度(IC_{50})分别为1.41 mg/mL和1.37 mg/mL。动力学曲线分析表明, 组织培养和野生牡荆叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型均为可逆性抑制。结论 牡荆叶提取物对 α -葡萄糖苷酶有较强抑制作用, 且组织培养和野生牡荆叶活性成分相当, 组织培养牡荆遗传稳定性较好。

关键词: 牡荆; 牡荆素; 总黄酮; α -葡萄糖苷酶; 抑制作用

Evaluation of Genetic Stability of Tissue - Cultured *Vitex Negundo* Folium Based on Active Ingredients and Its Inhibitory Effect Against α - Glucosidase

ZHOU Mei¹, MENG Xue², XUE Jianping², DUAN Yongbo², ZHAO Fenglan²

(1. Anhui Institute of Food and Drug Inspection, Hefei, Anhui, China 230001; 2. College of Life Sciences, HuaiBei Normal University · Anhui Provincial
Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Featured Resource Plants, HuaiBei, Anhui, China 235000)

Abstract: Objective To evaluate the genetic stability of tissue - cultured *Vitex Negundo* Folium. **Methods** The extraction effects of four solvents on the total flavonoids from *Vitex Negundo* Folium were investigated. High - performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of vitexin, and the inhibitory effect of the extract of *Vitex Negundo* Folium on α - glucosidase and the kinetic curve of vitexin were tested. **Results** The extraction rates of active ingredients from *Vitex Negundo* Folium by different solvents were as follows: acidic ethanol (pH 1.33) > 70% ethanol > acetone > ethyl acetate. In the tissue - cultured and wild *Vitex Negundo* Folium, the total flavonoid contents extracted with acidic ethanol as solvent were 62.79 mg/g and 60.35 mg/g (calculated by fresh weight), respectively; the vitexin contents were 132.20 μ g/g and 126.12 μ g/g (calculated by fresh weight), respectively; the 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of the extract on α - glucosidase were 1.41 mg/mL and 1.37 mg/mL, respectively. The kinetic curve analysis showed that the inhibitory type of the extracts from tissue - cultured and wild *Vitex Negundo* Folium on α - glucosidase was reversible inhibition. **Conclusion** The extract of *Vitex Negundo* Folium has a strong inhibitory effect on α - glucosidase, and the active ingredients of tissue - cultured and wild *Vitex Negundo* Folium are similar, indicating that tissue - cultured *Vitex Negundo* Folium has good genetic stability.

Key words: *Vitex Negundo* Folium; vitexin; total flavonoids; α - glucosidase; inhibitory effect

糖尿病为全球三大慢性病之一,近年来发病率呈增长趋势^[1],严重影响患者的生活质量及健康。糖尿病分为1型和2型,其中2型糖尿病患者占比超过95%^[2],患者需长期依赖降糖药。 α -葡萄糖苷酶是糖尿病药物筛选时的重要靶标^[3],是水解葡萄糖苷键释放的葡萄糖关键酶。阿卡波糖作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的常用药物,作用温和而持久,但存在不良反应^[4],故从植物源中挖掘新型糖尿病治疗药物成为研究热点^[5]。牡荆 *Vitex negundo* var.

cannabifolia 为马鞭草科牡荆属药用植物,以叶入药,具有抑菌、抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗氧化等活性^[6]。牡荆叶中典型的活性成分为牡荆素,具有较强的抗糖尿病活性^[7]。牡荆主要为野生资源,未开展广泛的人工标准化种植,牡荆素多从其他来源植物中提取而得^[8],故开展牡荆组织培养并进行全面评价对于牡荆的规模化和标准化种植意义重大。李旭群等^[9]对牡荆组织培养进行了相关研究;本课题组孟雪^[10]也以未萌发腋芽为外植体建立了牡荆高效再生

*基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目[KJ2021A0533]。

第一作者:周梅,女,硕士,副教授,研究方向为药代动力学,(电子信箱)tinyzz97@163.com。

△通信作者:赵丰兰,女,硕士,高级实验师,研究方向为药用植物学,(电子信箱)zhaofenglan2004@163.com。

体系,但基于活性成分的遗传稳定性评价尚未开展。本研究中比较了不同溶剂对组织培养牡荊叶活性成分提取的影响,并分析了提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,以评价组织培养牡荊的遗传稳定性,为开发抗糖尿病药物提供参考,同时为组织培养牡荊的规模化种植提供科学支撑。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Dionex U3000 型液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);KQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz);JA2003 型电子天平(上海菁海仪器有限公司,精度为 0.1 mg);紫外-可见分光光度计(上海联通仪器有限公司);CW-2000 型超声-微波协同萃取仪(上海新拓微波溶样测试技术有限公司,功率为 900 W,频率为 50 kHz);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试剂

