DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.028
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
578 2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0578-04

论著

薏苡仁多糖的分离提取及其降血糖作用的研究

徐梓辉,周世文,黄林清 (第三军医大学附属新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 从薏苡仁中分离提取薏苡仁多糖(Coixan),并观察其对多种模型小鼠血糖水平的影响。方法 ①采用热水提取、低温减压浓缩、三氯醋酸法去蛋白、流水透析、Sephadex G-75柱层析等方法。②采用四氧嘧啶、肾上腺素尾静脉注射建立高血糖小鼠模型,尾静脉取血,血糖仪测定血糖水平。结果 ①被提取的薏苡仁多糖是鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成,分子量约为 1.5×10^4,产率为0.125%;②口服给予Coixan对正常小鼠无明显降血糖作用;腹腔给予Coxian剂量在50 mg/kg和100 mg/kg时,能降低正常小鼠、四氧嘧啶糖尿病模型小鼠和肾上腺素高血糖小鼠的血糖水平($P<0.05$ & $P<0.01$)。且呈现一定的量效关系。结论 薏苡仁多糖对正常及高血糖模型小鼠均有降血糖作用,其降血糖作用与给药途径有关。

关键词:薏苡仁多糖;糖尿病模型;降血糖作用
中图法分类号:R284.2;R285 文献标识码:A

Extraction and hypoglycemic action of a polysaccharide from the seeds of coix lacchryma-jobi var, ma-yuen

XU Zi-hui, ZHOU Shi-wen, HUANG Lin-qing (Base of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the method of extraction of coixan, a polysaccharide from the seeds of coix lacchryma-jobi var, ma-yuen and its hypoglycemic action in mice. Methods ①The dried coix seeds were extracted with hot water and the extract was concentrated under lower pressure to get the crude coixan. Its protein content was removed with trichloracetic acid (TCA). Then the crude coixan was dialyzed with cellulose tubings against flowing water for 7 d and chromatographed over sephadex G-75 with a column of (0—1)mol/L NaCl to obtain purified coixan. ②The model of diabetes mellitus was established with alloxan injection through the tail vein in mice and the mode of hyperglycemia with adrenaline injection in mice too. Blood samples were collected with tail vein puncture to determine blood glucose level. Results ①Refined coixan of 0.125% yielding consisted of rhamonse, arabinose, mannose, galactose and glucose with an estimated molecular weight of 1.5×10^4. ②Oral administration of coixan to normal mice showed no obvious action to decrease blood glucose level. Peritoneal administration of coixan in the dosage from 50 to 100 mg/kg was able to decrease blood glucose level significantly in normal mice, diabetic and hyperglycemic mice ($P<0.05$ to $P<0.01$) in dosage-dependent manner. Conclusion Coixan is able to decrease the blood glucose level in normal, diabetic and hyperglycemic mice and its hypoglycemic action is determined by the route of administration.

Key words: coixan; diabetes model; hypoglycemic action

薏苡仁为禾本科植物薏苡(Coix lachrgma-jobi var ma-yuen)的种仁。据载具有"温气主消渴"作用,为中医学临床上治疗"消渴"(糖尿病)常用药物之一[1]。(日)Takahashi M等对其水溶性提取物的实验研究中,发现薏苡仁多糖(Coixan)有显著降血糖作用[2]。然而目前对其降血糖作用机制尚缺乏全面深入的研究,国内还未见Coixan的研究报道。因此,我们就Coixan的分离提取、理化性质及药理活性进行了探讨,现报告如下。

作者简介:徐梓辉(1969—),男,湖南省岳阳市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事植物多糖降血糖作用方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68755311

收稿日期:1999-08-10;修回日期:2000-03-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料

1.1　药品与试剂

薏苡仁由重庆市药材公司提供(由我院副主任药师葛勤鉴定), Sephadex G-75, 蓝色葡聚糖为 Sigma 公司产品, 四氧嘧啶(Alloxan)购自 Fluka 公司。