对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG,梯希爱<上海>化成工业发展有限公司,批号为 wkq20071504,纯度为 98%); α -葡萄糖苷酶(批号为 G5003,纯度为 98%),芦丁(批号为 100080-201811,纯度为 92.6%),均购自索莱宝生物科技有限公司;牡荊素对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为 111687-201704,纯度为 98%);磷酸盐缓冲液(PBS)、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

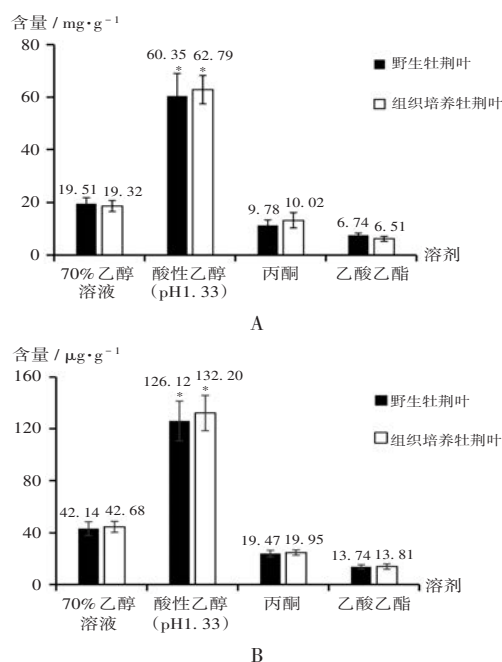
2.1 总黄酮提取与含量测定

以野生牡荊和本课题组前期获得的组织培养苗移栽 5 个月的牡荊植株叶片为试验样品(批号为 2021011)。取野生和组织培养牡荊叶适量研磨成粉,取 1 g,分别用乙酸乙酯、酸性乙醇(pH 1.33)、70%乙醇溶液、丙酮于超声微波萃取仪萃取,真空干燥离心机抽滤,即得牡荊叶提取物。以芦丁为对照制作标准曲线,测定总黄酮含量^[11]。取芦丁制成质量浓度分别为 200, 400, 600, 800, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液,于 510 nm 波长处测定吸光度值(A_{510})。以 $A_{510}(X)$ 为横坐标、芦丁质量浓度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 164.21X - 12.82$ ($R^2 = 0.9916, n = 5$)。取牡荊叶提取物,用甲醇溶解,测定 A_{510} ,按标准曲线换算成黄酮含量 [mg/g (以鲜重计)]。结果见图 1 A。

2.2 高效液相色谱(HPLC)法测定牡荊素含量

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:518905-902 Agilent HC-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(B)-0.1% 甲酸水溶液(A),梯度洗脱(0~30 min 时 60%B, 30~35 min 时



注:与其他溶剂比较,* $P < 0.05$ 。图 3 同。

A. 总黄酮 B. 牡荊素

图 1 野生和组织培养牡荊叶中总黄酮和牡荊素含量

Note: Compared with those extracted with other solvents, * $P < 0.05$

(for Fig. 1 and Fig. 3).

A. Total flavonoids B. Vitexin

Fig. 1 Content of total flavonoids and vitexin in wild and tissue-cultured *Vitis Negundo* Folium

60%B → 100%B, 35~37 min 时 100%B → 10%B, 37~42 min 时 10%B);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。每次进样前用初始流动相平衡 10 min。在此色谱条件下,牡荊素色谱峰与样品中其他成分的色谱峰分离度均大于 1.5,理论板数按牡荊素峰计不低于 5 000。色谱图见图 2。