1.2　动物

昆明种小白鼠, 雄性, 体重(20±2)g, 由第三军医大学实验动物中心提供。

2　方法与结果

2.1　Coixan 的提取和纯化

称取薏苡仁 10.0 kg 加热水(60°C)30 L 抽提 12 h, 滤干后再次加入同一温度热水 30 L, 提取 12 h, 将所得抽提液混合减压浓缩脱水, 得黄色粗提物。将粗提物用蒸馏水溶解, 加入等体积 15% 三氯醋酸(TCA)振荡 10 h, 使蛋白质与 TCA 作用生成凝胶物, 3 000 r/min 离心 20 min 去沉淀, 将上清液装入透析袋中, 流水透析 7 d, 透析液中逐渐加入 1 倍量的 95% 乙醇沉淀, 将沉淀物相继用丙酮和乙醚洗涤, 真空干燥, 再将多糖用蒸馏水溶解, 经 Sephadex G-75 柱层析, 用 0～1 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 硫酸-苯酚法[3]鉴定多糖部分, 合并多糖反应阳性部分, 用蒸馏水透析 3 d, 减压浓缩, 得白色多糖精品, 产率为 0.125%。

2.2　Coixan 的理化性质鉴定

2.2.1　Fehling's 反应[4]　称取 Coixan、薏苡仁多糖粗提物、葡萄糖、蔗糖各 10 mg 分装于 1、2、3、4 试管中, 每管加入双蒸水 8 ml, 摇匀, 让其充分溶解, 在 1、2 试管中加入 12 mol/L HCl 2 ml 后, 放入沸水浴中加热 30 min, 取出试管加入 NaOH 溶液中和至碱性, 再向 1、2 试管中各加入新配制的费林试剂 2 ml 摇匀后, 放入沸水浴中再加热约 3 min 后, 见有红色沉淀产生。向试管 3、4 中各加入新配制的费林试剂 2 ml, 摇匀后再放入沸水浴中加热约 2 min, 试管 3 出现大量的红棕色沉淀, 5 min 后试管 4 出现少量红棕色沉淀。

2.2.2　酸水解纸层析(PPC)[5]　采用杭州新华滤纸厂产慢速定性层析滤纸(III)(10 cm×15 cm), 正丁醇-吡啶-水(6∶4∶3)作溶剂系统, 取 Coixan 5 mg 用 2 N H_2SO_4 2 ml 封管在 100°C 水解 3 h, 用各种标准单糖作对照, 点样后滤纸置于层析缸中饱和 1 h, 室温展开约 16 h, 取出干燥后, 再重复展开 1 次, 硝酸银一氢氧化钠试剂显色, 5% 硫代硫酸钠溶液褪色, 样品斑点呈褐色, 显示含有鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖。

2.2.3　分子量测定[6]　采用凝胶过滤法测定分子量, 根据 Kosenko 认为分子量小于 5 万的多糖可采用 Sephadex G-75 柱层析计算法。将充分溶胀好的 Sephadex G-75 湿法装柱, 用 0.5 mol/L NaCl 溶液进行平衡, 然后将待测 Coixan 水溶液上柱, 同一离子强度的水溶液洗脱, 苯酚-硫酸法测定求得洗脱体积 Ve, 然后再将蓝色葡聚糖(MN＞200 万)上同一柱, 求出柱之空体积 V_o, 代入公式 $M^{1/3}=65.45[1.56-(Ve/Vo)^{1/3}]$, 得薏苡仁多糖分子量约为 1.5×10^4。

2.3　降血糖活性测定

2.3.1　Coixan 对正常小鼠血糖水平的影响　取正常小鼠 50 只, 随机分 5 组, 每组 10 只, 给药组分别按要求 i.g 100 mg/kg 和 200 mg/kg 以及 i.p 50 mg/kg 和 100 mg/kg Coixan, 对照组予等体积生理盐水, 给药后 0、2、7 h 尾静脉采血, 用葡萄糖氧化酶法测定血糖水平, 实验期间小鼠禁食 12 h, 自由饮水。结果显示: 口服给予 Coixan 剂量在 100 mg/kg 和 200 mg/kg 时, 对正常小鼠无明显影响, 而腹腔给药剂量在 50 mg/kg 和 100 mg/kg 时, 均有显著的降血糖作用, 且降低的程度呈剂量依赖性, 见表 1。

表 1　薏苡仁多糖对正常小鼠血糖水平的影响($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 1　Effect of Coixan on blood glucose level in normal mice($\bar{x}\pm s$, %)