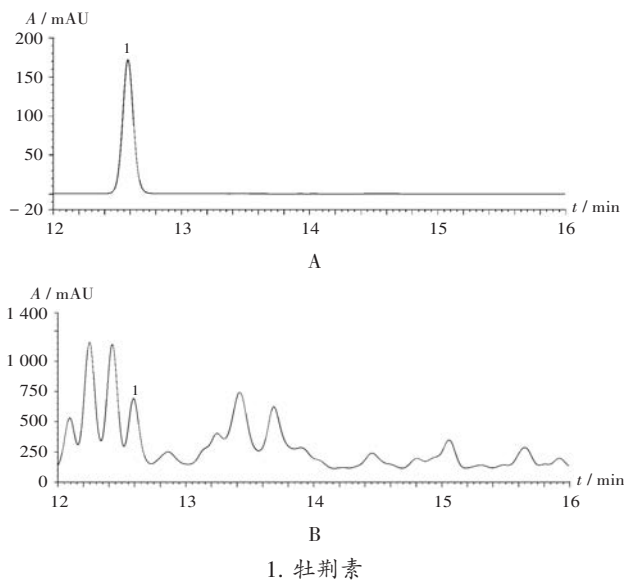
2.2.2 溶液制备

取牡荊素对照品 2.50 mg,精密称定,用甲醇溶解并定容于 25 mL 容量瓶中,配成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的牡荊素贮备液,用甲醇梯度稀释得质量浓度分别为 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照品溶液。取牡荊叶提取物,用甲醇溶解,溶液经 0.22 μm 滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取 2.2.2 项下系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以牡荊素质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.2153X + 0.02418$ ($R^2 = 0.9984, n = 5$)。结果表明,牡荊素质量浓度在 20~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取 2.2.2 项下质量浓度为 20, 60, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液各适量,按 2.2.1 项下色



1. 牡荆素
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液
图2 高效液相色谱图
1. Vitexin
A. Reference solution B. Test solution
Fig. 2 HPLC chromatograms

谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果的RSD分别为0.97%,1.14%,1.05%($n=5$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为2021011)样品6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算牡荆素含量。结果牡荆素含量的RSD为0.45%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为2021001)样品适量,依法制备供试品溶液,分别于室温放置0,2,4,6,12,24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.17%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(批号为2021011)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,分别加入相当于供试品溶液中牡荆素含量50%,100%,150%的牡荆素对照品,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果平均回收率为99.72%,RSD为1.21%($n=9$),表明方法准确性良好。

2.2.4 组织培养和野生牡荆叶的牡荆素含量测定

取2.1项下不同溶剂牡荆叶提取物适量,用甲醇溶解,制成质量浓度为0.1 mg/mL的供试品溶液,经13 000 g离心10 min后取上清液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算牡荆素含量。结果不同溶剂对牡荆活性成分提取效果的影响依次为酸性乙醇(pH 1.33) > 70%乙醇溶液 > 丙酮 > 乙酸乙酯。详见图1B。

2.3 α -葡萄糖苷酶活性抑制试验

参照林海生等^[12]的试验方法,在450 μ L 0.1 mol/L PBS(pH = 6.8)中加50 μ L α -葡萄糖苷酶(0.1 U/mL)

和各溶剂牡荆叶提取物(1.82 mg/mL),37 $^{\circ}$ C保温10 min,加入50 μ L质量浓度为3 mg/mL的pNPG溶液,混匀,37 $^{\circ}$ C反应20 min,加入800 μ L(0.1 mol/L) Na_2CO_3 溶液终止反应,测定405 nm波长处吸光度(A_{405})。按公式抑制率(%) = $1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$ 计算抑制率。式中, $A_{\text{样品}}$ 为样品组吸光度值(样品 + 酶 + pNPG); $A_{\text{样品空白}}$ 为样品空白组吸光度值(样品 + PBS + pNPG); $A_{\text{对照}}$ 为对照组吸光度值(PBS + 酶 + pNPG); $A_{\text{空白}}$ 为空白组吸光度值(PBS + PBS + pNPG)。

当野生和组织培养牡荆叶提取物质量浓度为1.82 mg/mL时,酸性乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率显著高于其他3种溶剂提取物,且抑制率与各溶剂所提取总黄酮含量变化趋势一致,表明黄酮是牡荆抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性物质。详见图3。

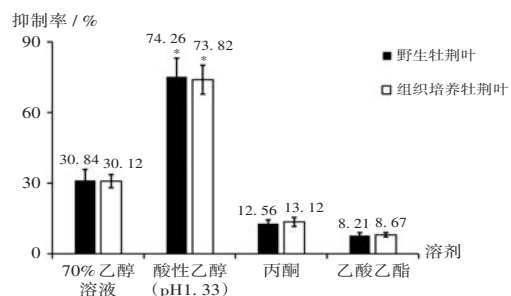


图3 不同溶剂提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响
Fig. 3 Effect of extracts extracted with different solvents on inhibitory rate against α -glucosidase

将抑制效果最好的组织培养和野生牡荆叶酸性乙醇(pH 1.33)提取物稀释成质量浓度分别为1.32, 1.36, 1.40, 1.44 mg/mL,按上述方法反应,并测定 A_{450} ,绘制抑制率曲线,计算半数抑制浓度(IC_{50})。根据测试提取物浓度,反应后测定吸光度,计算抑制率。得抑制率对野生牡荆叶总黄酮质量浓度的拟合曲线为 $Y_{\text{野}} = 0.0730 X_{\text{野}} + 0.3995$ ($R^2 = 0.9824$),以抑制率为50%计算得 IC_{50} 为1.37 mg/mL;组织培养牡荆叶拟合曲线为 $Y_{\text{组}} = 0.0991 X_{\text{组}} + 0.3611$ ($R^2 = 0.9847$),以抑制率为50%计算得 IC_{50} 为1.41 mg/mL。结果表明,组织培养与野生牡荆叶对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制作用相当。

2.4 牡荆叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学研究

制备质量浓度为1.44 mg/mL的酸性乙醇(pH 1.33)提取物,与20,40,60,80,100 mg/L α -葡萄糖苷酶反应,按2.3项下方法测定吸光度,以不添加(0 mg/mL)提取物为对照组,计算反应速率。以 α -葡萄糖苷酶质量浓度为横坐标(X , mg/mL)、抑制速率[Y ,以每分钟405 nm波长处的光密度变化值(ΔOD_{405})]为纵坐标,确定牡荆叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学曲线和抑制类型。结果见图4。可见,野生和组织培养牡荆叶提取物抑制速率均通过原点,表明其对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型均为可逆性抑制。

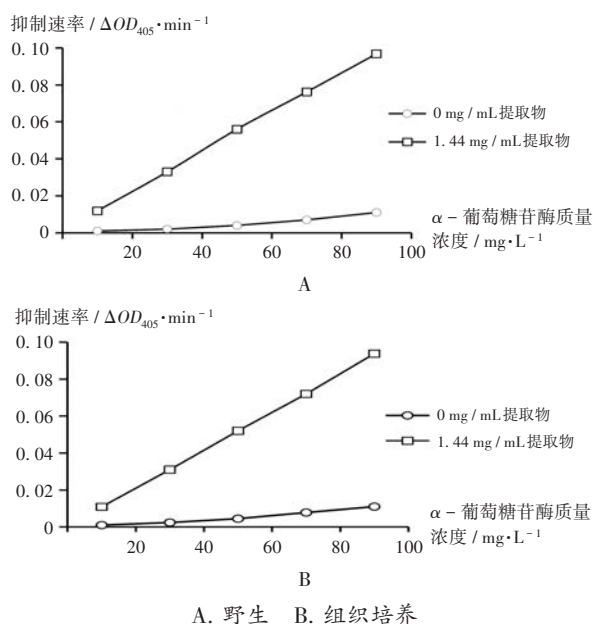


图4 牡荆叶提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制动力学曲线

A. Wild *Vitis Negundo Folium* B. Tissue - cultured *Vitis Negundo Folium*

Fig. 4 Kinetic curves of extracts from *Vitis Negundo Folium* inhibiting α - glucosidase

3 讨论

组织培养是植物脱毒复壮的重要途径,也是实现药用植物标准化种植的必要技术^[13]。不同组织培养条件下再生苗可能出现一定变异,故组织培养苗需进行遗传稳定性分析。关于组织培养苗的稳定性评价多集中在DNA水平^[14-15],从代谢水平深入评价其稳定性对于组织培养苗的大规模种植十分重要^[16-17]。本研究在前期建立的牡荆组织培养体系基础上,基于活性成分和对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用对组织培养牡荆进行了遗传稳定性评价。