Group	Dose(mg/kg)	n	Relative blood glucose level		
			0	2 h	7 h
Control		10	100	95.2±9.15	88.8±9.47
Coixan	100　i.g	10	100	93.5±11.12	86.5±10.34
Coixan	200　i.g	10	100	91.6±10.37	83.6±9.89
Coixan	50　i.P	10	100	86.7±9.63 *	66.8±9.52 **
Coixan	100　i.p	10	100	68.3±8.12 **	47.6±9.41 **

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* control

2.3.2　Coixan 对四氧嘧啶糖尿病模型小鼠血糖水平的影响　将小鼠禁食 48 h 后, 四氧嘧啶 70 mg/kg(临用前用生理盐水配制)尾静脉一次性注射建立模型[7], 对照组给予同样体积的生理盐水, 72 h 后选取血糖＞10 mmol/L 作为糖尿病模型小鼠, 取糖尿病模型小鼠 30 只, 随机均分为 3 组, 另取 10 只正常小鼠作对照, 分别按要求 i.p 50 mg/kg 和 100 mg/kg Coixan, 正常对照组和模型对照组则给予等体积的生理盐水, 给药后 0、2、7、24 h 尾静脉取血测血糖。结果显示腹腔注射 Coixan 在剂量 50 mg/kg 和 100 mg/kg 时, 对四氧嘧啶糖尿病模型小鼠均有明显的降血糖作用。虽高于正常对照组, 但与模型对照组相比, 2、7 h 血糖值可下降 20%～40%, 见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 薏苡仁多糖对四氧嘧啶诱导的高血糖小鼠血糖水平的影响(C_B/ mmol·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 2 Effect of Coixan on blood glucose level in alloxan-induced hyperglycemic mice(C_B/ mmol·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	Dose(mg/kg i.p)	0	2 h	7 h	24 h
Normal	Saline	5.93±0.98	5.74±0.64	4.93±0.61	3.67±1.57
Control	Saline	17.86±3.97**	17.75±3.21**	15.62±3.54**	13.52±3.91**
Coixan	50	19.14±3.68**	16.70±2.89**▲	12.41±2.72**▲	11.26±3.19**▲
Coixan	100	18.09±3.17**	14.80±2.51**▲	9.27±2.33**▲▲	9.16±2.78**▲▲

**: $P<0.01$ vs N, ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ vs C

2.3.3 Coixan 对肾上腺素致小鼠高血糖水平的影响 取正常小鼠40只, 禁食12 h后, 随机分为4组, 每组10只, 用药组i.p Coixan(50, 100 mg/kg), 模型对照组和空白对照组给予同体积生理盐水, 给药3 h后, 用药组、模型对照组i.p肾上腺素(20 μg/kg), 30 min后取血测血糖。结果显示: Coixan在剂量50 mg/kg和100 mg/kg时, 能够明显抑制肾上腺素导致的小鼠高血糖, 见表3。

表3 薏苡仁多糖对肾上腺素高血糖小鼠血糖水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 3 Effect of Coixan on blood glucose level in adrenaline hyperglycemic mice($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Groups	Dose (mg/kg i.p)	Adr (μg/kg i.p)	Blood glucose level(C_B/ mmol·L^{-1},)
Normal	Saline		5.63±0.61
Control	Saline	20	10.6±1.81**
Coixan	50	20	7.62±0.69▲
Coixan	100	20	6.83±0.83▲▲

**: $P<0.01$ vs N, ▲: $P<0.05$ vs C, ▲▲: $P<0.01$ vs C

3 讨论

薏苡仁作为常用的中药已有一千多年的历史了[1]。现代早期药理研究证明它有解热、镇静、镇痛作用, 嗣后发现薏苡仁还有增强免疫、抗肿瘤、降血糖、血钙等重要作用[8]。我们在预试验中发现薏苡仁的水提物有明显降低正常小鼠血糖的作用, 在此基础上我们从中进一步分离提取出Coixan, 并探讨了Coixan降血糖活性。结果显示口服给予薏苡仁多糖剂量在100 mg/kg和200 mg/kg时无明显的降血糖作用, 据分析可能由于多糖口服后被消化酶水解成小分子单糖或寡糖而失去活性。而腹腔给药在剂量50 mg/kg和100 mg/kg时, Coixan有降低正常小鼠血糖作用。有研究表明[9]植物多糖能够促进胰岛分泌胰岛素; 影响糖代谢酶的活性; 促使外周组织对葡萄糖的利用; 抑制糖异生。Coixan的降血糖作用可能与其中的一种或几种作用有关。