溶剂是决定不同植物活性成分的提取率的重要因素之一。本研究中比较了4种溶剂对牡荆叶总黄酮成分的提取效果,结果显示,酸性乙醇(pH 1.33)为牡荆叶总黄酮提取的最佳试剂,所提取的野生和组织培养牡荆中,总黄酮和牡荆素含量均远超其他3种溶剂,与文献^[18]的研究结果一致。表明酸性乙醇(pH 1.33)作为溶剂能实现牡荆活性成分的高效提取与分离,可为后期研究牡荆活性成分的规模化提取方法提供参考。

作为牡荆主要的黄酮成分之一,牡荆素在预防和治疗多种疾病方面都有重要作用^[19-20],其可作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂用于糖尿病治疗^[21]。体外酶活抑制试验不涉及大鼠等模型动物的使用,仅在合适温度条件下即可完成活性测定,为酶活力分析提供了一种简易方法。因此,本研究中采用体外酶活抑制试验考察提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率,比较组织培养与野生牡荆的差异,评价组织培养牡荆的遗传稳定性。结果显示,以酸性乙醇(pH 1.33)为溶剂的牡荆叶提取物对

α -葡萄糖苷酶表现出良好的抑制效果,组织培养与野生牡荆叶的 IC_{50} 分别为1.41 mg/mL和1.37 mg/mL,表明组织培养与野生牡荆叶对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用相当。牡荆叶提取物对体外 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 IC_{50} 低于药用植物红景天^[21],故进一步分析了牡荆叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制特征。结果显示,其抑制类型为可逆性抑制,表明牡荆叶提取物是通过非共价键与 α -葡萄糖苷酶分子结合而抑制其活性的,临床治疗中可用简单方法去除抑制剂而恢复 α -葡萄糖苷酶活性^[22]。可见,牡荆具有深入开发为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的潜力,为糖尿病的治疗提供新方法。

综上所述,组织培养牡荆遗传稳定性较高,在组织培养过程中未发生实质性的遗传变异;体外 α -葡萄糖苷酶活性抑制试验可作为牡荆遗传稳定性评价的简易方法,为牡荆组织培养苗的标准化种植提供理论和技术基础。

参考文献

- [1] 金苓莉,李修英,孔利萍,等. 老年2型糖尿病患者病耻感及影响因素研究[J]. 全科医学临床与教育,2022,20(8):745-747.
- [2] 柯敏,何仁忠,刘少华. 基于临床照护计划理念的2型糖尿病药学监护实践[J]. 中国药业,2023,32(2):119-121.
- [3] 姜丽丽,尹航,闫明睿,等. 天然芪类化合物及其抗 α -葡萄糖苷酶活性的研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2021,35(2):116-124.
- [4] 陈平. 伏格列波糖片与阿卡波糖片治疗2型糖尿病的疗效及副作用比较[J]. 中国现代医生,2012,50(14):73-74.
- [5] 晏英,王丹,张雄,等. 垫状卷柏和夏枯草提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用研究[J]. 山地农业生物学报,2022,41(5):35-42.
- [6] 舒柄焱,彭新宇,魏文康,等. 牡荆的化学成分及药理作用研究进展[J]. 动物医学进展,2020,41(5):105-110.
- [7] 张泽鹏,徐兴军,刘佳人,等. 牡荆素对1型糖尿病小鼠体内抗氧化酶活性及相关基因表达的影响[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(4):623-629.
- [8] 顾成波,蔡曼,袁肖寒,等. 牡荆的植物资源及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(3):382-389.
- [9] 李旭群,李曦,石小聪,等. 穗花牡荆的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2009,45(11):1104.
- [10] 孟雪. 牡荆再生体系的建立及其提取物对乳腺癌细胞的影响[D]. 淮北:淮北师范大学,2021.
- [11] ZHAO FL,ZHANG WJ,MENG X,et al. Antioxidant and antimicrobial properties of *Isodon amethystoides* (Benth.) CY Wu et Hsuan leaf extracts against agriculturally important pathogenic fungi[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment,2019,33:1690-1697.
- [12] 林海生,饶梦微,秦小明,等. 红江橙果皮黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用[J]. 现代食品科技,2023,39(5):1-8.
- [13] 蔡时可,李静宇,梅瑜,等. 中草药脱毒技术研究进展[J]. 广东农业科学,2021,48(12):151-161.