一般认为降血糖药的作用机制主要涉及以下两方面[10]: 一方面是促进胰岛素的分泌或释放; 另一方面是影响胰岛素受体后糖代谢的某些环节, 主要是抑制肝脏的糖异生作用。我们利用四氧嘧啶选择性破坏胰岛β细胞建立糖尿病小鼠模型, 结果发现Coixan能降低四氧嘧啶糖尿病小鼠的高血糖, 高剂量组下降的幅度大于低剂量组, 呈现一定的量效关系。因此我们推测Coixan的降血糖活性主要是通过影响胰岛素受体后糖代谢的某些环节而起作用的。

肾上腺素作为影响血糖水平的重要激素之一, 它能促进肝糖原分解, 肌糖原酵解, 加速糖异生, 从而升高血糖[11]。我们试验发现, Coixan在剂量50 mg/kg和100 mg/kg能够显著抑制肾上腺素引起的小鼠血糖升高, 因此可以推测Coixan可能有抑制肝糖原分解、肌糖原酵解, 抑制糖异生作用, 从而达到使血糖水平降低的目的(我们在随后的研究中证示了这点, 结果另文发表)。

参考文献:

[1] 江苏新医学院 编. 中药大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 2 646.

[2] Takahashi M, Konno C, Hikino H. Isolation and hypoglycemic of coixan A, B and C, glycans of coix lachryma-jobi var, ma-yuen seeds[J]. Planta medica, 1986, 53(2): 64—65.

[3] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al*. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28(3): 350—354.

[4] 肖崇厚 编. 中药提取鉴定原理[M]. 第2版. 上海: 上海科技出版社, 1996. 24—25.

[5] 上海药物研究所. 中草药有效成份的提取和分离[M]. 第2版. 上海: 上海科技出版社, 1997. 14.

[6] 中国医学科学院药物研究所 编. 中草药有效成份的研究: 提取、分离、鉴定和含量测定分册[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 79.

[7] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修 主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 1 275—1 277.

[8] 顾关云. 薏苡仁的药理作用[J]. 中成药, 1994, 38(6): 205—206.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[9] Hikno H, Ishiyama M, Suzuki Y, *et al*. Mechanisms of hypoglycemic activity of gandodern B: a glycan of ganoderma lucidum fruit bodies[J]. Planta Medica, 1989, 55(2): 423—428.

[10] Kuhnle H F, Schmidt F H, Deaciuc I V, *et al*. *In vivo* and *in vitro* effects of a new hypoglycemic agent, 2-3-methylcinnamylhydzono)-propionate (BM 42.340) on glucose metabolism in guinea pigs[M]. Biochem Pharmacol, 1984, 33: 1 437—1 444.

[11] 周宜强 主编. 糖尿病研治新论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.60.

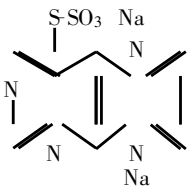
（编辑　陈聪连）

（上接 577 页）

叶红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)。实验采用三电极体系。聚四氟嵌装圆铂片(4 cm^2)为工作电极, 同样大小铂片为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极。

巯嘌呤(6-MP)为 Sigma 产品; 吡咯为 fluka 产品, 每次使用前经氮气氛蒸馏纯化。AT-1438 经 6-MP 合成[1,2], 溴化钾压片法红外光谱与文献[3]一致, 分光光度法测定其含量为 95.2%($E^{1\%}_{1cm}$ 按 351 计算[3])。

1.2　方法

磺巯嘌呤钠(AT-1438)·$2H_2O$ 极易溶于水, 且其药效部位为阴离子, 便于采用阳离子聚合物(聚吡咯)离子键合法进行控制释放。我们选用与 AT-1438 分子量相近的对甲苯磺酸钠(NaToS)作为聚吡咯的支持电解质, 以增大膜的表面积与孔径, 从而增大 AT-1438 的负载量。

聚吡咯(PPy/ToS)修饰电极由恒电位聚合而得。电解液为 0.1 mol/L 吡咯和 0.1 mol/L NaToS 的水溶液, 聚合电位 +0.6V, 聚合前通氮 20 min., 以除去溶液中的氧。膜厚由聚合过程中通过的电量来计算。聚合后, 电极在 0.1 mol/L NaCl 溶液中于 −1.0～+0.6V 内扫描进行预处理, 直至得到稳定循环伏安图, 使 Cl^- 尽可能与膜中 ToS^- 交换。然后将电位置于 −0.6V 直到电流减小到稳定值(约几个 μA), 使膜中 Cl^- 尽可能逸出。再将洗净的电极移入 0.1 mol/L AT-1438 水溶液中, 在 +0.6V 电位下, 使 AT-1438 掺入膜内。二次蒸馏水彻底冲洗电极后, 在 0.1 mol/L NaCl 溶液中, 控制电位为 −0.6V 以释放 AT-1438。释放液中 AT-1438 浓度由紫外-可见光谱法进行测定, 其最大吸收波长为 287 nm。

2　结果

2.1　AT-1438 稳定性

AT-1438 水溶液在 −1.0～+0.6V 电位范围内循环伏安无氧化还原峰; 且该水溶液经循环伏安处理后其 AT-1438 紫外峰位置、高度不变, 表明 AT-1438 在本实验条件下性质稳定。

2.2　AT-1438 负载与释放

本实验得到的 PPy/ToS 膜呈发亮的棕黑色。0.5 μm 厚的膜电极(PPy/ToS)与预处理后膜电极(PPy/Cl^-)负载、释放 AT-1438 所需时间分别为 20 min、3 min 与 8 min、3 min; AT-1438 释放量分别为 2.65×10^{-7} mol/L 与 1.46×10^{-6} mol/L。表明经 Cl^- 交换 ToS 预处理, 可显著提高 AT-1438 负载量, 缩短负载时间。

2.3　释放量与还原电位、膜厚的关系

实验发现随还原电位由正向负移, AT-1438 释放量由零逐渐增加。为保证 PPy 膜良好的循环伏安可逆性与 AT-1438 的稳定性, 我们选定 −0.6V 为释放电位。在相同的负载与释放条件下, 不同厚度的 PPy 膜 AT-1438 释放量不同, 见表 1。释放量随膜厚度增加而增大且呈现良好的线形关系, 表明 AT-1438 的掺杂可深入到膜的内部。

表 **1**　膜厚与释放量的关系

实验组	膜厚(l/μm)	释放量(C_B/mol·L^{-1})
1	0.5	1.46×10^{-6}
2	0.7	2.13×10^{-6}
3	0.9	2.69×10^{-6}
4	1.2	3.48×10^{-6}

研究结果表明, 利用 PPy 膜具有可逆的氧化还原态性质可以对阴离子抗癌药物 AT-1438 实现电化学控制释放, 且释放速度和释放量可由还原电位、还原电量进行控制。有关膜的孔穴结构对负载量的影响, 以及如何增大负载量以提高其实用性尚待进一步研究。

关键词: 电化学; 控制释放; 聚吡咯膜; 磺巯嘌呤钠
中图法分类号: R944.9　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 上海药物研究所, 中国科学院上海生物化学研究所, 上海第十二制药厂, 等. 溶癌呤(AT-1438)抗癌作用的研究[J]. 中国科学, 1977, 3: 281—288.

[2] Doarr I I, Wempen I, Clarke D A, *et al*. Thiation of nucleosides. III. oxidation of 6-mercaptopurines[J]. J Org chem, 1961, 26(10): 3 401—3 409.

[3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一九七七年版二部. 北京: 人民卫生出版社, 1979. 692—694 及附录: 163.

[4] 张文斌, 李一峻, 董绍俊. 电化学控制药物释放[J]. 分析化学, 1991, 19(70): 843—848.

[5] 李一峻, 董绍俊. 电化学控制释放三磷酸腺苷[J]. 化学学报, 1995, 53(2): 163—167.

[6] 黄　华, 刘柏峰, 董绍俊. 氟尿嘧啶的电化学控制释放[J]. 分析化学, 1996, 24(2): 130—134.

[7] Robert Langer. New methods of drug delivery[J]. Science, 1990, 249: 1 527—1 533.

（编辑　郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net